



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.**

**CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN  
BIOLOGIA SANITARIA**

**RUOLO DI SPECIFICI DOMINI DELLA PROTEINA  
NUCLEOCAPSIDE DEL VIRUS  
DELL'IMMUNODEFICIENZA FELINA NELLE FASI  
TARDIVE DELLA GEMMAZIONE VIRALE**

**RELATORE: Dott.ssa ARIANNA CALISTRI**  
DIPARTIMENTO DI ISTOLOGIA, MICROBIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE MEDICHE

**CORRELATORE: Dott.ssa CLAUDIA DEL VECCHIO**  
DIPARTIMENTO DI ISTOLOGIA, MICROBIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE MEDICHE

**LAUREANDA: VIVIANA ANNI**

**ANNO ACCADEMICO 2009/2010**

## INDICE

<b>1. SOMMARIO</b>	pag. 3
<b>2. INTRODUZIONE</b>	pag. 5
2.1 Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV)	pag. 5
2.1.1 Genoma	pag. 6
2.1.2 Ciclo replicativo	pag. 9
2.2 Regione del Nucleocapside	pag.12
2.3 I <i>Late Domains</i>	pag.13
2.4 La proteina AIP-1/Alix	pag.15
2.5 FIV animale modello per lo sviluppo di vaccini e terapie farmacologiche contro HIV-1	pag.17
<b>3. SCOPO</b>	pag. 19
<b>4. MATERIALI E METODI</b>	pag. 21
MATERIALI	pag. 21
4.1 Linee cellulari	pag. 21
4.2 Plasmidi	pag. 21
4.3 Oligonucleotidi	pag. 22
METODI	pag. 23
4.4 Quantificazione degli acidi nucleici	pag. 23
4.5 Tecniche di biologia molecolare	pag. 24
4.5.1 Preparazione del DNA plasmidico	pag. 24
4.5.2 Restrizioni enzimatiche	pag. 25
4.5.3 Trasformazione batterica	pag. 25
4.5.4 Tecniche di clonaggio	pag. 26
4.5.5 Sequenziamento dei plasmidi	pag. 27
4.5.6 Mutagenesi	pag. 27
4.5.7 Tecniche di trasfezione	pag. 29
4.5.8 Elettroforesi di proteine (SDS-PAGE)	pag. 29
4.5.9 Western Blotting e sviluppo	pag. 30
4.5.10 Produzione di <i>Virus Like Particles</i> (VLPs)	pag. 31
4.5.11 Purificazione delle VLPs mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio	pag. 31
<b>5. RISULTATI</b>	pag. 33
Premessa	

5.1 Mutagenesi degli <i>Zinc finger</i>	pag. 33
5.2 Ricostruzione del plasmide iniziale pΔenv1 contenente la mutazione di interesse	pag. 36
5.2.1 Costruzione del plasmide intermedio pΔenv1MutΔpol	pag. 37
5.2.2 Costruzione del plasmide finale pΔenv1Mut#	pag. 39
5.3 Analisi degli effetti delle mutazioni in <i>L Domains</i> e <i>Zinc fingers</i> sulla gemmazione delle <i>Virus Like Particles</i> e processamento della poliproteina Gag-Pol mediante Western Blotting	pag. 41
<b>6. DISCUSSIONE</b>	pag. 45
<b>7. ABBREVIAZIONI</b>	pag. 53
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 57

## 1.ABSTRACT

La proteina Nucleocapside di FIV, prodotta mediante taglio proteolitico della poliproteina precursore Gag (Pr50<sup>Gag</sup>), contiene due motivi *Zinc finger* caratterizzati dalla sequenza consenso Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys.

Il NC partecipa attivamente a fasi essenziali dell'intero ciclo retrovirale: media la multimerizzazione di Gag e l'assemblaggio virale; dirige inoltre l'incapsidamento dell'RNA genomico virale nella particella in formazione.

Il presente lavoro è stato condotto con l'intenzione di definire con maggior esattezza il ruolo della proteina NC nelle fasi tardive della gemmazione, analizzando il fenotipo di costrutti mutati a livello di residui aminoacidici impegnati nel legame con lo ione Zn<sup>2+</sup>. E' stata effettuata una sostituzione della Cys prossimale o distale del primo o secondo *Zinc finger* con la Serina, in associazione o meno a mutazioni nell'*L domain* o nella sequenza LLDL a valle. Dai risultati ottenuti non è emersa una significativa variazione nel processamento del precursore Pr50<sup>Gag</sup> e tantomeno nell'assemblaggio in VLPs; le differenze osservate rispetto al costrutto *wild-type* son principalmente ascrivibili alle mutazioni in p2, a conferma del ruolo rilevante che questo dominio ricopre nel processo di gemmazione. Non è stato inoltre riscontrato, a differenza di quanto riportato in letteratura per simili mutanti HIV-1, un ruolo prioritario del primo *Zinc finger* rispetto al secondo.

## 2.INTRODUZIONE

### 2.1 Virus dell'Immunodeficienza Felina

Il virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) è stato descritto per la prima volta nel 1987 come agente eziologico di una sindrome simile all'AIDS causata da HIV-1 nel gatto domestico (*Felis catus*) ed è stato successivamente osservato anche in varie specie feline selvatiche. Appartiene alla famiglia *Retroviridae* e può essere sottoclassificato come genere *Lentivirus* sulla base della morfologia, del suo particolare tropismo cellulare e dell'utilizzo preferenziale del catione magnesio da parte della DNA polimerasi RNA-dipendente associata al virus.

I membri del sottogruppo dei lentivirus (*Lentivirinae*) comprendono anche HIV, SIV (in scimmie), isolati da vari ungulati tra cui VV (visna virus, in pecore), CAEV (in capre), BIV (in bovini) ed EIAV (equino) (Steinman et al.,1990). La morfologia della particella virale di FIV è simile a quella di altri lentivirus. Il virione maturo è sferico, del diametro di circa 100-125 nm, circondato da un involucro esterno (*envelope* o capsida) che conferisce la caratteristica morfologia icosaedrica alla particella retrovirale avvolta dal doppio strato lipidico, dal quale protrudono le glicoproteine virali. Al suo interno si distingue un componente capsidico, costituito da una porzione esterna (matrice) e da una porzione centrale (nucleocapside o *core*), che racchiude il genoma virale e le proteine ad esso associate (Elder et al.,2008,Tomonaga and Mikami,1996, Miyazawa *et al.*, 1989, Pedersen *et al.*, 1987, Bendinelli et al.,1995).

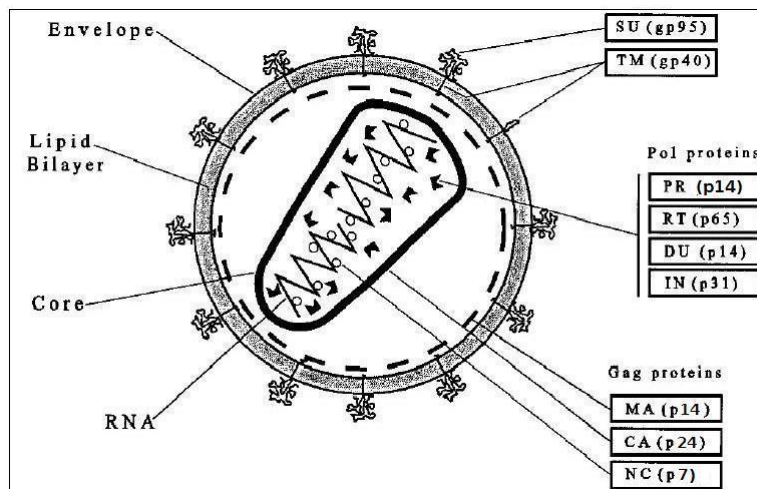


Fig.2.1:Virione di FIV maturo (da Bendinelli et al.,1995,modificata)

La prevalenza dell'infezione asintomatica tra gatti domestici delle varie nazioni varia a seconda dell'età, del genere e del rischio di esposizione (dal 6% del Regno

Unito al 14 % negli USA) mentre la prevalenza in animali con patologia conclamata è circa due-tre volte maggiore. Allo stesso modo del virus HIV-1, FIV può essere trasmesso mediante esposizione mucosale, trasfusione di sangue e per via verticale post-natale e pre-natale. A differenza della sindrome AIDS indotta nelle scimmie da

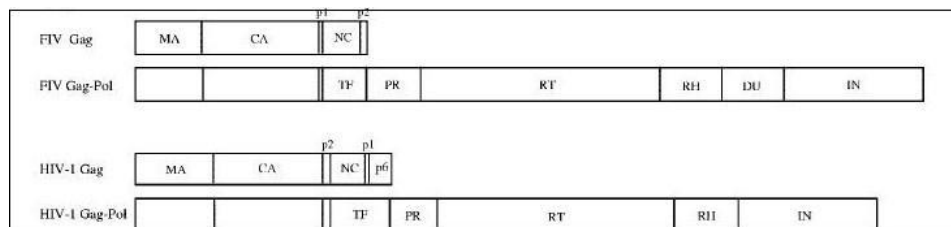
SIV, l'insorgenza di quella felina non richiede trasmissione inter-specie, col vantaggio di poter studiare sia il contagio orizzontale che verticale in colonie di felini domestici e selvatici (Bachmann et al.,2007, Elder et al.,2008, Luttge et al.,2009).

### 2.1.1 Genoma

Il genoma di FIV è costituito da due filamenti identici di RNA a polarità positiva, tenuti insieme da legami a idrogeno che si stabiliscono tra sequenze ripetute invertite presenti alle estremità delle catene. L'estremità 5' possiede un gruppo CAP (RNA<sup>7</sup>G) mentre quella 3' è poliadenilata. La lunghezza del genoma è di circa 9.4 kb, prossima a quella di HIV ed altri lentivirus; è impacchettato all'interno del virione dove forma un groviglio compatto grazie all'associazione con le proteine NC (p7).

La sua organizzazione è relativamente semplice, se messa a confronto con quella di lentivirus di primati; tuttavia si può affermare che la struttura genomica è simile a quella di HIV-1 eccetto alcune importanti distinzioni. Il DNA provirale, fiancheggiato dagli elementi LTR (*long terminal repeats*), uno ad ogni estremità, è formato dalle tre grandi ORF *gag*, *pol* ed *env* che codificano sia per proteine strutturali, che entrano a far parte del virione, sia per proteine funzionali ovvero enzimi necessari alla replicazione.

L'espressione della sola poliproteina Gag, Pr50<sup>Gag</sup>, processata dalla proteasi virale in MA (p14), CA (p24) e NC (p7) è sufficiente per la formazione di particelle virali capaci di incapsidare l'RNA genomico ed è perciò quella fondamentale per l'assemblaggio, gemmazione e rilascio dei virioni dalle cellule infette. Viene inoltre rilasciata dal processamento del precursore la regione C-terminale p2, funzionalmente equivalente alla p6 di HIV-1 (Dussupt *et al.*, 2009, Manrique et al.,2004, Elder et al.,2008, Olmsted et al.,1989, Saenz et al.,2004).



**Fig.2.1:**Rappresentazione schematica della proteina Gag e poliproteina Gag-Pol di FIV ed HIV-1. Sono evidenziati i siti di taglio e le proteina individuali mature. HIV-1 presenta rispetto a FIV una proteina spaziatrice aggiuntiva, p1, tra il NC e la proteina p6 nella poliproteina Gag-Pol, mentre FIV presenta un enzima aggiuntivo, DU, tra RH ed IN rispetto ad HIV-1.TF,*trans frame region*.(da Lin et al.,2006,modificata).

Le proteine prodotte in seguito all'evento di processamento da parte della proteasi ricoprono diversi ruoli.

La MA è strettamente associata alla membrana virale, situata al di sotto dell'envelope virale; viene modificata per miristolazione, particolare che si osserva nella maggior parte della famiglia *Retroviridae*, inclusi HIV-1 e SIV, nonostante FIV sia l'unico ad averlo tra i lentivirus di non primati.

Il dominio CA contiene regioni essenziali per l'unione di molteplici proteine Gag ed è il costituente principale del *core* virale maturo.

La proteina NC matura, posizionata al di sotto del core di proteine CA, possiede due motivi "Zinc finger" identici e viene liberata dalla proteasi virale durante le fasi tardive del ciclo virale, esattamente al momento dell'assemblaggio prima che avvenga la gemmazione virale (Elder et al.,2008, Elder et al.,1992, Dussupt et al.,2009, Thomas and Gorelick, 2009).

La sequenza codificante di *pol*, parzialmente sovrapposta a quella di *gag*, viene espressa come poliproteina di fusione Gag-Pol in seguito ad un evento di *frameshift* ribosomale, reso possibile dalla presenza della sequenza segnale GGAAAC situata in prossimità dell'estremità 3' di *gag*; il *frameshift* si verifica con una frequenza approssimativa del 30%.

La poliproteina Pol di FIV comprende i geni che codificano gli enzimi proteasi (PR), retrotrascrittasi (RT), integrasi (IN) ed un gene che codifica per la DU (Deossiridina pirofosfatasi) (Elder et al.,2008, Lerner et al.,1995, Mansky et al.,2000, Bendinelli et al.,1995).

Il gene *env* codifica per la poliproteina gp130 poi processata nelle due proteine, che subiscono la modifica post-traduzionale di glicosilazione, SU "surface envelope" (gp 95) e TM "transmembrane env" (gp40), gli epitopi maggiormente variabili in FIV.

La regione SU contiene importanti siti di legame al recettore primario (recettore di legame) mentre TM lega un recettore cellulare secondario (recettore di fusione), permettendo l'ingresso di FIV nella cellula ospite, analogamente alle interazioni SU/recettore notate in HIV. La glicoproteina principale gp130 è l'antigene dominante nella risposta immune all'infezione del gatto da parte di FIV.

Lo studio della caratterizzazione della fase di legame al recettore ed entrata ha fatto molti progressi negli ultimi anni e potrebbe offrire un ulteriore target per lo sviluppo di terapie antivirali sia nel gatto che nell'uomo (Elder et al.,2008,Uhl et al.,2008,Steinman,1990).

Oltre alle ORF principali, comuni a tutti i retrovirus, i lentivirus presentano ORF ausiliarie aggiuntive, caratteristiche di questo sottogruppo, le quali svolgono un ruolo importante nell'infezione, resistenza del virus nei confronti delle difese immunitarie dell'ospite e nell'indurre patologia cronica.

Le ORF minori presenti nel genoma di FIV sono tre: *Rev*, ORF-A e *Vif*.

Il gene *rev* regola l'espressione del gene *Vif*, dal momento che il *vif* mRNA contiene i *Rev Responsive Elements* ed è prodotto da un singolo evento di splicing

(Tomonaga and Mikami,1996). Il prodotto del gene *rev* di FIV è una proteina di 23kDa localizzata nel nucleolo della cellula infetta, come HIV-1 *rev* (Tomonaga and Mikana,1996). *Rev* agisce legandosi, tramite un dominio aminoacidico basico, a livello di una sequenza di RNA detta "RRE". L'RRE di FIV si trova all'estremità 3'dell'orf *env*, a differenza degli altri lentivirus in cui si localizza vicino alla giunzione Su-TM dell'orf *env* (Phillips et al.,1992).

Il sistema regolatorio in FIV e altri virus di non primati riguardo alle funzioni di *Rev* e delle sequenze RRE con cui interagisce è organizzato in modo simile a quello del lentivirus di primati HIV-1: FIV *Rev* ha gli stessi domini funzionali. Sembra che l'interazione *Rev*-RRE in FIV richieda la presenza di fattori cellulari specifici di linee cellulari feline, perciò è importante non solo per l'espressione virale ma anche per il tropismo cellulare (Tomonaga and Mikana,1996). Orf-A (o Orf-2) promuove un netto aumento della traduzione di prodotti genici transattivando le FIV LTR, che guidano la trascrizione dei prodotti genici (Saenz et al.,2004, Elder et al.,2008) .

Gli mRNA di *Orf-A* sono stati riscontrati nella fase precoce della replicazione in linee cellulari infettate da FIV, ma anche nella fase latente dell'infezione, isolati da PBMCs. In base a ciò si può dedurre che questo gene di FIV abbia un ruolo regolatorio, fatto che lo accomuna ai geni *tat* di altri lentivirus.

Effettivamente il gene *Orf-A* di FIV somiglia al primo esone codificante dei geni *tat* per la sua dimensione e posizione nel genoma; tuttavia *Orf-A* non agisce mediante un elemento TAR ("*Tar Responsive Elements*" sono sequenze LTR *cis*-agenti), come nel caso di HIV-1 *Tat*, ma promuove trascrizione/traduzione con meccanismi distinti dagli altri lentivirus .

Uno studio riporta che non si verifica un imponente incremento della trascrizione in presenza di *Orf-A* perciò l'aumento della traduzione potrebbe essere dovuta a sequenze situate a valle (Tomonaga and Mikami,1996, Elder et al.,2008). Il gene del fattore di infettività virale *Vif* è situato all'estremità 3' del gene *pol* di FIV, così come in altri lentivirus eccetto EIAV e codifica per una proteina di 23-29 kDa. La sua espressione è regolata dal gene *rev* in quanto il trascritto prodotto contiene le RRE. Il gene *Vif* di FIV è un elemento determinante per la replicazione virale ed infettività in linee cellulari feline quali le CFRK e G355-5 , suggerendo che la sua funzione è oltremodo simile ad HIV *Vif*, il cui prodotto genico è indispensabile per la produzione di virus infettivi in alcune linee cellulari non permissive, come nel caso dei PBMCs. Causa di ciò è la presenza nelle cellule non permissive di un soppressore dell'infettività virale, che viene sopraffatto dalla proteina *Vif*; le funzioni attribuite a questa proteina in seguito sono in linea generale conservate tra i lentivirus e sono riconducibili al motivo conservato (S/T)LQ(F/Y/R).

E' stato confermato da uno studio di Chatterj et al.(1999), mediante l'utilizzo di Ac monoclonali, che FIV *Vif* si localizza e svolge il suo ruolo principale a livello del nucleo delle cellule infette; HIV *Vif* invece si individua principalmente a livello citoplasmatico, caratteristica osservata talvolta anche per FIV *Vif*.

Le differenti localizzazioni di FIV *Vif* potrebbero però essere condizionate dal metodo adoperato per fissare le cellule infette (formaldeide o metanolo).

