

UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA

XXV CICLO

**INGEGNERIZZAZIONE DELLA PROTEINA DI
MATRICE M1 DEL VIRUS DELL'INFLUENZA
PER LA PRODUZIONE DI *VIRUS-LIKE
PARTICLES* (VLPs) A SCOPO VACCINALE**

Direttore della Scuola: **Ch.mo Prof. Giorgio Palù**

Supervisore: **Dott.ssa Arianna Calistri**

Dottoranda: **Dott.ssa Marta Toffoletto**

*A Mamma e Papà,
sempre e per sempre
dalla stessa parte
mi troverai...*

INDICE

1. SOMMARIO	1
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUZIONE	9
3.1 Il virus dell'influenza	9
3.2 Evoluzione dei virus influenzali	10
3.3 Il virus dell'influenza A: morfologia e fattori di patogenicità	12
3.3.1 Il ciclo replicativo del virus dell'influenza	16
3.4 Ruolo delle proteine di matrice M1 e M2 nella gemmazione virale del virus dell'influenza	19
3.5 Terapia e prevenzione dell'infezione da virus dell'influenza	26
3.5.1 Particelle simil-virali o <i>Virus-like particles</i> (VLP) come piattaforma vaccinale contro il virus dell'influenza A	28
3.5.2 Sviluppo di un vaccino universale contro il virus dell'influenza A	30
4. SCOPO	33
5. MATERIALI E METODI	35
Materiali	35
5.1 Linee cellulari	35
5.2 Plasmidi	35
5.3 Oligonucleotidi	41
Metodi	41
5.4 Competenza e trasformazione batterica	41
5.5 Preparazione di DNA plasmidico	44
5.6 Quantificazione degli acidi nucleici	44
5.7 Estrazione dell'RNA virale e RT-PCR	45
5.8 Reazione a catena della polimerasi (PCR)	46
5.9 Mutagenesi sito-specifica	47
5.10 Strategie di clonaggio	48
5.10.1 Ottenimento dei plasmidi esprimenti le proteine di matrice M1 e M2 del virus dell'influenza A/WSN/33 H1N1	49
5.10.2 Ottenimento dei plasmidi codificanti proteine chimeriche M1 derivate	53
5.10.3 Ottenimento dei plasmidi codificanti le fusioni della proteina M1 con la proteina M2 o parte di essa	57
5.10.4 Ottenimento dei costrutti codificanti la proteina M2 o parti di essa fuse a mutanti della proteina Gag di FIV	59
5.10.5 Ottenimento dei costrutti codificanti le emoagglutinine senza il dominio globulare (HA <i>headless</i>)	61
5.11 Restrizione enzimatica	62
5.12 Reazione di sequenziamento	63
5.13 Trasfezione di cellule 293T e COS-7	64
5.14 Purificazione di <i>Virus Like Particles</i> (VLP) su cuscino di saccarosio	66
5.15 Preparazione dei lisati cellulari	67
5.16 Elettroforesi di proteine (SDS-PAGE)	67
5.17 Western Blotting	68
5.18 Modello murino e protocollo di vaccinazione	69
5.19 Purificazione della proteina M1 mediante immunoprecipitazione	70
5.20 Valutazione della risposta immunitaria umorale	70
5.21 Analisi della proliferazione dei linfociti T	71
6. RISULTATI	73
Premessa	73
6.1 Analisi degli effetti dell'inserimento di <i>L-domain</i> o di proteine facenti parte del complesso ESCRT e della miristilazione nella proteina M1 nelle <i>Virus-Like Particles</i> (VLP)	74

6.1.2 Mutagenesi del segnale di miristilazione del costrutto MyrM1CHMP4B	79
6.2 Ruolo di M2 nel contesto della produzione di VLP basate sulla proteina M1	83
6.2.1 Analisi del ruolo di M2 e di parti di essa nel contesto di mutanti del virus dell'immunodeficienza felina (FIV) privi del dominio tardivo funzionale	86
6.3 Valutazione dell'immunità indotta dalle VLP composte dalla proteina di matrice M	90
6.4 Valutazione dell'incorporazione delle diverse proteine HA <i>headless</i> in particelle virali di FIV	96
7. DISCUSSIONE	101
8. ABBREVIAZIONI	113
9. BIBLIOGRAFIA	117
10 RINGRAZIAMENTI	129
11. PUBBLICAZIONI ALLEGATE.....	131

1. SOMMARIO

I virus dell'influenza costituiscono un rilevante problema di sanità pubblica a livello mondiale, in quanto sono gli agenti eziologici di patologie respiratorie acute che si possono presentare sotto forma di epidemie annuali, oppure come pandemie occasionali. Questi virus evolvono costantemente mediante l'accumulo di mutazioni puntiformi a carico degli antigeni di superficie emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA) (*antigenic drift*), oppure in seguito a fenomeni di riassortimento genico (*antigenic shift*) derivanti dalla coinfezione di virus aviari ed umani in un ospite intermedio. L'alto tasso di mutazioni, la possibilità di riassortimento dei segmenti genici e l'ampia varietà di virus dell'influenza spiegano la capacità di questi virus di superare le barriere anticorpali indotte da immunità pregresse (Wong *et al.*, 2005). Inoltre, l'alta variabilità del virus dell'influenza limita anche l'efficacia della terapia antivirale a disposizione a causa dei frequenti fenomeni di farmaco-resistenza. La vaccinazione rappresenta, quindi, la miglior strategia per prevenire e ridurre le possibilità di infezione da parte del virus dell'influenza e le conseguenti complicazioni. Tuttavia, le strategie per lo sviluppo di vaccini efficaci, capaci di stimolare immunità di lunga durata, sono risultate vane ad oggi, determinando quindi la necessità di cambiare ogni anno la formulazione del vaccino influenzale (Wong *et al.*, 2005). Per questo motivo, sono allo studio nuovi approcci vaccinali che consentano di ottenere, una volta inoculati nell'uomo, una protezione prolungata e diretta contro diversi sottotipi influenzali (vaccini universali). Inoltre, si cerca di migliorare l'efficacia e la rapidità delle procedure produttive dei vaccini classici, in maniera da poter affrontare, se necessario, emergenze quali l'insorgenza di ceppi influenzali pandemici (Kang *et al.*, 2011). Una tecnica molto promettente, da entrambi i punti di vista, risulta essere quella basata sulla produzione di particelle simil-virali o *Virus-like particles* (VLP). Le VLP mimano strutturalmente la particella virale, ma mancano della capacità replicativa, poichè prive del genoma virale (Zeltins, 2013). Le particelle simil-virali possono essere ottenute mediante l'espressione delle proteine strutturali virali (es.: Gag dei retrovirus, L1 di HPV), le quali hanno la capacità intrinseca di autoassemblarsi e gemmare dalle cellule (Haynes, 2009). Inoltre, le VLP possono essere utilizzate anche come piattaforme per la presentazione di epitopi, anche eterologhi, immunodominanti. La proteina di matrice M1 rappresenta la *driving force* della fase di gemmazione del virus dell'influenza (Gomez-Puertas *et al.*, 2000). La sua espressione nelle cellule, tuttavia, non è sufficiente a determinare la produzione di VLP. Questo dipende da

diverse ragioni, tra le quali l'incapacità di M1 di contattare da sola la membrana plasmatica, a causa della mancanza di un segnale specifico di indirizzamento (Wang *et al.*, 2010a). A questo proposito, è stato dimostrato come un'altra proteina strutturale virale, M2, svolga un ruolo importante nelle ultime fasi del processo di gemmazione virale, mediando proprio l'interazione tra M1 e la membrana plasmatica (Chen *et al.*, 2008). Inoltre, è stato recentemente chiarito che la capacità del virus dell'influenza di gemmare dalle cellule infettate in assenza del *pathway* di biogenesi dei *Multivescicular Bodies* (MVB), funzionale, utilizzato invece dalla maggior parte dei virus ad RNA dotati di *envelope*, sia da ascrivere proprio a funzioni intrinseche di M2. In particolare, M2 sarebbe in grado di funzionare come sostituto delle proteine appartenenti al complesso ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-III, fondamentale nell'ambito della formazione dei MVB e nella gemmazione di molti virus a RNA (Rossman *et al.*, 2010).

Scopo del presente lavoro di tesi è stato quello di conferire ad M1 le minime caratteristiche necessarie per gemmare da cellule eucariotiche anche in assenza di altri componenti virali. A tale scopo, M1 è stata opportunamente ingegnerizzata attraverso la fusione di domini, porzioni o intere proteine eterologhe, al fine di conferirle la capacità di contattare autonomamente la membrana cellulare e di sfruttare ESCRT-III. Il presente lavoro di dottorato si propone quindi l'ottimizzazione della produzione di VLP del virus dell'influenza come piattaforma per lo sviluppo di un vaccino universale. In particolare, l'attenzione è stata focalizzata sulla proteina di matrice M1 e sulla possibilità di renderla indipendente dalla proteina M2 durante la fase di gemmazione. È stato possibile quindi dimostrare: i) che il segnale di miristilazione della proteina Gag del virus dell'immunodeficienza umana (HIV-1), fuso nella regione amminotermine di M1 (Myr-M1), le conferisce la capacità di contattare la membrana plasmatica, ii) che l'aggiunta di un piccolo dominio ricco in prolina (PTAP), noto in letteratura come in grado di mediare l'interazione tra proteine diverse e il *pathway* di biogenesi dei MVB, consente ad Myr-M1 di gemmare nel sovratante cellulare; iii) che la fusione tra M1 e la proteina cellulare CHMP4B, appartenente al complesso ESCRT-III consente ad M1 di fuoriuscire dalle cellule, indipendentemente dalla presenza del segnale di miristilazione. Inoltre, abbiamo dimostrato che la proteina di fusione M2-M1 è in grado di gemmare autonomamente dalle cellule, così come la sola M2. Infine, le VLP basate su M2, M2-M1 e Myr-M1-CHMP4B sono state utilizzate in un esperimento pilota, eseguito nel topo, al fine di analizzarne l'immunogenicità *in vivo*. Nonostante siano stati rilevati anticorpi specifici e

diretti contro la proteina M1 in un numero statisticamente non significativo di topi saggiati, i dati ottenuti in questo esperimento pilota risultano essere incoraggianti. Infatti, sono stati raggiunti utilizzando VLP prodotte in condizioni di purificazione ancora da ottimizzare.

Partendo da questi dati, abbiamo anche generato una serie di costrutti codificanti diversi mutanti della proteina di superficie del virus influenzale HA, accomunati dall'assenza di uno dei suoi domini, ovvero dalla parte globulare (*HA-headless*). E' stato, infatti, dimostrato che *HA-headless*, a differenza della forma *wild-type* della proteina, è caratterizzata dall'esposizione al sistema immunitario di epitopi altamente conservati e, quindi, rappresenta un'ottima base per lo sviluppo di un vaccino universale, in grado di stimolare la risposta immunitaria verso ceppi virali diversi. Abbiamo analizzato e dimostrato la possibilità di incorporare *HA-headless* in particelle simil-virali basate sull'espressione della proteina Gag del virus dell'immunodeficienza felina (FIV). Intendiamo ora valutare la possibilità di incorporare *HA-headless* anche nelle VLP basate su M1 ingegnerizzata e, dopo opportuna purificazione, testare queste ultime e le VLP basate su FIV nel modello murino. In ultimo, al fine di approfondire il ruolo svolto da M2 come sostituta di ESCRT-III nell'ambito della gemmazione del virus dell'influenza, sono stati generati costrutti specifici basati sulla proteina strutturale Gag di FIV, mutata a livello delle sequenze che il nostro gruppo di ricerca ha dimostrato essere essenziali per il reclutamento del *pathway* di biogenesi degli MVB e per la gemmazione di FIV (Calistri *et al.*, 2009a). I risultati ottenuti suggeriscono che la regione della coda citoplasmatica di M2 è in grado di ripristinare la gemmazione dei mutanti virali.

In conclusione, i dati ottenuti in questa tesi di dottorato non solo forniscono importanti informazioni biologiche, relative alle funzioni di due proteine del virus dell'influenza (M1 e M2) e del coinvolgimento di proteine cellulari in fasi essenziali del ciclo replicativo virale, ma pongono interessanti basi per lo sviluppo di nuove strategie vaccinali dirette contro il virus dell'influenza basate su VLP.

2. ABSTRACT

Influenza viruses represent a significant public health problem, since they are the etiological agents of acute respiratory illness that can occur in annual epidemics or in occasionally pandemic events. Influenza viruses constantly evolve by the accumulation of point mutations at the level of their antigenic determinants hemagglutinin and neuraminidase (*antigenic drift*), or as a result of a genetic reassortment (*antigenic shift*), usually happening when avian and human viruses co-infect an intermediate host. The high rate of mutations, the possibility of reassortment of gene segments and the wide variety of influenza viruses explain their ability to overcome the host immunity, acquired by previously vaccination (Wong *et al.*, 2005). Moreover, the difficulty of developing vaccines capable of inducing a long-lasting immune response leads to the need of up-dating the vaccine formulation every year (Wong *et al.*, 2005). On the other hand, molecular evolution processes determine an increasing emergence of drug-resistant viruses that restrict the efficacy of the antiviral drugs. Indeed, vaccination remains the most effective preventative strategy to reduce the chance of infection from influenza virus and its complications. In this context, vaccines based on virus-like particles (VLPs) are extremely promising. In fact VLPs, while being antigenically identical to the infectious virus, lack pathogenicity. VLPs are obtained by expressing specific viral structural proteins, that display the ability to bud from cells, in the absence of any other viral component (such as retroviral Gag and papillomavirus L1) (Zeltins, 2013). VLPs can be used per se or as “platforms” for the presentation of immunodominant epitopes. In the case of influenza viruses, the matrix protein M1 represents the major driving force of viral budding process (Gomez-Puertas *et al.*, 2000). However, the expression of M1 alone does not allow the production of VLPs. Among other reasons, this feature is due to the lack in M1 of a membrane targeting signal (Wang *et al.*, 2010a). In this context, during the viral infection, it is the second matrix protein, M2, which is characterized by a targeting signal and can physically interact with M1, that brings the latest in contact with the plasma membrane (Chen *et al.*, 2008). Moreover, M2 is also able to facilitate the curvature of the membrane and the scission of the envelope of the budding viral particle from the cell surface (Rossman *et al.*, 2010), a function that is linked to the cellular complex ESCRT (endosomal sorting complex required for transport)-III, in the case of most enveloped viruses (Calistri *et al.*, 2009b).

