

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

DOTTORATO DI RICERCA IN
VIROLOGIA E BIOTECNOLOGIE MICROBICHE

XXII CICLO

Nuove strategie antimicrobiche contro rilevanti patogeni umani

Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Supervisore: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Co-Supervisore: Dott.ssa Sara Richter

Dottoranda: Ilaria Frasson

*Caminante,
son tus huellas el camino
y nada más.*

*Caminante,
no hay camino,
se hace camino al andar.
Al andar se hace el camino,
y al volver la vista atrás
se ve la senda que nunca
se ha de volver a pisar.*

*Caminante,
no hay camino,
sino estelas en la mar.*

*Antonio Machado
Proverbios y Cantares XXI*

INDICE

SOMMARIO	1
ABSTRACT	3
PREMESSA	5
SCOPO DELLA TESI	7

NEF, PROTEINA ACCESSORIA DI HIV-1: IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE DELLA DIMERIZZAZIONE ATTRAVERSO LA SELEZIONE DI INIBITORI SPECIFICI

1. INTRODUZIONE	11
1.1 HIV-1: virus dell'immunodeficienza acquisita	11
1.2 HIV-1: struttura	13
1.3 HIV-1: genoma	14
1.4 HIV-1: ciclo infettivo	17
1.5 La proteina accessoria di HIV-1: Nef	18
1.6 HIV-1 Nef: caratteristiche strutturali	19
1.6.1 Modificazioni post-traduzionali	21
1.6.2 Modificazioni strutturali	21
1.7 Ruolo e funzioni di Nef nel ciclo virale	24
1.7.1 Creazione di un ambiente favorevole alla replicazione virale	25
1.7.2 Stabilizzazione dei processi infettivi	27
1.7.3 Implementazione dell'infettività virale	27
1.8 Analisi dell'interazione proteina-proteina	28
1.8.1 Saggio del doppio ibrido	29
1.8.2 Complementazione della fluorescenza (BiFC)	32
2. MATERIALI E METODI	35
2.1 Materiali	35
2.2 Metodi	45
2.2.1 Preparazione di batteri elettrocompetenti	45
2.2.2 Trasformazione mediante elettroporazione	45
2.2.3 Preparazione di batteri chemocompetenti	45
2.2.4 Trasformazione chimica	46
2.2.5 Trasformazione chimica di cellule di lievito	46

2.2.6	Saggio di selezione con 3-AT	50
2.2.7	Saggio di attività beta-galattosidasi (saggio X-gal)	50
2.2.8	Estrazione del DNA plasmidico da lievito	51
2.2.9	Preparazione di DNA plasmidico con kit commerciali	52
2.2.10	Purificazione di DNA plasmidico per lisi alcalina	52
2.2.11	Reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR)	53
2.2.12	Sequenziamento	54
2.2.13	Restrizioni enzimatiche	55
2.2.14	Tecniche di clonaggio	55
2.2.15	Trasfezione transiente di HEK293T	56
2.2.16	Somministrazione dei composti (<i>small molecules</i>)	58
2.2.17	Preparazione del saggio BiFC	58
2.2.18	Microscopia confocale per BiFC	59
2.2.19	Immunofluorescenza indiretta	59
3.	RISULTATI	61
3.1	Premessa	61
3.2	Studio dell'interazione Nef-Dinamina 2	62
3.2.1	Verifica della capacità di Dinamina 2 di formare oligomeri <i>in vitro</i>	64
3.2.2	Verifica dell'interazione tra Nef e Dinamina 2	65
3.2.3	Localizzazione cellulare per immunofluorescenza	69
3.3	Valutazione del ruolo biologico della dimerizzazione di Nef	71
3.3.1	Verifica della capacità di Nef di formare oligomeri <i>in vitro</i>	71
3.3.2	Analisi delle regioni conservate in alleli diversi di Nef	73
3.3.3	Screening di una libreria combinatoriale peptidica	76
3.3.4	Analisi di una libreria di <i>small molecules</i> in cellule di mammifero	77
3.4	Analisi dell'interazione tra Nef ed altre proteine di HIV-1	80
4.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	83

MECCANISMI DI RESISTENZA AI CHINOLONI MEDIATI DA PLASMIDE (PMQR, *Plasmid Mediated Quinolone Resistance*) E SVILUPPO DI NUOVI ANTIBIOTICI ANTITOPISOMERASICI

1. INTRODUZIONE	87
1.1 Chemioterapia e antibiotici	87
1.2 Principali criteri di classificazione degli antibiotici	88
1.2.1 Inibizione della sintesi di parete	89
1.2.2 Inibizione della sintesi proteica	91
1.2.3 Distruzione della membrana cellulare	92
1.2.4 Antagonisti metabolici	92
1.2.5 Inibizione della sintesi degli acidi nucleici	93
1.3 Chinoloni	94
1.4 Fluorochinoloni	96
1.5 Proprietà chimico-fisiche dei fluorochinoloni	97
1.5.1 Solubilità in acqua	97
1.5.2 Acidità e basicità	98
1.5.3 Effetto chelante su cationi metallici	98
1.5.4 Fotoreattività	98
1.5.5 Tossicità	98
1.6 Relazione struttura-attività dei fluorochinoloni	99
1.7 Bersagli dei fluorochinoloni	100
1.7.1 DNA-Girasi	101
1.7.2 Topoisomerasi IV	104
1.8 Meccanismo d'azione dei chinoloni	105
1.9 Fenomeni di farmacoresistenza	105
1.9.1 Mutazioni a carico dei bersagli	106
1.9.2 Mutazioni a carico dei bersagli dei chinoloni: DNA-Girasi e Topoisomerasi IV	107
1.9.3 Over-espressione dei bersagli	109
1.9.4 Diminuzione dell'entrata del farmaco	109
1.9.5 Alterazione o rapido metabolismo del farmaco	110
1.9.6 Sviluppo di una via metabolica alternativa	111
1.10 Meccanismi di resistenza mediati da plasmidi	111
1.10.1 Protezione dei bersagli: geni <i>qnr</i>	112

1.10.1.1	<i>qnr</i> : caratteristiche	113
1.10.1.2	Qnr: caratteristiche e meccanismo d'azione	113
1.10.2	Inattivazione enzimatica per acetilazione: <i>aac(6')Ib-cr</i>	114
1.10.2.1	<i>aac(6')Ib-cr</i> : caratteristiche	115
1.10.2.2	Aac(6')Ib-cr: caratteristiche e meccanismo d'azione	115
1.10.3	Estrusione dalla cellula batterica del farmaco: <i>qepA</i>	115
1.10.3.1	<i>qepA</i> : caratteristiche	115
1.10.3.2	QepA: caratteristiche e meccanismo d'azione	116
1.11	Intorno genetico dei PMQR	116
1.12	Struttura, caratteristiche e classificazione degli integroni	117
1.13	Struttura, caratteristiche e classificazione dei transposoni	118
1.14	Simociclinone, SD8	118
2.	MATERIALI E METODI	121
2.1	Materiali	121
2.2	Metodi	125
2.2.1	Identificazione degli isolati clinici	125
2.2.2	Determinazione dell'antibiogramma	125
2.2.3	Estrazione del DNA totale	126
2.2.4	Reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR)	126
2.2.5	Sequenziamento	127
2.2.6	Estrazione di DNA plasmidico secondo il protocollo di Kieser	129
2.2.7	Elettroforesi su matrice di agarosio	129
2.2.8	Elettroforesi su matrice di agarosio megabase	130
2.2.9	Trasformazione batterica	130
2.2.10	Coniugazione batterica	130
2.2.11	Determinazione per microdiluizione della MIC ₅₀ all'SD8	131
2.2.12	Misura della frazione di SD8 assunta dalle cellule batteriche	132
3.	RISULTATI	135
3.1	Prevalenza della resistenza mediata da plasmide ai chinoloni	135
3.1.1	Resistenza mediata dai geni <i>qnr</i>	135
3.1.2	Resistenza mediata dal gene <i>aac(6')-Ib-cr</i>	136
3.1.3	Resistenza mediata dal gene <i>qepA</i>	137
3.1.4	Antibiogramma ai chinoloni degli isolati <i>qnr</i> -positivi	138
3.1.5	Antibiogramma ai chinoloni degli isolati <i>aac(6')-Ib-cr</i> -positivi	139

3.2	Verifica della presenza di ESBL	140
3.2.1	Verifica della presenza di ESBL negli isolati <i>qnr</i> -positivi	140
3.2.2	Verifica della presenza di ESBL negli isolati <i>aac(6')-Ib-cr</i> -positivi	141
3.3	Tipizzazione filogenetica clonale degli isolati <i>qnr</i> -positivi	142
3.4	Presenza di mutazioni cromosomiche	143
3.4.1	Presenza di mutazioni nei bersagli dei chinoloni in isolati <i>qnr</i> -positivi	143
3.4.2	Presenza di mutazioni nei bersagli dei chinoloni in isolati <i>aac(6')-Ib-cr</i> -positivi	145
3.5	Profilo elettroforetico	145
3.5.1	Profilo elettroforetico dei plasmidi codificanti i geni <i>qnr</i>	145
3.5.2	Profilo elettroforetico dei plasmidi codificanti i geni <i>aac(6')-Ib-cr</i>	147
3.6	Trasferibilità della resistenza	148
3.6.1	Plasmidi <i>qnr</i>	149
3.6.2	Plasmidi <i>aac(6')-Ib-cr</i>	151
3.7	Determinazione dell'intorno genetico del gene <i>qnrB19</i>	152
3.8	Simocliclinone (SD8): analisi dell'efficacia e del meccanismo d'azione	154
3.8.1	Efficacia della somministrazione di SD8	155
3.8.2	Valutazione della diversa permeabilità cellulare al simocliclinone	158
4.	DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	159
	ABBREVIAZIONI	163
	BIBLIOGRAFIA	165

SOMMARIO

Nonostante l'ultimo secolo sia stato caratterizzato da un'intensa ed efficace attività di prevenzione e trattamento farmacologico, l'incidenza delle patologie di origine infettiva, che causano la morte di 13 milioni di individui ogni anno, continua a destare forte preoccupazione, rimanendo uno dei problemi maggiori per la sanità pubblica mondiale. Il lavoro svolto in questa tesi è stato sviluppato su due argomenti di rilevante interesse in questo periodo, le infezioni da HIV-1 e la diffusione della resistenza ai farmaci antimicrobici.

La prima parte del lavoro ha analizzato il ruolo biologico della dimerizzazione di Nef, proteina accessoria di HIV-1, funzione già dimostrata avvenire *in vivo*, ma finora non approfonditamente caratterizzata. Ritenendo che l'inibizione della formazione di oligomeri possa essere un'innovativa e promettente strategia antivirale, sono stati selezionati composti chimici e piccoli peptidi, che interferiscono con l'interazione Nef-Nef *in vitro*. L'analisi dei residui amminoacidici della proteina oggetto di studio, coinvolti nel legame ai composti, darà precise indicazioni sulla regione coinvolta nella formazione degli oligomeri, regione ancora non definita dai precedenti lavori presenti in letteratura. Inoltre, la somministrazione delle molecole a cellule infettate dal virus HIV-1, rivelerà quali siano le conseguenze dell'inibizione della dimerizzazione di Nef sul ciclo infettivo virale.

La seconda parte del lavoro ha, invece, riguardato la determinazione della prevalenza della resistenza ai fluorochinoloni negli isolati di *Enterobacteriaceae* all'interno della nostra regione. Sono stati presi in considerazione i meccanismi di resistenza mediati da plasmide (PMQR). Si tratta di tipologie di resistenza recentemente descritte, ad ampia e rapida diffusione in tutto il mondo, spesso in correlazione con ESBL (Extended Spectrum Beta Lactamase), che stanno destando notevole preoccupazione in ambito clinico. Lo studio svolto ha rivelato che si tratta di plasmidi largamente diffusi anche nella nostra regione, che in molti casi veicolano resistenza a più classi di antibiotici, ad esempio chinoloni e beta-lattamici. Vista, inoltre, l'importanza di individuare nuove efficaci molecole ad attività antimicrobica, è stata analizzata l'attività farmacologica e il meccanismo d'azione dell'antibatterico simociclinone (SD8). È stato dimostrato che SD8 abbia un ampio spettro d'azione, agendo sia su ceppi batterici Gram positivi che Gram negativi, e sia un buon candidato per lo sviluppo di un nuovo farmaco antitopoisomerasico.

ABSTRACT

Despite a century of often successful prevention and treatment efforts, infectious diseases remain an important global problem in public health, causing over 13 million deaths each year. This work has been developed on two areas of major concern nowadays: HIV-1 infection and emerging antimicrobial resistance.

The first part of this thesis focused on the definition of the biological role of the dimerization of Nef, HIV-1 accessory protein. This function has been reported to take place *in vivo*, nevertheless it hasn't been well characterized yet. We believe that the inhibition of Nef oligomerization may become an innovative and successful antiviral therapy. For this reason, we screened two different libraries of small molecules and peptides, to discover compounds hindering Nef-Nef interaction *in vitro*. The characterization of the viral protein aminoacidic residues taking part in the interaction with the compounds will provide precise indications about the dimerization surface. This region has not been identified unambiguously yet. Moreover, the administration of small molecules to HIV-1 infected cells will shed light on the effects of Nef dimerization inhibition on the viral life and infectious cycle.

The second part of this work, aimed at determining the prevalence of fluoroquinolone resistance in *Enterobacteriaceae* samples, within our region. We focused our attention on the recently discovered plasmid-mediated mechanisms (PMQR). In the recent years, PMQR have spread rapidly all over the world, causing serious health concern, as they are often linked to both quinolone resistance and ESBL, giving rise to multi-resistant strains. Our study proved the large diffusion of these resistance determinants in the North East Italy. Furthermore, as the identification of new effective antimicrobial drugs is gaining more and more importance recently, we analysed the pharmacological activity and the mechanism of action of simocyclinone (SD8), a new antibiotic. SD8 has been demonstrated to have a broad spectrum of action, affecting both Gram positive and Gram negative bacterial species, so SD8 is likely to become a new antitopoisomerase drug.

PREMESSA

Con il corso degli anni è aumentato a dismisura il consumo di farmaci antimicrobici. Nonostante ciò le malattie infettive di origine microbica restano una delle cause principali di malattia e di morte nel mondo. Con la dicitura “di origine microbica” si individua un'ampia classe di patologie la cui eziologia dipende dalla colonizzazione dell'ospite, sia esso umano o animale, da parte di organismi procariotici (principalmente batteri) o da parte di parassiti obbligati come i virus. In molti casi è possibile riscontrare la contemporanea presenza di più specie, per deplezione del sistema immunitario dell'ospite.

Ultimamente si è assistito ad un aggravamento del problema, con aumento della frequenza di patologie ad eziologia multipla non trattabili, legato alla diminuzione di efficacia dei farmaci attualmente di maggior uso in pratica clinica, dal diffondersi di organismi patogeni particolarmente infettivi e dalla quasi totale mancanza di nuovi agenti terapeutici.

Nel corso degli ultimi anni gli organismi deputati al controllo della diffusione delle infezioni a livello nazionale ed europeo, come il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), l'Agenzia europea per i medicinali (EMA) e il comitato scientifico della Commissione europea sui rischi sanitari emergenti e recentemente identificati (SCENIHR) hanno pubblicato numerosi pareri scientifici congiunti sull'aggravarsi dello sviluppo e della diffusione della resistenza antimicrobica (AMR), nonché delle infezioni batteriche e virali, a rapida trasmissione, a carico degli esseri umani, con l'insorgere di pandemie e zoonosi.

La conclusione cui si giunge è che sia necessario, da un lato, comprendere i meccanismi di sviluppo e trasmissione della resistenza ai farmaci di uso comune, dall'altro sviluppare nuovi farmaci antimicrobici ricorrendo a nuove strategie, al fine di ottenere molecole fortemente attive, specifiche e che diano difficilmente luogo all'insorgenza di resistenza.

Il lavoro presentato in questa tesi si è occupato dello studio di strategie antimicrobiche presenti nella clinica o in fase di sviluppo verso due importanti patogeni nell'uomo:

HIV-1: virus che ogni anno infetta un numero crescente di individui, causando una sindrome immunosoppressiva caratterizzata dall'insorgenza di numerose super-infezioni batteriche. L'attenzione è stata posta sulla proteina accessoria Nef, peptide che svolge un ruolo cruciale nell'instaurare un ciclo infettivo efficiente e produttivo. L'individuazione di inibitori specifici di alcune funzioni svolte da Nef

sembra essere una promettente strategia antivirale ancora inesplorata.

Enterobacteriaceae: classe che racchiude un'ampia gamma di specie batteriche che danno luogo ad infezioni principalmente dei tratti urinario, gastroenterico e polmonare. Lo studio è stato focalizzato sulla messa a punto di nuovi antibatterici, nonché sulla caratterizzazione dei meccanismi di resistenza ai farmaci esistenti e alla loro diffusione nel nostro distretto geografico.

Vista la diversità tra le due specie di microrganismi, la tesi è stata sviluppata in due sezioni separate: la prima riguardante Nef di HIV-1 e nuove molecole antivirali, la seconda focalizzata sulle infezioni batteriche, resistenza ai chinoloni e sulla caratterizzazione di una nuova classe di antibiotici.

SCOPO DELLA TESI

I PARTE

NEF, PROTEINA ACCESSORIA DI HIV-1 - IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE DELLA DIMERIZZAZIONE ATTRAVERSO LA SELEZIONE DI INIBITORI SPECIFICI

Il virus dell'immunodeficienza acquisita (HIV-1) è causa dell'insorgenza di una patologia, ormai nota da decenni come AIDS (*Acquired ImmunoDeficiency Syndrome*), caratterizzata dalla deplezione, in primo luogo, dei linfociti T citotossici e, a lungo andare, dalla completa inefficienza dell'intero sistema immunitario nell'affrontare anche banali infezioni batteriche. Il genoma virale codifica una piccola proteina accessoria, chiamata Nef, che gioca un ruolo chiave nell'instaurare un ciclo virale ad alto titolo replicativo e fortemente infettivo. A Nef sono state attribuite numerose attività, molte delle quali dipendono dall'interazione con proteine della cellula ospite. Solo recentemente è stata avanzata l'ipotesi che questa proteina non agisca sempre in forma monomeric, come si è sempre pensato, ma che, per lo svolgimento di molte funzioni attribuitegli, Nef si organizza in forma dimerica od oligomeric. Resta, comunque, ancora da chiarire quale sia il ruolo biologico svolto dalla dimerizzazione di Nef. Allo stesso modo non sono stati ancora individuati in modo univoco i residui amminoacidici implicati nell'interazione tra due monomeri della proteina.

Alla luce di quanto appena descritto, lo scopo di questa prima parte del lavoro è stato quello di analizzare il ruolo svolto dalla dimerizzazione di Nef, attraverso la selezione in sistemi eucariotici di inibitori specifici, peptidi e small molecules, in modo da poter da un lato evidenziare gli effetti della mancata dimerizzazione di Nef sul ciclo virale, dall'altro avere a disposizione nuovi agenti terapeutici con un innovativo meccanismo d'azione.

II PARTE

MECCANISMI DI RESISTENZA AI CHINOLONI MEDIATI DA PLASMIDE (PMQR, *Plasmid Mediated Quinolone Resistance*) E SVILUPPO DI NUOVI ANTIBIOTICI ANTITOPISOMERASICI

Gli Enterobatteri, famiglia delle *Enterobacteriaceae*, includono un numero ampio di batteri, il cui habitat naturale è costituito dall'intestino umano. Danno generalmente luogo a blande infezioni, facilmente trattate con terapia antibiotica. Nella comune pratica clinica, i chinoloni, e i più recenti fluorochinoloni, sono la classe di antibatterici maggiormente prescritta, presentando una buona azione battericida ad ampio spettro. Tuttavia, nel corso degli ultimi anni, si sono sviluppati, e velocemente diffusi, numerosi meccanismi di resistenza a questa classe di farmaci. Alcuni di questi sono codificati da geni presenti su plasmidi che vengono rapidamente e facilmente scambiati da una specie batterica all'altra, dando luogo ad un aumento esponenziale di ceppi batterici multiresistenti, difficilmente trattabili farmacologicamente.

Lo scopo di questa seconda parte del lavoro, è stato la determinazione della prevalenza, nonché la caratterizzazione dei meccanismi di resistenza ai chinoloni mediata da plasmidi, all'interno della nostra regione geografica. In secondo luogo è stato provata l'efficacia e il meccanismo d'azione del simociclinone (SD8), nuovo promettente farmaco antibatterico, che in modo simile ai chinoloni, ha come bersaglio i membri della famiglia delle Topoisomerasi II.

I PARTE

**NEF, PROTEINA ACCESSORIA DI HIV-1:
IDENTIFICAZIONE DEL RUOLO FUNZIONALE
DELLA DIMERIZZAZIONE ATTRAVERSO LA
SELEZIONE DI INIBITORI SPECIFICI**

1. INTRODUZIONE

1.1 HIV-1: virus dell'immunodeficienza acquisita

Tra la fine degli anni '70 e l'inizio degli anni '80 veniva descritta una nuova sindrome da immunodeficienza caratterizzata dalla deplezione dei linfociti T CD4+ circolanti, linfadenopatia generalizzata, infezioni opportunistiche, quali polmoniti batteriche, encefaliti toxoplasmiche, retiniti citomegalovirus-associate, meningiti cocciche ed aumento dell'incidenza di alcune neoplasie, come il sarcoma di Kaposi e i linfomi non Hodgkin [1]. La nuova malattia colpiva prevalentemente alcune categorie di persone, come gli omosessuali (soprattutto maschi), i consumatori di droghe a somministrazione intravenosa, gli affetti da patologie che necessitavano di trasfusioni, come gli emofiliaci, oltre ai partner sessuali e i figli delle categorie elencate [1, 2]. Il quadro epidemiologico fece ipotizzare che la sindrome, successivamente chiamata AIDS (*Acquired ImmunoDeficiency Syndrome*), fosse contagiosa e causata da un nuovo agente patogeno. La trasmissione doveva avvenire prevalentemente per via ematica o attraverso lo scambio di liquidi fisiologici infetti, ad esempio durante i rapporti sessuali non protetti. Tra il 1981 e il 1983 numerosi microrganismi furono proposti come possibili agenti eziologici, finchè l'attenzione fu attirata da una classe di virus che infettava preferenzialmente le cellule del sistema immunitario. Nel 1983 fu isolato, presso l'istituto Pasteur di Parigi, un retrovirus dai linfonodi di un paziente affetto da linfadenopatia, successivamente un retrovirus citopatico T-tropico (HTLV, *Human T-Lymphotropic Virus*) fu isolato da un paziente affetto da AIDS presso in National Institute of Health degli Stati Uniti. Gli agenti virali individuati presentavano delle caratteristiche comuni: una Trascrittasi inversa magnesio-dipendente e apparivano come retrovirus in microscopia elettronica. Inizialmente il nuovo virus, associato all'AIDS, fu chiamato LAV (*Lymphadenopathy-Associated Virus*), quindi HTLV-III (*Human T-cell Leukaemia Virus*) ed infine HIV (*Human Immunodeficiency Virus*), quando nel 1986 l' International Committee on Taxonomy of Viruses raccomandò che fosse dato un nome indipendente al nuovo patogeno [3, 4].

HIV appartiene alla famiglia dei *Retroviridae* e al genere *Lentivirus* che è composto da virus che causano patologie a lenta insorgenza e decorso. Attualmente sono note due varianti virali legate all'AIDS, HIV-1 e HIV-2: HIV-1 è diffuso in tutto il mondo ed è responsabile della maggior parte dei casi di contagio e malattia, HIV-2, invece, presente in alcune regioni dell'Africa e dell'America meridionale, è

caratterizzato da una minor virulenza e porta allo sviluppo più lento della malattia [5]. Sono stati identificati virus analoghi, associati a patologie simili in specie diverse, i più studiati sono stati SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*) e FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*), che causano patologie rispettivamente nelle scimmie e nei felini. L'analisi comparativa dei genomi di HIV-1, HIV-2 e SIV ha permesso di individuare le relazioni filogenetiche tra i tre, e di evidenziare le regioni conservate ed omologhe. È ormai ritenuta valida l'ipotesi che HIV-1 e HIV-2 siano derivati, nel corso dei secoli, dal progenitore comune SIV, attraverso il contagio accidentale tra l'uomo e le scimmie [6]. Sulla base di alcune differenze genetiche tra HIV-1 e HIV-2 è stato possibile determinare che HIV-1 derivi da un sottotipo di SIV, chiamato SIVcpz perché colpisce gli scimpanzé, mentre HIV-2 discenda da un secondo sottotipo, SIVsmm (*sooty mangabeys monkeys*). Le successive analisi filogenetiche hanno permesso di raggruppare i virus in sottotipi genetici o *clades* [7]. Per HIV-1 sono stati individuati tre gruppi: M (*major*), O (*outlier*) ed N (*non-M, non-O*). Il gruppo M, che comprende la maggioranza dei virus responsabili della patologia, è ulteriormente distinto in almeno 11 *clades*, indicate con le lettere da A a K [8]. L'Italia (insieme alla maggior parte dei paesi europei e degli U.S.A.) è, al momento, quasi esclusivamente infettata dal sottotipo B. In particolare i virus del gruppo M sembrano il risultato di un unico evento di trasmissione scimpanzé-uomo seguito da un'evoluzione divergente dei vari sottotipi. Al contrario, i virus O ed N sembrano derivare da successivi ed indipendenti eventi di trasmissione. Il meccanismo di contagio più frequente tra un soggetto infetto ed uno sano risulta essere prevalentemente lo scambio per via sessuale o parenterale di sangue o altri liquidi biologici, contenenti sia virus libero che cellule infette. Inoltre è stata documentata la trasmissione verticale dalla madre infetta al feto, in corso di gravidanza. L'infezione primaria può essere asintomatica o può manifestarsi dopo qualche settimana come malattia infettiva acuta, caratterizzata da uno stato febbrile, accompagnato dal rigonfiamento ghiandolare e da sintomi simili a quelli di una mononucleosi infettiva ad esito benigno [9]. La fase post-infettiva, detta fase acuta, è caratterizzata dalla comparsa della viremia ed è seguita da un'intensa risposta immunitaria. Questa media il sequestro del virus negli organi linfoidi periferici, con inizio di una fase cronica asintomatica, che può durare per molti anni. In questa fase il virus si trova integrato nel genoma delle cellule ospiti, in fase latente. Solo in alcune cellule il virus si replica attivamente dando origine ad una progenie infettiva che determina l'espansione dell'infezione [10]. Con l'andare del tempo si genera un danno irreversibile caratterizzato dal progressivo

calo del numero di linfociti T CD4⁺ circolanti fino alla comparsa delle manifestazioni cliniche della patologia. È la progressiva compromissione dell'attività del sistema immunitario a portare a morte l'individuo infettato per l'insorgenza di numerose infezioni opportunistiche e/o di sindromi neoplastiche. È possibile anche individuare alcuni individui infetti che non arrivano mai alla fase di malattia conclamata o comunque presentano un periodo di incubazione asintomatica più lungo del normale, con stabili livelli di linfociti T circolanti. Questi pazienti vengono definiti *long-term non progressors* e rappresentano una speranza, dando la possibilità di comprendere maggiormente alcuni meccanismi infettivi, di poter individuare nuove strategie antivirali [11-13].

1.2 HIV-1: struttura

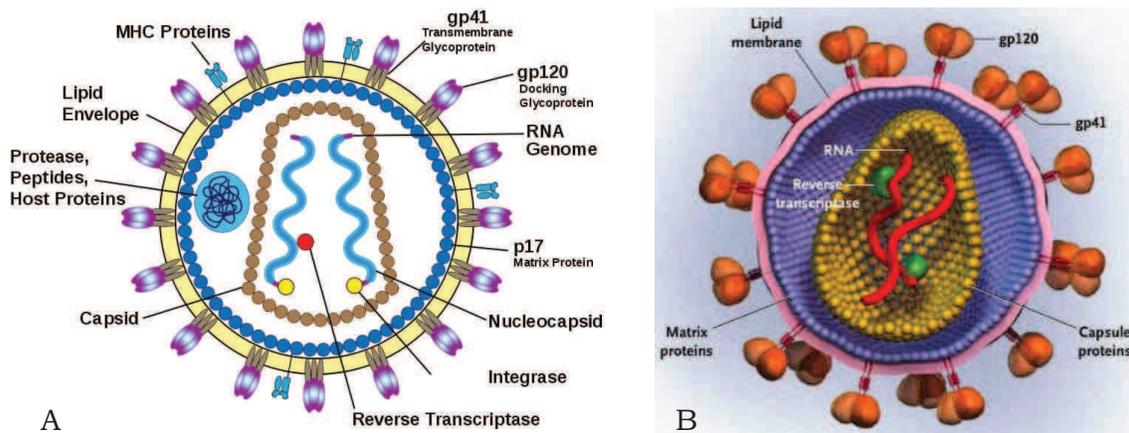


Fig. 1.1 – HIV-1 struttura del virus. A: rappresentazione schematica di una particella virale in cui si possono individuare le caratteristiche principali che fanno classificare HIV-1 nel genere *Lentivirus* della famiglia *Retroviridae*: il genoma è costituito da acido ribonucleico e dalla presenza di una Trascrittasi inversa. B.: illustrazione tridimensionale di una sezione della particella virale che mostra come sia racchiusa da un doppio strato lipidico, derivato dalla cellula ospite, in cui si inseriscono le proteine di superficie gp41 e gp120. L'acido nucleico si trova racchiuso in una struttura proteica detta *core*.

HIV-1 ha una forma simil-sferica con un diametro compreso tra i 100 e i 120 nm. E' costituito da un involucro esterno pericapsidico, chiamato anche envelope, e da una struttura interna detta nucleocapside. Il pericapside è formato da un doppio strato proteo-glico-lipidico acquisito, durante la gemmazione, dalla membrana cellulare dell'ospite. A livello dell'envelope si inseriscono anche le glicoproteine virali, rispettivamente chiamate gp41 e gp120 a causa del loro peso molecolare, che fungono da recettori per il riconoscimento e l'attacco al bersaglio [14, 15]. Gp41 è una proteina transmembrana (detta anche TM, *transmembrane*) altamente

glicosilata, caratterizzata da due domini ad alpha-elica extracellulari, un tratto transmembrana e due domini elicoidali citoplasmatici. Gp120 (proteina di superficie o SU) si trova all'esterno del virione, ed è ancorata alla gp41, con formazione di un eterodimero, per mezzo di covalenti. La superficie interna pericapsidica è rivestita da una proteina di matrice (MA o p17), associata ad doppio strato lipidico funge da sostegno-protezione, oltre a svolgere un ruolo importante durante le fasi di assemblaggio delle nuove particelle [16].

Il nucleocapside, o core, di forma simil-cilindrica con un diametro che va dai 20 nm di un'estremità ai 40-60 nm dell'altra, è composto dalla proteina p24 (detta CA, *core antigen*). Il nucleocapside racchiude e protegge ulteriormente il genoma virale [17].

1.3 HIV-1: genoma

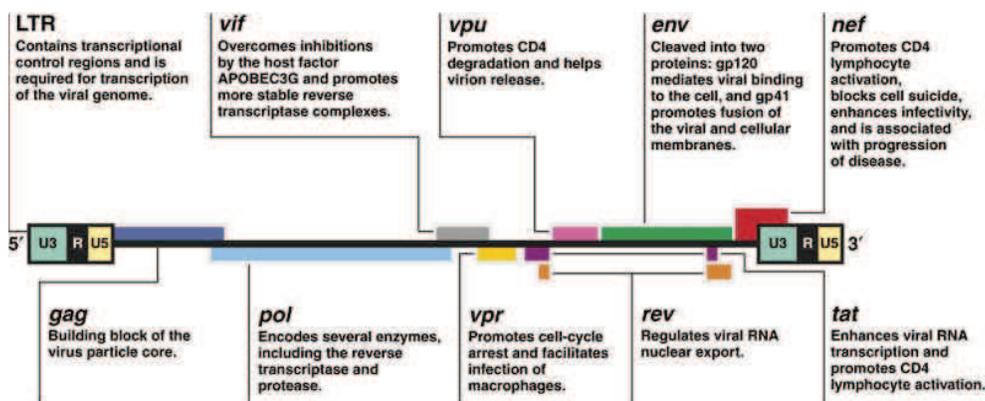


Fig. 1.2 – HIV-1 genoma. Il genoma di HIV-1 codifica numerose proteine, la cui localizzazione lungo il filamento di RNA è riportata nella rappresentazione schematica. Per ogni regione vengono definite le principali funzioni: LTR, controllo trascrizionale del genoma virale; *vif*, promuove la retrotrascrizione e blocca l'azione di APOBEC3G; *vpu*, media la degradazione di CD4 e facilita il rilascio delle nuove particelle; *env*, dà origine alle glicoproteine di membrana implicate nell'attacco e fusione alla membrana dell'ospite; *nef*, modula a favore della replicazione virale molte funzioni cellulari dell'ospite, aumentando l'infettività; *gag*, codifica le proteine della matrice e del core; *pol*, dà origine agli enzimi virali, Integrasi e Retrotrascrittasi; *vpr*, facilita l'infezione agendo sul ciclo cellulare; *rev*, regola il processamento del genoma virale; *tat*, implementa la trascrizione del genoma virale e attiva il ciclo cellulare.

Il genoma virale è composto da due copie di RNA a singolo filamento (ssRNA), strettamente complessate, anche se in modo non specifico, con due nucleoproteine (NC, p7 e p9), fortemente basiche. In questo modo l'acido nucleico viene protetto dalle nucleasi oltre che compattato all'interno del nucleo virale. Oltre al genoma virale, il core, contiene anche altre componenti proteico-enzimatiche necessarie alla replicazione virale: (a) una proteasi (PR, p11), (b) una Trascrittasi inversa eterodimerica Mg²⁺-dipendente (RT, subunità p66 e p51) ed

una endonucleasi-Integrasi (IN o p32).

L'acido nucleico virale, lungo circa 9 Kb, è composto da due molecole di RNA a polarità positiva dotate di CAP al 5' e poliadenilate all'estremità 3'. I due filamenti sono associati alle due estremità 5' per mezzo di legami idrogeno tra basi complementari in modo da formare una struttura speculare. Le due estremità di ciascun filamento vengono definite LTR (*Long Terminal Repeats*) e sono costituite da sequenze ripetute (U3-R-U5) altamente conservate, che contengono le informazioni necessarie all'integrazione nel genoma della cellula ospite e alla trascrizione. Un'unità di tRNA_{Lys} è appaiata a ciascun RNA, fungendo da innesco per la replicazione. In totale sono individuabili 9 *Open Reading Frames* (ORF), i cui prodotti sono classificabili come geni strutturali o geni ausiliari, ulteriormente suddivisi in transattivatori ed accessori [18]:

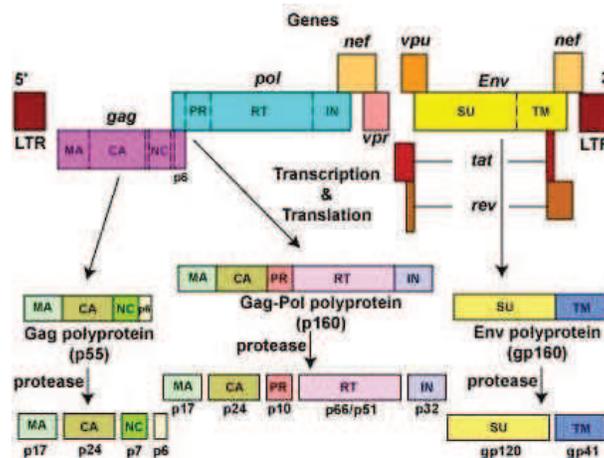


Fig. 1.3 – HIV-1 ORF. Rappresentazione dei nove *Open Reading Frames* (ORF), *gag*, *env*, *pol*, *tat*, *rev*, *vpu*, *vif*, *vpr* e *nef*, che compongono il genoma virale. *Gag*, *pol* ed *env* vengono trascritti come precursori, successivamente processati per dare origine alle proteine strutturali, agli enzimi virali ai componenti della membrana esterna.

“*Structural genes*”

gag: proteine del capsid, della matrice e del core

pol: enzimi necessari alla replicazione virale

env: glicoproteine di superficie e transmembrana

Sono presenti tre principali sequenze strutturali: *gag*, *pol* ed *env*, ciascuna delle quali va incontro a successivi eventi proteolitici, originando varie proteine virali. Il primo trascritto virale è un unico mRNA da cui derivano i precursori poliproteici Gag, Gag-Pol ed Env. *gag* dà quindi origine a p24 (CA), p17 (MA), p7 (NC), p6 (Proline-rich) e a due piccoli peptidi “*spacer*” p2 e p1. *pol* codifica gli enzimi essenziali alla sopravvivenza virale, la proteasi (PR), la trascrittasi inversa (RT),

l'Integrasi (IN). Poco prima dell'incapsidazione dei nuovi virioni vengono prodotte le proteine di superficie dell'envelope, gp120 e gp41, grazie ad un singolo evento di *splicing* del precursore gp160 (Env mRNA) [17].

“*Transactivation genes*”

tat: *Trans-activator of transcription*, codifica Tat, che promuove la trascrizione virale legando Tat Responsive RNA Element (TAR)

rev: *Regulator of virion*, codifica Rev, che regola il trasporto dell'RNA virale e il suo processamento attraverso il legame a Rev Responsive RNA Elements (RRE)

HIV-1 codifica un'ampia varietà di proteine regolatorie ed accessorie, le prime sono fattori chiave che assicurano la replicazione virale, le seconde sono responsabili della patogenesi virale nell'ospite, assicurando l'instaurarsi di un ciclo infettivo altamente efficiente[18].

La proteina regolatoria **Tat** è un potente attivatore trascrizionale della porzione U3 dell'LTR, che funge da promotore per la replicazione del provirus integrato. Tat agisce principalmente come fattore di stabilizzazione dell'elongazione dei trascritti virali nascenti [19, 20].

La seconda proteina regolatoria è **Rev**, che in associazione con altri peptidi cellulari, facilita il passaggio dei lunghi messaggeri virali non processati nel citoplasma dell'ospite, dove verranno sintetizzati i peptidi virali funzionali [21].

“*Accessory genes*”

nef: *Negative factor*, codifica Nef, fattore necessario alla replicazione virale. Nef lega numerose proteine dell'ospite, modulando molteplici processi cellulari a favore dell'infezione

vpu: *Viral Protein U*, porta alla formazione di una proteina che promuove la gemmazione delle nuove particelle virali

vif: *Virion Infectivity Factor*, dà origine a Vif, peptide che facilita la maturazione virale

vpr: *Viral Protein R*, codifica Vpr, proteina necessaria alla replicazione virale

Le proteine accessorie di HIV-1 modulano molti processi virali, dall'attivazione della cellula ospite, alla produzione di nuove particelle virali infettive.

Nef è forse la proteina che svolge, interagendo con numerose molecole cellulari, i ruoli più svariati, dall'instaurazione del ciclo infettivo alla sua progressione a patologia conclamata.

Vpu aumenta l'infettività virale facilitando il rilascio di nuove particelle, provocando un abbassamento dei livelli di molecole CD4 in membrana, per rapida degradazione all'uscita dal reticolo endoplasmico [22].

Vif implementa l'infettività virale promuovendo la sintesi del DNA provirale e inibendo l'attività di degradazione delle citidina deaminasi cellulare (APOBEC3G). Se Vif non è presente l'incorporazione di APOBEC nei virioni neosintetizzati fa sì che venga ostacolata la replicazione del genoma virale nella fase che segue l'entrata nella nuova cellula ospite per l'apporto di numerose modifiche lungo i filamenti di RNA [23, 24].

Vpr viene prodotta durante la fase finale del ciclo replicativo e media il trasporto nel nucleo del complesso pre-integrazione (PIC, *Pre Integration Complex*). Vpr, inoltre, arresta il ciclo cellulare in fase G2, in modo da attivare le regioni LTR del virus integrato, aumentando l'efficienza di infezione [25].

1.4 HIV-1: ciclo infettivo

Il riconoscimento e l'attacco al bersaglio dipende dall'interazione tra il virus ed i recettori cellulari: l'interazione tra la glicoproteina gp120 virale e il recettore CD4 e i co-recettori CCR5 o CXCR4, media l'attacco alla membrana cellulare e determina il tropismo virale. L'interazione tra queste proteine induce la dislocazione della gp120 e l'esposizione dei domini della gp41 che interagiscono con i fosfolipidi di membrana, iniziando il processo di fusione e di entrata. Una volta penetrata la cellula ospite, la particella virale viene spogliata del pericapside e il genoma viene liberato nel citoplasma associato alle poliproteine che ne mediano la trascrizione. L'RNA viene dapprima retro-trascritto in DNA complementare a doppio filamento (cDNA), quindi trasportato nel nucleo, dove, per azione dell'Integrasi virale e di fattori cellulari, viene incorporato nel genoma dell'ospite. In questa forma "provirale" vengono trascritti ed espressi numerosi geni virali, che una volta tradotti e processati svolgono il loro ruolo funzionale. Se viene innescato un ciclo virale produttivo, anche l'intero genoma virale viene trascritto e le particelle neoformate vengono rilasciate per gemmazione [17, 26].

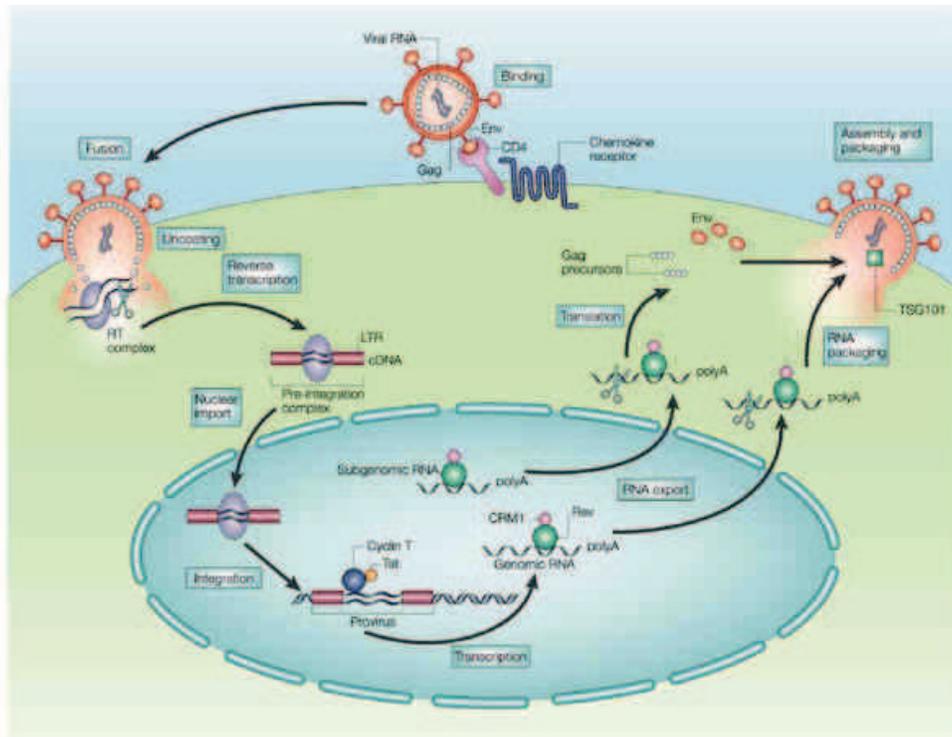


Fig. 1.4 – HIV-1 ciclo infettivo. A seguito del legame con i recettori e i co-recettori di superficie e della fusione alla membrana cellulare, il core penetra nella cellula ospite, liberando il genoma virale nel citosol. La Trascrittasi inversa sintetizza il DNA provirale che viene trasportato nel nucleo, dove, per azione dell'Integrasi, si inserisce nel genoma cellulare. Inizia, quindi, l'espressione del genoma di HIV-1, con successiva sintesi, maturazione e rilascio di nuova progenie virale.

1.5 La proteina accessoria di HIV-1: Nef

Come precedentemente descritto il genoma di HIV-1 è formato da 9 *Open Reading Frames*, in particolare la regione codificante Nef, proteina accessoria, si trova in prossimità della porzione 3' LTR, parzialmente sovrapposta a quest'ultima e al gene *env* e porta all'espressione di un piccolo peptide del peso molecolare di 27-35 KDa (circa 200 amminoacidi) che svolge numerose funzioni durante il ciclo virale e la patogenesi, la cui definizione è in continuo aggiornamento. Il gene viene estensivamente espresso durante le prime fasi infettive, la proteina si localizza soprattutto a livello della membrana, grazie alla miristilazione del suo N-terminale. La regione C-terminale, contenendo un dominio di riconoscimento del colesterolo, media la localizzazione di Nef anche in regioni cellulari ricche in lipidi. Inoltre, la proteina può essere presente a livello citosolico, del reticolo Trans-Golgi (TGN) e, se pur in minor quantità, nel nucleo.

Nef viene anche incorporata nei virioni di nuova sintesi [18].

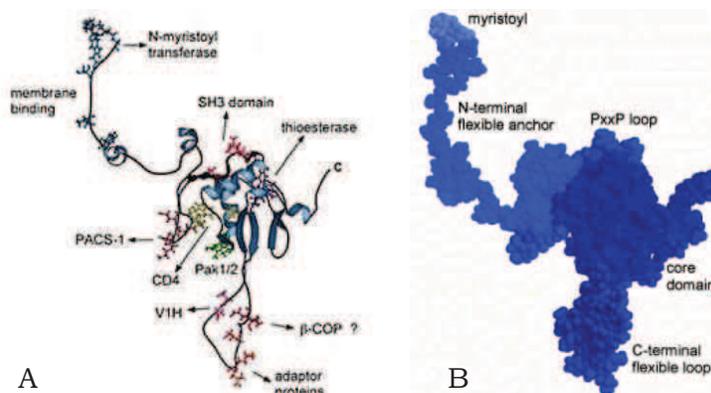


Fig. 1.5 – Nef, proteina accessoria di HIV-1: A.: modello strutturale della proteina virale Nef, in cui vengono indicati i siti di legame con i partners cellulari principali. B.: modello tridimensionale in cui vengono evidenziati i motivi strutturali caratteristici e conservati della proteina: l’N-terminale miristoilato, la regione ricca in residui di prolina, il dominio centrale e il C-terminale.

1.6 HIV-1 Nef: caratteristiche strutturali

Nef di HIV-1 è costituito da 206 residui amminoacidici, non possiede alcuna attività enzimatica, è stato quindi ipotizzato che svolga tutte le funzioni attribuitegli legando numerosi partner cellulari. Le regione codificante è molto conservata e la proteina contiene numerosi domini di riconoscimento che non vanno incontro a modifiche. Queste caratteristiche sono state rivelate dall'analisi del grado di omologia di sequenza tra 186 diversi ceppi virali appartenenti a diversi sottotipi di HIV-1 [27].

I domini conservati sono: (a) il sito di miristilazione, MGxxxS1; (b) la regione acidica, E62EEE; (c) il motivo di-leucinico, L164L; (d) il dominio ricco in proline, P72xxP e (e) il motivo di-argininico, R105R.

A causa delle ampie regioni esposte al solvente, che si strutturano, a volte, in modo non ordinato, è stato difficile ottenere un immagine chiara tridimensionale dell'intera proteina. Molte informazioni strutturali sono state ottenute mediante analisi cristallografica ed NMR, di frammenti o domini della proteina, unite poi a formare un quadro completo.

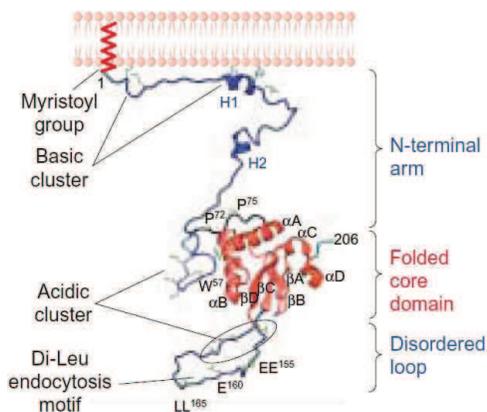


Fig. 1.6 - HIV-1 Nef. Rappresentazione schematica della proteina virale associata alla membrana della cellula ospite grazie all'N-terminale miristoilato. Viene riportata anche la suddivisione nei tre domini principali: N.terminale, core e C-terminale.

Si può, quindi, osservare un braccio N-terminale flessibile e poco conservato lungo circa 70 residui amminoacidici, seguito da un core strutturato e conservato, in tutti gli alleli di Nef caratterizzati, di 120 residui che comprende un loop di 30 amminoacidi (residui 148-178) che sporge verso l'esterno. Nef di HIV-2 e SIV sono composti da un'ulteriore coda C-terminale di 10-30 residui [28, 29].

Il core è l'unica parte della proteina che si ripiega assumendo una struttura terziaria stabile. Questa regione è stata caratterizzata sia in forma libera che legata a domini SH3 (*Src Homology 3*) di altre proteine, e consta di un dominio "alpha-beta" in cui un foglietto beta centrale antiparallelo, costituito da quattro filamenti, è affiancato, in corrispondenza della sua regione N-terminale, da due alpha-eliche antiparallele e, in corrispondenza della regione C-terminale, da due alpha-eliche brevi. Inoltre, è distinguibile una sequenza ricca in residui di prolina (P69xxPxxPxxP78), che assume una conformazione ad elica sinistrorsa [30].

Nef è composto da due regioni flessibili che, se sommate, coprono il 50% dell'intera catena polipeptidica: il braccio N-terminale ed il loop di 30 amminoacidi del core. Queste due regioni costituiscono la superficie accessibile alle interazioni intra e inter-molecolari.

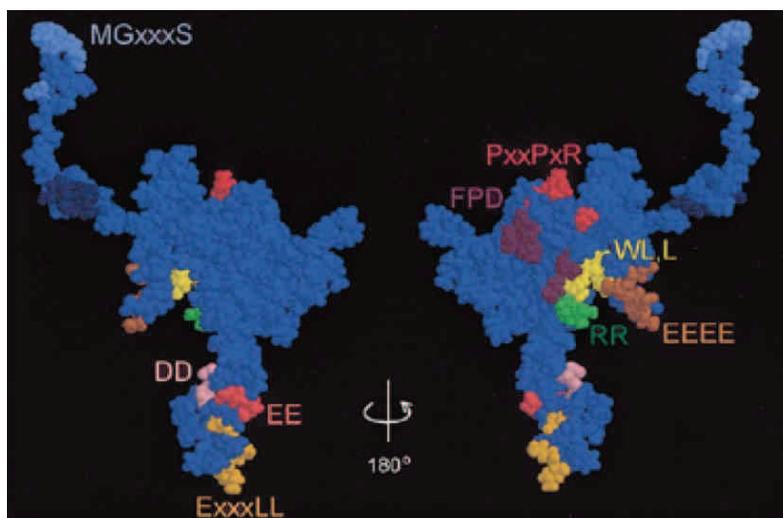


Fig. 1.7 – HIV-1 Nef. Raffigurazione schematica della struttura terziaria della proteina i cui sono evidenziati i motivi funzionali individuati in analisi NMR. La rappresentazione tridimensionale evidenzia le superfici accessibili e i residui che possono dar luogo ad interazioni.

1.6.1 Modificazioni post-traduzionali

N-miristilazione: il dominio N-terminale contiene molti residui carichi positivamente ed una sequenza consenso MGxxx(S/T) che media l'attacco covalente di un acido miristico (acido grasso saturo) da parte dell'enzima N-miristoil-transferasi, a seguito della rimozione della metionina iniziale. La modificazione della proteina consente l'associazione alle membrane cellulari. Mutazioni a carico della glicina della regione consenso alterano pesantemente la capacità di legare sia il doppio strato lipidico, sia numerosi partner cellulari (es. CD4, Src-chinasi, proteine citoscheletriche, etc), inibendo numerose funzioni biologiche di Nef [31].

Fosforilazione: chinasi cellulari mediano l'attacco di gruppi fosfato a diversi residui di Nef, dislocati lungo l'intera sequenza, facilitando la formazione di legami o destabilizzando interazioni per repulsione carica-carica.