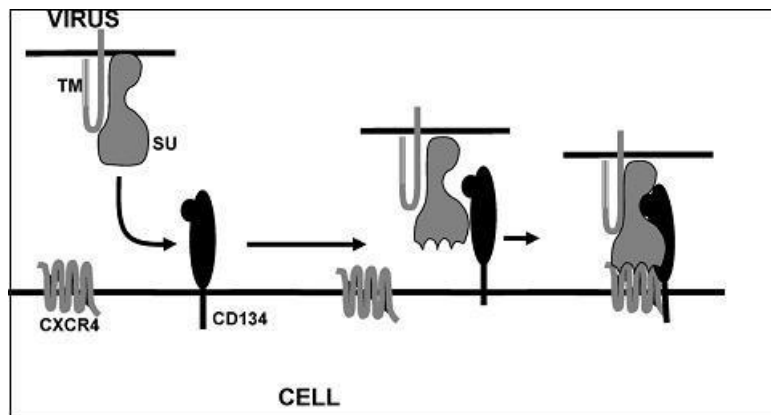


HIV Vif agisce anche nel ridurre le mutazioni causate dalla transizione G→A prevenendo la deaminazione della citidina da parte della deaminasi cellulare APOBEC-3G (Tomonaga and Mikami,1996,Elder et al.,2008,Chatterji et al.,1999).

### 2.1.2 Ciclo replicativo

Il tropismo virale è determinato dalle interazioni *envelope*-recettore, al momento dell'ingresso nella cellula ospite, e dall'efficienza con cui il promotore influenza l'espressione genica (Mustafa et al.,2005,Ikeda et al.,1998).

La cellula può essere infettata se presenta le caratteristiche di sensibilità, condizionata dalla presenza di recettori che permettano l'adsorbimento, e di permissività, ovvero dotata di tutti i meccanismi molecolari necessari alla trascrizione del genoma virale ed alla sintesi di tutte le proteine per le quali codifica. Gli eventi precoci dell'infezione consistono nell'attacco al recettore di legame CD134 (adsorbimento) sulla superficie della cellula ospite da parte della proteina glicosilata SU presente sull'*envelope* virale ed il legame proteina TM-corecettore CXCR4 (recettore di fusione) che determina la fusione tra i lipidi del virus e la membrana cellulare concludendosi con la penetrazione del core virale nel citoplasma, costituito da un guscio esterno di proteine capsidiche che circondano la struttura centrale nucleocapsidica (RNA genomico dimerizzato, proteine NC, tRNA<sup>Lys</sup>primers) (Elder et al.,2008, Shimoojima et al.,2004).



**Fig.2.2:** Rappresentazione degli eventi di legame al recettore durante l'infezione da parte di FIV. Il primo legame al CD134 causa un cambio conformazionale nella glicoproteina di superficie di FIV (SU), che incrementa l'affinità di legame al recettore delle chemochine, CXCR4. I successivi eventi di fusione che coinvolgono la membrana cellulare dell'ospite e la proteina trans membrana virale, TM, facilitano l'ingresso virale (da Elder et al.,2008,modificata).

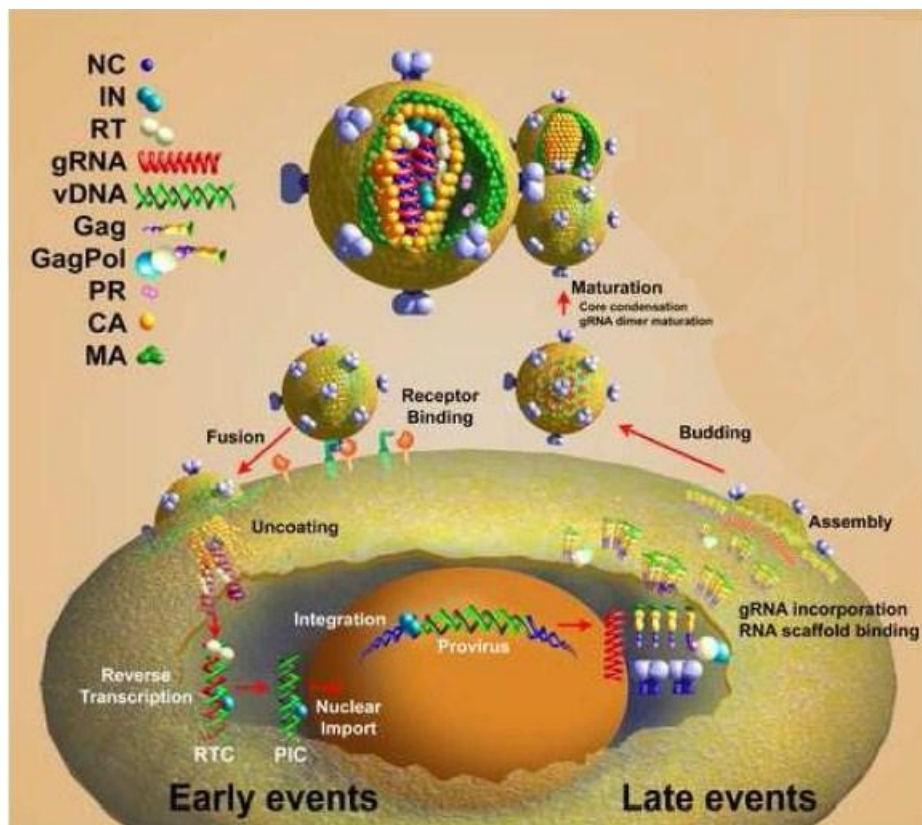
Al momento dell'ingresso avvengono in concomitanza lo scapsidamento del *core* virale, ed il processo di retrotrascrizione da parte della retrotrascrittasi virale (RT)(Thomas and Gorelick,2009, Mougel et al.,2009).

La RT sintetizza dsDNA a partire dall'RNA genomico virale, attingendo al pool intracellulare di dNTPs, attraverso un processo complesso, studiato nel dettaglio, che ricorda quello di altri retrovirus (Thomas and Gorelick,2009, Saenz and Poeschla, 2004).

Le proteine NC stabilizzano i filamenti di DNA in formazione.

Una volta terminata la retrotrascrizione, il dsDNA virale, associato a proteine cellulari e virali, viene trasportato nel nucleo (Thomas and Gorelick,2009, Mougel et al.,2009).

Infine il DNA virale si integra all'interno del genoma della cellula infetta, formando il pro virus. Questo processo è mediato dall'enzima IN virale, che interagisce con le estremità LTR (Thomas and Gorelick, 2009, Mougel et al.,2009).



**Fig.2.3:** Ciclo replicativo retrovirale (da Thomas and Gorelick,2008,modificata).

Il provirus formatosi dopo il processo di integrazione presenta le tre grandi ORF *gag*, *pol* ed *env* caratteristiche di tutti i retrovirus, organizzate nell'ordine 5'-*gag-pol-env*-3'. Alle estremità del DNA provirale si trovano invece le LTR (ripetizioni

terminali ripetute non codificanti estremamente conservate, organizzate nella sequenza U3-R-U5), formatesi per retrotrascrizione a partire dalle TR (*terminal repeats*) dopo le primissime fasi della replicazione.

La trascrizione degli mRNA virali avviene ad opera della RNA polimerasi II dell'ospite, che riconosce il promotore virale costituito dalle LTR.

La proteina Rev facilita il trasporto verso il citoplasma degli mRNA che hanno subito *splicing* singolo (Env, Vif e Vpu in HIV-1) o nessuno (Gag-Pol), necessari durante le fasi tardive della replicazione. Una volta sintetizzata la proteina strutturale maggiore Gag, questa si associa al doppio strato lipidico ed oligomerizza: l'incapsidamento è il processo nel quale l'mRNA genomico viene incorporato nel virione che si sta assemblando; è mediato principalmente dall'interazione tra le proteine virali CA e NC e sequenze *cis*-agenti dell'RNA genomico, che assume perciò un ruolo attivo durante l'assemblaggio retrovirale in quanto fornisce la struttura che facilita l'unione tra le proteine Gag.

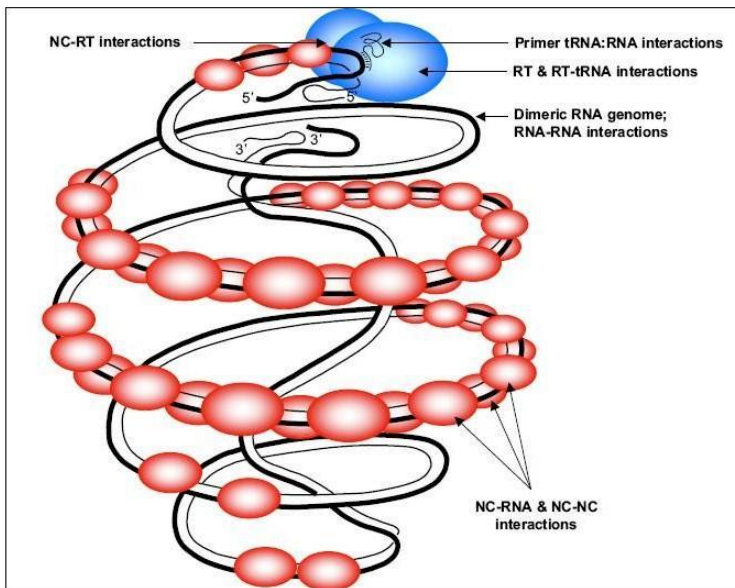
Allo stesso tempo la proteina dell'*envelope virale* si inserisce a livello della membrana citoplasmatica. Le particelle virali fuoriescono quindi dalla cellula in un processo complesso noto come gemmazione. La maturazione dei virioni avviene in concomitanza con il loro rilascio dalla membrana plasmatica e per azione della proteasi virale (PR), che processa la poliproteina Gag nelle proteine mature MA, CA, NC ed il peptide C-terminale (dominio p2).

Nello stesso tempo avviene anche il taglio della poliproteina Gag-Pol, meno abbondante, che risulta nella formazione degli enzimi PR matura, RT, IN e dUTPasi (solo in FIV ed EIAV in quanto sono entrambi lentivirus  $DU^+$ ) (Thomas and Gorelick,2009, Mougél et al.,2009, Luttge et al.,2007, Juan Martín Serrano,2007, Tomonaga and Mikana,1996). L'enzima dUTPasi è codificato dal gene DU compreso nella regione di *pol* tra RT ed IN; rappresenta un enzima fondamentale per garantire l'efficienza della replicazione in cellule che non si stanno dividendo, come nel caso di infezione di macrofagi primari, un tipo cellulare caratterizzato da bassi livelli endogeni di attività dUTPasica (Elder et al.,2008, Lerner et al.,1995, Mansky et al.,2000, Prasad et al.,1996).

Dal momento in cui il virus penetra nella cellula ospite fino alla fase finale di produzione dei primi virioni della progenie intercorre il periodo di eclisse durante il quale l'agente infettante non è più rilevabile nella cellula come entità, nonostante vi sia un'intensa attività metabolica (Thomas and Gorelick,2009, Mougél et al.,2009, Luttge et al.,2007, Juan Martín Serrano,2007, Tomonaga and Mikana,1996).

## 2.2 Regione del Nucleocapside

La proteina nucleocapside (NC) , codificata dal gene *gag*, si posiziona all'interno del *core* virale e riveste due molecole dell'RNA genomico virale. L'incapsidamento selettivo dell'RNA genomico virale *full-length*, che non ha subito *splicing*, dall'insieme di RNA virali e cellulari è una tappa essenziale nel ciclo vitale di tutti i retrovirus; richiede il riconoscimento da parte della poliproteina Gag non processata di una sequenza dell'RNA, situata all'estremità 5' del genoma e spesso sovrapposta parzialmente al gene *gag*. Il dominio nucleocapside della proteina precursore Gag è cruciale per l'incapsidamento dell'RNA genomico in diversi retrovirus. Tutte le proteine NC retrovirali mostrano un alto contenuto di residui basici e, ad eccezione degli spumavirus, contengono una o due copie di un motivo di legame allo Zinco (*Zinc finger motif*) rappresentato dalla sequenza Cys-X2-Cys-X4-His-X4-Cys, simile a quelle osservate in molte proteine deputate a legare il DNA. Sostituzioni aminoacidiche dirette contro i residui basici, così come contro i motivi *Zinc finger* della proteina NC, interferiscono con il legame all'RNA in vitro e con l'incapsidamento dell'RNA all'interno della particella in formazione in vivo. Oltre al ruolo di incapsidamento dell'RNA genomico, è stato riferito che il dominio NC del precursore Gag promuove l'*annealing* del primer tRNA al sito di legame per il primer presente nel genoma e facilita la dimerizzazione dell'RNA genomico. Inoltre è stato dimostrato il ruolo svolto dalla proteina NC matura durante le fasi precoci del ciclo di replicazione retrovirale. Diversi studi hanno sottolineato l'importanza del dominio NC di HIV-1 nell'oligomerizzazione della proteina Gag e nell'assemblaggio virale. A differenza delle proteina NC di HIV-1, a proposito della quale son stati pubblicati numerosi lavori che descrivono le sue funzioni, per quanto riguarda il NC di FIV non son state fornite adeguate informazioni sul ruolo svolto da questa proteina nel ciclo vitale dei lentivirus di non-primati. Posto che FIV ed il suo ospite d'elezione (il gatto) sono comunemente utilizzati come animale modello per i vaccini contro HIV-1 e per la messa a punto di altre strategie antiretrovirali, risulta quindi di fondamentale importanza la caratterizzazione degli elementi molecolari coinvolti nella funzione del NC di FIV (Manrique et al.,2004).



**Fig 2.4:** Schema del complesso di replicazione retrovirale, che mostra chiaramente le interazioni che si stabiliscono tra proteine NC e NC-RNA (da Mougel et al.,2009, modificata).

### 2.3 I Late Domains

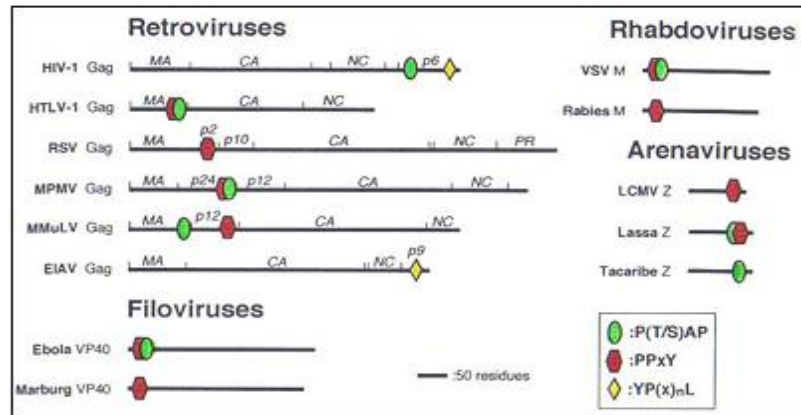
Studi di mutazioni e delezioni a carico della poliproteina Gag hanno permesso di definire brevi motivi aminoacidici richiesti per l'efficiente rilascio delle particelle virali dalle cellule infettate. Tali sequenze sono state chiamate "Late Domains" o "L-Domains", poichè in caso di mutazioni a carico di esse l'assemblaggio del virus è arrestato nelle fasi tardive del ciclo replicativo. Finora sono state ben caratterizzate tre diverse classi di domini tardivi, altamente conservati, ricchi in prolina e presenti in virus ad RNA a polarità positiva o negativa dotati di envelope, il cui ruolo consiste nel reclutamento di fattori cellulari fisiologicamente coinvolti nella generazione di vescicole nel compartimento endosomiale Multivesicular Body (MVB). Le sequenze degli L-Domains identificati sono di seguito riportate:

**P(T/S)AP:** il motivo è stato identificato per la prima volta nella regione carbossiterminale (dominio p6) della proteina Gag di HIV-1 ed è stato successivamente riscontrato anche in HTLV-1 (Human T-cell Leukemia Virus), in M-PMV (Mason-Pfizer Monkey Virus), nella proteina VP40 della matrice del virus Ebola e in alcuni arenavirus. La sequenza aminoacidica PSAP è, inoltre, presente in FIV, il quale, pur essendo sprovvisto del dominio p6 di HIV-1, possiede una regione funzionale analoga, detta p2;

**YP(x)nL:** il motivo YPDL è stato identificato nella proteina Gag del lentivirus non primate EIAV (Virus dell'Anemia infettiva Equina), mentre il motivo correlato YPLTSL è stato ritrovato in HIV-1;

**PPxY:** il motivo, caratteristico degli oncoretrovirus, è stato inizialmente identificato nella proteina Gag di RSV (Virus del Sarcoma di Rous) e ritrovato in molti altri

retrovirus, tra cui HTLV-1 e MLV (Virus della Leucemia Murina), rhabdovirus, filovirus (Ebola) e in alcuni arena virus.



**Fig.2.5:** Organizzazione e motivi dei *Late Domains*

Studi presenti in letteratura hanno dimostrato che i domini L possono essere interscambiabili, ma in qualche caso esibiscono dipendenza dal contesto. Tipicamente, i Late Domain lentivirali si collocano all'estremità carbossiterminale della poliproteina Gag, mentre il motivo PPxY degli oncoretrovirus si trova nella regione amino terminale. I domini tardivi possono essere presenti in singola copia o in diverse combinazioni nelle proteine strutturali e sembrano mostrare un effetto sinergico. A tale proposito, è degno di nota l'L-Domain della matrice del filovirus Ebola (PTAPPMEY) che, caratterizzato dalla sovrapposizione dei motivi P(T/S)AP e PPxY, conferisce al virus una lauta efficienza di rilascio.

L'assenza di tali domini funzionali porta al corretto assemblaggio di particelle virali mature che, tuttavia, restano attaccate alla membrana accumulandosi sulla superficie cellulare. Studi sui domini L hanno, inoltre, messo in luce la capacità differenziale dei diversi motivi aminoacidici di produrre VLP a partire da mutanti esprimenti specifiche porzioni di Gag .