The overall aim of our work was to optimize the production of influenza VLPs based on M1, by identifying the minimal sequences requested to render M1 able to

bud independently from M2 co-expression. To this end, we created different recombinant M1 proteins characterized by the ability to interact with different ESCRT components and to directly contact the plasma membrane, in the absence of M2. Specifically, we generated constructs expressing M1 fused to the myristilation signal of HIV-1 Gag and containing short proline rich domains (L-domains) capable of interacting with either Tsg101 (PTAP), AIP1/Alix (YPDL), both cellular proteins able to interact with ESCRT-III and involved in the budding of several RNA enveloped viruses (Calistri *et al.*, 2009b), or to a motif (PTAPPEY) known to be extremely efficient in mediating the production of VLPs (Strack *et al.*, 2000). Moreover, we directly fused at the C-terminus of M1 specific ESCRT-III proteins, namely CHMP3 and CHMP4B. In this way, we were able to demonstrate that: i) the HIV-1 Gag myristilation signal, added to the N-terminus of M1 (Myr-M1), confers it the ability to contact the plasma membrane; ii) the insertion of the small proline rich domain PTAP allows Myr-M1 to form VLPs and iii) the fusion between M1 and the cellular protein CHMP4B allows M1 to bud from the cells, independently from the presence of the myristilation signal. Furthermore, we were able to demonstrate that M2 alone and the M2-M1 fusion protein can self-assemble and bud into virus-like particles. In this context, by engineering specific mutants of the Gag proteins of the feline immunodeficiency virus (FIV), previously described in our laboratory (Calistri *et al.*, 2009a), we were able to demonstrate that indeed M2, and in particular its cytoplasmic region, can act as a substitute of ESCRT-III components for the budding of the influenza virus. Finally, VLPs based on M2, M2-M1 and M1-Myr-CHMP4B, were used in a pilot experiment performed in mice, in order to analyze their immunogenicity. Interestingly, we were able to detect specific antibodies directed against the protein M1, even though in a small number of tested animals. However, the obtained data are encouraging, since the purification of the employed VLPs, which are still under characterization in terms of density and morphology, was not optimal, thus affecting the obtained results. Finally, we also generated different hemagglutinin (HA) mutants characterized by the absence of the globular head (headless-HA). Indeed, it is well known that the conserved stalk domain of influenza HA is highly immunogenic and confers a broadly immune response (Steel *et al.*, 2010). We demonstrated that headless HA can be incorporated into engineered VLPs, based on FIV Gag protein. Currently, we are analyzing the possibility of incorporating headless-HA protein also in M1-based VLPs. Next, after setting up the appropriate purification protocol, we would test these M1-based VLPs, together with the FIV-based one, in the mouse model.

In conclusion, overall our data provide on one hand important biological insights into the function/characteristics of the influenza virus M1 and M2 proteins and, on the other hand useful information for the development and improvement of influenza-based VLPs to be employed in vaccination strategies.

3. INTRODUZIONE

3.1 Il virus dell'influenza

I virus dell'influenza sono agenti eziologici di sindromi respiratorie acute altamente contagiose, che costituiscono un problema di sanità pubblica rilevante, a causa dell'elevata morbilità e mortalità nell'uomo a livello globale (Goodman *et al.*, 2011). I dati riportati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO) stimano tra 250000 e 500000 i casi di morte l'anno legati a complicanze associate all'influenza in tutto il mondo (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/index.html>). I virus dell'influenza sono responsabili di epidemie annuali, che si verificano nel periodo invernale, e, occasionalmente, di eventi pandemici. In particolare, i virus influenzali pandemici hanno la capacità intrinseca di diffondere molto rapidamente tra gli individui, causando patologie di diversa entità. Ad esempio, il virus dell'influenza responsabile della pandemia del 1918 ha causato la morte di oltre 50 milioni di persone nell'arco di due anni, mentre il sottotipo virale H1N1 del 2009 è riuscito a diffondere molto rapidamente tra la popolazione, infettando circa 22 milioni di persone, determinando, però, sindromi più lievi (Rossman *and* Lamb, 2011).

I virus dell'influenza appartengono alla famiglia degli *Orthomyxoviridae*, un gruppo di virus dotati di *envelope* e con genoma segmentato, costituito da molecole di RNA monocatenario a polarità negativa. I virus influenzali sono classificati nei tre diversi tipi (A, B, C) in base alle caratteristiche della matrice (M), della nucleoproteina (NP) e al diverso spettro d'ospite (Arias *et al.*, 2009). Inoltre, i virus dell'influenza di tipo A vengono ulteriormente suddivisi in sottotipi (profilo antigenico **HxNy**) in relazione alle caratteristiche degli antigeni di superficie emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA), di cui fino ad oggi sono state identificate rispettivamente sedici e nove varianti (Arias *et al.*, 2009). Tutti questi sottotipi virali sono stati isolati in uccelli acquatici selvatici, in particolare nelle specie migratorie, che fungono, quindi, da serbatoio naturale (*reservoir*) del virus (Fig. 3.1). Ogni isolato virale viene identificato secondo una nomenclatura standard in cui la prima lettera indica il tipo (A, B, C), a seguire la specie d'origine (nel caso di isolati virali non umani), il luogo d'isolamento, il numero dell'isolato, l'anno dell'isolamento e, nel caso dei virus dell'influenza A, anche l'eventuale sottotipo di HA e NA [per esempio: A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1)].

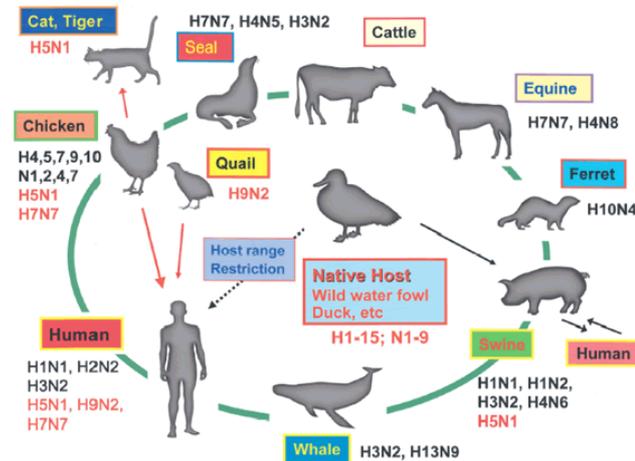


Figura 3.1: Rappresentazione schematica dei diversi sottotipi virali e degli ospiti coinvolti (Suzuki, 2005).

Dal punto di vista epidemiologico, i virus dell'influenza A sono i principali responsabili degli eventi epidemici annuali e delle occasionali pandemie. Insieme ai virus di tipo B, possono, inoltre, causare complicazioni gravi, quali polmoniti ed encefaliti (Baigent *and* McCauley, 2003). Inoltre, i virus influenzali di tipo A sono caratterizzati da un ampio spettro d'ospite, che oltre all'uomo comprende tra gli altri suini, cavalli e furetti. I ceppi appartenenti al virus dell'influenza del tipo B infettano quasi esclusivamente l'uomo e le foche, causando sindromi più lievi. Infine, i virus dell'influenza di tipo C risultano essere agenti causali di infezioni molto rare e di modesta entità del tratto respiratorio superiore dell'uomo e dei suini. Gli *Influenzavirus* di tipo A e B presentano un genoma costituito da 8 molecole di RNA a singola elica, mentre quelli di tipo C hanno un genoma costituito da sette segmenti di RNA. Infatti, quest'ultimi possiedono un'unica glicoproteina, denominata HEF (*Hemoagglutinin-Esterase-Fusion*), la quale svolge le stesse funzioni dell'emoagglutinina (HA) e della neuraminidasi (NA), caratteristiche dei virus di tipo A e B (Baigent *and* McCauley, 2003).

3.2 Evoluzione dei virus influenzali

Come accennato inizialmente, i virus dell'influenza A evolvono costantemente utilizzando due diversi meccanismi: l'*antigenic drift* e l'*antigenic shift*. L'alto tasso di mutazioni a cui sono soggetti porta alla comparsa di nuove varianti antigeniche, che incidono sulla capacità di superare le barriere anticorpali create da infezioni o vaccinazioni pregresse (Wong *et al.*, 2005). Le proteine che sono maggiormente interessate da questi cambiamenti sono l'emoagglutinina (HA) e la

neuraminidasi (NA), esposte alla pressione selettiva del sistema immunitario. In particolare, la specificità del legame tra il recettore dell'acido sialico e la proteina emoagglutinina è un determinante fondamentale del tropismo d'ospite. L'acido sialico è composto da un monosaccaride di nove atomi carbonio che solitamente si trova all'estremità di diversi glicoconiugati, presenti sulla superficie di diversi tipi cellulari e in diverse specie animali. Nello specifico, l'atomo di carbonio in posizione 2 può legare il carbonio in posizione 3 e 6 del galattosio, portando alla formazione rispettivamente di legami α -2,3 e α -2,6. La specificità di riconoscimento e il legame dei residui di acido sialico α -2,3 o α -2,6 è determinata dalla diversa affinità dell'emoagglutinina presente sulla superficie del virione. Infatti, i virus umani si legano preferenzialmente a residui di acido sialico che presentano un legame α 2,6 con la molecola oligosaccaridica; mentre i virus aviari richiedono la presenza di un legame di tipo α 2,3 (Neumann *and* Kawaoka, 2006). La conformazione α -2,3 prevale nelle mucose respiratorie ed enteriche di diverse specie di anseriformi. Invece, nell'epitelio tracheale dell'uomo sono predominanti i residui con legame α -2,6. Tuttavia, nell'epitelio delle basse vie aeree umane (bronchioli, alveoli e pneumociti di tipo II) sono stati individuati anche residui di acido sialico con legame di tipo α 2,3, seppure meno abbondanti. Per questo motivo, l'uomo può essere infettato, anche se in maniera meno efficiente, da un virus influenzale di derivazione aviaria sviluppando gravi complicanze (Bouvier *and* Palese, 2008).

Le epidemie stagionali influenzali sono associate al meccanismo di *antigenic drift*, che consiste nell'insorgenza di mutazioni puntiformi nei segmenti genici di HA e NA. A causa di questo fenomeno che avviene in maniera continuativa, è necessario variare la formulazione vaccinale ogni anno (Arias *et al.*, 2009).

Un altro meccanismo coinvolto nell'evoluzione del virus dell'influenza è *l'antigenic shift*, ovvero riassortimento genico, che è stato la causa delle pandemie avvenute fino ad oggi. Questo processo è agevolato dalla caratteristica del genoma virale di essere segmentato ed ha origine quando due virus di diversa derivazione (aviaria e umana) coinfectano uno stesso organismo, per esempio il suino (Wong *et al.*, 2005). Infatti, nell'epitelio tracheale del suino sono presenti residui di acido sialico legati al galattosio con legami α 2,6 (recettori per HA dei virus umani) e legami α 2,3 (recettori per HA dei virus aviari). Questo organismo viene definito *mixing vessel*, ovvero funge da "contenitore di riassortimento", determinando la comparsa di nuovi sottotipi virali (Wong *et al.*, 2005). Le nuove varianti così ottenute possiedono un elevato potenziale pandemico, in quanto la popolazione

umana risulta completamente o significativamente sprovvista di immunità nei loro confronti.

3.3 Il virus dell'influenza A: morfologia e fattori di patogenicità

Le particelle del virus dell'influenza A sono caratterizzate da una forma sferica o filamentosa con un diametro che varia dagli 80 ai 120 nm, per questo sono detti pleomorfici (Rossman *and* Lamb, 2011) (Fig.3.2). Esternamente, le particelle virali possiedono un doppio strato lipidico, denominato *envelope*, in cui sono inserite le due glicoproteine di membrana emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA) e la proteina di matrice M2 (Bouvier *and* Palese, 2008). I lipidi che compongono questa struttura derivano dalla membrana plasmatica della cellula ospite e sono arricchiti in colesterolo e glicosfingolipidi.

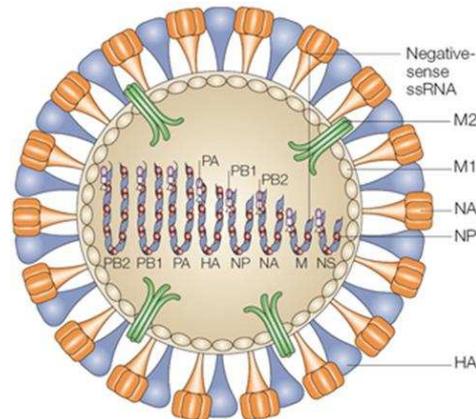


Figura 3.2: Rappresentazione schematica della particella virale del virus dell'influenza A (Horimoto *and* Kawaoka., 2005).