1.6.2 Modificazioni strutturali

Oligomerizzazione: nel corso degli studi, mirati alla caratterizzazione delle proprietà biochimiche e fisiche di Nef, per meglio comprendere la funzione dei domini strutturali nello svolgimento delle numerose attività infettive, fu ipotizzato che all'interno dell'ospite si potessero formare dimeri ed oligomeri di questa

proteina [32, 33]. L'analisi della composizione amminoacidica suggerì che all'interno del core fosse presente un dominio *leucine zipper-like repeat*, normalmente implicato nei processi di oligomerizzazione. Fu inizialmente dimostrato, esprimendo la proteina virale in sistemi sia procariotici che eucariotici, che Nef era in grado di formare omo-oligomeri, come dimeri, trimeri e tetrameri, per l'instaurarsi di ponti di-solfuro intermolecolari tra residui di cisteina. Una dettagliata analisi NMR della struttura secondaria e terziaria di Nef, ha rivelato che venissero a crearsi anche interazioni non covalenti tra i monomeri di Nef, stabilizzati da interazioni polari o elettrostatiche e che il dominio di interazione si trovi all'interno del core. Lavori successivi riportarono la presenza di oligomeri sia a livello della membrana cellulare, per interazioni non covalenti, sia a livello citoplasmatico. In contrasto con i primi dati presentati, studi più recenti, hanno comprovato la formazione di oligomeri sia in ambienti riducenti che non riducenti, suggerendo che le interazioni proteina-proteina non fossero stabilizzate dall'instaurarsi di legami di-solfuro, ma che dipendessero da altri aspetti strutturali. A comprovare ciò, l'analisi cristallografica della proteina purificata rivelò la presenza, nella regione del core, di una tasca idrofobica accessibile al solvente, che potrebbe formare un'ampia superficie di legame. Alterazioni di questa regione potrebbero destabilizzare o prevenire il legame tra più molecole di Nef o di Nef con altri partner molecolari. Analizzando solo la struttura centrale della proteina è stato possibile dimostrare che la tasca contiene beta-eliche adiacenti, per presenza di foglietti beta paralleli, la cui regione centrale potrebbe fungere da dominio di oligomerizzazione.

Gli studi più particolareggiati sono stati svolti da Arold e colleghi che ricercando le basi molecolari dell'interazione, hanno analizzato le caratteristiche dell'associazione Nef-Nef via cross-linking chimico, scattering dinamico della luce, ultracentrifugazione analitica ed spettroscopia NMR [32]. Utilizzando la proteina formata solo dal core, con una mutazione a livello della cisteina 206, unico residuo in grado di formare ponti di-solfuro perché accessibile al solvente, hanno dimostrato che questo tipo di interazione non è necessaria alla formazione o stabilizzazione dei complessi. Sembra, inoltre, che lo stato oligomerico sia concentrazione dipendente, cioè che si incontrino più facilmente forme monomeriche e dimeriche piuttosto che complessi trimerici o tetrameric.

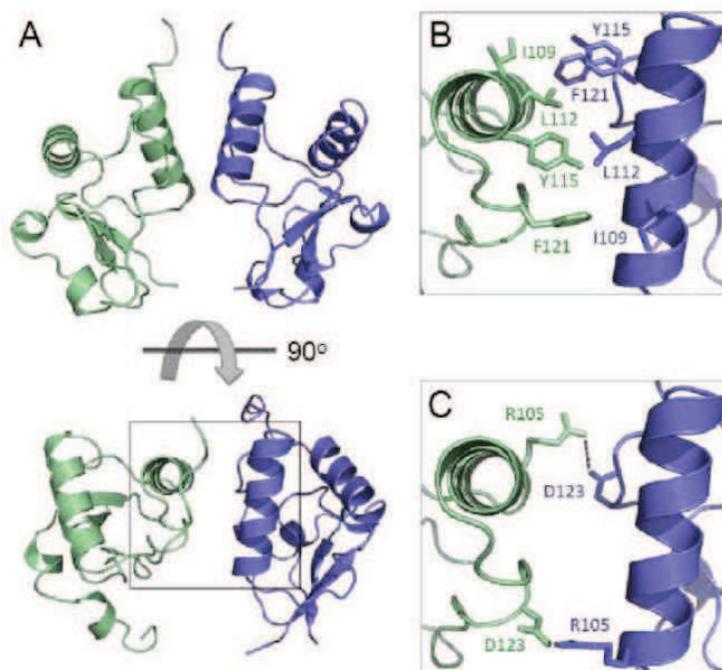


Fig. 1.8 – Nef, ipotetico dominio di dimerizzazione. Struttura cristallografica della superficie di dimerizzazione più accreditata. A.: immagini che riportano la parte centrale della struttura dimerica di Nef. Le due porzioni monomeriche sono evidenziate con colori diversi. Il riquadro mostra le porzioni ad alfa-elica e foglietto beta coinvolte nell'interazione. La stessa regione viene mostrata ingrandita in B. e C. Ciascun riquadro mostra le catene laterali dei residui amminoacidici idrofobici e carichi coinvolti nelle interazioni.

Sembra che gli amminoacidi coinvolti nel legame siano: R105, D108, I109, L112, Y115, H116, F121, P122 e D123: si tratta di residui molto conservati tra i ceppi di HIV-1, che si racchiudono a formare una piccola regione idrofobica, con al centro Y115 e F121, delimitata dalle interazioni che si instaurano tra gli amminoacidi carichi R105 e D123. Inoltre Nef, anche se in forma polimerica, è in grado di legare i partner cellulari identificati per la forma monomerica, come ad esempio, i peptidi con dominio SH3, il CD4 o le molecole di MHC I. Mutazioni a carico del residuo conservato D123 non solo inficiano la possibilità di dimerizzare, ma inibiscono anche il legame di Nef con diversi interattori funzionali. Tutti i dati appena descritti confermano che la forma dimerica ed oligomerica di Nef abbia un significato biologico nello svolgimento dei processi infettivi virali, ciononostante il ruolo che questa ha nelle cellule infettate resta ancora solo ipotetico e necessita di essere ulteriormente caratterizzato [27, 34-36].

1.7 Ruolo e funzioni di Nef nel ciclo virale

Nel corso degli anni, la caratterizzazione funzionale di Nef ha portato ad attribuire ruoli diversi alla proteina, riguardanti molti aspetti del percorso patogenetico virale, dall'attivazione dell'ospite all'inibizione dei processi apoptotici [33]. La tabella sottostante riporta quali siano sino ad oggi le funzioni svolte individuate e quali siano i partner cellulari contattati per il loro svolgimento.

Tab. 1.1 - Funzioni biologiche note della proteina accessoria Nef. Ad ogni attività sono stati associati i partners di legame e il meccanismo d'azione [18].

Ruolo e attività biologiche	Meccanismo d'azione	Partners di legame
Promozione dell'infezione virale	Attivazione CD4 ⁺ CTL	
Escape dal sistema immunitario	Riduzione espressione molecole MHC I	Coda citosolica MHC I, AP-1, PACS-1, ARF6, ARF1, PI3-kinase
Escape dal sistema immunitario ed implementazione dell'infezione	Riduzione dell'esposizione delle molecole CD4 sulla superficie cellulare	V1H, AP-2, ARF-1, beta-COP, Lck
Alterazione della via di trasduzione del segnale da T-cell receptor	Legame a molecole responsabili della trasduzione del segnale da T-cell Receptor	Vav, p21-activated kinases, Rac, CDC42, DOCK2-ELMO1 complex
	Upregolazione FasL	
Inibizione dell'apoptosi	Blocco attività delle chinasi cellulari a valle di FasL e di TNF Receptor	ASK1
	Inibizione attività p53	p53
	Legame a chinasi cellulari	p21-activated kinases, PI3-kinases
Alterazione trafficking intracellulare	Alterazione trafficking vescicolare citosolico, endocitosi, gemmazione	Complessi etero-tetramerici clathrin-AP (1-4) & proteine accessorie associate, VH1, PACS-1, COP-1
Aumento dell'efficienza di replicazione virale e dell'infettività	Downregolazione di fattori cellulari	MHC II, CD8, CD28, CD80, CD86, CCR5, CXCR4, recettore transferrina e mannosio, TNF, tioesterasi

Il termine Nef, fu coniato come acronimo di *NEgative Factor* poiché i primi studi condotti *in vitro* alla fine degli anni '80, che si basavano sulla mutazione o

delezione della regione codificante, avevano suggerito che potesse regolare negativamente la replicazione e la patogenesi virale attraverso un'attività repressiva su 5'LTR [37]. La successiva caratterizzazione funzionale ha al contrario dimostrato l'importanza di Nef nella progressione dell'infezione virale verso la malattia, dando alla proteina un ruolo infettivo tutt'altro che negativo [38, 39]. Gli studi condotti su diversi modelli animali (primati e topi) della malattia hanno evidenziato una forte pressione selettiva nei confronti degli individui che esprimevano una forma funzionalmente attiva di Nef, come responsabile del mantenimento di una buona carica virale durante l'infezione. Gli studi condotti sui pazienti "umani", che miravano a comprendere i meccanismi del passaggio tra infezione da HIV-1 e instaurarsi della patologia AIDS conclamata, hanno permesso di individuare degli individui che superavano, privi di sintomi, il normale periodo di incubazione (10 anni circa). Questi individui, circa 0.00003% del totale, definiti *long-term non progressors* (LTNPs) per il mancato avanzamento alla fase AIDS, presentano normali livelli di linfociti T CD4⁺ e virus deleti o mutati per la regione codificante Nef, a conferma di un ruolo nell'instaurarsi di un'infezione produttiva del peptide .

È possibile affermare che le funzioni più importanti svolte da Nef riguardano:

- a. La creazione di un ambiente favorevole alla replicazione virale:
 - attivazione della cellula ospite
 - elusione dal sistema immunitario
- b. La stabilizzazione dei processi infettivi:
 - inibizione dei processi apoptotici
- c. L'implementazione dell'infettività virale:
 - alterazione dei processi biochimici cellulari a favore del virus

Le suddette funzioni verranno descritte ora in dettaglio.

1.7.1 Creazione di un ambiente favorevole alla replicazione virale

Attivazione della cellula ospite: una volta infettato il bersaglio, Nef ottimizza l'ambiente cellulare al fine di promuovere un'efficiente replicazione virale. Molti studi suggeriscono che Nef alteri, a suo favore, i *pathways* cellulari di *signaling*, inducendo una serie di reazioni biochimiche che portano all'attivazione del ciclo cellulare. L'incremento dell'espressione genica aumenta la concentrazione di fattori nucleari, utilizzati per aumentare l'efficienza della replicazione virale e quindi l'infettività, definita dal numero di nuovi virioni assemblati e rilasciati [40].

L'attivazione dei linfociti T, bersaglio favorito dal virus, è un indice predittivo della progressione a patologia conclamata: all'inizio del nuovo ciclo cellulare Nef promuove l'integrazione del genoma virale e la trascrizione. L'espressione genica induce anche l'over-espressione di IL-2 e la susseguente stimolazione autocrina, tipica dei linfociti T attivati. Esperimenti condotti in linee oncogeniche di linfociti T, hanno dimostrato che Nef induce un profilo di espressione genica molto simile a quello indotto dall'attivazione del TCR per *signaling* a partire da CD3. Infine viene indotta l'attivazione sia del fattore nucleare NFAT (*Nuclear Factor of Activated T-cells*), mediatore della trascrizione di IL-2 e di altri fattori immunomodulatori, non via TCR ma via IP3 chinasi, sia della via ERK/MAPK, con attivazione di numerose chinasi e sintesi di fattori di crescita [41, 42].

Elusione dal sistema immunitario: il mascheramento nei confronti del sistema immunitario viene mantenuta soprattutto per down-regolazione del CD4 ed MHC I in membrana. Nel particolare, la diminuzione del CD4 di superficie, elimina anche la possibilità di super-infezione della stessa cellula da parte di altri virus. Ricorrendo a mutanti di Nef è stato ipotizzato che la proteina virale accoppi il complesso Nef-CD4 alle vescicole rivestite di clatrina (*Clathrin coated pits*, CCP) mediandone l'endocitosi, dopo aver spiazzato, per competizione, il legame del CD4 con la chinasi cellulare Lck [43]. La rimozione del recettore CD4 dalla membrana avviene perché l'indotta fosforilazione del residuo di serina 408 fa sì che il dominio citoplasmatico del CD4 interagisca con un complesso etero-proteico di proteine (*adaptor proteins*, AP) delle CCP.

Parallelamente all'effetto sul CD4, Nef è in grado di down-regolare il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC-I), prevenendo il riconoscimento, e la conseguente eliminazione, delle cellule infette da parte dei linfociti T citotossici (CTL). In questo modo viene elusa la risposta immunitaria. La destabilizzazione del complesso MHC-I si verifica con un'efficienza minore rispetto a quella del CD4 e sembra richiedere un maggior livello di espressione di Nef [44]. I residui implicati nello svolgimento di questa funzione sono geneticamente e strutturalmente separati da quelli necessari per la regolazione negativa del CD4. I dati disponibili suggeriscono che Nef induca la riduzione dell'espressione dell'MHC-I attraverso due meccanismi diversi: per aumento del grado di endocitosi della molecola esposta in membrana, e per direzionamento dell'MHC-I neosintetizzato verso il trans-Golgi network (TGN), senza alterazione della sintesi, ma per accumulo nelle vescicole endosomiali e degradazione a livello lisosomiale [45].

1.7.2 Stabilizzazione dei processi infettivi

Inibizione dei processi apoptotici: la morte cellulare programmata, anche indotta da immuno-sentinelle, è una delle strategie attuate a livello biologico nella difesa dalle infezioni virali. Quindi la capacità di instaurare un ciclo virale produttivo dipende dalla capacità di HIV-1 di mimetizzarsi al sistema immunitario, come appena descritto, e di evitare il “suicidio” delle cellule infettate. In particolare, Nef blocca diverse vie di innesco dell'apoptosi: (a) inibisce l'oncosoppressore p53, legandolo e mediandone la degradazione, (b) attiva la PI3 chinasi e PAK che fosforilando Bad, membro della famiglia di Bcl-2, blocca il signalling apoptotico mitocondriale, (c) lega, inibendola, la chinasi ASK1 (*Apoptosis Signal regulatory Kinase 1*), fattore chiave dei *pathways* apoptotici da Fas/FasL e TNF-alpha [18, 46-48].

Al fine di difendere la cellula infettata da eventuali attacchi esterni, Nef induce la up-regolazione di FasL sulla superficie cellulare. Il legame con il suo recettore Fas, presente in larga quantità sulla membrana delle cellule del sistema immunitario, ne induce la morte.

1.7.3 Implementazione dell'infettività virale

Alterazione dei processi biochimici cellulari: l'infettività virale è profondamente implementata dalla presenza di Nef, come dimostrato dall'analisi comparativa di colture primarie di macrofagi e linfociti e colture cellulari eucariotiche (COS e 293T) infettati con virioni codificanti Nef *wild type*, mutato o completamente deleto: si apprezza una ritardata e ridotta produzione virale nelle cellule infettate con virus mutato per Nef [49-51]. In caso di virioni deleti per la sequenza codificante si assiste ad una riduzione da 5 a 20 volte del titolo dei virioni neo formati, in assenza di una parallela diminuzione della quantità delle proteine Gag ed Env, nell'attività della Trascrittasi inversa (RT) e nell'incorporazione di RNA virale. L'effetto registrato su colture eucariotiche di cellule non normalmente bersaglio del virus, prova che l'effetto mediato da Nef non richiede la presenza di fattori cellulari specifici, bensì ubiquitari. Virus mutati in *nef* sono da 4 a 40 volte meno infettivi rispetto al virus *wild-type*, questa “mancanza” può essere complementata dall'espressione in trans di Nef, durante la produzione di nuove particelle, a nulla invece serve l'espressione ectopica nelle cellule bersaglio.

Inoltre, Nef non migliora l'infettività promuovendo la fusione dei virioni o agendo sulla struttura del core o della matrice, piuttosto potrebbe agire alterando la composizione della membrana cellulare, ad esempio creando zone più ricche di colesterolo, al fine di facilitare il passaggio attraverso di essa, sia in entrata che in uscita, e il movimento del genoma virale a livello citosolico. Questa funzione dipende dall'interazione di Nef con Vav, un fattore di scambio del nucleotide guanina appartenente alla famiglia delle Rho GTPasi, implicato nell'organizzazione dei filamenti di actina citoscheletrica [52]. Alcuni studi hanno rivelato la presenza di Nef nei virioni: è stato stimato che ogni particella ne contenga circa 70 copie. In HIV-1, la maggior parte della proteina associata al virione è presente come isoforma di 20 KDa, generata per azione della proteasi virus-specifica che taglia la molecola tra gli amminoacidi 57 e 58, liberando il dominio C-terminale. E' stato ipotizzato che il frammento, rilasciato subito dopo l'infezione, possa contribuire all'aumento dell'infettività prendendo parte ai processi di denudamento virale e di trascrizione inversa, o comunque favorendo la creazione di un ambiente favorevole alla sintesi del DNA provirale [53]. Infine è stato dimostrato che Nef è in grado di interagire a livello nucleare con la proteina virale Tat, aumentando l'espressione genica virale, per transattivazione Tat-mediata dell'LTR [54, 55]. E' stato osservato che la regione N-terminale di Nef si associa con il repressore della trascrizione Eed e ne induce la traslocazione dal nucleo verso la membrana plasmatica, favorendo la stimolazione della trascrizione virale Tat-dipendente [56]. Eed (*Embryonic ectodermal development factor*) fa parte dei complessi proteici PcG (*Polycomb Group*) che legano il DNA a livello degli elementi PREs (*Polycomb Response Elements*) inducendo il silenziamento della cromatina per azione su fattori come HDAC (*Histone DeACetylase*), che regolano l'interazione tra le proteine istoniche e il DNA [57].

1.8 Analisi dell'interazione proteina-proteina

Le interazioni fra proteine, sia transitorie che stabili, giocano un ruolo di primaria importanza in molti processi biologici: replicazione del DNA, trascrizione, controllo del ciclo cellulare, *splicing*, traduzione, metabolismo, formazione di macrostrutture cellulari e complessi enzimatici, nonché cascate di trasduzione del segnale. In particolare, le interazioni proteiche transitorie sono coinvolte nell'assemblaggio dei complessi trascrizionali, nel trasporto delle proteine attraverso le membrane, nel ripiegamento di proteine native e nella rottura e riformazione di strutture

subcellulari durante il ciclo cellulare. In generale anche tutte le modificazioni, post-trascrizionali e soprattutto post-traduzionali, cui vanno incontro le proteine coinvolgono legami reversibili con peptidi quali enzimi come chinasi, fosfatasi, glicosil transferasi, acil-transferasi, miristoil-transferasi e proteasi. È anche noto come l'alterazione dei processi di interazione tra peptidi possa contribuire o essere concausa dell'insorgenza o della progressione di molte patologie. La caratterizzazione della modalità di legame e la possibilità di modulare, in senso positivo o negativo, il rapporto tra due proteine costituisce un'ipotetica strategia terapeutica.

Sono state messe a punto numerose tecniche per lo studio delle interazioni proteiche: alcuni dei metodi proposti sono di tipo chimico-fisico, come la cromatografia di affinità, che consiste nel legare covalentemente una proteina ad una colonna ed usarla per selezionare proteine presenti in un estratto cellulare in grado di reagire in modo specifico. Esistono inoltre metodi genetici basati su librerie genomiche o peptidiche, che è possibile esprimere in sistemi procariotici ed eucariotici. La maggior parte di queste metodiche si basa sull'utilizzo del saggio del doppio ibrido, utilizzando come reporter sia geni con indici colorimetrici, sia indicatori nutrizionali sia enzimi per la conversione di metaboliti tossici [58-60]. Tecniche di recente sviluppo permettono l'espressione in sistemi eucariotici che sfruttano la complementazione di proteine fluorescenti (BiFC), quali GFP e YFP, permettendo di investigare sia l'avvenuta interazione, sia la sua localizzazione [61-64].

Gli esperimenti condotti in questo lavoro di tesi si sono basati sull'utilizzo del saggio del doppio ibrido e sulla complementazione della fluorescenza della YFP in cellule di mammifero.

1.8.1 Saggio del doppio ibrido

Gli studi sulla regolazione della trascrizione eucariotica hanno evidenziato che gli attivatori trascrizionali sito-specifici avessero una struttura modulare, fossero cioè costituiti da domini indipendenti con funzioni diverse. Vari studi hanno confermato che la modularità è una caratteristica generale di molti attivatori, sia eucariotici che procariotici, e che le due unità funzionali degli attivatori trascrizionali possono essere sfruttate per la costituzione di fattori ibridi costituiti da porzioni di proteine eterologhe. Sulla base di questi studi, è stato sviluppato il saggio del doppio ibrido: sistema genetico per rilevare interazioni proteina-proteina

che sfrutta la capacità dei due domini funzionali essenziali, BD (*Binding domain*, dominio di legame al DNA) e AD (*Activation domain*, dominio di attivazione), di formare un fattore trascrizionale unico, anche se non appartenenti alla stessa proteina. Il fattore di trascrizione può formarsi anche per interazione mediata da due proteine qualsiasi fuse a tali domini [65, 66].

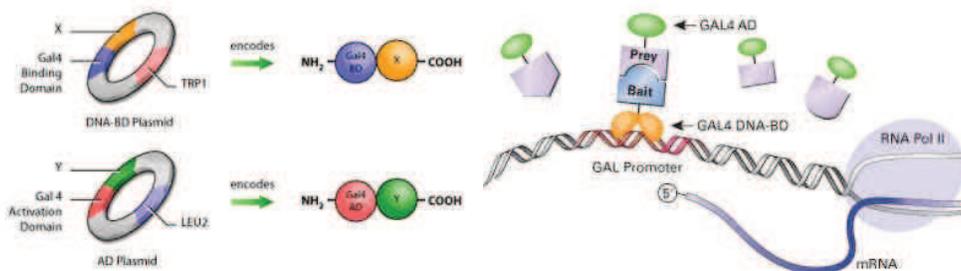


Fig. 1.9 – Saggio del doppio ibrido. Il saggio consente di valutare l'interazione tra due proteine (X ed Y), fuse, rispettivamente, al dominio di legame al DNA (BD) o al dominio di attivazione (AD) di un fattore di trascrizione, es. Gal 4 di lievito. È necessario, innanzitutto, creare due vettori, il primo detto esca (*bait*) che codifica la proteina X fusa al BD, il secondo, detto preda, che codifica la proteina Y fusa all'AD. Se la preda Y interagisce con l'esca X, il fattore trascrizionale viene ricomposto e media l'espressione di un gene reporter, es. LacZ o HIS3.

Il principio di funzionamento è molto semplice: vengono costruite proteine di fusione con i due domini del fattore di trascrizione. In linea teorica, le due proteine di fusione, in mancanza una dell'altra, non possono attivare la trascrizione. Solo la costituzione del fattore trascrizionale completo recluterà la polimerasi e darà il via all'espressione del gene reporter [67]. La maggior parte dei sistemi a doppio ibrido sono utilizzati in ceppi di lievito, perché come organismi eucariotici di base, possono svolgere modificazioni post-traduzionali, a differenza di quanto accade nei batteri, che solo raramente vengono utilizzati per gli studi di interazione [68, 69]. Essendo le modificazioni post-traduzionali essenziali per studiare molti peptidi nelle loro condizioni naturali, solitamente il saggio viene svolto ricorrendo a ceppi di *S. cerevisiae* mutagenizzati, che presentano le seguenti caratteristiche:

- a. integrazione nel genoma del gene reporter lacZ di *E. coli* (codificante l'enzima beta-galattosidasi) sotto il controllo della regione regolatrice del gene GAL1, contenente i siti UAS-GAL o altri siti di legame per il BD. L'enzima reporter idrolizza molti beta-D-galattosidi, tra cui substrati incolori quali il 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-D-galattopiranoside (X-gal) e l'o-nitrofenil-beta-D-galattopiranoside (ONPG), creando metaboliti colorati. *S. cerevisiae* non possiede un'attività beta-galattosidasi endogena che possa interferire con quella del gene reporter.

- b. mutazioni a carico dei geni per la biosintesi degli amminoacidi essenziali (Istidina, Leucina e Triptofano) per permettere la selezione di plasmidi codificanti le proteine ibride e contenenti geni marcatori.
- c. delezione delle sequenze codificanti le proteine Gal4 e Gal80 endogene.

Sono stati creati saggi che sfruttano la complementarità dei domini di attivazione di Gal4 di lievito o ibridi tra LexA di *E. coli* e Gal4 di lievito.

Le maggiori applicazioni di questo sistema sono:

- a. L'analisi dell'interazione tra due proteine note, saggiando l'attività beta-galattosidasi. È inoltre possibile individuare i domini e i residui amminoacidici coinvolti nel legame facendo un'analisi mutazionale e di delezione dei geni codificanti le proteine di interesse.
- b. Ricercare all'interno di una libreria di cDNA o peptidi dei partner di legame di una proteina di interesse, allo stesso modo è possibile individuare inibitori di un'interazione nota.

Gli esperimenti condotti in questo studio hanno sfruttato sia l'induzione dell'attività beta-galattosidasi, sia la capacità di crescere su terreno selettivo data dall'avvenuta interazione tra la proteina di interesse.

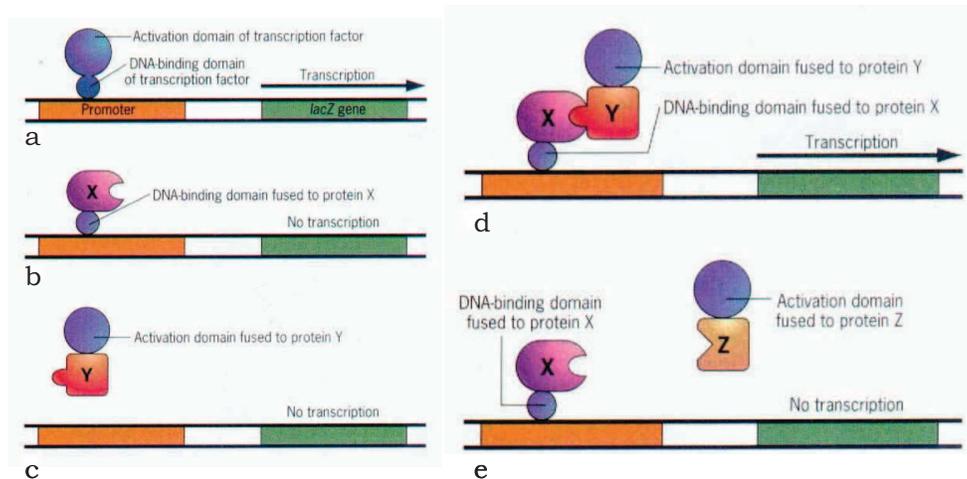


Fig. 1.10 – Doppio ibrido, principi generali. Il saggio si basa sulla capacità di riunire i due domini (BD ed AD) di un fattore di trascrizione cellulare. a.: il normale funzionamento di un fattore di trascrizione prevede che il BD contatti la regione promotoriale del gene reporter, in questo caso LacZ, e che l'AD catalizzi l'inizio dell'espressione genica; b.: la sola presenza del BD, anche se fuso ad una proteina X non dà trascrizione del reporter; c: anche nel caso di sola presenza dell'AD, fuso alla proteina Y, non si ha espressione del transgene; d: la presenza di due proteine, X ed Y, che interagiscono, portando alla ricomposizione del fattore trascrizionale, provoca l'espressione del gene reporter; e.: la presenza di due proteine X e Z, che non interagiscono, non comporta la ricomposizione del fattore di trascrizione e non media l'espressione del reporter.

1.8.2 Complementazione della fluorescenza (BiFC)

Numerose interazioni tra proteine sono state individuate mediante saggi genetici o di legame *in vitro*, risulta, comunque molto importante, investigare la formazione del legame anche in cellule di mammifero, ambiente in cui l'interazione avviene normalmente. Il saggio di complementazione della fluorescenza è un metodo di recente messa a punto, che permette di analizzare il legame tra peptidi in cellule eucariotiche vive [61, 63, 70]. È basato sulla formazione di un complesso, che emette ad una certa lunghezza d'onda, che si forma solo in caso di interazione specifica tra i peptidi oggetto dello studio, fusi ai due frammenti terminali della proteina fluorescente (GFP, YFP, etc) [71, 72]. La formazione di un complesso tra le due proteine di fusione avviene senza interferenza da parte dei frammenti cui sono legati e l'emissione del segnale avviene solo in caso di legame stabile e duraturo nel tempo, necessitando il fluoroforo di un tempo di maturazione di qualche ora per essere registrato. Il saggio quindi esprime anche l'efficienza di interazione tra i due peptidi e può essere sfruttato anche per esperimenti di inibizione o competizione al sito di legame. L'approccio mediante BiFC, permette di determinare il comparto subcellulare in cui avviene il legame, o in cui si distribuiscono i complessi proteici, in condizioni ambientali che corrispondono a quelle *in vivo*. Il saggio, inoltre, è altamente sensibile, permettendo di analizzare anche interazioni che riguardano peptidi con bassi livelli di espressione; la presenza dei terminali non fluorescenti non perturba né la struttura terziaria delle proteine oggetto di studio, né l'ambiente cellulare, permettendo di studiare qualsiasi tipo di interazione in qualsiasi sistema cellulare. L'emissione del segnale è specifico indice di avvenuta interazione e il rumore di fondo dato dalle cellule che non esprimono le proteine di interesse è minimo, inoltre l'intensità di segnale della proteina complementata non differisce da quello della stessa proteina in condizioni native [62, 73].

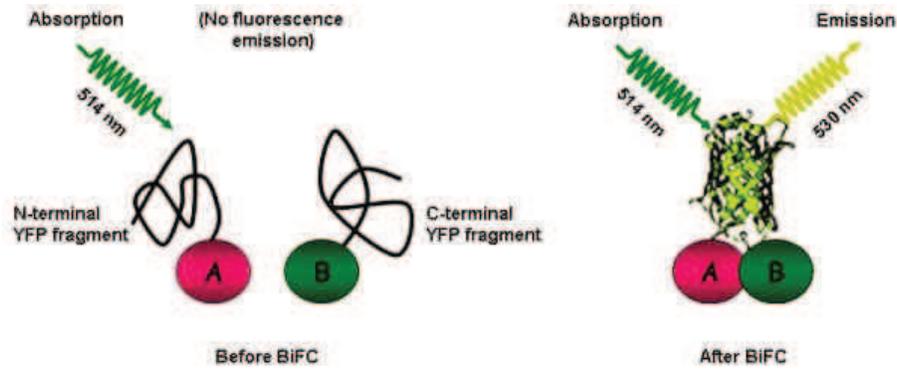


Fig. 1.11 – BiFC, BiFluorescence Complementation. Lo schema illustra il principio che sottende al saggio BiFC: la proteina YFP (Yellow Fluorescent Protein) viene suddivisa in due domini non fluorescenti, N-terminale e C-terminale rispettivamente; i peptidi A e B, oggetto dello studio, vengono fusi ciascuno ad un terminale, es A-N-terminale-YFP e B-C-terminale-YFP. Se non si instaura alcuna interazione tra A e B, i due “emi-fluorofori” restano inattivi. Qualora, invece, si formi un legame tra A e B, il fluoroforo viene ricomposto emettendo un segnale fluorescente a seguito dell’eccitazione alla lunghezza d’onda ottimale. Per la YFP si usa una lunghezza d’onda di eccitazione pari 514 nm e un intervallo di emissione pari a 530-650 nm.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

5-BROMO-4-CLORO-3-INDOLIL-B-D-GALATTOPIRANOSIDE:

Nei saggi su filtro come substrato della beta-galattosidasi è stato utilizzato il 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galattopiranoside (X-gal, Qbiogene, Carlsbad, CA), alla concentrazione di 40 mg/ml in N,N-dimetilformammide 100% (DMF). Il substrato incolore X-gal viene scisso dalla beta-galattosidasi in galattosio e 5-bromo-4-cloro-3-indolo. Quest'ultimo conferisce alle cellule un caratteristico colore blu.

3-AT:

Il 3-amminotriazolo (3-AT, PM=84,08) è un composto in grado di inibire in modo competitivo il prodotto del gene HIS3 (codificante l'imidazolo glicerol-fosfato deidratasi), legato ad una trascrizione non dovuta alla complementazione del fattore di trascrizione modulare (*leaky expression*). Sensibile sia alla luce che calore (inattivato a temperature superiori a 55°C), per la sua preparazione la polvere (Sigma Aldrich Cat # A-8056) è stata sciolta in acqua deionizzata in modo da ottenere una soluzione 1 M e sterilizzata per filtrazione (polarità 0.22 µm).

LIBRERIA DI COMPOSTI (*SMALL MOLECULES*):

Una libreria combinatoriale formata da 10⁴ composti chimici diversi è stata acquistata da ChemBridge Corporation. I composti sono sciolti in DMSO alla concentrazione di 10 mM e vengono conservati a -20°C al riparo dalla luce. Prima del loro utilizzo devono essere portati a temperatura ambiente per almeno 30 minuti, mescolati e centrifugati.

PLASMIDI:

pNef-Lai: plasmide gentilmente donato dal Dott. M. Pizzato (Imperial College, London), di circa 4 Kb, contenente la sequenza completa, di HIV-1 *nef* legata al C-terminale all'epitopo HA. Il termine Lai individua un preciso allele del genoma di HIV-1, sequenziato e depositato.

pCG-Nef-NA7-GFP: costruito cortesemente donato dal Prof J. Skowronski (Cold Spring Harbor, New York), contenente la sequenza codificante l'allele NA7 del gene

nef, definito particolarmente infettivo, coniugato al gene reporter GFP.

Plasmidi per il saggio del doppio ibrido in lievito:

pGBT9: vettore commerciale (Clontech™), a basso numero di copie, di circa 5.5 Kb, di cui è nota l'intera sequenza nucleotidica. Questo plasmide contiene la sequenza codificante il *binding domain* (BD) di Gal4 di lievito sotto il controllo del promotore ADH1 troncato. La sequenza di interesse viene inserita all'interno del *Multiple Cloning Site* (MCS), posto a valle del BD. Il vettore conferisce la resistenza all'ampicillina e contiene il marcatore nutrizionale TRP1 per la selezione in *S. cerevisiae*.

Plasmidi creati ed utilizzati:

pGBT9Nef-Lai: presenta l'allele Lai di Nef, con e senza l'epitopo HA al C-terminale (MCS: 5'-EcoRI, 3'-BamHI)

pGBT9Nef-NA7: presenta l'allele NA7 di Nef, con e senza l'epitopo HA al C terminale (MCS: 5'-EcoRI, 3'-BamHI)

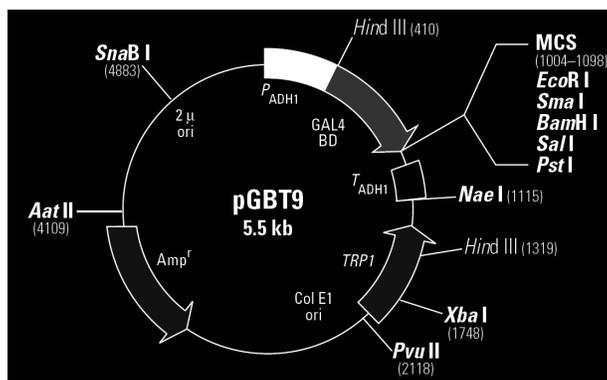


Fig. 2.1 – pGBT9: vettore per il saggio del doppio ibrido in lievito che consente l'espressione della proteina di interesse fusa al suo N terminale con il BD di Gal4.

pGAD GH: vettore commerciale (Clontech™), lungo circa 8 Kb, di cui è nota l'intera sequenza nucleotidica. Presenta l'*activation domain* (AD) di Gal4 di lievito sotto il controllo del promotore ADH1 troncato, a monte del MCS. Il plasmide contiene, inoltre, la sequenza di localizzazione nucleare dell'antigene T di SV40 e l'epitopo HA a valle del MCS. La selezione in cellule batteriche può avvenire per indotta resistenza all'ampicillina, mentre in lievito si può sfruttare il marcatore nutrizionale LEU2.

All'interno del MCS di questo plasmide sono state clonate le sequenze codificanti $n > 10^9$ cloni di peptidi random lunghi 16 amminoacidi (MCS: 5'-EcoRI, 3'-EcoRI).

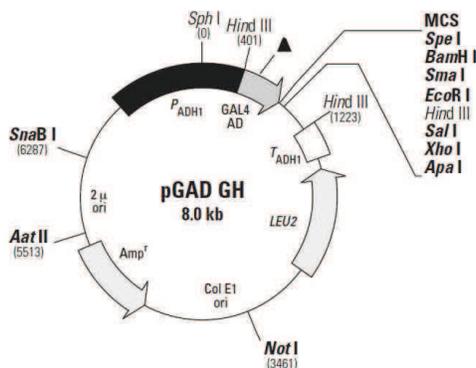


Fig. 2.2 – pGAD GH. Vettore per il saggio del doppio ibrido in lievito che media l'espressione di una libreria di peptidi random fusi al loro N-terminale all'AD di Gal4.

pGAD424: vettore simile al precedente, ma più piccolo (6.6 Kb) presenta le stesse caratteristiche strutturali e di selezione di pGAD GH, l'AD di Gal4 si trova a monte del MCS (più breve rispetto al pGAD-GH). La sequenza di interesse, in questo caso, non viene coniugata ad ulteriori epitopi.

Plasmidi utilizzati:

pGAD424-Integrasi: costruito gentilmente donato dal Prof. J. Luban (Dept. of Microbiology and Molecular Medicine, University of Geneva, Switzerland) esprime l'Integrasi di HIV-1

pGAD424-RT51: costruito cortesemente donato dalla Prof.ssa Prof. G. Tachedjian (Burnet Institute, Australia), che esprime la subunità non catalitica, p51 della Retrotrascrittasi inversa di HIV-1

pBTM116: plasmide ad alto numero di copie, lungo circa 5.5 Kb e di sequenza solo parzialmente nota, gentilmente messo a disposizione dalla Dott.ssa A. Loregian (Dip. Istologia, microbiologia e biotecnologie mediche, Università di Padova). Questo vettore contiene la sequenza completa codificante il BD della proteina LexA di *E. coli* sotto il controllo del promotore ADH1 troncato. Il vettore conferisce resistenza all'ampicillina e contiene il marcatore nutrizionale TRP1 per la selezione in *S.cerevisiae*.

Plasmidi creati ed utilizzati:

pBTM116Nef-Lai: presenta l'allele Lai, con e senza l'epitopo HA al C-terminale (MCS: 5'-EcoRI, 3'-BamHI)

pBTM116Nef-NA7: presenta l'allele NA7, con e senza l'epitopo HA al C-terminale (MCS: 5'-EcoRI, 3'-BamHI)

pBTM116-Dyn2-AA; -AB; -BA-NF: vettori che contiene la sequenza di una variante di *splicing* di Dinamina 2, con Flag all'N-terminale (MCS: 5'-EcoRI, 3'-EcoRI)

pBTM116Dyn2-AA; -AB; -BA-CF: come i precedenti contengono le varianti di *splicing* munite di Flag al C-terminale (MCS: 5'-EcoRI, 3'-EcoRI)

pBTM116-Tat: plasmide che esprime Tat di HIV-1

pEG202: plasmide ad alto numero di copie, gentilmente donato dal Prof. R. Brent (University of California, San Francisco). È nota l'intera sequenza nucleotidica, circa 10 Kb; di questo vettore, che codifica la sequenza completa codificante il BD della proteina LexA di *E. coli* sotto il controllo del promotore ADH1 troncato a monte del MCS. Inoltre, pEG202 conferisce la resistenza all'ampicilina e porta come marcatore nutrizionale HIS3.

Plasmidi creati ed utilizzati:

pEG202Nef-Lai: presenta l'allele Lai, con e senza l'epitopo HA al C-terminale (MCS: 5'-EcoRI, 3'-BamHI)

pEG202Nef-NA7: presenta l'allele NA7, con e senza l'epitopo HA al C-terminale (MCS: 5'-EcoRI, 3'-BamHI)

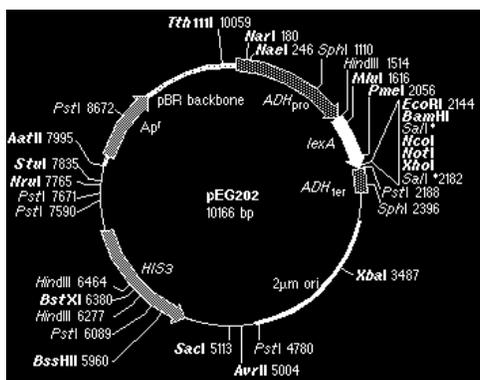


Fig. 2.3 – pEG202. Vettore per il saggio del doppio ibrido in lievito che permette l'espressione della proteina di interesse fusa al suo N-terminale con il BD di LexA.

pSH2: plasmide ad alto numero di copie, gentilmente donato dalla Prof. G. Tachedjian (Burnet Institute, Australia). È nota l'intera sequenza nucleotidica, circa 10 Kb, di questo vettore, che codifica una sequenza ridotta (1-82 amminoacidi) del BD della proteina LexA di *E. coli* sotto il controllo del promotore ADH1 troncato. Anche in questo caso il BD si trova a monte del MCS. Inoltre, pSH2 conferisce resistenza all'ampicilina e porta come marcatore nutrizionale HIS3.

Plasmidi creati ed utilizzati:

pSH2Nef-NA7: presenta l'allele NA7, con e senza l'epitopo HA al C-terminale (MCS: 5'-EcoRI, 3'-BamHI)

pSH2-IN: contiene la sequenza codificante l'Integrasi di HIV-1

pSH2-RT51: esprime la subunità p55 della Retrotrascrittasi inversa di HIV-1

pSH2-RT66: esprime la subunità catalitica p66 della Trascrittasi inversa di HIV-1

pACTII: vettore commerciale (Clontech™), di circa 8 Kb, di cui è nota l'intera sequenza nucleotidica che contiene la sequenza codificante l'AD di Gal4 di lievito sotto il controllo del promotore ADH1 troncato, a monte del MCS. Il plasmide contiene, inoltre, la sequenza di localizzazione nucleare dell'antigene T di SV40 e l'epitopo HA a monte del MCS. La selezione in cellule batteriche può essere fatta per conferimento della resistenza all'ampicillina, mentre in lievito si può sfruttare il marcatore nutrizionale LEU2.

Plasmidi creati ed utilizzati:

pACTIINef-Lai: esprime l'allele Lai di Nef (MCS: 5'-NcoI, 3'-BamHI)

pACTIINef-NA7: esprime l'allele NA7 di Nef (MCS: 5'-NcoI, 3'-BamHI)

pACTIIDyn2-AA; -AB; -BA: costrutti che contengono le varianti di *splicing* di Dynamina2 (MCS: 5'-EcoRI, 3'-Xho)

pACTII-Tat: vettore che contiene la sequenza di Tat di HIV-1.

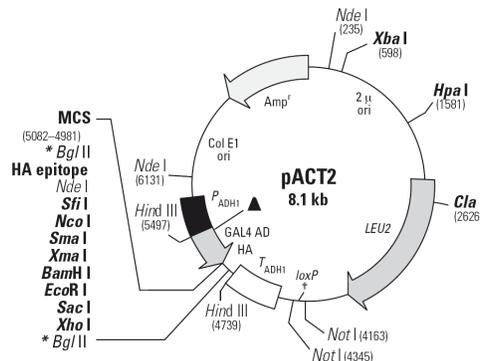


Fig. 2.4 – pACTII. Vettore usato nel saggio del doppio ibrido in lievito che consente l'espressione della proteina di interesse fusa al suo N-terminale con l'AD di Gal4.

Plasmidi per Bi-Fluorescence Complementation (BiFC) in linee cellulari:

pNef-YN: plasmide contenente la sequenza codificante l'allele SF2 del gene *nef* di HIV-1, fuso all'N-terminale (amminoacidi 1-154) della proteina YFP (*Yellow Fluorescent Protein*).

pNef-YC: plasmide contenente la sequenza codificante l'allele SF2 del gene *nef* di HIV-1, fuso al C-terminale (amminoacidi 155-238) della proteina YFP (*Yellow Fluorescent Protein*).

Questi ultimi due costrutti sono stati gentilmente donati dal Prof. T.E. Smithgall (Dept. Microbiology and molecular genetics, University of Pittsburgh, USA). Si tratta di vettori di espressione, la cui sequenza non è completamente nota, derivati da pCDNA3.1(-) (Invitrogen). Guidano l'espressione della sequenza di interesse sotto il controllo del promotore forte di HCMV e presentano il gene codificante la beta-lattamasi per la selezione in cellule procariote e il gene conferente la resistenza alla geneticina per l'eventuale selezione in cellule di mammifero.

pCDNA3.1 (Invitrogen): vettore per l'espressione di sequenze geniche in cellule di mammifero, contiene a monte del sito di policlonaggio il promotore del citomegalovirus umano (HCMV) e l'origine di SV40 che permette la replicazione episomale in linee cellulari infettate in modo latente da SV40 o che esprimono l'antigene T del medesimo virus.

JunYN155; bFosYC155 e bFosΔZIPYC155: costrutti cortesemente donati dal Prof. T. Kerppola, (Howard Hughes Medical Institute and Dept. of Biological Chemistry, University of Michigan Medical School, U.S.A.), creati dallo scheletro del vettore di espressione pCDNA3.1(-) (Invitrogen) per inserimento delle tre sequenze codificanti fuse all'N- o al C-terminale della YFP (JunYN155; bFosYC155 e bFosΔZIPYC155). Come nei vettori precedenti, l'espressione è posta sotto il controllo del promotore forte di HCMV e la selezione è resa possibile dalla presenza del gene per la resistenza ai beta-lattamici e alla geneticina.

TERRENI DI COLTURA:

Tab. 2.1 - Terreni di coltura per batteri

Terreno completo LB (Luria Bertani) liquido:	Bacto Triptone (Difco) 1% Estratto di lievito (Difco) 0.5% NaCl (Carlo Erba) 1%
solido:	Come liquido + agar 1.5%
Componenti aggiunti quando necessario: acido nalidissico (Sigma, stock 100 mg/ml) ampicillina (Sigma, stock 100 mg/ml) ciprofloxacina (FlukaBiochemica, stock 4 mg/ml) kanamicina (FlukaBiochemica stock 50 mg/ml) sodio azide (Sigma, stock 100 mg/ml) streptomycin (Sigma, stock 10 mg/ml)	

Tab. 2.2 - Terreni di coltura per lieviti.

Terreno completo YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose):	
Liquido:	Bacto Triptone (Difco) 1% Estratto di lievito (Difco) 1% Glucosio (Merck) 2%
Solido:	Come liquido + agar 2%
Terreno minimo SD (Synthetic Dropout):	
Liquido:	Yeast nitrogen base w/o amminoacidi e ammonio solfato (Difco) 0.17% Ammonio solfato 0.5% Glucosio 2%
Solido:	Come liquido + agar 2%

Al fine di selezionare, grazie alla presenza di marcatori nutrizionali, i ceppi di lievito trasformati con uno o più plasmidi, il terreno minimo sintetico (SD), sia liquido che solido, è stato arricchito con appropriate soluzioni di amminoacidi. In tabella sono riportate le concentrazioni di ciascun amminoacido in una soluzione stock 10x. Tutte le soluzioni sono state preparate in acqua deionizzata sterile, quindi sterilizzate per microfiltrazione (Filtri Millipore Millex Filter Units, 0.22 µm) La concentrazione finale raggiunta nel terreno è stata 1x in tutti gli esperimenti condotti.

Tab. 2.3 - Soluzioni di amminoacidi per la preparazione deim terreni di coltura.

Nutriente	10x [conc] mg/L	Sigma Cat. #
L-Adenina	200	A-9126
L-Arginina HCl	200	L A-5131
L-Istidina HCl	200	H-8125
L-Isoleucina	300	I-2752
L-Leucina	1000	L-8000
L-Lisina HCl	300	L-5626
L-Metionina	200	M-9625
L-Fenilalanina	500	P-2126
L-Treonina	2000	T-8625
L-Triptofano	200	T-0254
L-Tirosina	300	T-3754
L-Uracile	200	U-0750
L-Valina	1500	V-0500

CEPPI BATTERICI:

In tabella sono riportati i ceppi batterici utilizzati durante lo studio con i relativi genotipi:

Tab. 2.4 – Genoma delle specie di *E. coli* utilizzate.

Ceppo:	Genotipo:
DH5alpha	F- ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -
HB101	thi-1, hsdS20(rB-, mB-), supE44, recA13, ara-14, leuB6, proA2, lacY1, galK2, rpsL20(strr), xyl-5, mtl-1
J53	F- pro met = J 5-3 F- /RC 709/
JM109	endA1, recA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK-, mK+), relA1, supE44, Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZ Δ M15]
JM110	rpsL(strr), thr, leu, thi, hsdR17(rK-, mK+), lacY, galK, galT, ara, tonA, tsx, dam, dcm, supE44, Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZ Δ M15]
TOP10	F-, mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), ϕ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara, leu)7697, galU, galK, rpsL(strr), endA1, nupG
XL1-BLUE	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17(rK-, mK+), supE44, relA1, lac, [F', proAB, lacIqZ Δ M15::Tn10(tetr)]

Il mantenimento e la selezione dei plasmidi precedentemente descritti in cellule procariotiche è stato possibile grazie alla presenza in ciascun costrutto dell'origine di replicazione batterica ColE1 o pUC di *E. coli* e del gene codificante la resistenza.

CEPPI DI LIEVITO:

In tabella vengono riportati i ceppi di lievito, con relativi genomi, utilizzati per i saggi di interazione mediante tecnica del doppio ibrido:

Tab. 2.5 - Genoma dei ceppi di *S. cerevisiae* utilizzati.

Ceppo:	Genotipo:
Y190	MATa: ura3-52; his3-200; ade2-101; lys2-801; trp1-901; leu2-3, 112; gal4Δ; gal80Δ; cyhr2; LYS2::GAL ₁ UAS-GAL ₁ TATA-HIS3; URA3::GAL ₁ UAS-GAL ₁ TATA-lacZ
CTY10-5d	MATa ade2 trp1-901 leu2-3, 112 his3-200 gal42 gal802 URA3::lexA-lacZ

Le mutazioni puntiformi e delezioni presenti all'interno dei geni codificanti fattori nutrizionali li rendono adatti alla trasformazione con plasmidi in grado di sopperire al deficit nutrizionale.

LINEE CELLULARI:

HEK-293T: linea cellulare che deriva da cellule immortalizzate di una popolazione embrionale renale umana di origine epiteliale, a morfologia stellata, (HEK, *Human Embryonic Kidney*). La linea era già presente in laboratorio. Le cellule 293T sono state cresciute in *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) arricchito con il 10% di siero fetale bovino (FBS, Gibco), senza aggiunta di antibiotici e mantenute a 37°C in incubatore umidificato, al 5% di CO₂.

OLIGONUCLEOTIDI (primers):

In tabella vengono riportati gli oligonucleotidi innesco utilizzati nelle reazioni di amplificazione mediante PCR o sequenziamento con protocollo di Sanger modificato di Nef e Dinamina 2:

Tab. 2.6 - Primers disegnati e utilizzati nel corso dello studio.

Gene	Nome primer e sequenza 5'-3'	Templato	Costrutto
Dinamina 2 Varianti di <i>splicing</i> AA, AB, BA	Dyn2NF EcoRI fwd: AATCTAGAATTCATGGACTACAAGGA CGACG Dyn2NF EcoRI rev: TAGATAGAATTCGTCG AGGCCTAGTCG	pDyn2-NFlag pDyn2-CFlag	pBTM116Dyn2-AA, -AB, -BA; pEG202Dyn2-BA-NF; pGBT9Dyn2-BA-NF
	Dyn2 CF EcoRI fwd: CTAAGAATTCGCGGCCCATGGGC Dyn2 CF XhoI rev: ATGGCTCGAGTCATTGTCATCGTC		pACTIIDyn2-BA
Nef-Lai, -NA7	Nef NcoI fwd: CTCGACCGCCATGGGTGGCAAGTGG Nef BamHI rev: GCATGGATCCTCAGCAGTTCTTGAA	pNef-Lai, pCGNef-NA7	pACTIINef-Lai, pACTIINef-NA7 pGBT9Nef-NA7
Nef-NA7	Nef ins HA BamHI rev: CAGTGGATCCTCAAGCGTAATCTGG GACGTCGTATGGGTAGCAGTTCTTG AAGTACTCCGGATGCAGC	pCGNef-NA7	pBTM116Nef-NA7-HA
Nef-Lai	Nef BamHI fwd: CTGAGGATCCCATGGGTGGCAAGT Nef EcoRI fwd: CTGAGAATTCACCATGGGTGGCAAG TGGTC Nef HA BamHI rev: TAATGGATCCTCAAGCGTAATCTGGG AC	pNef-Lai, pCGNef-NA7	pBTM116Nef-Lai, pEG202Nef-Lai; pBTM116Nef-NA7, pEG202Nef-NA7 pGBT9Nef-NA7
pGAD-GH	Pr5GAD-GH: CTATTCGATGATGAAGATACCCACC AAACCC Pr3GAD-GH: GTGAACTTGCGGGGTTTTTCAGTATC TACGAT	Amplificazione regione codificante gli interattori identificati in saggio del doppio ibrido	

Tab. 2.7 - Primers di sequenza per Dinamina 2.