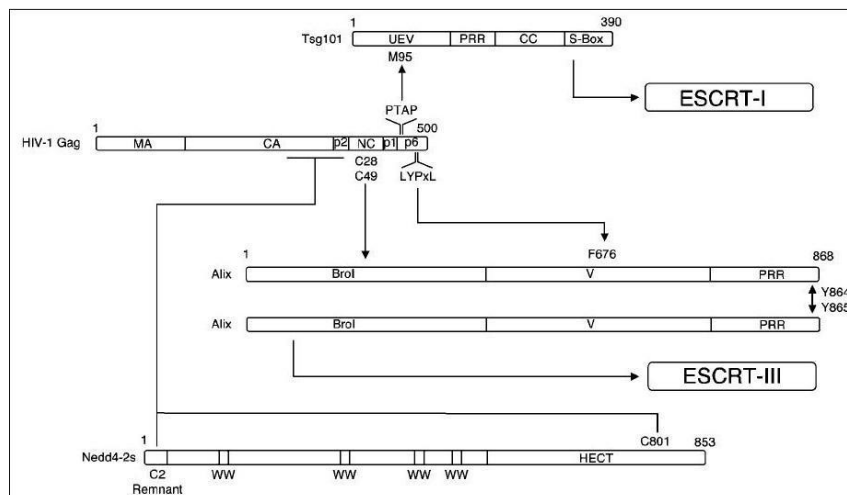
Il reclutamento diretto di fattori cellulari coinvolti nella biogenesi degli MVB da parte dei domini tardivi suggerisce che la gemmazione dei retrovirus, e di altri virus appartenenti a differenti famiglie, sia un processo topologicamente identico alla formazione di vescicole intraluminari nei *Multivesicular Bodies*. In particolare, le particelle virali sfruttano il processo per gemmare dalla membrana plasmatica delle cellule infettate oppure dai MVB stessi, venendo poi esocitate all'esterno. Fisiologicamente, nelle cellule il MVB costituisce un organello intermedio del *pathway* endocitico, che media la traslocazione di proteine opportunamente ubiquitinate dalla membrana plasmatica o dall'apparato di Golgi ai lisosomi per la degradazione. La biogenesi degli MVB consiste nella gemmazione di vescicole intraluminari recanti le proteine destinate al compartimento lisosomiale ed è guidata da una classe di proteine (*Vacuolar Protein Sorting* di classe E) organizzate in quattro

complessi agenti in sequenza, denominati ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*). In particolare, studi di doppio ibrido in lievito hanno messo in luce che il dominio tardivo P(T/S)AP, tipico dei lentivirus, interagisce con la proteina Tsg101 del complesso ESCRT-I. È interessante notare che il medesimo motivo PTAP viene impiegato per l'interazione con Tsg101 dal suo partner cellulare ESCRT-0. Diversi studi hanno, invece, dimostrato che l'L-Domain YP(x)nL è in grado di interagire con la proteina di Classe E AIP1/ALIX (ALG-2 interacting protein x), che svolge un ruolo di connessione tra i complessi ESCRT-I ed ESCRT-III del pathway dei MVBs. Infine, il motivo PPxY è presente in numerose proteine cellulari che interagiscono con altre proteine mediante domini WW (Trp-40aa-Trp). Numerosi studi hanno identificato nelle proteine della famiglia Nedd4 (Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4) delle ubiquitina ligasi E3 l'interattore del dominio tardivo oncoretrovirale PPxY. Questa classe di proteine è, infatti, caratterizzata dal possesso di più copie di domini WW ed è coinvolta nel processo di biogenesi degli MVB.

La proteina strutturale Gag del Virus dell'Immunodeficienza Felina non è ancora stata caratterizzata in modo esaustivo. L'analisi della sequenza aminoacidica della regione carbossiterminale della poliproteina ha portato all'identificazione di una sequenza a potenziale funzione di Late Domain: PSAPPMEEKLLDL (seq. aa 438-450).

## 2.4 La proteina AIP-1/Alix

Alix è il nodo centrale della fitta rete che connette le proteine di ESCRT: mette in relazione il traffico endosomale/lisosomale, il *pathway* che conduce le cellule alla necrosi ed il citoscheletro. Può intervenire in molteplici processi per il fatto che possiede una struttura modulare.



**Fig.2.6:** HIV-1 Gag prende contatto tramite diversi domini con le proteine cellulari per uscire dalle cellule infette. La proteina Alix lega la regione del NC, il dominio LYPxL e una sub unità del complesso ESCRT-III. PRR, *prolin rich region*; UEV, ubiquitin 2 variant (da Carlton and Juan Martín-Serrano,2009,modificata).

Comprende un dominio Bro1 tra i primi 359 residui a.a., definito in tal modo poiché Alix è la proteina ortologa di Bro1 in lievito; i domini Bro1 sono strutture conservate, possiedono una forma particolare ,“a boomerang”, che conduce verso le membrane endosomali attraverso il legame con la proteina CHMP4, conosciuta in lievito come Vps32/SNF7 (Lee et al.,2008).

Il dominio Bro1 di Alix interagisce inoltre con la regione del NC di HIV-1 Gag e mutazioni del NC che interferiscono con questa interazione comportano la comparsa di un fenotipo analogo ai mutanti nell'*L-domain* (accumulo delle proteine del capsid CA-p2 e di p41-Gag, intermedi del taglio proteolitico ). Quest'interazione dipende dai motivi conservati *Zinc Fingers* , che si suppone agiscano da mediatori per le interazioni sequenza-specifiche con il segnale di *packaging* nell'RNA genomico virale (Popov et al.,2009).

I residui centrali 360-716 di Alix comprendono invece un secondo dominio responsabile del legame ai motivi virali LYPXnLXXL, di cui però non si conosce la normale funzione fisiologica. Infine i residui 717-868, situati nella regione C-terminale, comprendono un dominio ricco di proline (PRD) che i metodi di predizione del folding hanno definito “senza struttura” (Lee et al.,2008). Il PRD di Alix interagisce direttamente con Tsg101 (Vps23 in lievito), subunità di ESCRT-I. Qualora si sovraesprima il solo dominio V di Alix (residui 360-702), che lega Gag, ne consegue un'inibizione del rilascio dei virus forniti di quel motivo (HIV-1 ed EIAV) poiché è una variante tronca, in cui sono assenti sia il dominio critico Bro1 che i domini ricchi di prolina di Alix.

Al contrario il rilascio di FIV non è influenzato negativamente dalla mancanza di Alix né se si sovraesprime il dominio V di quest'ultima proteina. L'attività di questi inibitori dominanti negativi, come il frammento V, è *L-domain* dipendente e permette di identificare e caratterizzare i *late domains* virali e comprendere più a fondo la gemmazione virale (Luttge et al.,2007 e 2008) .

Sovraesprimendo Alix *full-length* o il suo dominio Bro1 N-terminale si ristabilisce la gemmazione delle particelle virali dovuta a mutazione del dominio PT/SAP. Questa *rescue* richiede che vi sia un sito di legame a ESCRT-III intatto nel dominio Bro1. Sebbene la mancanza di Alix o mutazioni nel sito di legame di Alix sembra non inibiscano significativamente la gemmazione di HIV-1, riducono però l'infettività delle particelle rilasciate, forse a causa di difetti nella morfogenesi dei virioni che restano ancorati alla membrana plasmatica, a dimostrazione del fatto che danneggia anche l'assemblaggio virale (Luttge et al.,2008, Fujii et al.,2009).



## **2.5 FIV animale modello per lo sviluppo di vaccini e terapie farmacologiche contro HIV-1**

FIV infetta il gatto domestico inducendo una patologia che si evolve con modalità simili a quelle osservate per HIV nell'uomo. I due virus condividono molte caratteristiche del ciclo vitale, i *targets* della cellula ospite a cui sono diretti e le funzioni delle proteine codificate dal loro genoma.

I bersagli presi in considerazione per lo sviluppo di strategie antivirali sono i più svariati; si può citare come esempio la caratterizzazione di molecole capaci di inibire le interazioni HIV-1 RT-NC e bloccare pertanto l'attività di *chaperon* nelle cellule che producono virioni e nel complesso RTC formatosi immediatamente dopo l'infezione.

Per raggiungere questo obiettivo occorre caratterizzare ogni fattore coinvolto nel funzionamento della proteina NC di FIV: mediante mutagenesi sito-specifica è possibile ottenere informazioni preziose al riguardo. È stato osservato con questa strategia che il primo *Zn-finger* svolge un ruolo predominante sia per il legame all'RNA sia nella fase di assemblaggio e che alcuni piccoli domini della regione C-terminale di Gag (*L-domains*) sono necessari per l'efficiente produzione di particelle virali in quanto legano una proteina che sfrutta il *pathway* dei MVB per la gemmazione.

Le proteasi sono invece il bersaglio dei composti inibitori delle PR, decisamente utili come strategia antivirale se si considera il fatto che è indispensabile un corretto processamento delle proteine precursore Gag e Gag-Pol, regolato appunto dalle PR, per la produzione di progenie virale capace di causare infezione e di replicarsi. Le sperimentazioni in corso su questi farmaci utilizzano vettori per trasfezione di colture cellulari e perseguono l'obiettivo di apportare dei miglioramenti che li rendano altamente specifici e capaci di bloccare non solo le PR dei ceppi virali *wild type* ma anche di quelli che hanno sviluppato farmaco-resistenza. In ogni caso è doveroso valutare anche la loro capacità di entrare nella cellula ed eventuali effetti tossici indesiderati. Gli inibitori in uso contro le proteasi di HIV-1 sono poco attivi contro le proteasi di FIV (Mougel et al., 2009, Manrique et al., 2004, Lin et al., 2006).

Inibitori delle PR altamente specifici, se usati in combinazione con inibitori della RT costituiscono le terapie antiretrovirale ad alta attività (HAART) che sopprimono la replicazione di HIV-1 fino a rendere quasi impossibile la sua individuazione (Elder et al., 2008).

Un altro punto essenziale da considerare perché si possa ostacolare il virus è dato dal ripristino dei livelli di cellule T dell'ospite, il cui sistema immunitario risulta notevolmente indebolito. A questo fine sono utilizzati farmaci inibitori della RT, come l'AZT e PMEA. L'AZT attenua la sintomatologia e aumenta il rapporto cellule CD4:CD8 pur non impedendo la diffusione del virus alle cellule circostanti né allungando la vita dell'animale infetto.

La replicazione di FIV può invece essere rallentata dalla citochina ricombinante umana IFN- $\alpha$  ed ha un effetto sinergico con l'AZT.

Tra le citochine IL-7, IL-2, IL-12 e IL-15, la IL-7 è quella maggiormente usata, capace di accrescere la popolazione di cellule T. La sua attività antiretrovirale

consiste principalmente nella capacità di stimolare la proliferazione dei linfociti T ed attività anti apoptotica verso questo tipo cellulare; contemporaneamente però regola positivamente l'espressione del CXCR4mRNA nei linfociti maturi facilitando perciò l'infezione delle cellule che lo esprimono, in quanto corecettore per HIV e FIV.

Altri agenti capaci di rigenerare la funzionalità timica sono il GH, l'Insuline-like Growth Factor-1, il Keratinocyte-GF o farmaci antagonisti dei recettori per gli steroidi sessuali (Kolenda-Roberts et al.,2008).

Per quanto riguarda il campo della terapia genica sono in commercio sia vettori virali che non-virali.

I vettori non-virali sono rappresentati dai liposomi, emulsioni, metodo di co-precipitazione del DNA col calcio fosfato e cationi lipidici complessati al DNA plasmidico, carico negativamente, che favoriscono il legame alla cellula ed il suo *uptake*.

La co-precipitazione col Calcio-fosfato resta il metodo di trasfezione maggiormente adottato quando si adoperano vettori lentivirali. I mezzi di trasfezione sopra elencati possono essere adottati sia per transgenesi in colture cellulari sia in animali modello. L'efficienza di trasfezione è influenzata da svariati fattori: la dimensione, carica, presenza di siero ma il principale è il rapporto del DNA *carrier* con il DNA di interesse (Kim et al.,2003,Mercedes Segura et al.,2007).

I vettori virali (adenovirali, oncoretrovirali, vettori HIV e altri lentivirali) sono molto efficienti nella trasduzione; è importante però che siano progettati in modo tale da non avere effetti nocivi per la cellula ed essere adatti per più tipi cellulari. Riguardo al fattore sicurezza sono preferibili i vettori derivati da FIV rispetto ai vettori HIV in quanto FIV non è patogeno per l'uomo ed presenta un rischio minore di ricombinazione per la minima omologia di sequenza con HIV, nonostante l'organizzazione del genoma sia simile.

I vettori lentivirali presentano numerosi vantaggi: efficiente integrazione nel genoma cellulare, principalmente in geni attivamente trascritti distanti dai promotori, capacità di trasdurre cellule quiescenti o in divisione e basso rischio di mutagenesi inserzionale (Pistello et al.,2007).

### 3. SCOPO

Numerose evidenze di letteratura hanno dimostrato l'importanza di specifiche interazioni tra proteine cellulari, coinvolte nel sistema endo-lisosomiale, e proteine virali nella fuoriuscita dei virus dotati di envelope dalle cellule infettate (gemmazione).

Il presente progetto di tesi è stato condotto con l'intenzione di chiarire il ruolo svolto dalla proteina nucleocapside (NC) del Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) nelle fasi tardive della gemmazione virale e di verificare l'esistenza di un possibile coinvolgimento di specifiche proteine cellulari nel rilascio di FIV. In tale contesto ci si è proposto di agire a livello delle sequenze CCHC degli *Zinc finger del NC*, introducendo singole sostituzioni aminoacidiche a carico delle Cisteine, associate o meno a mutazioni a livello di altre regioni della proteina strutturale Gag, dalla quale il NC prende origine, del virus per le quali era già stato dimostrato un ruolo nella gemmazione. Gli effetti prodotti sul rilascio delle particelle virali e sul corretto processamento delle stesse sono stati osservati.



## 4.MATERIALI E METODI

### MATERIALI

#### 4.1 Linee Cellulari

Per questo lavoro sperimentale è stata utilizzata la seguente linea cellulare:

**293T**: cellule embrionali di rene umano, a morfologia stellata che esprimono costitutivamente l'antigene proteico T del Virus Vacuolante della Scimmia (SV40) permettendo un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici contenenti l'origine di replicazione di tale virus. La linea cellulare è stata gentilmente fornita dal Dott. D. Baltimore (Rockefeller University, New York).

Le cellule 293T sono state coltivate in terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's medium*) addizionato con il 10% (v/v) di FCS (*Fetal Calf Serum*), inattivato a 56°C per 30 minuti.

Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore Hereaus BDD 6220 alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5% (v/v) di CO<sub>2</sub> e sottoposte a periodici controlli per escludere eventuali contaminazioni.

#### 4.2 Plasmidi

Sono qui di seguito descritti i plasmidi utilizzati in questo lavoro di tesi:

- ❖ **pΔenv1**: contiene i geni *gag*, *pol*, *vif*, *ORF-A*, *rev*, la sequenza RRE di FIV, derivanti dal clone molecolare p34TF10 (codice accesso NC\_001482). Rispetto al genoma *wild type*, pΔenv1 presenta la LTR all'estremità 5' sostituita dal promotore del Cytomegalovirus (CMV) e quella all'estremità 3' modificata con il segnale di poli-adenilazione dell'ormone della crescita bovino. Inoltre, presenta una delezione di 1 kb nel gene *env* (Δenv) e la delezione del segnale di incapsidamento (ΔΨ). pΔenv1 è clonato all'interno del *multiple cloning site* del plasmide di clonaggio pUC119, mediante inserimento a livello dei siti di restrizione *EcoRI* e *SalI*. Il plasmide presenta inoltre i seguenti elementi: le origini di replicazione batterica, ColE1, e fagica, F1; il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina; i siti di legame per i primer M13. Il plasmide è stato gentilmente fornito dal Prof. M. Pistello (Università di Pisa, Italia).

**pSP73:** questo plasmide (Promega) contiene il promotore per l'RNA polimerasi del fago SP6 e del fago T7, posti rispettivamente in 5' e in 3'

- ❖ rispetto al sito di policlonaggio. Esso presenta inoltre il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina e l'origine di replicazione batterica ColE1.
- ❖ **pBluescript® II KS(+/-) phagemid:** questo plasmide presenta l'origine di replicazione del fago f1(+) ed il promotore della RNA polimerasi del fago T3 e del fago T7, rispettivamente in posizione 5' e 3' rispetto al sito di policlonaggio (*Stratagene*).
- ❖ **pSP73Mut02:** contiene la regione GagPol di FIV (seq. a.a. 438-450: **ASAAPMEEKLLDL**) nella quale son state inserite le mutazioni **P438A** e **P441A**
- ❖ **pSP73Mut21:** contiene la regione GagPol di FIV (seq. a.a. 438-450: **ASAAPMEEKAAAA**) nella quale son state inserite le mutazioni **L447A**, **L448A**, **D448A** ed **L450A**.
- ❖ **pSP73MutΔp2:** ottenuto mediante delezione dell'intera regione p2, realizzata con la sostituzione della tripletta codificante una Prolina (in posizione 438) con un codone di stop (seq. a.a. 438-450: **STOPASAAPMEEKLLDL**)

Per l'amplificazione dei diversi plasmidi in cellule procariotiche è stato utilizzato il ceppo DH5α di *E. coli* [F'/endA1 hsdR17 ( $r_k^- m_k^+$ ) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (NaI) relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)] (Biolabs Inc.).

I batteri sono stati coltivati in forma liquida in terreno Luria-Bertani [L.B.: Bacto-triptone 1% (p/v), Estratto di lievito 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v)] in agitazione a 37°C. Quando necessario, il terreno è stato solidificato mediante aggiunta di agar 1.5% (p/v). Quando richiesto, è stato aggiunto l'antibiotico di selezione.

### 4.3 Oligonucleotidi

Nelle reazioni di mutagenesi e sequenziamento sono stati utilizzati oligonucleotidi innesco (*primer*) opportunamente disegnati e riportati in Tabella 2.1.

L'oligonucleotide FIV2 è stato impiegato per il sequenziamento del plasmide; quelli a partire da NC1756F fino a NC1852R sono quelli utilizzati per le reazioni di mutagenesi.

<b>Nome primer</b>	<b>Sequenza nucleotidica (5'-3')</b>	<b>T<sub>M</sub></b>
FIV2	GCATGGTATCTCGAGGCATT	50°C
NC1756F	AAAGGATCAGGACCAGTGTCTTTTAATTGTAAAAAACCAGGACAT	77.3°C
NC1756R	ATGTCCTGGTTTTTTTACAATTAAGACACTGGTCCTGATCCTTT	77.3°C
NC1795F	CCAGGACATCTAGCAAGACAATCTAGAGAAGTGAAAAAAT	73.9°C
NC1795R	ATTTTTTCACTTCTCTAGATTGTCTTGCTAGATGTCCTGG	73.9°C
NC1812F	TAGAGAAGTGAAAAAATCTAATAAATGTGGAAAACCTGGTCATGTAG	74.6°C
NC1812R	CTACATGACCAGGTTTTCCACATTTATTAGATTTTTTCACTTCTCTA	74.6°C
NC1852F	CCTGGTCATGTAGCTGCCAAATCTTGCCAAGGAAATAGAAAGAAT	81.1°C
NC1852R	ATTCTTTCTATTTTCCTTGCCAAGATTTGGCAGCTACATGACCAGG	81.1°C

*Tabella 4.1:* Oligonucleotidi utilizzati e loro principali caratteristiche.