L'emoagglutinina è la glicoproteina integrale di membrana più abbondante dell'*envelope* ed il determinante antigenico responsabile del tropismo d'ospite (Bouvier *and* Palese, 2008). HA, che assume una forma di omotrimerico durante il processo di maturazione, è caratterizzata da una testa globulare, posta su uno stelo, dove è presente il sito di legame con il recettore (Rossman *and* Lamb, 2011). La testa è costituita esclusivamente dalla subunità HA1, mentre lo stelo è formato principalmente dalla subunità HA2. Le due subunità presenti nella forma matura funzionale derivano da un precursore inattivo HA0 (Arias *et al.*, 2009). La neuraminidasi è il secondo più importante antigene di superficie del virione ed è la glicoproteina di membrana deputata a facilitare il rilascio e la diffusione dei virioni nell'ospite, attraverso il taglio dei legami glicosidici tra i residui di acido sialico della cellula ospite e la superficie delle particelle virali (Arias *et al.*, 2009). NA assume la forma di omotetramero, composto da una testa e da un peduncolo

nella regione amminoterminale, che funge da segnale di ancoraggio alla membrana. La testa è costituita da quattro subunità identiche che contengono i quattro siti catalitici, fondamentali per il rilascio delle particelle virali neoformate (Enami *and* Enami, 1996).

Nell'*envelope* è presente anche la proteina di matrice 2 (M2), organizzata in omotetrameri, che funge da canale ionico cruciale per la dissociazione pH-dipendente della proteina matrice (M1) dalla nucleoproteina (NP), permettendo così il rilascio del genoma virale nella cellula ospite (Nayak *et al.*, 2004). Inoltre, M2 influenza anche le variazioni del pH della rete del *trans*-Golgi durante la maturazione delle nuove particelle virali (Wong *et al.*, 2005). Lo strato interno all'*envelope* è costituito dal nucleocapside, caratterizzato da matrice e *core*, che include i complessi delle ribonucleoproteine virali (vRNPs) (Nayak *et al.*, 2004). La proteina di matrice M1 funge da ponte tra *envelope* virale e *core* ed è la proteina più abbondante nel virione. M1 svolge un ruolo fondamentale nella fase di assemblaggio e di gemmazione della progenie virale (Arias *et al.*, 2009). Il *core* virale consiste di 8 complessi ribonucleoproteici (vRNP), costituiti dai segmenti di RNA genomico monocatenario a polarità negativa (vRNA), legati alla nucleoproteina (NP) e al complesso dell'RNA polimerasi virale (Nayak *et al.*, 2004). Nel *core* è presente in piccole quantità la proteina non strutturale 2 (NS2), coinvolta nel trasporto dei complessi vRNP dal nucleo al citoplasma e per questo viene anche denominata *Nuclear Export Protein* o NEP (Nagata *et al.*, 2008).

Gli otto segmenti di RNA virale del virus dell'influenza A codificano undici proteine virali e sono numerati in ordine decrescente in base alla loro lunghezza. I primi sei segmenti codificano ognuno una proteina e sono rispettivamente: la polimerasi basica 2 (PB2); la polimerasi basica 1 (PB1); la polimerasi acida (PA); l'emoagglutinina (HA) e la neuroaminidasi (NA). In alcuni sottotipi virali dell'influenza A altamente patogeni è stato identificato un peptide PB1-F2, codificato da un secondo *open reading frame* (ORF) nel segmento della polimerasi basica 1, che induce apoptosi cellulare (Bouvier *and* Palese, 2008). Il gene PB1 del virus dell'influenza A (H1N1) 2009 codifica una proteina PB1-F2 tronca, molto probabilmente non funzionale, di soli 11 amminoacidi (Arias *et al.*, 2009). Gli ultimi due segmenti 7 e 8 codificano rispettivamente le proteine di matrice (M1, M2) e le proteine non-strutturali (NS1, NS2). Le proteine di matrice 2 (M2) e non strutturale 2 (NS2) derivano da un evento di *splicing* dei trascritti primari codificanti la proteina di matrice 1 (M1) e la proteina non-strutturale 1 (NS1) (Bouvier *and* Palese, 2008). Le estremità terminali di ogni segmento di RNA virale formano una struttura a forcina elicoidale, che viene legata dal

complesso eterotrimerico dell'RNA polimerasi (PB1, PB2 e PA). Il resto del segmento genico viene ricoperto dalla nucleoproteina (NP), che essendo ricca di arginine è carica positivamente e quindi interagisce con il gruppo fosfato presente nell'RNA virale (Fig. 3.3) (Bouvier *and* Palese, 2008).

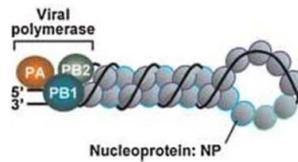


Figura 3.3: Rappresentazione dei complessi ribonucleoproteici (RNP) del virus dell'influenza A (Nagata *et al.*, 2008).

All'estremità 3' e 5' di ogni segmento virale, è stata identificata una regione non codificante diversa in dimensione, ma altamente conservata tra tutti i vRNA del virus dell'influenza. In questa regione non codificante, sono localizzati anche il segnale di poliadenilazione dell'RNA messaggero e parte del segnale di *packaging* utile per l'assemblaggio virale (Bouvier *and* Palese, 2008).

L'interesse verso i fattori coinvolti nella patogenicità dei virus influenzali è cresciuto nel corso degli ultimi anni a causa del potenziale pandemico di alcuni ceppi aviari, come H5N1, e a seguito della pandemia del 2009. Le proteine coinvolte nella patogenesi ricoprono un ruolo specifico nel tropismo virale, nella capacità di regolare la risposta immunitaria dell'ospite e nella trasmissione in nuove specie (Bouvier *and* Palese, 2008).

L'emoagglutinina dei virus dell'influenza A viene considerata il principale determinante di patogenicità virale. Oltre a mediare il riconoscimento di specifici tipi di legame dell'acido sialico a proteine di membrana, essenziale per la specie-specificità, questa proteina presenta una regione determinante nel tropismo cellulare. Infatti, la presenza di singoli o multipli residui basici nel precursore HA0 influisce sull'efficienza del processo di clivaggio e sul riconoscimento da parte di proteasi cellulari (Arias *et al.*, 2009). Questo incide sulla capacità del virus di determinare un'infezione localizzata o sistemica. I virus influenzali umani sono pneumotropici e presentano una singola carica positiva nel sito di taglio dell'HA che viene clivata da proteasi specifiche (triptasi di Clara), limitando la replicazione all'apparato respiratorio (Nayak *et al.*, 2004). Al contrario, i virus aviari considerati ad elevata patogenicità sono pantropici e le loro emoagglutinine contengono residui basici multipli, che vengono clivate da proteasi ubiquitarie con la disseminazione del virus a livello sistemico (Nayak *et al.*, 2004).

La polimerasi basica 2 è coinvolta nella replicazione virale ed è stato dimostrato come specifiche mutazioni in questo segmento siano associate all'aumento nella virulenza, ma anche al tropismo e alla trasmissione all'ospite. Alcuni studi eseguiti su isolati virali del sottotipo H5N1 hanno dimostrato come la sostituzione dell'acido glutammico in posizione 627 (presente nei virus aviari) con una lisina (presente in sottotipi umani), oltre a determinare il grado di patogenicità del virus, possono incidere sull'efficienza di replicazione nelle alte e nelle basse vie respiratorie (Arias *et al.*, 2009).

PB1-F2 è una piccola proteina (87-89 aminoacidi) codificata da un secondo *open reading frame* (ORF) nel segmento 2 ed è presente solo in sottotipi virali altamente patogeni. È stata dimostrata la sua interazione con due proteine della membrana mitocondriale, che aumentano la permeabilità della membrana stessa, favorendo il rilascio del citocromo C e l'attivazione della cascata apoptotica. Alcuni studi indicano come un singolo cambiamento amminoacidico in posizione 66 (asparagina-serina) della proteina assuma particolare importanza nella virulenza dei ceppi aviari H5N1 (Arias *et al.*, 2009).

La patogenicità virale si esplica nella capacità del virus di eludere le difese immunitarie dell'ospite. La proteina non strutturale 1 (NS1) svolge un ruolo chiave in questo processo, bloccando la sintesi proteica cellulare ed fungendo da antagonista della risposta antivirale interferone-mediata (IFN α/β) (Arias *et al.*, 2009). NS1 è una proteina multifunzione, che modula la virulenza e influisce sulla replicazione, ed è suddivisa in due domini. Il primo dominio N-terminale (1-73 aminoacidi) è responsabile del legame con l'RNA a doppio filamento, il secondo C-terminale (74-231 aminoacidi), detto dominio effetore è utilizzato per bloccare la maturazione e l'esportazione degli mRNA cellulari (Hale *et al.*, 2008). Le molteplici funzioni di NS1 comprendono: la regolazione temporale della sintesi degli RNA virali; il controllo dello splicing degli mRNA virali e l'aumento della loro traduzione; la regolazione nella morfogenesi delle particelle virali; la soppressione della risposta apoptotica/immunitaria dell'ospite; l'attivazione della fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) e il coinvolgimento nella patogenesi ceppo-dipendente (Hale *et al.*, 2008).

Altre due proteine sono associate alla patogenicità dei virus influenzali in quanto coinvolte con l'insorgenza di resistenze ai farmaci antivirali fino ad oggi in uso. Questi due fattori sono la proteina di matrice M2 e NA. La neuraminidasi è un importante fattore di patogenesi in quanto coinvolta con il rilascio della progenie virale dalla cellula infettata. L'efficienza nel rilascio delle particelle neoformate risulta essere correlata alla lunghezza e alla sequenza della regione che separa il

core enzimatico di NA dai domini transmembranario e citoplasmatico. L'accorciamento di questa regione diminuisce l'efficienza nel rilascio del virus, limitando l'accesso al substrato da parte del sito attivo della proteina (Newmann *and* Kawaoka, 2006). Inoltre, è stato dimostrato che l'attività della neuraminidasi può variare tra virus appartenenti allo stesso sottotipo e mostrare maggiore o minore resistenza al pH acido dell'apparato digerente, a seconda che i virus siano di derivazione aviaria, suina o umana. Per questo motivo virus riassortanti possono mostrare un maggior grado di patogenicità (Newmann *and* Kawaoka, 2006). La proteina di matrice M2 funge da canale ionico responsabile dell'acidificazione del *core* virale e svolge un ruolo importante nell'assemblaggio e nella gemmazione virale, come precedentemente descritto. Recentemente, è stato dimostrato come la parte N-terminale di M2 (60 amminoacidi) blocchi la maturazione degli autofagosomi, ostacolando la loro fusione con i lisosomi. Ciò comporta l'inibizione del processo cellulare della macroautofagia, che compromette la sopravvivenza delle cellule infettate dal virus ma non la replicazione dello stesso. L'induzione dell'apoptosi cellulare non è correlata con l'aumento di titolo virale, bensì sembrerebbe essere coinvolta nell'evasione dal sistema immunitario (Gannage *et al.*, 2009).

3.3.1 Il ciclo replicativo del virus dell'influenza

Il ciclo replicativo del virus influenzale inizia con il riconoscimento del recettore di acido N-acetilneuroaminico (sialico) presente sulla membrana cellulare da parte della glicoproteina di superficie HA, permettendo l'adesione del virus sulla superficie della cellula bersaglio (Fig. 3.4). Durante la replicazione virale, l'emoagglutinina sotto forma di precursore inattivo (HA0) viene clivata nelle due subunità funzionali HA1 e HA2, tramite l'azione di alcune serin-proteasi dell'ospite (Baigent *and* McCauley, 2003). A seguito del legame al recettore da parte del dominio HA1, la particella virale viene internalizzata mediante endocitosi in vescicole rivestite di clatrina. La successiva acidificazione del lume dell'endosoma determina il cambiamento conformazionale dell'emoagglutinina con l'esposizione del peptide di fusione presente nel dominio HA2 (Bouvier *and* Palese, 2008). Questo peptide si inserisce nella membrana della vescicola, provocandone la fusione con l'*envelope* virale. A seguire, l'attivazione del canale ionico costituito dalla proteina M2 permette l'immissione di protoni all'interno del virione, acidificando quindi il lume della vescicola e provocando la dissociazione tra la proteina di matrice 1 (M1) e i complessi delle

ribonucleoproteine virali (vRNPs). Tale processo consente il rilascio dei vRNPs nel citoplasma della cellula ospite. I complessi ribonucleoproteici vengono indirizzati all'interno del nucleo attraverso i suoi pori, utilizzando i segnali di localizzazione nucleare (NLS) della nucleoproteina (NP) (Bouvier *and* Palese, 2008). La trascrizione e la replicazione del genoma virale avvengono nel nucleo tramite l'azione del complesso polimerasico RNA-dipendente (PB1, PB2 e PA). L'RNA polimerasi virale RNA-dipendente utilizza i segmenti di RNA virale a polarità negativa come stampo per la sintesi di due tipi di RNA a polarità positiva: gli RNA messaggeri (mRNA) per la sintesi delle proteine virali e gli RNA complementari (*complementary* RNA, cRNA) intermedi per la trascrizione di nuove molecole di RNA virale genomico (Nagata *et al.*, 2008). In particolare, la subunità PB1 lega sia gli RNA virali, che i loro complementari cRNA. Inoltre, PB1 funge anche da subunità catalitica in quanto contiene dei domini conservati che sono responsabili della fase di elongazione delle catene nascenti di mRNA. La polimerasi basica 2 (PB2) è responsabile del riconoscimento e legame degli oligonucleotidi contenuti nella struttura 5'-cap-metilata dei pre-mRNA cellulari, che sono utilizzati come innesco per la sintesi degli RNA messaggeri virali (mRNA). La funzione della polimerasi acida non è ancora ben nota, ma si suppone sia coinvolta tanto nella fase di trascrizione quanto nella replicazione del genoma virale, in quanto implicata nell'assemblaggio della polimerasi virale (Nagata *et al.*, 2008). L'elongazione delle catene nascenti di mRNA ha termine quando l'RNA polimerasi virale sintetizza una coda di poli A (segnale di poliadenilazione), che deriva dalla trascrizione di 5-7 residui di uracile (U) presenti nel segmento di RNA virale a polarità negativa (Nagata *et al.*, 2008). Dopo essere stati addizionati della struttura 5'-cap ed essere stati poliadenilati, gli mRNA virali vengono trasportati al di fuori del nucleo e tradotti come accade agli mRNA cellulari (Bouvier *and* Palese, 2008).