Gene	Nome primer e sequenza 5'-3'
Dinamina 2 Varianti di <i>splicing</i> - AA, -AB, -BA	prFSEQ1Dyn: GCGGTTTCAGGAATCGTCACCC
	prFSEQ2Dyn: AGGAAGTCGATCCCCAAGGCC
	prFSEQ3Dyn: GTTTGGGGGTGGATTTTGAGAAG
	prFSEQ4Dyn: GGGAGAACGAAGGACCAGATTC
	prRSEQ1Dyn: GTGGACACAGTGCTGGTGCTG
	prRSEQ2Dyn: CTAGTCGAGCAGGGATGGCTC
	prRSEQ3Dyn: GTCCTGCTAATGGGAAGTTG

2.2 Metodi

2.2.1 Preparazione di batteri elettrocompetenti

Una singola colonia di *E. coli* (ceppi utilizzati: TOP10, XL1-blue, HB101, JM109, JM110 e DH5-alpha) è stata inoculata in 4 ml di LB e fatta crescere O/N a 37°C, sotto moderata agitazione. Per i ceppi selezionabili, (TOP10, HB101, JM110) è sempre stato aggiunto l'antibiotico streptomina (20 mg/L finale) al terreno di coltura. In seguito, 1 ml di sospensione batterica è stato inoculato in 100 ml di LB. I batteri sono stati fatti crescere per circa 3 ore fino al raggiungimento della fase esponenziale inoltrata, corrispondente ad un OD₆₀₀ pari a circa 0.5-0.7. La crescita è stata, quindi, bloccata in ghiaccio e la sospensione batterica è stata pellettata a 4000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il pellet cellulare è stato risospeso in acqua sterile fredda, nuovamente sedimentato a 3500 rpm per 10 minuti a 4°C. Il sedimento è stato lavato in glicerolo 10% sterile per due volte; infine i batteri sono stati aliquotati (100 µl per aliquota) e conservati a -80°C.

2.2.2 Trasformazione mediante elettroporazione

Una volta scongelate in ghiaccio le aliquote di *E. coli* necessarie, la sospensione è stata incubata per qualche minuto con il DNA di interesse, la cui quantità è stata decisa in funzione della grandezza del plasmide e della purezza della preparazione (100 ng – 1 µg). Le cellule e in DNA sono stati trasferiti in apposite cuvette per elettroporazione (BioRad, gap 0.2 µm) pre-raffreddate in ghiaccio. L'apparecchio Gene Pulser (BioRad) è stato programmato a 12.5 kV Cm⁻¹ (voltaggio), 1000 Ω (resistenza), 25 µF (capacitanza) e i batteri sottoposti ad uno shock elettrico. Immediatamente dopo il passaggio di corrente elettrica sono stati aggiunti 900 µl di LB non selettivo, quindi i batteri sono stati recuperati e posti a 37°C, sotto agitazione, per almeno 60 minuti. Successivamente la sospensione è stata piastrata su terreno selettivo (LB solido) e i batteri sono stati lasciati crescere a 37°C O/N.

2.2.3 Preparazione di batteri chemocompetenti

Una singola colonia di *E. coli* (ceppi utilizzati: TOP10, XL1-blue, HB101, JM109, JM110 e DH5alpha) è stata inoculata in 5 ml di LB e fatta crescere O/N a 37°C,

sotto moderata agitazione. Successivamente, una parte (pari a 2,5 ml) dell'inoculo è stato aggiunto a 100 ml di LB contenente $MgCl_2$ alla concentrazione finale di 15mM. La sospensione è stata posta in agitazione e per circa 3 ore, fino al raggiungimento della fase esponenziale inoltrata, corrispondente ad un OD_{600} pari a circa 0.5-0.7. Per bloccare la crescita si è raffreddata rapidamente la coltura in ghiaccio. La sedimentazione dei batteri per centrifugazione è stata condotta 3500 rpm per 15 minuti a 4°C. Il sedimento è stato risospeso in 25 ml di soluzione A fredda ($MnCl_2 \times 4H_2O$ 10 mM, $CaCl_2 \times 2H_2O$ 50 mM, MES [2-(*N-morpholino*) ethanesulfonic acid] 10 mM pH 6.3, in H_2O Milli Q, filtrata con filtro 0.22 μm). I batteri sono stati di nuovo pellettati a 4000 rpm per 15 minuti a 4°C, quindi delicatamente risospesi in 3 ml di soluzione B fredda (soluzione A addizionata con glicerolo al 15% (v/v)). Infine la sospensione è stata aliquotata (50 o 100 μl per aliquota) e conservata a -80°C.

2.2.4 Trasformazione chimica

Per questo tipo di reazioni di trasformazione 50-100 μl di batteri competenti sono stati incubati, per 30 min in ghiaccio, con il DNA di interesse, la cui quantità è stata decisa in funzione della grandezza del plasmide e della purezza della preparazione (100 ng-1 μg), o con i prodotti delle reazioni di ligazione. Al termine è stato applicato uno shock termico, mediante esposizione sequenziale a 42°C per 0.5-2 minuti e a 4°C in ghiaccio per 2 minuti. A seguito dell'aggiunta di 900 μl di LB non selettivo, i batteri sono stati lasciati in crescita a 37°C sotto moderata agitazione per almeno un'ora. Al termine le cellule sono state piastrate su terreno LB solido selettivo a 37°C, fino alla comparsa di colonie.

Nota₁: nel corso di trasformazione sia chimica che elettrica, in caso di plasmidi esprimenti sequenze particolarmente tossiche o prони alla ricombinazione, gli step di crescita previsti a 37°C sono stati condotti a 30°C.

Nota₂: ciascuna reazione di trasformazione prevedeva la presenza di controlli positivi e/o negativi appropriati.

2.2.5 Trasformazione chimica di cellule di lievito

Titolazione su piastra del 3-AT

Prima di procedere con gli esperimenti per il saggio del doppio ibrido è stato

necessario determinare la concentrazione di 3-AT da aggiungere al terreno di crescita. È, infatti, riportato che nel ceppo di lievito Y190 permanga una minima espressione basale del gene HIS3, che porta alla sintesi dell'amminoacido istidina. Inoltre qualsiasi sequenza genica, coniugata al BD o all'AD può dar luogo ad attivazione aspecifica del gene reporter (nel nostro caso proprio HIS3). Per queste ragioni è molto importante aggiungere al terreno di coltura una quantità sufficiente di 3-AT, tale, da un lato, da evitare la sintesi di istidina non legata all'interazione tra le proteine di interesse (falsi positivi), dall'altro, da non inibire la crescita delle cellule di lievito per elevata tossicità del composto.

A questo scopo cellule di lievito Y190 sono state trasformata con il solo vettore contenente in BD (pGBT9Nef-NA7). I lieviti sono stati fatti crescere su piastre di terreno selettivo, in presenza di quantità crescenti del composto, a partire da 25 mM, concentrazione minima consigliata per il ceppo Y190 *wild type*, fino 60 mM, concentrazione inibente la crescita. Lo studio ha previsto che in ogni piastra vi fosse un incremento pari a 5 mM della concentrazione. È stato, quindi, scelto di utilizzare il 3-AT alla concentrazione 35 mM per piastra. Questa quantità blocca la crescita delle cellule di lievito in cui si ha un'attivazione aspecifica del transgene, in modo che non superino il diametro di 1 mm dopo 10 giorni di crescita. Le cellule trasformate in cui si ha interazione tra le proteine di interesse non vengono affette dal 3-AT e superano i 5 mm di diametro già dopo 7 giorni di crescita.

Protocollo "small scale" ad alta efficienza

Una singola colonia di cellule di lievito è stata inoculata in 5 ml di terreno (completo YEPD o selettivo SD) e lasciata in incubazione a 30°C O/N a 200 rpm (raggiungimento della fase stazionaria, $1-2 \times 10^8$ cellule/ml). La coltura è stata successivamente diluita in 30-100 ml di terreno fino alla concentrazione di 5×10^6 cellule/ml, corrispondente ad un OD₆₀₀ pari a 0.2. La diluizione è stata nuovamente incubata a 30°C sotto vigorosa agitazione fino a raggiungere la densità ottica di 2×10^7 cellule/ml (10^9 cellule totali). I lieviti sono stati centrifugati a 1000 x g per 10 minuti a temperatura ambiente e il pellet lavato in H₂O deionizzata microfiltrata (MQ) sterile. Le cellule sono state ricentrifugate e risospese in 1 ml di LiAc 100 mM e quindi trasferite in eppendorf da 1.5 ml. I campioni sono stati, quindi, centrifugati per 15 secondi a 7000 rpm e risospesi in un volume finale di 500 µl (2×10^9 cellule/ml) di LiAc 100 mM. La sospensione di cellule di lievito è stata suddivisa in aliquote contenenti 2×10^8 cellule ciascuna; le aliquote sono state poi pellettate ed il surnatante è stato eliminato. A ciascuna

aliquota sono stati aggiunti nel seguente ordine:

- 240 μ l PEG (50% (w/v))
- 36 μ l LiAc 1 M
- 5 μ l DNA carrier (10 mg/ml) precedentemente denaturato
- 70 μ l di DNA plasmidico (0.1-10 μ g) in H₂O

La miscela è stata vigorosamente mescolata prima di essere incubata per 30 minuti a 30°C, e successivamente a 42°C per 25 minuti. Al termine i campioni sono stati centrifugati a 5000 rpm per 15 secondi. Il pellet è stato quindi risospeso in H₂O sterile e piastrato su terreno SD selettivo.

Protocollo "small scale" rapido

Una singola colonia di cellule di lievito è stata inoculata in 4 ml di terreno (completo YEPD o selettivo SD) e lasciata in incubazione a 30°C O/N a 200 rpm. Questo protocollo prevede un inoculo per ogni trasformazione da svolgere. Le colture sono state poi centrifugate a 7000 rpm per 3 minuti, i pellet sono stati risospesi in 500 μ l di LiAc 100 μ M e incubati per 30 minuti a 30°C sotto lieve agitazione, tanto da impedire la sedimentazione cellulare. Al termine ogni campione è stato pellettato per centrifugazione (1 minuto a 7000 rpm) e sono stati aggiunti nell'ordine:

- 5 μ l di DNA carrier (10 mg/ml) precedentemente denaturato
- 0.5-3 μ g di ciascun DNA plasmidico
- 100 μ l di soluzione di trasformazione (PEG 3500 50% (w/v); LiAc 0.2 M; DTT 0.1 M)

il tutto è stato vigorosamente mescolato ed incubato a 45°C per 30-45 minuti. I campioni sono stati quindi pellettati, risospesi in H₂O sterile e piastrati su terreno SD selettivo.

Nota: lo stesso protocollo di trasformazione è stato da noi modificato per aumentare l'efficienza di doppia trasformazione, prevedendo l'inoculo in terreno completo (YEPD) ed una crescita a 30°C sotto decisa agitazione per circa 5 ore, fino al raggiungimento della fase esponenziale. È stato quindi omesso il passaggio di crescita O/N, non sono state apportate modifiche ai successivi passaggi previsti.

Protocollo di trasformazione in larga scala per libreria peptidica

Alcune colonie di lievito precedentemente trasformate con il plasmide pGBT9Nef-

NA7, quindi esperimenti Nef-NA7 legato al BD, sono state inoculate in 10 ml di terreno SD selettivo (senza triptofano in questo caso), e lasciate crescere O/N sotto moderata agitazione a 30°C. Previa misurazione dell'OD₆₀₀, la coltura è stata riportata alla base della curva di crescita (latenza OD₆₀₀=0.2) in 300 ml di terreno SD selettivo e lasciata crescere in agitazione per circa 4-5 ore a 30°C. E' stata, quindi, centrifugata a 1000×g per 10 minuti e il pellet risospeso in 25 ml di acqua sterile. Al termine di una seconda centrifugazione, i lieviti sono stati risospesi in un volume totale di 1,5 ml di TE/LiAc (LiAc 100 mM in Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM). Alle cellule risospese è stata aggiunta la miscela di trasformazione contenente:

- 4.8 ml di PEG 3350 (50% (w/v))
- 1.2 ml di TE/LiAc (LiAc 100 mM in Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM)
- 2 mg di ssDNA carrier precedentemente denaturato
- 30 µg di plasmide AD contenente la libreria

il tutto è stato attentamente mescolato in modo da ottenere una sospensione omogenea, poi suddivisa in 12 aliquote da 0.6 ml ciascuna. Queste sono incubate a 30°C per 30 minuti sotto agitazione (Eppendorf, Thermomixer, 650 rpm). Al termine a ciascun campione sono stati aggiunti 0.07 ml di DMSO, il tutto è stato mescolato ed incubato a 43°C per 30 minuti sotto agitazione (Eppendorf, Thermomixer, 550 rpm). Infine i campioni sono stati raffreddati rapidamente in ghiaccio per qualche minuto, quindi centrifugati a 7000 rpm per 3 minuti. Ciascun pellet è stato risospeso in 0.2 ml di TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM). I campioni sono stati quindi piastrati su terreno SD solido selettivo e contenente 3-AT alla concentrazione finale di 35 mM.

Calcolo della resa di trasformazione e della numerosità di cloni screenati

Al fine di valutare l'efficienza della tecnica utilizzata per lo screening della libreria peptidica, per ogni trasformazione è stata calcolata la resa, piastrando su terreno selettivo ma privo di 3-AT, un aliquota del volume finale totale di risospensione. Per comodità si è scelto di usare il fattore di diluizione 0.01, al fine di ottenere un numero compreso tra 30 e 300 colonie per piastra.

Metodo utilizzato per calcolare l'efficienza di trasformazione:

Dopo aver contato le colonie (cfu: unità formante colonia) cresciute su terreno selettivo SD/-Leu/-Trp si applica la formula:

$$\frac{\text{colonie}(cfu) \cdot \text{volume} \cdot \text{di} \cdot \text{risospensione}(ul)}{\text{volume} \cdot \text{piastrato}(ul) \cdot \text{fattore} \cdot \text{diluizione} \cdot \text{DNA}(ug)} = cfu / ugDNA$$

Nel nostro caso, avendo scelto il metodo di trasformazione sequenziale e non simultanea, il termine al denominatore si riferisce alla quantità di plasmide AD, codificante la libreria, utilizzato in ogni esperimento.

Per stimare, invece il numero di cloni differenti presi in esame, si è ricorsi alla seguente formula:

$$\frac{cfu}{\text{quantità} \cdot \text{totale} \cdot \text{di} \cdot \text{DNA} \cdot \text{usato}(ug)} = \text{numero} \cdot \text{cloni} \cdot \text{esaminati}$$

2.2.6 Saggio di selezione con 3-AT

Le colonie trasformate cresciute su terreno solido selettivo (SD -Trp/-Leu) addizionato con 3-AT (35 mM) sono state nuovamente strisciate sullo stesso tipo di terreno selettivo al fine di valutarne la vitalità e il mantenimento della capacità di crescere in assenza del marcatore nutrizionale prodotto solo a seguito dell'interazione tra le proteine codificate dai vettori incorporati durante la trasformazione. Le colonie positive per questo primo controllo sono state sottoposte a saggio di valutazione dell'attività beta-galattosidasi.

2.2.7 Saggio di attività beta-galattosidasi (saggio X-gal)

Per valutare l'interazione tra le sequenze di interesse, sono stati allestiti specifici saggi su filtro: singole colonie di lievito, trasformate e cresciute su terreno SD solido selettivo, sono state posizionate su un filtro di carta e numerate. Il filtro di carta è stato poi lasciato per almeno 30 minuti a -80°C al fine di danneggiare la parete cellulare. Successivamente è stato appoggiato, con le colonie di lievito verso l'alto, sopra un secondo disco di carta (3MM Whatmann o da filtro) imbevuto con tampone Z (Z Buffer: Na₂HPO₄·7H₂O 60 mM, Na₂HPO₄·H₂O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM, beta-mercaptoetanolo 0.27%) e X-gal (340 mg/L). Il filtro è stato poi incubato a 30°C al riparo dalla luce ed è stata monitorata l'eventuale comparsa della colorazione blu. Ogni saggio comprendeva una reazione di controllo, data da colonie di lievito contenenti i plasmidi codificanti Nef fuso sia all'AD che al BD, in modo da valutare se i peptidi positivi interagissero con Nef in

modo più o meno affine rispetto all'interazione omotipica di dimerizzazione.

2.2.8 Estrazione del DNA plasmidico da lievito

Le colonie che dimostravano in saggio per l'attività beta-galattosidasica di esprimere un peptide in grado di legare Nef, sono state ristriciate su terreno completo solido selettivo (SD -Trp/-Leu) non addizionato con 3-AT, in modo da consentirne la ripresa. Contemporaneamente sono state inoculate in terreno SD liquido (SD -Leu) in modo da facilitare la perdita del vettore codificante *nef* e selezionato dall'amminoacido triptofano (Trp). Dopo circa due passaggi di crescita in terreno SD-Leu è stimato che circa il 20% delle colonie perde il vettore non selezionato. Il controllo è stato svolto piastrando le stesse colonie contemporaneamente su terreno singolo e doppio selettivo (SD -Leu ed SD -Trp/-Leu). I lieviti che riuscivano a crescere solo su terreno singolo selettivo avevano effettivamente perso il vettore pGBT9-Nef. Le colonie contenenti solo pGAD-GH sono state nuovamente analizzate in saggio per l'attività beta-galattosidasica, in modo da escludere eventuali peptidi in grado di attivare il gene reporter non per interazione con Nef, ma in modo autonomo (falsi positivi). Si è proseguito con l'estrazione del plasmide dalle colonie che avevano superato anche questo controllo. Quest'ultime sono state inoculate O/N a 30 °C sotto vigorosa agitazione in terreno liquido selettivo (SD -Leu). Sono state quindi pellettate a 13200 rpm per 5 minuti e risospese in soluzione di lisi alcalina (SDS 2% e NaOH 0.3N), che è necessario lasciar agire per un'ora sotto agitazione. Al termine i campioni sono stati sottoposti e ripetuti cicli di congelamento (in azoto liquido)-scongelo rapido, seguito da un vigoroso mescolamento via vortex. La separazione degli acidi nucleici è stata completata per aggiunta di una soluzione contenente fenolo-cloroformio-alcol isoamilico (in proporzione 25:24:1) e successiva centrifugazione. La precipitazione degli acidi nucleici recuperati dalla fase acquosa è avvenuta per incubazione a -80°C dopo l'aggiunta di etanolo assoluto e sodio acetato e successiva centrifugazione. I pellet così ottenuti sono stati lavati, asciugati, quindi risospesi in H₂O. Il DNA plasmidico recuperato è stato immediatamente trasformato in cellule di *E. coli* competenti, poi selezionate su terreno selettivo (LB solido contenente ampicillina 50 mg/L).

I plasmidi successivamente ottenuti per lisi delle cellule batteriche trasformate sono stati analizzati fino ad ottenere la sequenza codificante il peptide interattore, utilizzando i primer riportati (vedi Tab. 2.6).

2.2.9 Preparazione di DNA plasmidico con kit commerciali

Il DNA plasmidico in piccola scala (*Mini prep*) ed in grande scala (*Maxi prep*) è stato estratto dai diversi ceppi di *E. coli* trasformati con il metodo della lisi alcalina e purificato con QIAGEN Plasmid Kit, un sistema basato sull'utilizzo di colonne a scambio anionico. Con questo procedimento il DNA plasmidico si lega alla resina della colonna e viene separato da RNA, proteine ed impurità ad alto peso molecolare mediante lavaggi con tamponi a bassa concentrazione salina. Il DNA plasmidico viene successivamente eluito e concentrato in tampone EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5). Tra i due tipi di purificazione plasmidica per mezzo di kit commerciale cambia il volume di coltura iniziale e di conseguenza la resa finale.

2.2.10 Purificazione di DNA plasmidico per lisi alcalina

Questo tipo di protocollo non prevede l'utilizzo di materiale commerciale, si basa sull'utilizzo di detergenti alcalini e sul recupero del materiale genetico non genomico attraverso la precipitazione in solvente organico. Una o più colonie isolate di una popolazione omogenea di *E. coli* trasformate con il plasmide di interesse è stata inoculata in 5-8 ml terreno LB liquido addizionato con l'antibiotico adatto al mantenimento in selezione del ceppo di interesse e lasciata crescere O/N a 37 °C sotto moderata agitazione. Il diverso volume di inoculo iniziale dipende dalla diversa resa che si ottiene esprimendo plasmidi cosiddetti "*high copy number*" o "*low copy number*". La sospensione batterica è stata quindi pellettata a 5000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente (RT). Il pellet è stato risospeso in tampone osmotico GTE (50 mM glucosio, 10 mM EDTA pH 8.0, 25 mM Tris-HCl pH 8.0), quindi lisato per aggiunta di una soluzione contenente NaOH ed SDS (0.2 N NaOH, 1% SDS) e vigorosa inversione. La precipitazione del DNA genomico e delle proteine in soluzione è stata ottenuta grazie all'aggiunta di una soluzione di neutralizzazione (5M potassio acetato, 11.5% acido acetico glaciale) e ad una centrifugazione a 13200 rpm a 4°C per 10 minuti. Al termine il sovranatante è stato recuperato, trasferito in un nuovo contenitore (Eppendorf, 1.5 ml) e precipitato per aggiunta di 1 ml di etanolo freddo a 13200 rpm a 4°C per 10 minuti. Il pellet traslucido recuperato è stato lavato in etanolo al 70% e risospeso in TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) con l'eventuale aggiunta di RNasiA.

2.2.11 Reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR)

Per l'amplificazione dei frammenti di DNA di interesse è stata utilizzata la tecnica di amplificazione a catena della polimerasi (PCR). Per l'amplificazione di Nef (lunghezza amplificato 600 bp) o Dinamina 2 (lunghezza amplificato 2600 bp) sono state state preparate delle miscele di reazione in acqua deionizzata sterile fino ad un volume di 50 μ l. I programmi di amplificazione sono stati differenziati a seconda della lunghezza della regione e dei primers utilizzati e sono stati riportati in Tab. 2.6.

Tab. 2.8 - Composizione della miscela di reazione utilizzata per la PCR di amplificazione.

Componente	Quantità	Composizione
Templato	70-120 ng	
Buffer 10x	5 μ l (1x finale)	10x: Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM, MgCl ₂ 15 mM
MgCl ₂ 25mM	3 μ l (1.5 mM finale)	
dNTPs	1 μ l (0.2 mM finale)	0.05 mM finale per dNTP
Primer fwd Primer rev	0.5 μ l 0.5 μ l	0.2 μ M finale ciascuno
AmpliTaqGold	0.5 μ l (2.5 unità totali)	5 unità/ μ l
H ₂ O	q.b. fino a 50 μ l	

Tutti i reagenti utilizzati sono AppliedBiosystems.

Tutte le reazioni di amplificazione sono state effettuate in termociclatore (Mastercycler personal, Eppendorf) mediante la ripetizione di un numero variabile di cicli successivi comprendenti una fase di denaturazione a 94°C, una di appaiamento degli oligonucleotidi alla temperatura richiesta ed una di elongazione a 72°C. Allo scopo di denaturare il DNA e di attivare la polimerasi, si è sempre previsto un unico ciclo iniziale a 94°C di 5 minuti.

Tab. 2.9 - Programmi di amplificazione utilizzati per Nef e Dinamina 2.

Ciclo Nef	n. cicli	Temp (°C)	Tempo	Ciclo Dyn2	n. cicli	Temp (°C)	Tempo
1	1	94	5 min	1	1	94	5 min
2	30	94 52 72	60 sec 30 sec 60 sec	2	30	94 56 72	60 sec 60 sec 3 min
3	1	72	7 min	3	1	72	7 min
4	1	4	∞	4	1	4	∞

2.2.12 Sequenziamento

Come già anticipato, i costrutti utilizzati in questo studio sono stati controllati tramite sequenziamento. La reazione di sequenziamento è stata allestita ricorrendo al BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), basato sul metodo di Sanger modificato. Tale kit fornisce un tampone di reazione composto da:

- 4 di-deossinucleotidi trifosfato (ddNTPs) coniugati ciascuno ad un cromoforo diverso
- i deossinucleosidi-trifosfati (dNTPs)
- l'enzima AmpliTaq® Gold
- il tampone di reazione.

In tabella si riporta la composizione di una reazione di sequenziamento:

Tab. 2.10 - Miscela di reazione utilizzata per il sequenziamento dei geni di interesse.

Componente	Quantità	Composizione
Templato	< 100 ng	
Buffer 5x	3 µl (1x finale)	5x: Tris-HCl 200 mM, pH 9.0, MgCl ₂ 5 mM
BD	1 µl	ddNTPs, dNTPs, Taq
Primer	0.5 µl	0.2 µM finale
H ₂ O	q.b. fino a 15 µl	

La reazione di sequenziamento è stata condotta in un termociclatore (Mastercycler personal, Eppendorf) secondo il seguente schema di amplificazione:

Tab. 2.11 - Programma utilizzato per la PCR di sequenziamento

Ciclo	n. cicli	Temp (°C)	Tempo
1	1	94	5 min
2	35	94 50 72	30 sec 10 sec 4 min
3	1	4	∞

I campioni sono stati quindi purificati mediante precipitazione O/N a -20 °C in presenza di sodio acetato (3M pH 4.6, 3%) e 2.5 volumi di etanolo, quindi risospesi in formammide (Sigma, F7508). L'analisi è stata condotta utilizzando un sequenziatore automatico (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). L'elettroferogramma ottenuto è stato processato con l'editor di file contenenti cromatogrammi Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd) ed allineato alle sequenze depositate nel sistema internazionale NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando il programma Blast.

2.2.13 Restrizioni enzimatiche

Le reazioni di restrizione enzimatica del DNA sono state effettuate utilizzando gli opportuni enzimi (Biolabs, Fermentas) nei rispettivi tamponi di reazione. Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dichiarata per l'enzima scelto (generalmente 37°C). A seconda del tipo di endonucleasi utilizzata e della quantità di acido nucleico da digerire la reazione è stata impostata in termini di (a) unità di enzima impiegate e (b) intervallo di reazione (minimo 15 minuti, massimo 90 minuti). Al termine della reazione di digestione, i campioni sono stati analizzati tramite migrazione elettroforetica in gel d'agarosio. Per verificare la corretta dimensione dei frammenti ottenuti sono stati impiegati opportuni marcatori a peso molecolare noto (vedi 2.2.7).

2.2.14 Tecniche di clonaggio

In questo lavoro è stata utilizzata la strategia di clonaggio sotto riportata:

La sequenza genica di interesse è stata amplificata mediante la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR). A tale scopo sono stati disegnati opportuni oligonucleotidi innesco (primers) in grado di amplificare l'intera

sequenza di interesse addizionata o meno ad un'estremità con epitopi noti (Flag o HA). La sequenza di ciascun primer è caratterizzata dalla presenza di sequenze di taglio riconosciute specificamente da enzimi di restrizione, scelti opportunamente tra quelli presenti all'interno del MCS del vettore di destinazione. Al termine della reazione parte del prodotto di PCR (5% o 10% a seconda della resa) è stato caricato in gel d'agarosio per verificare la corretta dimensione degli amplificati. Successivamente sia il frammento purificato che il vettore in cui tale frammento doveva essere inserito sono stati sottoposti a taglio enzimatico con gli opportuni enzimi di restrizione. I prodotti delle digestioni quindi sono stati controllati in gel d'agarosio, purificati ed infine ligati tra loro.

Qualora fosse stato scelto di inserire il frammento utilizzando lo stesso enzima per entrambi i terminali (es. EcoRI), il vettore è stato trattato con fosfatasi alcalina al fine di rimuovere i gruppi fosfato alle estremità 5', prevenendo la reazione intramolecolare di circolarizzazione del vettore (*self-ligation*). La reazione è stata condotta a 37°C per un minimo di 60 minuti, il tempo di incubazione è stato aumentato in modo proporzionale alle quantità di templatato (Calf Intestine Phosphatase, Roche Diagnostics, buffer di defosforilazione: 0.05 M Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 8.5). Le reazioni di ligazione sono state effettuate utilizzando la DNA ligasi del batteriofago T4 (Biolabs, 4x10⁵ U/ml, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 10 mM Dithiothreitol, pH 7.5), capace di catalizzare *in vitro* la formazione di legami fosfodiesterici tra il residuo di fosfato in 5' ed il gruppo idrossilico in 3' delle estremità adiacenti. Le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 20 µl impiegando 0.5 unità di ligasi e incubate O/N a 16°C. Le quantità dei due frammenti usate nella reazione di ligazione sono state calcolate in base al tipo di clonaggio, soprattutto in base al rapporto tra la grandezza dell'inserito rispetto al vettore di destinazione. I prodotti della reazione sono stati trasformati in cellule batteriche di *E. coli* competenti, per via chimica o elettrica. È sempre stato incluso un controllo per stimare la percentuale di vettore ricircularizzato o non completamente digerito/defosforilato. Ogni vettore creato è stato, poi, verificato sia mediante excisione enzimatica dell'inserito, sia mediante sequenziamento.

2.2.15 Trasfezione transiente di HEK293T

Al fine di trasfettare in modo transiente cellule della linea HEK293T con i plasmidi codificanti Nef di HIV-1 fuso alla porzione N- o C-terminale della proteina

fluorescente YFP, è stato usato il sistema TransIT®-Express Transfection Reagent (Mirus Bio, Madison, USA). Questa innovativa tecnica sfrutta un sistema di *delivery* basato su poliammine e risulta essere molto efficiente, scarsamente tossico per le cellule utilizzando reagenti fisiologici e particolarmente adatto per la semina su piastre *multiwell*, oltre che estremamente rapido.

Per valutare in modalità “*high-throughput screening*” l'efficacia di una libreria di composti contro la dimerizzazione di Nef di HIV-1 si è scelto di utilizzare piastre da 96 pozzetti a fondopiatto ad alta adesività (Microplate, 96 well, Flat-Bottom, μ CLEAR, Cat.-No.: 655097, Greiner Bio One). Grazie alla modalità e ai reagenti scelti è stato possibile trasfettare le cellule e somministrare i composti in un totale di 6 ore, valutandone gli effetti, in termini di citotossicità, formazione di precipitati ed efficace inibizione della dimerizzazione di Nef dopo 48 ore di incubazione.

Le cellule HEK293T sono state seminate in fiasche con superficie di 75 cm² (T75, Falcon) in DMEM addizionato con di FBS (10% v/v), senza antibiotici in un volume finale pari a 10 ml. Le cellule sono state utilizzate una volta arrivate al 60-80% di confluenza (24-48 ore). Come da protocollo, i reagenti di trasfezione (terreno di coltura+DNA+TransIT) sono stati incubati per un'ora, tanto da consentire la formazione dei complessi DNA-reagenti. Nello specifico, per ogni pozzetto sono stati utilizzati:

- 100 μ l di terreno DMEM (non addizionato FBS 10%)
- 60 ng di ciascun plasmide
- 0.5 μ l di Trans IT®-Express (corrispondente a 643.5 μ g)

Il protocollo prevede un primo intervallo di almeno 20 min, in cui sono stati incubati il terreno e il reagente, per indurre la formazione dei complessi ed un secondo, di 30 min, che inizia con l'aggiunta del DNA che entrerà a far parte dei complessi formati. Durante questo secondo intervallo di incubazione le cellule sono state staccate dalla superficie della fiasca, cui aderivano come monostrato (Trypsina-EDTA, Gibco) e contate (camera di Burker, Trypan Blue, Sigma) in modo da seminarne 2×10^4 per ogni pozzetto in ulteriori 100 μ l di DMEM (addizionato FBS 10%).

In tabella sono riassunte le condizioni di trasfezione per pozzetto e per piastra da 96 pozzetti:

Tab. 2.12 – Composizione della miscela utilizzata per la trasfezione transiente delle cellule.

	HEK293T	DNA	Trans IT®	DMEM
1 well	2x10 ⁴	60 ng pNef-YN 60 ng pNef-YC	0.5 µl	200 µl - V _{reagenti}
96 wells	1.8x10 ⁶	5.4 µg pNef-YN 5.4 µg pNef-YC	45 µl	18 ml - V _{reagenti}

Come si può notare dalla quantità riportate, in realtà non sono stati usati tutti i 96 pozzetti, su indicazione della casa produttrice delle piastre, la prima e l'ultima colonna di pozzetti non sono state utilizzate per la semina delle cellule perché potevano andare incontro a fenomeni di evaporazione, ma contenevano tampone fosfato PBS 1x (*Phosphate Buffered Saline*, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 4.3 mM, 1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4) sterile.

2.2.16 Somministrazione dei composti (*small molecules*)

Le cellule 293T trasfettate e piastrate sono state lasciate in incubatore termostato per 4 ore, durante le quali le cellule si sono sedimentate ed hanno iniziato ad aderire al fondo del pozzetto. Al termine di questo intervallo in ciascun pozzetto è stato aggiunto un diverso composto, proveniente dalla libreria commerciale di *small-molecules* (vedi 2.1), alla concentrazione finale di 25 µM per composto. Le cellule sono state lasciate crescere per 48 ore in incubatore termostato a 37°C al 5% di CO₂. Ogni ciclo di trasfezione e somministrazione di composti prevedeva la presenza di controlli di trasfezione e di crescita in presenza di dimetilsolfossido (DMSO) usato come solvente per le *small molecules*.

2.2.17 Preparazione del saggio BiFC

Al termine di un'incubazione di 48 ore con i composti oggetto dello studio, le cellule sono state analizzate al microscopio a luce diretta (Leika), al fine di valutare quale fosse il grado di tossicità dato dalle sostanze e l'eventuale presenza di precipitati solidi o di altri contaminanti. Questi dati sono stati registrati in modo da escludere dall'analisi dell'efficacia sull'inibizione della dimerizzazione i composti tossici o anche minimamente precipitati. Le piastre sono state quindi trasferite in un incubatore termostato a 30°C per le successive 3 ore al fine di consentire la maturazione del fluoroforo. Al termine di questo intervallo, dopo aver

rimosso il terreno di coltura, ciascun pozzetto è stato lavato più volte in tampone PBS 1x. Le cellule sono state lasciate in questo buffer per l'intera durata dell'analisi al microscopio confocale.

2.2.18 Microscopia confocale per BiFC

Il saggio di complementazione, BiFC, si basa sull'emissione di un segnale fluorescente che dipende dall'avvenuta interazione tra i peptidi, oggetto dello studio, fusi ai due terminali non fluorescenti della proteina YFP. In pratica, solo l'interazione diretta tra le due proteine può portare alla formazione della YFP completa, in grado di emettere un segnale visibile nell'ambito della fluorescenza, permettendo anche di ottenere dei dati circa la localizzazione dell'interazione proteina-proteina. Non c'è differenza di intensità o lunghezza d'onda tra una proteina fluorescente non suddivisa in frammenti e il corrispettivo segnale emesso per complementazione. L'analisi della complementazione di fluorescenza data dalla dimerizzazione omotipica di Nef di HIV-1, nonché la sua inibizione ad opera di un composto chimico, sono state studiate utilizzando un microscopio confocale (TCS SP5 II, Leica), impostando la lunghezza d'onda di eccitazione a 514 nm e l'intervallo di emissione tra 530 e 650 nm. In ogni esperimento sono state salvate le immagini relative ai controlli di trasfezione e di crescita in assenza e presenza di DMSO e dei composti che facevano registrare una diminuzione della fluorescenza rispetto ai controlli. In questo caso è stata salvata un'immagine dello stesso campo in luce trasmessa, per dimostrare che la diminuzione di segnale registrato non dipendeva dalla presenza di un basso numero di cellule adese.

2.2.19 Immunofluorescenza indiretta

Cellule HEK293T (1.5×10^5) sono state seminate all'interno di una piastra da sei pozzetti (Falcon) sul cui fondo sono stati depositi vetrini portaoggetto sterili, in un volume finale pari a 2 ml di terreno (DMEM addizionato FBS 10%), senza antibiotici. I vetrini sono stati pretrattati utilizzando una soluzione di Poli-Lisina (0.1 mg/ml, Sigma) in modo da favorire l'adesione delle cellule. Raggiunta una confluenza del 60-80%, si è proceduto alla trasfezione. Dopo 48 ore, i vetrini sono stati lavati in PBS 1X e le cellule fissate, incubandole per 5 minuti a -20°C , in una soluzione contenente acetone e metanolo in rapporto 1:1. I vetrini sono stati incubati con BSA 3%-PBS 1X per 30 minuti a temperatura ambiente. È stato,

quindi, aggiunto l'anticorpo primario diluito in BSA 3%-PBS 1X, lasciato incubare per 1 ora in camera umida a temperatura ambiente. Al termine di tre lavaggi in PBS 1X, i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo secondario diluito in BSA 3%-PBS 1X per 1 ora, in camera umida, al buio, a temperatura ambiente. Infine, i vetrini sono stati lavati in acqua, coperti con una goccia di soluzione di montaggio (glicerolo 90% (v/v) in PBS, N-propilgallato 0.2% (w/v)) (Vectashield H-1000, Vector Laboratories) ed analizzati al microscopio confocale con obiettivo 63X ad immersione (LEICA DM IRBE).

La seguente tabella riassume gli anticorpi impiegati e le modalità di utilizzo:

Tab. 2.13 – Anticorpi utilizzati per l'immunofluorescenza indiretta.

Anticorpo primario	Diluizione
Monoclonale di topo anti-Flag (Sigma)	1:500
Anticorpo secondario	Diluizione
Policlonale di capra anti-IgG di topo Alexa Fluor 568 (Invitrogen)	1:750

3. RISULTATI

3.1 Premessa

Come descritto nella parte introduttiva, la proteina Nef di HIV-1 svolge numerose funzioni, volte all'aumento dell'infettività virale e dell'efficienza replicativa, interagendo con numerosi fattori sia cellulari che virali.

L'ipotesi sperimentale iniziale di questo lavoro era nata dalla pubblicazione, nel 2007, di un promettente lavoro che aveva individuato nella proteina strutturale Dinamina 2 un partner cellulare essenziale per l'implementazione dell'infettività virale mediata da Nef [74].

La prima parte del lavoro si proponeva di verificare ed analizzare il legame tra le due proteine, utilizzando come organismo di espressione il lievito, avendo come scopo finale l'individuazione di peptidi inibitori dell'interazione. Non riscontrando alcun tipo di interazione in *S. cerevisiae* tra le suddette proteine e non ottenendo migliori risultati in cellule di mammifero, abbiamo ritenuto più utile focalizzare la nostra attenzione sulla caratterizzazione del ruolo che la dimerizzazione di Nef svolge nella modulazione dei processi cellulari e nell'implementazione dell'infettività. Recentemente, sono stati presentati numerosi lavori in supporto del fatto che la forma oligomerica della proteina virale sia necessaria allo svolgimento di molte funzioni chiave, come la down-regolazione del CD4 e l'interazione con Hck, ipotizzando che non abbia solo una funzione strutturale di protezione e stabilizzazione a livello citosolico [35, 36].

La seconda parte del lavoro, quindi, ha mirato all'ottimizzazione di saggi affidabili e riproducibili per analizzare la dimerizzazione di Nef in sistemi eucariotici di base, ad esempio utilizzando diversi ceppi di lievito, e in cellule di mammifero. Lo scopo finale, in entrambi i sistemi, è stato quello di individuare inibitori proteici o chimici (*small molecules*) che potessero meglio caratterizzare il ruolo biologico della dimerizzazione di Nef, attraverso la sua inibizione.

Inoltre, è stato ritenuto utile analizzare l'interazione tra Nef ed altre proteine di HIV-1 (Retrotrascrittasi, Integrasi e Tat), ipotizzando che anche la destabilizzazione di questi legami possa rappresentare una nuova promettente strategia terapeutica antivirale. Questa parte del lavoro si è ispirata alle pubblicazioni, nel corso dell'ultimo decennio, di dati che dimostrano *in vitro* l'interazione diretta di Nef sia con Tat [55] che con Integrasi [75]. Resta ancora da comprendere quale sia il ruolo funzionale dei legami che Nef instaura con queste

proteine virali e quale siano le regioni strutturali coinvolte. La selezione di inibitori specifici potrebbe rivelarsi efficace sia nel determinare il meccanismo di interazione tra le proteine, sia nel portare alla caratterizzazione del ruolo svolto durante il ciclo infettivo.

L'individuazione di inibitori specifici delle funzioni di Nef mediate dalla forma dimerica o mediate dall'interazione con altre proteine del virus HIV-1 può, quindi, essere particolarmente utile nella comprensione di diversi meccanismi virali ancora poco chiari e può portare alla selezione di nuovi composti attivi contro il virus *in vivo* e quindi utilizzabili come *lead compounds* nella formulazione di nuovi trattamenti antivirali.

3.2 Studio dell'interazione Nef-Dinamina 2

La pubblicazione del lavoro del Dott. Pizzato e colleghi ha richiamato l'attenzione sulla possibilità che Nef trovasse nella proteina cellulare Dinamina 2 un importante partner di legame [74]. Per chiarezza espositiva, a seguito viene riportata una breve descrizione della proteina, in termini di struttura e funzioni note.

Dinamina 2, GTPasi cellulare ubiquitaria

Struttura

Dinamina 2 (Dyn 2) appartiene alla superfamiglia delle dinamine (Dinamina 1, 2 e 3 e proteine ad esse correlate). Si tratta di grandi GTPasi cellulari implicate nei processi di endocitosi mediati da clatrina, nel trasporto via vescicole tra i vari compartimenti cellulari, nella nucleazione dell'actina e nei processi cito-chinetici. Sono state individuate tre isoforme di Dinamina, che presentano un'elevata omologia di sequenza. Si tratta di proteine ad elevato peso molecolare, circa 96 KDa, con bassa affinità per il GTP e capacità di rapida idrolisi di questo nucleotide:

- Dyn 1: espressa dal tessuto neuronale, presenta 8 varianti di *splicing*
- Dyn 2: espressa in modo ubiquitario, presenta 4 varianti di *splicing*: AA, AB, BA, BB
- Dyn 3: espressa a livello polmonare, del tessuto neuronale e dal testicolo, presenta 13 varianti di *splicing*.

Le tre isoforme, *in vivo ed in vitro*, si organizzano in tetrametri, strutturalmente simili ad anelli e spirali.

Dinamina 2 può essere suddivisa in cinque domini strutturali:

- a. N-terminale o *GTP binding & hydrolysis domain*: contiene tre siti di legame per il GTP
- b. Dominio intermedio o *Middle domain*: coinvolto nella formazione dei tetrameri
- c. Dominio PH o *Pleckstrin homology domain*: ha un ruolo chiave nella localizzazione in membrana della proteina e nei processi di endocitosi mediata da recettori
- d. Dominio GED o *GTPase effector domain*: regione con struttura *coil-coiled* che attiva l'idrolisi del GTP da parte del dominio N-terminale. È, inoltre, coinvolto nelle interazioni proteina-proteina e nell'oligomerizzazione
- e. Dominio C-terminale o *Proline rich domain*: è coinvolto nei processi di endocitosi e nelle interazioni proteina-proteina

Funzioni

1. Endocitosi mediata da clatrina a partire dalla membrana cellulare
2. Fagocitosi e trasporto di vescicole dal e verso il Golgi e degli endosomi tardivi
3. Regolazione e organizzazione della nucleazione dei filamenti di actina citoscheletrica
4. Cito-chinesi durante la mitosi

Non è ancora chiaro come Dinamina 2 intervenga nel processo di rilascio della vescicola dalla membrana. Sono state elaborate due ipotesi: (a) per compressione da parte degli oligomeri del collo della vescicola a seguito dell'attività GTPasica e (b) per *stretching* della vescicola da parte dei polimeri di Dinamina che si espandono, allungandosi, sino a provocarne il rilascio dalla membrana.

È stato scelto di verificare l'interazione tra le proteine di interesse all'interno di un sistema eucariotico di base come il lievito, ricorrendo al saggio del doppio ibrido (vedi 1.8.1). Uno dei problemi dati da questa metodica è la possibilità di andare incontro a risultati inesatti, definiti falsi positivi, dovuti alla capacità intrinseca di alcuni peptidi di dare attività trascrizionale non abbinata alla ricomposizione del fattore di trascrizione, ma a seguito dell'abilità della proteina in studio di fungere da dominio di legame al DNA o al più semplice reclutamento di fattori di trascrizione cellulari.

Il sistema LexA-Gal4 è riportato dar luogo ad una più rapida ed intensa attivazione del transgene (con relativo segnale più alto dato dall'attività beta-galattosidasica), dall'altro è maggiormente incline all'insorgere di attività

trascrizionale aspecifica. Il sistema Gal4-Gal4, invece, risulta in una più blanda attivazione del transgene, con relativo minor segnale dato dall'attività beta-galattosidasi, ma dà luogo meno frequentemente all'insorgenza di falsi positivi. È sempre necessario valutare quale sia il sistema più adatto allo studio dell'interazione scelta, valutando anche diversi plasmidi per lo stesso sistema.

La parte iniziale del progetto ha riguardato la messa a punto e la valutazione di numerosi costrutti all'interno di entrambi i sistemi in lievito descritti sopra. Una volta scelti i vettori più adatti sono state analizzate le interazioni oggetto dello studio. I risultati ottenuti verranno illustrati in seguito.

3.2.1 Verifica della capacità di Dinamina 2 di formare oligomeri *in vitro*

La capacità di Dinamina 2 di formare dimeri e oligomeri *in vitro* è stata indagata in *S. cerevisiae*, mediante saggio del doppio ibrido. A tale scopo le 4 varianti di *splicing* di Dinamina 2 (AA, AB, BA) sono state clonate all'interno di vettori contenenti il BD di LexA (pBTM116 e pEG202) o di Gal4 (pGBT9). La variante di *splicing* BA è stata clonata all'interno del vettore pACTII contenente l'AD di Gal4. La variante BB, dopo sequenziamento del vettore fornitoci dal Dott. Pizzato, è stata tralasciata per la presenza di numerose mutazioni e delezioni.

I ceppi CTY10-5d e Y190 sono stati trasformati con le varie combinazioni di vettori, in modo da avere ogni volta una variante di *splicing* abbinata al BD e l'altra coniugata all'AD. Le colonie positive sono, quindi, state sottoposte a saggio X-Gal.

Tab. 3.1 – Dimerizzazione di Dinamina 2. Si riportano le combinazioni di vettori utilizzate per dimostrare la capacità di Dinamina 2 di formare dimeri *in vitro*. L'attività galattosidasi è riportata come: buona (+), intensa (++) e molto intensa (+++). La sigla CTRL individua i controlli per escludere che vi sia attivazione aspecifica del gene reporter da parte delle singole proteine esaminate.

Interazione	Plasmide DB	Plasmide AD	Attività beta-galattosidasi
CTRL Dyn2AA-BD-LexA	pBTM116-Dyn2AA	pACTII	No
CTRL Dyn2AB-BD-LexA	pBTM116-Dyn2AB	pACTII	No
CTRL Dyn2BA-BD-LexA	pBTM116-Dyn2BA	pACTII	No
CTRL Dyn2BA-BD-LexA	pEG202Dyn2BA	pACTII	No
CTRL Dyn2BA-BD-Gal4	pGBT9Dyn2BA	pACTII	No
CTRL Dyn2BA-AD-Gal4	pBTM116	pACTIIDyn2BA	No
Dyn2AA-Dyn2BA	pBTM116-Dyn2AA	pACTIIDyn2BA	Si (+++)
Dyn2AB-Dyn2BA	pBTM116-Dyn2AB	pACTIIDyn2BA	Si (++)
Dyn2BA-Dyn2BA	pBTM116-Dyn2BA	pACTIIDyn2 BA	Si (+++)
Dyn2BA-Dyn2BA	pEG202Dyn2BA	pACTIIDyn2BA	Si (+++)
Dyn2BA-Dyn2BA	pGBT9Dyn2BA	pACTIIDyn2 BA	Si (+)

Come si vede dalla Fig. 3.1, i diversi esperimenti condotti, hanno dimostrato che:

- a. Le singole varianti di *splicing* di Dinamina 2 sono in grado formare dimeri, sia per interazioni omotipiche che eterotipiche.
- b. Le varianti di *splicing* AA e BA fanno registrare una più intensa attività beta-galattosidasica, significativa del fatto che instaurino interazioni più rapidamente e a più alta affinità. La variante AB risulta, invece, essere la meno reattiva.
- c. L'interazione, se pur con una differenza di intensità legata al sistema, è visibile, come attività beta-galattosidasica, sia nel sistema LexA-Gal4 che in quello Gal4-Gal4, ed è catalogabile come interazione forte.

3.2.2 Verifica dell'interazione tra Nef e Dinamina 2

Saggio del doppio ibrido in lievito

Anche l'interazione tra Nef e Dinamina 2 è stata verificata in *S. cerevisiae*, mediante saggio del doppio ibrido, in modo analogo alla dimerizzazione di Dinamina 2 appena descritta. A questo scopo sono stati costruiti vettori esprimenti gli alleli Lai ed NA7 di Nef, fusi al BD di LexA (pBTM116, pEG202 e pSH2) o al BD di Gal4 (pGBT9). Ogni allele, inoltre, è stato clonato all'interno di ciascun vettore sia fuso al C-terminale all'epitopo HA che privo di questo tag. I ceppi CTY10-5d e Y190 sono stati trasformati con varie combinazioni di vettori in modo da verificare sia l'interazione specifica tra le due proteine che la presenza di una diversa affinità di Nef per le diverse varianti di *splicing* di Dinamina 2.

Tab. 3.2 – Interazione tra Nef di HIV-1 e Dinamina 2. Si riportano le combinazioni di vettori utilizzate per dimostrare la capacità di Nef e Dinamina 2 di interagire *in vitro*. L'attività galattosidasi è riportata come: buona (+), intensa (++) e molto intensa (+++). La sigla CTRL individua i controlli per escludere che vi sia attivazione aspecifica del gene reporter da parte delle singole proteine esaminate.

Interazione	Plasmide DB	Plasmide AD	Attività beta-galattosidasi
CTRL BD-LexA	pBTM116		No
CTRL AD-Gal4		pACTII	No
CTRL BD-LexA + AD-Gal4	pBTM116	pACTII	Si
CTRL BD-Gal4	pGBT9		No
CTRL BD-Gal4 + AD-Gal4	pGBT9	pACTII	No
CTRL NefHA-BD-LexA	pBTM116Nef-LaiHA		Si (+++)
	pBTM116Nef-NA7HA		Si (+++)
	pEG202Nef-LaiHA		Si (+++)
	pEG202Nef-NA7HA		Si (+++)
CTRL Nef-BD-LexA	pBTM116Nef-Lai		Si (++)
	pBTM116Nef-NA7		Si (++)
	pEG202Nef-Lai		Si (+)
	pEG202Nef-NA7		Si (+)
CTRL NefHA-BD-Gal4	pGBT9Nef-LaiHA		No
	pGBT9Nef-NA7HA		No
Dyn2BA-BD-LexA + Nef-AD-Gal4	pBTM116-Dyn2BA	pACTIINef-Lai	Si (+/-)
	pEG202Dyn2BA	pACTIINef-Lai	No
Nef-BD-LexA + Dyn2BA-AD	pBTM116Nef-LaiHA	pACTIIDyn2BA	Si (++)
	pEG202Nef-LaiHA	pACTIIDyn2BA	Si (++)
Dyn2BA-BD-Gal4 + Nef-AD-Gal4	pGBT9Dyn2BA	pACTIINef-Lai	No
Nef-BD-Gal4 + Dyn2BA-AD	pGBT9Nef-Lai	pACTIIDyn2BA	No

Come evidenziato dalla Fig. 3.1, i numerosi esperimenti condotti per la messa a punto del saggio hanno rivelato che:

- Nef, se legato al BD di LexA, è in grado di portare all'espressione del transgene, anche in assenza dell'AD: questo effetto impedisce di studiare il legame di Nef a qualsiasi altro peptide, se fuso al BD di LexA. La capacità di attivare il gene reporter, quando legato al BD LexA, è tipica di entrambi gli alleli di Nef a disposizione (Lai ed NA7).
- La presenza dell'epitopo HA, probabilmente a causa della presenza di residui amminoacidici acidi, implementa l'espressione del transgene, falsando ulteriormente i risultati visibili.
- Nef, fuso al BD di Gal4, non porta all'attivazione del gene reporter indipendentemente dalla presenza del relativo AD. È preferibile abbinare Nef ai

domini di questo fattore di trascrizione, in modo da non alterare i risultati degli esperimenti.

- d. Anche quando legato all'AD di Gal4, Nef non dà luogo all'insorgenza di segnali aspecifici: diventa necessario mantenere Nef legato all'AD, in questo tipo di costrutto, qualora sia necessario utilizzare il sistema LexA-Gal4.

Gli esperimenti svolti hanno, incontrovertibilmente, dimostrato che mediante saggio del doppio ibrido in lievito non è possibile provare che esista un' interazione tra Nef di HIV-1 e Dinamina 2, indipendentemente dall'isoforma considerata. Il minimo segnale ottenuto dall'espressione in lievito nel sistema LexA-Gal4, con Nef fuso al BD, dipende esclusivamente dalla capacità della proteina virale di indurre l'espressione del gene reporter. All'interno dello stesso sistema, se è Dinamina ad essere legata al BD, il segnale registrato è trascurabile o del tutto assente.