## **METODI**

### **4.4 Quantificazione degli acidi nucleici**

Quando necessario, la quantità di DNA plasmidico è stata determinata allo spettrofotometro UV-Visibile NanoDrop®: è uno strumento innovativo capace di determinare in modo accurato la concentrazione e la qualità degli acidi nucleici presenti in microvolumi di campione (2 µl nel nostro caso).

Inoltre la capacità di lavorare anche a concentrazioni estremamente elevate consente di eliminare totalmente l'utilizzo delle cuvette ed il ricorso a diluizioni.

Il risultato è una quantificazione molto accurata ed una misurazione della densità ottica (D.O.) del campione, in quanto tutte le procedure di preparazione non devono essere più effettuate.

La lunghezza d'onda di 260 nm corrisponde al massimo picco di assorbimento per le basi azotate; la concentrazione degli acidi nucleici viene fornita nell'unità di misura ng/µl o µg/µl. I rapporti di assorbanza 260/280 nm e 260/230 nm, determinati in modo automatico, permettono di rilevare la presenza di eventuali contaminazioni: nel primo caso di natura proteica mentre nel secondo da parte di fenoli/polifenoli derivati dalle soluzioni utilizzate per l'estrazione.

Sono state considerate anche le preparazioni in cui il rapporto D.O.<sub>260</sub>/D.O.<sub>280</sub> era compreso tra i valori 1.8 e 2.0.

## 4.5 Tecniche di biologia molecolare

### 4.5.1 Preparazione di DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato estratto dal ceppo DH5 $\alpha$  di E. coli con il metodo della lisi alcalina applicato per preparazioni plasmidiche in piccola scala (miniprep) per piccoli volumi di coltura batterica (1-2 ml). Questa procedura, basata sulla lisi chimica, prevede l'utilizzo di tre diverse soluzioni con le quali si provoca la rottura della parete e delle membrane delle cellule batteriche e l'isolamento del DNA plasmidico da quello cromosomico. Il pellet batterico viene inizialmente risospeso nella prima soluzione "GTE", costituita da: i) glucosio, che riduce le possibilità di rotture accidentali della molecola di DNA ed impedisce alle cellule di scoppiare per le variazioni di pressione osmotica, ii) Tris-HCl, che funge da tampone mantenendo il pH in un range ottimale, iii) EDTA, che indebolisce la parete cellulare attraverso la rimozione degli ioni magnesio, indispensabili per preservare la struttura globale dell'involucro cellulare, ed inibisce gli enzimi cellulari che potrebbero degradare il DNA. La soluzione utilizzata successivamente, che induce il processo di lisi, è costituita da NaOH e dal detergente anionico SDS: il primo provoca un aumento repentino del pH che rompe i legami a idrogeno tra le basi del DNA cromosomico riducendolo in grossi frammenti, a differenza del DNA plasmidico denaturato che mantiene la forma circolare; il secondo solubilizza i lipidi delle membrane ed altera la struttura secondaria delle proteine. Infine viene utilizzata una terza soluzione costituita da potassio acetato ad elevata molarità (5 M) che riporta la soluzione in condizioni normali (pH neutro): i plasmidi rinaturano velocemente riprendendo la conformazione circolare chiusa e restano in soluzione mentre i frammenti di DNA cromosomico si aggregano formando una massa insolubile che precipita insieme ai detriti cellulari e proteine. Il DNA plasmidico isolato è stato quindi precipitato con alcool etilico al 96% (v/v), lavato dai sali con etanolo al 70% (v/v) e successivamente risospeso nel tampone a bassa forza ionica TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8) contenente RNAsi pancreatica 20  $\mu$ g/ml. Questo procedimento è stato solitamente adoperato per verificare la positività dei clonaggi eseguiti in pSP73 e p $\Delta$ env1; il DNA estratto in questo modo presenta solitamente una parte di contaminanti e la misura allo spettrofotometro non permetterebbe di quantificare in maniera esatta. Per la reazione di mutagenesi è stato necessario partire da DNA ad elevata purezza: questo è stato possibile mediante lisi con il "QIAGEN Plasmid MINI Kit", che sfrutta lo stesso principio. In questo modo si può risalire facilmente al valore di concentrazione relativo al solo DNA plasmidico. Per ottenere preparazioni plasmidiche ad elevato grado di purezza e in grande scala (maxi prep) adatte alla trasfezione delle cellule eucariotiche, il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il "QIAGEN Plasmid MAXI Kit" basato sull'utilizzo di



colonne a scambio anionico QIAGEN®. Attraverso questo procedimento il DNA plasmidico si lega alla resina della colonna utilizzando tamponi a bassa concentrazione salina, mentre viene purificato da RNA, proteine e impurità ad alto peso molecolare. Il DNA plasmidico viene poi eluito dalla colonna per mezzo di tamponi ad elevata concentrazione salina. Il plasmide, in seguito, viene concentrato e pulito da sali mediante precipitazione con isopropanolo e lavaggio con etanolo al 70% (v/v).

Il DNA ottenuto è stato controllato mediante restrizione enzimatica, mentre la presenza di eventuali contaminazioni e la resa è stata valutata tramite tecniche spettrofotometriche (si veda Paragrafo 4.4).

#### **4.5.2 Restrizioni enzimatiche**

In questo lavoro sperimentale, le diverse reazioni di restrizione del DNA sono state effettuate utilizzando gli opportuni enzimi (Biolabs) nei rispettivi tamponi di reazione. Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dell'enzima (in genere 37°C) per il tempo richiesto, a seconda del tipo di enzima e delle quantità di DNA da digerire. Al termine della digestione, i campioni sono stati diluiti in colorante [Glicerolo al 5% (p/v), Blu di bromofenolo 0,15% (p/v), Xilene cianolo allo 0,02% (p/v) e EDTA 0,002 M] al fine di visualizzare il fronte di migrazione della corsa elettroforetica e facilitare l'entrata del campione di DNA nel pozzetto d'agarosio all'1% (p/v) (Seakem). Al gel d'agarosio è stato addizionato bromuro di etidio (0,5 µg/ml), molecola fluorescente che si intercala fra le basi di DNA, rendendolo visibile quando irradiato con luce UV. Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato il tampone salino TBE 1X (Tris-borato 0,009 M, EDTA 1 mM pH 8). Inoltre, per verificare la corretta dimensione dei frammenti sono stati utilizzati opportuni *marker* di peso molecolare noto, tra cui il "Marker VII" (0,25 µg/ml; bande 576/7427/6106/4899/3639/2799/1953/1882/1515/1482/1164/992/710/492/359 pb) e il "Marker II" (0,25 µg/ml; bande 23130/9416/6557/4361/2322/2027/564 pb) (Roche/Boehringer).

#### **4.5.3 Trasformazione batterica**

La trasformazione batterica è stata effettuata aggiungendo il DNA plasmidico (100-300 ng) oppure i prodotti di ligazione a 50 µl di cellule batteriche *E.coli* competenti (ceppo DH5α), incubando poi in ghiaccio per 30 minuti. In seguito i batteri sono stati sottoposti a shock termico mediante esposizione a 37°C per 2 minuti, raffreddati in ghiaccio e incubati a 37°C per un'ora in 200 µl di LB, consentendo così l'espressione e la sintesi della proteina che conferisce la resistenza all'antibiotico di selezione.

Infine, tutta la sospensione è stata seminata in piastre Petri contenenti LB-Agar addizionato con ampicillina 100 µg/ml e incubati 16 ore a 37°C al fine di selezionare i batteri trasformati.

#### 4.5.4 Tecniche di clonaggio

La strategia di clonaggio prevede di ottenere il frammento da clonare mediante restrizione enzimatica a partire dal plasmide appropriato. Alla fine della reazione la miscela viene sottoposta a corsa elettroforetica in gel d'agarosio per controllare la corretta dimensione dei frammenti, mediante l'utilizzo di *marker* di peso molecolare noto. Il frammento di gel, contenente la banda corretta, viene inciso con un bisturi ed il DNA viene purificato attraverso l'uso del kit *QUIAGEN*<sup>®</sup> "*QIAquick gel extraction kit*". Questo sistema è basato sulla solubilizzazione dell'agarosio e sul successivo legame specifico degli acidi nucleici alla membrana di silice-gel di una colonna a scambio anionico in presenza di un agente caotropico. La separazione finale del DNA linearizzato da sali ed enzimi è resa possibile attraverso una serie di eluizioni progressive. Dopo il taglio enzimatico, la sequenza è inserita nel plasmide opportuno, anch'esso trattato mediante reazione enzimatica per permettere l'introduzione del frammento. Per tale scopo è usata la DNA ligasi del batteriofago T4 ( $4 \times 10^5$  U/ml) (Biolabs), enzima in grado di catalizzare *in vitro* la formazione di legami fosfodiesterici tra il residuo 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 1 unità di ligasi e incubate a 16°C per 16 ore.

Le quantità di vettore ed inserto da utilizzare nella reazione di ligazione vengono determinate utilizzando la seguente formula:

$$X \text{ (ng)} = [ Y \text{ pb} \times 300 \text{ ng} ] / V \text{ pb}$$

Dove: X = ng inserto  
Y pb = paia di basi dell'inserto  
300 ng = 300 ng di vettore  
V pb = paia di basi del vettore plasmidico

I prodotti di ligazione sono poi utilizzati per la trasformazione dei batteri come descritto nel Paragrafo 4.5.3.

Le colonie resistenti all'ampicillina vengono incubate in 5 ml di terreno LB, in presenza di antibiotico (100 µg/ml), e fatte crescere 16 ore a 37°C in agitazione. La presenza del DNA plasmidico viene verificata usando il protocollo delle "*miniprep*" (si veda Paragrafo 4.5.1). Successivamente il DNA plasmidico viene controllato mediante reazione enzimatica, gel elettroforesi e sequenziamento.

#### 4.5.5 Sequenziamento dei plasmidi

Oltre all'analisi mediante restrizione enzimatica, i costrutti ottenuti in questo lavoro sono stati controllati tramite sequenziamento. A tal fine, è stato utilizzato il kit “*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction*” (Applied Biosystem), basato sul metodo di Sanger modificato (Sanger *et al.*, 1977), in cui si utilizza la DNA polimerasi AmpliTaq® per sintetizzare copie di DNA a singolo filamento. Nella miscela di reazione, oltre ai quattro deossinucleotidi trifosfato (dNTPs), è stata aggiunta una miscela di dideossinucleotidi trifosfato (ddNTPs), ognuno dei quali è coniugato ad un diverso cromoforo. Tali gruppi, legati ai ddNTPs per non interferire stericamente con la reazione di polimerizzazione, quando eccitati alla stessa lunghezza d'onda di 448 nm, sono in grado di emettere fluorescenza a lunghezze d'onda diverse comprese tra 500 nm e 700 nm. Si ottiene così una serie di filamenti di DNA di sequenza complementare allo stampo, interrotti in punti casuali dai ddNTPs fluorescenti. I diversi frammenti vengono quindi separati per gel elettroforesi capillare e rilevando la lunghezza d'onda di emissione associate ai diversi dideossinucleotidi è possibile ricostruire la sequenza del DNA in analisi. Tale procedura è stata effettuata utilizzando un sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystem).

La reazione di sintesi è stata allestita in un volume finale di reazione di 10 µl contenente: 300 ng di DNA estratto dalle preparazioni plasmidiche, il *primer* di innesco alla concentrazione 1 µM, 1 µl di *buffer* 5X (Tris-HCl 200 mM, pH 9, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), 1 µl della miscela del kit e acqua milliQ per arrivare a volume. Come inneschi sono stati utilizzati opportuni oligonucleotidi riportati in Tabella 3.1.

Sono stati effettuati 35 cicli di amplificazione in termociclatore, comprendenti una fase di denaturazione a 95°C per 10 secondi, una fase di appaiamento degli oligonucleotidi a 50°C per 10 secondi e una fase di elongazione a 62°C per 4 minuti. Allo scopo di denaturare il DNA stampo e di attivare la polimerasi, i 35 cicli sono stati preceduti da un'incubazione delle miscele di reazione a 95°C per 10 minuti. I campioni sono stati mantenuti a 4°C fino al momento della purificazione. Il prodotto della reazione di sequenziamento è stato precipitato in presenza di 1/10 del volume di sodio acetato 3M pH 4.6 e 2 volumi di etanolo e risospeso in acqua.

L'elettroforesi capillare dei prodotti di estensione è stata eseguita nel sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 (Applied Biosystem).

#### 4.5.6 Mutagenesi

Al fine di modificare la sequenza aminoacidica CCHC del primo o secondo *Zinc finger* della regione NC della poliproteina Gag di FIV, la sequenza nucleotidica *wild*

*type* di interesse è stata mutagenizzata con il kit “*QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit*” (Stratagene). Il protocollo prevede la sintesi del filamento mutante a partire dal template di interesse mediante PCR, la digestione del DNA parentale ed infine la trasformazione della molecola mutante in cellule di *E. coli* (ceppo XL1-Blue) competenti.

La procedura sperimentale prevede, innanzitutto, la reazione di sintesi del filamento mutante mediante PCR. Si prepara la seguente miscela: 5 µl di *buffer* di reazione 10X (Stratagene®), circa 50 ng di DNA template a doppio filamento, 125 ng di oligonucleotidi innesco contenenti la sostituzione nucleotidica (si veda Tabella 3.1), 1 µl di miscela contenente i 4 dNTPs (Stratagene®) ed acqua milliQ fino a volume di 50 µl. Successivamente si è aggiunto 1 µl di *PfuUltra™ High-Fidelity* DNA polimerasi (2.5 U/µl). Vengono effettuati 12 cicli di amplificazione in termociclatore, comprendenti una fase di denaturazione a 95°C per 30 secondi, una fase di appaiamento degli oligonucleotidi a 55°C per 1 minuto ed una fase di elongazione a 68°C per 5 minuti e 30 secondi. Allo scopo di denaturare il DNA stampo e di attivare la polimerasi, i 12 cicli vengono preceduti da un'incubazione delle miscele di reazione a 95°C per 30 secondi.

Dopo la reazione di amplificazione, la miscela viene incubata in ghiaccio per 2 minuti al fine di raffreddarla e, di seguito, viene aggiunto 1 µl di endonucleasi di restrizione *DpnI* (10 U/µl) allo scopo di digerire il DNA parentale emimetilato o metilato. La reazione viene centrifugata per 1 minuto a 13000 rpm e incubata a 37°C per 1 ora.

L'ultima fase prevede la trasformazione di 1 µl di DNA trattato con *DpnI* in 50 µl di batteri *E. coli* (ceppo XL1-Blue) supercompetenti (Stratagene®), incubando poi la miscela in ghiaccio per 30 minuti. In seguito i batteri sono stati sottoposti a shock termico mediante esposizione a 42°C per 45 secondi, raffreddati in ghiaccio e incubati a 37°C per un'ora in 500 µl di LB, consentendo così l'espressione e la sintesi della proteina che conferisce la resistenza all'antibiotico di selezione. Infine, metà della sospensione viene seminata in piastre Petri contenenti LB-Agar addizionato con ampicillina 100 µg/ml e incubati 16 ore a 37°C al fine di selezionare i batteri trasformati.

Le colonie batteriche ottenute vengono incubate in 3 ml di terreno liquido LB contenente ampicillina 100 µg/ml e lasciate incubare a 37°C per circa 16 ore in agitazione. Il DNA plasmidico mutato viene infine purificato mediante *miniprep* (si veda Paragrafo 4.5.1) e successivamente sequenziato (si veda Paragrafo 4.5.5), per valutare l'inserimento della mutazione desiderata. I *primer* utilizzati per il sequenziamento sono riportati in Tabella 4.1.

#### 4.5.7 Tecniche di trasfezione

Nel presente lavoro sperimentale, è stata utilizzata la tecnica del calcio fosfato per introdurre DNA esogeno all'interno delle cellule. Questo è un metodo chimico di trasfezione delle cellule che sfrutta la formazione di un fine precipitato costituito da fosfato di calcio e DNA, in presenza di cloruro di calcio e di tampone fosfato.

Le cellule 293T sono state seminate alla densità di  $1,5 \times 10^6$  in una fiasca da  $25 \text{ cm}^2$  di superficie (Falcon) in 4 ml di terreno DMEM completo, 24 ore prima della trasfezione.

Il giorno successivo le cellule sono state trasfettate nel seguente modo:

- ❖ Trasfezione con il costrutto pΔenv1 o contenente le mutazioni introdotte:

	<b>293T</b>
<b>pΔenv1 o pΔenv1Mut#</b>	1,25 µg
<b>pBSK II</b>	2 µg
<b>Calcio Cloruro (CaCl<sub>2</sub>)</b>	16 µl
<b>TE 1/10 (diluizione 1:10 a partire da TE: Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8)</b>	A volume fino a 160 µl

**Tabella 3.2:** schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la trasfezione delle cellule 293T con il plasmide pΔenv1 o contenente le mutazioni introdotte.

Alla soluzione contenente il DNA sono stati aggiunti goccia a goccia 160 µl di HPB 2X pH 7.1 (100 ml: 5.6 ml NaCl 5M, 10 ml HEPES 0.5M pH 7.1, 1 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.15M, 83.4 ml milliH<sub>2</sub>O) e dopo una incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente, la sospensione con i precipitati di DNA e fosfato di calcio è stata trasferita goccia a goccia sulle fiasche da  $25 \text{ cm}^2$  contenenti le cellule da trasfettare. Circa 10 ore dopo la trasfezione, il terreno di coltura è stato aspirato e sono stati effettuati due lavaggi da 2 ml con DMEM completo: i lavaggi sono necessari quando si utilizza questa tecnica di trasfezione per rimuovere i precipitati non assunti dalle cellule (visibili al microscopio nella forma di piccoli cristalli di colore scuro), per le quali risultano tossici. Infine sono stati aggiunti 7,5 ml di terreno DMEM completo.

#### 4.5.8 Elettroforesi di proteine (SDS-PAGE)

Le cellule trasfettate sono state lisate mediante risospensione in soluzione di lisi [RIPA 1X: NaCl 150 mM, IGEPAL CA-630 1% (v/v), Acido deossicolico 0.5%

(p/v), SDS 1% (p/v), Tris-HCl 50 mM, pH 8.0] con l'aggiunta di una miscela di inibitori delle proteasi, "Complete" (Estratto di pancreas, Pronasi, Termolisina, Chimotripsina, Tripsina, Papaina) (Roche/Boehringer) ed incubate per 30 minuti a 4°C. In questo modo si favorisce la lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine bloccando l'attività delle proteasi intracellulari che una volta rilasciate, potrebbero degradare le proteine di interesse.