La replicazione del genoma virale è un processo "primer-indipendente", in quanto non necessita del riconoscimento di sequenze che fungano da innesco, a differenza della trascrizione. Infatti, a seguito della produzione delle prime proteine virali avviene una transizione dell'attività delle polimerasi dalla sintesi degli mRNA alla replicazione del genoma virale (Nagata *et al.*, 2008).

Durante la replicazione, vengono prima sintetizzati filamenti a polarità positiva complementari (cRNA) all'RNA virale; poi l'RNA polimerasi genera il nuovo corredo genomico virale con la sintesi di filamenti di RNA a polarità negativa, partendo dall'estremità 3' dei cRNA (Bouvier *and* Palese, 2008).

I segmenti di RNA virale neosintetizzati nel nucleo vengono trasportati nel citoplasma grazie all'azione della proteina di matrice M1 e della proteina non-strutturale NS2 (o NEP). M1 permette l'interazione tra gli RNP e la nucleoproteina (NP) per la formazione dei nuovi ribonucleocomplessi (vRNP). Il legame tra M1, vRNP, NEP e la cromatina (Crm1) crea un complesso denominato *daisy-chain*, che media l'uscita dal nucleo del genoma virale passando attraverso le nucleoporine (Nayak *et al.*, 2009).

Attraverso le interazioni tra componenti citoscheletriche della cellula ospite con la proteina di matrice M1 e la nucleoproteina, i complessi M1-RNP-NS2 vengono indirizzati verso il sito di assemblaggio delle nuove particelle virali (Nayak *et al.*, 2004).

La proteina di matrice M1 è la più abbondante nella particella virale e viene anche considerata la *driving force* nel processo di gemmazione della nuova progenie virale (Gomez-Puertas *et al.*, 2000). Infatti, M1 è responsabile del reclutamento dei componenti virali nel sito di assemblaggio a seguito della sua interazione con le code citoplasmatiche di HA, NA e M2. Quindi, dopo aver contribuito all'assemblaggio di tutte le componenti virali, interagisce con il doppio strato lipidico creando un'alterazione nella curvatura della membrana. Inoltre, M1 determina la morfologia delle particelle virali neoformate (Nayak *et al.*, 2004). La gemmazione dei virus dell'influenza è un processo attivo, che avviene a livello della membrana plasmatica apicale di cellule epiteliali (es: cellule epiteliali bronchiali). È stato dimostrato che le glicoproteine HA, NA e M2 sono importanti per la determinazione del sito di assemblaggio e gemmazione del virus e li vengono trasportate sfruttando un *pathway* esocitico. Queste proteine posseggono alcuni determinanti nel dominio transmembranario, che sono coinvolti nell'indirizzamento verso la membrana apicale e nell'associazione con i *lipid-rafts* (HA e NA) e con il colesterolo (M2) (Nayak *et al.*, 2009). In particolare, sembra essere fondamentale nella fase iniziale dell'assemblaggio il legame dell'emoagglutinina con i *lipid-rafts*, domini in prossimità della membrana apicale arricchiti in colesterolo e sfingolipidi, che rappresentano la piattaforma su cui poi convogliano tutte le proteine virali per la gemmazione (Rossmann *and* Lamb, 2011). Avvenuta la gemmazione, la neuraminidasi esplica la sua attività sialidasica, tagliando i residui terminali di acido sialico da gangliosidi e glicoproteine posti sulla superficie cellulare. In questo modo le particelle virali neoformate vengono rilasciate dalla cellula ospite. NA rimuove anche i residui di acido sialico presenti sui virioni neoformati, così da prevenire l'aggregazione tra le particelle virali e il riattacco a cellule già infettate (Bouvier *and* Palese, 2008).

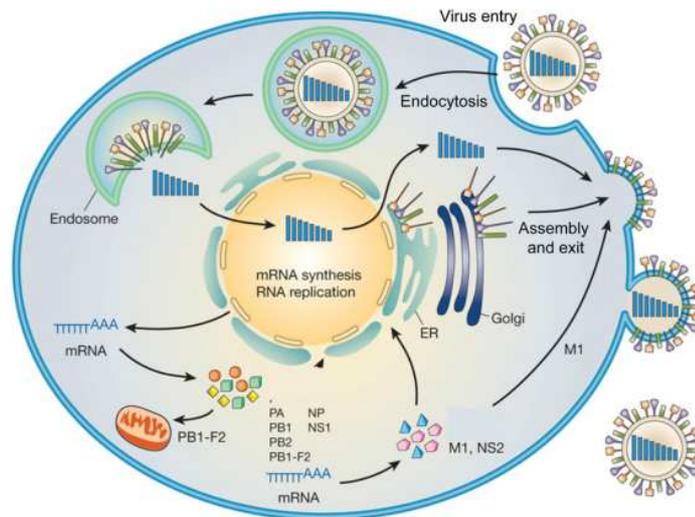


Figura 3.4 : Rappresentazione del ciclo replicativo del virus dell'influenza A (Arias *et al.*, 2009).

3.4 Ruolo delle proteine di matrice M1 e M2 nella gemmazione virale del virus dell'influenza

E' stato ampiamente dimostrato come molti virus ad RNA dotati di *envelope* sfruttino il *pathway* di biogenesi dei *Multivescicular Bodies* (MVB) al fine di completare il loro ciclo replicativo. I *Multivescicular Bodies* rappresentano il sistema che le cellule eucariotiche utilizzano per consentire la degradazione di proteine di membrana attraverso i lisosomi. Dato il loro ruolo fondamentale, risultano altamente conservati nelle cellule eucariotiche (Calistri *et al.*, 2009b) (Fig. 3.5).

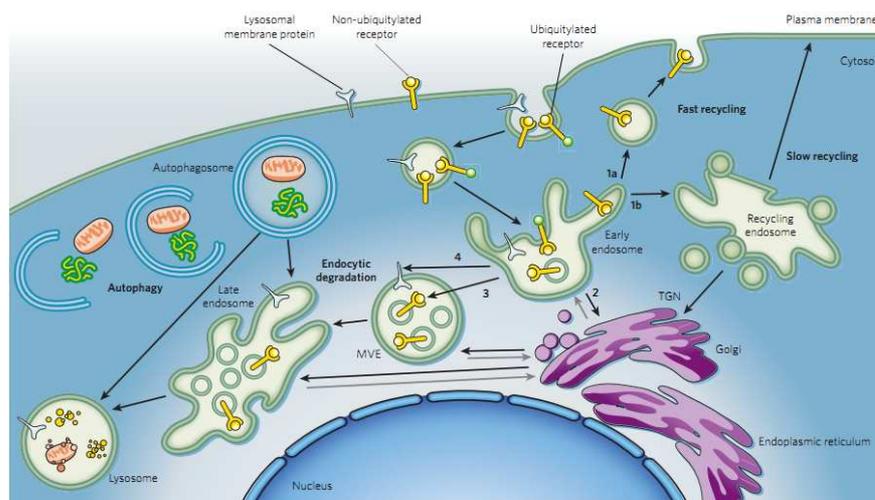


Figura 3.5: Rappresentazione schematica del *pathway* dei *Multivescicular Bodies* (Raiborg and Stenmark, 2009).

Questo processo inizia a livello della membrana plasmatica, dove le proteine destinate alla degradazione vengono ubiquitinate, e continua sino agli endosomi tardivi, dove le proteine bersaglio ubiquitinate vengono endocitate in vescicole intraluminali (ILV) (Raiborg *and* Stenmark, 2009). La gemmazione delle ILV nel lumen dell'endosoma origina gli MVB stessi. Quindi, essi si fondono con i lisosomi dove la membrana delle ILV viene degradata da lipasi e idrolasi, e il loro contenuto viene processato da proteasi lisosomiali (Calistri *et al.*, 2009b). Il processo di formazione delle ILV, fase fondamentale nel *pathway* di biogenesi degli MVB, è topologicamente equivalente alla gemmazione dei virus dalla cellula ospite. Ciò avviene grazie al sequenziale reclutamento di diverse proteine citoplasmatiche, denominate proteine Vps (*Vacuolar sorting proteins*), che sono organizzate in quattro complessi eteromerici distinti, denominati ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III (Calistri *et al.*, 2009b). Le proteine bersaglio ubiquitinate passano in maniera sequenziale attraverso i complessi ESCRT, tramite il legame iniziale con ESCRT-0, poi con la proteina Tsg101 (*Tumor Susceptibility Gene 101*), appartenente ad ESCRT-I, e in ultimo con la proteina Vps36/ESCRT-II. Infine, le proteine ubiquitinate vengono indirizzate all'interno delle ILV in via di formazione, sfruttando tutti i componenti dell'ESCRT-III e i fattori ad esso associati. Una volta formate le ILV, il complesso ESCRT-III viene disassemblato dalla membrana grazie all'azione di un'importante ATPasi di classe I AAA (*AAA-ATPase, ATPase associated with various cellular activities*), nota come Vps4. La proteina Vps4 quindi dissocia e rende nuovamente disponibili tutti i componenti degli ESCRT, permettendo così l'inizio di un nuovo ciclo (Calistri *et al.*, 2009b). L'attività di questa proteina risulta fondamentale per la formazione degli MVB. Infatti, l'espressione di una sua variante dominante negativa, caratterizzata dall'inattivazione del sito catalico, induce un fenotipo particolare in cui le vescicole degli MVB risultano incomplete o aberranti e si accumulano a livello della membrana endosomiale (Chen *and* Lamb, 2008).

Come accennato, studi condotti negli ultimi vent'anni hanno ampiamente dimostrato come diversi virus ad RNA dotati di *envelope* utilizzino i complessi ESCRT per fuoriuscire dalla cellule ospite. Nello specifico, all'interno di diverse proteine strutturali virali sono stati identificati corti motivi amminoacidici ricchi in prolina, denominati domini tardivi (*Late domain, L-domain* o domini L). Tali domini sono stati individuati per la prima volta in alcuni studi riguardanti la proteina Gag di HIV-1. Come è ampiamente riportato in letteratura, è noto che tale proteina è in grado di autoassemblarsi e gemmare dalla cellula in assenza di

qualsiasi altro determinante virale. Delezioni o mutazioni a carico dei domini tardivi contenuti nella proteina Gag stessa inducono un blocco dell'assemblaggio nelle fasi finali del ciclo virale (Göttlinger *et al.*, 1991). Sino ad oggi sono state descritte tre classi di *L-domain*:

- dominio P(T/S)AP: identificato per la prima volta nella regione p6 del precursore di HIV-1 (Göttlinger *et al.*, 1991). È il primo *L-domain* caratterizzato.
- dominio YP(X)nL: caratterizzato per la prima volta nel dominio p9 del precursore Gag del virus dell'anemia infettiva del cavallo (*Equine infectious anemia virus*, EIAV) (Puffer *et al.*, 1997). Inoltre, la sequenza correlata ad esso (YPLTSL) è stata individuata nel dominio p6 del precursore della proteina Gag di HIV-1 (Strack *et al.*, 2003).
- dominio PPXY: è stato inizialmente identificato nella proteina Gag del Virus del Sarcoma di Rous (RSV) e poi anche in altre proteine strutturali virali, spesso in combinazione con il motivo P(T/S)AP, come nel caso del virus Ebola (Parent *et al.*, 1995). Rappresenta anche il dominio tardivo caratteristico degli oncoretrovirus ed è stato identificato in rhabdovirus, filovirus e arenavirus (Morita *and* Sundquist, 2004).

Ulteriori evidenze sperimentali hanno permesso di definire altre caratteristiche peculiari degli *L-domain*, ovvero: i) la loro funzionalità è posizione indipendente all'interno della proteina strutturale; ii) sono funzionalmente interscambiabili tra virus eterologhi, che presentano domini differenti; iii) la presenza in proteine strutturali di virus dotati di *envelope* ad RNA sia a polarità positiva, che a polarità negativa (Morita *and* Sundquist, 2004). Inoltre, corti domini amminoacidici analoghi a quelli virali e in grado di sostituire funzionalmente i *L-domain* sono stati identificati a livello di diverse proteine transmembrana cellulari (Strack *et al.*, 2000). Tutte queste caratteristiche ed evidenze hanno permesso di dimostrare come i domini tardivi virali/cellulari fungano da siti di legame per specifiche proteine cellulari, appartenenti al *pathway* di biogenesi degli MVB (Calistri *et al.*, 2009b). Nello specifico, il primo *L-domain* caratterizzato P(T/S)AP è coinvolto nell'interazione con Tsg101, mediante il legame con il dominio UEV di quest'ultima (Garrus *et al.*, 2001, Lutge *et al.*, 2008; Martin-Serrano *et al.*, 2001). Infatti, la proteina Hrs (*Hepatocyte growth factor Receptor tyrosine kinase Substrate*), facente parte del complesso ESCRT-0, recluta Tsg101 attraverso l'utilizzo del dominio PSAP, per cui HIV-1 e virus correlati utilizzano il motivo P(T/S)AP mimando Hrs. Inoltre, quest'ultima fusa al Gag di HIV privo di un

dominio tardivo funzionale, è in grado di sostituirlo mediando la gemmazione virale (Garrus *et al.*, 2001). Il secondo motivo amminoacidico YP(X)nL è implicato nella gemmazione virale tramite il legame con la proteina cellulare AIP1/Alix [*Apoptosis-linked gene 2 (ALG-2)-interacting protein X*], che collega i complessi ESCRT-I e ESCRT-III (Strack *et al.*, 2003). Infine, la sequenza PPXY identificata in diverse proteine cellulari, ha la funzione di sequenza consenso per l'interazione con i domini WW, presenti negli enzimi E3 ubiquitin-ligasi e nei membri della famiglia di ubiquitino-ligasi Nedd-4 (*Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated 4*) (Martin Serrano *et al.*, 2005). Questi enzimi possono promuovere il rilascio delle particelle virali dal *pathway* degli MVB, esplicando la loro attività ubiquitin-ligasica. Il preciso meccanismo è ancora sconosciuto (Martin Serrano *et al.*, 2004) (Fig. 3.6).