Ulteriore conferma viene data dall'analisi dell'interazione nel sistema Gal4-Gal4, in cui, come detto precedentemente, Nef non dà luogo a segnali aspecifici: non è possibile evidenziare la presenza di interazione, considerando entrambi gli accoppiamenti tra proteine e domini del fattore di trascrizione.

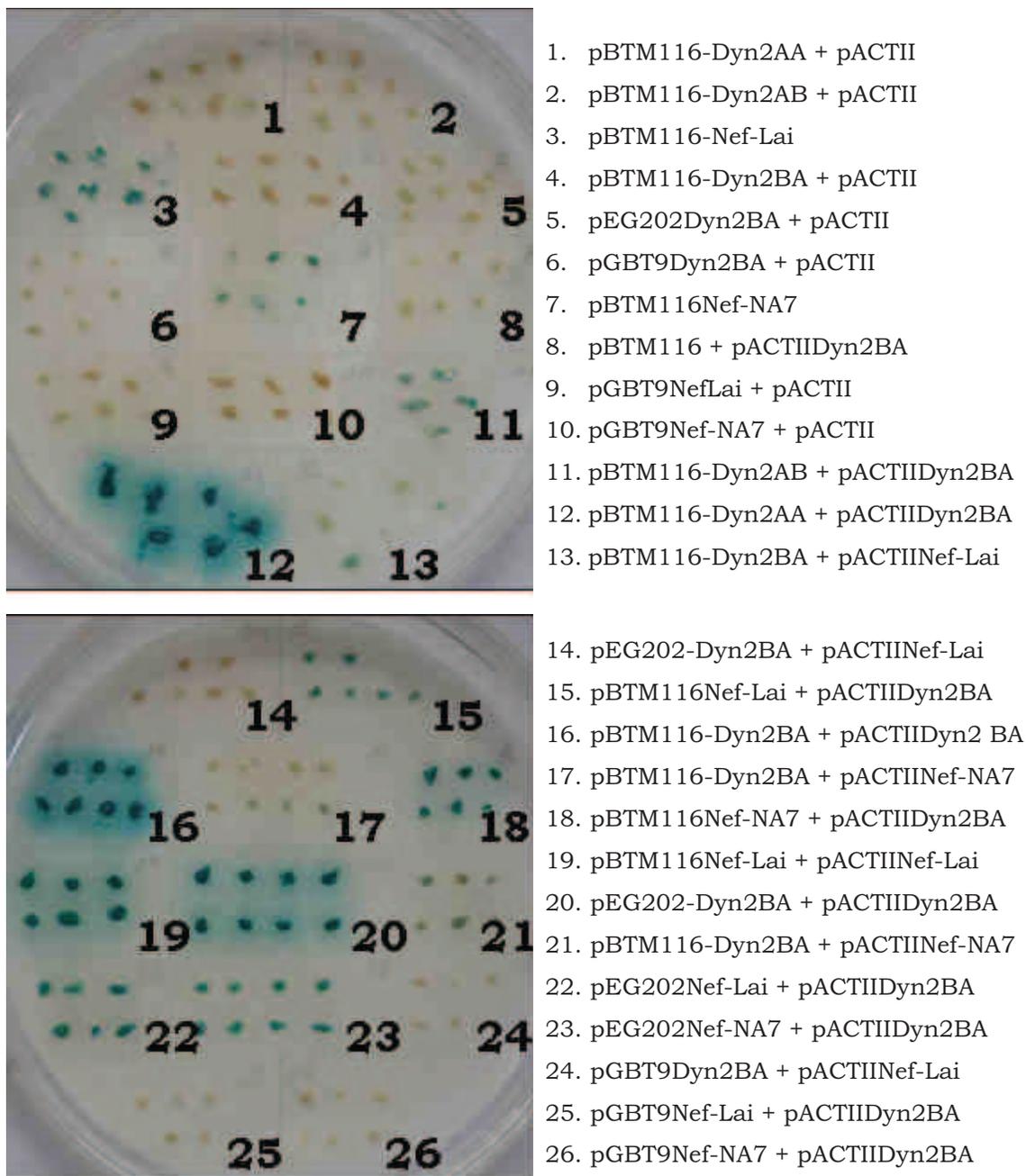


Fig. 3.1 - Immagine relativa al saggio X-gal della dimerizzazione di Dinamina 2 e della sua interazione con Nef di HIV-1. # 11, 12, 16 e 20 mostrano la dimerizzazione tra le diverse isoforme di Dinamina 2; # 1, 2, 4, 5, 6 e 8 sono i relativi controlli; # 3, 7, 9, 10 e 19 mostrano la diversa capacità di Nef di dare transattivazione basale del gene reporter a seconda del plasmide in cui è inserito # 13, 14, 15, 16, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25 e 26 mostrano i diversi risultati ottenuti nello studio dell'interazione tra Nef e Dinamina 2 a seconda dei costrutti utilizzati, in particolare # 24, 25 e 26 provano come in lievito non avvenga interazione tra le due proteine.

3.2.3 Localizzazione cellulare per immunofluorescenza

Abbiamo voluto verificare se la mancata visualizzazione dell'interazione Nef-Dinamina 2 fosse legata al sistema eucariotico di base utilizzato (lievito) o a limiti di sensibilità della tecnica scelta (*Two Hybrid Assay*) per lo studio. Per questa ragione l'interazione Nef-Dinamina 2 è stata analizzata anche mediante immunofluorescenza in cellule di mammifero. Le due proteine sono state fatte esprimere singolarmente in cellule eucariotiche (HEK293T), fuse a proteine fluorescenti (Nef-GFP e Dinamina 2 BA-dsRED). L'analisi al microscopio confocale ha rivelato che l'espressione di Nef non viene influenzata dalla GFP. La localizzazione cellulare è a livello di membrana, citosolica e, in minima parte nucleare, come riportato in letteratura. Al contrario, la fusione di Dinamina 2 al dsRED ne modifica l'espressione e la localizzazione. È stato quindi necessario coniugare questa proteina all'epitopo Flag, rivelando l'espressione in cellule grazie ad un anticorpo secondario marcato. Questa seconda soluzione si è rivelata adatta allo scopo, non interferendo con l'espressione e il trafficking intracellulare della proteina. Al microscopio confocale è stata, quindi, verificata la co-localizzazione delle due proteine. Le immagini riportate (Fig. 3.2) dimostrano che, al contrario di quanto ci si aspetterebbe in caso di interazione, la superficie cellulare in cui è possibile ritrovare entrambi i peptidi è praticamente nulla. Inoltre in molte delle zone in cui si addensa la proteina virale non si colloca la proteina cellulare e viceversa.

Anche questi esperimenti ci hanno portato ad affermare che non vi sia un'interazione tra Nef e Dinamina 2, o che questa sia mediata da altri fattori, da noi non identificati.

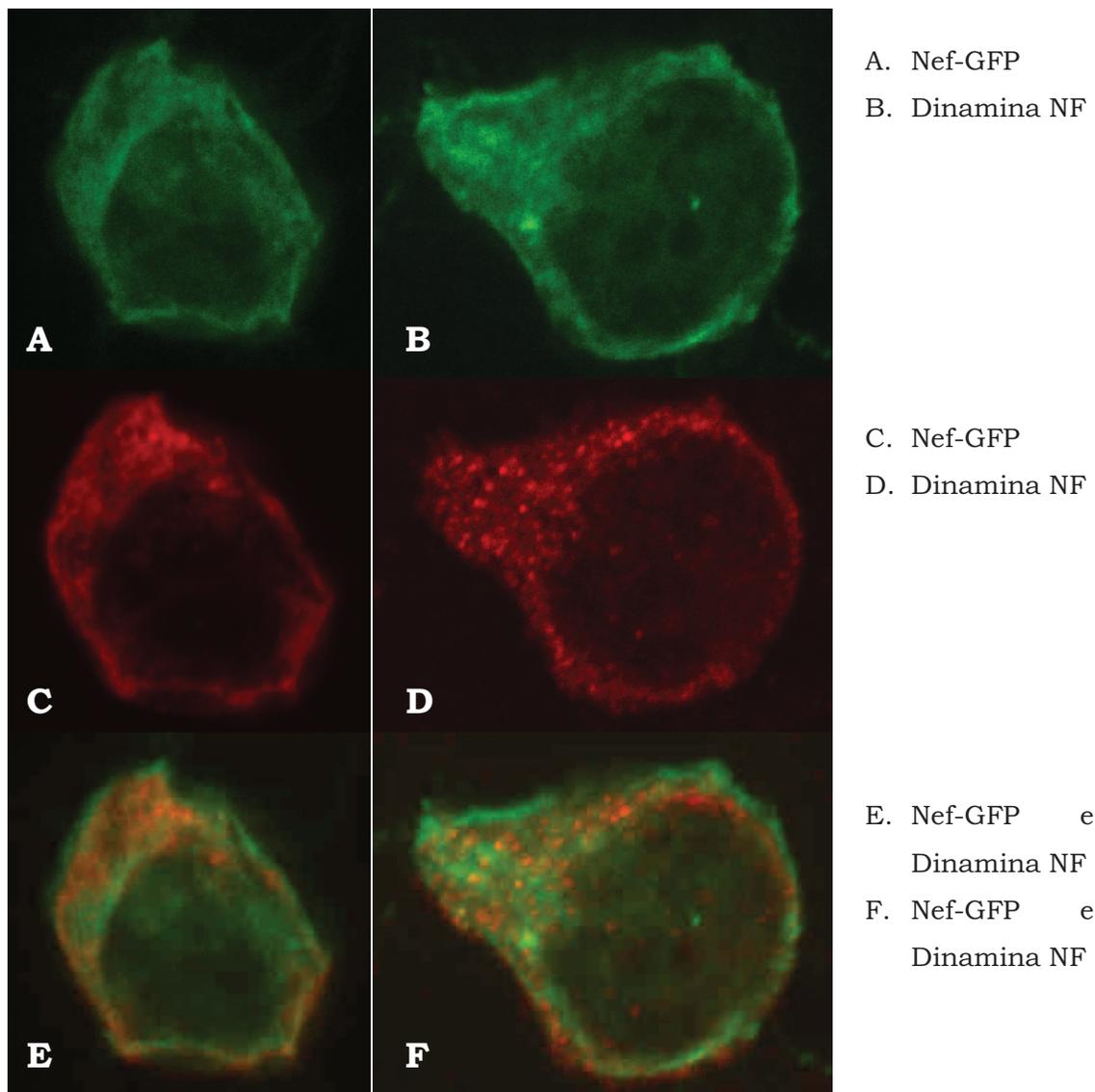


Fig. 3.2 – Localizzazione cellulare delle proteine Nef-GFP e Dinamina 2 N-Flag: cellule 293T sono state trasfettate in modo che esprimessero la proteina virale Nef, fusa all'N-terminale con la proteina fluorescente GFP, e la proteina cellulare Dinamina 2, fusa all'N-terminale con l'epitopo Flag. A 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state fissate con una soluzione di acetone e metanolo in rapporto 1:1, incubate con l'anticorpo anti-Flag e, successivamente, con l'opportuno anticorpo secondario. I riquadri A e B mostrano la localizzazione cellulare di Nef-GFP, i riquadri C e D quella di Dinamina 2, mentre i riquadri E ed F rappresentano la sovrapposizione tra le precedenti immagini (E=A+C; F=B+D).

Per questo motivo, è stato scelto di abbandonare questa linea di studio, ponendo maggior attenzione sulla proteina virale Nef, sulla caratterizzazione delle sue funzioni meno conosciute e sull'identificazione di partner di legame ancora non noti.

Abbiamo ritenuto molto interessante e promettente caratterizzare la dimerizzazione di Nef, investigandone il ruolo biologico attraverso la ricerca di inibitori.

La scelta, a prima vista non usuale, di analizzare la funzione della struttura dimerica attraverso la selezione di inibitori, nasce dal fatto che non è possibile ricorrere alla creazione di una serie di mutanti puntiformi lungo tutta la sequenza. In questo modo infatti, vengono modificati anche numerosi residui responsabili delle interazioni con partners cellulari noti, non permettendo quindi di discriminare le eventuali modificazioni del ciclo virale dovute all'effettiva diminuzione di Nef in forma oligomerica, piuttosto che al semplice venir meno del legame ai peptidi cellulari.

In questo modo, inoltre, è possibile individuare quali interattori cellulari vengano legati dalla forma dimerica della proteina, piuttosto che da quella monomerica. È stato recentemente riportato, infatti, che la dimerizzazione sia necessaria per l'interazione di Nef con la proteina cellulare Hck [35].

È stato deciso di portare avanti lo studio lungo due binari paralleli: il primo in lievito, con la ricerca di piccoli peptidi che leghino la regione ritenuta responsabile della dimerizzazione, il secondo in sistemi eucariotici più complessi, dove valutare l'effetto di numerose *small molecules* contro l'interazione Nef-Nef.

I risultati sinora ottenuti saranno descritti in seguito, partendo con il sistema in lievito e proseguendo con gli studi in cellule di mammifero.

3.3 Valutazione del ruolo biologico della dimerizzazione di Nef

3.3.1 Verifica della capacità di Nef di formare oligomeri *in vitro*

Come già accennato nei paragrafi precedenti, la capacità di Nef di formare dimeri *in vitro* è stato verificata in *S. cerevisiae*, mediante saggio del doppio ibrido. Le due varianti alleliche di Nef (NA7 e Lai), prive di epitopi, sono state clonate all'interno di vettori contenenti il BD di LexA (pBTM116, pEG202 e pSH2) o quello di Gal4 (pGBT9). In entrambi i casi è stato usato il costrutto pACTII, contenente il dominio

di attivazione. Le varie combinazioni di vettori sono state trasformate nei ceppi CTY10-5d e Y190 e le colonie positive sono state, quindi, sottoposte a saggio X-gal.

Tab. 3.3 – Dimerizzazione di Nef di HIV-1. Si riportano le combinazioni di vettori utilizzate per valutare la capacità di Nef di formare dimeri *in vitro*. L'attività galattosidasiica è riportata come: buona (+), intensa (++) e molto intensa (+++). La sigla CTRL individua i controlli per escludere che vi sia attivazione aspecifica del gene reporter da parte delle singole proteine esaminate.

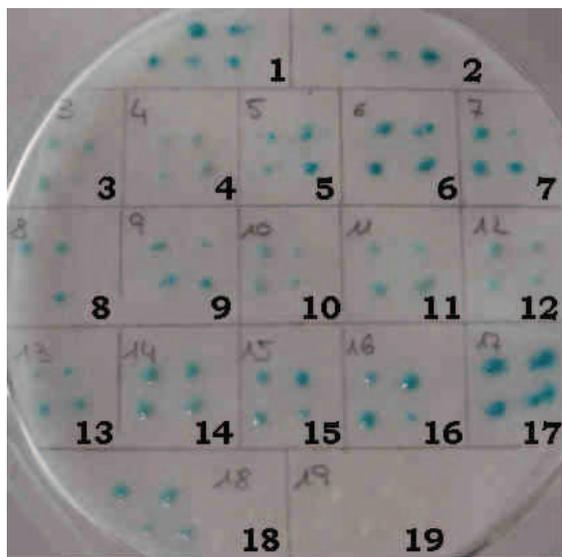
Interazione	Plasmide DB	Plasmide AD	Attività beta-galassidasiica
CTRL NefHA-BD-LexA + AD-Gal4	pBTM116Nef-LaiHA	pACTII	Si (+++)
	pBTM116Nef-NA7HA	pACTII	Si (+++)
	pEG202Nef-LaiHA	pACTII	Si (++)
	pEG202Nef-NA7HA	pACTII	Si (++)
CTRL Nef-BD-LexA + AD-Gal4	pBTM116Nef-Lai	pACTII	Si (++)
	pBTM116Nef-NA7	pACTII	Si (++)
	pEG202Nef-Lai	pACTII	Si (+)
	pEG202Nef-NA7	pACTII	Si (+)
CTRL Nef-BD-Gal4 + AD-Gal4	pGBT9Nef-Lai	pACTII	No
	pGBT9Nef-NA7	pACTII	No
NefBD-NefAD	pBTM116Nef-Lai	pACTIINef-Lai	Si (++)
	pBTM116Nef-Lai	pACTIINef-NA7	Si (+)
	pBTM116Nef-NA7	pACTIINef-NA7	Si (++)
	pBTM116Nef-NA7	pACTIINef-Lai	Si (+)
	pEG202Nef-Lai	pACTIINef-Lai	Si (++)
	pEG202Nef-Lai	pACTIINef-NA7	Si (+)
	pEG202Nef-NA7	pACTIINef-NA7	Si (++)
	pEG202Nef-NA7	pACTIINef-Lai	Si (+)
	pGBT9Nef-Lai	pACTIINef-Lai	Si (++)
	pGBT9Nef-Lai	pACTIINef-NA7	Si (+)
	pGBT9Nef-NA7	pACTIINef-NA7	Si (++)
	pGBT9Nef-NA7	pACTIINef-Lai	Si (+)

I diversi esperimenti condotti hanno dimostrato che:

- Entrambe le varianti alleliche, Nef NA7 e Nef Lai, sono in grado di formare dimeri *in vitro*. A causa della trasattivazione basale data dal legame al BD di LexA, l'utilizzo del sistema Gal4-Gal4 risulta essere maggiormente sicura per evitare di analizzare risultati, il cui segnale è implementato da un'attivazione aspecifica.
- Il difetto maggiore del sistema Gal4-Gal4, rispetto a quello LexA-Gal4, è che la durata del saggio è maggiore e l'intensità di colorazione ottenuta è debole.
- L'allele NA7 dà luogo a interazioni più forti in lievito, rispetto all'allele Lai, per questo motivo, tutti gli esperimenti successivi sono stati condotti solo con

questo allele.

- d. La dimerizzazione di Nef non è omo-allelica, l'interazione, cioè, avviene anche tra monomeri appartenenti ai due diversi alleli, suggerendo che i residui implicati nella dimerizzazione non sono soggetti a variazioni, bensì sono conservati tra le diverse specie. È comunque visibile una minore affinità di legame tra monomeri appartenenti ad alleli diversi.



1. pBTM116Nef-LaiHA
2. pBTM116Nef-NA7HA
3. pEG202Nef-Lai + pACTIINef-NA7
4. pEG202Nef-NA7 + pACTIINef-Lai
5. pBTM116Nef-LaiHA + pACTII
6. pBTM116Nef-NA7HA + pACTII
7. pEG202Nef-Lai + pACTII
8. pEG202Nef-NA7 + pACTII
9. pBTM116Nef-Lai + pACTIINef-NA7
10. pBTM116Nef-NA7 + pACTIINef-Lai
11. pGBT9Nef-Lai + pACTIINef-NA7
12. pGBT9Nef-NA7 + pACTIINef-Lai
13. pEG202Nef-Lai + pACTIINef-Lai
14. pBTM116Nef-Lai + pACTIINef-Lai
15. pGBT9Nef-Lai + pACTIINef-Lai
16. pEG202Nef-NA7 + pACTIINef-NA7
17. pBTM116Nef-NA7 + pACTIINef-NA7
18. pGBT9Nef-NA7 + pACTIINef-NA7
19. pGBT9Nef-NA7 + pACTI

Fig. 3.3 - Saggio X-gal della dimerizzazione di Nef di HIV-1. # 1, 2, 7, 8 e 19 rappresentano i controlli svolti che hanno messo in luce la capacità di Nef di dare transattivazione basale del gene reporter se fuso al BD di LexA, non se fuso al BD di Gal4; # 3, 4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 e 18 mostrano le diverse combinazioni di vettori con cui è stata studiata la dimerizzazione di Nef. In particolare # 11, 12, 15 e 18 dimostrano la capacità di Nef di formare dimeri in lievito e che esiste una diversa affinità di legame tra i diversi alleli (NA7 e Lai). L'affidabilità del risultato ottenuto sia affidabile è dimostrata dal controllo # 19.

3.3.2 Analisi delle regioni conservate in alleli diversi di Nef

Volendo dare una spiegazione alle differenze, evidenziate dal saggio, tra le diverse isoforme alleliche di Nef in termini di affinità di interazione omo ed eterotipica, abbiamo comparato, mediante allineamento della sequenza primaria, i tre alleli

utilizzati per gli esperimenti condotti in questa tesi: Nef NA7, SF2 e Lai. In letteratura è riportato che NA7 e SF2 siano alleli particolarmente infettivi, perché sono in grado di evadere molto efficientemente dal sistema immunitario dell'ospite per deplezione delle molecole CD4 ed MHC I dalla superficie cellulare. Lai, al contrario, non è mai stato definito più attivo di altri, es. NL 4.3 o ELI.

Analizzando tutti i dati pubblicati sulle le regioni chiave della struttura di Nef e dei residui maggiormente conservati, è stata elaborata la Fig. 3.4.

AA	10	20	30	40	50		
NA7	MGGKWSKRSAGGWSA	VRKRMEQAEP	AADGVGAV	SRDLEKYGA	ITSSNTAT	1-50	
SF2	MGGKWSKRSMGGWSA	TRERMRAEPA	ADGVGAV	SRDLEKHGA	ITSSNTAA		
LAI	MGGKWSKSSVIGWPTV	RERMRAEPA	ADRVGA	SRDLEKHGA	ITSSNTAA		
AA	60	70	80	90	100		
NA7	NNADCAWLEAQ	EEEEVGF	PVRPQVPL	LRPMTYKAA	VDISHFLKEKGGLEGL	51-100	
SF2	TNADCAWLEAQ	EEEEVGF	PVRPQVPL	LRPMTYKAA	LDISHFLKEKGGLEGL		
LAI	TNAACAWLEAQ	EEEEVGF	PVTPQVPL	LRPMTYKAA	VDLSHFLKEKGGLEGL		
AA	110	120	130	140	150		
NA7	IHSQRRQD	IIDLWYHT	QGF	FPDWQNY	TGPGGIRYPLTF	GWCFKLVPEA	
SF2	IWSQRRQE	IIDLWYHT	QGY	FPDWQNY	TGPGGIRYPLTF	GWCFKLVPEP	
LAI	IHSQRRQD	IIDLWYHT	QGY	FPD-QNY	TGPGVRYPLTF	GWCYKLVPEP	
AA	160	170	180	190	200		
NA7	EQVEEANT	GENNSLLHPMS	LHGME	DAEREVLQ	WKFDSRLAF	FHHMARELHP	
SF2	EKVEEAN	GENNSLLHPMS	LHGME	DAEKEVLV	WRFDSKLA	FHHMARELHP	
LAI	DKIEEANK	GENTSL	LHPVSL	HGMDDP	EREVLEWR	FDSRLAF	FHHVARELHP
AA	206						
NA7	EYYKDC						201-206
SF2	EYYKDC						
LAI	EYFKNC						

Fig. 3.4 – Allineamento della sequenza primaria di tre diversi alleli di Nef (NA7, SF2 e Lai). In figura sono state allineate le sequenze amminoacidiche degli alleli di Nef (HIV-1 sottotipo B) utilizzati nel corso dello studio. Le sequenze sono state ricavate dal *NIH HIV Sequence Database* (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>) ed è stata analizzata la presenza dello stesso residuo amminoacidico per ogni posizione. Con colori diversi sono evidenziate le posizioni chiave lungo la sequenza: in verde i 10 residui conservati nel 99% degli alleli di Nef presenti in letteratura (in quella posizione sono stati rinvenuti al massimo due diversi amminoacidi, es. # 16 V/I), in giallo i residui che formano i domini poliacidici, in rosa il dominio di-leucinico, in azzurro residui che recentemente sono stati ipotizzati concorrere alla dimerizzazione di Nef. In particolare due regioni sono state definite ipotetiche superfici di interazione Nef-Nef: R105, D108, I109, L112, Y115, H116, F121, P122 e D123 [28, 32] e F139, R188, F191, H192, H193, R196 e E197 [27].

È stato osservato che dei 206 amminoacidi che compongono la proteina, solo 63 siano altamente conservati, 8 vengono definiti altamente variabili potendo presentare qualsiasi residuo. Le regioni rimanenti sono state, quindi, suddivise in base alla presenza di particolari motivi strutturali o funzionali, individuati per analisi mutazionale [27].

I domini conservati in tutti gli alleli sono state evidenziati con diversi colori a seconda della loro funzione.

Sono state ipotizzate due diverse regioni che potrebbero intervenire nella dimerizzazione, agendo da superfici di interazione, la prima tra gli amminoacidi R105 e D123, la seconda tra F139 ed E197 [27, 32]. I tre alleli non si differenziano tra loro all'interno di queste due regioni, tantomeno in altre definite essenziali per l'interazione della proteina virale con fattori cellulari. I residui amminoacidici che non sono uguali nei tre casi, si trovano in regioni altamente variabili, poco conservate tra i diversi sottogruppi. Con molta probabilità il diverso comportamento dimostrato nel saggio in lievito dipende da un diverso ripiegamento della proteina virale, quando fusa al dominio trascrizionale. È possibile che i residui diversi tra i due alleli, pur non alterando la funzionalità della proteina, ne causino una diversa organizzazione spaziale.

D'altro lato, questa analisi ha permesso di definire che tutti e tre gli alleli sono adatti, in ugual misura, allo scopo dello studio. Inoltre, ha permesso di dimostrare che anche conducendo gli studi sull'inibizione della dimerizzazione analizzando un unico allele, sarà possibile applicare i risultati ottenuti anche a tutti gli altri. La scelta di utilizzare in lievito Nef NA7 è dettata solo dalla più rapida ed intensa riuscita del saggio.

Una volta dimostrato che la proteina virale è in grado di oligomerizzare nel sistema di base eucariotico, suggerendo che la proteina si ripieghi in modo simile allo stato naturale e che quindi possa essere studiata esprimendola in cellule di lievito, è stato pianificato un metodo per inibire la sua dimerizzazione utilizzando piccoli peptidi random. Sono stati fatti numerosi tentativi per mettere a punto un saggio riproducibile che consentisse di far sì che ciascuna cellula di lievito esprimesse due monomeri di Nef, fusi ai due domini del fattore di trascrizione, e che a questi fosse aggiunto un terzo plasmide codificante una libreria peptidica. Anche cambiando sistema reporter è risultato impossibile trovare tre plasmidi con diversi geni per la selezione: il problema riguarda la presenza del gene di selezione per il triptofano, sia su tutti i vettori contenenti il BD di Gal4, sia su tutti i plasmidi per l'espressione in lievito di sequenze eterologhe non fuse ad altri domini. Abbiamo quindi deciso di individuare interattori di Nef all'interno di una libreria di piccoli peptidi random lunghi 16 amminoacidi. In questo modo abbiamo, in un primo momento, selezionato le molecole in grado di interagire con la proteina virale, con l'intento di discriminare successivamente la regione di legame. Scopo finale dello screening è caratterizzare tutti i peptidi selezionati: essi possono corrispondere sia a sequenze *consensus* comuni a partner di legame già noti, sia essere catalogati

come nuovi interattori inibitori della dimerizzazione o di altre funzioni della proteina.

3.3.3 Screening di una libreria combinatoriale peptidica

La libreria peptidica utilizzata, fornita dalla ditta Clontech™, presenta un'elevata numerosità e molteplicità: è composta da cellule batteriche di *E. coli* DH10B trasformate ciascuna con un plasmide pGAD-GH (AD) (vedi 2.1) contenente una diversa sequenza codificante un peptide di 16 amminoacidi. La tipologia di libreria scelta assicura che non vi siano segnali di stop interni, quindi che non vi siano peptidi di lunghezza inferiore ai 16 amminoacidi, né che siano presenti concatameri, per la presenza di una tripletta di stop come diciassettesimo amminoacido. L'intento è stato di stimare almeno 10^7 cloni diversi. Come prima verifica qualitativa, per diluizioni seriali dello stock batterico è stato calcolato che il titolo della libreria fosse pari a 3×10^9 cloni diversi.

Brevemente, il metodo prevede l'utilizzo di un ceppo di *S. cerevisiae*, Y190, auxotrofo per triptofano, istidina e leucina, in cui far esprimere due plasmidi (BD-triptofano ed AD-leucina) (vedi 2.2.5). I geni reporter utilizzati sono stati il marcatore enzimatico-colorimetrico LacZ, per l'attività beta-galattosidasi e il marcatore nutrizionale HIS3, per la sintesi di imidazolo glicerolfosfato deidratasi, enzima coinvolto nella biosintesi dell'istidina. I due geni reporter si trovano sotto il controllo di operatori diversi e rappresentano due paralleli sistemi di controllo dell'avvenuta interazione tra le proteine codificate. Come appena detto, il ceppo Y190 è parzialmente delecto per il promotore del gene codificante l'istidina, ciononostante può rimanere un certo livello di espressione basale residua, sufficiente a permettere la crescita del lievito in terreno privo di istidina. Per risolvere questo

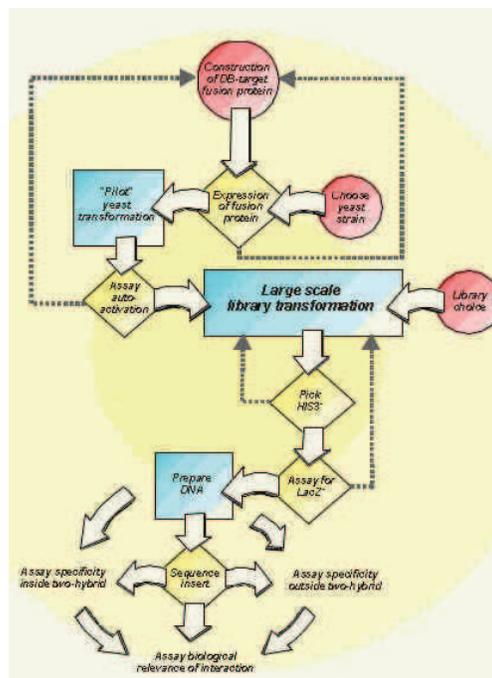


Fig. 3.5 - Screening della libreria peptidica in lievito. Una volta trasformato il ceppo Y190 con i plasmidi di interesse, il primo screening dei peptidi, interattori di Nef, è stato svolto come saggio di crescita su terreno contenente 3-AT. In secondo luogo, le colonie positive sono state analizzate anche in termini di attività beta-galattosidasi. Solo le colonie risultate positive in entrambi i controlli sono state ulteriormente caratterizzate.

problema si è utilizzato il 3-amminotriazolo (3-AT), sostanza in grado di inibire il prodotto del gene HIS3. Al fine di ottenere la massima resa, gli esperimenti di trasformazione sono stati condotti su un ceppo di Y190 già selezionato per l'espressione di Nef NA7 in pGBT9. I lieviti trasformati sono state selezionati in terreno doppio selettivo (-Trp; -Leu) addizionato con 3-AT. Le colonie che dopo 7 giorni avevano un diametro superiore a 5 mm sono state sottoposte a saggio X-gal. Quelle risultate positive ad entrambi i controlli sono state seminate più volte in terreno selettivo solo per il vettore esprimente l'interattore (-Leu), in modo che perdessero il plasmide codificante Nef, nel corso delle divisioni cellulari. Il DNA totale è stato quindi estratto dai lieviti ed utilizzato per trasformare cellule batteriche (*E. coli*) in modo da amplificarlo. Per ogni ciclo di trasformazioni è stata calcolata la resa in termini di numero di colonie (cfu, *colony forming unit*) per µg di DNA plasmidico, che si è attestata intorno alle 50 colonie per µg di DNA. Da questo valore e dalla quantità di DNA totale utilizzati finora negli esperimenti è stato possibile determinare di aver analizzato lo 0.14% della libreria iniziale ottenendo lo 0.33% di cloni positivi per crescita su 3-AT. L'ulteriore controllo dato dall'analisi dell'attività beta-galattosidasi ha permesso di ritenere specifici interattori di Nef lo 0.03% dei peptidi presi in esame.

Lo studio sta proseguendo con l'isolamento dei costrutti di interesse dalle cellule di lievito. Una volta ottenuti verranno analizzati mediante sequenziamento.

3.3.4 Analisi di una libreria di *small molecules* in cellule di mammifero

Parallelamente, la dimerizzazione di Nef è stata analizzata facendo esprimere la proteina virale in cellule HEK293T e utilizzando il saggio della complementazione di fluorescenza della proteina YFP, sia per ottenere dati sull'effettiva interazione *in vitro* di Nef, sia per analizzare il possibile effetto inibitore da parte di composti chimici (*small molecules*). Come descritto in 2.1, la libreria è composta da 10^4 composti diversi e lo screening è stato svolto in piastre a 96 pozzetti, in modo da somministrare una molecola per ogni pozzetto. Ogni ciclo di trasfezione ha previsto l'analisi di 72 composti diversi per piastra. Il saggio prevede di valutare l'eventuale diversità tra la fluorescenza delle cellule di controllo, trasfettate con i plasmidi esprimenti Nef fuso ai due terminali della YFP, che emettono un segnale di fluorescenza direttamente proporzionale all'efficienza di trasfezione, rispetto alle cellule messe a contatto con un possibile inibitore. Da ogni saggio sono stati esclusi tutti i composti che dimostravano citotossicità (soglia massima tollerata

50%) o che davano luogo a precipitati in soluzione acquosa. È stato finora esaminato il 65% della libreria: ad una prima valutazione lo 0.3% dei composti provoca una diminuzione della fluorescenza in un range compreso tra il 30% e il 90%. I composti ritenuti efficaci sono stati testati su cellule esprimenti Nef per due volte, durante trasfezioni diverse, in modo da escludere errori durante la prima somministrazione.

Successivamente è stato valutato se i composti causino una diminuzione del segnale di fluorescenza per specifica inibizione della dimerizzazione di Nef o se agiscano legando una delle due porzioni della YFP impedendo la complementazione della proteina. Per validare i dati ottenuti, abbiamo deciso di valutare l'efficacia dei composti come inibitori dell'interazione tra due proteine cellulari Jun e Fos, sempre mediante BiFC. Queste due proteine cellulari sono state dimostrate interagire proprio utilizzando la complementazione di fluorescenza [61-64]. La somministrazione dei composti a cellule che esprimono Fos e Jun può dar luogo a due risultati: (a) diminuzione del segnale di fluorescenza, (b) nessuna variazione rispetto alle cellule di controllo. I composti ricollegabili al primo caso sono stati scartati perché agivano probabilmente legando una porzione della proteina fluorescente. I composti che, al contrario, non hanno alcun effetto sull'interazione tra Fos e Jun sono stati ritenuti inibitori specifici dell'inibizione della dimerizzazione di Nef. Alcuni esempi sono riportati in Fig. 3.6. Al termine di questo primo controllo abbiamo considerato inibitori specifici lo 0.1% dei composti esaminati (65% della libreria). Di queste è stata analizzato la formula di struttura, cercando gruppi conservati o sequenze *consensus* comuni.

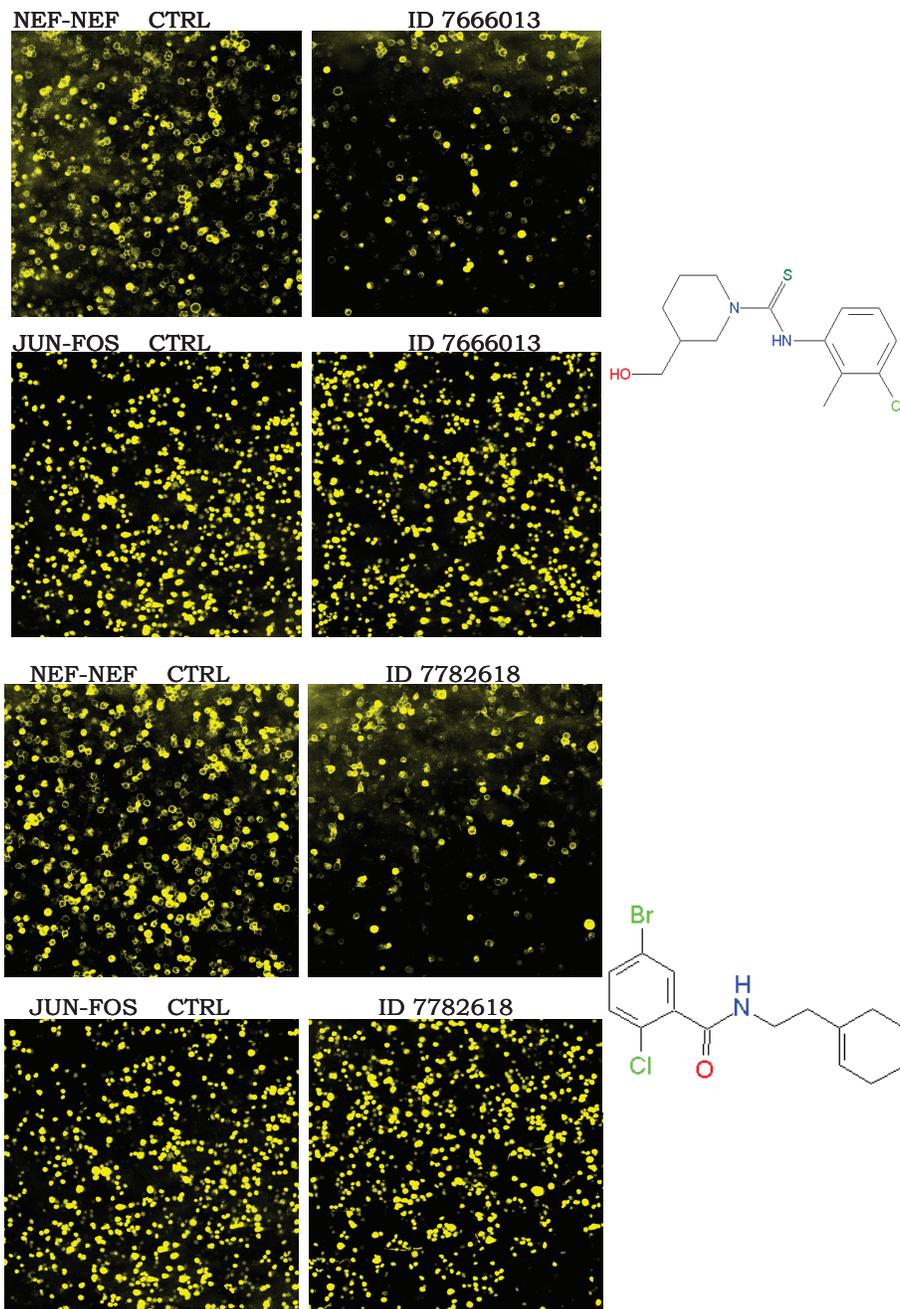


Fig. 3.6 - Analisi BiFC. Due esempi significativi della selezione di composti attivi in modo specifico sulla dimerizzazione di Nef: cellule HEK293T sono state trasfettate con le coppie di costrutti codificanti Nef-YN e Nef-YC oppure JUN-YN e FOS-YC. Per ogni esperimento sono riportate: in alto a sinistra l'immagine relative ai controlli, cui non è stata somministrata alcuna molecola, con emissione di fluorescenza data dalle cellule in cui avviene la dimerizzazione di Nef (NEF-NEF CTRL), in basso a sinistra lo stesso tipo di controllo, ma in cellule che esprimono l'interazione tra Jun e Fos (JUN-FOS CTRL). Il riquadro in alto a destra, invece, riporta la diminuzione del segnale di fluorescenza della dimerizzazione di Nef, causato dalla somministrazione del composto. In basso a destra viene riportato l'effetto dello stesso composto sull'interazione tra Jun e Fos. L'emissione di un segnale costante di fluorescenza da parte delle cellule trasfettate con Jun e Fos indica che i composti selezionati, la cui struttura è riportata a lato, agiscono in modo specifico, inibendo la dimerizzazione di Nef e non interagendo, ad esempio, con i terminali della YFP.

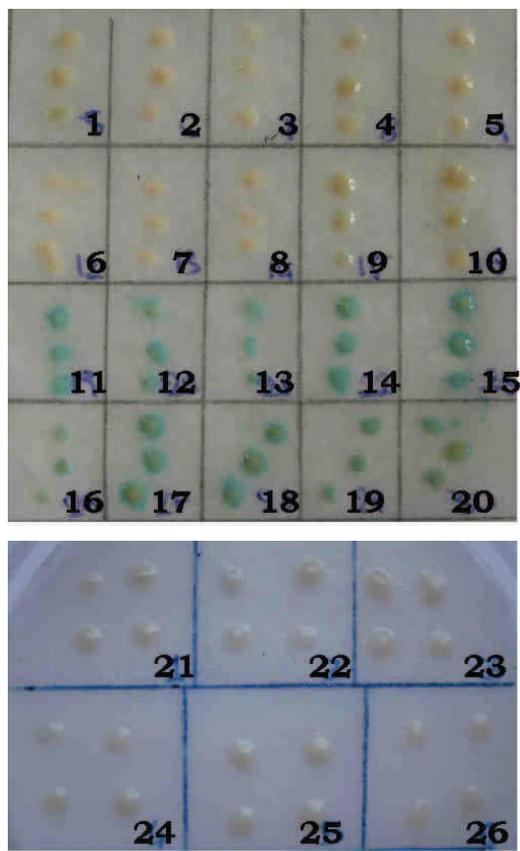
Come scritto nella premessa, è stata condotta una terza parte dello studio, in cui sono state analizzate le interazioni tra Nef e tre proteine virali: Integrasi, Trascrittasi inversa e Tat.

3.4 Analisi dell'interazione tra Nef ed altre proteine di HIV-1

Sempre mediante saggio del doppio ibrido in lievito, abbiamo verificato la capacità di Nef di interagire con le proteine virali che svolgono un ruolo chiave durante il ciclo infettivo: Trascrittasi inversa (subunità p51 e p66), Integrasi e Tat. Sono state studiate numerose combinazioni, di modo che tutte le proteine si trovassero sia legate al BD che all'AD. È stato utilizzato in sistema LexA-Gal4 e per ogni interazione sono stati inclusi i controlli appropriati, in modo da escludere false interazioni in realtà dovute a segnali non specifici. In questo caso non è stato necessario ricorrere al sistema Gal4-Gal4, in quanto il segnale dato dalle interazioni tra le proteine davano un segnale positivo prima del relativo controllo. La tabella sottostante riporta le combinazioni verificate e la presenza o meno di interazione.

Tab. 3.4 - Interazione tra Nef e altre proteine di HIV-1. Si riportano le combinazioni di vettori utilizzate per valutare la capacità di Nef di legare altre proteine virali *in vitro*. L'attività galattosidasiaca è riportata come: buona (+), intensa (++) e molto intensa (+++).

Interazione	Plasmide DB	Plasmide AD	Attività beta-galattosidasiaca
Nef-Retrotrascrittasi p51	pEG202-NA7	pACTII-p51	si (++)
Nef-Integrasi	pEG202-NA7	pGAD-IN	si (++)
Nef-Tat	pEG202-NA7	pACTII-Tat	si (++)
Retrotrascrittasi p66-Nef	pSH2-p66	pACTII-NA7	si (++)
Integrasi-Nef	pSH2-IN	pACTII-NA7	si (++)
Tat-Nef	pBTM116-Tat	pACTII-NA7	no
Retrotrascrittasi p66-Integrasi	pSH2-p66	pGAD-IN	no
Retrotrascrittasi p66-Tat	pSH2-p66	pACTII-Tat	no
Integrasi-Retrotrascrittasi p51	pSH2-IN	pACTII-p51	no
Integrasi-Tat	pSH2-IN	pACTII-Tat	no
Tat-Retrotrascrittasi	pBTM116-Tat	pACTII-p51	no
Tat-Integrasi	pBTM116-Tat	pGAD-IN	no
Retrotrascrittasi <i>holoenzyme</i>	pSH2-p66	pACTII-p51	si (++)
Integrasi dimerizzazione	pSH2-IN	pGAD-IN	si (++)
Tat dimerizzazione	pBTM116-Tat	pACTII-Tat	no



1. pBTM116-Tat + pACTII-NA7
2. pSH2-p66 + pGAD-IN
3. pSH2-p66 + pACTII-Tat
4. pSH2-IN + pACTII-p51
5. pSH2-IN + pACTII-Tat
6. pBTM116-Tat + pACTII-p51
7. pBTM116-Tat + pGAD-IN
8. pBTM116-Tat + pACTII-Tat
9. pEG202Nef-NA7 + pACTII
10. pEG202 + pACTIINef-NA7
11. pSH2-IN + pGAD-IN
12. pSH2-IN + pACTII-NA7
13. pEG202-NA7 + pGAD-IN
14. pSH2-p66 + pACTII-p51
15. pSH2-p66 + pACTII-NA7
16. pEG202-NA7 + pACTII-Tat
17. pEG202-NA7 + pACTII-p51
18. pEG202Nef-NA7 + pACTIINef-NA7
19. pEG202Nef-Lai + pACTIINef-Lai
20. pEG202Nef-Lai + pACTIINef-NA7
21. pSH2-p66 + pACTII
22. pSH2 + pACTII-p51
23. pBTM116-Tat + pACTII
24. pBTM116 + pACTII-Tat
25. pSH2-IN + pACTII
26. pSH2 + pGAD-IN

Fig. 3.7 - Saggio X-gal dell'interazione tra Nef e altre proteine di HIV-1. # 9, 10, 21, 22, 23, 24, 25 e 26 rappresentano i controlli svolti per verificare l'eventuale attivazione del reporter da parte delle proteine virali Integrasi, Trascrittasi inversa e Tat o da parte di Nef; # 8, 11, 14, 18, 19 e 20 mostrano la capacità delle proteine virali di dimerizzare *in vitro*; #12 e 13 dimostrano il legame di Nef con Integrasi; # 15 e 17 evidenziano l'interazione tra Nef ed entrambe le subunità (p66 e p51) della Trascrittasi inversa; # 1 e 16 mostrano l'interazione tra Nef e Tat. # 2 e 4 dimostrano che non vi sia interazione tra Integrasi e Retrotrascrittasi; # 5 e 7 che non vi sia tra Integrasi e Tat; # 3 e 6 che non interagiscano neanche Tat e Trascrittasi inversa.

Gli esperimenti condotti hanno dimostrato che Nef è in grado di legare entrambe le proteine virali che vengono incorporate nel virione prima della gemmazione: la Trascrittasi inversa, sia la subunità catalitica p66 che quella strutturale priva di attività enzimatica p51, e l'Integrasi, come si può vedere dalla

Fig. 3.7. È riportato in letteratura che Nef contatti Tat nel passaggio tra la fase iniziale e quella tardiva dell'infezione, in modo da assicurare una stabile trascrizione virale durante tutti gli stadi del processo replicativo [54, 55]. Il fatto

che l'interazione, in lievito, sia visibile solo quando Nef è fuso al BD può dipendere dalla conformazione assunta dalle proteine quando si trovano legate ai domini. È sufficiente che una delle due combinazioni dia esito positivo per assumere che vi sia un'interazione tra i due peptidi, a patto che i relativi controlli negativi siano stati ottimizzati e verificati [66, 68]. È, quindi, possibile affermare che Nef leghi tutti e tre i peptidi in esame, nulla, però, è possibile dire sulla funzione di queste interazioni, fatta eccezione di Nef-Tat, se esse avvengano solo *in vitro* e a livello di virione, se abbiano un significato strutturale di stabilizzazione o se abbiano un ruolo funzionale e livello infettivo.

Gli stessi esperimenti hanno confermato che le due subunità della Trascrittasi inversa si leghino a formare un dimero in modo rapido e covalente. Anche l'enzima Integrasi tende a dimerizzare in modo rapido e stabile: è infatti riportato in letteratura che si formino multimeri di Integrasi, per associazione dei domini catalitici e che la forma dimerica o tetramerica sia indispensabile allo svolgimento delle funzioni integrative del DNA virale nel genoma dell'ospite [76, 77].

Allo stesso tempo è stato dimostrato che, al contrario, la proteina Tat non formi dimeri [78, 79]. Tutti i dati riportati in letteratura concordano sul fatto che Tat agisca solo come monomero e non possieda regioni coinvolte in una possibile oligomerizzazione.

Ipotizzando che queste interazioni abbiano un ruolo funzionale, tuttora non noto, si procederà, innanzitutto, cercando di individuare le regioni proteiche coinvolte nei legami. Successivamente verranno ricercati inibitori specifici, proteici o chimici, che consentano anche di valutare le conseguenze sul ciclo infettivo a seguito della mancata interazione tra Nef e Integrasi, Trascrittasi inversa e Tat.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'infezione e la replicazione del virus dell'immunodeficienza umana, HIV-1, sono regolate da un complesso network di interazioni che si instaurano tra le proteine virali e numerosi fattori cellulari dell'ospite. Le diverse strategie terapeutiche in uso sono indirizzate simultaneamente verso diversi prodotti del genoma virale, ad esempio gli enzimi Integrase e Trascrittasi inversa. Non è sorprendente che, a causa della pressione selettiva dettata dalle condizioni microambientali in cui il virus deve sopravvivere e replicarsi, HIV-1 sia un virus in continua evoluzione. La modificazione dei target virali, contro cui sono rivolti i farmaci in uso, ha reso quest'ultimi molto meno efficaci con l'andare del tempo. Per questo molti sforzi vengono spesi al fine di identificare nuovi bersagli d'azione contro cui agire per combattere l'infettività virale [18]. Molta attenzione viene posta sulla piccola proteina accessoria Nef, espressa ad alti livelli durante le prime fasi del ciclo virale, cui sono state attribuite numerose funzioni nel corso degli anni [12, 31, 33, 37-39, 41, 47, 53, 80]. L'identificazione del suo ruolo biologico e dei partners cellulari con cui interagisce è in continua evoluzione. È, comunque, possibile riassumere che Nef agisca al fine di assicurare la replicazione virale attivando il ciclo cellulare della cellula infettata, al fine di sfruttarne l'apparato metabolico, e bloccandone i processi apoptotici. Parallelamente, Nef media l'*escape* dal sistema immunitario dell'ospite, modulando l'espressione di molecole di superficie. Soprattutto quest'ultima capacità di Nef è stata analizzata estensivamente, ipotizzando possa essere un buon target da sfruttare. La determinazione della struttura terziaria della proteina ha richiesto molto tempo a causa della sua difficoltosa purificazione e dell'impossibilità di analizzarla con metodiche cristallografiche [28, 33, 81]. Già da qualche tempo è stato dimostrato che Nef sia in grado di oligomerizzare e possa trovarsi, a livello citosolico o di membrana, sotto forma di dimero [32]. Tuttavia non è ancora chiaro né quale sia la regione coinvolta dell'interazione Nef-Nef, tantomeno se la dimerizzazione abbia un preciso ruolo biologico. Solo ultimamente è stato affermato che molte funzioni svolte potrebbero essere mediate dalla forma dimerica, piuttosto che da quella monomerica [27]. Un recente lavoro afferma che la mutazione del residuo D123, che molti lavori ritengono cruciale nella dimerizzazione, inibisce l'interazione Nef-Nef, ripercuotendosi sulla capacità della proteina di mediare la diminuzione dell'esposizione in membrana di molecole CD4 e MHC I [35, 36, 82].

Il lavoro svolto in questa tesi si colloca tra gli studi che mirano a caratterizzare il

ruolo della dimerizzazione di Nef durante il ciclo infettivo. L'approccio scelto prevede la selezione di molecole chimiche (*small molecules*) e di piccoli peptidi random, che intervengano in modo specifico sull'interazione tra due monomeri della proteina virale. L'approccio mutazionale, avrebbe forse, permesso di individuare i residui chiave coinvolti nella dimerizzazione, ma nulla avrebbe potuto dire sulle conseguenze a livello di ciclo replicativo virale. La modificazione di molti residui sarebbe risultata anche nell'inibizione dell'interazione tra Nef e i suoi numerosi partner cellulari, impedendo di comprendere se gli effetti registrati dipendessero dalla mancata dimerizzazione o piuttosto dal mancato legame al fattore dell'ospite. La valutazione di una libreria di composti chimici ha permesso di individuarne circa 10 che agiscono in modo specifico. L'analisi del sito di legame tra Nef e questi composti darà modo di identificare in modo univoco la regione strutturale responsabile della dimerizzazione, risolvendo i dubbi presenti in letteratura circa la possibilità che le superfici di interazione siano due diverse, una nella regione centrale (*core*), l'altra più vicina al C-terminale [27, 32, 35]. Inoltre, la somministrazione dei composti a cellule infettate dal virus HIV-1 mostrerà quale sia l'effetto sull'infettività virale della mancata dimerizzazione di Nef durante il ciclo replicativo. Se dovessero venir meno alcune funzioni virali, ad esempio, se la mancata dimerizzazione di Nef riportasse a livelli normali l'esposizione delle molecole di riconoscimento immunologico sulle superficie cellulare, le cellule infettate verrebbero immediatamente attaccate e distrutte. I composti selezionati, quindi, potrebbero presto rivelarsi ottimi *lead compounds* per lo sviluppo di nuovi farmaci antivirali.