In seguito a centrifugazione a 13000 rpm per 30 minuti, il surnatante è stato diluito 1:2 con il tampone di caricamento, Laemmli *Buffer* 2X [Tris-HCl 100 mM, pH 6.8, SDS 4% (p/v), Glicerolo 20% (p/v), Blu di bromofenolo 0.2% (p/v), DTT 200mM]. Prima di essere caricati in gel di poliacrilammide, i campioni sono stati incubati a 100° C per 5 minuti.

Per l'analisi delle proteine sono stati preparati gel di poliacrilammide delle dimensioni di 200 x 200 mm e dello spessore di 1 mm come da ricetta:

- 1 Gel di concentrazione al 4.5% (p/v) di acrilammide costituito da 4 ml di Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 2.4 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v), 160 µl di SDS 10% (p/v), 20 µl di N,N,N,N',N'-tetrametiletilediammina, TEMED e 80 µl di ammonio persolfato, APS 10% (p/v) e portato al volume finale di 16.06 ml con acqua deionizzata;
- 2 Gel di separazione al 10% (p/v) di acrilammide costituito da 12.5 ml di Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 16.6 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v), 500 µl di SDS 10% (p/v), 40 µl di TEMED e 200 µl di APS 10% (p/v) e portato al volume finale di 50 ml con acqua deionizzata.

La migrazione elettroforetica è stata effettuata con un'intensità di corrente costante di 80V per un tempo di 12 ore circa in presenza di un tampone di corsa costituito da: Tris 0.25 M, Glicina 1.9 M, SDS 0.1% (p/v), pH 9.2. Per poter risalire al corretto peso molecolare in kDa delle proteine di interesse è stato utilizzato il *marker* di peso molecolare noto "Fermentas Page Ruler Protein Ladder" (bande 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa )

#### **4.5.9 Western Blotting e sviluppo**

Le proteine separate in gel di poliacrilammide sono state trasferite elettricamente su una membrana di nitrocellulosa ("Hybond-C Extra", Amersham Life Science), utilizzando l'apparato per il trasferimento Trans-Blot Cell (Bio-Rad). Prima del trasferimento, la membrana e il gel sono stati equilibrati per 30 minuti in tampone di trasferimento [Tris 48 mM, glicina 39 mM, metanolo 33% (v/v)]. Il trasferimento è stato condotto per 2 ore a temperatura ambiente al voltaggio costante di 50V. Successivamente, allo scopo di saturare i siti di legame aspecifici, la membrana è stata incubata per 30 minuti in agitazione con una soluzione bloccante [latte scremato in polvere al 5% (p/v) (Bio-Rad) in tampone fosfato PBS + 0.1% (v/v) Tween 20]. In

seguito è avvenuta l'incubazione a 4°C per 16 ore in agitazione con l'anticorpo primario: è stato utilizzato, per valutare la proteina Gag e i suoi prodotti di processamento, l'anticorpo monoclonale di topo anti-p24 (Gag) di FIV (AbD Serotec) diluito 1:1000 in latte scremato in polvere all' 1% (p/v) (Bio-Rad) in tampone fosfato PBS + 0.1% (v/v) Tween 20.

La membrana, dopo 3 lavaggi per 10 minuti in PBS addizionato dello 0.1% (v/v) di Tween 20, è stata incubata per 1 ora con l'anticorpo secondario, immunoglobuline di pecora anti-topo coniugate all'enzima perossidasi di rafano (HRP, *horseradish peroxidase*), diluito 1:1000 nella soluzione in latte scremato in polvere al 0,5% (p/v) (Bio-Rad) in tampone fosfato PBS + 0.1% (v/v) Tween 20 .

Dopo aver lavato, nuovamente, la membrana come indicato sopra, è stato compiuto un ultimo lavaggio solamente in PBS a cui è seguita una incubazione per 5 minuti con una soluzione contenente il substrato per l'enzima perossidasi di rafano: l'idrolisi produce un segnale chemiluminescente ("*ECL Plus Western Blotting Detection system*", Amersham Bioscience) crescente nel tempo, con cui si impressionano le lastre fotografiche (Kodak Biomax light film) sovrapponendole al filtro. Le lastre sono state esposte alla membrana per un tempo variabile tra 30 secondi e 45 minuti e successivamente sviluppate.

#### **4.5.10 Produzione di *Virus Like Particles* (VLPs)**

La poliproteina Gag di FIV (Pr50<sup>Gag</sup>) ha la capacità di assemblarsi in *Virus Like Particles* (VLPs) non infettive poiché prive di *envelope*, ma morfologicamente simili ai virioni FIV maturi (Morikawa *et al.*, 1991). L'ottenimento di questo tipo di particelle simil-virali è possibile trasfettando cellule della linea 293T mediante la tecnica del calcio fosfato con il costrutto pΔenv1 o contenente le mutazioni. La raccolta delle VLPs è stata effettuata 24 ore dopo la trasfezione. Il mezzo di coltura delle cellule è stato raccolto in tubi da centrifuga (Falcon) da 50 ml e sottoposto a centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti a 4° C per sedimentare i detriti cellulari presenti nel terreno. Il surnatante è stato successivamente filtrato (0.45 µm, Millipore), aliquotato e conservato alla temperatura di -20°C.

#### **4.5.11 Purificazione delle VLPs mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio**

Il surnatante ottenuto come descritto al Paragrafo 3.5.10, è stato purificato mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio. In particolare il volume di surnatante è stato

stratificato su 4 ml di una soluzione di saccarosio al 20% (p/v) in tubi da centrifuga (Polyallomer Centrifuge Tubes 14 x 95 mm, Beckman) e sottoposti a successiva centrifugazione a 27000 rpm per 2 ore a 4° C. Dopo aspirazione del surnatante, il sedimento virale è stato quindi risospeso in 35µl di RIPA 1X [NaCl 150 mM, IGEPAL CA-630 1% (v/v), Acido deossicolico 0.5% (p/v), SDS 1% (p/v), Tris 50 mM, pH 8.0] e sottoposto a SDS-PAGE, come descritto nel Paragrafo 3.5.8.



## 5.RISULTATI

### Premessa

Questo progetto di tesi è incentrato sullo studio dei possibili effetti causati dalla mutagenesi sito-specifica a livello delle Cisteine in posizione 1852, 1756, 1795 e 1812 degli *Zinc Fingers*, compresi nella regione del NC nel gene *gag*, sulla gemmazione virale nella linea cellulare 293T.

Le diverse reazioni di mutagenesi in questione sono state indirizzate al frammento genico GagPol clonato nel plasmide pSP73, in associazione o meno a mutazioni effettuate precedentemente in questo laboratorio in corrispondenza del *Late domain* PSAP (posizione 438-442 in Gag) e nel dominio LLDL (in posizione 446-450 di Gag).

Sono stati infatti utilizzati i seguenti cloni di pSP73: il WT, che presenta il *Late domain* intatto; il mutante 02 che presenta il *Late domain* completamente distrutto (ASAA) e il mutante 21 che invece lo è a livello del dominio LLDL (AAAA) ; infine il mutante  $\Delta p2$  manca del dominio PSAPP poiché è stata sostituita la prima Prolina con un codone di stop che impedisce l'espressione della regione p2 di Gag, localizzata all'estremità C-terminale.

I costrutti mutati a livello di *Zinc fingers*, *L domain* o di entrambi sono stati trasfettati e, una volta trascorse 24 ore, è stato possibile valutare la produzione di *Virus-Like Particles* (VLP), purificate dai surnatanti dopo ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio, e le proteine intracellulari nei lisati cellulari corrispondenti.

Gli esperimenti sono stati condotti sulla linea cellulare 293T, di derivazione embrionale renale umana: esprime l'SV40 *large-T antigen* (*Simian Vacuolating Virus T Ag*), un oncogene capace di trasformare una vasta gamma di tipi cellulari; sono normalmente utilizzate per lo studio del virus HIV-1 e per la produzione di proteine ricombinanti e vettori virali.

### 5.1 Mutagenesi degli *Zinc Fingers*

A partire dal costrutto pSP73 Gag-Pol sono state eseguite una serie di reazioni di mutagenesi sito-specifica dirette contro le sequenze CCHC degli *Zinc fingers*, localizzati nella regione del nucleocapside.

Nello specifico le mutazioni sono state introdotte, mediante l'utilizzo delle opportune coppie di primer F e R NC1756, NC1812, NC1795 ed NC1852 ( si veda Tabella 4.1 in Materiali&Metodi), nelle sequenze geniche di interesse dei cloni pSP73WT, 21, 02 e  $\Delta p2$  di seguito riportati:

- ❖ **pSP73Mut02:** contiene la regione GagPol di FIV (seq. a.a. 438-450: ASAAPMEEKLLDL) nella quale sono state inserite le mutazioni P438A e P441A.
- ❖ **pSP73Mut21:** contiene la regione GagPol di FIV (seq. a.a. 438-450: ASAAPMEEKAAAA) nella quale sono state inserite le mutazioni L447A, L448A, D448A ed L450A.

- ❖ **pSP73MutΔp2**: ottenuto mediante delezione dell'intera regione p2, realizzata con la sostituzione della tripletta codificante una Prolina (in posizione 438) con un codone di stop (seq. a.a. 438-450: **STOP**ASAAPMEEKLLDL).
- ❖ **pSP73WT**: contiene la regione GagPol di FIV(seq. a.a. 438-450: PSAPPMEEKLLDL).

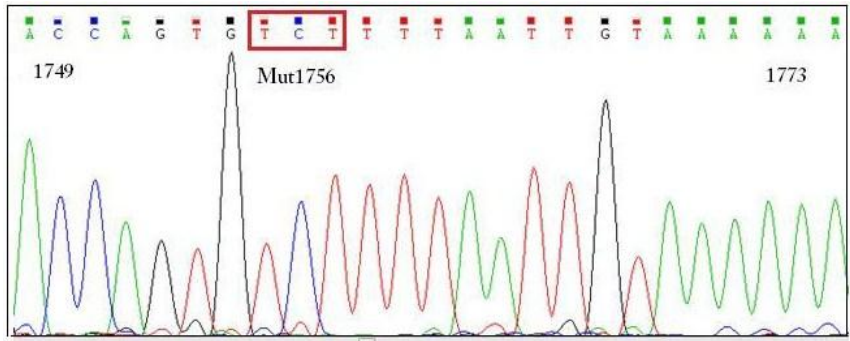
Il protocollo di mutagenesi prevede 12 cicli di PCR e si serve dell'enzima la *Pfu* polimerasi ad alta fedeltà: come risultato finale si ottiene la sostituzione aminoacidica desiderata (Cisteina→Serina) alla prima o ultima Cisteina del primo o secondo *Zinc Finger*, realizzata mediante il cambio del codone “tgt” in “tct”.

In questo modo sono stati prodotti i seguenti mutanti (le posizioni aminoacidiche si riferiscono alla regione NC nella mappa di pΔenv1(inserito EcoRI/SalI in pUC119):

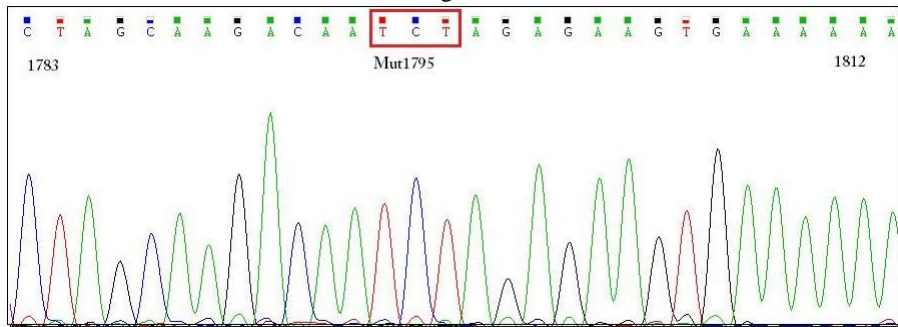
- ❖ pSP73Mut1756: ottenuto attraverso la sostituzione della prima Cisteina (C1756S) nello *Zinc finger* prossimale (seq. a.a. 1756-1797: **SFNCKKPGH**LARQC).
- ❖ pSP73Mut1795: ottenuto attraverso la sostituzione dell'ultima Cisteina (C1795S) nello *Zinc finger* prossimale (seq. a.a. 1756-1797: **CFNCKKPGH**LARQS).
- ❖ pSP73Mut1812: ottenuto attraverso la sostituzione della prima Cisteina (C1812S) nello *Zinc finger* distale (seq. a.a. 1812-1854: **SNKCGKPGH**VAAKC).
- ❖ pSP73Mut1852: ottenuto attraverso la sostituzione dell'ultima Cisteina (C1852S) nello *Zinc finger* distale (seq. a.a. 1812-1854: **CNKCGKPGH**VAAKS).

Ciascuna di queste mutazioni è stata introdotta sia nel NC di pSP73*wild-type* sia nel NC di pSP73 mutati in precedenza a livello della regione *L domain* (pSP73Mut02/1756, pSP73Mut21/1756, pSP73MutΔp2/1756, pSP73Mut02/1795, pSP73Mut21/1795, pSP73MutΔp2/1795, pSP73Mut02/1812, pSP73Mut21/1812, pSP73MutΔp2/1812, pSP73Mut02/1852, pSP73Mut21/1852 e pSP73MutΔp2/1852) in modo da poter osservare il comportamento dei due tipi di mutanti (solo nello *Zinc Finger* oppure in *Zn finger* ed *L domain*) in parallelo.

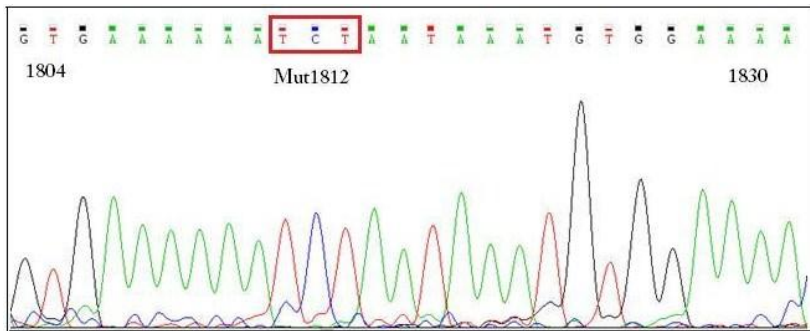
Per accertare la riuscita della mutagenesi è stato necessario sequenziare: i prodotti della reazione di mutagenesi sono stati utilizzati per la trasformazione batterica; i plasmidi, purificati dalle colonie, sono stati sequenziati a livello degli *Zinc finger*. Per tale scopo è stato sfruttato il primer “FIV2”.



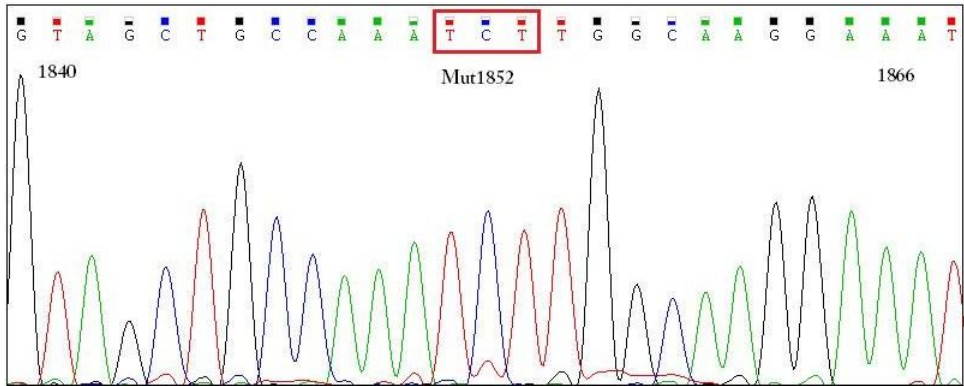
**Fig.5.1:** Sequenziamento genico del pSP73Mut1756 con il primer FIV2 a conferma dell'avvenuta mutagenesi.



**Fig.5.2:** Sequenziamento genico del pSP73Mut1795 con il primer FIV2 a conferma dell'avvenuta mutagenesi.



**Fig.5.3:** Sequenziamento genico del pSP73Mut1812 con il primer FIV2 a conferma dell'avvenuta mutagenesi.



**Fig.5.4:** Sequenziamento genico del pSP73Mut1852 con il primer FIV2 a conferma dell'avvenuta mutagenesi.

## **5.2 Ricostruzione del plasmide iniziale p $\Delta$ env1 contenente la mutazione di interesse**

I plasmidi pSP73 positivi per la presenza delle mutazioni desiderate nel gene *gag*, a livello delle Cisteine degli *Zinc fingers*, sono stati denominati “pSP73MUT”.

Le sequenze mutate devono essere reinserite nel vettore p $\Delta$ env1, fornito degli elementi che permettono la sua espressione in cellule eucariotiche, a differenza del pSP73. La realizzazione del plasmide finale mutato, il “p $\Delta$ env1MUT#”, di 11867 bp, richiede un passaggio intermedio di clonaggio rappresentato dal plasmide p $\Delta$ env1MUT $\Delta$ pol a cui manca ancora un segmento della regione *pol* della dimensione di 2169 bp.

Dopo il sequenziamento sono stati scelti alcuni dei cloni pSP73Gag-Pol contenenti le mutazioni; per ricavare da questi la regione Gag-Pol è stata effettuata in primo luogo una restrizione enzimatica, utilizzando le endonucleasi *SacI* ed *EcoRV* in modo da ottenere separatamente, dopo migrazione elettroforetica in gel d'agarosio all'1%, il *backbone* pSP73 di 2300 bp ed il frammento di interesse Gag-Pol di 1540 bp.

I frammenti ottenuti sono stati messi a confronto con quelli appartenenti al Marker di peso molecolare II, per poter accertare la dimensione attesa in paia di basi.

La corsa elettroforetica del Marker II, costituito da DNA di fago  $\lambda$  digerito dall'enzima di restrizione HindIII, produce un *pattern* di bande con un peso molecolare ideale per il paragone con il DNA oggetto di studio, soprattutto se si considera il doppietto di 2322 e 2027 bp.

E' stata quindi incisa la parte di gel che conteneva il segmento genico Gag-Pol e si è proceduto con la purificazione del DNA da gel di agarosio.

### 5.2.1 Costruzione del plasmide intermedio pΔenv1MUTΔpol

Il vettore pΔenv1 è stato digerito con gli enzimi di restrizione *EcoRV* e *SacI* generando tre frammenti: *pol* di 2169 bp con estremità *EcoRV/EcoRV*, *GagPol* di 1540 con estremità *EcoRV/SacI* ed il *backbone* di 8158 bp con estremità piatte *EcoRV* e coesive *SacI*.