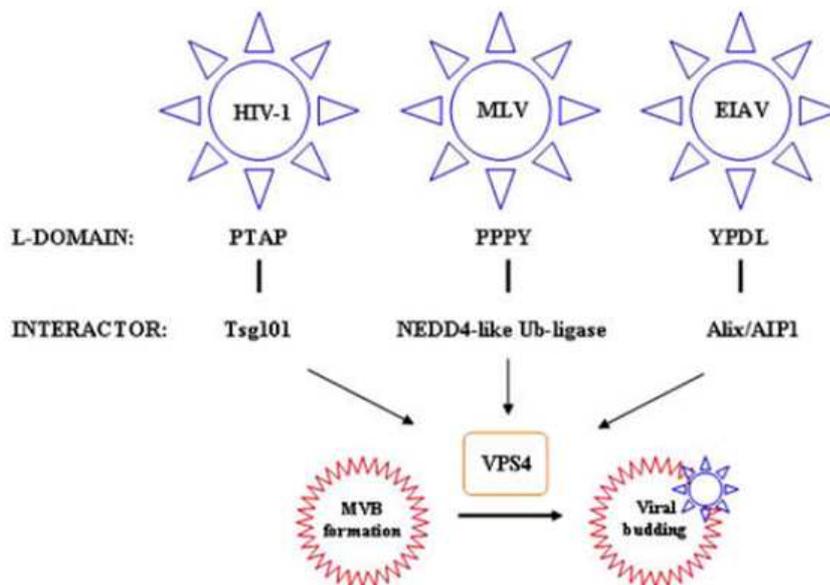


Figura 3.6: Rappresentazione schematica delle interazioni fra i principali late domain e specifici fattori cellulari coinvolti nel pathway dei MVB (Calistri *et al.*, 2009b).

L'interazione tra le proteine virali strutturali e le diverse proteine appartenenti al *pathway* di biogenesi degli MVB ha come scopo ultimo il reclutamento del complesso ESCRT-III al sito di gemmazione virale (Calistri *et al.*, 2009b). Infatti, anche in tale contesto questo complesso è essenziale per determinare la curvatura della membrana cellulare e portare alla fissione tra l'*envelope* virale e la membrana stessa. Tuttavia, non sempre la presenza di un dominio tardivo o l'interazione tra la proteina strutturale e i fattori appartenenti agli ESCRT sono sufficienti per la gemmazione virale. Esistono infatti eccezioni riportate in letteratura che indicano come la fase di fuoriuscita dalla cellula ospite di alcuni virus sia più complessa. In questi casi, il fattore limitante è rappresentato, infatti,

dal reclutamento delle proteine strutturali virali a livello del sito di gemmazione, funzione esplicata dalle proteine dell'*envelope*. Esempi di questi tipi di virus sono rappresentati dal PFV (*Prototype Foamy Virus*) e dal PIV-5 (*Paramyxovirus Parainfluenza-5*) (Chen and Lamb, 2008). I Foamy virus rappresentano, in effetti, un'eccezione tra i retrovirus. Infatti, la sola espressione della proteina Gag non determina la formazione di VLP, ma è necessaria la co-espressione della proteina Env, glicoproteina dell'*envelope* (Shaw *et al.*, 2003). Questo nonostante il Gag presenti un motivo PSAP identico a quello presente nelle proteine Gag di altri retrovirus. Nonostante ciò, la gemmazione virale di PFV risulta comunque sensibile all'espressione di versioni dominanti negativi di Tsg101, CHMP3 e Vps4 (Patton *et al.*, 2005). Quindi, anche se Gag da solo non è in grado di formare VLP in quanto non riesce a contattare la membrana in assenza di Env, il *pathway* degli MVB è comunque fondamentale per la gemmazione. In modo analogo al Gag di PFV, la proteina M di PIV-5 non è in grado di portare alla formazione di VLP se non quando espressa insieme al nucleocapside e alle glicoproteine dell'*envelope* e nonostante la presenza di un putativo *L-domain* (Schmitt *et al.*, 2002). Quindi, è possibile concludere che una proteina strutturale virale per formare VLP non solo deve essere in grado di reclutare ESCRT-III a livello del sito di gemmazione, ma deve essere essa stessa in grado di raggiungere questo sito. Nel caso di molti retrovirus, come HIV-1, quest'ultima funzione è svolta dal segnale di miristilazione presente nella regione amminoterminale di Gag, in altri casi questa funzione è fornita dall'interazione con altre proteine virali. Il virus dell'influenza, e in particolare la sua proteina strutturale M1, rappresenta un'eccezione ancor più estrema, perché non solo M1 non è in grado di contattare da sola la membrana plasmatica, sito di gemmazione virale, ma non è nemmeno capace di reclutare ESCRT-III. In questo contesto, tali funzioni sono svolte da una seconda proteina virale, M2. Il virus dell'influenza quindi è uno dei pochi virus dotati di *envelope* con genoma ad RNA in grado di gemmare indipendentemente da ESCRT-III (Rossmann *et al.*, 2010, Yondola and Carter, 2011).

Fin dai primi studi effettuati, è stato notato come la proteina di matrice M1 risulta essere la *driving force* della fase della gemmazione virale (Gomez-Puertas *et al.*, 2000). M1 è una proteina costituita da 252 amminoacidi, organizzati in tre diversi domini collegati da α -eliche, separate a loro volta da brevi motivi di legame. La porzione centrale della proteina media l'oligomerizzazione e l'interazione con i complessi ribonucleoproteici (vRNP). Inoltre, uno studio di qualche anno fa aveva identificato nel motivo YRKL, presente a livello della sequenza amminoacidica di M1, il putativo dominio tardivo del virus dell'influenza (Hui *et al.*, 2003). Inoltre,

era stato individuato il suo *partner* cellulare d'interazione nella proteina Vps28, appartenente al complesso ESCRT-I (Hui *et al.*, 2006a). Tuttavia, questi studi non hanno trovato conferme e sono stati in parte ritrattati (Hui *et al.*, 2006b). Inoltre, l'ipotetica interazione osservata *in vitro* tra la proteina M1 e la proteina ESCRT-I/Vps28 non è stata rilevata nel contesto dell'infezione virale (Bruce *et al.*, 2009). Ulteriori studi hanno evidenziato come la gemmazione del virus dell'influenza e la produzione delle VLP non risulti essere alterata o bloccata in presenza della forma dominante negativa di Vps4 (Watanabe *and* Lamb, 2010). Al contrario, è stato recentemente dimostrato che un'altra ATPasi, F1Fo-ATPasi, diversa da Vps4 e non facente parte del *pathway* degli MVB, risulta essere coinvolta nella formazione/gemmazione del virus dell'influenza ed interagisce a livello mitocondriale con la proteina NS2 (Gorai *et al.*, 2012). A supporto di tutti questi dati, nostre evidenze sperimentali indicano che il motivo YRKL non svolge il ruolo di *L-domain* funzionale, in quanto non è in grado di ripristinare la gemmazione di mutanti delle proteine Gag di FIV (*Feline Immunodeficiency Virus*) e HIV-1 difettivi del dominio tardivo P(T/S)AP (dati non pubblicati). Inoltre, è stato ampiamente dimostrato che l'espressione della proteina M1 nelle cellule non è sufficiente a determinare la formazione di particelle simil-virali (Chen *et al.*, 2007). Tale effetto è imputabile, tra altre possibili ragioni, alla mancanza nella proteina M1 di un segnale di indirizzamento alla membrana, che in assenza di altri determinanti virali, rimane localizzata nel nucleo e nella regione perinucleare (Wang *et al.*, 2010a). Infine, la gemmazione del virus dell'influenza sembra essere indipendente dal *pathway* di biogenesi degli MVB e dal macchinario dei componenti ESCRT (Watanabe *and* Lamb, 2010, Yondola *and* Carter, 2011). Uno studio recente ha chiarito questo fenomeno, identificando nella proteina di matrice M2 il fattore in grado di sostituire funzionalmente i componenti degli ESCRT durante la gemmazione del virus dell'influenza (Rossmann *et al.*, 2010). La proteina M2 è costituita da 97 residui amminoacidici, che si assemblano a formare un omotetramero organizzato in: un dominio aminotermine extracellulare di 24 amminoacidi; una regione transmembranaria di 19 amminoacidi, che costituisce il canale ionico e una coda citoplasmatica composta dagli ultimi 54 residui amminoacidici. La porzione C-terminale della proteina M2 è coinvolta nell'assemblaggio del genoma virale nelle particelle infettive (McCown *and* Pekosz, 2005). Questa regione contiene diversi domini che legano la proteina M1 e che determinano l'incorporazione di M2 nei virioni (McCown *and* Pekosz, 2006; Chen *et al.*, 2008). Inoltre, l'interazione di M2 con M1 fa sì che quest'ultima venga indirizzata alla membrana plasmatica con

la conseguente produzione di VLP (Wang *et al.*, 2010a). È stato dimostrato che i primi 17 amminoacidi della porzione citoplasmatica di M2 formano una struttura ad elica, anfipatica e parallela alla membrana, che risulta molto conservata tra proteine M2 di diversi sottotipi virali. M2 contiene inoltre due sequenze consenso per il riconoscimento del colesterolo (CRAC, *cholesterol recognition/interaction amino acid consensus motif*) parzialmente sovrapposte, che le permettono di legare quest'ultimo. Nel contesto dell'infezione virale, il legame con il colesterolo induce un cambiamento a livello dell'elica anfipatica di M2, che di conseguenza si inserisce nella membrana plasmatica inducendone la curvatura (Rossmann *et al.*, 2010). Tuttavia, quando espressa in assenza di altri componenti virali, M2 localizza in una regione lipidica non ricca in colesterolo (*non-rafts*) della membrana plasmatica differente dal sito di gemmazione del virus (*lipid rafts*). Si suppone che il reclutamento di M2 a livello di tale sito sia associato alla sua interazione con la proteina M1 (Rossmann *and* Lamb, 2011). Quindi, M2 svolge un ruolo fondamentale nella curvatura della membrana cellulare e nella deformazione del collo della particella virale nascente con la sua successiva scissione (Fig. 3.7). Queste funzioni sono analoghe a quelle svolte dalle proteine facenti parte il complesso degli ESCRT-III (Rossmann *et al.*, 2010).

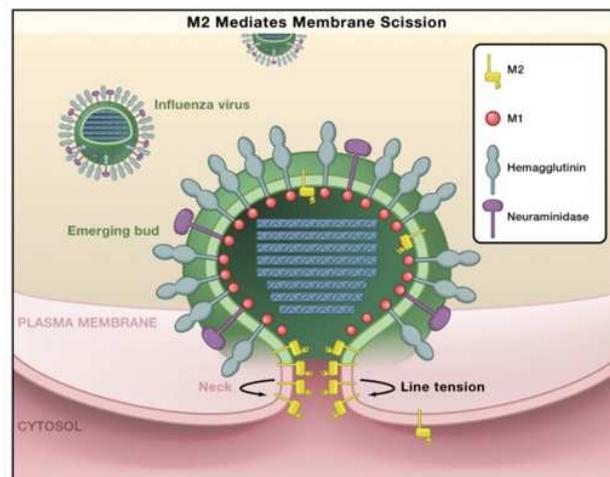


Figura 3.7: Rappresentazione schematica della funzione di M2 nelle fasi terminali della gemmazione del virus dell'influenza (Gottlinger, 2010).

Inoltre, è stato evidenziato come la deplezione della proteina cellulare GTPasi Rab11 (*Ras-related proteins in brain 11*) alteri la gemmazione del virus dell'influenza (Bruce *et al.*, 2010), suggerendo che questa proteina svolga un ruolo essenziale nel trasporto di M2 alla membrana apicale (Rossmann *et al.*, 2010). Un ulteriore studio identifica nella regione N terminale di M1 un breve motivo

coinvolto nell'interazione con la proteina cellulare RACK1 (*Receptor of activated C kinase 1*), conservato in diversi isolati virali. RACK1 è una proteina che contiene ripetizioni triptofano-aspartato (WD), che agisce come piattaforma per la trasduzione del segnale in un'ampia serie di processi cellulari, in particolare nella corretta segregazione dei cromosomi durante la citochinesi delle cellule eucariotiche. Inoltre, specifiche mutazioni a livello di M1 o la deplezione di RACK1 impediscono l'interazione M1 e RACK1, bloccando così la gemmazione delle particelle virali. Ciò suggerisce che il *pathway* mediato da RACK1 svolge un ruolo fondamentale in specifiche fasi della fuoriuscita dei virioni neoformati dalla cellula (Demirov *et al.*, 2012). Inoltre, RACK1 media il riciclo endosomiale di Rab11 durante la mitosi e deplezioni di entrambe queste proteine arrestano il rilascio delle particelle virali dell'influenza. In conclusione, tanto l'interazione di M1 con M2, quanto le loro interazioni con specifiche proteine cellulari, risultano essere importanti nelle ultime fasi del ciclo replicativo e in particolare nella scissione delle particelle virali dalla membrana cellulare (Rossman *et al.*, 2010, Demirov *et al.*, 2012).

3.5 Terapia e prevenzione dell'infezione da virus dell'influenza

Attualmente, i farmaci utilizzati nella terapia delle infezioni da virus dell'influenza vengono classificati in due categorie: gli inibitori della neuraminidasi (oseltamivir e zanamivir) e gli inibitori del canale ionico M2 (amantadina e rimantadina). Queste due classi di farmaci agiscono direttamente contro la neuraminidasi (NA) e la proteina di matrice M2. La loro efficacia tuttavia è limitata dai frequenti fenomeni di farmaco-resistenza, che sono incentivati dall'alto tasso di mutazioni a cui i virus influenzali sono soggetti.