In secondo luogo, la ricerca di piccoli peptidi in grado di legare Nef sta dando modo di selezionare ipotetici inibitori sia della dimerizzazione sia di altre funzioni della proteina. L'analisi della loro sequenza primaria porterà all'individuazione di regioni *consensus*, utilizzabili per progettare strutturalmente inibitori specifici di alcuni domini di Nef, in primo luogo quelli coinvolti nella dimerizzazione.

La terza parte dello studio ha premesso di identificare in Tat, Trascrittasi inversa e Integrase dei partner di legame di Nef. Il ruolo dell'interazione tra queste proteine virali non è mai stato investigato. Allo stesso modo di quanto detto sulla dimerizzazione di Nef, la ricerca di inibitori sembra rivelarsi la strategia più promettente da seguire sia per chiarire altre caratteristiche del ciclo virale, sia per individuare nuove molecole in grado di ostacolare la replicazione e l'infettività di HIV-1.

II PARTE

**MECCANISMI DI RESISTENZA AI CHINOLONI
MEDIATI DA PLASMIDE (PMQR, *Plasmid
Mediated Quinolone Resistance*) E SVILUPPO DI
NUOVI ANTIBIOTICI ANTITOPISOMERASICI**

1. INTRODUZIONE

1.1 Chemioterapia e antibiotici

La necessità di prevenire e trattare le patologie causate dalla colonizzazione di diversi distretti corporei umani, nonché animali, da parte di numerosi microrganismi, ha portato allo sviluppo della moderna chemioterapia. È trascorso ormai un secolo da quando, nel 1904, il medico tedesco Paul Ehrlich (1854-1915) parlò della necessità di individuare delle sostanze chimiche che agissero esclusivamente sugli agenti eziologici e patogenetici delle malattie, non manifestando alcuna tossicità sull'ospite. Ciò cui il dottor Ehrlich si riferiva come “*magic bullet*” cioè una sorta di arma intelligente in grado di discriminare tra l'ospite e il “colonizzatore” viene oggi definito “agente chemioterapico”. Con questo termine ci si riferisce, abitualmente, a composti chimici utilizzati nella comune pratica clinica per il trattamento delle infezioni, causate da microrganismi, quali batteri, virus, funghi o parassiti in generale. Si tratta di farmaci in grado di attaccare selettivamente l'agente patogeno, distruggendolo o inibendone la crescita, somministrati a concentrazioni sufficientemente basse da non danneggiare, se non minimamente, l'ospite.

I chemioterapici possono essere suddivisi in base alla classe di microrganismi che sono in grado di riconoscere ed attaccare, es. antivirali, antimicotici, antibiotici o antimicrobici in generale.

Col termine antibiotico si definisce una sostanza, o un metabolita, prodotti dai microrganismi in grado di inibire la crescita o la sopravvivenza di altri patogeni, anche appartenenti alla stessa specie. Nella maggior parte dei casi si definiscono antibiotici sostanze che agiscono specificamente sulla crescita batterica. La scoperta e il successivo isolamento di molti di questi composti è iniziata spesso per caso dall'osservazione di fenomeni naturali di sopravvivenza nello stesso habitat di specie diverse di microrganismi. Esempio famoso è la scoperta della penicillina da parte del medico scozzese Alexander Fleming, nel 1928, dovuta ad un'imperizia durante le pratiche di semina e conservazione delle piastre di coltura per l'isolamento di cocchi da ferite superficiali della pelle. Questa importante scoperta portò, successivamente, alla ricerca e all'isolamento, nel 1953, di altre specie batteriche in grado di produrre antibiotici (es. cloramfenicolo, neomicina, streptomina, etc.). Nel corso degli ultimi decenni l'avvento della chimica sintetica ha portato allo sviluppo di numerosi agenti antibiotici sulla base di quelli esistenti

in natura o strutturalmente non correlati a prodotti di origine naturale. È possibile definire delle caratteristiche generali, valide sia per i chemioterapici naturali che di sintesi:

- a. Tossicità selettiva: il farmaco deve agire sull'agente patogeno danneggiando l'ospite nella misura minore possibile. Il grado di selettività può essere espresso in termini di dose terapeutica, cioè quantità di principio attivo necessaria al trattamento dell'infezione o dose tossica, cioè concentrazione alla quale il farmaco mostra effetti tossici anche sull'ospite. Il rapporto tra dose tossica e dose terapeutica individua l'indice terapeutico del farmaco in esame.
- b. Raggiungimento del sito di infezione in concentrazione inibitoria.
- c. Penetrazione e raggiungimento del target.

Composti in grado di agire su strutture o funzioni tipiche dell'agente infettivo ed assenti nell'ospite hanno, solitamente, una tossicità selettiva maggiore ed un più alto indice terapeutico.

1.2 Principali criteri di classificazione degli antibiotici

Come appena descritto gli agenti chemioterapici devono essere tossici esclusivamente per gli organismi patogeni, siano essi batteri, virus o funghi. Questa parte dello studio ha riguardato l'analisi del meccanismo d'azione di diverse classi di antibiotici, farmaci comunemente prescritti per il trattamento delle infezioni batteriche. Brevemente, i batteri sono definiti procarioti, cioè organismi unicellulari, privi di nucleo, in grado di sopravvivere indipendentemente dalla colonizzazione di un ospite.

I bersagli potenzialmente attaccabili da un antibiotico, affinché abbia uno spettro d'azione mirato, sono precise caratteristiche che differenziano i batteri dalle cellule eucariotiche dell'ospite, ad esempio la parete cellulare, gli organelli citosolici, gli enzimi deputati alla produzione di energia e di macromolecole.

Esistono diversi sistemi di classificazione dei numerosi principi attivi con attività antibiotica utilizzati nella pratica clinica:

- I. Tipo di azione:
 - Batteriostatica (blocco dell'attività riproduttiva, non morte)
 - Battericida (morte cellulare, 0.01% di crescita a 24 ore dalla somministrazione)

II. Spettro d'azione:

- Ristretto (effetto su una limitata varietà di batteri, es. solo Gram +, solo Gram -)
- Medio (effetto su limitate classi o parti di più classi)
- Ampio (effetto su più classi contemporaneamente)

III. Origine:

- Naturale (estratti direttamente dai microrganismi produttori, es. *Streptomyces*, *Penicillium*, etc.)
- Semisintetica (modifica chimica per aggiunta di catene di sintesi ad un composto estratto)
- Sintetica (sintesi chimica di una struttura naturale nota)

IV. Struttura chimica:

- Amminoacidi, Glucidi, Ammino-glucidi, Ammino-eterosidi, Unità acetiche e proprioniche
- Unità a carattere acido, basico o neutro

V. Meccanismo d'azione:

- Inibizione della sintesi di parete
- Inibizione della sintesi proteica
- Distruzione della membrana cellulare
- Antagonisti metabolici
- Inibizione della sintesi degli acidi nucleici

Quest'ultima classificazione è la più importante e la più comunemente utilizzata. Ciascun meccanismo elencato verrà ora descritto singolarmente.

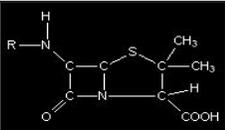
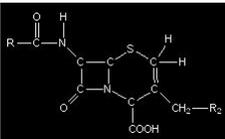
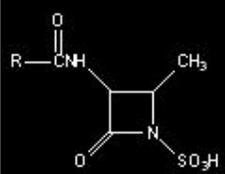
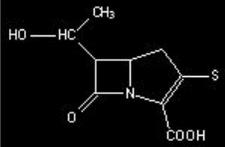
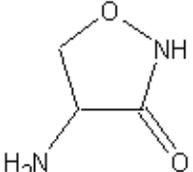
1.2.1 Inibizione della sintesi di parete

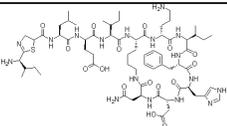
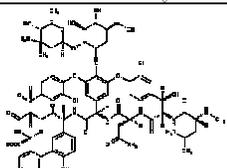
La reazione enzimatica che porta alla sintesi della parete batterica è il primo bersaglio individuato e sfruttato per l'inibizione della crescita e moltiplicazione batterica. Si tratta di un bersaglio strettamente selettivo in quanto le macromolecole coinvolte non possono essere ricavate dall'ambiente esterno o dall'ospite, ma sono tipiche della sola cellula batterica. La parete batterica, anche se con modeste differenze tra specie Gram + e Gram -, è costituita da peptidoglicano (o mureina), un complesso ammino-glucidico, formato da residui di formata da subunità disaccaridiche di N-acetilglucosamina e da acido N-acetilmuramico, uniti da legami N-glucosidici. Tra le diverse specie cambia il tipo

di legame che unisce i diversi strati di peptidoglicano. La sintesi della parete batterica può essere bloccata dagli antibiotici a diversi stadi:

- Durante la prima fase, a livello citoplasmatico, per (a) blocco dell'enzima (fosfoenolpiruvato) che sintetizza i precursori ammino-glucidici, o per (b) inibizione degli enzimi (alanina racemasi e D-alanil-D-alanina sintetasi) che sintetizzano la coda amminoacidica che completa l'acido muramico.
- Durante la seconda fase, di trasporto dei precursori dal citoplasma alla membrana, per (a) blocco del trasportatore (undecaprenil fosfato) alla e attraverso la membrana o per (b) blocco della polimerizzazione, per inibizione del rilascio dei precursori dal carrier.
- Durante la terza fase, a livello della membrana nascente, sia per (a) inibizione della polimerizzazione delle catene di nuova sintesi, sia per (b) inibizione della transpeptidizzazione tra le catene neosintetizzate e quelle preesistenti.

Tab. 1.1 - Farmaci che agiscono inibendo la sintesi della parete batterica.

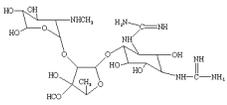
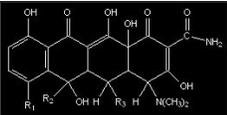
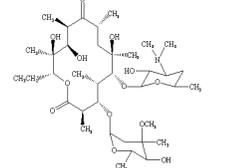
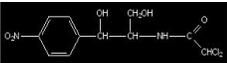
Classe	Famiglia	Gr. farmacoforo	Meccanismo d'azione
Beta-lattamici	Penicillina		Inibizione dell'attività trans-peptidasica e attivazione di mureinidrolasi e peptidasi con blocco della sintesi o della riparazione della parete e conseguente autolisi. Penicilline e cefalosporine vengono somministrate in associazione ad inibitori della beta lattamasi come l'acido clavulanico
	Cefalosporine		
	Monobactami		
	Carbapenemi		
Inibitori di parete	Cicloserina		Blocca l'allungamento della catena di peptidoglicano

	Bacitracina		Inibisce il trasportatore fosforilato
	Vancomicina		Inibisce l'allungamento della catena di peptidoglicano

1.2.2 Inibizione della sintesi proteica

Il secondo meccanismo su cui gli antibiotici possono agire è la sintesi proteica. Nei batteri questa avviene nel citosol, a livello dei nuclei ribo-proteici ribosomiali. I ribosomi batterici sono composti da due subunità, una 30S ed una 50S, differendo da quelli eucariotici (subunità 40S e 60S). Anche in questo caso, quindi, il bersaglio dei farmaci è selettivo, vengono colpite solo le cellule procariotiche, solitamente per legame del farmaco con una delle due subunità, in fase monomerica o dopo la formazione del complesso ribosomiale completo. Il blocco della sintesi proteica può avvenire sia per blocco catalitico della subunità, sia per inibizione del legame con i tRNA e conseguente allungamento del messaggero nascente, sia per l'induzione di errori nel codice di riconoscimento tRNA-triplette.

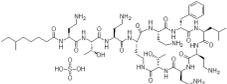
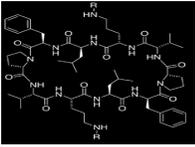
Tab. 1.2 - Farmaci che agiscono inibendo la sintesi proteica.

Classe	Famiglia	Gr. farmacoforo	Meccanismo d'azione
Ammino-glicosidi	Streptomicina Kanamicina Gentamicina Neomicina		Legano la subunità 30S e provocano un'errata lettura del codice genetico
Tetra-cicline	Tetraciclina Oxitetraclina Doxiciclina		Legano la subunità 30S interferendo con il legame dell'aminoacil-tRNA
Macrolidi	Eritromicina Claritromicina Azitromicina		Legano la subunità 50S e bloccano l'allungamento della catena proteica in formazione per inibizione della traslocazione
	Cloramfenicolo		Legano la subunità 50S e bloccano l'enzima peptidil-transferasi, quindi la formazione dei legami peptidici

1.2.3 Distruzione della membrana cellulare

La membrana plasmatica delle cellule batteriche è in molti modi simile a quella delle cellule eucariotiche, anche se molto più facilmente danneggiabile; consiste in un doppio strato fosfolipidico in cui si inseriscono numerose proteine ed ha il compito di mantenere l'omeostasi idrosalina e pressoria, proteggendo la cellula dall'entrata incontrollata di sostanze e liquidi o dalla fuoriuscita massiva di quest'ultimi. Alcuni agenti antibatterici agiscono alterando l'organizzazione strutturale e la permeabilità della membrana, interagendo con i suoi diversi componenti e comportandosi da cationi, anioni o molecole neutre.

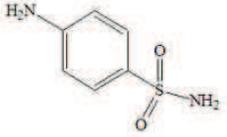
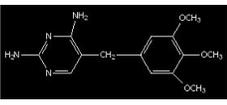
Tab. 1.3 - Farmaci che danneggiano la parete batterica.

Classe	Famiglia	Gr. farmacoforo	Meccanismo d'azione
Polipeptidi cationici	Polimixina Tirocidina		Hanno un'azione simile a quella di un detergente cationico, perturbano l'equilibrio di membrana contenendo gruppi sia idrofilici che idrofobici
Peptidi ionofori	Gramicidina		Miscela di peptidi di 15 aminoacidi che perturbano l'equilibrio ionico lasciando permeare cationi, quindi distruggendo il gradiente ionico tra ambiente extra ed intracellulare

1.2.4 Antagonisti metabolici

Alcuni composti chimici espletano la loro funzione antibatterica in quanto analoghi strutturali ma non funzionali di macromolecole coinvolte in diversi processi metabolici tipici dei procarioti. Nello specifico, molti farmaci agiscono sulle reazioni che portano alla sintesi del tetraidrofolato e sul metabolismo del folato stesso. Si tratta di un meccanismo non presente nelle cellule eucariotiche che sono in grado di assorbire folato dall'ambiente extracellulare. Questa molecola agisce da trasportatore di fonti di carbonio durante i processi di sintesi di macromolecole quali acidi nucleici e componenti peptidici della membrana cellulare.

Tab. 1.4 - Farmaci che agiscono fungendo da antagonisti metabolici.

Classe	Famiglia	Gr. farmacoforo	Meccanismo d'azione
Sulfamidici	Sulfonamide Sulfametoxazolo Sulfadoxina, Sulfasalazina Sulfadiazina		Inibiscono l'enzima diidropteroato sintetasi, che utilizza l'acido para-aminobenzoico (paba) per sintetizzare l'acido diidrofolico e quindi le purine.
Diammino pirimidine	Trimetoprim		Inibisce l'enzima diidrofolico reduttasi (DHFR) bloccando il processo di produzione delle purine e quindi la sintesi del DNA.

1.2.5 Inibizione della sintesi degli acidi nucleici

Gli acidi nucleici cellulari sono il DNA e l'RNA, quest'ultimo può essere suddiviso in sottogruppi, messaggero (mRNA), transfer (tRNA) e ribosomiale (rRNA), coinvolti nella sintesi proteica. Il DNA costituisce e custodisce il materiale genetico della cellula e funge da stampo per la sintesi, sia di nuovo DNA (replicazione cellulare) che di RNA (trascrizione).

Come noto, il DNA è una macromolecola costituita da due catene polinucleotidiche avvolte l'una intorno all'altra a formare una doppia elica. Ogni catena è formata dal susseguirsi di nucleotidi, composti da una base azotata, uno zucchero e tre gruppi fosfato. Ogni nucleotide lega il precedente e il successivo mediante legami N-glicosidici; la struttura elicoidale è poi stabilizzata da ponti idrogeno intercatena, che coinvolgono coppie di basi azotate (A+T e C+G). In breve, il processo di replicazione del DNA richiede l'iniziale intervento di enzimi che separino e svolgano la doppia catena, si tratta della famiglia delle Topoisomerasi II; e di un enzima che si occupi della sintesi dei nuovi filamenti, la DNA polimerasi.

È possibile interferire con il processo di sintesi degli acidi nucleici in più punti:

1. Inibizione della sintesi dei nucleotidi
2. Alterazione del processo di appaiamento intercatena tra le basi
3. Inibizione degli enzimi con attività polimerasica
4. Attacco diretto alla molecola di DNA
5. Inibizione delle Topoisomerasi II

Tab. 1.5 - Principali meccanismi d'azione dei farmaci che inibiscono la sintesi degli acidi nucleici.

Classe	Meccanismo d'azione
1	Analoghi nucleosidici-nucleotidici
1	Inibitori della sintesi di purine e pirimidine
2	Agenti intercalanti
3	Legame diretto all'enzima con blocco funzionale (Rifampicina)
3	Legame a specifiche basi con blocco della progressione dell'enzima
4	Agenti alchilanti
5	Inibizione della subunità GirasiA (Chinoloni)
5	Inibizione di enzimi della famiglia delle Topoisomerasi II

È più difficile incontrare farmaci antibatterici che intervengano e blocchino le funzioni replicative, essendo queste conservate tra le diverse specie, con poche differenze tra organismi procariotici ed eucariotici. Viene meno la possibilità di creare farmaci selettivamente tossici e sale la probabilità di avere effetti collaterali a carico delle cellule dell'ospite. Sono in commercio solo due classi di antibiotici che inibiscono selettivamente la replicazione batterica: le rifamicine, che inibiscono la sintesi dell'RNA, bloccando l'attività dell'RNA-polimerasi-DNA dipendente e i chinoloni, che agiscono sulla famiglia delle Topoisomerasi II, in particolare sulla GirasiA

1.3 Chinoloni

I chinoloni sono una famiglia di chemioterapici antibatterici di sintesi in continua e progressiva evoluzione e solo recentemente introdotti nella pratica clinica [83]. La storia degli antibatterici chinolonici ha avuto origine da una scoperta pressoché casuale avvenuta all'inizio degli anni sessanta. Nel corso di una sintesi alternativa della cloroquina, i chimici della Sterling-Winthrop isolarono come sottoprodotto un composto, che risultò provvisto di una certa attività antibatterica. Ripetute modificazioni chimiche di questo *lead* permisero l'ottenimento di una varietà di analoghi strutturali che furono saggiati come antibatterici, arrivando così alla scoperta dell'acido nalidissico [84].

Questo composto, dotato di moderata attività contro i G-, è considerato il capostipite della famiglia dei chinoloni e fu introdotto in terapia nel 1963, come

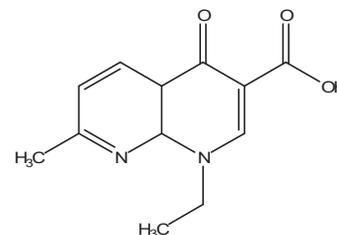


Fig. 1.1 - Acido nalidissico. Struttura chimica del primo chinolone di sintesi.

chemioterapico delle vie urinarie. La scoperta dell'acido nalidissico ha successivamente spronato un'intensa attività di ricerca che, negli anni successivi ha portato allo sviluppo di una serie di analoghi che costituiscono i cosiddetti chinoloni di prima generazione e che presentano caratteristiche praticamente sovrapponibili (Fig. 1.2).

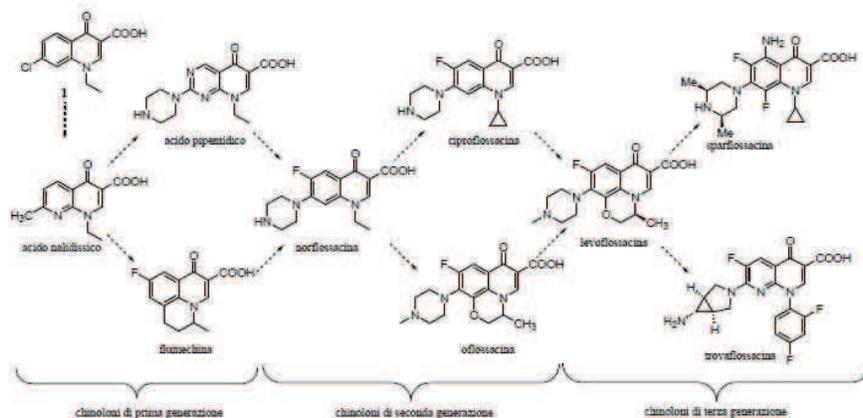


Fig. 1.2 – Chinoloni di prima, seconda e terza generazione. Evoluzione dei composti sintetizzati nel corso degli anni, suddivisi per generazione, a partire dal capostipite, l'acido nalidissico.

La struttura fondamentale della maggior parte di essi è rappresentata dall'anello 4-ossichinolico o da quello naftiridinico.

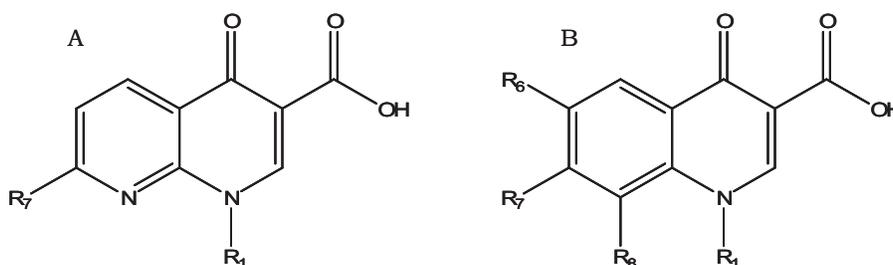


Fig. 1.3 - Struttura di base dei chinoloni. Le strutture di base dei chinoloni sono costituite dall'anello 4-ossichinolico (A) o dall'anello naftiridinico (B), dove R₁= alchile, ciclo alchile o anello condensato, R₆= H, F o alogeno ed R₇= alchile o ciclo azotato.

Rispetto all'acido nalidissico, gli altri chinoloni di prima generazione presentano aumentata attività contro le specie Gram negative (*Enterobacteriaceae*), ma sono sostanzialmente privi di effetti verso le specie Gram positive, *Staphylococcus aureus* e microrganismi anaerobi. Questa generazione è caratterizzata dal raggiungimento di una bassa concentrazione tissutale post-somministrazione ed una veloce clearance renale che li rende adatti al solo trattamento delle infezioni

delle vie urinarie.

Un progresso sensibile si ebbe nel 1980, allorché i chimici della Kyorin misero a punto la norfloxacin, derivante dalla combinazione di elementi strutturali dell'acido pipemidico (7-piperazina) e della flumechina (6-fluoro). La norfloxacin mostra efficacia anche su batteri G⁺ oltre che ad un'aumentata attività contro i G⁻, ma in pratica è ancora indicata soltanto per le infezioni del tratto urinario, a causa dei bassi livelli ematici raggiunti e della scarsa biodisponibilità sistemica [85].

La terza generazione di chinoloni è caratterizzata dalla fluorurazione alla posizione R₆, che dà origine alla classificazione dei successivi composti, detti appunto fluorochinoloni.

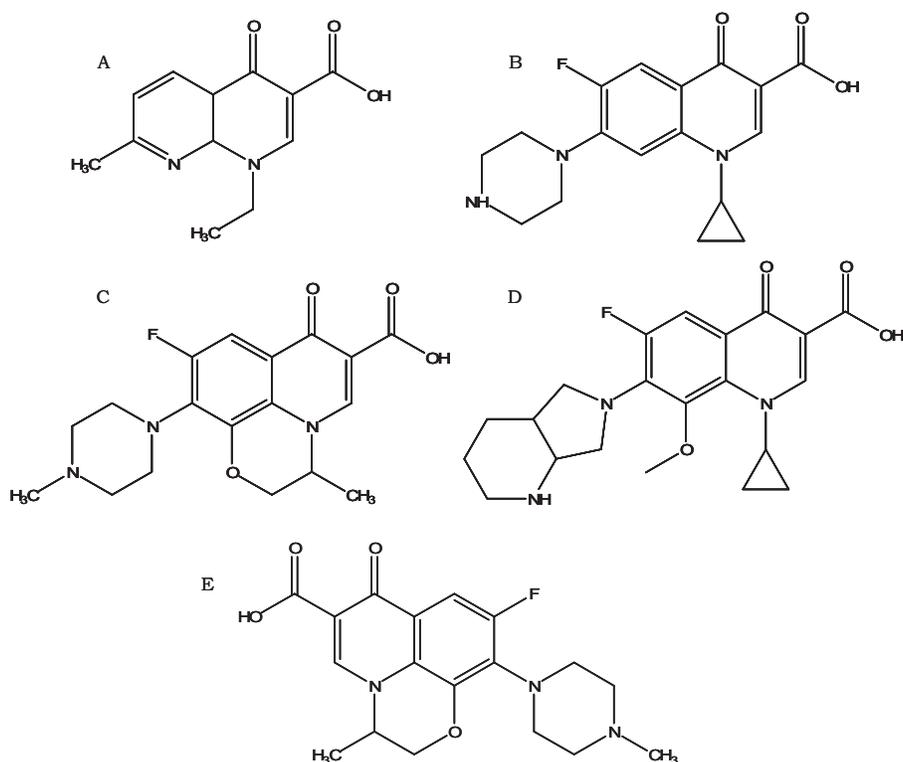


Fig. 1.4 – Chinoloni e fluorochinoloni. Strutture chimiche dei chinoloni che trovano più largo uso in pratica clinica ed utilizzati durante questo studio. A: acido nalidissico; B: ciprofloxacin; C: levofloxacin; D: moxifloxacin ed E: ofloxacin.

1.4 Fluorochinoloni

La norfloxacin è stato il primo fluorochinolone propriamente detto in quanto presenta non solo il fluoro in posizione 6, ma anche l'altro elemento strutturale fondamentale che è la piperazina in posizione 7 (si potrebbe anche parlare di

fluoropiperazochinoloni). L'atomo di fluoro serve sia ad aumentare l'attività di legame al bersaglio, sia a facilitare la penetrazione all'interno della cellula batterica. Alcune delle modifiche apportate alla struttura della norfloxacina sono in grado di alterare sensibilmente le proprietà dei composti risultanti. Si assiste ad un ampliamento dello spettro d'azione, ad un aumento dell'emivita e della distribuzione sistemica [86].

Dalla norfloxacina vennero sviluppati tutti i chinoloni di terza generazione che comprendono l'enoxacina, l'ofloxacina, la ciprofloxacina, composto che dimostra la maggiore attività antibatterica e la levofloxacina, enantiomero dell'ofloxacina.

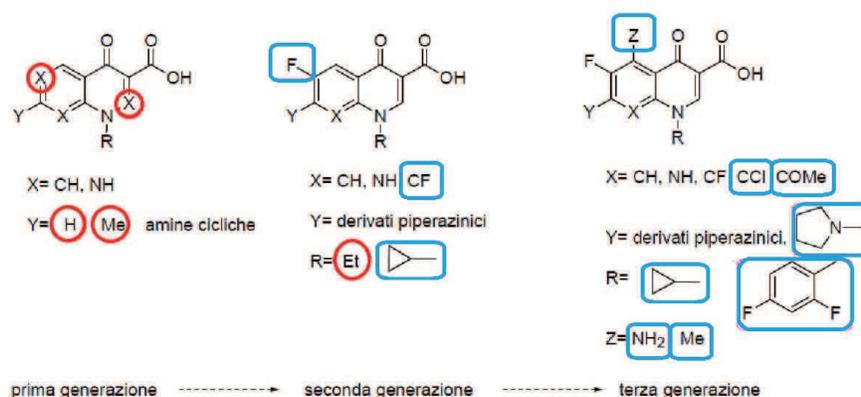


Fig. 1.5 – Evoluzione strutturale dei chinoloni. L'immagine riassume le modifiche introdotte alla struttura dei chinoloni di base, da una generazione all'altra. In rosso sono evidenziate le caratteristiche introdotte, ma non più utilizzate; le modifiche strutturali mantenute sono, invece, indicate in azzurro.

1.5 Proprietà chimico-fisiche dei fluorochinoloni

Il comportamento farmaco-cinetico e farmaco-dinamico dei chinoloni è strettamente correlato ad alcune caratteristiche chimico-fisiche di questi composti come la solubilità, il carattere acido-base, la capacità chelante e la fotoreattività.

1.5.1 Solubilità in acqua

I fluorochinoloni sono composti poco solubili in acqua ma facilmente solubili in alcali, data la presenza di un'ampia regione idrofobica. Presentano punti di fusione elevati (generalmente $>200^{\circ}\text{C}$) a causa delle forme cristalline molto stabili che si formano (π -stacking tra gli anelli aromatici). Per superare questo problema sono stati sintetizzati alcuni profarmaci aventi gruppi funzionali che conferiscono

una maggiore solubilità in acqua (derivati ammidici, sali sodici, etc) ma che nell'organismo liberano facilmente il principio attivo.

1.5.2 Acidità e basicità

I fluorochinoloni hanno proprietà acide conferite dal gruppo carbossilico in posizione 3, pKa compreso tra 5.5-6.3. Inoltre, la presenza di uno o più centri basici, conferisce proprietà basiche, pKa da 7.6 a 9.3, che varia a seconda del sostituente presente sull'anello eterociclico. Poiché i fluorochinoloni possiedono sia caratteristiche acide che basiche sono sostanze anfotere.

1.5.3 Effetto chelante su cationi metallici

I fluorochinoloni hanno la capacità di chelare cationi con costanti di affinità crescenti, nell'ordine $Ca_{2+} > Mg_{2+} > Fe_{3+} > Al_{3+}$. L'interazione con gli ioni avviene a livello della funzione carbossilica e del vicino gruppo carbonilico in posizione 4: la coplanarità che esiste tra i due gruppi rende possibile la formazione di chelati molto stabili. Le conseguenze sono: riduzione della biodisponibilità, insorgenza di interazioni tra farmaci e con il cibo.

1.5.4 Fotoreattività

I fluorochinoloni, in particolare quelli contenenti atomi di alogeno in posizione 8, sono composti fotoreattivi specialmente in condizioni neutre o acide. Se opportunamente stimolati da radiazioni elettromagnetiche, i fluorochinoloni danno origine a specie radicaliche di diversa natura a seconda della struttura del chinolone e, infine, portano alla formazione di radicali reattivi dell'ossigeno. I fluorochinoloni assorbono nel visibile a lunghezze d'onda comprese tra 350 e 425 nm, per questo motivo pazienti che assumono fluorochinoloni possono manifestare reazioni di fotosensibilità a seguito dell'esposizione alla luce solare.

1.5.5 Tossicità

Se assunti i fluorochinoloni determinano raramente reazioni tossiche o di scarsa tolleranza sistemica. Alcuni problemi vengono registrati a causa della fotoreattività dei principi attivi.

1.6 Relazione struttura-attività dei fluorochinoloni

Il nucleo fondamentale è un anello 1,4-diidro-4-oxopiridinico-3-carbossilico-1-alchil-sostituito fuso con un altro nucleo aromatico o etero-aromatico esa-atomico (benzene, piridina, pirimidina). Sono state apportate numerose modifiche al farmacoforo dei chinoloni per cercare di migliorare l'attività antimicrobica e diminuire la resistenza e la tossicità. Le posizioni 2, 3 e 4 sono essenziali e non possono essere cambiate senza una significativa perdita di attività.

Posizione R₁: in questa posizione un sostituyente ciclopropilico è considerato la modificazione che incrementa di più la potenza, seguita dal sostituyente 2,4-difluorofenile. Altri sostituenti possono abbassare la capacità della molecola di legarsi alla tasca dell'enzima e quindi diminuiscono la potenza del farmaco.

L'isomero S dell'ofloxacina (levofloxacina), anche se presenta una potenza minore della molecola col gruppo ciclopropilico, grazie all'anello che connette le posizioni 1 e 8 e crea una struttura tricyclica, è un'utile alternativa.

Posizione R₂: questa posizione è molto vicina al sito di legame per la DNA-Girasi e Topoisomerasi IV, quindi i gruppi voluminosi inibiscono l'accesso al sito di legame e diminuiscono l'attività del farmaco. Solo uno zolfo incorporato in un piccolo anello può rimpiazzare l'idrogeno in questa posizione.

Posizioni R₃ e R₄: queste due posizioni sul nucleo chinolonico sono critiche per il legame al DNA. Essenziali per l'attività antimicrobica sono, infatti, i gruppi 3-carbossilico e 4-carbonilico.

Posizione R₅: i sostituenti in questa posizione sembrano avere la capacità di alterare la conformazione sterica planare della molecola. L'aggiunta di gruppi di piccola grandezza come gruppi metilici, idrossilici, o amminici possono aumentare in modo marcato l'attività *in vitro*. Alogenuri e gruppi metossilici tendono a diminuire l'attività.

Posizione R₆: l'addizione di un atomo di fluoro ha migliorato di molto l'attività antimicrobica rispetto ai primi agenti antibatterici chinolonici. L'introduzione di un gruppo amminico in posizione 6 ha reso determinanti i sostituenti nelle posizioni 7 e 8.

Posizione R₇: questa posizione è considerata quella che direttamente interagisce con la DNA-Girasi e Topoisomerasi IV. I sostituenti ottimali in questa posizione sono gruppi che contengono, come minimo, eterocicli di 5 o 6 atomi contenenti azoto, come gruppi amminopirrolidinici (che aumentano l'attività verso batteri

Gram-positivi) e piperazinici (che aumentano l'attività verso batteri Gram-negativi).

Si è inoltre osservato che un volume maggiore nella posizione R₇ (Moxifloxacina) aumenta l'attività nei confronti degli anaerobi e conferisce protezione dalle pompe di efflusso attivate dal batterio, contrastando questo tipo di resistenza.

Posizione R₈: questa posizione influenza, come la posizione 5, la configurazione sterica della molecola chinolonica e i cambi apportati alterano l'accesso del chinolone alla tasca dell'enzima o ai siti di legame sul DNA.

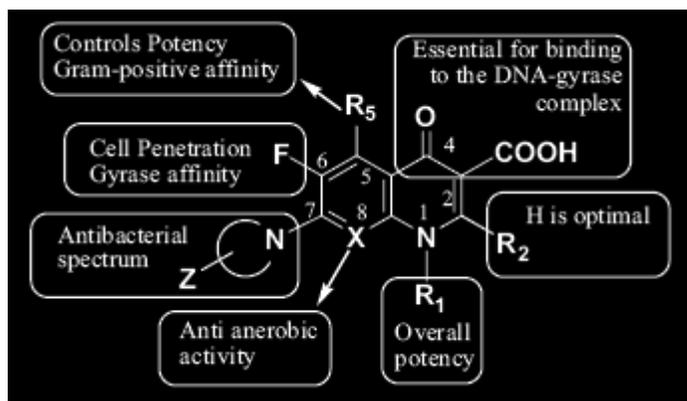


Fig. 1.6 – Relazione struttura-attività dei chinoloni. Per ogni posizione vengono riportate le caratteristiche principali: R₁, incremento della potenza; R₂, sostituente a minor ingombro sterico per non ostacolare il legame al bersaglio; R₃ ed R₄, legame al complesso Girasi-DNA; R₅, conformazione planare della molecola; R₆, determinazione dell'attività farmacologica; R₇, interazione con il bersaglio; R₈, configurazione sterica della molecola.

1.7 Bersagli dei fluorochinoloni

L'azione dei chinoloni è rivolta verso due enzimi batterici, DNA-Girasi e Topoisomerasi IV, appartenenti alla classe delle topoisomerasi II [87].

Le Topoisomerasi sono un ampio gruppo di enzimi presenti in tutti gli organismi ed implicati, come dice il nome stesso, nel mantenimento dello stato topologico del DNA. Intervengono nella replicazione e nella trascrizione, nella condensazione o decondensazione della cromatina, nella ricombinazione e nei meccanismi di riparo, in quei processi, cioè, in cui avviene un'alterazione della topologia del DNA. Le topoisomerasi vengono definite di classe I o II a seconda della loro capacità di introdurre, rispettivamente, una rottura temporanea del singolo o del doppio filamento di DNA. Le topoisomerasi II catalizzano la rottura temporanea di entrambi i filamenti di DNA, attraverso questa fanno passare un segmento di DNA intatto e risaldano le estremità tagliate, usando come fonte di energia l'ATP. In particolare l'enzima DNA-Girasi facilita i cambiamenti conformazionali del DNA

durante la replicazione, mentre l'enzima Topoisomerasi IV interviene nei processi di decatenazione delle molecole figlie dopo la replicazione del DNA.

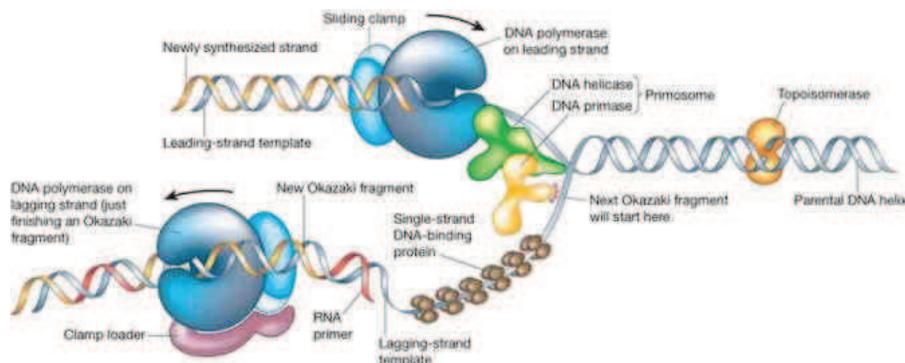


Fig. 1.7 – Caratteristiche generali della replicazione del DNA: Il doppio filamento viene svolto per azione della DNA-Girasi e dell'Elicasi. Ciascun filamento viene stabilizzato da SSB (*ssDNA-binding protein*) ed inizia la sintesi dei filamenti complementari grazie alla presenza di una molecola di DNA polimerasi su ciascun filamento (*leading e lagging*). In ogni momento, lo stato topologico del DNA viene stabilizzato dall'azione della DNA-Girasi e della Topoisomerasi IV.

DNA-Girasi e Topoisomerasi IV procariotiche sono evolutivamente e strutturalmente correlate e sono implicate nel processo di replicazione della catena del DNA batterico. Esse catalizzano il rilassamento ed il super-avvolgimento della doppia elica, la formazione ed il disfacimento di zone spiralizzate, l'organizzazione catenaria del DNA circolare. Gli omologhi funzionali degli enzimi batterici (Girasi e Topoisomerasi IV) nelle cellule eucariotiche fanno parte della famiglia delle Topoisomerasi II. Le numerose differenze strutturali tra gli enzimi procariotici ed eucariotici sono tali da rendere i fluorochinoloni agenti selettivi per i soli enzimi batterici. Le prime classi di fluorochinoloni sintetizzate sono caratterizzate da una specificità di inibizione enzimatica, agiscono, cioè, solo su determinate specie batteriche. Sebbene la suddivisione non sia ben netta, la DNA Girasi è il principale enzima bersaglio dei fluorochinoloni negli organismi Gram negativi, mentre la Topoisomerasi IV lo è nelle specie Gram positive.

1.7.1 DNA-Girasi

La DNA-Girasi è un etero-tetramero costituito da due subunità GyrA (97 KDa ciascuna) e due subunità GyrB (89.9 KDa ciascuna). La porzione C-terminale della subunità GyrA è responsabile della creazione dei super-avvolgimenti negativi, infatti, mutanti privi di questa porzione, perdono questa attività. La porzione N-terminale della subunità GyrA comprende un frammento di 29 KDa in cui si trova

il sito attivo (a livello di una tirosina, Tyr122) e un dominio costituito da tre alpha-eliche che formano il dominio CAP (*Catabolite Activating Protein*), delle quali solo due adiacenti (la seconda e la terza) sono critiche per il legame al DNA. La quarta alpha-elica, invece, è importante per il riconoscimento della sequenza di DNA prima del taglio. Questa elica contiene tre importanti residui amminoacidici: Thr744, molto conservato e collocato all'interno della proteina, Ser740 e Gln743, che sono rivolti verso l'esterno del peptide e sono poco conservati, facendo ipotizzare che contribuiscano a determinare le differenze inter-specie nel riconoscimento delle sequenze di DNA e nella diversa sensibilità ai farmaci.

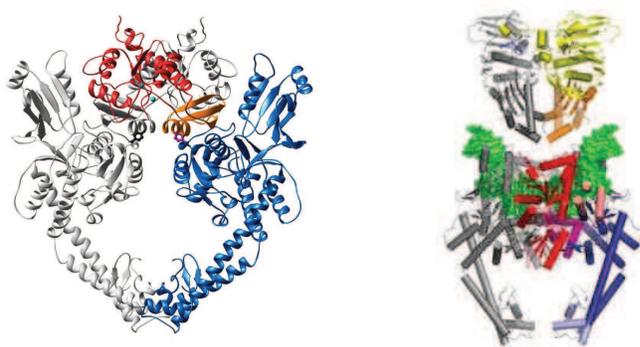


Fig. 1.8 – DNA-Girasi. A sinistra, la struttura tridimensionale della topoisomerasi II di *S. cerevisiae* (*DNA binding e cleavage fragment*). La struttura cristallografica mostra la forma a “cuore” assunta dalla proteina in forma dimerica, con una larga apertura mediana in cui scorrono le molecole di DNA. A destra, la struttura catalitica elaborata dal Prof. Berger (Belkley University). I domini funzionali sono evidenziati con diversi colori: in alto, in giallo e grigio la subunità ATPasica, in basso, in rosso, blu, rosa e grigio la subunità di legame e *cleavage* del DNA, in verde la molecola di DNA complessata all'enzima.

Ulteriori studi hanno dimostrato che i residui di GyrA coinvolti nell'interazione con i chinoloni si trovano nel dominio N-terminale e sono Ser83 e Asp87. Mutazioni a questo livello sono spesso coinvolte nell'insorgenza della resistenza ai chinoloni. La maggioranza dei ceppi resistenti isolati contengono mutazioni tra le posizioni 67 e 106 della subunità Girasi A, portando alla definizione di questa regione come “regione determinante la resistenza ai chinoloni” (QRDR, *Quinolone Resistant Determining Region*).

Nel dettaglio, DNA-Girasi è l'enzima responsabile del mantenimento dei normali super-avvolgimenti negativi del DNA ed è essenziale nella condensazione cromosomica, nell'inizio della trascrizione e nel movimento del complesso enzimatico durante la replicazione e trascrizione. L'azione enzimatica inizia con l'avvolgimento del DNA attorno all'enzima. Le subunità A scindono il DNA in un punto preciso definito G, *gate segment*, e ciascun monomero A dell'enzima viene

legato covalentemente, tramite un residuo tirosinico, al fosfato 5' del DNA tagliato, creando un legame fosfotirosinico. In presenza di ATP, l'enzima subisce un cambiamento conformazionale che determina il passaggio di un tratto di DNA integro detto T, *transported segment*, attraverso la rottura del filamento; a questo punto la subunità B salda il filamento prima tagliato di DNA. Il ciclo si chiude con l'idrolisi dell'ATP legato ed il conseguente rilascio di ADP ed ortofosfato. In seguito alla dissociazione dell'ADP l'enzima torna nello stato conformazionale iniziale, così è pronto a ricominciare la sua azione su un altro tratto di DNA (vedi Fig. 1.9).

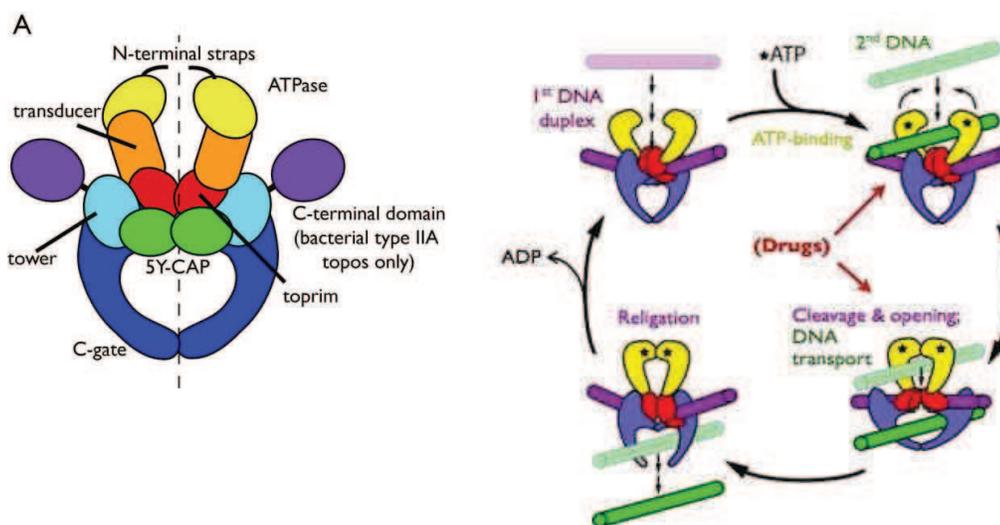


Fig. 1.9 – Struttura della DNA-Girasi e meccanismo d'azione. A: rappresentazione schematica della DNA-Girasi, in giallo e arancione sono indicati i domini con attività ATPasica, in rosso il sito di legame al DNA, chiuso da due terminali 5Y-CAP, in azzurro i domini *tower*, in blu il dominio *gate*, in viola i domini C-terminali. A sinistra, il meccanismo d'azione dell'enzima: la molecola di DNA si lega all'enzima, le subunità GyrA scindono il DNA creando un *gate*, una seconda parte integra del DNA passa attraverso la rottura del primo filamento che viene, successivamente, saldato dalla subunità GyrB. L'enzima, quindi, si dissocia e ricomincia la sua azione su un altro filamento. Le frecce rosse individuano i punti d'azione dei farmaci antitopoisomerasi.

La subunità GyrB è responsabile del legame e dell'idrolisi dell'ATP. GyrB contiene una zona detta piega di Rossmann, che, oltre a residui coinvolti nell'interazione con i chinoloni, contiene residui responsabili del taglio del DNA. Inoltre, mutazioni a livello di Asp426 e Lys447 della porzione C-terminale di GyrB determinano variazioni dell'interazione dell'enzima con i chinoloni, facendo pensare che tali residui siano direttamente coinvolti nel legame con il farmaco, agendo come elementi stabilizzanti il complesso chinolone-Girasi-DNA. I residui che legano l'ATP si trovano nella porzione N-terminale (da 1 a 220) di GyrB, ma ci sono altri due residui (Gln335 e Lys337) che sono implicati nel legame. Sebbene il ruolo di tali residui altamente conservati sia ancora poco noto, sembra intervengano nelle

modificazioni conformazionali dell'enzima a seguito l'idrolisi dell'ATP. La porzione di legame e idrolisi dell'ATP, forma un foglietto-beta con il braccio N-terminale dell'altro monomero, contenente residui essenziali per il processo di dimerizzazione.

E' stato visto che mutazioni della regione C-terminale di GyrB a carico dei residui Asp426 e Lys447 determinano variazioni nell'interazione dell'enzima con i chinoloni, facendo pensare che questa regione sia direttamente coinvolta nella formazione della tasca di legame ai chinoloni, oppure che entri a far parte del sito attivo di GyrA.

1.7.2 Topoisomerasi IV

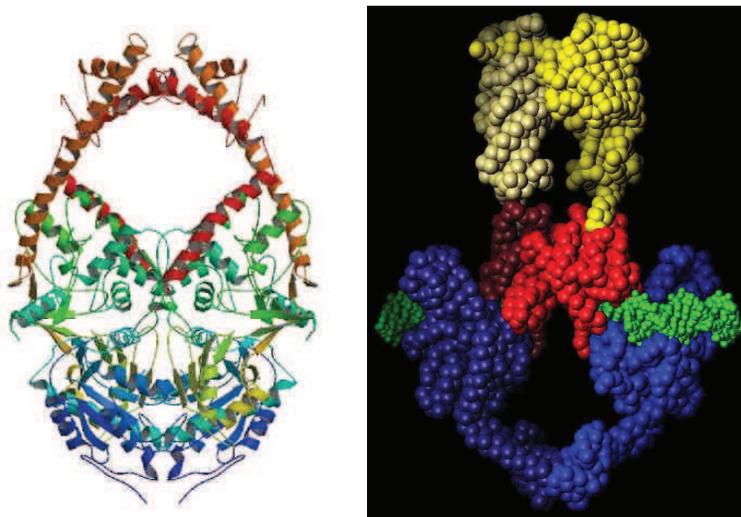


Fig. 1.10 - Topoisomerasi II: struttura. A sinistra, il complesso eterodimerico delle subunità della Girasi (blu, azzurro e verde) e della Topoisomerasi IV (rosso e arancione). A destra la struttura cristallografica dell'oloenzima di lievito, complessato ad una molecola di DNA (verde), dove le subunità della Topoisomerasi IV vengono evidenziate in due tonalità di giallo; la subunità della Girasi, invece, vengono identificate in blu e rosso.

La proteina Topoisomerasi IV è un etero-tetramero composto da due coppie di subunità denominate rispettivamente ParC e ParE, del peso molecolare di 83.7 KDa e 70.2 KDa. Interviene nella decatenazione delle molecole figlie dopo l'avvenuta replicazione del DNA. Il meccanismo d'azione è molto simile a quello della DNA-Girasi. La subunità ParC contiene il sito che catalizza la rottura del doppio filamento di DNA e la sua risaldatura, mentre la subunità ParE lega l'ATP e catalizza la sua idrolisi, fornendo l'energia necessaria a questa reazione. ParC e ParE mostrano un'estesa omologia di sequenza (36-40%) con, rispettivamente, le subunità GyrA e GyrB dell'enzima DNA-Girasi.

1.8 Meccanismo d'azione dei chinoloni

Come descritto in precedenza, DNA-Girasi e Topoisomerasi IV interagiscono con il doppio filamento, introducendo dei tagli dove necessario. Gli enzimi formano con il DNA un complesso temporaneo chiamato *cleavage complex*. L'azione antibatterica dei fluorochinoloni consta proprio nell'interazione con questo complesso. Hanno grande affinità di legame per il *cleavage complex*, andando a costituire un complesso ternario stabile DNA-Enzima-Farmaco. Il legame del chemioterapico stabilizza energeticamente il complesso ternario neoformato, bloccando il ciclo catalitico dell'enzima con conseguente non riparazione dei tagli sul DNA. L'impossibilità di riparare il DNA porta all'innescò dei processi di morte cellulare. Evidenze sperimentali suggeriscono che il farmaco sia in grado di legare il DNA e l'enzima, sia esso DNA-Girasi o Topoisomerasi IV, separatamente con un'affinità moderata. Il legame diviene molto più affine ed efficace se si tratta del complesso DNA-enzima.

Analizzando separatamente i due bersagli si può dire che:

- a. nel caso di legame con DNA-Girasi, le molecole di farmaco possono essere due o più numerose e l'interazione avviene attraverso il sostituito R_7 per formazione di ponti idrogeno con i residui Asp426 e Lys447 di GyrB, e/o attraverso il sostituito R_1 , per interazione con i residui aminoacidici Ser83 e Asp87 del dominio N-terminale della subunità GyrA. È stato provato come mutazioni a livello di questi residui siano la principale causa dello sviluppo di resistenza a questi farmaci [88].
- b. nel caso di legame con Topoisomerasi IV, il farmaco porta alla formazione di un addotto ternario stabile tra enzima, chinolone e DNA, con blocco dell'attività replicativa o riparativa e successivo innescò dei processi di morte cellulare [88-90].

1.9 Fenomeni di farmacoresistenza

Sono passati oltre quarant'anni dalla sintesi dei primi chinoloni e, quasi venti, da quella dei nuovi fluorochinoloni. Questa classe di farmaci ha avuto molto successo nella pratica clinica, inizialmente si pensò, erroneamente che, essendo farmaci di origine sintetica e non avendo correlazione con strutture già presenti in natura, la comparsa di fenomeni di farmacoresistenza sarebbe stata difficile o comunque

molto tardiva. Purtroppo questa ipotesi si è presto rivelata inesatta, e si è assistito ad rapida insorgenza di fenomeni di diminuita sensibilità o resistenza nei confronti di questi antibatterici.

In generale il fenomeno della resistenza ad un farmaco dipende da un adattamento, o meglio, selezione evolutiva dei singoli batteri, in corso di somministrazione della sostanza e deriva da mutazioni spontanee o dal trasferimento delle stesse tra batteri della stessa specie o di specie diverse. La frequenza di utilizzo di un determinato chemioterapico è direttamente proporzionale alla frequenza di insorgenza di fenomeni di resistenza. Sta acquistando sempre più importanza, nell'ultimo periodo, l'insorgenza di ceppi batterici multiresistenti, spesso per selezione all'interno dei nosocomi, molto difficili da trattare nella pratica clinica [91].