Il prodotto della reazione di restrizione è stato sottoposto a corsa elettroforetica in gel d'agarosio da cui son state estratte e purificate le bande di DNA corrispondenti al frammento *pol* di 2169 bp ed al *backbone* di 8158 bp.

Nel caso dei plasmidi pΔenv1 è stato utilizzato, oltre al *Marker* di peso molecolare *II* (23130-564 bp) anche il *Marker VII* (8576-359 bp) per accertare il peso molecolare atteso dei frammenti di interesse.

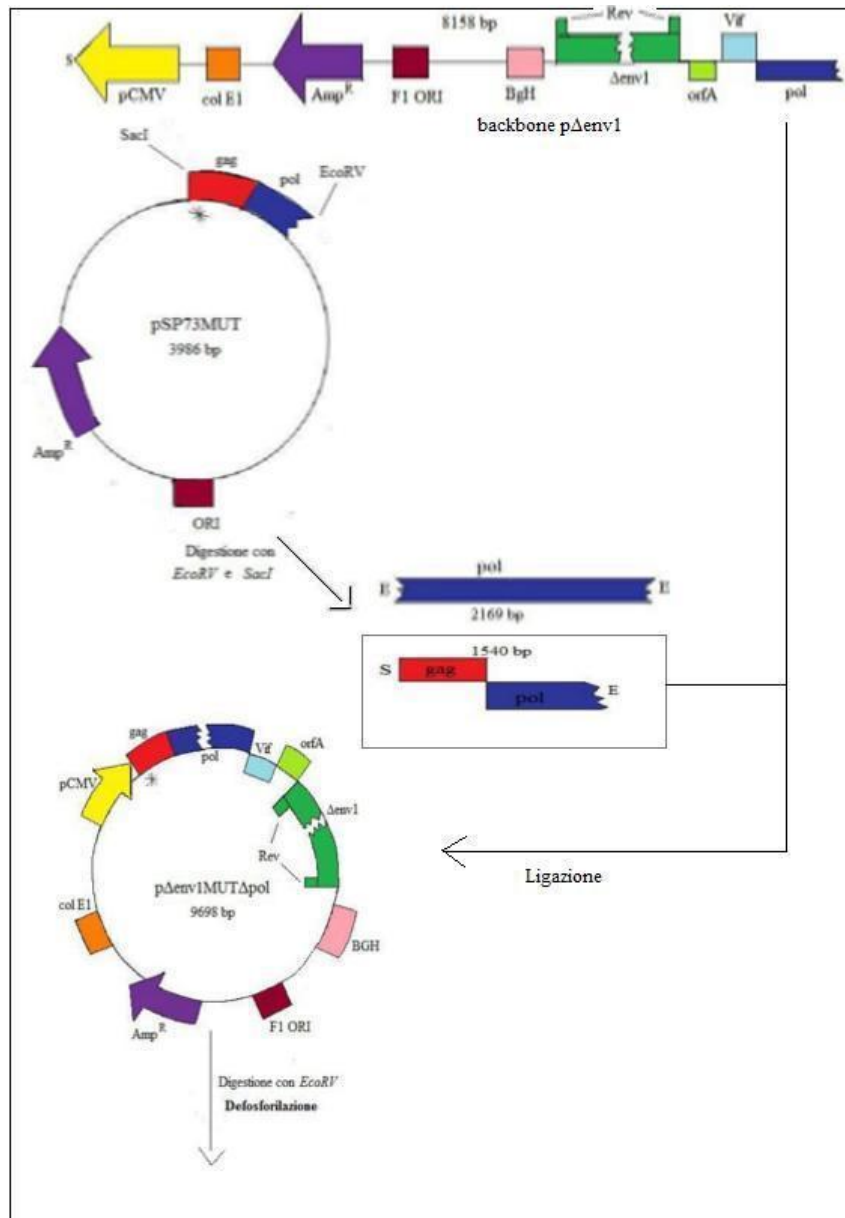
Contemporaneamente i costrutti pSP73GagPolMUT son stati digeriti con le medesime endonucleasi di restrizione ottenendo i frammenti pSP73 (2446 bp con estremità *EcoRV* e *SacI*) e *GagPolMUT* (1540 bp con estremità *EcoRV* e *SacI*); quest'ultimo è stato quindi purificato.

A questo punto, una volta ottenuti i frammenti, è stato possibile procedere con la costruzione del plasmide intermedio pΔenv1MUTΔpol mediante la ligazione del *backbone* pΔenv1ΔgagΔpol con il frammento *GagPolMUT* appartenente al costrutto pSP73GagPol ottenuto nella precedente fase di mutagenesi (si veda Paragrafo 5.1).

Questo clonaggio è stata eseguito per tutte le mutazioni. E' stato utilizzato l'enzima T4 DNA ligasi, capace di unire estremità protrudenti *sticky* (coesive) oppure *blunt* (piatte) e di riparare ssDNA in presenza del cofattore essenziale ATP.

Si è trattato di un clonaggio direzionale in quanto entrambi i frammenti linearizzati possedevano estremità 5' e 3' differenti: questo minimizzava la possibilità che il frammento si potesse inserire nel vettore con un orientamento errato e che il vettore potesse richiudersi senza acquisire il DNA esogeno. Dopo la trasformazione dei batteri competenti con l'intera reazione di ligazione le piastre sono state incubate a 30°C *overnight*.

I plasmidi intermedi pΔenv1MUTΔpol sono stati esaminati mediante analisi di restrizione, utilizzando gli enzimi *EcoRV* e *SacI*, e corsa elettroforetica dei prodotti della reazione in gel d'agarosio, al fine di confermare la riuscita del clonaggio.



**Fig.5.5:** La figura rappresenta il plasmide intermedio **pΔenv1MutΔpol** generato in seguito alla ligazione del frammento pΔenv1Δpol, ottenuto dal plasmide pΔenv1, con GagPolMut, estratto dal plasmide pSP73MUT. **Gag:** porzione della ORF del gene *gag*; **Pol:** ORF del gene *pol*; **Vif, OrfA, Rev:** ORF minori di FIV rappresentanti i geni *vif*, *orfA* e *rev*; **Δenv1:** delezione di 1 kb a carico del gene *env*; **BGH polyA:** poli-adenilazione dell'ormone della crescita bovino; **ColE1:** origine di replicazione batterica; **F1 Ori:** origine di replicazione fagica; **Amp<sup>R</sup>:** gene per la resistenza all'ampicillina; **bp:** paia di basi.

### 5.2.2 Costruzione del plasmide finale p $\Delta$ env1MUT#

I costrutti intermedi p $\Delta$ env1MUT $\Delta$ pol sono stati linearizzati utilizzando un unico enzima di restrizione, *EcoRV*. Un'aliquota della reazione di restrizione è stata sottoposta a corsa elettroforetica per verificare se effettivamente fosse avvenuta la linearizzazione e si è poi potuto procedere con la purificazione del plasmide seguendo il protocollo di purificazione in colonna di DNA da reazioni enzimatiche. Il taglio enzimatico ha generato in questo caso due estremità identiche compatibili *EcoRV*: non si trattava pertanto di un clonaggio direzionale dato che l'inserto poteva saldarsi sia in direzione 5'-3' che in 3'-5'.

Per questo motivo è stato necessario defosforilare il vettore alle estremità 5' prima di proseguire con l'inserimento del frammento mancante di *pol* di 2169 bp, con estremità *EcoRV*, ottenuto dalla digestione di p $\Delta$ env1 nella precedente fase di clonaggio (si veda Paragrafo 5.3.1); questo accorgimento previene sia la ricircularizzazione del vettore che la formazione di dimeri.

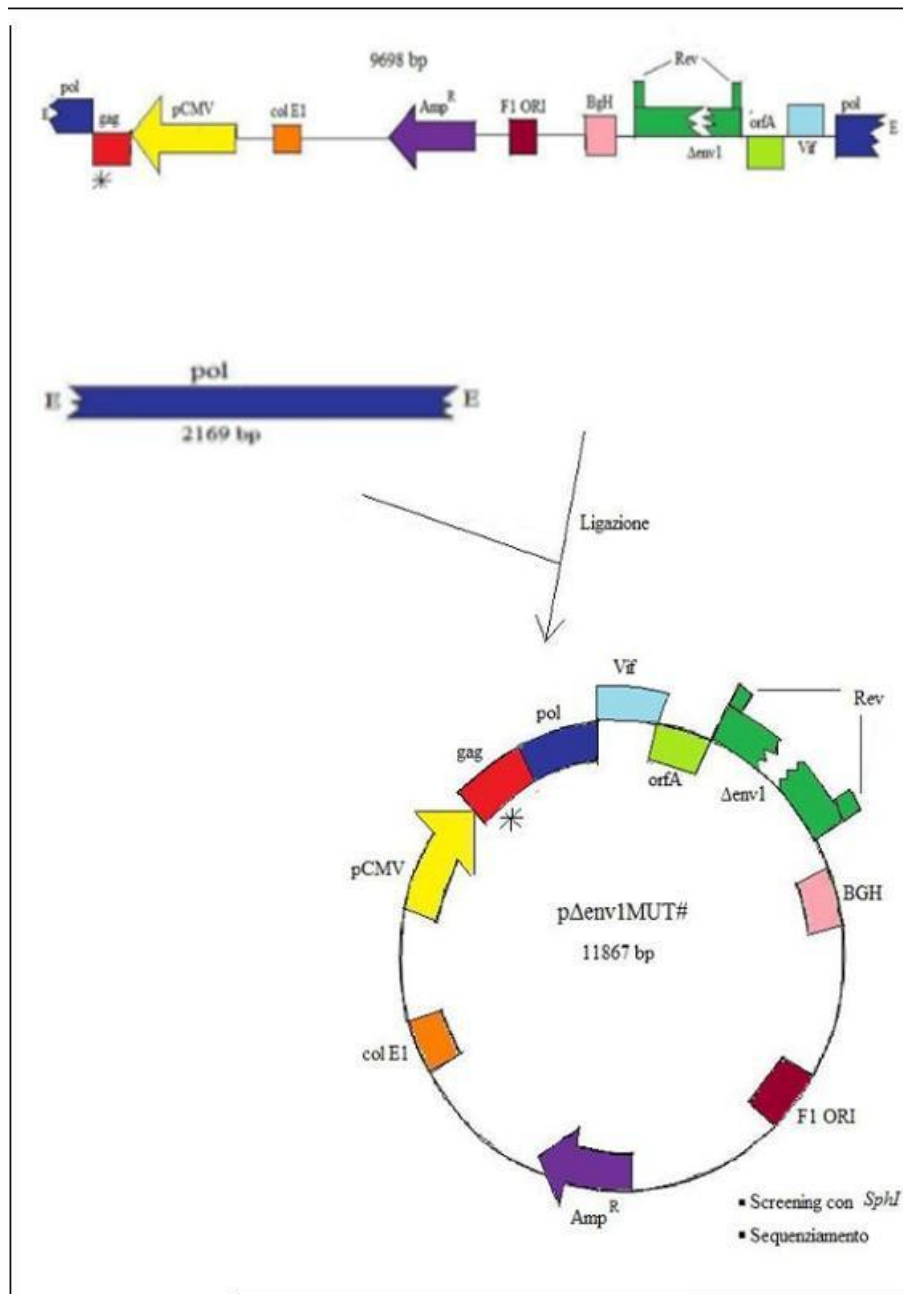
Il vettore può richiudersi soltanto quando l'inserimento del DNA da clonare (non trattato con fosfatasi per permettere la formazione del legame fosfodiesterico) fornisce un'estremità 5'P a ciascuno dei due punti di giunzione. In questo caso le doppie eliche del DNA ricombinante saranno unite solo in corrispondenza dei siti 5' dell'inserto con i 3' del vettore; questo non costituisce un problema perché i *nick* (punti di rottura) restanti vengono poi chiusi dai sistemi di riparazione di *E.coli* dopo la trasformazione.

La defosforilazione viene eseguita con l'enzima CIP (*calf intestinal phosphatase*): questo passaggio permette inoltre di ridurre la quantità di vettore da utilizzare in quanto l'equilibrio della reazione è spostato verso la ligazione dell'inserto al suo interno. Una volta trascorso il tempo richiesto dalla fosfatasi per agire, è stato possibile purificare il plasmide mediante cromatografia su colonna e clonare al suo interno il frammento *pol*.

Come per il precedente costrutto (si veda Paragrafo 5.3.1), questo clonaggio è stato eseguito per tutte le mutazioni.

Un metodo che permette di valutare l'orientamento dell'inserto acquisito dal vettore consiste nell'utilizzo, in questo caso specifico, dell'enzima di restrizione *SphI*: il taglio genera un frammento di 6885 bp ed uno di 4982 bp nel caso in cui abbia la direzione corretta 5'-3', viceversa si ottengono un frammento di 5617 bp ed uno di 6250 bp.

Il plasmide finale completo p $\Delta$ env1MUT# è stato sequenziato con il primer FIV2 per confermare la presenza delle mutazioni a livello del dominio L e degli *Zinc fingers*.



**Fig.5.6:** La figura rappresenta il plasmide finale **pΔenv1Mut#** generato in seguito alla ligazione tra il costrutto intermedio pΔenv1MutΔpol, ottenuto nella fase precedente, con il frammento mancante di pol, estratto dal vettore pΔenv1. **pCMV:** promotore del citomegalovirus (CMV); **Gag:** ORF del gene gag; **Pol:** ORF del gene pol; **Vif, OrfA, Rev:** ORF minori di FIV rappresentanti i geni vif, orfA e rev; **Δenv:** delezione di 1 kb a carico del gene env; **BGH polyA:** poli-adenilazione dell'ormone della crescita bovino; **ColE1:** origine di replicazione batterica; **F1 Ori:** origine di replicazione fagica; **Amp<sup>R</sup>:** gene per la resistenza all'ampicillina; **bp:**paia di basi.



### **5.3 Analisi degli effetti delle mutazioni in *L Domains* e *Zinc fingers* sulla gemmazione delle *Virus like particles* e processamento della poliproteina Gag-Pol mediante Western Blotting**

Successivamente, terminate le fasi di clonaggio che hanno portato all'ottenimento del plasmide finale recante le sequenze mutate in diverse posizioni, è stata valutata la produzione, gemmazione e maturazione delle VLPs prodotte da ciascun costrutto.

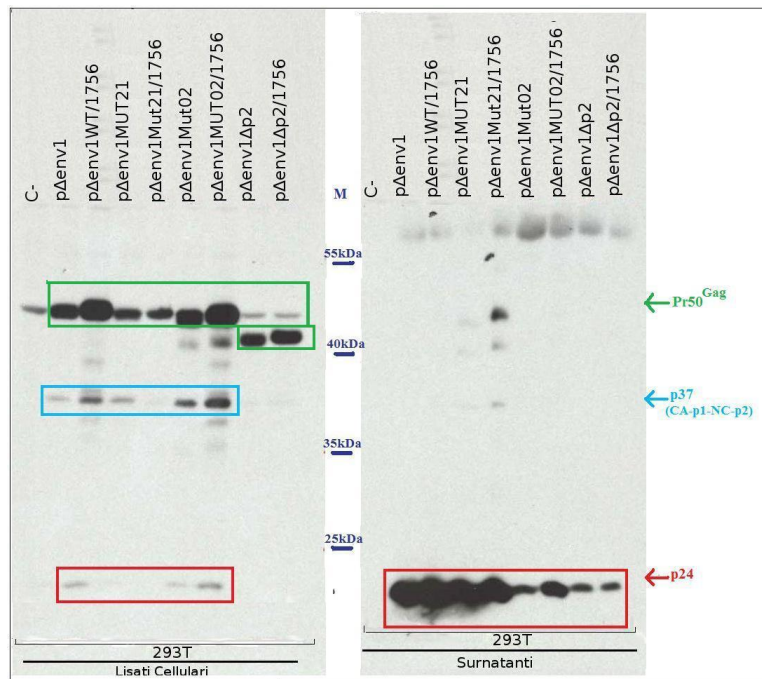
Le VLP sono particelle sprovviste dell'*envelope* esterno e di RNA genomico al loro interno, perciò non infettanti; sono però strutturate in maniera identica al *core* dei virioni maturi e costituite più esternamente dalla porzione capsidica codificata dal gene gag, la cui espressione è sufficiente per l'auto-assemblaggio, come riferito da Gottlinger et al.(1991).

Con l'intenzione di esaminare le funzioni della regione C-terminale di FIV Gag ed analizzare l'effetto del processamento della proteina precursore Gag sulla produzione di particelle, i costrutti finali p $\Delta$ env1MUT# recanti le mutazioni a livello degli *Zn fingers* (C1756S, C1795S, C1812S e C1852S) e/o del *Late domain* (WT, Mut02, Mut21 e  $\Delta$ p2) sono stati quindi trasfettati nella linea cellulare 293T col metodo del Calcio Fosfato. Le cellule umane 293T, normalmente utilizzate per lo studio di HIV-1, permettono anche la produzione di particelle di FIV.

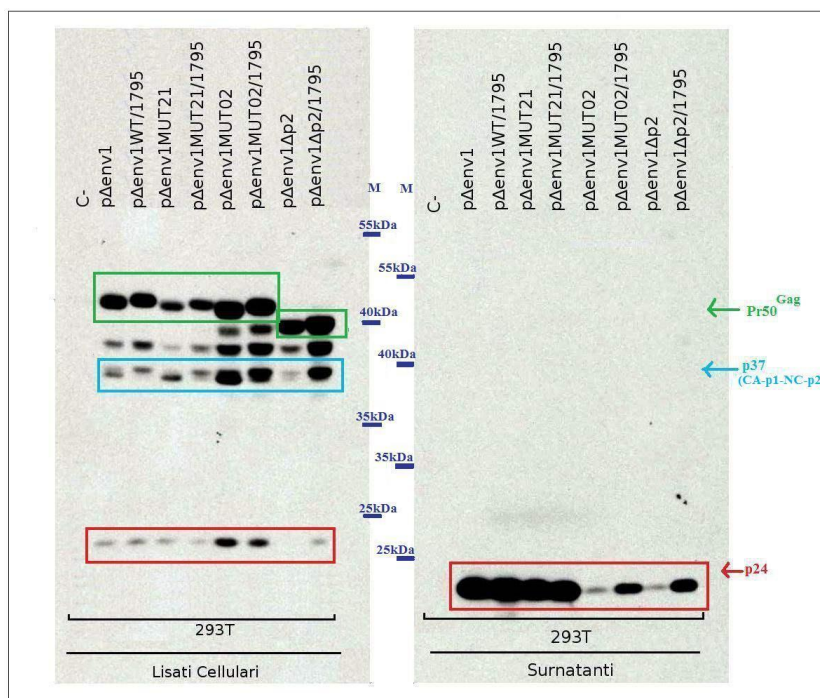
Trascorse 24 ore, sono stati raccolti da ogni fiasca i surnatanti contenenti le VLPs ed ultracentrifugati attraverso cuscino di saccarosio; le cellule sono state pellettate e lisate con appositi *buffers*.