Gli inibitori di M2 sono dotati di struttura tricyclica e sono efficaci nei confronti di tutti i sottotipi di influenza A, ma non nei confronti dei virus di tipo B e C. Gli adamantani agiscono sia bloccando il passaggio di protoni attraverso il canale ionico M2, sia alterando la maturazione dell'emoagglutinina neosintetizzata durante il suo passaggio dal reticolo endoplasmatico alla membrana. Mutazioni puntiformi in M2 (aa. 26, 27, 30, 31 e 34) sono state associate all'insorgenza di farmaco-resistenze (Arias *et al.*, 2009).

Gli inibitori della neuraminidasi possiedono una struttura analoga ai residui di acido sialico, ostacolando l'attività di NA, il rilascio della progenie virale e la diffusione dell'infezione. Questi farmaci sono attivi sia verso virus dell'influenza di tipo A, che verso quelli di tipo B. Alcuni studi hanno identificato l'insorgenza

di mutazioni conferenti resistenza in NA dopo alcuni passaggi del virus *in vitro*, come anche in isolati ottenuti da campioni clinici (Duan *et al.*, 2010). Inoltre, circa il 95% dei ceppi influenzali circolanti negli Stati Uniti durante la stagione invernale 2008-2009 risultavano resistenti al farmaco oseltamivir (Arias *et al.*, 2009). Nonostante ciò, il trattamento antivirale è efficace nella riduzione della durata e della severità dei sintomi associati all'infezione, solo se la somministrazione avviene entro quarantotto ore dalla comparsa dei sintomi. Inoltre, il trattamento riduce la diffusione del virus dell'influenza, ma non è ancora stata stabilita una correlazione tra la variazione dello *shedding* virale e i sintomi clinici (<http://www.cdc.gov/flu/professional/antivirals/antiviral-use-influenza.htm>). La miglior strategia per prevenire e ridurre la possibilità di infezione da parte dei virus dell'influenza e le conseguenti complicazioni ad essa associate rimane, pertanto, la vaccinazione. Il primo vaccino commerciale contro l'influenza risale al 1945, era composto da virus intero inattivato ed era stato approvato negli Stati Uniti per la campagna vaccinale dell'esercito durante la seconda guerra mondiale, viste le ingenti perdite dovute alla pandemia dell'influenza spagnola nel 1918-1919 (Kang *et al.*, 2011).

La risposta anticorpale indotta dall'infezione naturale e dopo la vaccinazione tradizionale è rivolta principalmente contro epitopi non conservati localizzati sulla testa globulare dell'emoagglutinina. La pressione selettiva a cui essi sono esposti insieme all'alto tasso di mutazioni, alla possibilità di riassortimento dei segmenti genici e all'ampia varietà di virus dell'influenza spiega la difficoltà di sviluppare vaccini efficaci con immunità di lunga durata e la necessità di cambiarne la formulazione ogni anno (Wong *et al.*, 2005).

Il piano di profilassi annuale italiano prevede l'utilizzo di un vaccino trivalente, composto da due sottotipi virali dell'influenza A (H1N1 e H3N2) e da un'unica variante del virus di tipo B. La scelta dei sottotipi virali da includere nella formulazione del vaccino viene effettuata mediante l'analisi dei dati epidemiologici e virologici registrati durante la precedente stagione epidemica dal programma mondiale di sorveglianza dell'influenza (Kang *et al.*, 2011). I vaccini in commercio derivano principalmente da preparazioni virali in uova embrionale di pollo, che ne limitano il numero di dosi producibili vista la ridotta quantità di uova a disposizione. Inoltre, l'utilizzo di questi substrati non può essere applicato alla crescita di virus influenzali aviari ad alta patogenicità, vista la suscettibilità degli embrioni verso questo tipo di virus (Kang *et al.*, 2009a). A seguito dell'ultima pandemia, è stata autorizzato l'impiego di linee cellulari per la produzione dei vaccini. Inoltre, l'attenzione della comunità scientifica si è

focalizzata sullo sviluppo di nuovi approcci vaccinali, che includono l'utilizzo di proteine ricombinanti, peptidi, vaccini coniugati, vaccini a DNA, vettori di espressione, metodologie basate sulla *reverse genetics* e la produzione di particelle simil-virali.

3.5.1 Particelle simil-virali o *Virus-like particles* (VLP) come piattaforma vaccinale contro il virus dell'influenza A

Una tecnica molto promettente per lo sviluppo di vaccini efficaci verso diverse infezioni virali è quella basata sulla produzione di particelle simil-virali o *virus-like particles* (VLP), strutture che mimano il virione e sono in grado di autoassemblarsi e gemmare, ma mancano della capacità di replicativa, essendo prive del genoma virale. L'interesse verso questo tipo di strategia vaccinale è notevolmente aumentato dopo il successo ottenuto con la commercializzazione dei vaccini contro il virus dell'epatite B e quello contro il papilloma virus. Le VLP sono ottenute mediante l'espressione di specifiche proteine strutturali virali, le quali dimostrano così di avere la capacità intrinseca di gemmare dalle cellule in assenza di qualsiasi altro componente virale (per esempio la proteina Gag di HIV-1 e la proteina L1 di HPV) (Haynes, 2009). Uno dei fattori che risulta cruciale nell'ottenimento di nuove VLP è la scelta del sistema d'espressione. Infatti, la generazione delle particelle simil-virali può essere conseguita in sistemi di derivazione batterica, o di lievito, oppure che impiegano cellule d'insetto o di mammifero, e in ultimo che sfruttano l'inoculo in piante (Zeltins, 2013). Ognuno di questi sistemi presenta caratteristiche specifiche e particolari limitazioni, per cui la scelta viene effettuata anche in base a quali proprietà si vogliono fornire alle VLP prodotte. Ad esempio, l'espressione in cellule di mammifero può introdurre particolari modifiche post-traduzionali, quali la glicosilazione, e agevolare l'ottenimento di VLP strutturalmente complesse (Zeltins, 2013). Al fine di assicurare che le VLP prodotte e sintetizzate rimangano intatte per le successive applicazioni, la selezione del protocollo di purificazione può risultare molto critica. Perciò, la scelta delle condizioni iniziali da utilizzare nella purificazione di VLP, ancora non caratterizzate e di nuova sintesi, può avvalersi dei protocolli applicati al virus da cui derivano.

I risultati di studi indipendenti dimostrano che le particelle simil-virali risultano i) essere altamente immunogeniche, ii) attivare le cellule B e iii) produrre elevati titoli anticorpali indotti dagli antigeni esposti sulla loro superficie (Zeltins, 2013). Inoltre, la vaccinazione basata su VLP può attivare cellule presentanti l'antigene,

come le cellule dendritiche, che dopo aver degradato la particella simil-virale, espongono i peptidi da essa derivati con la conseguente attivazione sia dei linfociti T che dei linfociti B. Le VLP possono essere utilizzate come piattaforma anche per la presentazione di epitopi immunodominanti eterologhi. Inoltre, l'incapacità delle VLP di replicare e la mancanza in esse di materiale genomico virale le rendono candidate ideali per protocolli di vaccinazione da utilizzare anche in soggetti considerati ad alto rischio (Kang *et al.*, 2009a).

In letteratura, sono riportati diversi esempi di proteine di matrice o simil-strutturali di virus dotati di *envelope*, la cui espressione nelle cellule è sufficiente a generare particelle simil-virali (per esempio la poliproteina Gag di HIV-1, la proteina di matrice di VSV, la proteina VP40 del virus Ebola) (Haynes, 2009). Nel caso del virus dell'influenza, la produzione di VLP è stata ottenuta utilizzando diversi sistemi d'espressione, quali: i virus del vaccino ricombinanti; la trasfezione di DNA plamidico congiunta all'espressione della T7 RNA polimerasi del virus del vaccino e i baculovirus ricombinanti (Kang *et al.*, 2009a). Tuttavia, non è ancora stato dimostrato quali siano le componenti strutturali virali necessarie e sufficienti alla formazione delle VLP di influenza, in quanto le evidenze riportate in letteratura risultano contrastanti. Nel contesto dell'infezione virale, l'interazione tra M1 e le code citoplasmatiche di HA, NA e M2 sembrano essere fondamentali per le fasi di assemblaggio e gemmazione. VLP ricombinanti di influenza possono essere ottenute tramite l'infezione di cellule d'insetto con baculovirus esprimenti: le quattro proteine virali HA, NA, M1 e M2; o le tre proteine HA, NA e M1 oppure ancora mediante l'espressione delle sole HA e M1 (Wei *et al.*, 2011). Inoltre, in questo stesso sistema è possibile ottenere VLP d'influenza tramite la sola espressione della proteina di matrice M1 (Latham *and* Galarza, 2001). Tale evidenza non è confermata dall'espressione di M1 in cellule di mammifero e ciò è imputabile alla mancanza all'interno della proteina di un segnale di indirizzamento alla membrana (Wang *et al.*, 2010a). È quindi possibile che il sistema d'espressione del baculovirus fornisca qualche fattore sconosciuto a M1, capace di farla autoassemblare e gemmare dalla cellula (Haynes, 2009). D'altra parte, è stato dimostrato che VLP di influenza possono essere generate efficientemente nelle cellule mediante la coespressione di M1 insieme ad M2 (Wang *et al.*, 2010a). Infatti, è stato osservato come M2 possa fungere da piattaforma per il reclutamento di M1 alla membrane plasmatica, favorendo la stessa incorporazione di M2 nelle VLP (Chen *et al.*, 2008).

Infine, diversi studi dimostrano che l'impiego di VLP influenzali, ottenute mediante l'espressione di diverse combinazioni delle proteine virali, possono

indurre una risposta immunitaria importante e ad ampio spettro. Per esempio, la vaccinazione con VLP costituite dalle proteine HA e M1 del sottotipo virale H3N2 inducono nel modello murino una produzione di anticorpi diretti contro l'emoagglutinina pari a quella sviluppata dopo due somministrazioni di una dose subletale del virus vivo (Galarza *et al.*, 2005). Ulteriori evidenze sperimentali dimostrano che VLP formate sempre da HA e M1 del virus dell'influenza A/PR/8/34(H1N1) forniscono egual protezione contro virus omologhi [A/PR/8/34(H1N1)] ed eterologhi [A/WSN/33(H1N1)] (Quan *et al.*, 2007). Inoltre, l'immunizzazione per via intramuscolare di VLP basate su HA e NA del sottotipo H3N2 sviluppa una risposta immunitaria cross-reattiva nei topi, con l'ottenimento di un alto livello di anticorpi nel siero (Bright *et al.*, 2007). In un recente studio, la vaccinazione con VLP basate sull'espressione di HA, NA, M1 del virus aviario A/Vietnam/1203/04(H5N1) determina nel modello murino un'immunità protettiva di lunga durata, efficace contro l'infezione e la morte associata all'esposizione ad una dose letale di un virus H5N1 isolato dall'uomo (Kang *et al.*, 2009b).

3.5.2 Sviluppo di un vaccino universale contro il virus dell'influenza A

Una limitazione dei vaccini in commercio è legata all'elevata variabilità a cui è sottoposta la regione antigenica dell'HA dei virus dell'influenza A. Di conseguenza, i vaccini attuali potrebbero risultare inadeguati nel prevenire la diffusione di un nuovo virus dell'influenza pandemico, che presenti un HA antigenicamente diversa da quelle presenti nei virus circolanti (Kang *et al.*, 2011). Con il fine di superare questo limite, gli sforzi della comunità scientifica si stanno concentrando sullo sviluppo di un vaccino "universale", il quale possa indurre una risposta immunitaria duratura e ad ampio spettro contro il virus dell'influenza A basato sull'utilizzo di due proteine virali: M2 e HA.

Il dominio extracellulare di M2 (M2e) è risulta altamente conservato tra diversi sottotipi del virus dell'influenza A e ciò lo rende un candidato ideale per lo sviluppo di una piattaforma vaccinale universale (Kang *et al.*, 2011). La somministrazione passiva di anticorpi monoclonali diretti contro M2 riduce il titolo virale nei polmoni di topi infettati con il virus dell'influenza A. L'azione di questi anticorpi blocca la replicazione nelle ultime fasi del ciclo virale (Wang *et al.*, 2008). In uno studio recente, la proteina M2 è stata presentata in VLP ricombinati di influenza, prodotte mediante la coinfezione di cellule d'insetto con baculovirus contenenti M2 e M1. I topi immunizzati con queste VLP sono risultati

protetti da una successiva infezione letale con diversi virus dell'influenza A (Song *et al.*, 2011). Tale risultato è stato ottenuto anche dopo la vaccinazione con il peptide M2e in presenza dell'adiuvante di Freund (Wu *et al.*, 2007). Tuttavia, questo peptide è molto piccolo e da solo induce una bassa immunogenicità, per questo diversi studi si sono concentrati sull'ingegnerizzazione di VLP basate sulla proteina del capsido L1 di HPV e sul virus dell'epatite B, per l'inserimento del peptide M2e. È stato dimostrato che l'immunizzazione con queste VLP ricombinanti induce la produzione di elevate quantità di anticorpi diretti contro M2e (Kang *et al.*, 2011). Tuttavia, va sottolineato come l'immunità indotta dal peptide M2e diminuisce, ma non elimina completamente i sintomi della malattia. Ulteriori evidenze sperimentali hanno dimostrato come l'aggiunta del peptide M2e ad una formulazione vaccinale basata sull'utilizzo di un virus vivo attenuato possa sviluppare una risposta immunitaria cross-protettiva ad ampio spettro (Kang *et al.*, 2011).