I normali meccanismi di resistenza ai farmaci adottati dai microrganismi comprendono:

- a. mutazioni a carico dei bersagli
- b. diminuita incorporazione intracellulare del farmaco
- c. alterazione della molecola o rapido metabolismo del farmaco
- d. sviluppo di una via metabolica alternativa

In particolare i fenomeni di resistenza ai chinoloni utilizzano i primi tre meccanismi elencati. I geni coinvolti in questi meccanismi possono essere situati a livello cromosomico o plasmidico. Per questo motivo possono essere individuate due classi di resistenza: (a) causate da mutazioni cromosomiche, caratterizzate da stabilità, trasmissione orizzontale e diffusione clonale, (b) mediate da elementi mobili, caratterizzate da trasmissione verticale e diffusione intra e inter-specie [92-94].

1.9.1 Mutazioni a carico dei bersagli

La frequenza di mutazioni spontanee nelle popolazioni batteriche, a carico di qualsiasi sequenza genica, è molto bassa, pari a 10^{-6} - 10^{-8} cellule per ogni divisione cellulare [95]. In corso di infezione aumenta la probabilità che avvenga una mutazione favorevole allo sviluppo di resistenza, soprattutto in alcune specie microbiche. È possibile sia che insorgano mutazioni neutre o sfavorevoli alla sopravvivenza, sia che compaiano e vengano selezionate caratteristiche che favoriscono la sopravvivenza in corso di trattamento con un determinato chemioterapico. La resistenza sarà, quindi, efficace anche verso altri farmaci

aventi lo stesso meccanismo d'azione. Mutazioni di questo tipo riguardano, nella maggioranza dei casi, modificazioni del target del farmaco. Il mancato riconoscimento del bersaglio o una diminuita affinità per esso consentiranno al microrganismo di sopravvivere.

1.9.2 Mutazioni a carico dei bersagli dei chinoloni: DNA-Girasi e Topoisomerasi IV

Il più importante meccanismo di resistenza ai chinoloni adottato dai microrganismi è sicuramente quello legato all'insorgenza di mutazioni all'interno delle sequenze codificanti le diverse subunità di DNA-Girasi e Topoisomerasi IV. Sono state individuate precise regioni geniche in cui le mutazioni sono più frequenti e portano a resistenza, con successiva selezione e diffusione di ceppi mutati. Queste zone sono denominate QRDR, *Quinolone Resistant Determining Region*: si tratta di regioni circoscritte, di piccole dimensioni, in cui insorgono mutazioni la cui frequenza è direttamente correlata alla rilevanza in termini di effetto. È stato visto che le subunità più colpite dall'insorgenza di mutazione sono GyrA e ParC. La maggior parte delle mutazioni a livello di GyrA e GyrB avvengono all'interno del dominio N-terminale, nella regione detta, appunto, QRDR, compresa tra gli aminoacidi Ala67 e Gln106 in GyrA e tra Asp426 e Lys447 in GyrB. Le mutazioni più frequenti si trovano a livello dei residui Ser83 ed Asp87, adiacenti al residuo di tirosina, *core* catalitico, che interagisce con il filamento di DNA. Le mutazioni a questo livello alterano il legame con i chinoloni, riducendone l'efficacia o dando completa resistenza. In contrasto con i dati ottenuti *in vitro*, che vedono una frequenza di insorgenza di mutazione paragonabile tra le subunità GyrA e GyrB, *in vivo* si assiste ad una ben più alta presenza di mutazioni in GyrA. Non tutte le mutazioni di GyrA hanno le stesse conseguenze, in termini di aumento della MIC ai chinoloni, o conferiscono lo stesso livello di resistenza, ad esempio:

- a. mutazioni a livello di Ser83 e Asp87 (tranne le mutazioni Asp87Asn, Asp87Gly e Asp87Tyr) danno alti livelli di resistenza;
- b. mutazioni a carico di Gly81Asp e Asp82Gly danno bassi livelli di resistenza ai fluorochinoloni;
- c. mutazioni dei residui Gly81Asp e Gln106Arg provocano un forte aumento di resistenza ai fluorochinoloni, mentre hanno poco effetto sull'attività dell'acido nalidissico.

Tra i diversi tipi di mutazioni, quelli che provocano una sostituzione amminoacidica possono alterare la capacità di formare legami a idrogeno o la struttura della proteina. Sembrano cruciali le sostituzioni degli amminoacidi carichi negativamente perchè importanti per l'interazione dei chinoloni con il complesso Girasi-DNA.

Anche se meno frequenti, le mutazioni della subunità GyrB sono comunque associate ad un lieve aumento della MIC ai chinoloni. Sono stati individuati due siti principali, a livello degli amminoacidi Asp426 e Lys447. Le mutazioni a carico di Asp426 danno resistenza all'intera classe di farmaci, mentre mutazioni a carico di Lys447 aumentano la MIC dell'acido nalidissico, rendendo, però, il ceppo molto sensibile ad altri chinoloni, quali la ciprofloxacina. È stato comunque dimostrato che questa ipersensibilità dipenda dalla contemporanea presenza di mutazioni a livello di GyrA [89].

Numerosi studi hanno evidenziato come l'enzima Topoisomerasi IV non sia sensibile ai chinoloni quanto DNA-Girasi. Per questo motivo è considerato un target secondario dei chinoloni, soprattutto nelle specie Gram negative. Ad oggi non sono mai state rinvenute mutazioni a carico delle subunità ParC o ParE in assenza di alterazioni in GyrA. D'altra parte, la presenza esclusiva di mutazioni in ParC non modifica la sensibilità verso i chinoloni, ma costituisce un passo successivo che determina l'aumento della MIC a questi farmaci, con selezione di ceppi altamente resistenti. Da studi di comparazione di sequenza e di struttura tra GyrA e ParC, risulta che gli omologhi dei residui 81, 83 ed 87 di GyrA sono rispettivamente i residui 78, 80 e 84 di ParC [96].

I punti cruciali in caso di mutazioni in ParC sono Ser80 e Glu84, nel primo caso diminuisce la capacità di formare ponti idrogeno se il residuo muta a Ile o Arg, mentre nel secondo le sostituzioni in Lys, Val o Gly modificano la carica della regione. Se, invece, la mutazione riguarda Gly78, con entrata di Asp, si assiste ad un aumento di resistenza ai fluorochinoloni, ma non all'acido nalidissico. Sono state identificate anche mutazioni che non cadono all'interno della regione QRDR di ParC (Ala56Thr, Ser57Thr)

In base all'omologia che le accomuna, le mutazioni a carico della subunità ParE sono del tutto simili a quelle che occorrono in GyrB e possono, perciò, essere associate ad un aumento di resistenza ai fluorochinoloni. In particolare, l'effetto dell'insorgenza di mutazioni di Asp420 e Lys441 in ParE sono analoghe alle mutazioni di Asp426 e Lys447 di GyrB. È comunque stato dimostrato che le modifiche ai residui di ParE oltre ad essere poco frequenti, influiscono poco

sull'aumento della MIC ai chinoloni [97].

1.9.3 Over-espressione dei bersagli

Questo meccanismo è conosciuto per altri tipi di farmaco (resistenza all'isoniazide del micobatterio tubercolare, per aumentata espressione di *inhA*), non è ancora stato identificato come responsabile della resistenza ai chinoloni.

1.9.4 Diminuzione dell'entrata del farmaco

Il secondo meccanismo che può portare ad antibiotico-resistenza è legato alla diminuzione della quantità di farmaco che viene assimilato dalla cellula batterica. Questo meccanismo può dipendere sia da un minore penetrazione (entrata) sia da un maggiore efflusso (uscita). Il primo caso vede la cellula procariotica modificare la permeabilità di membrana al farmaco, ad esempio, per inibizione dell'espressione o dell'esposizione di porine in membrana. I farmaci chinolonici sfruttano, solitamente un processo di diffusione passiva attraverso canali proteici come le porine per entrare nella cellula batterica, tuttavia la sola diminuzione in membrana di canali d'entrata non è sufficiente a spiegare *in toto* la concentrazione intracellulare riscontrata, in caso di insorgenza di questo tipo di farmaco resistenza. Contribuisce al mancato aumento di concentrazione citosolica di antibiotico, l'incremento della *clearance* intracellulare dell'antibiotico. Essa dipende dall'aumento di espressione ed attività di pompe di efflusso che, espellono attivamente le molecole di farmaco prima che raggiungano il bersaglio. In entrambi i casi, comunque, l'antibiotico non espleta la sua funzione perchè non raggiunge il bersaglio. Le pompe di efflusso sono strutture presenti in quasi tutte le specie batteriche e concorrono all'insorgenza di resistenza verso numerose classi di antibiotici. Spesso vengono raggruppate sotto la definizione MDR (*Multidrug Resistance*) pumps. Non sono ancora noti i substrati naturali delle MDR, ma si è supposto che esse concorrano alla detossificazione da composti tossici, anche metabolici, della membrana o del citoplasma. L'espressione e la funzione di queste proteine è modulata da fattori regolatori. L'insorgenza di resistenza e, in generale, l'entità dell'azione dei fluorochinoloni, perciò, possono essere influenzati, dal livello di espressione dei geni codificanti regolatori globali (*global regulator loci*) noti come *marA*, *soxS* e *robA*, che mediano l'espressione di pompe di efflusso. *MarA* (*Multiple antibiotic resistance A*) e *soxS* (*superoxide S*),

sono geni che regolano l'espressione di porine, una loro over-espressione aumenta la detossificazione mediata da pompe di efflusso. In particolare, *marA* e *soxS* causano, da un lato, la diminuita sintesi delle porine della famiglia OmpF (responsabili del passaggio di molecole idrofiliche a basso peso molecolare attraverso la membrana), dall'altro l'aumentata sintesi di "Multidrug efflux pumps", quali AcrAB-TolC. La conseguenza principale è la diminuzione dell'effetto legato alla somministrazione di diverse classi di antibiotici.

1.9.5 Alterazione o rapido metabolismo del farmaco

Molte specie batteriche sono in grado di sintetizzare e secernere nell'ambiente circostante sostanze in grado di inibire la crescita di altri microrganismi, perché tossiche. Si tratta di un meccanismo di difesa attuato al fine di assicurarsi una rapida crescita e colonizzazione del territorio circostante. Spesso si tratta di peptidi o tossine che hanno effetti anche su alcune classi di farmaci, funzionando da enzimi inattivanti. Questo meccanismo di resistenza non riguarda i chinoloni ma è largamente diffuso per gli antibiotici beta-lattamici, il cloramfenicolo e gli aminoglicosidi.

ESBL (Extended Spectrum Beta-lactamases):

Questo termine individua la più frequente causa di inefficacia degli antibiotici beta-lattamici. Dipende dalla produzione di enzimi con attività beta-lattamasi, cioè in grado di intervenire a livello dell'anello beta lattamico delle penicilline e delle cefalosporine, danneggiandolo. Inizialmente si pensava si trattasse di determinanti esclusivamente cromosomici, ma la larga e rapida diffusione della resistenza a questa classe di chemioterapici ha portato all'individuazione di numerosi determinanti plasmidici. Con il termine ESBL si classificano, oggi, entrambe le categorie. La prima beta-lattamasi plasmidica identificata fu *tem*, descritta già negli anni '60. Successivamente fu identificata la variante *shv*, in grado di idrolizzare le cefalosporine. Nel 1989 fu poi identificata una terza beta-lattamasi plasmidica, definita *ctx-M*, perché preferenzialmente attiva verso il cefotaxime.

Riassumendo, le beta-lattamasi plasmidiche possono essere di diverso tipo, presenti anche contemporaneamente, e spesso contenuti in elementi mobili del DNA, come integroni e transposoni:

- SHV: con attività verso le penicilline e cefalosporine

- TEM: come SHV agisce su penicilline e cefalosporine
- CTX-M: ha un'attività idrolitica verso il cefotaxime
- OXA: agisce preferenzialmente su cloxacillina ed oxacillina
- ESBL specie specifiche: LAP, VEB, PER, BEL, BES, TLA, SFO e IBC

La crescente preoccupazione che nasce dalla diffusione di questa classe di resistenza dipende dall'aumento esponenziale di casi di multi-resistenza, espressa verso i chinoloni e i beta-lattamici. Sembra esserci un alto indice di insorgenza di ESBL in ceppi già resistenti ai chinoloni.

1.9.6 Sviluppo di una via metabolica alternativa

Spesso gli antibiotici agiscono bloccando una specifica via metabolica, essenziale per la sopravvivenza della cellula batterica. Il patogeno può, comunque sviluppare via metaboliche alternative, inattivando l'azione del farmaco. Questo tipo di resistenza, tuttavia, non riguarda i chinoloni.

1.10 Meccanismi di resistenza mediati da plasmidi

I plasmidi batterici sono piccole molecole di DNA circolare prive di geni essenziali alla vita della cellula, indipendenti dal DNA genomico e auto-replicanti. I batteri contengono spesso tratti di DNA extracromosomici, che si scambiano attraverso processi che dipendono dalla presenza di un pilo di coniugazione inter-cellulare e vengono definiti fenomeni di coniugazione. Molti plasmidi contengono geni per la resistenza agli antibiotici, anche più d'uno sulla stessa molecola, e rappresentano un modo efficiente, rapido ed efficace di diffusione del fenomeno della resistenza. Il fenomeno è stato favorito dall'uso spesso eccessivo di antibiotici, che ha selezionato i ceppi più adatti alla sopravvivenza in presenza di farmaci appartenenti a classi diverse [88, 98, 99].

PMQR (Plasmid Mediated Quinolone Resistance):

Fino all'inizio degli anni novanta la resistenza ai chinoloni mediata da geni plasmidici era del tutto sconosciuta, la diminuzione dell'effetto farmacologico era spiegato dall'accumularsi di progressive mutazioni cromosomiche a carico dei bersagli. L'ipotesi che la resistenza ai chinoloni fosse solo un "fenomeno mutazionale" non ne spiegava il continuo aumento, sia di livello che di frequenza, e la rapida diffusione. Visto che l'insorgenza di mutazioni spontanee plurime

all'interno dello stesso gene ha una bassissima probabilità di avvenire (si stima muti un nucleotide ogni 10^9 basi [100]) e visto che la diminuzione della suscettibilità riguardava più specie batteriche contemporaneamente, ha iniziato a prender piede l'ipotesi che la diffusione della resistenza dipendesse dal trasferimento orizzontale di geni in grado di ridurre la sensibilità ai chinoloni [101]. Solo nel 1998 è stato isolato e caratterizzato il primo plasmide, quindi una molecola indipendente di DNA extra-cromosomico, codificante peptidi in grado di aumentare la resistenza a questi antibiotici. Nel corso degli anni sono poi stati individuati tre determinanti, con funzioni diverse, che implementano la resistenza alle varie classi:

- a. *qnr*: protezione dei bersagli, Girasi e Topoisomerasi IV
- b. *aac(6')Ib-cr*: inattivazione enzimatica per acetilazione
- c. *qepA*: estrusione dalla cellula batterica del farmaco

Gli ultimi due meccanismi descritti riguardano solo chinoloni con particolari caratteristiche, quali la presenza di una ammina piperazinica e l'idrofilicità, come la ciprofloxacina e la norfloxacina. L'effetto dell'azione dei Qnr inficia, invece, l'attività di tutti i chinoloni, non agendo sulla molecola chimica, quanto sul bersaglio [102, 103].

1.10.1 Protezione dei bersagli: geni *qnr*

Nel 1998, in un ceppo di *K. pneumoniae*, venne per caso scoperta la presenza di un plasmide in grado di aumentare considerevolmente la MIC ai chinoloni [104]. Il fatto che questo plasmide fosse stato ritrovato in ceppi sia positivi che negativi per l'espressione di porine, fece immediatamente scartare che la resistenza fosse legata ad un'alterazione dell'*uptake* del farmaco. Il successivo sequenziamento del plasmide svelò la presenza di un *Open Reading Frame* di 657 bp, il cui gene fu denominato *qnr* (*QuiNolone Resistance*). Fu quindi dimostrato che *qnr* era in grado di aumentare da quattro a sedici volte il grado di resistenza alla ciprofloxacina e agli altri chinoloni, in presenza di mutazioni nei bersagli, di meccanismi di detossificazione o limitato *uptake*, suggerendo, comunque che non si trattasse di un meccanismo legato né ad una limitata entrata, né ad un'incrementata attività dei trasportatori di membrana, né dell'inattivazione del farmaco. Solo la purificazione della proteina codificata dal gene *qnr* ha permesso di capirne struttura e funzioni [105, 106].

1.10.1.1 *qnr*: caratteristiche

La famiglia genica dei *qnr* è composta da isoforme di sequenza, lunghe circa 600 bp, isolate e caratterizzate nel corso dell'ultimo decennio, e denominate, rispettivamente, *qnrA* (1998), *qnrB* (2006), *qnrS* (2005), *qnrC* (2009) e *qnrD* (2009) [98, 101, 107]. Ciascuna famiglia mostra circa il 40%-60% di similarità di sequenza con le altre. Per le sottofamiglie *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* sono state individuate anche isoforme alleliche, denominate per aggiunta di un numero progressivo, es. *qnrA1*, *qnrA2*...*qnrAn*. Le isoforme alleliche condividono circa il 90% della sequenza amminoacidica. È stato recentemente proposto, in vista dell'isolamento di nuove isoforme, che vengano definiti *qnr*, geni che non differiscano da quelli già depositati di più del 30% nella sequenza nucleotidica o amminoacidica. In caso di isoforme alleliche dello stesso gene, es. *qnrB*, queste non devono differire per più di cinque amminoacidi [107].

1.10.1.2 Qnr: caratteristiche e meccanismo d'azione

I geni *qnr* codificano proteine di 218 amminoacidi appartenenti alla famiglia “*pentapeptide repeat proteins*”, che per definizione è caratterizzata dalla presenza da motivi di amminoacidi ripetuti secondo uno schema preciso [Ser, Thr, Ala o Val] [Asp o Asn] [Leu o Phe] [Ser Thr o Arg] [Gly]. Una caratteristica comune alle proteine Qnr è la presenza di nove domini pentapetidici separati da una glicina e una cisteina, ripetuti più volte, es. 28 in QnrA, 29 in QnrB e 22 in QnrS. La loro struttura tridimensionale, tuttavia, non è ancora stata determinata.

Per identificare il meccanismo d'azione dei Qnr si è partiti dall'ipotesi che potesse essere simile a quello di altri peptidi appartenenti alla stessa famiglia e che mostrassero una minima omologia con le proteine di interesse. Solo due proteine condividevano circa il 20% di omologia: McbG e MfpA, che in micobatteri proteggono le topoisomerasi dall'azione di farmaci inibitori della replicazione. Nello specifico, McbG protegge la DNA-Girasi dall'azione di una tossina, MfpA probabilmente compete con l'enzima nell'interazione con il DNA, impedendo la formazione del *cleavage complex* [108].

Esperimenti di transconiugazione di *qnrA* hanno permesso di confermare che i Qnr agiscono sugli stessi target degli omologhi appena descritti, proteggendoli dall'azione degli antibiotici chinolonici. Sebbene non sia ancora stato possibile definire e caratterizzare pienamente il loro meccanismo d'azione, evidenze

sperimentali hanno dimostrato che i Qnr:

- a. non hanno alcuna attività enzimatica, quindi non agiscono, parallelamente, inattivando il farmaco;
- b. non interferiscono con l'accumulo dello stesso all'interno della cellula;
- c. hanno affinità specifica per DNA-Girasi e Topoisomerasi IV *in vitro*;
- d. legano sia l'*holoenzyme* che le singole subunità della DNA-Girasi, senza interferire con la formazione dei dimeri o del tetramero finale;
- e. legano il bersaglio indipendentemente dalla presenza del DNA, di ATP o dell'antibiotico;
- f. legano il bersaglio a cavallo del sito per l'interazione al DNA, agendo da competitori, senza inibire l'attività enzimatica;
- g. non competono con il farmaco per il legame al bersaglio.

Questi dati portano ad ipotizzare che i meccanismi d'azione delle Qnr possano comprendere:

- a. un'alterazione della formazione del *cleavage complex*, bersaglio dei chinoloni;
- b. un'interferenza sulla stabilità del *cleavage complex* stesso, permettendo all'enzima di funzionare anche se legato al farmaco;
- c. l'induzione di modificazioni conformazionali nella tasca di legame con il farmaco così da destabilizzarne o impedirne il binding.

Nel complesso la presenza dei geni *qnr* porta all'aumento della MIC ai chinoloni di 16-125 volte, a seconda della molecola considerata, in ceppi che già esprimono determinanti cromosomici di resistenza (mutazioni dei bersagli, diminuzione delle porine e/o aumento dell'attività delle pompe di efflusso). In ceppi sensibili, privi di qualsiasi alterazione, l'aumento si attesta tra le 2-32 volte.

1.10.2 Inattivazione enzimatica per acetilazione: *aac(6')-Ib-cr*

Durante i numerosi studi svolti al fine di caratterizzare i plasmidi che conferivano resistenza ai chinoloni per presenza di geni *qnr*, divenne chiaro che alcuni di questi aumentavano la MIC agli antibatterici in misura molto maggiore di altri. L'analisi, mediante mutagenesi dell'intera sequenza plasmidica, dimostrò che l'aumentata resistenza era legata alla presenza di una sequenza simile alla nota amminoglicosil-acetiltransferasi *aac(6')-Ib*. Il sequenziamento rivelò che si trattava di una nuova isoforma genica, chiamata *aac(6')-Ib-cr*, che sebbene si differenziasse minimamente dalla versione già nota per quanto riguarda la sequenza, ha dimostrato avere notevoli differenze dal punto di vista funzionale [109].

1.10.2.1 *aac(6')-Ib-cr*: caratteristiche

Il gene inizialmente isolato, lungo circa 600 bp, sembrava semplicemente una delle 30 isoforme note dell'amminoglicosil-acetiltransferasi *aac(6')-Ib*, che dà normalmente resistenza agli amminoglicosidi, come la kanamicina. L'analisi di sequenza mostrò che la nuova variante presentava due mutazioni puntiformi con cambio di amminoacido codificato (Trp102Arg e Asp179Tyr). La modificazione della catena di amminoacidi che compongono la proteina, fa sì che l'enzima possa inattivare, non solo gli amminoglicosidi, ma anche la ciprofloxacina e la norfloxacina, acetilando l'ammina libera del gruppo piperazinico (N-acetilazione).

1.10.2.2 *Aac(6')-Ib-cr*: caratteristiche e meccanismo d'azione

Studi cinetici sulla proteina purificata, composta da 160 amminoacidi, dimostrarono che l'efficienza di acetilazione della variante -cr è leggermente minore rispetto all'enzima privo di mutazioni. Tuttavia la ridotta funzionalità è sufficiente a dare un fenotipo resistente ai chinoloni acetilabili.

Questo enzima ha di per sé un impatto modesto sulla MIC, aumentandola in misura molto minore rispetto ai Qnr perché agendo su un numero limitato di farmaci, ma la sua presenza facilita notevolmente la selezione di mutanti. *Aac(6')-Ib-cr* dunque, non aumenta di molto la resistenza dei batteri ai chinoloni ma facilita l'insorgenza di mutazioni a livello di DNA-Girasi e Topoisomerasi IV, permettendo così la selezione di ceppi con alti livelli di resistenza.

1.10.3 Estrusione dalla cellula batterica del farmaco: *qepA*

L'ultimo determinante plasmidico individuato in grado di conferire resistenza ai chinoloni, chiamato *qepA*, provoca una diminuzione di sensibilità agli antibiotici per rapida estrusione del farmaco. Fu scoperto dall'analisi di sequenza di plasmidi in grado di conferire resistenza a più classi di farmaci contemporaneamente, es. amminoglicosidi, beta-lattamici e chinoloni [110, 111].

1.10.3.1 *qepA*: caratteristiche

Il gene *qepA*, lungo circa 1 Kb, è caratterizzato da un alto contenuto in G+C, il 72% in più rispetto al normale contenuto cromosomico di queste basi. Codifica un

peptide di 511 amminoacidi, simile a proteine che fungono da trasportatori di membrana.

1.10.3.2 QepA: caratteristiche e meccanismo d'azione

QepA appartiene alla famiglia di pompe di efflusso “*Major Facilitator Superfamily*” di trasportatori protone-dipendenti, caratterizzati da 14 domini trans-membrana. L'analisi filogenetica ha rivelato un maggior grado di omologia con le famiglie di trasportatori di membrana dei Gram positivi che dei Gram negativi.

L'impatto sulla MIC ai chinoloni di QepA, è un aumento da 2 a 64 volte a seconda dell'antibiotico considerato. L'azione detossificante è rivolta anche verso altri farmaci idrofilici come l'eritromicina.

Tra i tre meccanismi appena descritti, la resistenza mediata da QepA è la meno frequente, soprattutto nel nostro continente. La prevalenza è notevolmente maggiore se si considerano gli Stati Uniti e i paesi orientali.

1.11 Intorno genetico dei PMQR

La rapidità di diffusione dei plasmidi in grado di indurre e implementare la resistenza ai chinoloni, e soprattutto il ritrovamento delle sequenze codificanti i geni *qnr*, *aac(6')-Ib-cr* e *qepA* in vettori diversi, in grado di passare facilmente da una specie all'altra, ha reso necessario analizzare e comprendere il ruolo dell'intorno genetico nella disseminazione delle singole sequenze. Si è compreso che i diversi plasmidi si sono formati per eventi di ricombinazione, trasposizione, delezione e inserzione di cassette geniche. Nonostante si possa pensare che vettori di grandi dimensioni siano più difficili da coniugare tra cellula a cellula e tra specie e specie, è stato dimostrato che la selezione naturale ha portato alla formazione di tre gruppi principali di plasmidi, con dimensioni che variano dalle 20 alle 320 Kb, in grado di conferire resistenza a diverse classi di farmaci, codificando numerose sequenze diverse. È stata spesso dimostrata una copresenza di geni per la resistenza ai chinoloni e geni codificanti beta-lattamasi. Ciascun plasmide può contenere anche più geni per l'inattivazione della stessa classe di chemioterapici. Nella maggior parte le sequenze geniche si trovano all'interno di cassette mobili, facilmente mobilizzabili. Sono stati identificati due tipi principali di cassette di ricombinazione: transposoni e integroni. Ciascun gene PMQR mostra una preferenzialità di intorno genetico, con differenze anche tra un allele e l'altro. Per

esempio, *qnrA* si trova all'interno di una cassetta integronica, mentre *qnrB* sembra essere più spesso associato a sequenza transposoniche, anche se alcuni alleli, come il *qnrB2* e *B6* sono stati rinvenuti anche all'interno di integroni. I geni per le beta-lattamasi viaggiano sempre all'interno di transposoni, spesso in tandem con altre cassette geniche, sia transposoniche che integroniche [112].

1.12 Struttura, caratteristiche e classificazione degli integroni

Gli integroni sono elementi genetici costituiti da un gene codificante un'Integrasi (IntI), affiancato da un promotore e un sito di ricombinazione, attI, in cui una o più cassette geniche mobili possono essere inserite o escisse grazie ad un meccanismo di ricombinazione sito-specifico catalizzato dall'Integrasi stessa. Le cassette geniche sono elementi costituiti da un singolo gene ed uno specifico sito di ricombinazione, attC, noto anche come "elemento di 59 basi" [113]. La maggior parte delle cassette geniche, che nella forma non integrata sono circolari, presenta determinanti per l'antibiotico-resistenza e non sembrano esistere limitazioni di specie alla loro diffusione. La classificazione degli integroni si basa sul grado di omologia della sequenza del gene per l'Integrasi intI. Finora sono state identificate numerose classi di integroni: i più diffusi tra i batteri Gram negativi ed i meglio caratterizzati sono gli integroni di classe 1. Gli integroni di classe 1, 2 e 3 sono in grado di integrare lo stesso tipo di cassette geniche. Sono noti inoltre oltre 70 tipi diversi di cassette mobili la cui lunghezza varia tra 300 e 1500 paia di basi; spesso hanno dei siti di ricombinazione attC unici. Questi possono variare da 57 a 141 bp e ogni cassetta genica nota presenta un elemento da 59 basi con sequenza unica [114, 115]. Sono state inizialmente identificate come sequenze invertite, ripetute, imperfette e associate ad una sequenza consensus di circa 59 basi. Le loro somiglianze sono limitate solo alle loro estremità che permettono il riconoscimento da parte dell'Integrasi e l'inserimento nel sito attI. Come detto precedentemente, l'integrazione avviene nel sito attI, subito a valle del gene dell'Integrasi, quindi ogni nuova cassetta si inserisce al 5' della precedente. Inoltre sono inserite tutte con lo stesso orientamento così che vengono trascritte come un unico operone a partire da un unico promotore. Sono, comunque, presenti trascritti più corti rispetto all'operone, che di solito corrispondono alla lunghezza della prima cassetta. Questo spiegherebbe i diversi livelli di resistenza conferiti dalla stessa cassetta genica a seconda che sia in prima posizione o a valle delle altre cassette. Gli integroni non sono di per sé elementi mobili, però sono spesso associati a

transposoni e/o a plasmidi che possono promuoverne il trasferimento intra- e interspecie [116].

1.13 Struttura, caratteristiche e classificazione dei transposoni

I transposoni sono segmenti di DNA che possono spostarsi autonomamente all'interno del genoma o di elementi extra-cromosomiali. Sono noti anche come elementi mobili o *selfish DNA*, in base al fatto che si propagano e replicano indipendentemente dalle sequenze geniche che interrompono mobilizzandosi. La loro struttura è molto semplice, è caratterizzata dalla presenza di due terminali ripetuti invertiti (ITR, *Inverted Terminal Repeats*), lunghi poche paia di basi, che fungono da sequenze di inserzione (IS, *Insertion Sequence*). La cassetta posta all'interno dei due terminali può variare per grandezza e contenuto, codificando una transposasi, enzima che guida i processi replicativi e di ricombinazione, e una o più cassette geniche. Normalmente la cassetta non contiene elementi promotoriali e i diversi ORF ricombinano senza preferenzialità di orientamento. Spesso è possibile rinvenire cassette transposoniche all'interno di integroni che ne assicurano l'espressione [117, 118].

1.14 Simociclinone, SD8

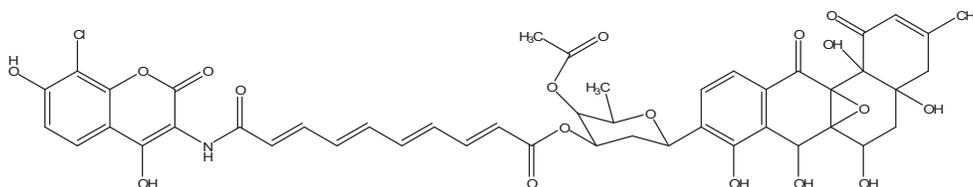


Fig. 1.11 – Simociclinone, SD8. Struttura chimica del composto.

Nell'ambito dell'analisi di chemioterapici, inibitori della funzione topoisomerasica è stata caratterizzata l'attività dell'antibiotico SD8 [119].

Il simociclinone D8 appartiene ad una nuova classe di antibiotici anguciclinonici, isolati dallo *Streptomyces antibioticus* Tü6040 [120]. In particolare SD8 contiene un gruppo amminocumarinico alogenato, come caratteristica principale, oltre ad un core polichetidico anguciclico, uno zucchero desossiesoso e una catena laterale tetraenica. È stato dimostrato che SD8 abbia come target principale d'azione la subunità A della Girasi batterica e inibisca o interferisca con la replicazione del materiale genetico batterico [121]. È noto che i farmaci cumarinici, cui appartiene

SD8, abbiano come bersaglio principale le topoisomerasi di tipo II, come i chinolonici [122]. Nel dettaglio, mentre i chinolinici legano in un complesso ternario DNA-Girasi e DNA, i cumarinici, inibiscono in modo competitivo l'attività ATPasica della DNA-Girasi. Contrariamente alla classe di farmaci cui appartiene, SD8 non inibisce l'attività ATPasica della Girasi, bensì interagisce con la subunità GyrA, impedendo il suo legame al DNA. Nonostante l'omologia di sequenza e di struttura degli stessi enzimi tra specie batteriche diverse, SD8 è stato riportato essere attivo esclusivamente sui batteri Gram-positivi, come *S. aureus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus subtilis*, e *Streptomyces viridochromogenes*. Al contrario finora sembrava non avere alcuna attività antibatterica sui Gram-negativi, come *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas fluorescens*, nonostante fosse stato riportato che in vitro SD8 legava la DNA-Girasi di *E. coli* [121, 123].

2. MATERIALI E METODI

2.1 Materiali

ISOLATI CLINICI:

Al fine di studiare la presenza di geni plasmidici implicati nell'insorgenza della resistenza ai fluorochinoloni, in collaborazione con l'U.O. di Microbiologia e Virologia dell'Azienda Ospedaliera di Padova (Dott.ssa Cavallaro A., Dott.ssa Bergo C.) nel periodo compreso tra Ottobre 2007 e Giugno 2009 sono stati raccolti e selezionati isolati clinici unici per la presenza di *Enterobacteriaceae* (es. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* e *Citrobacter Koseri*). I campioni sono stati isolati da diversi distretti corporei e appartenevano sia a pazienti nosocomiali (92%) che ad utenti del laboratorio di diagnostica microbiologica.

Sono stati scelti 232 campioni per il controllo della presenza dei geni *qnr* e 694 campioni per la possibile presenza di *aac(6')-Ib-cr* e *qepA*. I criteri di selezione comprendevano: diversi intervalli di MIC alla ciprofloxacina e presenza o meno di ESBL. L'identificazione dei campioni è stata condotta con il sistema automatico Vitek2 (BioMérieux, Hazelwood, MO, USA), mentre l'esatto valore di MIC è stato determinato mediante saggio di diffusione su agar e confermato mediante E-test (AB Biodisk, Solna, Sweden & bioMérieux, Hazelwood, MO, USA), secondo i criteri standard pubblicati da CLSI (M100-S18 con appendice M2-A9).

TERRENI DI COLTURA:

Oltre al terreno di base LB (Luria Bertani) (vedi 2.1), sono stati utilizzati anche i seguenti terreni solidi commerciali (BioMérieux, BD Becton, Dickinson and Company).

Tab. 2.1 - Composizione dei terreni solidi commerciali utilizzati.

Nome	Composizione	Scopo
Mueller Hinton	Idrolisato di caseina 1.75% w/v, amido 0.15% w/v, estratto proteico 0.2% w/v, agar 1.7% w/v, pH 7.5	Antibiogrammi
Agar Cioccolato	Estratto proteico 1.75% w/v, estratto di lievito 0.5% w/v, NaCl 0.5% w/v, 1.7% w/v, sangue animale cotto 7%, pH 7.5	Crescita batterica per arricchimento
Chromagar Orientation (ORI)	Estratto proteico 1,61% w/v; miscela cromogena 0.13% w/v, agar 1,5% w/v	Identificazione in base al metabolismo

CEPPI BATTERICI :

Durante gli esperimenti condotti in questa parte del lavoro sono stati utilizzati i ceppi batterici precedentemente descritti (vedi 2.1).

In particolare, per gli esperimenti di coniugazione batterica è stato utilizzato come accettore il ceppo di *E. coli* J53 Az^r gentilmente fornito dal Prof. L. Martinez-Martinez, (Department of Microbiology, University of Seville-University Hospital Virgen Macarena, Seville, Spain). È stato scelto questo ceppo in particolare perché privo di fattore di coniugazione e sensibile ai chinoloni. A scopo sperimentale, per avere una seconda selezione di controllo, il ceppo J53 Az^r è stato reso resistente anche alla kanamicina, ottenendo il ceppo J53 Az^rKan^r, effettivamente usato durante gli esperimenti di coniugazione. Per indurre l'insorgenza della resistenza alla kanamicina, cellule di J53 Az^r sono state cresciute in terreno contenente l'antibiotico. Partendo da una concentrazione minima pari a 5 mg/L, le cellule sono state selezionate per crescita O/N a 37 °C in terreno liquido selettivo. La concentrazione di antibiotico è stata raddoppiata (*two-fold serial dilution*) ad ogni ciclo di crescita, fino ad ottenere cellule in grado di crescere ad una concentrazione pari a 30 mg/L di kanamicina.

CEPPI BATTERICI DI CONTROLLO:

Come controllo interno dell'avvenuta amplificazione specifica delle sequenze in oggetto di studio, durante le reazioni di PCR sono sempre stati inclusi come controlli positivi i lisati ottenuti dai seguenti ceppi:

- *Enterobacter cloacae* HM04-477 per QnrA1;
- *Enterobacter cloacae* HM05-186 per QnrB4;

- *Escherichia coli* J53 tranconjugant HM5-184 per QnrS1
gentilmente forniti dalla Prof. Emanuelle Cambau (Hassistance Hopitaux Publique de Paris, group hospitalier Albert Chenevier-Henri Mondor) e
- *Escherichia coli* U2A1528 per aac(6')-Ib
- *Escherichia coli* TOP10/Pat291 (Pcr2.1#qepA) per qepA
gentilmente forniti dal Prof. Patrice Courvalin e dal Prof. Marc Galimand (Unité des Agents Antibactériens, Institut Pasteur, Paris, France).

OLIGONUCLEOTIDI:

Durante le reazioni di amplificazione e sequenziamento svolte per verificare la presenza di geni connessi alla resistenza plasmide-mediata ai chinoloni sono stati utilizzati gli oligonucleotidi (primers) riportati in tabella:

Tab. 2.2 - Primers utilizzati per lo studio della prevalenza dei meccanismi di resistenza mediati da plasmide e per le analisi di sequenza.

Gene	Nome primer e sequenza 5'-3'	Amplificato (bp)	Ref
qnrA	qnrA Fwd: AGAGGATTTCTCACGCCAGG qnrA Rev: TGCCAGGCACAGATCTTGAC	580	[124]
qnrB	qnrB Fwd: GGMATHGAAATTCGCCACTG qnrB Rev: TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA	264	[124]
qnrS	qnrS Fwd: GCAAGTTCATTGAACAGGGT qnrS Rev: TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG	428	[124]
GyrA Cambau	gyrA Fwd: CTGCGCGGCTGTGTTATAATT gyrA Rev: CCGTGCCGTCATAGTTATCAA	521	[125]
GyrA Lavilla	gyrA Fwd: CGACCTTGCGAGAGAAAT gyrA Rev: GTTCCATCAGCCCTTCAA	626	[125]
ParC Cambau	parC Fwd: AAGAAATCCGCCCCTACCGT parC Rev: CCGTGCCCCCAGTCCCCT	146	[125]
ParC Lavilla	parC Fwd: TGAATTTACGAAAACGCCTA parC Rev: GCCACTTCACGCAGGTTATG	534	[125]
BlaTEM	TEM Fwd: AGTGTCGACTTACCAATGCTTAATCAGT TEM Rev: AAAGAATTCTAAATACATTCAAATATG	890	[126]
BlaSHV	SHV Fwd: CGCCGGGTTATTCTTATTTGTCGC SHV Rev: TCTTTCCGATGCCGCCAGTCA	890	[126]
blaCTX M-1	CTX-M-1 Fwd: CGCTTTGCGATGTGCAG CTX-M-1 Rev: ACCGCGATATCGTTGGT per amplificare alleli CTX-M-1, -3, -10, -11, -12, -15 -22	551	[127]
blaCTX M-2	CTX-M-2 Fwd: TTAATGACTCAGAGCATTC CTX-M-2 Rev: GATACCTCGCTCCATTTATTG per amplificare alleli CTX-M-2, -4, -5, -6, -7 e Toho-1	896	[128]

blaCTX M-8	CTX-M-8 Fwd: TGAATACTTCAGCCACACG CTX-M-8 Rev: TAGAATTAATAACCGTCGGT per amplificare alleli CTX-M-8 e -25	918	[128]
blaCTX M-9	CTX-M-9 Fwd: CTGCTTAATCAGCCTGTCGA CTX-M-9 Rev: TCAGTGCATCCAGACGAAA per amplificare alleli CTX-M-9, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -21 Toho-2 e -3	230	[128]
blaLAP	LAP Fwd: GACCATATCAAAGGTCGG LAP Rev: TATACGAGATGGCTTGCC	Specie dipendente	[129]
blaMOX	MOX Fwd: GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT MOX Rev: CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520	[129]
blaCIT	CIT Fwd: TGGCCAGAACTGACAGGCAAA CIT Rev: TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	[129]
blaDHA	DHA Fwd: AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT DHA Rev: CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405	[129]
blaACC	ACC Fwd: AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA ACC Rev: TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	346	[129]
blaEBC	EBC Fwd: TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG EBC Rev: CTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302	[129]
blaFOX	FOX Fwd: AACATGGGGTATCAGGGAGATG FOX Rev: CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190	[129]
Sull ISCR1 DHAampR ISCR Bae 5'CS 3'CS	Sull: TGAAGGTTTCGACAGCAC ISCR1: CGCCCACTCAAACAAACG ampR: TGAGGCCGAAATCATGCAG ISCRBae: CAGACGCTCGTGATGACAAT 5'CS: GGCATCCAAGCAGCAAG 3'CS: AAGCAGACTTGACCTGA	Combinazione dipendente	[126]
ISEcp1	ISEcp1 Fwd: GACATGGCGGTGGGTCATC ISEcp1 Rev: CTGCTTGTCACACATTGTAAC	408	[130]
QnrB19 5'-3' OF	QnrB19 5': CGCTCAGGTCCGCACCTG QnrB19 3': GCGTAAAGTTAGACAGCTACC	Sequenza	[131]
ERIC	ERIC 1: ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC ERIC 2: AAGGTAAGTGACTGGCCTGAGCG	Specie dipendente	[126]
aac(6')-Ib	aac(6')-Ib Fwd: TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA aac(6')-Ib Rev: CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	469	[132]
aac(6')-Ib	SEQ aac(6')-Ib: CGTCACTCCATACATTGCAA	Sequenza	[131]
QepA Wang	qepA W Fwd: CGGCGCGTGTGCTGGAGTTCTT qepA W Rev: CCGACAGGCCACGACGAGGATGC	547	[111]
QepA CRAB	qepA C Fwd: TGGTCTACGCCATGGACCTCA qepA C Rev: TGAATTCGGACACCGTCTCCG	1137	[110]

SIMOCICLINONE (SD8):

SD8 è stato gentilmente donato dal Prof. Heide L. (Universität of Tübingen). È stata preparata una soluzione stock (5 mM) in metanolo, la cui concentrazione è stata determinata in spettrometria UV ($\epsilon_{345\text{nm}}=11.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Per ottenere le diverse diluizioni utilizzate nel corso dello studio è sempre stato utilizzato il metanolo come solvente, essendo l'SD8 quasi del tutto insolubile in acqua ed in tutti gli altri solventi organici ed inorganici. La soluzione madre è stata conservata a -20°C , la diluizioni sono state mantenute a 4°C , al riparo dalla luce. Soprattutto quando posto a basse temperature, l'SD8 tende a formare agglomerati in soluzione, che diminuiscono la quantità di farmaco attivo somministrato, per cui è stato cruciale ai fini dell'attendibilità e della riproducibilità dei risultati che la soluzione madre e le relative diluizioni venissero incubate a temperatura ambiente per almeno 30 minuti e mescolate energicamente prima dell'uso.

2.2 Metodi

2.2.1 Identificazione degli isolati clinici

Per l'identificazione dei ceppi isolati dai pazienti è stato utilizzato uno strumento automatizzato (Vitek®2, BioMérieux), normalmente usato nella pratica diagnostica dell'U.O. di Microbiologia e Virologia. Si è ottenuto un dato circa la specie di appartenenza dell'isolato. Lo strumento utilizza schede composte da 64 pozzetti contenenti reagenti biochimici od antibiotici. Il Vitek®2 permette di discriminare specie Gram +, Gram -, lieviti e funghi. Qualora il campione risultasse composto da più specie contemporaneamente, queste sono state isolate ed identificate separatamente su terreno ChromAgar Orientation (BD).

2.2.2 Determinazione dell'antibiogramma

Per ogni isolato è stato calcolato l'intervallo di sensibilità a numerosi farmaci antimicrobici, utilizzati nella normale pratica clinica. È stata determinata la MIC (Minima Concentrazione Inibente) in grado di inibire il 90% della crescita batterica, individuando gli intervalli di sensibilità e resistenza ai singoli antibiotici. L'antibiogramma è stato determinato con tecniche diverse, manuali o automatizzate:

1. microdiluizione in terreno liquido, contenente diluizioni scalari del farmaco e

- misurazione dell'OD₆₀₀ di crescita (*Broth microdilution assay*)
2. misurazione con sistemi automatizzati (Vitek®2, BioMérieux). Lo strumento è in grado di testare fino a 32 antibiotici per i Gram +, fino a 46 antibiotici per i Gram -. L'interpretazione dei dati è possibile grazie al software Advanced Expert System (AES).
 3. E-test, metodo quantitativo che determina la MIC in modo preciso utilizzando una striscia di plastica impregnata da un gradiente calibrato di antibiotico e valutando il termine dell'alone di inibizione.
 4. agar diffusione secondo Kirby Bauer e misurazione della presenza e del diametro dell'alone di inibizione (*Agar dilution assay*).

L'antibiogramma è stato calcolato per gli antibiotici riportati in tabella:

Tab. 2.3 - Sommario degli antibiotici utilizzati per la determinazione dell'antibiogramma.

Ac. Nalidissico	Aztreonam	Ceftazidime	Gentamicina	Ofloxacina
Acido Fusidico	Cefepidime	Ceftriaxone	Imipenem	Piperacillina
Amikacina	Cefotaxime	Ceftriaxone	Levofloxacina	Rifampicina
Ampicillina	Cefoxitina	Ciprofloxacina	Moxifloxacina	Tetraciclina
Amoxicillina Ac. Clavulanico	Ampicillina Sulbactam	Cefotaxime Ac. Clavulanico	Ceftazidime Ac. Clavulanico	Piperacillina Tazobactam

A seguito di tutti gli esperimenti di trasformazione e coniugazione, è stato formulato l'antibiogramma dei ceppi accettori nei confronti dei principali chinoloni utilizzati nella comune pratica clinica: acido nalidissico (NA), ciprofloxacina (CFX), levofloxacina (LE), moxifloxacina (MO), ofloxacina (OF).

2.2.3 Estrazione del DNA totale

Alcune colonie isolate prelevate da colture pure, cresciute O/N su terreno ricco Agar cioccolato a 37°C, sono state sottoposte a shock termico per 5 minuti a 95°C, dopo essere state risospese in H₂O deionizzata sterile. La sospensione è stata centrifugata a 13200 rpm per 5 minuti, il sovrinatante recuperato è stato, quindi utilizzato nei successivi esperimenti di amplificazione.

2.2.4 Reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR)

Per controllare la presenza delle sequenze di interesse nei lisati cellulari, è stata utilizzata la tecnica di amplificazione a catena della polimerasi (PCR).

Per l'amplificazione delle sequenze oggetto dello studio sono state preparate delle miscele di reazione in acqua deionizzata sterile fino ad un volume di 50 μ l.

La composizione è stata la seguente:

Tab. 2.4 - Composizione della miscela di reazione utilizzata per la PCR di amplificazione della sequenza dei geni per la resistenza ai chinoloni ed ESBL.

Componente	Quantità	Composizione
Templato	2-5 μ l	Lisato cellulare
Buffer 10x	5 μ l (1x finale)	10x: Tris-HCl 100 mM pH 8.3, KCl 500 mM, MgCl ₂ 15 mM
MgCl ₂ 25mM	3 μ l (1.5 mM finale)	
dNTPs	1.25 μ l (0.25 mM finale)	0.0625 mM finale per dNTP
Primer fwd Primer rev	1 μ l 1 μ l	0.4 μ M finale ciascuno
AmpliTaqaGold	0.2 μ l (2.5 unità totali)	1 unità/ μ l
H ₂ O	q.b. fino a 50 μ l	

In seguito si riporta lo schema del programma di amplificazione:

Tab. 2.5 - Programma di amplificazione utilizzato nella verifica della presenza di PMQR ed ESBL.

Ciclo	n. cicli	Temp (°C)	Tempo
1	1	94	5 min
2	30	94 48-54 72	60 sec 30 sec 60 sec
3	1	72	7 min
4	1	4	∞

In caso di PCR multiplex, dove è previsto l'inserimento di più coppie di primers nella stessa reazione, non sono state modificate le concentrazioni degli altri componenti. Tutti i reagenti utilizzati sono AppliedBiosystems. Ciascuna PCR di amplificazione ha previsto la presenza di un controllo negativo, per garantire l'assenza di contaminanti nei reagenti ed un controllo positivo di avvenuta reazione.

2.2.5 Sequenziamento

Il prodotto di PCR di tutti i campioni risultati positivi per uno dei geni oggetto dello

studio è stato analizzato mediante sequenziamento utilizzando il BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems), basato sul metodo di Sanger modificato.

Tale kit fornisce un tampone di reazione composto da:

- 4 di-deossinucleotidi trifosfato (ddNTPs) coniugati ciascuno ad un cromoforo diverso
- i deossinucleosidi-trifosfati (dNTPs)
- l'enzima AmpliTaq® Gold
- il tampone di reazione.

In tabella si riporta la composizione di una reazione di sequenziamento:

Tab. 2.6 - Composizione della miscela di reazione utilizzata durante la PCR di sequenziamento degli amplificati dei geni per PMQR ed ESBL.

Componente	Quantità	Composizione
Templato	#	
Buffer 5x	3 µl (1x finale)	5x: Tris-HCl 200 mM, pH 9.0, MgCl ₂ 5 mM
BD	1 µl	ddNTPs, dNTPs, Taq
Primer	0.5 µl	0.2 µM finale
H ₂ O	q.b. fino a 15 µl	

Non è stata indicata la quantità di templato utilizzata per reazione perchè questo parametro è stato modificato per ogni campione in base alla resa dell'iniziale PCR di screening. I campioni non sono stati purificati, si è visto, infatti che i componenti della PCR di amplificazione non disturbavano in alcun modo la successiva reazione di sequenziamento.

La reazione di sequenziamento è stata condotta in un termociclatore (Mastercycler personal, Eppendorf) secondo il seguente schema di amplificazione.

Tab. 2.7 - Programma di amplificazione utilizzato per il sequenziamento.

Ciclo	n. cicli	Temp (°C)	Tempo
1	1	94	5 min
2	35	94 50 72	30 sec 10 sec 4 min
3	1	4	∞

I campioni sono stati, quindi purificati, mediante precipitazione O/N a -20 °C in

presenza di sodio acetato (3M pH 4.6, 3%) e 2.5 volumi di etanolo, quindi risospesi in formammide (Sigma, F7508). L'analisi è stata condotta utilizzando un sequenziatore automatico (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems). L'elettroferogramma ottenuto è stato processato con l'editor di file contenenti cromatogrammi Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd) ed allineato alle sequenze depositate nel sistema internazionale NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) usando il programma Blast.

2.2.6 Estrazione di DNA plasmidico secondo il protocollo di Kieser

L'estrazione di DNA plasmidico illustrato da Kieser permette di isolare anche costrutti di dimensioni molto grandi (es. >20 Kb), purificandoli dal DNA genomico, da proteine e detriti cellulari. Una o più colonie provenienti da colture pure è stata inoculata in almeno 8 ml di terreno LB liquido addizionato con gli appropriati antibiotici e lasciata crescere O/N a 37°C sotto moderata agitazione. La sospensione è stata quindi pellettata a 13200 rpm per qualche minuto, quindi risospesa nella soluzione di Kieser (saccarosio 0.3 M; Tris-HCl 25 mM, pH 8; EDTA 25 mM, pH 8). La lisi è stata ottenuta per aggiunta di una soluzione contenente NaOH ed SDS (SDS 2%; NaOH 0.3 N) e vigorosa inversione (anche con vortex). Al termine è stata aggiunta un' aliquota di miscela di fenolo acido (8-idrossichinolina 0.1% w/v) e cloroformio in rapporto 1:1. Ciascun campione è stato ben mescolato e centrifugato a 13200 rpm a 4°C per circa un'ora al fine di separare i componenti in base alla loro preferenza per i solventi organici o acquosi. Il sovrantante è stato, quindi, recuperato. Il campione è stato direttamente utilizzato oppure ulteriormente purificato mediante precipitazione dell'acido nucleico a 13200 rpm a 4°C dopo aggiunta di etanolo e acetato di sodio (3M pH 5.2). Il pellet ottenuto è stato lavato in etanolo 70% quindi risospeso in TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0).