I campioni di proteine extracellulari ed intracellulari sono stati quindi sottoposti ad elettroforesi in SDS-PAGE, prodotto con una percentuale di acrilamide ottimale per poter visualizzare, dopo incubazione con gli Anticorpi primario e secondario, la forma immatura (Pr50<sup>Gag</sup>), intermedia p37(CA-p1-NC-p2) e matura (p24) della proteina Gag.

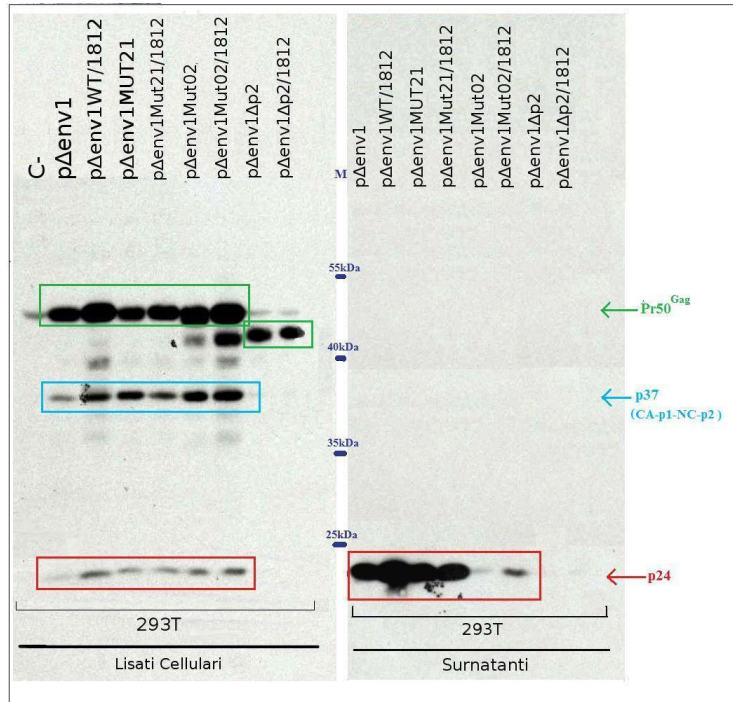
L'anticorpo primario utilizzato per riconoscere le diverse forme di Gag è diretto contro l'epitopo p24 di FIV: si lega non solo alla proteina stessa ma anche alla medesima sequenza presente nelle altre forme di Gag. L'anticorpo secondario lega la porzione costante dell'Ac primario.



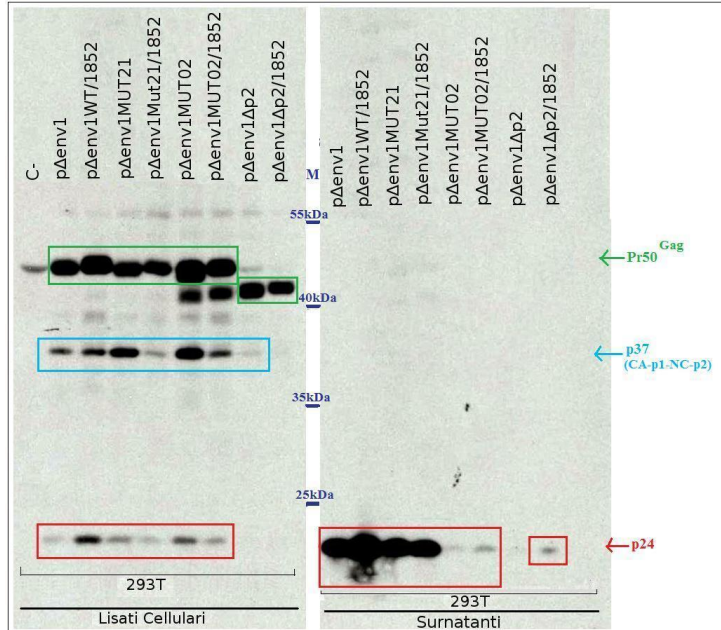
**Fig.5.7** : Western blotting dei lisati cellulari (a sinistra) e surnatanti (a destra) trasfettati ottenuti da cellule 293T trasfettate con i plasmidi: pΔenv1, pΔenv1WT/1756, pΔenv1MUT21, pΔenv1Mut21/1756, pΔenv1Δp2, pΔenv1Δp2/1756. Marker di peso molecolare (“Page ruler protein ladder”, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa. Anticorpo anti-p24 Gag di FIV.



**Fig.5.8** : Western blotting dei lisati cellulari (a sinistra) e surnatanti (a destra) ottenuti da cellule 293T trasfettate con i plasmidi: pΔenv1, pΔenv1WT/1795, pΔenv1MUT21, pΔenv1Mut21/1795, pΔenv1Δp2, pΔenv1Δp2/1795. Marker di peso molecolare (“Page ruler protein ladder”, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa. Anticorpo anti-p24 Gag di FIV.



**Fig.5.9** : Western blotting dei lisati cellulari (a sinistra) e surnatanti (a destra) ottenuti da cellule 293T trasfettate con i plasmidi: pΔenv1 (C+), pΔenv1WT/1812, pΔenv1MUT21, pΔenv1Mut21/1812, pΔenv1Δp2, pΔenv1Δp2/1812. Marker di peso molecolare (“Page ruler protein ladder”, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa. Anticorpo anti-p24 Gag di FIV.



**Fig.5.10**: Western blotting dei lisati cellulari (a sinistra) e surnatanti (a destra) ottenuti da cellule 293T trasfettate con i plasmidi: pΔenv1, pΔenv1WT/1852, pΔenv1MUT21, pΔenv1Mut21/1852, pΔenv1Δp2, pΔenv1Δp2/1852. Marker di peso molecolare (“Page ruler protein ladder”, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa. Anticorpo anti-p24 Gag di FIV.

I nostri dati ribadiscono quanto riportato nel recente lavoro di Calistri et al.(2009): FIV infatti lega, attraverso il dominio PSAP, la proteina Tsg101 che funge da ponte di connessione con il *pathway* della formazione dei MVB, del quale si serve per gemmare (Luttge et al.,2008).

I difetti osservati nel processamento della Pr50<sup>Gag</sup> da parte della proteasi virale (parti relative ai lisati cellulari) e nell'assemblaggio in VLPs (parti relative ai surnatanti) da parte dei diversi costrutti (Figure 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10) son perciò ascrivibili alle mutazioni introdotte precedentemente in corrispondenza del *Late domain*. La singola mutazione a livello di una Cisteina nella sequenza CCHC degli *Zinc fingers* non influisce sul processamento della Pr50Gag da parte della proteasi virali né riduce l'assemblaggio in VLPs.

E' possibile osservare per tutti i costrutti (parti relative ai lisati cellulari delle Figure 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10) la produzione della poliproteina Gag nella linea cellulare utilizzata. La forma di peso molecolare leggermente inferiore al Pr50<sup>Gag</sup>, visibile nelle corsie dei costrutti Mut02 (parte relativa ai lisati cellulari), consiste in un accumulo intracellulare di Gag processata solo in parte, soprattutto dell'intermedio MA-CA-p1-NC.

Per il costrutto  $\Delta p2$  ed i costrutti  $\Delta p2$  recanti la mutazione addizionale a livello di uno *Zn finger*, come si può notare nelle parti relative ai lisati cellulari delle Figure 5.7, 5.9 e 5.10, si osserva soltanto la banda di Pr50<sup>Gag</sup>, priva di qualunque altra forma di processamento.

Il controllo positivo, rappresentato dal plasmide p $\Delta env1$ , come atteso, è in grado di formare VLPs in quanto presenta la sequenza completa di *gag-pol*.

In particolare, nei lisati cellulari è presente il precursore Pr50Gag, la forma intermedia di processamento p37 (CA-p1-NC-p2) ed il prodotto finale di maturazione p24 (CA), mentre nei surnatanti si osserva la sola forma p24 matura e completamente processata (Figure 5.7, 5.8, 5.9 e 5.10).

## 6.DISCUSSIONE

Le pesanti conseguenze della pandemia del virus HIV-1 e le recenti epidemie di SARS ed influenza aviaria offrono un esempio di come l'emergenza da virus patogeni crei serie minacce alla salute umana.

Gli studi comparativi tra uomo ed altre specie offrono un aiuto prezioso che, attraverso la fusione del bagaglio di conoscenze di diverse discipline, favorisce il progresso nella ricerca genetica e nello studio dell'evoluzione del patogeno e dell'ospite. Capire quali sono i ceppi emergenti, associare correttamente un patogeno alla epidemia, capire le mutazioni che gli conferiscono maggior o minor virulenza, la sua origine geografica e il suo percorso evolutivo sono strumenti fondamentali per la messa a punto di vaccini e terapie farmacologiche appropriate (Pecon-Slattey et al.,2008).

Il Virus dell'Immunodeficienza Felina infetta il gatto domestico determinando l'insorgenza di una patologia che si evolve con modalità simili a quelle osservate per HIV-1, che fece il salto di specie dallo scimpanzé (*Pan Troglodytes*) all'uomo; è endemico nella specie *Felidae*, anche se non tutti gli animali infetti sviluppano l'AIDS. I due virus condividono molte caratteristiche del ciclo vitale, i *targets* cellulari a cui sono diretti e le funzioni delle proteine codificate dal loro genoma. Entrambi contengono gli elementi essenziali *gag*, *pol* ed *env*, ricorrenti in tutti i retrovirus, che quasi certamente derivano da un lentivirus ancestrale in comune, e fattori accessori che facilitano la replicazione in vivo, spesso superflui nelle colture cellulari usate per la sperimentazione.

Sequenziando il genoma del *Felis catus* è emerso un basso livello di similarità di sequenza negli ORF omologhi ed in quelli codificanti per fattori accessori tra HIV e FIV, per il fatto che quest'ultimo si è evoluto indipendentemente nel gatto.

D'altra parte il gatto presenta una grande percentuale di *markers* microsatelliti ortologhi a quelli di cane e uomo: per questo l'infezione da FIV nel gatto rappresenta un attraente modello di studio per la ricerca di vaccini contro HIV e per la sindrome di immunodeficienza acquisita. Inoltre è un animale piccolo quindi facilmente maneggiabile, diffuso ed economico (Luttge et al.,2007, Elder et al.,2008, Olmsted et al.,1989, Pecon-Slattey et al.,2008).

A differenza dei lentivirus dei primati, molti aspetti essenziali della biologia cellulare di FIV non son stati ancora compresi.

Tuttavia son stati compiuti negli ultimi anni progressi importanti: son state fornite numerose delucidazioni sui meccanismi molecolari del suo ciclo vitale, in gran parte facilitate dal confronto con il virus HIV-1 (Luttge et al.,2009).

FIV è l'unico lentivirus per il quale è già disponibile un vaccino che protegge contro alcuni sottotipi (Luttge et al.,2009). I sottotipi principali identificati in base alle sequenze genetiche dell'*env* sono A, B e C (Bachmann et al 1997); se si considera invece l'intero genoma lo si può classificare in 5 sottotipi.

Per HIV-1 si distinguono tre gruppi (M,N ed O), tra cui l'M, che è il più comune, viene ulteriormente diviso in nove sottotipi. I sottotipi di entrambi i virus sono distribuiti in tutto il mondo, in svariate aree geografiche; le molteplici variazioni intra e inter-sottotipi complicano la messa a punto di vaccini efficaci. Considerando che a questo proposito la conquista più importante sarebbe la realizzazione di un unico vaccino universale contro tutti i ceppi isolati di FIV ed HIV, è necessario capire, per raggiungere questo fine, quali sono gli epitopi protettivi conservati più utili. La tecnica dell'*epitope mapping*, ad esempio, si concentra su quelli riconosciuti dalle cellule T; ovviamente, per quanto riguarda HIV-1, questo studio può essere condotto solo in persone infette e non si può capire quali siano in grado di stimolare una risposta protettiva post-vaccinazione. Utilizzando il modello FIV ed il suo ospite naturale si possono invece testare in maniera random più antigeni e verificare quali immunogeni diano anche una risposta protettiva. Ancora con l'*epitope mapping* si può procedere al confronto tra gli epitopi osservati negli animali infetti e quelli riconosciuti in seguito a vaccinazione; si ottengono così informazioni preziose riguardo a quelli potenzialmente adoperabili per un vaccino protettivo contro lentivirus.

Sarebbe necessario però sviluppare database di peptidi virali e siti di legame delle MHC-I e MHC-II feline da ricondurre poi, con un'analisi computazionale, alle sequenze di legame delle MHC umane, già presenti in rete (Uhl et al.,2008).

Il target maggiormente preso di mira dalle strategie antivirali è rappresentato dalla proteina Gag in quanto ricopre una considerevole importanza per la funzione che svolge nel ciclo retrovirale, assemblaggio e rilascio del virione e per gli eventi che seguono all'ingresso virale nella cellula ospite (Luttge et al.,2009).

Gli *L domains* della proteina Gag retrovirale sono necessari per la gemmazione: in caso di delezioni o mutazioni la particella virale resta unita alla membrana plasmatica della cellula che la produce (Strack et al.,2003)

La loro posizione e sequenza aminoacidica varia tra i diversi retrovirus. Negli oncoretrovirus son costituiti dal motivo PPPY, nei lentivirus dal motivo P(T/S)AP (Blot et al.,2004). EIAV possiede invece un motivo YPXL in p9, che è sufficiente per il suo rilascio dalla cellula: nel caso di questo virus infatti non è richiesta Ubiquitina. E' stato riportato che questo dominio lega inoltre AP-2 *in vitro*, un complesso che si occupa di selezionare ciò che viene destinato alle vescicole di clatrina (Strack et al.,2003,Pornillos et al.,2002).

La proteina p2 di FIV mostra un'omologia funzionale alla p6 di HIV-1; condividono inoltre omologie a livello degli *L domains* (Elder et al.,2008). E' stato dimostrato di recente per HIV-1 che, qualora privato del motivo PTAP, la proteina Alix facilita il suo rilascio attraverso il legame dei suoi residui centrali (360-716) al dominio secondario LYPX<sub>n</sub>L.

Alix è invece sufficiente per la gemmazione di EIAV, che contiene solo l'*L domain* del tipo LYPX<sub>n</sub>L(Dussupt et al.,2009).

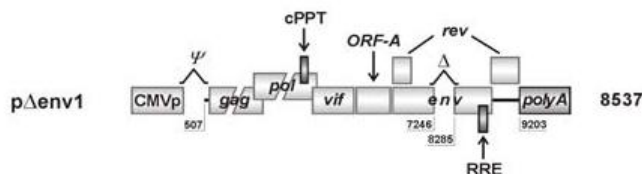
La quantità ottimale di Alix esogena che dev'essere fornita perché possa dare *rescue* è piuttosto minima: una quantità eccessiva impedisce infatti il rilascio di HIV-1 e causa difetti nella morfogenesi del virione (Popov et al.,2008).

La proteina NC svolge svariati ruoli nelle fasi precoci e tardive del ciclo di replicazione retrovirale: i) con la collaborazione della proteina CA media le interazioni tra proteine Gag che conducono all'assemblaggio della particella virale nel citoplasma; ii) lega l'RNA genomico che viene quindi racchiuso dalle proteine del capsido all'interno del virione nascente (l'incapsidamento selettivo del genoma virale è dovuto al riconoscimento del segnale  $\psi$ , situato all'estremità 5' del genoma, spesso parzialmente sovrapposto alla ORF di *gag*); iii) svolge il ruolo di *chaperon* nei confronti dell'acido nucleico, in modo che questo acquisisca un corretto ripiegamento nello spazio, in modo da favorire le fasi successive del ciclo di replicazione virale (Luttge et al.,2009, Mark-Danieli et al.,2005).

L'arrangiamento in tandem dei due *Zn fingers* formati dalla sequenza CCHC è conservato nel NC di FIV; è presente inoltre un alto grado di similarità in quella sequenza ripetuta tra FIV, HIV-1, ed EIAV. La distanza presente in ogni *Zinc finger* tra i residui Cys e His deputati a legare lo ione è la stessa ed è invece solo leggermente maggiore tra i residui basici della regione *linker* in HIV-1(Luttge et al.,2009).

Il presente lavoro di tesi è stato condotto con la finalità di capire il ruolo svolto dagli *Zinc fingers* del NC di FIV nella gemmazione di costrutti recanti diverse mutazioni introdotte con la tecnica della mutagenesi sito-specifica dalle cellule trasfettate. La proteina retrovirale NC è di fatto considerata un valido target per interventi terapeutici ed è perciò importante caratterizzare a livello molecolare gli elementi coinvolti nella funzione del Nucleocapside di FIV. In questo modo sarà possibile approfondire le conoscenze sul ruolo svolto dalle proteine virali, condiviso tra lentivirus di primati e di non primati; permetterà inoltre di ideare strategie efficaci contro HIV-1 e contro i lentivirus animali.

Per conseguire il nostro l'obiettivo si è scelto di utilizzare il costrutto p $\Delta$ env1, prodotto a partire dal ceppo Petaluma di FIV, nel quale son state rimpiazzate le 5' e 3'LTR sostituite rispettivamente con il pCMV, che possiede un'attività maggiore nelle cellule umane 293T, e con il segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino (BGH);  $\psi$  è stato deleto in parte ed *env* contiene una delezione di 1Kbp.



**Fig 6.1:** Rappresentazione schematica del costrutto FIV di packaging utilizzato (da Pistello et al.,2007).

A questo costrutto son state inoltre aggiunte la ORI eucariotica e procariotica ed il gene dell'antibiotico resistenza. Il frammento Gag-Pol di interesse è stato successivamente clonato in un vettore esclusivamente procariotico (pSP73, 2446 bp) in quanto la dimensione in paia di basi del costrutto pΔenv1 (11867 bp) non permetteva di introdurre le mutazioni nei siti di interesse.

Con la tecnica della mutagenesi sito-specifica son state quindi effettuate alcune sostituzioni aminoacidiche in corrispondenza della regione C-terminale di Gag, la cui presenza è sufficiente per la produzione di VLPs.

In particolare erano state introdotte, in precedenza, le seguenti mutazioni a livello del *Late domain*: cambiando le proline e serine in alanine è stato completamente distrutto il *Late domain* PSAP al costrutto denominato Mut02 ; il MutΔp2 è invece completamente deletato in corrispondenza di quella regione; al Mut21 è stata cambiata la sequenza a valle del *Late domain*, LDLL, in una successione di alanine. Il *wild-type* possiede entrambe le sequenze intatte.