2.2.7 Elettroforesi su matrice di agarosio

L'elettroforesi è una tecnica che permette di separare le molecole di DNA in base alla carica e alle dimensioni, in termini di massa molecolare e ingombro sterico. Tutti gli amplificati ottenuti per PCR sono stati separati in gel di agarosio (0.8-1% (w/v)) in tampone TAE 1x (Tris-HCl 40 mM, EDTA 1 mM pH 8, acido acetico glaciale 20 mM) contenente Etidio Bromuro (0.5 mg/L). In base alla grandezza dei

frammenti sono state caricate anche delle miscele di DNA a peso molecolare noto: GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder, 250-10.000 bp e GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 50-1000 bp (Fermentas).

2.2.8 Elettroforesi su matrice di agarosio megabase

Per studiare il profilo elettroforetico dei plasmidi ad alto peso molecolare estratti dai campioni positivi per almeno uno dei geni oggetto dello studio, il DNA purificato mediante protocollo di Kieser, è stato caricato all'interno di una matrice gel a maglia larga (Certified Megabase Agarose, 0.7% in TAE 1x), addizionato ad un indicatore colorimetrico di corsa (glicerolo 50% w/v, xilene cianolo 0.25% w/v e blu di bromofenolo 0.25% w/v.). Insieme ai campioni è stato caricato un indicatore di peso molecolare (1 Kb Plus DNA Ladder, 75-20.000 bp, BAC-Tracker™ Supercoiled DNA Ladder EPICENTRE® Biotechnologies). La separazione è stata condotta per almeno 5 ore, a 4°C in tampone TAE 1x a 4.5 V/cm. Al termine della corsa il gel è stato colorato in Etidio Bromuro, quindi analizzato mediante transilluminatore a UV.

2.2.9 Trasformazione batterica

Come descritto (vedi 2.2.2; 2.2.4) esistono due tecniche diverse per veicolare DNA esogeno all'interno di cellule batteriche, rese a questo scopo competenti. Per verificare che i geni per la resistenza ai chinoloni fossero su elementi mobili, tipo plasmidi, e non fossero integrati nel genoma, gli estratti di DNA totale, i plasmidi purificati con il protocollo di Kieser e/o il DNA prelevato dalle bande elettroforetiche a termine di una corsa è stato veicolato in batteri accettori competenti. Sono state usate entrambe le tecniche, sia la trasformazione per via chimica, che per via elettrica, usando come ceppo accettore *E. coli* TOP10, in quanto privo di mutazioni a livello della subunità GyrA e quindi sensibile a i chinoloni. La selezione delle cellule trasformate è avvenuta su terreno contenente acido nalidissico (30 mg/L), per trasferimento di resistenza ai chinoloni, e streptomycin (20 mg/L), per selezione del ceppo competente.

2.2.10 Coniugazione batterica

È il processo utilizzato dalle cellule batteriche per scambiarsi materiale genetico

attraverso il contatto cellula-cellula e dipende dalla presenza di fattori o pili di coniugazione. In natura si assiste frequentemente al passaggio di plasmidi contenenti, ad esempio, fattori che mediano la resistenza ai farmaci antimicrobici, portando all'insorgenza di ceppi multiresistenti. Il passaggio di materiale avviene sia tra batteri appartenenti alla stessa specie, che di specie diverse, e solo le cellule esprimenti il fattore F di coniugazione sono in grado di “agganciare” le cellule accettrici. Anche il fattore F può essere trasferito, convertendo un semplice accettore in donatore.

Sfruttando questa capacità delle cellule batteriche, si è voluto verificare che la resistenza ai chinoloni fosse effettivamente mediata da plasmide. Allo scopo sono stati scelti dei donatori positivi per i geni di interesse e sensibili alla kanamicina, in modo da poter selezionare senza interferenze il ceppo accettore, che come descritto in precedenza (vedi 2.2.10) è il ceppo *E. coli* J53 Az^rKan^r. Il protocollo (*Filter Mating Assay*) utilizzato prevedeva che accettore e donatore fossero cresciuti separatamente a 37°C sotto agitazione, in terreno selettivo specifico. Al raggiungimento della fase esponenziale, si è bloccata l'agitazione per 30 minuti, tanto da consentire il formarsi dei pili di coniugazione del donatore. Al termine le due colture sono state centrifugate a 5000 rpm per 5 minuti e risospese in una soluzione tampone (MgSO₄, 20 mM). L'accoppiamento tra le due specie è stato condotto su filtro (Microcon Centrifugal Filter Devices, cut-off 100 kDa) le sospensioni sono state incubate (in rapporto 1:3 in favore dell'accettore) O/N a 37°C, collocando il filtro su terreno arricchito (Agar cioccolato, BD). Successivamente i filtri sono stati recuperati e posti a crescere in terreno liquido triplo selettivo per la presenza di antibiotici per la selezione dell'accettore (sodio azide 100 mg/L e kanamicina 30 mg/L) e del plasmide trasferito (acido nalidissico 50 mg/L o ciprofloxacina 0.2 mg/L). Per ogni esperimento sono stati previsti dei controlli di crescita negativi del ceppo donatore ed accettore per verificare l'eventuale insorgenza di mutazioni e resistenze che avrebbero falsato il risultato ottenuto. Di tutti i ceppi coniugati ottenuti è stato valutato l'antibiogramma ai fluorochinoloni mediante E-test.

2.2.11 Determinazione per microdiluizione della MIC₅₀ all'SD8

La minima concentrazione inibente il 50% di crescita batterica (MIC₅₀) è stata determinata mediante saggio di microdiluizione in liquido, utilizzando piastre a 96 pozzetti (Falcon). Singole colonie da colture pure dei ceppi scelti per lo studio sono

state inoculate in terreno liquido (LB) senza antibiotici e lasciate crescere a 37°C sotto agitazione fino al raggiungimento della fase esponenziale tardiva. Le singole colture sono state quindi diluite a OD₆₀₀ pari a 0.06 (fase di latenza) in un volume finale di 100 µl di terreno liquido. L'SD8 è stato aggiunto facendo diluizioni seriali 1:2 (*two-fold serial dilution*). Le concentrazioni crescenti utilizzate andavano da 100 mg/L a 0.01 mg/L, in ogni pozzetto la concentrazione di metanolo la stessa, pari al 2%. Tutti i saggi comprendevano un controllo di crescita del ceppo in terreno senza antibiotici e un controllo di crescita in presenza del 2% di metanolo, in assenza del farmaco. Non sono stati verificati gli effetti antimicrobici dell'SD8 a concentrazioni superiori di 100 mg/L a causa dei possibili effetti tossici del solvente sulla crescita batterica, per questa ragione è stata determinata la MIC₅₀ e non è stata raggiunta la MIC₉₀, che normalmente si raggiunge nei comuni saggi di titolazione di composti con attività antibiotica.

2.2.12 Misura della frazione di SD8 assunta dalle cellule batteriche

Estrazione mediante acetato di etile:

Volendo valutare la frazione di SD8 internalizzata dalle cellule batteriche, i ceppi di *E. coli* e *K. pneumoniae* sono stati inoculati in 3 ml di LB liquido contenente SD8 (50 mg/L) e lasciati crescere O/N a 37°C sotto agitazione. La coltura è stata quindi pellettata, lavata da eventuali residui di mezzo di coltura e risospesa in una soluzione di lisi (SDS 1%, NaOH 0.3%). Le cellule sono state mescolate energicamente e lasciate sedimentare. Per eliminare i detriti cellulari, i campioni sono stati pellettati per centrifugazione a 13200 rpm. Al termine si è proceduto con una doppia estrazione in acetato di etile, aggiungendo al sovrantante recuperato un ugual volume di solvente organico e mescolando accuratamente. I campioni sono stati lasciati a temperatura ambiente fino a completa separazione tra le due fasi. La fase organica è stata quindi recuperata e l'etil acetato è stato eliminato per mezzo di un evaporatore rotante.

Analisi RP(Reversed Phase)-HPLC:

L'SD8 estratto e purificato dal solvente è stato risospeso in metanolo e analizzato in RP-HPLC (*Reversed Phase - High Performance Liquid Chromatography*) (Eclipse XDB C18 column, Agilent Technologies). I parametri utilizzati sono stati i seguenti: solvente A CH₃CN/TFA (acetonitrile/acido trifluoroacetico) 0.01%, solvente B H₂O/TFA (acqua/acido trifluoroacetico) 0.01%, gradiente: 0-100%

solvente A in 10 minuti. I risultati sono stati riportati come quantità assoluta (pmol), determinata per comparazione ad una curva di calibrazione e come percentuale relativa, calcolata come rapporto tra la quantità di farmaco rinvenuta all'interno delle cellule e la quantità totale somministrata alle colture ad inizio saggio.

3. RISULTATI

La resistenza ai farmaci antimicrobici in commercio è in continua crescita, trasformandosi in una questione mondiale, con sviluppo di ceppi multiresistenti, difficilmente caratterizzabili in modo univoco con un semplice antibiogramma e difficilmente trattabili. L'ampia e rapida diffusione del problema dipende da un aumento della prescrizione di antibiotici, sia di uso umano che animale, con errori di posologia o intervallo di somministrazione, e dal rapido spostamento delle masse da un continente all'altro con susseguente disseminazione di ceppi batterici resistenti a più classi di antibiotici, che più facilmente superano la pressione selettiva.

I chinoloni sono la famiglia di antibiotici più largamente prescritta per il trattamento di infezioni da *Enterobacteriaceae*, contro cui si stanno sviluppando numerosi e nuovi meccanismi di resistenza. I risultati che verranno descritti riguardano l'analisi epidemiologica della presenza di resistenza a questi farmaci nella nostra zona. Particolare attenzione è stata rivolta ai meccanismi di resistenza mediati da plasmide, più recentemente individuati, e alla loro caratterizzazione.

Parallelamente, ritenendo interessante analizzare l'attività antimicrobica di nuove molecole, in grado di agire sugli stessi enzimi target dei chinoloni, le Topoisomerasi, vengono descritti i risultati ottenuti dalla caratterizzazione dell'azione antibatterica ad ampio spettro di un nuovo composto antibatterico, il simociclinone (SD8).

3.1 Prevalenza della resistenza mediata da plasmide ai chinoloni

3.1.1 Resistenza mediata dai geni *qnr*

Lo screening dei 232 campioni di *Enterobacteriaceae* (68% *E. coli*, 20% *K. pneumoniae*, 12% altri) ritenuti idonei allo studio, ha rivelato che il 17% di questi è positivo per l'espressione di uno dei geni *qnr* (*qnrA*, *qnrB* o *qnrS*). Nessun campione presenta più geni contemporaneamente. Come riassunto dalla Fig. 3.1, gli isolati positivi appartengono a due sole specie batteriche: *K. pneumoniae* (80%) ed *E. coli* (20%), con larga preferenzialità di specie. L'analisi di sequenza ha rivelato che i geni *qnr* identificati appartengono all'allele *qnrA* (prevalenza 0.84%, 100% *K. pneumoniae*), *qnrB* (prevalenza 15.3%, 86% *K. pneumoniae*, 14% *E. coli*) e *qnrS* (prevalenza 1.3%, 100% *E. coli*), mentre l'allineamento per la classificazione

dell'isoforma allelica ha permesso di evidenziare che tutti i campioni di *qnrA* appartengono all'allele A1, i *qnrS* all'allele S1, e i *qnrB* all'allele B19. Quest'ultimo dato è apparso come il più particolare ed interessante, visto che l'isoforma B19 è stata identificata in Colombia nel 2008 e sembrava finora presente solo nella regione dell'America del sud.

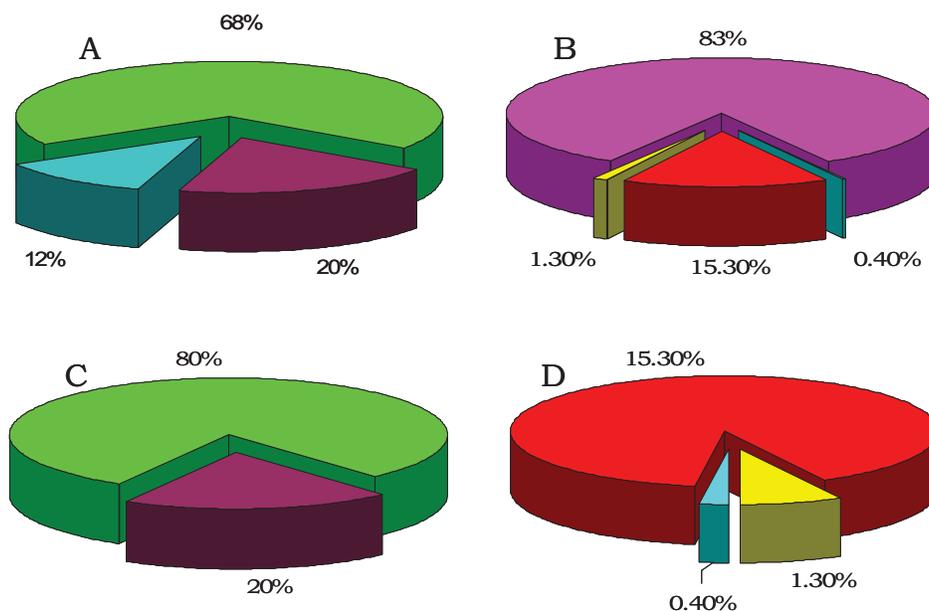


Fig. 3.1 – Resistenza mediata dai geni *qnr*. A. distribuzione percentuale di specie dei campioni selezionati per lo studio, in verde *K. Pneumoniae*, in viola *E. coli*, in azzurro le altre specie. B. distribuzione percentuale dei geni *qnr* all'interno degli isolati analizzati, in rosa i campioni negativi, in azzurro i positivi per *qnrA*, in rosso i positivi per *qnrB*, in giallo i positivi per *qnrS*. C. distribuzione percentuale dei campioni positivi per specie di appartenenza, in verde *K. Pneumoniae*, in viola *E. coli*. D. distribuzione percentuale dei campioni positivi per gene *qnr*, in azzurro *qnrA*, in rosso *qnrB*, in giallo *qnrS*.

3.1.2 Resistenza mediata dal gene *aac(6')-Ib-cr*

Lo screening per la presenza del gene *aac(6')-Ib-cr* in 197 campioni di *Enterobacteriaceae* (74% *E. coli*, 20% *K. pneumoniae*, 6% altri) selezionati per lo studio, in base alla MIC alla ciprofloxacina, è stato condotto con primers che riconoscono tutte le isoforme del gene *aac(6')-Ib*, appaiando alle estremità della sequenza codificante. Nello specifico sono stati selezionati campioni resistenti (30%) a questo farmaco, sensibili (53%) e intermedi (15%). Come si può vedere dalla Fig. 3.2, a questa prima indagine sono risultati positivi 25 isolati (13%), 17 (68%) dei quali *E. coli* e 8 (32%) *K. pneumoniae*. Per capire se gli isolati contenessero la variante *aac(6')-Ib-cr* dell'enzima, è stata fatta un'analisi di sequenza dell'amplificato genico ed è stata controllata la presenza delle due

mutazioni caratteristiche (Trp102Arg e Asp179Tyr), che differenziano la variante -cr rispetto alla più comune amminoglicoside-acetiltransferasi. 16 (64%) dei 25 isolati esprimono la variante dell'enzima in grado di acetilare alcuni fluorochinoloni, come la ciprofloxacina. La totalità (100%) degli isolati appartengono ad *E. coli*: anche in questo caso, quindi si osserva un'ampia preferenzialità di specie.

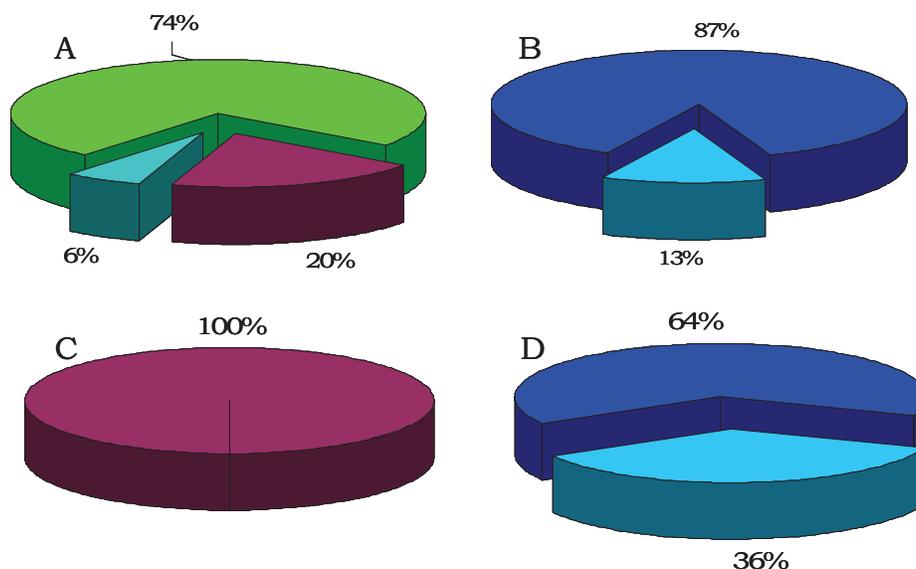


Fig. 3.2 - Resistenza mediata dal gene *aac(6)-Ib-cr*. A. distribuzione percentuale di specie dei campioni selezionati per lo studio, in verde *K. pneumoniae*, in viola *E. coli*, in azzurro le altre specie. B. distribuzione percentuale del gene *aac(6)-Ib*, in blu i campioni negativi, in azzurro i positivi. C. distribuzione percentuale di specie dei campioni positivi per *aac(6)-Ib-cr*, in viola *E. coli*. D. distribuzione percentuale degli isolati positivi per *aac(6)-Ib-cr* in azzurro, rispetto al totale positivo per *aac(6)-Ib* al primo screening, in blu.

3.1.3 Resistenza mediata dal gene *qepA*

Lo screening dei 450 campioni di *Enterobacteriaceae* (70% *E. coli*, 16% *K. pneumoniae*, 14% altre) in cui è stata esaminata la presenza del gene *qepA* ha avuto esito negativo. È stato ritenuto inutile proseguire con il monitoraggio in quanto la frequenza riportata in letteratura per questo gene è pari allo 0.3%, significando che si sarebbe dovuto trovare almeno un campione positivo se questo meccanismo di resistenza fosse presente nella nostra regione.

3.1.4 Antibiogramma ai chinoloni degli isolati *qnr*-positivi

Degli isolati positivi è stato determinato l'antibiogramma all'acido nalidissico (NA) e ai 4 chinoloni più largamente usati in terapia antibiotica: ciprofloxacina (CPX), ofloxacina (OFX), levofloxacina (LVF) e moxifloxacina (MXF) (vedi Fig. 3.3).

I risultati ottenuti sono stati riportati nella tabella sottostante, dove S indica sensibile, R resistente ed I intermedio:

Tab. 3.1 – Antibiogramma ai chinoloni dei campioni positivi per *qnr*. I campioni sono stati suddivisi in tre intervalli: S (sensibile), R (resistente) ed I (intermedio).

A	NA	CPX	OFX	LVF	MXF
S	18%	63%	28%	82%	85%
R	78%	8%	13%	11%	8%
I	4%	29%	59%	7%	7%

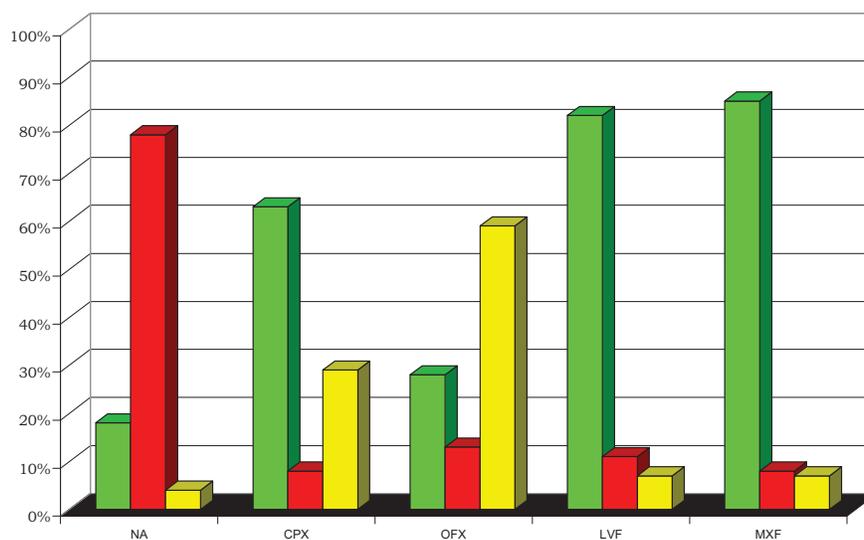


Fig. 3.3 - Antibiogramma ai chinoloni degli isolati *qnr*-positivi. Per ogni antibiotico analizzato, il grafico riporta in verde la percentuale degli isolati sensibili, in rosso i resistenti, i giallo gli intermedi.

Come si può notare, se fosse stato preso in considerazione unicamente l'antibiogramma, molti di questi ceppi sarebbero stati definiti trattabili con chinoloni, con il risultato che la prescrizione di questa famiglia di farmaci avrebbe selezionato ceppi resistenti. Il fatto che la resistenza non sia ancora palese, dipende dal fatto che i geni *qnr* concorrono molto limitatamente all'aumento della MIC agli antibiotici, molte volte è necessario che subentrino meccanismi genetici,

come mutazioni nei target, affinché la resistenza si palesi.

3.1.5 Antibiogramma ai chinoloni degli isolati *aac(6')-Ib-cr*-positivi

Analogamente a quanto descritto nel paragrafo precedente, è stato calcolato l'antibiogramma ai principali chinoloni, degli isolati che esprimevano *aac(6')-Ib-cr* ed i risultati sono stati riassunti in Tab. 3.2.

Tab. 3.2 - Antibiogramma ai chinoloni dei campioni positivi per *aac(6')-Ib-cr*. I campioni sono stati suddivisi in tre intervalli: S (sensibile), R (resistente) ed I (intermedio).

A	NA	CPX	OFX	LVF	MXF
S	6%	6%	6%	6%	6%
R	0%	94%	94%	94%	94%
I	94%	0%	0%	0%	0%

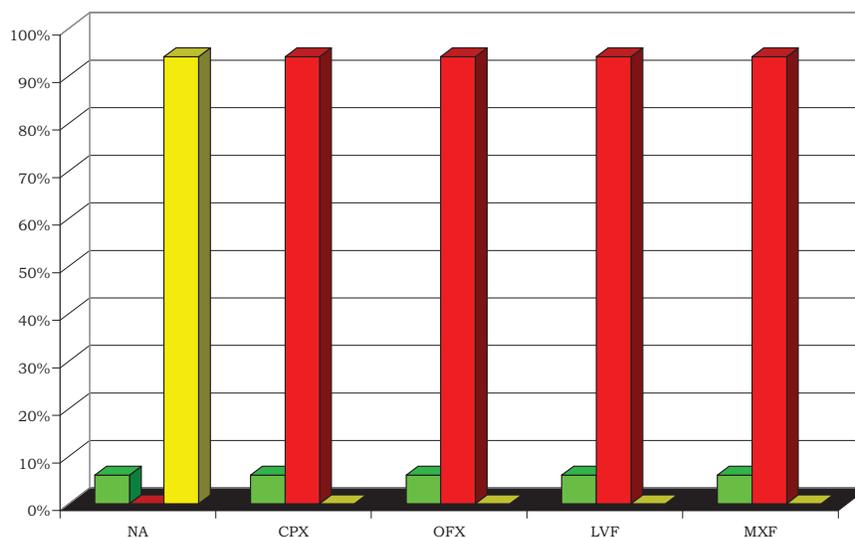


Fig. 3.4 - Antibiogramma ai chinoloni dei campioni positivi per *aac(6')-Ib-cr*. Per ogni antibiotico analizzato, il grafico riporta in verde la percentuale degli isolati sensibili, in rosso i resistenti, i giallo gli intermedi.

In questo caso la presenza del gene ricercato correla con la presenza di una MIC elevata ai fluorochinoloni, l'effetto sull'aumento della resistenza all'acido nalidissico risulta essere minore. È noto che *aac(6')-Ib-cr*, come gli altri geni conferenti resistenza ai chinoloni mediata da plasmide, dia luogo, solo, ad un minimo aumento del valore della MIC ai farmaci. Il risultato dall'antibiogramma potrebbe essere dovuto all'induzione di mutazioni a livello delle Topoisomerasi.

Infatti, la presenza di un'alta percentuale di isolati clinici divenuti quasi insensibili all'acido nalidissico, farmaco non sensibile all'acetilazione da parte di *aac(6')-Ib-cr*, suggerisce che questi ceppi presentino anche meccanismi cromosomici di resistenza (vedi 1.9).

3.2 Verifica della presenza di ESBL

3.2.1 Verifica della presenza di ESBL negli isolati *qnr*-positivi

In tutti i campioni che contenevano un gene *qnr* è stata verificata la concomitante presenza di geni in grado di conferire resistenza ai farmaci beta-lattamici. Nello specifico, sono state ricercate le seguenti sequenze: *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-8}* e *bla_{CTX-M-9}*. 30 campioni su 40 (75%) esprimono almeno una beta lattamasi, con un'incidenza notevolmente maggiore di *shv* e *tem*, alcuni isolati le esprimono in associazione, fino ad un massimo di tre diverse.

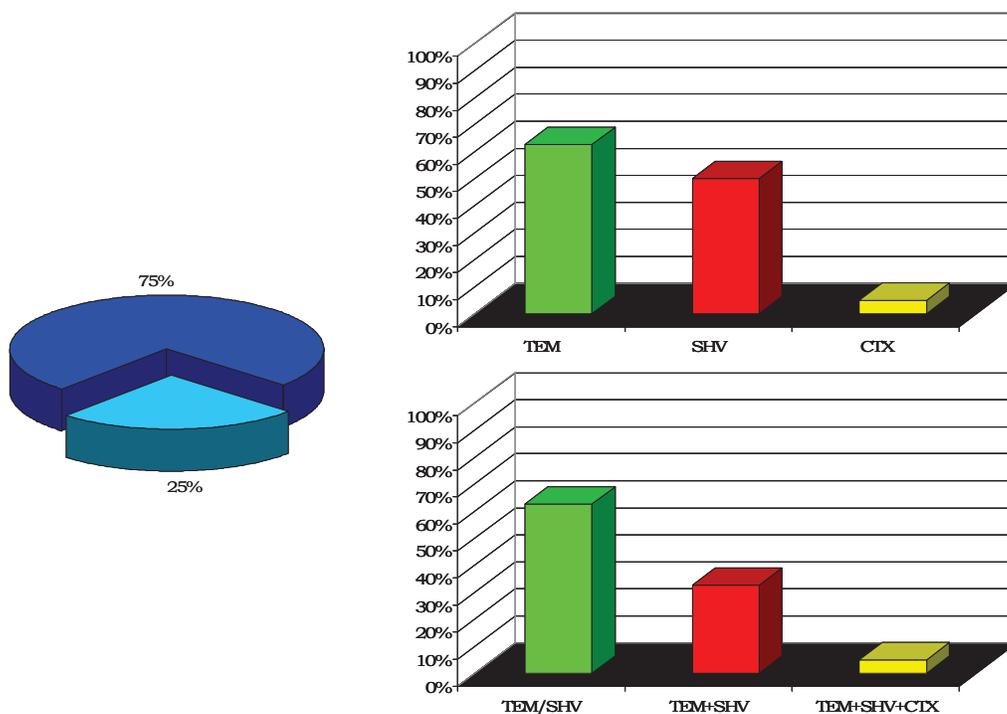


Fig. 3.5 - Presenza di ESBL negli isolati *qnr*-positivi. Il grafico a torta riporta in blu la percentuale di campioni positivi per ESBL, sul totale di isolati *qnr*-positivi. Il grafico in alto a destra rappresenta la distribuzione percentuale delle tre sequenze codificanti beta-lattamasi ricercate, *tem*, *shv* e *ctx*. Il grafico in basso a destra rappresenta la presenza di un'unica beta lattamasi (*tem* o *shv*) in verde, di due contemporaneamente (*tem* ed *shv*) in rosso o di tutte e tre (*tem*, *shv* e *ctx*) in giallo, espressa in percentuale.

In particolare il 62.5% dei campioni è positivo per un gene ESBL, il 32.5% per 2 geni ed il restante 5% per tre diverse sequenze. *Tem* è presente nel 62.5% dei campioni, *shv* nel 50%, *ctx* nel 5%. La produzione di ESBL è stata confermata da test fenotipici (72%). L'antibiogramma su piastra si è confermato, quindi, meno sensibile dei test molecolari (72% vs 75%) Infatti, uno dei limiti dell'antibiogramma, è la possibilità che alcuni fenotipi di resistenza vengano mascherati dalla contemporanea espressione di più classi di enzimi, con azione su diverse categorie di antibiotici, portando a definire che un ceppo sia trattabile con un determinato farmaco, nei confronti del quale è in realtà resistente.

3.2.2 Verifica della presenza di ESBL negli isolati *aac(6')*-*Ib-cr*-positivi

In modo analogo è stata analizzata la copresenza di *aac(6')*-*Ib-cr* ed ESBL, mediata da *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-8}* e *bla_{CTX-M9}*. 15 campioni su 16 (94%) esprimono almeno una beta lattamasi. In questo caso è presente quasi esclusivamente la sequenza *bla_{CTX-M-1}*, mentre manca completamente *shv*. Nello specifico, il 44% degli isolati è positivo per 2 geni, il 50% solo per *ctx-M1*. La prevalenza generale registrata è stata del 44% per *tem* e del 94% per *ctx-M1*. Anche in questo caso, la presenza di ESBL è stata confermata mediante test fenotipici.

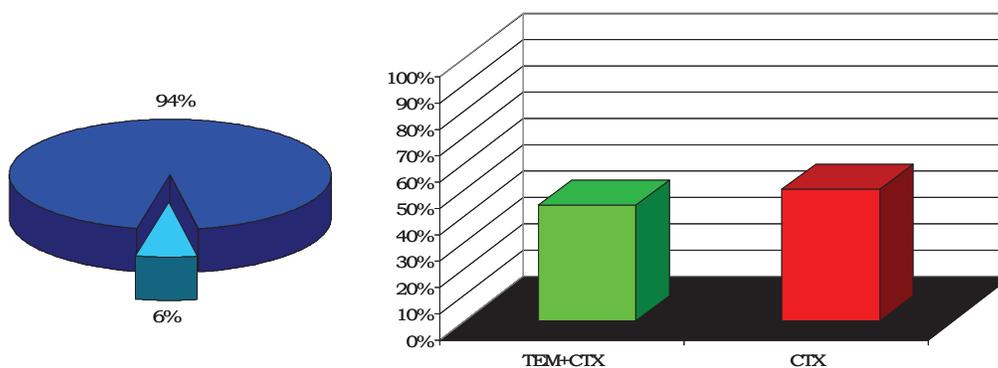


Fig. 3.6 - Presenza di ESBL negli isolati *aac(6')*-*Ib-cr*-positivi. Il grafico a torta riporta in blu la percentuale di campioni positivi per ESBL, sul totale di isolati *aac(6')*-*Ib-cr*-positivi. A destra la distribuzione dei geni *tem* e *ctx*, espressa in percentuale; in verde la presenza contemporanea di *tem* e *ctx*, in rosso quella di *ctx*, nessun campione presenta solo *tem*.

3.3 Tipizzazione filogenetica clonale degli isolati *qnr*-positivi

Il profilo genetico dei 40 isolati batterici risultati positivi per la presenza di geni *qnr*, è stato ottenuto analizzando per amplificazione le sequenze consenso ripetitive ed intergeniche caratteristiche delle *Enterobacteriaceae* (ERIC). Le sequenze ERIC sono una classe di elementi di DNA, ripetute ed altamente conservate, che regolano l'espressione genica trovandosi all'interno di regioni promotoriali, di terminazione della trascrizione e di siti di legame per le proteine regolatrici. Sono presenti soprattutto negli enterobatteri, lunghe 126 paia di basi, includono una sequenza invertita ripetuta che potrebbe potenzialmente formare uno *stem-loop* quando trascritta in RNA. Le sequenze ERIC sono altamente conservate a livello della sequenza nucleotidica, ma la loro localizzazione cromosomiale differisce tra le specie. Ecco che allora il metodo ERIC-PCR permette una chiara distinzione tra specie e ceppi batterici, contenenti questi elementi ripetitivi.

I risultati ottenuti hanno permesso di raggruppare i 40 isolati in base al loro profilo genotipico ed in base alla specie batterica di appartenenza. Nonostante la tecnica di genotipizzazione basata sugli ERIC faccia riferimento a sequenze ripetute presenti sul cromosoma batterico, è stato riportato che anche i ceppi contenenti geni *qnr* diversi possano essere catalogati con questo metodo.

L'analisi genotipica ha riguardato:

- a. *K. pneumoniae* positivi per *qnrA*
- b. *K. pneumoniae* positivi per *qnrB*
- c. *E. coli* positivi per *qnrB*
- d. *E. coli* positivi per *qnrS*

I risultati sono raggruppati in Tab. 3.3 per semplicità.

Tab. 3.3 – Tipizzazione. Catalogazione in sottogruppi filogenetici mediante ERIC-PCR dei campioni *qnr*-positivi.

Gene	Specie	Amplificati	Campioni	Sottogruppo
<i>qnrA</i>	<i>K. pneumoniae</i>	682-900 bp 900-1114 bp	1	A-KLPN-I
<i>qnrB</i>	<i>K. pneumoniae</i>	242- 320 bp 900-1114 bp	17	B-KLPN-I
		242-320 bp 489-501 bp 900-1114 bp	8	B-KLPN-II
		242-320 bp 692- 900 bp 900-1114 bp	1	B-KLPN-III
		692- 900 bp	3	B-KLPN-IV
		900-1114 bp	2	B-KLPN-V
<i>qnrB</i>	<i>E. coli</i>	124-147 bp 242-320 bp	2	B-ESCO-I
		242-320 bp	3	B-ESCO-II
<i>qnrS</i>	<i>E. coli</i>	147-190 bp 320-404 bp	1	S-ESCO-I
		190-242 bp	1	S-ESCO-II
		242-320 bp 489-501 bp 900-1114 bp	1	S-ESCO-III

È possibile notare come non vi sia correlazione tra gli isolati *qnrS*-positivi e come siano individuabili dei gruppi preferenziali di appartenenza per i campioni *qnrB*-positivi di *K. pneumoniae*.

3.4 Presenza di mutazioni cromosomiche

3.4.1 Presenza di mutazioni nei bersagli dei chinoloni in isolati *qnr*-positivi

Molto spesso un elevato grado di resistenza ai chinoloni non dipende solo dall'azione di prodotti genici veicolati da plasmidi, come le proteine Qnr, ma dalla contemporanea presenza o insorgenza di mutazioni a carico dei principali bersagli dei farmaci, le subunità GyrA e ParC. È noto, anche, che si accumulino mutazioni preferenzialmente all'interno di regioni precise, denominate QRDR (*Quinolone Resistant Determining Region*), che si trovano, per GyrA, tra l'amminoacido 67 e

106, mentre per ParC, tra gli amminoacidi 62 e 101 e che venga colpita prima la Girasi rispetto alla TopoIV.

Lo studio ha rivelato che il 73% dei campioni positivi per *qnr* presenta anche una mutazione a livello della Girasi (Asp87Gly), il 2% ha due mutazioni (Ser83Leu e Asp87Gly). Quest'ultimo 2% è interessato anche da una mutazione a livello di ParC (Ser80Ile). La presenza e il numero di modificazioni all'interno della sequenza dei bersagli correla con un elevato grado di resistenza a molti membri della famiglia dei chinoloni per alterazione dei siti di legame.

Tab. 3.4 - Mutazioni cromosomiche. Presenza e distribuzione delle mutazioni in GyrA e ParC negli isolati *qnr*-positivi, divisi per specie batterica di appartenenza. La sigla M_{gyrA} indica la presenza e il tipo di mutazioni presenti in *gyrA*, M_{parC} quelle rinvenute in *parC*.

N	Specie	CPX	M_{gyrA}	Tipo	M_{parC}	Tipo	%tot	%specie
7	<i>E. coli</i>	S	No		No		17.5	87.5
3	<i>K. pneumoniae</i>	S	No		No		7.5	9.3
28	<i>K. pneumoniae</i>	S-I	Si (1)	D87G	No		70	87.5
1	<i>K. pneumoniae</i>	R	Si (1)	D87G	Si (1)	S80I	2.5	3.2
1	<i>E. coli</i>	R	Si (2)	S83L; D87G	Si (1)	S80I	2.5	12.5

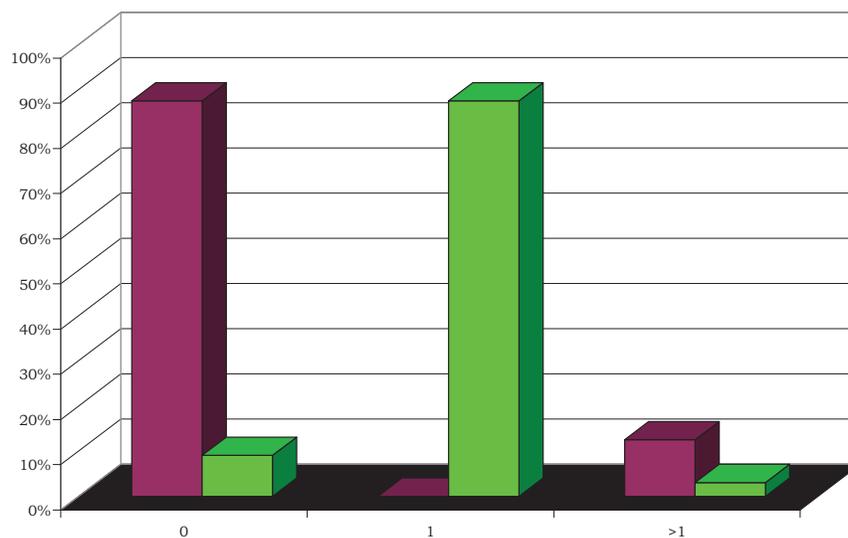


Fig. 3.7 - Presenza di mutazioni nei bersagli dei chinoloni in isolati *qnr*-positivi. Distribuzione all'interno delle due specie, *E. coli* in viola, *K. pneumoniae* in verde, delle mutazioni nei bersagli dei chinoloni, suddivisa in tre intervalli, 0= nessuna mutazione, 1= una mutazione in uno dei target, >1= più di una mutazione.

3.4.2 Presenza di mutazioni nei bersagli dei chinoloni in isolati *aac(6')-Ib-cr*-positivi

La stessa analisi ha riguardato i campioni positivi per il gene *aac(6')-Ib-cr*, riscontrando il 94% (15 su 16) dei campioni positivi per mutazioni in entrambi i bersagli. Sono sempre presenti due mutazioni all'interno della sequenza di GyrA (Ser83Leu e Asp87Asn) e una mutazione all'interno di ParC (Glu84Val). Questo fenomeno è probabilmente legato al fatto che *aac(6')-Ib-cr* agisce parallelamente aumentando la frequenza di insorgenza di mutazioni puntiformi anche in presenza di basse dosi di antibiotico (MPC), come la ciprofloxacina. L'unico campione esente da mutazioni è anche il solo che, nonostante sia positivo per la presenza di *aac(6')-Ib-cr*, mantiene un bassissimo profilo di resistenza ai chinoloni.

3.5 Profilo elettroforetico

3.5.1 Profilo elettroforetico dei plasmidi codificanti i geni *qnr*

Utilizzando una metodica basata sulla separazione in fase acquosa-idrofobica e successiva precipitazione in etanolo assoluto, sono stati estratti tutti i plasmidi da ciascun isolato positivo per *qnr*. Il lisato così ottenuto, è stato separato in gel di agarosio a maglie larghe e per ciascun campione è stato valutato il profilo di corsa elettroforetica. I plasmidi estratti superavano tutti le 20 Kb, attestandosi, circa intorno alle 40 Kb. Gli stessi campioni sono stati analizzati più volte, ripartendo, per l'isolamento del plasmide, da stock di batteri congelati, isolati come colture pure su terreno ricco. In questo modo è stato provato che i risultati ottenuti non dipendessero dalla metodica utilizzata per l'estrazione del plasmide, che poteva portare alla formazione di isoforme parzialmente degradate o frammentate di DNA. Il fatto che neanche la matrice polimerica utilizzata per la separazione influenzasse il profilo di corsa è stato verificato utilizzando tipi di agarosio diversi, a diverse concentrazioni. Curiosamente, come si vede in Fig. 3.8, tutti i lisati ottenuti da isolati *qnrB19*-positivi, tranne quello del # 132, presentano lo stesso pattern di corsa. Sono sempre presenti le stesse bande ad altissimo peso molecolare, mentre non viene mai rivelata la presenza di plasmidi di grandezza minore alle 20 Kb. Sembra, quindi, che i campioni analizzati non contengano altri costrutti, oltre a quelli oggetti dello studio. Come detto, il campione # 132 si differenzia per profilo elettroforetico da tutti gli altri: è caratterizzato, comunque,

dalla presenza di numerose bande ad altissimo peso molecolare, che corrono, però, ad altezze diverse da quelle di qualsiasi altro isolato considerato, anche positivo per altre sequenze *qnr*. A differenza degli altri B19-positivi, # 132 non presenta resistenza all'acido nalidissico, si attesta su valori intermedi e non presenta mutazioni a livello dei bersagli. Le osservazioni svolte ci hanno portato ad approfondire la caratterizzazione di questo campione, analizzando mediante sequenziamento un'ampia regione delimitante la regione codificante il *qnr*.

I campioni positivi per *qnrS* mostrano pattern di corsa elettroforetica diversi, sia tra loro, sia rispetto agli altri isolati positivi. Analogamente alla tipizzazione filogenetica, anche il campione positivo per *qnrA* è risultato diverso da tutti gli altri.

Infine, per verificare che i plasmidi estratti contenessero il gene *qnr* è stata svolta un'amplificazione mediante PCR del DNA prelevato da ogni banda visibile di ciascun campione. È stato possibile amplificare il gene in ogni esperimento, suggerendo che ciascuna banda corrispondesse ad una diversa forma di superavvolgimento dei plasmidi.

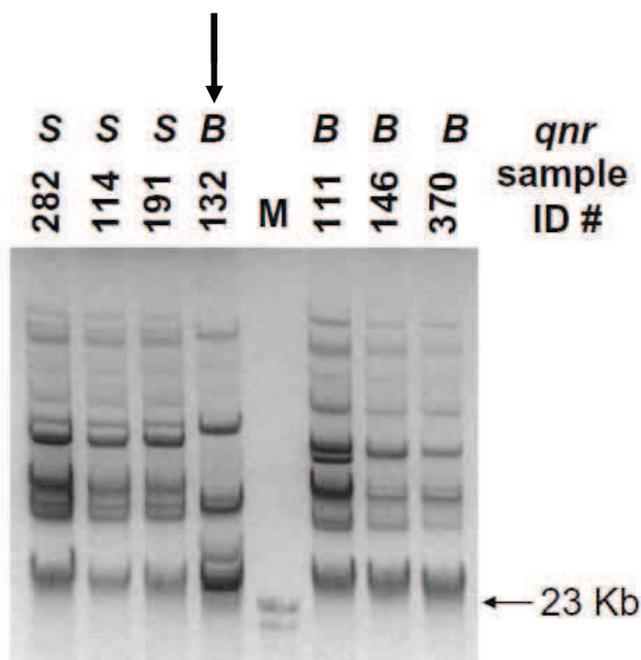


Fig. 3.8 - Profilo elettroforetico dei plasmidi codificanti i geni *qnr*. I plasmidi degli isolati positivi per *qnr* sono stati estratti secondo il protocollo di Kieser e fatti correre all'interno di una matrice di agarosio Megabase (0.7%). Il profilo di separazione elettroforetica è stato rivelato mediante colorazione in Etidio bromuro. Nel gel sono visibili tre isolati positivi per *qnrS* (# 282, 114 e 191), tre isolati positivi per *qnrB19* (# 111, 146 e 370) e il campione # 132, positivo per *qnrB19*, ma con caratteristiche di corsa diverse rispetto ai precedenti. Anche l'antibiogramma di questo isolato presenta MIC all'acido nalidissico e agli altri chinoloni più basse rispetto agli altri campioni *qnr*-positivi.

3.5.2 Profilo elettroforetico dei plasmidi codificanti i geni *aac(6')*-*Ib-cr*

Analogamente, sono stati estratti e separati in agarosio anche i plasmidi contenuti negli isolati positivi per *aac(6')*-*Ib-cr*. La Fig. 3.9 mostra come in questo caso non si sia ottenuto un profilo univoco di corsa elettroforetica, ciascun campione ha in comune con gli altri solo due delle bande più alte nel gel, o presenta soltanto una di queste due.

L'amplificazione del DNA prelevato da ciascuna banda, ha rivelato che i plasmidi codificanti *aac(6')*-*Ib-cr* corrono esclusivamente in corrispondenza di due. Con molta probabilità le altre bande visibili sono dovute a plasmidi diversi all'interno della stessa specie isolata e non a diverse forme topologiche dello stesso, come accadeva nel caso di campioni contenenti *qnr*.

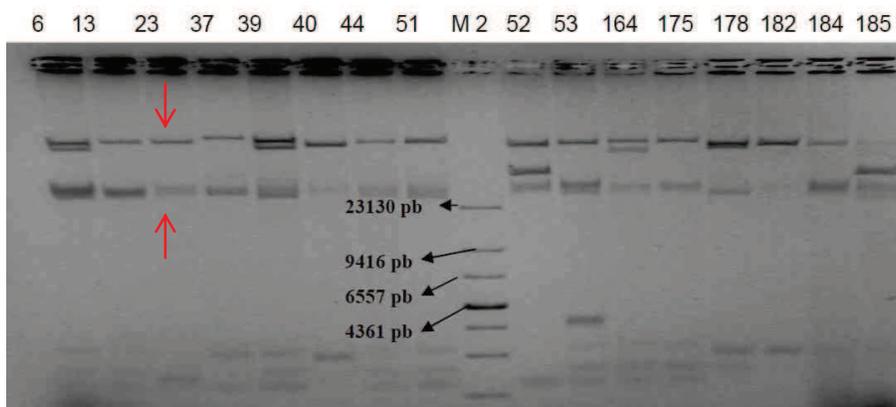


Fig. 3.9 - Profilo elettroforetico dei plasmidi codificanti il gene *aac(6')*-*Ib-cr*. I plasmidi dei campioni positivi per *aac(6')*-*Ib-cr* sono stati purificati e separati all'interno di una matrice di agarosio Megabase (0.7%). Il profilo elettroforetico non è risultato uguale per tutti i campioni esaminati. La PCR di amplificazione di *aac(6')*-*Ib-cr*, a partire dalle bande estratte da gel, ha rivelato che le forme topologiche corrispondenti al plasmide di interesse sono le due indicate dalle frecce rosse. Almeno una delle due bande è presente in tutti i campioni analizzati. M2 è il marker di peso molecolare utilizzato (vedi 2.2.8).

3.6 Trasferibilità della resistenza

È stato affermato che i determinanti per la resistenza, sia mediata da *qnr*, sia mediata da *aac(6')-Ib-cr*, si trovano all'interno di tratti extracromosomici, che possono passare da una cellula all'altra mediante processi di coniugazione. Volendo verificare se, anche nel nostro caso, le sequenze geniche fossero veicolate da plasmidi, piuttosto che da geni integrati nel cromosoma batterico, si è proceduto con esperimenti sia di trasformazione, che di coniugazione batterica. Queste due tecniche permettono di dimostrare che la resistenza non sia solo trasferibile intra ed inter-specie, ma che i geni responsabili si trovino su elementi mobili extracromosomici.

Mediante coniugazione batterica è stato dimostrato che fosse possibile il trasferimento di materiale, tuttavia, questa tecnica non assicura che da una cellula donatrice ad una accettrice non passino, in realtà, sequenze genomiche mobilizzate come transposoni o integroni, mediante *rolling circle*. Per coniugazione batterica, infatti, si intende qualsiasi passaggio di materiale genetico da una cellula all'altra, per semplice contatto fisico. È il meccanismo utilizzato più spesso dai batteri per dar luogo a ricombinazione genetica. Per questa ragione, è stato verificato che si trattasse di uno scambio di plasmidi anche mediante trasformazione batterica.

Il passaggio della resistenza da lisato cellulare a cellule batteriche competenti ha dimostrato che si trattasse effettivamente di elementi non cromosomici. Durante il procedimento di purificazione del DNA plasmidico, il cromosoma batterico è stato frammentato e precipitato, evitando che rimanessero tratti genomici in soluzione. Qualora brevi tratti non fossero purificati adeguatamente, la loro condizione di frammenti o molecole a doppio filamento lineari, li avrebbe resi substrato di nucleasi, anche nel momento in cui penetrassero la cellula batterica verrebbero degradati perché riconosciuti come DNA esogeno e quindi pericoloso. Poter trasferire solo il gene implicato nella resistenza, ha permesso, inoltre, di valutare il peso nella determinazione della MIC dei soli determinanti plasmidici, in assenza di meccanismi cooperativi cromosomici, come mutazioni nei bersagli.

3.6.1 Plasmidi *qnr*

La trasformazione batterica è stata svolta per elettroporazione di cellule *E. coli* TOP10 competenti. Il DNA utilizzato proveniva: (a) dall'estrazione di DNA da ciascuna banda ottenuta per separazione elettroforetica del lisato cellulare di isolati *qnr*-positivi scelti in modo arbitrario e (b) dalla purificazione in fenolo-cloroformio e precipitazione in etanolo assoluto dei plasmidi contenuti dagli stessi campioni. I batteri sono quindi stati selezionati su terreno solido. La presenza del plasmide nelle cellule positive è stata verificata mediante amplificazione del gene *qnr* corrispondente al campione di partenza. Dei ceppi trasformati è stata determinato l'antibiogramma ai 5 chinoloni di più largo uso (acido nalidissico, ciprofloxacina, ofloxacina, levofloxacina e moxifloxacina), poi confrontato con quello del ceppo accettore *wild type*. La reazione di coniugazione batterica è stata attuata scegliendo un isolato positivo per *qnrS* ed un secondo per *qnrB* e accoppiandoli con un ceppo accettore, *E. coli* J53 resistente al sodio azide e alla kanamicina. La crescita su terreno solido selettivo per tre diversi antimicrobici (sodio azide, kanamicina e acido nalidissico) è stata la prova del passaggio coniugativo del plasmide. Anche in questo caso la presenza dei geni *qnr* è stata verificata mediante PCR con primers specifici. Dei due ceppi J53-*qnr* è stato determinato l'antibiogramma ai più importanti chinoloni e confrontato con quello del ceppo *wild type* (vedi Tab. 3.5).

La comparazione tra i diversi antibiogrammi ha riguardato l'analisi:

1. dei trasformanti o coniuganti rispetto al ceppo ricevente *wild type*:

Le MIC aumentano da 25 a 115 volte, a seconda dell'antibiotico considerato. La maggiore fluttuazione si registra con l'acido nalidissico (16-128 volte).

2. dei trasformanti o coniuganti rispetto all'isolato donatore:

Le MIC rispetto a ceppi parentali altamente resistenti diminuiscono di almeno 40 volte. Se il ceppo di partenza era stato identificato come intermedio, la riduzione della MIC raggiunge al massimo le tre volte.

La modificazione del livello di resistenza è risultata meno apprezzabile nei ceppi coniugati, probabilmente in riferimento al diverso genotipo che caratterizza i ceppi accettori TOP10 e J53. Le modificazioni genetiche a carico del ceppo J53 lo rendono più debole e a riproduzione più lenta, rispetto ai ceppi di *E. coli* commerciali più noti, come TOP10. Inoltre, la selezione in terreno triplo selettivo ha notevoli effetti inibitori sulla replicazione cellulare.

Né mediante trasformazione, né mediante coniugazione i geni *qnr* sono stati

trasferiti insieme ai geni *bla* per le beta-lattamasi, suggerendo che si trovino su plasmidi diversi. In nessun caso, inoltre, sono state identificate mutazioni nella sequenza di *gyrA* e *parC* dei ceppi accettori, trasformati o coniugati.

Tab. 3.5 - Antibiogramma. Valori di MIC, all'acido nalidissico (NA), alla ciprofloxacina (CPX), all'ofloxacina (OFX), alla levofloxacina (LVF) e alla moxifloxacina (MXF), espressi in mg/L, dei campioni trasformati (T) e coniugati (C), rispetto ai ceppi *wild type*.