A quei diversi costrutti mutati a livello del *Late domain* son stati quindi estratti i frammenti Gag-Pol; invece, in altri mutanti dello stesso tipo, è stata inserita una mutazione aggiuntiva a livello di una delle Cisteine situate alle estremità di ogni *Zn finger* ( Cys<sup>1756</sup>, Cys<sup>1795</sup>, Cys<sup>1812</sup> o Cys<sup>1852</sup>). La Serina differisce dalla Cisteina soltanto per la presenza di un gruppo idrossilico al posto di quello sulfidrilico. Infine, per poter esaminare i livelli di espressione di Gag intracellulare e per osservare la capacità di questi mutanti di produrre VLPs, i frammenti Gag-Pol dei 16 costrutti son stati reintrodotti nel plasmide di partenza pΔenv1 rimpiazzando il suo frammento Gag-Pol WT; i plasmidi finali son stati quindi trasfettati nella linea cellulare embrionale renale umana 293T.

Dall'analisi dei risultati ottenuti si è avuta un'ulteriore conferma del fatto che il motivo PSAP è fondamentale per la produzione delle particelle simil-virali: la loro presenza nei surnatanti è infatti severamente ridotta in tutti i costrutti, ad eccezione del Mut21 che presenta l'*L domain* intatto come il WT.

La distruzione della sequenza LDLL più a valle non compromette la funzionalità dell'*L domain* PSAP nel Mut21.

La distruzione completa del dominio PSAP nel Mut02 porta comunque all'espressione della Pr50<sup>Gag</sup>. Il suo processamento è però difettoso, son prodotti un maggior numero di intermedi, soprattutto un accumulo di MA-CA-p1-NC, oltre al p37 (CA-p1-NC-p2), in particolar modo se si osserva la parte relativa ai lisati cellulari nella Fig.4.8; la produzione di VLPs è invece quasi paragonabile a quella osservata nel costrutto recante la delezione.

Un recente articolo di Fuji et al. (2009) su HIV-1 riporta che delezioni o mutazioni a livello del dominio LYPX<sub>n</sub>L in p6 non riducono il rilascio delle particelle in cellule HeLa o COS, per il quale è determinante il legame del dominio L principale PTAP alla proteina Tsg101: da questo punto di vista la sequenza secondaria LDLL di FIV possiede una caratteristica in comune con il *Late domain* accessorio di HIV-1. Considerando ancora la sequenza LDLL di FIV, se viene mutata in ALDS, trasfettando cellule CrFK, si giunge ad un risultato diverso per quanto riguarda la produzione di VLPs nella linea CrFK rispetto a quello che si osserva per la mutazione in AAAA nella linea 293T: non si rileva infatti la presenza di particelle nei surnatanti.



La completa delezione della proteina p2 situata nella regione C-terminale di FIV Gag (Mut $\Delta$ p2), che contiene il dominio PSAP, permette ancora l'espressione della poliproteina precursore. Come ci si aspettava, quest'ultima mostra una mobilità differente dalle Pr50<sup>Gag</sup> degli altri costrutti dovuto al fatto che la delezione aminoacidica ha ridotto il suo peso in kDa; tuttavia non subisce processamento da parte delle proteasi virali ad eccezione del Mut $\Delta$ p2/1795 (si veda la Figura 5.8, parte relativa ai lisati cellulari), l'unico mutante deleto per il quale si osserva la presenza di qualche forma intermedia di processamento.

La gemmazione dei costrutti Mut $\Delta$ p2 invece, come si nota nella parte dei surnatanti (Fig.5.9 e 5.10), è praticamente abolita; al contrario nelle corsie delle Fig.5.7 e 5.8, relative agli stessi costrutti, si osserva una produzione leggermente superiore di VLPs, soprattutto nel Mut $\Delta$ p2 contenente la mutazione addizionale NC<sub>C1795S</sub>, seppur non paragonabile ai livelli del WT.

In riferimento al Mut02, il comportamento osservato nei nostri risultati rispecchia sia quello del medesimo mutante ASAA, trasfettato in 293T e CrFK, descritto da Calistri et al. (2009) che quello di Manrique et al. (2004) trasfettato nella linea CrFK. Infine, esaminando i dati riguardanti i mutanti che portano la mutazione addizionale in una Cys del primo o secondo *Zinc finger*, si può riscontrare che questa non sembra condizionare la produzione del precursore né il suo processamento se si mette a confronto con il costrutto corrispondente mutato solo a livello della proteina p2.

Inoltre, spostando l'attenzione sulle parti relative ai surnatanti, si può constatare che la mutazione al NC non produce variazioni l'assemblaggio in VLPs, specialmente se si considera il caso del secondo *Zinc finger* né alcuna diminuzione che si sommi alla precedente mutazione in p2.

Anzi, inaspettatamente è addirittura maggiore nei costrutti Mut02/1795 e Mut $\Delta$ p2/1795; l'incremento nel Mut02/1756 potrebbe però essere una conseguenza del fatto che questo costrutto aveva prodotto anche una quantità maggiore di Pr50<sup>Gag</sup> rispetto al Mut02.

In contrasto con quanto osservato nei nostri esperimenti, è stato riportato in letteratura per FIV che lo *Zinc finger* prossimale è più rilevante per il legame all'RNA e l'assemblaggio virale rispetto al secondo.

Un lavoro di Manrique et al.(2004) riferisce che sostituendo la prima Cisteina dello *Zinc finger* prossimale (C11S) o distale (C30S) e trasfettando la linea CrFK, hanno notato che il precursore era prodotto e processato; tuttavia la produzione di VLPs era paragonabile al WT per il C30S mentre praticamente nulla per il C11S. Misurando invece per gli stessi mutanti la capacità di legame del NC all'RNA hanno potuto riscontrare un notevole calo da parte MutC11S(primo *Zn finger*), a differenza della lieve diminuzione del C30S(secondo *Zn finger*), quasi paragonabile al WT. Questa evidenza è stata constatata anche per HIV-1, in cui la sequenza prossimale Cys-His del NC è più sensibile a cambiamenti rispetto a quella distale per quanto riguarda la capacità di *packaging* dell'RNA genomico (Manrique et al.,2004). Il confronto di tutte le sequenze aminoacidiche delle proteine retrovirali munite di *Zn fingers* ha rivelato che il primo, a partire dall'estremità N-terminale, è maggiormente conservato rispetto al secondo; la minor pressione selettiva è indicativa dell'importanza ricoperta da quei residui aminoacidici.

Viene inoltre ribadito in letteratura (Dussupt et al.,2009) che, nel contesto di un costrutto HIV-1 Gag ridotto agli elementi minimi necessari che permettono la produzione di VLPs, son richiesti sia il NC che la regione PTAP perché avvenga un'efficiente gemmazione e la presenza di uno o l'altro separatamente non è sufficiente. Inoltre alcune mutazioni nel NC, in particolar modo a livello di alcuni residui basici della regione N-terminale o degli *Zinc fingers*, riducono il rilascio di virioni HIV-1 che presentano il motivo PTAP intatto; l'*L domain* principale non è perciò sufficiente nel contesto di mutanti NC poiché esiste un rapporto di collaborazione tra le due regioni.

Al contrario il nostro costrutto di FIV, contenente il PSAP intatto e mutato unicamente in una Cisteina del NC, si assembla in VLPs a livelli paragonabili a quelli del WT.

Per HIV-1 è inoltre necessaria la presenza del sito di legame per Alix oltre a quello per Tsg101 affinché ci sia un efficiente rilascio di un costrutto minimo HIV-1 Gag (Strack et al.,2003). La presenza del solo motivo PTAP è sufficiente per HIV-1 solo nella linea umana 293T, in cui Alix diventa superfluo: una possibile spiegazione potrebbe essere, anche se effettivamente non sufficiente per spiegare alcuni fenotipi difettivi dipendenti dal tipo-cellulare, il diverso livello di Tsg101 e Alix espresso in diverse linee cellulari, e la proteina espressa in quantità maggiore diventa quella determinante per la produttività dell'infezione (Dussupt et al.,2009, Fujii et al.,2009).

Alix, allo stesso modo della proteina Tsg101, promuove il rilascio della particella virale, che richiede la separazione dell'*envelope* virale dalla membrana plasmatica, attraverso un legame con l'*L domain* accessorio di HIV-1 e con la regione del NC. Il NC, prendendo contatti con l'RNA genomico, determina la multimerizzazione di Gag e l'assemblaggio virale, durante il quale l'RNA probabilmente serve da supporto per promuovere l'associazione tra varie proteine Gag: è emerso di recente che, a differenza di come si pensava, in questo evento non sono implicati soltanto i residui basici ma principalmente gli *Zinc fingers*, avendo appurato che mutazioni in queste regioni riducono la produzione di particelle sia in cellule HeLa che in cellule 293T e la presenza della parte restante del NC non è sufficiente per impedirlo.

Alix interagisce tramite il dominio PRD con Tsg101 e tramite il dominio Bro1 con i motivi *Zinc finger* del NC: questi devono essere intatti affinché si possa creare l'interazione con la proteina e perché mantengano la capacità di dare *rescue* di mutanti nel sito di legame a Tsg101. La completa distruzione di entrambi gli *Zinc fingers* di HIV-1 impedisce ad Alix di mediare il rilascio virale (Dussupt et al.,2009). Nel caso di FIV abbiamo appurato che, anche se mutato nella sequenza a valle del *Late domain* PSAP (Mut21) è in grado di gemmare grazie al solo motivo PSAP anche da cellule 293T, che per questo virus, a differenza di HIV-1, non rappresentano il target naturale per l'infezione.

Sarebbe interessante indagare se la scoperta del coinvolgimento del legame NC-Alix nella gemmazione di HIV-1 possa avere un riscontro anche per FIV, introducendo ad esempio mutazioni più ampie o delezioni di uno o entrambi gli *Zinc fingers*, dal momento che le singole mutazioni alle Cisteine non hanno influito in modo significativo.

E' noto infine che la sovraespressione dell'ubiquitina ligasi Nedd4.2s è in grado di promuovere il rilascio di varianti di HIV-1 sprovviste di NC e di *L domain*, guidando Gag, mediante ubiquitinazione , al pathway ESCRT e di correggere i difetti del suo processamento, ancor più di quanto faccia Alix (Dussupt et al.,2009, Usami et al.,2008).



## 7.ABBREVIAZIONI

A Alanina

AIDS Sindrome da Immunodeficienza acquisita

AIP1 *ALG-2 interacting protein*

BSA albumina di siero bovino

C Cisteina

CA capside

CHMP *charged multivesicular protein*

CMV citomegalovirus

D acido Aspartico

DMEM *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA acido deossiribonucleico

ddNTP dideossinucleotide trifosfato

dNTP deossinucleotide trifosfato

E acido Glutamico

EIAV virus dell'Immunodeficienza Equina

FBS siero fetale bovino

FIV virus dell'Immunodeficienza Felina

G Glicina

H Istidina

HIV-1 virus dell'Immunodeficienza umana di tipo 1

IN integrasi

K Lisina

kDa chilo dalton

L *late*

L Leucina

LB Luria-Bertani

LTR *long terminal repeat*

MA matrice

MVB *Multivesicular body*

N Asparagina

NC nucleocapside

NEDD4 *Neural precursor cell-expresses developmentally downregulated*

nm nanometri

ORF *open reading frame*

P Prolina

p/v peso su volume

pb paia di basi

PBS tampone fosfato

PR proteasi

Pr50<sup>Gag</sup> poliproteina precursore Gag del peso di 50 kDA

R Arginina

RNA acido ribonucleico

RNasi ribonucleasi

rpm rivoluzioni per minuto

RRE *rev responsive element*

S Serina

SDS Sodio dodecil solfato

SU proteina di superficie

T Treonina

TBE Tris-borato EDTA

TE Tris-EDTA

TM proteina transmembrana

Tsg101 *Tumor susceptibility gene 101*

U unità enzimatica

Ub ubiquitina

U.V. luce ultravioletta

VLP *Virus-like particle*

Vps *vacuolar protein sorting*

Zn<sup>2+</sup> ione Zinco





## 8.BIBLIOGRAFIA

- Bendinelli M., Pistello M., Lombardi S., Poli A., Garzelli C., Matteucci D., Ceccherini-Nelli L., Malvaldi G., Tozzini F. 1995. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and a important cat pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 8: pp. 87-112.
- Bieniasz P.D. 2006. Late budding domains and host proteins in enveloped virus release. *Virology*, 344: pp. 55-63.
- Calistri A., Del Vecchio C., Salata C., Celestino M., Celegato M., Göttlinger H., Palù G., Parolin C. 2009. Role of the feline immunodeficiency virus L-domain in the presence or absence of Gag processing: involvement of ubiquitin and Nedd4-2s ligase in viral egress. *J.Cell.Physiol.* 218: pp.175-182.
- Chung H.Y., Morita E., von Schwidler U., Müller B., Kräusslich H.G., Sundquist W.I. 2008. NEDD4L overexpression rescues the release and infectivity of human immunodeficiency virus type 1 constructs lacking PTAP and YPXL late domains. *Journal of Virology* vol 82., pp4884-4897.
- Dussupt V., Javid M.P., Abou-Jaoudé G., Jadwin J.A., de La Cruz J., Kunio N., Bouamr F. 2009. The nucleocapsid region of HIV-1 Gag cooperates with the PTAP and LYPX<sub>n</sub>L late domains to recruit the cellular machinery necessary for viral budding. *PLoS Pathog* 5(3):e1000339.
- Elder J.H., Sundstrom M., de Rozières S., de Parseval A., Grant C.K., Ling Y.C. 2008. Molecular mechanism of FIV infection. *Veterinary Immunology and Immunopathology* . Vol.123, pp 3-13.
- Fujii K., Munshi U.M., Ablan S.D., Demirov D.G., Soheilian F., Nagashima K., Stephen A.G., Fisher R.J., Freed E.O. 2009. Functional role of Alix in HIV-1 replication. *Virology* , 391: pp.284-292.
- Guo J., Wu T., Kane B.F., Johnson D.G., Henderson L.E., Gorelick R.J., Levin J.G. 2002. Subtle alteration of the native zinc finger structures have dramatic effects on the nucleic acid chaperone activity of human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein. *Journal of Virology*, 76: pp. 4370-4378.
- Lee S., Joshi A., Nagashima K., Freed E.O, Hurley J.H. 2007. Structural basis for viral late domain binding to Alix. *Nat. Struct Mol Biol.*, 14(3): pp. 194-199.
- Lin Y.C., Brik A., de Parseval A., Tam K., Torbett B.E., Wong C.H., Elder J.H. 2006. Altered Gag polyprotein cleavage specificity of feline immunodeficiency virus/human immunodeficiency virus mutant proteases as demonstrated in a cell-based expression system. *Journal of Virology*, 80: pp.7832-7843.

Luttge B.G., Freed E.O. 2009. Virus assembly and host-cell interactions. *Vet. Immunol. Pathol.*,8168.

Manrique M.L., Rauddi M.L., González S.A., Affranchino J.L. 2004. Functional domains in the feline immunodeficiency virus nucleocapsid protein. *Virology* 327, pp.83-92.

Martin-Serrano J., Perez-Caballero D., Bieniasz P.D. 2004. Context-dependent effects of L domains and ubiquitination on viral budding. *Journal of virology*, 78: pp.5554-5563.

Martin-Serrano Juan, 2007. The role of ubiquitin in retroviral egress. *Traffic*, 8: pp. 1297-1303.

Mougel M., Houzet L., Darlix J.L. 2009. When is it time for reverse transcription to start and go? *Retrovirology*, 6:24.

Mustafa F., Jayanth P., Phillip P.S., Ghazawi A., Schmidt R.D., Lew K.A., Rizvi T.A. 2005. Relative activity of the feline immunodeficiency virus promoter in feline and primate cell lines. *Microbes and Infection* 7, pp.233-239.

Pistello M., Conti F., Vannucci L., Freer G. 2010. Novel approaches to vaccination against the feline immunodeficiency virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 134, pp 48-53.

Pistello M., Vannucci L., Ravani A., Bonci F., Chiuppesi F., Del Santo B., Freer G., Bendinelli M. 2007. Streamlined design of a self-inactivating feline immunodeficiency virus vector for transducing *ex vivo* dendritic cells and T lymphocytes. *Genetic Vaccine and Therapy*, 5:8.

Popov S., Popova E., Inoue M., Göttlinger H.G. 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Gag engages the Bro1 domain of ALIX/AIP1 through the Nucleocapsid. *Journal of Virology*, 82: pp. 1389-1398.

Popov S., Popova E., Inoue M., Göttlinger H.G. 2009. Divergent Bro1 domains share the capacity to bind human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid and to enhance virus-like particle production. *Journal of Virology*, 83: pp. 7185-7193.

Pornillos O., Garrus J.E., Sandquist W.I. 2002. Mechanism of enveloped RNA virus budding. *Cell Biology*, Vol.12.,12 Dec.

Saenz D.T., Poeschla E.M. 2004. FIV: from lentivirus to lentivector. *J Gene Med* , 6: pp.95-104.

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* Vol.74, pp.5463-5467.

Shimajima M., Miyazawa T., Ikeda Y., McMonagle E.L., Haining H., Akashi H., Takeuchi Y., Hosie M.J., Willett B.J. 2004. Use of CD134 as a primary receptor by the feline immunodeficiency virus. *Science*, Vol. 303,1192.

Strack B., Calistri A., Craig S., Popova E., Göttlinger H.G. 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*, Vol.114, pp.689-699.

Strack B., Calistri A., Göttlinger H.G. 2002. Late assembly domain function can exhibit context dependence and involves ubiquitin residues implicated in endocytosis. *Journal of Virology*, 76: pp. 5472-5479.

Thomas J.A, Gorelick R.J. 2008. Nucleocapsid function in early infection processes. *Virus Res.* 134(1-2): pp 39-63.

Thomas J.A., Bosche W.J., Shatzer T.L., Johnson D.G., Gorelick R.J. 2008. Mutations in human immunodeficiency virus type 1 nucleocapsid protein zinc fingers cause premature reverse transcription. *Journal of Virology*, 82: pp. 9318-9328.

Tomonaga K., Mikami T. 1996. Molecular biology of the feline immunodeficiency virus auxiliary genes. *Journal of General Virology*, Vol.77, pp.1611-1621.

Usami Y., Popov S., Popova E., Göttlinger H.G. 2008. Efficient and specific rescue of human immunodeficiency virus type 1 budding defects by a Nedd4-like ubiquitin ligase. *Journal of virology*, 82: pp. 4898-4907.