Campione/MIC (mg/L)	NA	CPX	OFX	LVF	MXF
70	>256	>32	>32	>32	>32
70T	48	0.016	n.d.	n.d.	n.d.
71	>256	1.5	8	n.d.	2
71T	64	0.023	n.d.	n.d.	n.d.
111	>256	1.5	4	n.d.	2
111T	128	0.023	n.d.	n.d.	n.d.
132	16	0.32	1.5	0.38	0.5
132T	16	0.16	n.d.	0.23	n.d.
132C	16	0.32	n.d.	0.32	n.d.
146	>256	1	4	1.5	2
146T	128	0.023	n.d.	n.d.	n.d.
191	64	0.50	1.5	0.75	1.5
191T	32	0.16	n.d.	0.32	n.d.
191C	32	0.23	n.d.	0.32	n.d.
282	16	0.5	1.5	0.75	0.5
282T	32	0.23	n.d.	0.32	n.d.
TOP10	1	0.002	0.016	0.004	0.006
J53 Az ^r Kan ^r	3	0.016	0.047	0.047	0.023

3.6.2 Plasmidi *aac(6')-Ib-cr*

Utilizzando le stesse tecniche è stata provato che la trasferibilità della resistenza per espressione di *aac(6')-Ib-cr* dipende dal passaggio di un plasmide da una cellula batterica all'altra. Analogamente a quanto appena descritto, sono stati creati ceppi trasformati e coniugati, dei quali è stato misurato l'antibiogramma, riportato in Tab. 3.6. La comparazione con entrambi i ceppi accettori *wild type* ha evidenziato che l'azione del gene, si espleta con una diminuzione dell'efficacia della ciprofloxacina e con un aumento della MIC di circa 4 volte. Il minimo aumento dipende dal fatto che il gene *aac(6')-Ib-cr*, non agisce tanto determinando la resistenza al farmaco, quanto inducendo la formazione di mutazioni nei bersagli d'azione. Rispetto agli isolati parentali, infatti, le variazioni si apprezzano per tutti i chinoloni, con un ampio range, da 4 a 1000 (fluorochinoloni di nuova sintesi) volte. L'effetto è dovuto all'assenza, e non trasferibilità, di mutazioni dei target nei ceppi accettori.

A differenza dei plasmidi contenenti i geni *qnr*, in questo caso vengono trasferite anche la beta-lattamasi di tipo *ctx-M1*, suggerendo, che in questo caso, i due determinanti si trovino sullo stesso plasmide.

Tab. 3.6 – Antibiogramma. valori di MIC, all'acido nalidissico (NA), alla ciprofloxacina (CPX), all'ofloxacina (OFX), alla levofloxacina (LVF) e alla moxifloxacina (MXF), espressi in mg/L, dei campioni trasformati (T) e coniugati (C), rispetto ai ceppi *wild type*.

Campione/MIC (mg/L)	NA	CPX	OFX	LVF	MXF
16	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
16T	1	0.008	0.016	0.004	0.006
13	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
13C	4	0.064	0.047	0.047	0.023
13T	1	0.008	0.016	0.004	0.006
23	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
23C	3	0.047	0.047	0.047	0.032
23T	1	0.004	0.016	0.004	0.006
37	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
37T	1	0.006	0.016	0.004	0.006
39	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
39T	1	0.006	0.016	0.004	0.006
40	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16

40T	1	0.006	0.016	0.004	0.006
44	1,5	0.047	0.032	0.008	0.023
44C	3	0.047	0.047	0.047	0.023
44T	1	0.006	0.016	0.004	0.006
51	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
51T	1	0.006	0.016	0.004	0.006
52	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
52T	1	0.004	0.016	0.004	0.006
53	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
53T	1	0.004	0.016	0.004	0.006
164	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
164T	1	0.004	0.016	0.004	0.006
175	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
175T	1	0.006	0.016	0.004	0.006
178	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
178T	1	0.006	0.016	0.004	0.006
182	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
182T	1	0.006	0.016	0.004	0.006
184	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
184T	1	0.006	0.016	0.004	0.006
185	≥ 16	≥4	≥16	≥16	≥16
185T	1	0.006	0.016	0.004	0.006
TOP10	1	0.002	0.016	0.004	0.006
J53 Az ^r Kan ^r	3	0.016	0.047	0.047	0.023

3.7 Determinazione dell'intorno genetico del gene *qnrB19*

In Europa, nel corso degli anni, la presenza del gene *qnrB19* in isolati di *Enterobacteriaceae* resistenti ai chinoloni è stato associato a plasmidi diversi, per mobilizzazione della sequenza codificante integrata all'interno di un elemento transposonico, depositato come Tn2012 (GeneBank accession no. EU523120), delimitato dalla sequenza segnale di inserzione ISEcp1. 35 dei 36 isolati risultati positivi per *qnrB19* al nostro studio, presentano la stessa regione transposonica, con mobilizzazione mediata da ISEcp1.

Solo il campione # 132, come descritto precedentemente, caratterizzato da un livello intermedio di resistenza all'acido nalidissico e un diverso profilo elettroforetico rispetto agli altri isolati, è risultato negativo per l'amplificazione

della sequenza di mobilizzazione di Tn2012. Volendo determinare l'intorno genetico del gene *qnrB19* in questo campione, il DNA plasmidico è stato isolato e sequenziato.

L'analisi di una regione di circa 1.3 Kb, contenente il gene, ha dimostrato che la sequenza si trova, in questo caso, all'interno di un una regione intronica mobile di tipo ISCR1 (GeneBank accession no. GU074393). Come si può apprezzare dalla Fig. 3.10, l'integrone presenta una iniziale regione conservata tipica (5'CS, *Conserved Sequence*), contiene una regione promotoriale (Psp Operon) a monte ed il sito per la ricombinasi a valle (Int1) del gene *qnr*. La presenza di numerose sequenze troncate fiancheggiate dai siti di ricombinazione testimonia il ripetersi di svariati cicli di mobilizzazione ed integrazione.

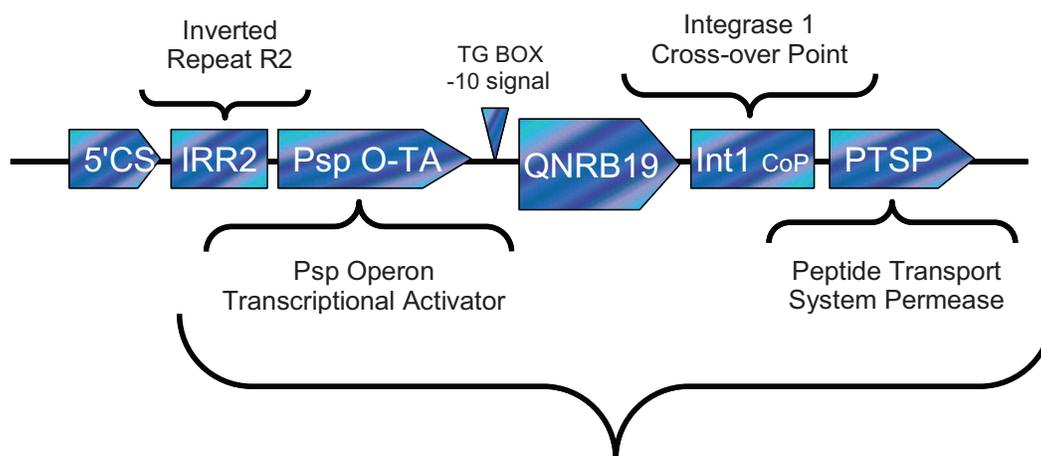


Fig. 3.10 - Intorno genetico del gene *qnrB19* dell'isolato # 132. Il sequenziamento del plasmide estratto dal campione # 132, ha rivelato che la sequenza del gene *qnrB19* si trova all'interno di un elemento mobile integronico di tipo ISCR1, In1:ISCR1:*QnrB19*. L'integrone è aperto da una sequenza conservata (5'CS), seguita da una regione ripetuta invertita (IRR2). Subito a monte del tratto codificante il *qnrB19* è presente il promotore troncato dell'operone Psp. Resta comunque individuabile la sequenza segnale -10 TG BOX. A valle del gene *qnrB19* è presente l'Integrasi Int1, con il suo putativo sito di ricombinazione, seguito dal gene *sapA* distrutto da numerosi eventi di ricombinazione.

3.8 Simocliclinone (SD8): analisi dell'efficacia e del meccanismo d'azione

Nell'ambito dell'analisi dello sviluppo ed espansione della resistenza ad una od a più classi di antibiotici, è stata concepita una parte dello studio mirata all'individuazione e all'eventuale caratterizzazione di nuovi farmaci antimicrobici, possibilmente ad ampio spettro, in grado di intervenire su patogeni multiresistenti. Recentemente si assiste ad un forte aumento delle infezioni da microbi, la cui crescita non viene inibita dalla somministrazione degli antibiotici di largo uso, come i chinoloni ed i beta-lattamici. Da qui nasce la necessità di individuare nuovi farmaci, che agiscano su bersagli non ancora sfruttati o che dimostrino un nuovo sito d'azione su target già noti.

Il nostro lavoro ha preso in considerazione questa seconda modalità, cercando una molecola che agisse su un bersaglio già noto per altre classi di farmaci, ma che mostrasse un nuovo meccanismo d'azione. Vista l'importanza a livello di ciclo cellulare e la loro conservazione all'interno delle specie batteriche, nonché lo studio svolto sui meccanismi di resistenza ai chinoloni, la famiglia delle topoisomerasi, in particolare DNA-Girasi e TopoIV, sono sembrati i bersagli ideali per un nuovo antibiotico ad ampio spettro. Sul mercato sono reperibili due diverse classi in antimicrobici antitopoisomerasici: i chinoloni, di cui è stato largamente parlato in precedenza, ed i derivati cumarinici, che agiscono sull'attività ATPasica della DNA-Girasi, ma che dimostrando un basso indice terapeutico e un'alta probabilità di interazione con altri farmaci (FANS, corticosteroidi e aspirina) sono raramente prescritti. Recentemente sono stati pubblicati alcuni studi sull'attività antitopoisomerasica di una molecola estratta da *Streptomyces antibioticus* Tü 6040, chiamata SD8, che per analogia di struttura viene considerata un inibitore di tipo anguciclinonico della DNA-Girasi. Il nostro studio nasce dalla discrepanza di alcuni dati presentati da gruppi diversi, soprattutto dal fatto che SD8 venga definito attivo solo su ceppi batterici Gram positivi, benché parallelamente sia in grado di legare la DNA-Girasi di *E. coli in vitro*. In particolare, è stato affermato che SD8 sia totalmente inefficace sui ceppi Gram negativi, per la presenza di pompe di efflusso [133].

Ritenendo che il simocliclinone possa essere un'ottimo candidato per lo sviluppo di un nuovo farmaco e ritenendo che verificare l'efficacia di una molecola solo su ceppi di *E. coli* commerciali, derivativi di K-12, come fatto dagli studi precedenti,

possa dare risultati non attendibili o comunque non riferibili all'intera classe batterica (G-), abbiamo ritenuto utile esaminare l'efficacia di SD8 su diverse classi di *Enterobacteriaceae*, partendo da isolati clinici.

3.8.1 Efficacia della somministrazione di SD8

Come detto, gli esperimenti precedentemente condotti per individuare lo spettro d'azione di SD8, avevano utilizzato, come ceppo di riferimento per i batteri G-, *E. coli* commerciali, come MG1655, DH5alpha e altri. È noto che si tratti di ceppi il cui genoma è stato profondamente modificato al fine di renderli adatti a scopi sperimentali, che potrebbero, quindi, comportarsi in modo diverso rispetto ai batteri ambientali appartenenti alla stessa specie. Per questo motivo il nostro studio ha verificato il possibile spettro d'azione di SD8, mediante somministrazione del composto a diversi ceppi batterici:

- a. Un ceppo Gram positivo: *S. aureus*, visto che i dati in letteratura definiscono SD8 attivo contro questa specie.
- b. Due ceppi ambientali Gram negativi: *E. coli* e *K. pneumoniae*, colture ottenute da isolati clinici, identificati mediante Vitek2. Sono stati scelti campioni con antibiogrammi diversi per sensibilità e resistenza ai diversi chinoloni. Nella scelta è stata valutata anche la presenza o meno di geni *qnr*.
- c. Sei ceppi commerciali di *E. coli*: TOP10, DH5alpha, XL-1blue, JM109, JM110 e HB101

L'eventuale inibizione della crescita batterica è stata calcolata ed espressa come MIC₅₀. A causa della scarsa solubilità di SD8 in solventi acquosi, come il mezzo di coltura (LB, Luria Bertani), non è stato possibile calcolare la reale MIC₉₀.

Come si può vedere in Tab. 3.7, gli isolati appartenenti ad *E. coli* si sono dimostrati sensibili all'SD8 in un range compreso tra l'alta (MIC₅₀=0.78 mg/L) e la moderata (MIC₅₀=25-50 mg/L) suscettibilità, solo alcuni sono risultati resistenti al farmaco (MIC₅₀>100 mg/L). Al contrario gli isolati appartenenti a *K. pneumoniae* mostrano una suscettibilità moderata (MIC₅₀=50 mg/L) o sono resistenti all'SD8 (MIC₅₀>100 mg/L). Come riportato in letteratura, i batteri Gram positivi, tra cui *S. aureus*, dimostrano avere una sensibilità intermedia (MIC₅₀=50 mg/L). Tutti i ceppi commerciali derivati da *E. coli* K-12 sono sempre caratterizzati da una forte resistenza al farmaco (MIC₅₀ >100 mg/L). Inoltre, la presenza di geni *qnr*, correla con la presenza di resistenza, facendo ipotizzare un comune sito di attacco al bersaglio.

Vista l'importante azione sulla resistenza ai chinoloni data da mutazioni cromosomiche a livello dei bersagli e considerando che SD8 inibisce la famiglia delle topoisomerasi di tipo II, abbiamo verificato la presenza di meccanismi in grado di alterare l'attività del complesso GyrA-ParC nelle specie batteriche prese in analisi. Innanzitutto abbiamo considerato la MIC₉₀ alla ciprofloxacina (MIC_{CFX}), quindi abbiamo controllato la presenza di mutazioni all'interno delle subunità GyrA e ParC. Questa analisi ha rivelato che tre isolati di *E. coli*, con una MIC_{CFX}=0.5-1 mg/L (i.e. sensibilità all'antibiotico) presentano una mutazione puntiforme Ser83Leu in GyrA, mentre un isolato con MIC_{CFX}> 4 mg/L (i.e. resistenza all'antibiotico) presenta una doppia mutazione in GyrA: Ser83Leu e Asp87Asn ed una mutazione in ParC: Ser80Ile. Per quanto riguarda gli isolati di *K. pneumoniae*, sei campioni con MIC_{CFX} compresa tra 0.25 e 4 mg/L presentano la mutazione Asp87Gly in GyrA.

In generale, prendendo in considerazione entrambe le specie di *Enterobacteriaceae*, solo gli isolati estremamente sensibili alla ciprofloxacina (MIC_{CFX}<0.25 mg/L che non hanno ancora sviluppato alcuna mutazione a livello delle topoisomerasi, subiscono pesantemente l'effetto del simociclinone (vedi Fig. 3.11). In generale, comunque, è stato appurato che *E. coli* appare maggiormente sensibile al trattamento, rispetto a *K. pneumoniae*.

Sommando le informazioni ottenute dall'analisi della MIC₅₀, della MIC_{CFX} e la presenza di mutazioni puntiformi, si può ipotizzare che la presenza del polipeptide codificato dai geni *qnr* porti ad una diminuzione della sensibilità al simociclinone, per probabile competizione a livello del sito di legame sulla subunità DNA-GyrA.

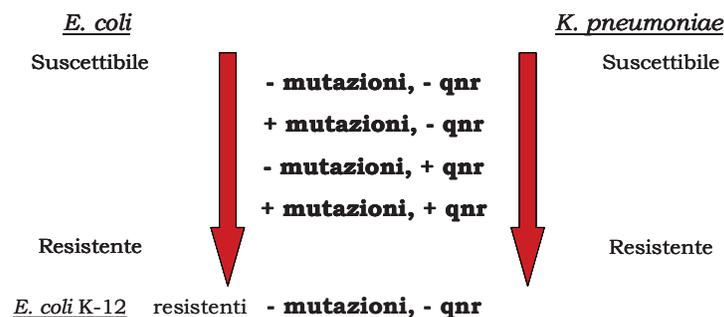


Fig. 3.11- Efficacia della somministrazione di SD8. Il trattamento con SD8 50 mg/L ha evidenziato l'effetto del farmaco sia sugli isolati di *E. coli*, che di *K. pneumoniae*. I campioni possono essere suddivisi in un range che va da suscettibile a resistente, come indicato dalle frecce, a seconda della presenza di geni *qnr* e/o mutazioni a carico dei bersagli. I ceppi commerciali K-12, invece, sono resistenti a tutte le concentrazioni di SD8 valutate, in assenza di geni *qnr* e mutazioni dei target.

Tab. 3.7- Suscettibilità al trattamento con SD8 e resistenza ai chinoloni degli isolati analizzati. Si indica con # il numero identificativo del campione, con KLPN la specie *K. pneumoniae*, con ESCO la specie *E. coli*, con % la sopravvivenza dopo somministrazione di SD8 a 50 mg/L, con M_{gyrA} e M_{parC} la presenza di mutazioni nei bersagli, con *qnr* la presenza dei geni per la resistenza ai chinoloni.

#	Specie	%	MIC ₅₀	CFX	M_{gyrA}	M_{parC}	<i>qnr</i>
5	KLPN	>90	>100	S	D87G	No	B19
97	KLPN	68 ± 3	50	S	No	No	B19
110	KLPN	>90	>100	S	D87G	No	B19
172	KLPN	>90	>100	S	D87G	No	B19
204	KLPN	>90	>100	I	No	No	B19
16	KLPN	>90	>100	I	D87G	No	B19
328	KLPN	>90	>100	R	D87G	No	B19
370	KLPN	>90	>100	R	D87G	No	B19
92	KLPN	77 ± 5	50	S	No	No	No
134	KLPN	51 ± 4	25	S	No	No	No
91	KLPN	>90	>100	R	n.d.	n.d.	No
173	KLPN	83 ± 7	100	R	n.d.	n.d.	No
47	ESCO	44 ± 5	12	S	No	No	B19
50	ESCO	41 ± 2	12	S	No	No	B19
191	ESCO	56 ± 3	25	S	No	No	S1
9	ESCO	>90	>100	R	S83L D87G	S80I	B19
24	ESCO	21 ± 3	3.12	S	No	No	No
41	ESCO	9 ± 2	0.78	S	No	No	No
85	ESCO	>90	>100	S	S83L	No	No
115	ESCO	>90	>100	S	S83L	No	No
95	ESCO	>90	>100	I	S83L	No	No
32	ESCO	>90	>100	I	n.d.	n.d.	No
21	ESCO	>90	>100	R	n.d.	n.d.	No
13	ESCO	>90	>100	R	n.d.	n.d.	No
7	ESCO	>90	>100	R	n.d.	n.d.	No
DH5a	K-12	>90	>100	R	No	No	No
HB101	K-12	>90	>100	S	No	No	No
JM109	K-12	>90	>100	R	No	No	No
JM110	K-12	>90	>100	R	No	No	No
TOP10	K-12	>90	>100	S	No	No	No
XL-1B	K-12	>90	>100	R	No	No	No
	<i>S. aureus</i>	66 ± 18	50	R	n.d.	n.d.	n.d.

3.8.2 Valutazione della diversa permeabilità cellulare al simociclinone

Ipotizzando che, almeno in parte, la minore sensibilità all'SD8 delle specie di *K. pneumoniae*, rispetto a quelle di *E. coli*, sia legata ad una diversa permeabilità di membrana tra le due specie, con conseguente maggiore *uptake* da parte della seconda, abbiamo misurato la quantità di farmaco presente all'interno delle cellule batteriche al termine del trattamento con SD8. Il farmaco estratto è stato analizzato mediante RP-HPLC: i risultati ottenuti, riportati in Tab. 3.8, hanno mostrato come, effettivamente, *E. coli* sia in grado di assumere una quantità di simociclinone 3-6 volte superiore rispetto a *K. pneumoniae*, evidenziando come il primo ceppo sia molto più sensibile al farmaco anche perché molto più permeabile. Al contrario i ceppi commerciali, derivati da K-12 *E. coli*, presentano una permeabilità al farmaco del tutto comparabile a quella di *K. pneumoniae*, suggerendo che in parte la resistenza di queste specie all'SD8 sia dovuta a caratteristiche di membrana che riducono la quantità di farmaco in grado di raggiungere il bersaglio.

Tab. 3.8 – Permeabilità cellulare ad SD8. Si indica con # il numero identificativo dei campioni esaminati, con KLPN la specie *K. pneumoniae*, con ESCO la specie *E. coli*, con SD8_{IN} la quantità in pmoli di farmaco intracellulare.

#	Specie	MIC ₅₀ (50 mg/L)	SD8 _{IN} (pmol)	% <i>uptake</i>
97	KLPN	50	40	1.30
92	KLPN	50	60	1.96
50	ESCO	12	180	5.87
24	ESCO	3.12	260	7.53
TOP10	K-12	>100	80	2.61

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Nel corso degli ultimi anni, notevole attenzione è stata posta sull'aumento esponenziale dei casi di resistenza a numerose classi di antibiotici, con insorgenza di infezioni batteriche multiresistenti, difficilmente trattabili con una normale terapia antibiotica.

I chinoloni sono una famiglia di antimicrobici di sintesi numerosa ed in continua e progressiva evoluzione. È una delle classi di antibiotici più diffusamente utilizzata perché composta da farmaci ad ampio spettro, caratterizzati da una buona cinetica metabolica, nonché da una rapida biodisponibilità sistemica.

D'altra parte, l'efficacia di questi chemioterapici è notevolmente diminuita a causa del rapido sviluppo di meccanismi di resistenza. Alcuni di questi meccanismi, determinati a livello cromosomico, sono noti da tempo. Più recentemente, invece, sono stati descritti fenomeni di diminuita suscettibilità legati alla presenza di geni veicolati da plasmidi, rapidamente propagati tra le diverse specie batteriche. Dato più allarmante è la presenza sullo stesso plasmide di geni che mediano la contemporanea resistenza a più classi di farmaci. In questo lavoro di tesi è stata valutata e caratterizzata la prevalenza in ceppi di *Enterobacteriaceae* dei meccanismi di resistenza mediata da plasmidi (PMQR) all'interno della nostra regione geografica (Nord-Est Italia). I dati raccolti ci hanno permesso di determinare che vi sia una larga diffusione di due determinanti plasmidici: *qnrB*, allele B19, ed *aac(6')-Ib-cr*. Il terzo determinante, *qepA*, non è invece, ancora presente nella nostra regione.

In particolare il gene *qnrB* è stato ritrovato in larga maggioranza in isolati *K. pneumoniae*, nessun altro studio aveva mai riportato una così ampia preferenzialità di specie. Inoltre, l'allele B19, è sempre stato descritto come diffuso soprattutto nei Paesi del Sud America, in particolare in Colombia. Il suo ritrovamento nella nostra zona, dimostra la rapida circolazione e trasmissione di questi determinati come conseguenza del movimento della popolazione mondiale. Parallelamente altri due geni appartenenti alla famiglia *qnr*, sono stati rinvenuti sia in *K. pneumoniae* che in *E. coli*, con minore frequenza e senza predominanza di specie batterica. Come detto, è stata evidenziata la presenza anche del gene *aac(6')-Ib-cr*, al contrario di quanto detto per *qnrB19*, questa sequenza è stata rinvenuta solo all'interno di campioni di *E. coli*, denotando, anche in questo caso, che alcuni meccanismi di resistenza sono più rappresentati in una specie batterica piuttosto che in un'altra. Il fatto che il 75% degli isolati *qnr*-positivi e il

94% di quelli *aac(6')-Ib-cr*-positivi risulti, anche produttore di ESBL, cioè sia resistente anche a tutti gli antibiotici beta-lattamici, delinea un quadro allarmante per quanto riguarda la diffusione di ceppi batterici multiresistenti.

In seconda luogo, l'analisi dei meccanismi di mobilizzazione delle sequenze geniche che portano all'insorgenza di resistenza ai chinoloni, che permettono il passaggio delle stesse in plasmidi diversi ed in specie diverse, ha evidenziato che il gene *qnrB19* non sia contenuto solo all'interno di elementi di tipo transposonico, come finora riportato in letteratura. Tutti i dati presenti, infatti, avevano sempre descritto questa sequenza all'interno del transposone *Tn2012*, mobilizzata dalle regioni di inserzione ISEcp1.

È particolarmente rilevante, che il nostro studio abbia evidenziato la presenza di un campione, in cui il gene *qnrB19* si trovi all'interno di un elemento di tipo integronico. Tale caratteristica non era ancora stata associata all'allele B19, ma era già stata descritta per B2, B6 e B10. L'analisi di sequenza ha rivelato che si tratta di un integrone di tipo ISCR1, caratterizzato dall'efficiente e rapida mobilizzazione delle sequenze contenute, grazie alla presenza, anche in singola copia, della regione di inserzione ISCR1. Questo meccanismo non è possibile in caso di elemento transposonico, dove sono necessarie due copie dell'elemento ISEcp1. Inoltre l'integrone ISCR1, a differenza dei transposoni, media l'espressione dei geni che contiene, grazie alla presenza di un operatore promotoriale autonomo ed indipendente dalla regione di inserimento. Il lavoro svolto ha, quindi, portato alla luce un dato preoccupante, associando anche il *qnrB19* ad un elemento in grado di trasferire molto più rapidamente ed efficientemente la resistenza ai chinoloni.

La necessità di individuare nuovi farmaci in grado di agire in modo rapido ed efficace su infezioni batteriche, spesso non risolvibili con gli antimicrobici in commercio, a causa della diffusione dei meccanismi di resistenza appena descritti, ha portato all'analisi del meccanismo d'azione del farmaco simociclinone (SD8). Si tratta, infatti, di una nuova molecola, che dimostra essere un potenziale nuovo antibiotico altamente attivo e ad ampio spettro, che ha come bersaglio, in modo simile ai chinoloni, la famiglia delle Topoisomerasi II. L'analisi effettuata ha dimostrato, che al contrario di quanto riportato in letteratura, SD8 abbia un considerevole effetto, non solo sulle specie batteriche Gram positive, ma anche su quelle Gram negative. I nostri dati provano che la somministrazione di SD8 a ceppi come *E. coli* e *K. pneumoniae* causi la morte dei microrganismi, se pur a concentrazioni diverse a causa di una diversa permeabilità di membrana. Inoltre,

abbiamo verificato che la presenza di mutazioni all'interno della sequenza di GyrA (S83, D87) e ParC (S80) portano alla totale inefficacia del trattamento. Il fatto che si tratti delle stesse mutazioni che conferiscono resistenza ai chinoloni, fa ipotizzare che SD8, in modo simile a questi antibiotici, interagisca con il complesso Girasi-DNA, condividendone il sito di azione. Il fatto che la presenza del gene *qnr*, negli isolati considerati, diminuisca la suscettibilità all'SD8 conferma questa ipotesi. Infine, lo studio ha permesso di evidenziare che l'utilizzo di ceppi commerciali di *E. coli*, come spesso accade, piuttosto che specie *wild type* ambientali, come fatto da noi, per l'analisi dell'efficacia di nuove molecole ad azione antibatterica dia luogo a risultati inattendibili, portando a scartare farmaci con buon potenziale antibiotico, come è accaduto con SD8.

In conclusione questa parte del lavoro ha permesso di meglio comprendere quali siano i determinanti che sottendono alla diminuzione di efficacia di molte classi di antibiotici e soprattutto quale siano i processi che ne portano ad una rapida diffusione. È stata, inoltre, valorizzata l'importanza della caratterizzazione di nuove molecole ad attività antimicrobica, che agiscano con meccanismi inediti su bersagli già noti, comuni a più classi batteriche, come le Topoisomerasi.

ABBREVIAZIONI

°C:	gradi Celsius
3-AT:	3-amminotriazolo
aa:	amminoacido(i)
AD:	activation domain
Ade:	adenina (base azotata)
ATP:	adenosina trifosfato
BD:	binding domain
BiFC:	Bi-Fluorescence Complementation
bp:	base pair, paio di basi
C:	citosina
cDNA:	complementary DNA
cfu:	colony forming unit, unità formante colonia
DMF:	N,N-dimetilformammide
DMSO:	dimetilsolfossido
DNA:	Deoxyribonucleic acid, acido deossiribonucleico
ds/ss DNA:	double/single stranded DNA, DNA a doppio/singolo filamento
DTT:	ditiotreitolo
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
EDTA:	Acido etilen-diammino tetraacetico (disodico)
G:	guanosina (base)
<i>K. pneumoniae</i> :	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kb:	kilobase, chilobase
kDa:	kiloDalton
L:	litro
MCS:	Multiple Cloning Site, sito di clonaggio multiplo
min:	minuto(i)
mRNA:	RNA messaggero
NLS:	nuclear localization signal
OD:	Optical Density, densità ottica
OF:	Outward Facing
PCR:	Polymerase Chain Reaction, reazione a catena della polimerasi
PEG:	poli-etilenglicole
RNA:	ribonucleic acid, acido ribonucleico
rpm:	revolution per minute, giri al minuto

RT:	room temperature, temperatura ambiente
<i>S. aureus</i> :	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. cerevisiae</i> :	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD8:	Simociclinone
SDS:	sodio dodecil solfato
sec:	secondo(i)
T:	timina (base)
TAE:	Tris-acetato-EDTA
TE:	Tris-EDTA
T _m :	Melting Temperature, temperatura di fusione
Tris:	Tris (idrossimetil) amminometano
UV:	ultravioletto
w/v:	weight/volume, concentrazione come rapporto peso/volume
X-gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galattopiranoside

BIBLIOGRAFIA

1. Vahlne, A., *A historical reflection on the discovery of human retroviruses*. *Retrovirology*, 2009. 6: p. 40.
2. Rutherford, G.W., et al., *Course of HIV-1 infection in a cohort of homosexual and bisexual men: an 11 year follow up study*. *Bmj*, 1990. 301(6762): p. 1183-8.
3. Gallo, R.C., et al., *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. *Science*, 1984. 224(4648): p. 500-3.
4. Barre-Sinoussi, F., et al., *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. *Science*, 1983. 220(4599): p. 868-71.
5. Kilmarx, P.H., *Global epidemiology of HIV*. *Curr Opin HIV AIDS*, 2009. 4(4): p. 240-6.
6. Willey, S.J., et al., *Identification of a subset of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1), HIV-2, and simian immunodeficiency virus strains able to exploit an alternative coreceptor on untransformed human brain and lymphoid cells*. *J Virol*, 2003. 77(11): p. 6138-52.
7. Peeters, M., P. Piot, and G. van der Groen, *Variability among HIV and SIV strains of African origin*. *Aids*, 1991. 5 Suppl 1: p. S29-36.
8. Peeters, M., et al., *Isolation of simian immunodeficiency viruses from two sooty mangabeys in Cote d'Ivoire: virological and genetic characterization and relationship to other HIV type 2 and SIVsm/mac strains*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1994. 10(10): p. 1289-94.
9. Aasa-Chapman, M.M., et al., *Development of the antibody response in acute HIV-1 infection*. *Aids*, 2004. 18(3): p. 371-81.
10. Benito, J.M., M. Lopez, and V. Soriano, *The role of CD8+ T-cell response in HIV infection*. *AIDS Rev*, 2004. 6(2): p. 79-88.
11. Rodes, B., et al., *Differences in disease progression in a cohort of long-term non-progressors after more than 16 years of HIV-1 infection*. *Aids*, 2004. 18(8): p. 1109-16.
12. Geffin, R., et al., *Functional and structural defects in HIV type 1 nef genes derived from pediatric long-term survivors*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2000. 16(17): p. 1855-68.
13. Bartnof, H.S., *Long-term non-progressors, survivors and HIV positives*. *Beta*, 1995: p. 29-32.
14. Metlas, R. and V. Veljkovic, *HIV-1 gp120 and immune network*. *Int Rev Immunol*, 2004. 23(5-6): p. 413-22.
15. Weiss, C.D., *HIV-1 gp41: mediator of fusion and target for inhibition*. *AIDS Rev*, 2003. 5(4): p. 214-21.
16. Ganser-Pornillos, B.K., M. Yeager, and W.I. Sundquist, *The structural biology of HIV assembly*. *Curr Opin Struct Biol*, 2008. 18(2): p. 203-17.
17. Freed, E.O. and A.J. Mouland, *The cell biology of HIV-1 and other retroviruses*. *Retrovirology*, 2006. 3: p. 77.
18. Richter, S.N., I. Frasson, and G. Palu, *Strategies for inhibiting function of HIV-1 accessory proteins: a necessary route to AIDS therapy?* *Curr Med Chem*, 2009. 16(3): p. 267-86.
19. Richter, S.N., et al., *Dynamics of nascent mRNA folding and RNA-protein interactions: an alternative TAR RNA structure is involved in the control of HIV-1 mRNA transcription*. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(15): p. 4278-92.
20. Richter, S., H. Cao, and T.M. Rana, *Specific HIV-1 TAR RNA loop sequence and functional groups are required for human cyclin T1-Tat-TAR ternary complex formation*. *Biochemistry*, 2002. 41(20): p. 6391-7.
21. Edgcomb, S.P., et al., *Protein structure and oligomerization are important for the formation of export-competent HIV-1 Rev-RRE complexes*. *Protein Sci*, 2008. 17(3): p. 420-30.
22. Neil, S.J., et al., *HIV-1 Vpu promotes release and prevents endocytosis of nascent retrovirus particles from the plasma membrane*. *PLoS Pathog*, 2006. 2(5): p. e39.
23. Holden, L.G., et al., *Crystal structure of the anti-viral APOBEC3G catalytic domain and functional implications*. *Nature*, 2008. 456(7218): p. 121-4.
24. Aguiar, R.S. and B.M. Peterlin, *APOBEC3 proteins and reverse transcription*. *Virus Res*, 2008. 134(1-2): p. 74-85.
25. Pandey, R.C., et al., *HIV-1 Vpr: a closer look at the multifunctional protein from the structural perspective*. *Curr HIV Res*, 2009. 7(2): p. 114-28.
26. Nazari, R. and S. Joshi, *HIV-1 gene therapy at pre-integration and provirus DNA levels*. *Curr Gene Ther*, 2009. 9(1): p. 20-5.

27. O'Neill, E., et al., *Dynamic evolution of the human immunodeficiency virus type 1 pathogenic factor, Nef*. J Virol, 2006. 80(3): p. 1311-20.
28. Geyer, M. and B.M. Peterlin, *Domain assembly, surface accessibility and sequence conservation in full length HIV-1 Nef*. FEBS Lett, 2001. 496(2-3): p. 91-5.
29. Baugh, L.L., J.V. Garcia, and J.L. Foster, *Functional characterization of the human immunodeficiency virus type 1 Nef acidic domain*. J Virol, 2008. 82(19): p. 9657-67.
30. Raney, A., et al., *Structural constraints on human immunodeficiency virus type 1 Nef function*. Virology, 2007. 368(1): p. 7-16.
31. Gerlach, H., et al., *HIV-1 Nef membrane association depends on charge, curvature, composition and sequence*. Nat Chem Biol. 6(1): p. 46-53.
32. Arold, S., et al., *Characterization and molecular basis of the oligomeric structure of HIV-1 nef protein*. Protein Sci, 2000. 9(6): p. 1137-48.
33. Arold, S.T. and A.S. Baur, *Dynamic Nef and Nef dynamics: how structure could explain the complex activities of this small HIV protein*. Trends Biochem Sci, 2001. 26(6): p. 356-63.
34. Betzi, S., et al., *Protein protein interaction inhibition (2P2I) combining high throughput and virtual screening: Application to the HIV-1 Nef protein*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. 104(49): p. 19256-61.
35. Poe, J.A. and T.E. Smithgall, *HIV-1 Nef dimerization is required for Nef-mediated receptor downregulation and viral replication*. J Mol Biol, 2009. 394(2): p. 329-42.
36. Liu, L.X., et al., *Mutation of a conserved residue (D123) required for oligomerization of human immunodeficiency virus type 1 Nef protein abolishes interaction with human thioesterase and results in impairment of Nef biological functions*. J Virol, 2000. 74(11): p. 5310-9.
37. Baur, A., *Functions of the HIV-1 Nef protein*. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord, 2004. 4(4): p. 309-13.
38. Arora, V.K., B.L. Fredericksen, and J.V. Garcia, *Nef: agent of cell subversion*. Microbes Infect, 2002. 4(2): p. 189-99.
39. Das, S.R. and S. Jameel, *Biology of the HIV Nef protein*. Indian J Med Res, 2005. 121(4): p. 315-32.
40. Arhel, N.J. and F. Kirchhoff, *Implications of nef: host cell interactions in viral persistence and progression to AIDS*. Curr Top Microbiol Immunol. 339: p. 147-75.
41. Fenard, D., et al., *Nef is physically recruited into the immunological synapse and potentiates T cell activation early after TCR engagement*. J Immunol, 2005. 175(9): p. 6050-7.
42. Schindler, M., et al., *Association of Nef with p21-activated kinase 2 is dispensable for efficient human immunodeficiency virus type 1 replication and cytopathicity in ex vivo-infected human lymphoid tissue*. J Virol, 2007. 81(23): p. 13005-14.
43. Witte, V., et al., *Induction of HIV transcription by Nef involves Lck activation and protein kinase C theta raft recruitment leading to activation of ERK1/2 but not NF kappa B*. J Immunol, 2008. 181(12): p. 8425-32.
44. Noviello, C.M., S. Benichou, and J.C. Guatelli, *Cooperative binding of the class I major histocompatibility complex cytoplasmic domain and human immunodeficiency virus type 1 Nef to the endosomal AP-1 complex via its mu subunit*. J Virol, 2008. 82(3): p. 1249-58.
45. Schaefer, M.R., et al., *HIV-1 Nef targets MHC-I and CD4 for degradation via a final common beta-COP-dependent pathway in T cells*. PLoS Pathog, 2008. 4(8): p. e1000131.
46. Olivetta, E. and M. Federico, *HIV-1 Nef protects human-monocyte-derived macrophages from HIV-1-induced apoptosis*. Exp Cell Res, 2006. 312(6): p. 890-900.
47. Gelezianas, R., et al., *HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell*. Nature, 2001. 410(6830): p. 834-8.
48. Xu, X.N., et al., *Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain*. J Exp Med, 1999. 189(9): p. 1489-96.
49. Miller, M.D., et al., *The human immunodeficiency virus-1 nef gene product: a positive factor for viral infection and replication in primary lymphocytes and macrophages*. J Exp Med, 1994. 179(1): p. 101-13.
50. Chowes, M.Y., et al., *Optimal infectivity in vitro of human immunodeficiency virus type 1 requires an intact nef gene*. J Virol, 1994. 68(5): p. 2906-14.
51. Spina, C.A., et al., *The importance of nef in the induction of human immunodeficiency virus type 1 replication from primary quiescent CD4 lymphocytes*. J Exp Med, 1994. 179(1): p. 115-23.
52. Fackler, O.T., et al., *Activation of Vav by Nef induces cytoskeletal rearrangements and downstream effector functions*. Mol Cell, 1999. 3(6): p. 729-39.

53. Fackler, O.T., et al., *Functional characterization of HIV-1 Nef mutants in the context of viral infection*. *Virology*, 2006. 351(2): p. 322-39.
54. Joseph, A.M., et al., *Human immunodeficiency virus-1 Nef protein interacts with Tat and enhances HIV-1 gene expression*. *FEBS Lett*, 2003. 548(1-3): p. 37-42.
55. Wolf, D., et al., *HIV Nef enhances Tat-mediated viral transcription through a hnRNP-K-nucleated signaling complex*. *Cell Host Microbe*, 2008. 4(4): p. 398-408.
56. Karn, J., *Control of human immunodeficiency virus replication by the tat, rev, nef and protease genes*. *Curr Opin Immunol*, 1991. 3(4): p. 526-36.
57. Rakotobe, D., et al., *Human Polycomb group EED protein negatively affects HIV-1 assembly and release*. *Retrovirology*, 2007. 4: p. 37.
58. Borghouts, C., C. Kunz, and B. Groner, *Peptide aptamer libraries*. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008. 11(2): p. 135-45.
59. Das, S. and G.V. Kalpana, *Reverse two-hybrid screening to analyze protein-protein interaction of HIV-1 viral and cellular proteins*. *Methods Mol Biol*, 2009. 485: p. 271-93.
60. Lalonde, S., et al., *Molecular and cellular approaches for the detection of protein-protein interactions: latest techniques and current limitations*. *Plant J*, 2008. 53(4): p. 610-35.
61. Kerppola, T.K., *Visualization of molecular interactions by fluorescence complementation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. 7(6): p. 449-56.
62. Kerppola, T.K., *Design and implementation of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays for the visualization of protein interactions in living cells*. *Nat Protoc*, 2006. 1(3): p. 1278-86.
63. Kerppola, T.K., *Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis as a probe of protein interactions in living cells*. *Annu Rev Biophys*, 2008. 37: p. 465-87.
64. Kerppola, T.K., *Bimolecular fluorescence complementation: visualization of molecular interactions in living cells*. *Methods Cell Biol*, 2008. 85: p. 431-70.
65. Guan, H. and E. Kiss-Toth, *Advanced technologies for studies on protein interactomes*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2008. 110: p. 1-24.
66. Koegl, M. and P. Uetz, *Improving yeast two-hybrid screening systems*. *Brief Funct Genomic Proteomic*, 2007. 6(4): p. 302-12.
67. Fields, S., *High-throughput two-hybrid analysis. The promise and the peril*. *Febs J*, 2005. 272(21): p. 5391-9.
68. Serebriiskii, I.G. and E. Kotova, *Analysis of protein-protein interactions utilizing dual bait yeast two-hybrid system*. *Methods Mol Biol*, 2004. 261: p. 263-96.
69. Bennett, M.A., J.F. Shern, and R.A. Kahn, *Reverse two-hybrid techniques in the yeast *Saccharomyces cerevisiae**. *Methods Mol Biol*, 2004. 261: p. 313-26.
70. Hu, C.D. and T.K. Kerppola, *Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis*. *Nat Biotechnol*, 2003. 21(5): p. 539-45.
71. Hu, C.D., A.V. Grinberg, and T.K. Kerppola, *Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis*. *Curr Protoc Cell Biol*, 2006. Chapter 21: p. Unit 21 3.
72. Hu, C.D., A.V. Grinberg, and T.K. Kerppola, *Visualization of protein interactions in living cells using bimolecular fluorescence complementation (BiFC) analysis*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2005. Chapter 19: p. Unit 19 0.
73. Robida, A.M. and T.K. Kerppola, *Bimolecular fluorescence complementation analysis of inducible protein interactions: effects of factors affecting protein folding on fluorescent protein fragment association*. *J Mol Biol*, 2009. 394(3): p. 391-409.
74. Pizzato, M., et al., *Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(16): p. 6812-7.
75. Ciuffi, A., et al., *Interactions of processed Nef (58-206) with virion proteins of HIV type 1*. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2004. 20(4): p. 399-407.
76. Hare, S., et al., *Structural basis for functional tetramerization of lentiviral integrase*. *PLoS Pathog*, 2009. 5(7): p. e1000515.
77. Ceccherini-Silberstein, F., et al., *Characterization and structural analysis of HIV-1 integrase conservation*. *AIDS Rev*, 2009. 11(1): p. 17-29.
78. Matsugami, A., et al., *Structure of RNA aptamer for HIV Tat complexed with Tat-derived peptide*. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2004(48): p. 111-2.
79. Shojania, S. and J.D. O'Neil, *HIV-1 Tat is a natively unfolded protein: the solution conformation and dynamics of reduced HIV-1 Tat-(1-72) by NMR spectroscopy*. *J Biol Chem*, 2006. 281(13): p. 8347-56.
80. Bour, S. and K. Strebel, *HIV accessory proteins: multifunctional components of a complex system*. *Adv Pharmacol*, 2000. 48: p. 75-120.
81. Geyer, M., O.T. Fackler, and B.M. Peterlin, *Structure-function relationships in HIV-1 Nef*.

- EMBO Rep, 2001. 2(7): p. 580-5.
82. Lu, X., et al., *Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4*. Immunity, 1998. 8(5): p. 647-56.
83. Kim, O.K., K. Ohemeng, and J.F. Barrett, *Advances in DNA gyrase inhibitors*. Expert Opin Investig Drugs, 2001. 10(2): p. 199-212.
84. Andriole, V.T., *The quinolones: past, present, and future*. Clin Infect Dis, 2005. 41 Suppl 2: p. S113-9.
85. Emmerson, A.M. and A.M. Jones, *The quinolones: decades of development and use*. J Antimicrob Chemother, 2003. 51 Suppl 1: p. 13-20.
86. De Souza, M.V., *New fluoroquinolones: a class of potent antibiotics*. Mini Rev Med Chem, 2005. 5(11): p. 1009-17.
87. Peterson, L.R., *Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity*. Clin Infect Dis, 2001. 33 Suppl 3: p. S180-6.
88. Hooper, D.C., *Mechanisms of action of antimicrobials: focus on fluoroquinolones*. Clin Infect Dis, 2001. 32 Suppl 1: p. S9-S15.
89. Hooper, D.C., *Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones*. Clin Infect Dis, 2000. 31 Suppl 2: p. S24-8.
90. Hooper, D.C., *Mode of action of fluoroquinolones*. Drugs, 1999. 58 Suppl 2: p. 6-10.
91. Marcusson, L.L., N. Fridomdt-Moller, and D. Hughes, *Interplay in the selection of fluoroquinolone resistance and bacterial fitness*. PLoS Pathog, 2009. 5(8): p. e1000541.
92. Morgan-Linnell, S.K., et al., *Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in Escherichia coli clinical isolates*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(1): p. 235-41.
93. Hopkins, K.L., R.H. Davies, and E.J. Threlfall, *Mechanisms of quinolone resistance in Escherichia coli and Salmonella: recent developments*. Int J Antimicrob Agents, 2005. 25(5): p. 358-73.
94. Drlica, K., et al., *Quinolones: action and resistance updated*. Curr Top Med Chem, 2009. 9(11): p. 981-98.
95. Jacoby, G.A., *Mechanisms of resistance to quinolones*. Clin Infect Dis, 2005. 41 Suppl 2: p. S120-6.
96. Petersen, A. and L.B. Jensen, *Analysis of gyrA and parC mutations in enterococci from environmental samples with reduced susceptibility to ciprofloxacin*. FEMS Microbiol Lett, 2004. 231(1): p. 73-6.
97. Hiasa, H., *The Glu-84 of the ParC subunit plays critical roles in both topoisomerase IV-quinolone and topoisomerase IV-DNA interactions*. Biochemistry, 2002. 41(39): p. 11779-85.
98. Hooper, D.C., *Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance*. Emerg Infect Dis, 2001. 7(2): p. 337-41.
99. Li, X.Z., *Quinolone resistance in bacteria: emphasis on plasmid-mediated mechanisms*. Int J Antimicrob Agents, 2005. 25(6): p. 453-63.
100. Drake, J.W., *The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes*. Ann N Y Acad Sci, 1999. 870: p. 100-7.
101. Poirel, L., V. Cattoir, and P. Nordmann, *Is plasmid-mediated quinolone resistance a clinically significant problem?* Clin Microbiol Infect, 2008. 14(4): p. 295-7.
102. Cattoir, V. and P. Nordmann, *Plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial species: an update*. Curr Med Chem, 2009. 16(8): p. 1028-46.
103. Poirel, L., et al., *In vivo selection of fluoroquinolone-resistant Escherichia coli isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(4): p. 1525-7.
104. Martinez-Martinez, L., A. Pascual, and G.A. Jacoby, *Quinolone resistance from a transferable plasmid*. Lancet, 1998. 351(9105): p. 797-9.
105. Tran, J.H. and G.A. Jacoby, *Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(8): p. 5638-42.
106. Jacoby, G.A., et al., *qnrB, another plasmid-mediated gene for quinolone resistance*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(4): p. 1178-82.
107. Cavaco, L.M. and F.M. Aarestrup, *Evaluation of quinolones for use in detection of determinants of acquired quinolone resistance, including the new transmissible resistance mechanisms qnrA, qnrB, qnrS, and aac(6)Ib-cr, in Escherichia coli and Salmonella enterica and determinations of wild-type distributions*. J Clin Microbiol, 2009. 47(9): p. 2751-8.
108. Tran, J.H., G.A. Jacoby, and D.C. Hooper, *Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with Escherichia coli DNA gyrase*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(1): p. 118-25.

109. Robicsek, A., et al., *Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase*. Nat Med, 2006. 12(1): p. 83-8.
110. Yamane, K., et al., *New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, QepA, found in an Escherichia coli clinical isolate*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. 51(9): p. 3354-60.
111. Ma, J., et al., *High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6)-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(2): p. 519-24.
112. Baquirin, M.H. and M. Barlow, *Evolution and recombination of the plasmidic qnr alleles*. J Mol Evol, 2008. 67(1): p. 103-10.
113. Partridge, S.R., et al., *Definition of the attI1 site of class 1 integrons*. Microbiology, 2000. 146 (Pt 11): p. 2855-64.
114. Stokes, H.W. and R.M. Hall, *A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons*. Mol Microbiol, 1989. 3(12): p. 1669-83.
115. Stokes, H.W., et al., *Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes*. Mol Microbiol, 1997. 26(4): p. 731-45.
116. Ridley, A. and E.J. Threlfall, *Molecular epidemiology of antibiotic resistance genes in multiresistant epidemic Salmonella typhimurium DT 104*. Microb Drug Resist, 1998. 4(2): p. 113-8.
117. Labbate, M., R.J. Case, and H.W. Stokes, *The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation*. Methods Mol Biol, 2009. 532: p. 103-25.
118. Robinson, A., et al., *Structural genomics of the bacterial mobile metagenome: an overview*. Methods Mol Biol, 2008. 426: p. 589-95.
119. Richter, S.N., et al., *Simocyclinone D8 turns on against Gram-negative bacteria in a clinical setting*. Bioorg Med Chem Lett, 2009.
120. Flatman, R.H., et al., *Simocyclinone D8, an inhibitor of DNA gyrase with a novel mode of action*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(3): p. 1093-100.
121. Edwards, M.J., et al., *A crystal structure of the bifunctional antibiotic simocyclinone D8, bound to DNA gyrase*. Science, 2009. 326(5958): p. 1415-8.
122. Sissi, C., et al., *Mapping simocyclinone D8 interaction with DNA gyrase: evidence for a new binding site on GyrB*. Antimicrob Agents Chemother. 54(1): p. 213-20.
123. Opegard, L.M., et al., *In vivo and in vitro patterns of the activity of simocyclinone D8, an angucyclinone antibiotic from Streptomyces antibioticus*. Antimicrob Agents Chemother, 2009. 53(5): p. 2110-9.
124. Cattoir, V., et al., *Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates*. J Antimicrob Chemother, 2007. 60(2): p. 394-7.
125. Lascols, C., et al., *Type II topoisomerase mutations in clinical isolates of Enterobacter cloacae and other enterobacterial species harbouring the qnrA gene*. Int J Antimicrob Agents, 2007. 29(4): p. 402-9.
126. Lavilla, S., et al., *Prevalence of qnr genes among extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacterial isolates in Barcelona, Spain*. J Antimicrob Chemother, 2008. 61(2): p. 291-5.
127. Villegas, M.V., et al., *CTX-M-12 beta-lactamase in a Klebsiella pneumoniae clinical isolate in Colombia*. Antimicrob Agents Chemother, 2004. 48(2): p. 629-31.
128. Li, H. and J.B. Li, *Detection of five novel CTX-M-type extended spectrum beta-lactamases with one to three CTX-M-14 point mutations in isolates from Hefei, Anhui province, China*. J Clin Microbiol, 2005. 43(8): p. 4301-2.
129. Perez-Perez, F.J. and N.D. Hanson, *Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR*. J Clin Microbiol, 2002. 40(6): p. 2153-62.
130. Poirel, L., et al., *ISEcp1B-mediated transposition of blaCTX-M in Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. 49(1): p. 447-50.
131. Richter, S.N.F., I; Bergo C.; Cavallaro A., Manganello R.; Palù G., *High prevalence of qnrB19 plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae from Italy*. Clinical Microbiology and Infection, 2009.
132. Park, C.H., et al., *Prevalence in the United States of aac(6)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. 50(11): p. 3953-5.
133. Le, T.B., et al., *Coupling of the biosynthesis and export of the DNA gyrase inhibitor simocyclinone in Streptomyces antibioticus*. Mol Microbiol, 2009. 72(6): p. 1462-74.

PUBBLICAZIONI

Richter, S.N., Frasson I., and Palù G., Strategies for inhibiting function of HIV-1 accessory proteins: a necessary route to AIDS therapy? *Curr Med Chem*, 2009. 16(3): p. 267-86.

Richter, S.N., Frasson I., Palumbo M., Sissi C. and Palù G., Simocyclinone D8 turns on against Gram-negative bacteria in a clinical setting. *Bioorg Med Chem Lett*, 20 (2010), pp. 1202-1204.

Richter, S.N., Frasson I., Bergo C., Cavallaro A., Manganelli R. and Palù G., High prevalence of qnrB19 plasmid-mediated quinolone resistance in Enterobacteriaceae from Italy. Submitted to *Clinical Microbiology and Infection*, 2009.