L'altra proteina candidata per lo sviluppo del vaccino universale contro il virus dell'influenza è l'emoagglutinina. Come precedentemente descritto (paragrafo 3.3), HA è costituita da una testa globulare localizzata nella subunità HA1 e da un dominio denominato "stelo", composto da parte della subunità HA1 e parte di HA2. La subunità HA2 è caratterizzata da proprietà strutturali altamente conservate ed è coinvolta nell'ancoraggio dell'emoagglutinina all'*envelope* virale. Recentemente, nel dominio dello "stelo" è stato identificato un potenziale bersaglio per lo sviluppo di una risposta immunitaria cross-reattiva e ad ampio spettro. Infatti, questa regione rappresenta la porzione maggiormente conservata tra le emoagglutinine di differenti sottotipi virali (Chun *et al.*, 2008). Diversi studi indipendenti hanno dimostrato il successo ottenuto con strategie vaccinali disegnate sulla subunità HA2. Durante l'infezione virale, la risposta immunitaria diretta contro questa regione risulta molto debole e non sempre rilevata, probabilmente a causa dell'ingombrante testa globulare di HA1 (Kang *et al.*, 2011). Probabilmente nella forma nativa dell'HA, il dominio della testa globulare di HA1 inibisce il riconoscimento da parte del sistema immunitario della regione dello stelo (Steel *et al.*, 2010). Recentemente, è stato quindi sviluppato un nuovo vaccino contro il virus dell'influenza basato sulla proteina HA priva della testa globulare (HA *headless*) (Steel *et al.*, 2010). La protezione indotta da tale vaccino è risultata cross-reattiva e ad ampio spettro, essendo diretta contro diversi sottotipi virali dell'influenza A. Inoltre, questo protocollo vaccinale fornisce protezione agli animali anche quando quest'ultimi vengono esposti ad una dose letale del virus influenzale. Gli autori di questo lavoro mostrano che questa particolare

conformazione dell'emoagglutinina, ovvero HA priva della testa, rende la porzione più conservata esposta e accessibile anche alle cellule B, risultando altamente immunogenica. Infine, è stato dimostrato che un vaccino basato sul peptide sintetico di HA2 può fornire protezione nei topi contro sottotipi divergenti del virus dell'influenza A (Wang *et al.*, 2010b).

4. SCOPO

La continua evoluzione dei virus influenzali determina la comparsa di nuove varianti antigeniche, che sono responsabili di epidemie annuali e occasionalmente di eventi pandemici. Le attuali strategie vaccinali contro questi virus si basano sull'induzione di anticorpi neutralizzanti diretti, in particolare, contro la glicoproteina di superficie HA. Tuttavia, la continua pressione selettiva a cui sono esposti questi epitopi spiega la difficoltà di sviluppare vaccini efficaci con immunità di lunga durata e la necessità di cambiarne la formulazione ogni anno. Lo studio di nuove piattaforme vaccinali si sta focalizzando sull'impiego delle particelle simil-virali o *Virus-like particles* (VLP), le quali possono essere ottenute mediante l'espressione di proteine strutturali virali (es.: Gag di HIV-1, L1 di HPV) con la capacità intrinseca di autoassemblarsi e gemmare dalle cellule. Le VLP non risultano essere infettive, in quanto sono prive del genoma virale, e tale caratteristica le rende candidate ideali per la vaccinazione anche delle categorie considerate ad alto rischio. Inoltre, le VLP possono essere utilizzate anche come piattaforme per la presentazione di epitopi, anche eterologhi, immunodominanti. Questa tesi di dottorato si è proposta di contribuire alla caratterizzazione e allo sviluppo di nuove strategie di vaccinazione contro il virus dell'influenza A basati sull'ottimizzazione di VLP per la presentazione di differenti antigeni virali.

In particolare, sulla base dei dati presenti in letteratura la prima parte della tesi ha avuto lo scopo di analizzare i requisiti minimi da conferire ad M1 al fine di produrre VLP in cellule eucariotiche. A tale scopo sono state utilizzate diverse strategie che hanno permesso di ottenere importanti risultati anche dal punto di vista più strettamente biologico. Parallelamente, un secondo scopo della tesi è stato quello di sviluppare un costrutto in grado di esprimere un antigene immunodominante e altamente conservato tra diversi ceppi del virus dell'influenza da poter utilizzare, in associazione con le VLP sviluppate nella prima parte del lavoro o basate su proteine strutturali di altri virus per ottenere un vaccino potenzialmente universale. Anche in questo caso i risultati ottenuti sono interessanti e pongono le basi per lo sviluppo di una strategia vaccinale potenzialmente efficace. Infine, il terzo e ultimo scopo della tesi, è stato quello di testare le VLP generate nella prima parte del lavoro di tesi in un esperimento pilota sul topo, al fine di valutarne l'immunogenicità. Nonostante alcuni problemi sperimentali, in fase peraltro di risoluzione, i dati ottenuti, in particolare in termini di produzione anticorpale sono stati estremamente incoraggianti e verranno rivalutati in esperimenti più raffinati.

5.MATERIALI E METODI

Materiali

5.1 Linee cellulari

In questo lavoro sperimentale sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

293T: cellule embrionali renali umane, con morfologia stellata e crescita adesa al substrato. Queste cellule esprimono costitutivamente l'antigene T del virus vacuolante della scimmia (SV40), garantendo un'efficiente replicazione dei plasmidi contenenti l'origine di replicazione di tale virus. Questa linea cellulare è stata gentilmente fornita dal Dott. Baltimore (Rockefeller University, New York, USA) (ATCC®CRL-11268).

COS-7: cellule fibroblastoidi derivanti dal rene della scimmia verde africana (African green monkey). Questa linea cellulare è stata ottenuta dall'immortalizzazione delle cellule CV-1 ed esprimono costitutivamente l'antigene T del virus Vacuolante della Scimmia (SV40). ottenute dall'*American Type Culture Collection* (ATCC®CRL-1651).

Le linee cellulari di 293T e COS-7 sono state mantenute in terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco), addizionato al 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*, Gibco) inattivato a 56°C per 30 minuti. Le cellule sono state mantenute in incubatori (Heraeus BDD 6220) alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5% (v/v) di CO₂e sottoposte a periodici controlli per escludere contaminazioni.

5.2 Plasmidi

pcDNA3.1TM(+): plasmide che permette l'espressione di sequenze geniche in cellule eucariotiche grazie alla presenza del promotore precocissimo del Citomegalovirus umano (HCMV) a monte del sito di policlonaggio. Inoltre, la presenza del promotore e dell'origine di SV40 consente la replicazione in linee cellulari esprimenti l'antigene T del medesimo virus. Il segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovina (BGH) e la sequenza di terminazione della trascrizione sono state inserite per aumentare la stabilità degli RNA messaggeri prodotti. Sono presenti anche i geni per la resistenza alla neomicina e all'ampicillina per la selezione rispettivamente in cellule eucariotiche e procariotiche. A monte e a valle del sito di policlonaggio sono inserite

rispettivamente le sequenze per il riconoscimento dei primer T7 e BGH utili per il sequenziamento (Invitrogen).

pSP73[®]: il plasmide presenta l'origine batterica ColE1 e il promotore delle RNA polimerasi del fago SP6 e del fago T7, rispettivamente in posizione 5' e 3' rispetto al sito di policlonaggio (Promega[®]).

pcDNA3.1(+)M1-Flag****: plasmide che contiene l'intera sequenza codificante la proteina M1 del virus dell'influenza A/WSN/33 (H1N1) coniugata a livello della regione carbossiterminale con l'epitopo immunodominante Flag (DYKDDDDK). Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.1).

pcDNA3.1(+)PTAPM1-Flag****: plasmide che esprime la proteina M1 con l'inserimento al livello della regione amminotermine del motivo amminoacidico di riconoscimento per la proteina cellulare Tsg101 (PTAP). L'epitopo Flag è stato aggiunto a livello della regione carbossiterminale di M1. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+)MyrM1PTAP-Flag****: plasmide contenente la proteina M1 fusa a livello della regione amminotermine al segnale di miristilazione (Myr) della proteina strutturale Gag di HIV-1 (MGARASV). Alla regione carbossiterminale della proteina è fuso il motivo amminoacidico PTAP e l'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+)MyrPTAPM1-Flag****: plasmide esprime la proteina M1 fusa nella regione amminotermine al Myr del Gag di HIV-1, seguito dal motivo PTAP. L'epitopo Flag è stato aggiunto nella regione carbossiterminale di M1. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+)Flag-MyrM1PTAP****: plasmide che contiene la proteina M1 fusa nella regione amminotermine all'epitopo Flag, seguito dal Myr del Gag di HIV-1 e coniugata a livello della regione carbossiterminale al motivo PTAP. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+)MyrM1YPDL-Flag****: plasmide che esprime la proteina M1 fusa nella regione amminotermine al Myr del Gag di HIV-1 e nella regione carbossiterminale al motivo di legame alla proteina cellulare AIP1/Alix (YPDL) coniugato all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+)*Myr*YPDLM1-Flag: plasmide che contiene la proteina M1 fusa nella regione amminotermine al *Myr* del Gag di HIV-1 e seguito dal motivo (YPDL). L'epitopo Flag è stato aggiunto nella regione carbossiterminale di M1. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+)*Flag*-*Myr*M1YPDL: plasmide che esprime la proteina M1 fusa nella regione amminotermine all'epitopo Flag, seguito dal *Myr* del Gag di HIV-1 e coniugata a livello della regione carbossiterminale al motivo YPDL. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+)*PTAPPEY*M1-Flag: plasmide che contiene la sequenza codificante la proteina M1 con l'inserimento al livello della regione amminotermine del motivo amminoacidico di riconoscimento per le ubiquitino-ligasi della famiglia *Nedd4-like* (*PTAPPEY*). L'epitopo Flag è stato aggiunto a livello della regione carbossiterminale di M1. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+)*MyrPTAPPEY*M1-Flag:** plasmide esprime la proteina M1 fusa nella regione amminotermine al *Myr* del Gag di HIV-1, seguito dal motivo *PTAPPEY*. L'epitopo Flag è stato aggiunto nella regione carbossiterminale di M1. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pBJ5: plasmide che permette l'espressione di sequenze geniche in cellule eucariotiche. Il promotore ibrido (*SR α*) è composto dal promotore precoce del virus Vacuolante della Scimmia (SV40) fusa al segmento R e a parte della sequenza U5 (R-U5) della sequenza *long-terminal repeat* (LTR) del virus HTLV-1 (*T-cell leukemia virus type 1*) (Takebe *et al.*, 1988).

pBJ5M2-Flag: plasmide che deriva dal vettore pBJ5 e contiene l'intera sequenza codificante la proteina M2 del virus dell'influenza A/WSN/33 (H1N1). L'epitopo Flag è stato aggiunto nella regione carbossiterminale di M1. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.1).

pcDNA3.1(+)*M2*-*M1*-Flag: plasmide esprime la proteina M1 fusa nella regione amminotermine alla proteina M2. L'epitopo Flag è stato aggiunto nella regione carbossiterminale di M1. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.3).

pcDNA3.1(+)*M1*-*M2*-Flag: plasmide che codifica la proteina M1 fusa nella regione carbossiterminale alla proteina M2, coniugata all'epitopo Flag. Questo

costruito è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.3).

pcDNA3.1(+M1-E.A.M2-Flag): plasmide che esprime la proteina M1 fusa nella sua regione amminotermine all'elica anfipatica (E.A.) di M2, coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.3).

pcDNA3.1(+MyrM1-E.A.M2-Flag): plasmide contenente la proteina M1 fusa a livello della regione amminotermine al Myr del Gag di HIV-1. Alla regione carbossiterminale della proteina è fusa l'elica anfipatica (E.A.) di M2, coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.3).

pBJ5-CHMP4B-Flag: plasmide che codifica la proteina cellulare CHMP4B (clone EST BC011429) del complesso ESCRT-III, coniugata a livello della regione carbossiterminale con l'epitopo Flag. Questo vettore è stato fornito dal Dott. H. Göttlinger (University of Massachusetts Medical Center, Worcester, USA).

pBJ5-CHMP3-Flag: plasmide che esprime la proteina cellulare CHMP3 (clone EST BC004419) del complesso ESCRT-III, coniugata a livello della regione carbossiterminale con l'epitopo Flag. Questo vettore è stato fornito dal Dott. H. Göttlinger (University of Massachusetts Medical Center, Worcester, USA).

pcDNA3.1(+MyrM1CHMP3-Flag): plasmide che contiene la proteina M1 fusa nella regione amminotermine al Myr del Gag di HIV-1 e nella regione carbossiterminale alla proteina CHMP3, coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+MyrM1CHMP4B-Flag): plasmide che esprime la proteina M1 fusa nella regione amminotermine al Myr del Gag di HIV-1 e nella regione carbossiterminale alla proteina CHMP4B, coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+M1CHMP4B-Flag): plasmide che codifica la proteina M1 fusa nella regione carbossiterminale alla proteina CHMP4B, coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pcDNA3.1(+MutMyrM1CHMP4B-Flag): derivato dal plasmide pcDNA3.1(+MyrM1CHMP4B-Flag, presenta la mutazione della glicina in posizione 1 del segnale di miristilazione (sequenza amminoacidica: MAARASV).

Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.2).

pΔenv1: il plasmide contiene i geni *gag*, *pol*, *vif*, *orf-A*, *rev* e la sequenza RRE di FIV, derivanti dal clone molecolare p34TF10. La regione *Long Terminal Repeat* (LTR) all'estremità 5' è sostituita dal promotore del Citomegalovirus (CMV) e quella all'estremità 3' è modificata con il segnale di poli-adenilazione dell'ormone della crescita bovino (BGH). Il costrutto reca la delezione di 1 kb nel gene *env* (Δenv) ed è privo del segnale di incapsidamento (ΔΨ). pΔenv1 è clonato nel sito di policlonaggio del plasmide pUC119. Il costrutto è stato gentilmente fornito dal Prof. M. Pistello (Università di Pisa, Italia) (Pistello *et al.*, 2007).

pΔenv1Mut02: derivato dal plasmide pΔenv1 in cui il dominio tardivo di FIV è stato distrutto sostituendo i due residui di prolina in posizione 438 e 441 con due alanine (mutazioni P438A, P441A) (seq. aa 438-450: ASAAPMEEKLLDL). Questo costrutto è stato precedentemente descritto (Calistri *et al.*, 2009a).

pΔenv1Mut06: derivato dal plasmide pΔenv1, presenta un codone di stop in posizione 10 della proteasi virale. Questo costrutto è stato precedentemente descritto (Calistri *et al.*, 2009a).

pΔenv1MutΔp2: derivato dal plasmide pΔenv1, presenta la delezione della regione p2 di Gag ottenuta sostituendo il codone CCA (Pro438) con TAA (codone di stop).

pΔenv1Mut21-ASAA: derivato dal plasmide pΔenv1Mut02 in cui sono state introdotte le mutazioni L447A, L448A, D449A e L450A (sequenza amminoacidica del dominio p2, posizioni 438-450: ASAAPMEEKAAAA).

pcDNA3.1(+)*Gag FIV wild type*: derivato dal plasmide pΔenv1, codifica l'intera sequenza codificante la proteina Gag del clone molecolare p34TF10 di FIV. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.4).

pcDNA3.1(+)*GagFIVΔp2-M2-Flag*: derivato dal plasmide pΔenv1MutΔp2, codifica la proteina Gag di FIV deleva della regione p2 (Δp2) fusa nella regione carbossiterminale alla proteina M2 del virus dell'influenza A/WSN/33 (H1N1), coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.4).

pcDNA3.1(+)*GagFIVΔp2-CTM2-Flag*: derivato dal plasmide pΔenv1MutΔp2, contiene la proteina Gag di FIV deleva della regione p2 (Δp2) fusa nella regione carbossiterminale alla coda citoplasmatica di M2 (CT M2), coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.4).

pcDNA3.1(+)GagFIV Δ p2-E.A.M2-Flag: derivato dal plasmide p Δ env1Mut Δ p2, codifica la proteina Gag di FIV deleva della regione p2 (Δ p2) fusa nella regione carbossiterminale all'elica anfipatica di M2 (E.A.M2), coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.4).

pcDNA3.1(+)GagFIVMut02-M2-Flag: derivato dal plasmide p Δ env1Mut02, contiene la proteina Gag di FIV in cui il dominio tardivo è stato distrutto (ASAA) fusa nella regione carbossiterminale alla proteina M2, coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.4).

pcDNA3.1(+)GagFIVMut02-CTM2-Flag: derivato dal plasmide p Δ env1Mut02, codifica la proteina Gag di FIV in cui il dominio tardivo è stato distrutto (ASAA) fusa nella regione carbossiterminale alla coda citoplasmatica di M2 (CT M2), coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.4).

pcDNA3.1(+)GagFIVMut02-E.A.M2-Flag: derivato dal plasmide p Δ env1Mut02, contiene la proteina Gag di FIV in cui il dominio tardivo è stato distrutto (ASAA) fusa nella regione carbossiterminale all'elica anfipatica di M2 (E.A.M2), coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.4).

pcDNA3.1(+)GagFIVMut21-CTM2-Flag: derivato dal plasmide p Δ env1Mut21, codifica la proteina Gag di FIV in cui il dominio tardivo PSAP e il motivo LDL sono stati distrutti (ASAA e AAAA, rispettivamente) fusa nella regione carbossiterminale alla coda citoplasmatica di M2 (CT M2), coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.4).

pcDNA3.1(+)GagFIVMut21-E.A.M2-Flag: derivato dal plasmide p Δ env1Mut21, contiene la proteina Gag di FIV in cui il dominio tardivo PSAP e il motivo LDL sono stati distrutti (ASAA e AAAA, rispettivamente) fusa nella regione carbossiterminale all'elica anfipatica di M2 (E.A.M2), coniugata all'epitopo Flag. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.4).

pcDNA3.1(+)HA1-HA2-Flag: plasmide contenente la fusione tra i primi 52 amminoacidi del dominio *stalk* dell'emoagglutinina (HA) del virus dell'influenza A/WSN/1933 e la rimanente parte della regione *stalk* della proteina HA del virus A/Brisbane/59/2007, coniugata all'epitopo Flag a livello della regione

carbossiterminale. Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.5).

pcDNA3.1(+)*HA1-RRRR-HA2*: plasmide che esprime la fusione tra i primi 52 amminoacidi del dominio *stalk* dell'emoagglutinina (HA) del virus dell'influenza A/WSN/1933 e la rimanente partedella regione *stalk* della proteina HA del virus A/Brisbane/59/2007, coniugata all'epitopo Flag a livello della regione carbossiterminale. La testa globulare è stata sostituita con un peptide di legame, costituito da quattro arginine (RRRR). Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.5).

pcDNA3.1(+)*HA1-GGGG-HA2*: plasmide che esprime la fusione tra i primi 52 amminoacidi del dominio *stalk* dell'emoagglutinina (HA) del virus dell'influenza A/WSN/1933 con il resto della regione *stalk* della proteina HA del virus A/Brisbane/59/2007, coniugata all'epitopo Flag nella regione carbossiterminale. La testa globulare è stata sostituita con un peptide di legame, costituito da quattro glicine (GGGG). Questo costrutto è stato ottenuto in questo lavoro di tesi, come specificato successivamente (paragrafo 5.10.5).

Al fine di amplificare i plasmidi precedentemente descritti in cellule procariotiche è stato impiegato il ceppo batterico DH5 α [F/*endA1hsdR17*(rk-, mk+)*glnV44thi-1 recA1 gyrA* (Na1^r) *relA1* Δ (*lacZYA-argF*)U169 *deoR*(ϕ 80*dlac* Δ (*lacZ*)M15)] o TOP10 [F*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139 Δ (*ara-leu*)7697*galUgalK*rpsL (Str^r) *endA1 nupG*](Invitrogen).*

Le colture batteriche sono state fatte crescere in terreno liquido Luria Bertani (NaCl 1% (p/v) (Becton-Dickinson), Bacto-Tryptone 1% (p/v) (Becton-Dickinson), Bacto-Yeastextract 0,5% (p/v), Becton-Dickinson) a 30°C o 37°C in agitazione a seconda del plasmide da amplificare. A seconda della necessità, il terreno è stato solidificato mediante l'aggiunta di Bacto-agar 1,5% (p/v) (Becton-Dickinson) e reso selettivo mediante l'aggiunta dell'opportuno antibiotico al terreno di coltura (ampicillina 100 μ g/ml).

5.3 Oligonucleotidi

Nelle reazioni a catena della polimerasi (PCR), di mutagenesi e di sequenziamento sono stati utilizzati gli oligonucleotidi innesco (*primer*) opportunamente disegnati e riportati in Tabella 5.1. Nello specifico, gli oligonucleotidi descritti dalla sigla 1GAMyrM1CHMP4BFw e 1GAMyrM1CHMP4BRev sono stati impiegati nel

protocollo di mutagenesi; mentre gli oligonucleotidi T7, BGH, SP6 e FIV2 sono stati utilizzati nelle reazioni di sequenziamento.

Primer	Sequenza nucleotidica (5'-3')	Tm
5'-M1	ATCGTAGGATCCATGAGTCTTCTAACC'	58°C
3'-FlagM1	ATCGTACTCGAGCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTTGAATCGTTG	69°C
5'-M2	ACGCATCTCGAGGCCACCATGAGTCTTCTAACCAGGGTCGAA	71°C
3'-FlagM2	ATCGTAGAATTCCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTCCAGCTCTATGT TGACAAAATGG	71°C
5'-MyrYPDLM1	ACGCATGAATTCATGGGTGCGAGAGCGTCAGTACTGTACCCAGATCTGAGTC TTCTAACC	74°C
5'-Flag MyrM1	ACGCATGAATTCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGGTGCGAGAGCG TCAGTAAGTCTTCTAACC	74°C
3'-YPDLM1	ATCGTACTCGAGCTACAGATCTGGGTACAGCTTGAATCGTTG	68°C
5'-MyrM1	ACGCATGAATTCATGGGTGCGAGAGCGTCAGTAAGTCTTCTAACC	70°C
3'-FlagYPDLM1	ATCGTACTCGAGCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCAGATCTGGGTAC AGCTTGAATCGTTG	73°C
5'-MyrPTAPM1	ACGCATGAATTCATGGGTGCGAGAGCGTCAGTACCAACAGCCCCAAGTCTT CTAACC	75°C
5'-PTAP-M1	ACGCATGAATTCATGCCAACAGCCCCAAGTCTTCTAACC	68°C
3'-PTAPM1	ATCGTACTCGAGCTATGGGGCTGTTGGCTTGAATCGTTG	69°C
3'-FlagPTAPM1	ATCGTACTCGAGCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCTGGGGCTGTTGGCT TGAATCGTTG	74°C
5'-PTAPPEYM1	ATCGTAGGATCCATGCCAACTGCACCTCCAGAGTACAGTCTTCTAACC	71°C
5'-MyrPTAPPEYM1	ACGCATGAATTCATGGGTGCGAGAGCGTCAGTACCAACTGCACCTCCAGAG TACAGTCTTCTAACC	76°C
5'-EcoRVM1	CTGGAGGATATCAGTCTTCTAACCAGGGTCGAAACGTACGTTCTC	70°C
3'-EcoRIFlagM1	ATCGTAGAATTCCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTTGAATCGTTG	68°C
3'-EcoRVM1	AAGACTGATATCCTTGAATCGTTGCATCTGCACCCCCATTCTGTTCTG	70°C
5'-EcoRV18M2	TTCAAGGATATCCGCTTTTTTTTCAAATGCATTTATCGTCGCTTT	64°C
3'-XhoIFlag18M2	ATCGTACTCGAGCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCCCTCTTTTCAA	69°C
5'-KpnI MyrM1	ATCGTAGGTACCATGGGTGCGAGAGCGTCAGTAAGTCTTCTAACC	71°C
3'-SmaIM1	ATCGTACCCGGGCTTGAATCGTTGCATCTGCACCCCCATTCTGTTCTG	73°C
5'-SmaI CHMP3	TTCAAGCCCGGGGGCTGTTTGGAAAGACCCAGGAGAAGCCGCC	76°C
3'-FlagCHMP3	ATCGTACTCGAGCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGCTGCGGAGTGT	72°C
5'-SmaI CHMP4B	TTCAAGCCCGGGTCGGTGTTCGGGAAGCTGTTTCGGGGCTGGAGGGGGT	78°C
3'-FlagCHMP4B	ATCGTACTCGAGCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCATGGATCCGGC	72°C
5'-M1CHMP4B	ATCGTAGAATTCATGAGTCTTCTAACCAGGGTCGAAACGTACGTT	67°C
1GAMyrM1CHMP4B Fw	CAGTGTGGTGAATTCATGGCTGCGAGAGCGTCAGTAAGTC	71°C
1GAMyrM1CHMP4B Rev	GACTTACTGACGCTCTCGCAGCCATGAATCCACCACACTG	71°C
5'-GAGFIV	ATCGTAGGATCCATGGGGAATGGACAGGGGCGAGATTGGAAA	70°C
3'-EcoRVGAGAP2	AAGACTGATATCCATTACTGCTTGCTGCATTTGATTCACTGGGGC	68°C
5'-EcoRVM2	ATCGTAGATATCAGTCTTCTAACCAGGGTCGAAACGCCTATC	67°C
3'-NotIFlagM2	ATCGTAAGCGGCCGCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCTCCAGCTCT AT	73°C
3'-EcoRVMutASAA	AAGACTGATATCTAAATCCAATAGTTCTCCTCCATTGGAGG	65°C
3'-EcoRVASAAAAA	AAGACTGATATCTGCAGCCGCTGCTTTCTCCTCCATTGGAGC	70°C
5'-EcoRVM2CT	ATCGTAGATATCGATCGTCTTTTTTCAAATGCATT	59°C
3'-NotIFlag18M2	ATCGTAAGCGGCCGCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCCCCTCTTTTCA A	72°C

5'-HA1	ATCGTAGATATCATGAAGGCAAACTACTGGTCTG	63°C
3'-HA1-HA2	GGGTGTTTGACACTTCGTGTTACAACATAGTTTCCCCTGTGTCTGTC	70°C
3'-HA1-RRRR-HA2	TTGACACTTCGTGTTACACCGCCGCCGCGACATAGTTTCCCCTGTGTG	74°C
3'-HA1-GGGG-HA2	GGGTGTTTGACACTTCGTGTTACAGCCGCCGCCACATAGTTTCCCCTGTG TGCTGTC	77°C
5'-HA2	TGTAACACGAAGTGTCAAACACCCCAGGGATCTATAAAC	66°C
3'-Flag-HA2	ATCGTACTCGAGCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGATGCATATTCT	69°C
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	48°C
BGH	TAGAAGGCACAGTCGAGGC	50°C
SP6	CTGGTTCTATAGTGCACCTAAAT	69°C
FIV2	GCATGGTATCTCGAGGCATT	50°C

Tabella 5.1. Oligonucleotidi innesco e loro principali caratteristiche.

Metodi

5.4 Competenza e trasformazione batterica

I plasmidi e i prodotti delle reazioni di ligazione sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule batteriche di *E. coli*, di DH5 α o TOP10, rese artificialmente competenti mediante la tecnica del calcio cloruro. Le colonie batteriche sono state fatte crescere a 37°C in 3ml di terreno liquido LB contenente MgCl₂ 15mM, in assenza di antibiotico per circa 12 ore, al fine di ottenere la competenza batterica. Successivamente, l'inoculo è stato trasferito in 500 ml dello stesso terreno liquido. Quando si è raggiunta una densità ottica compresa tra 0,4 e 0,6 alla lunghezza d'onda di 600 nm, la coltura batterica è stata fatta raffreddare rapidamente in ghiaccio per bloccare la crescita batterica e quindi i batteri sono stati sedimentati per centrifugazione a 3500 rpm a 4°C per 15 minuti e risospesi in una soluzione fredda costituita da MnCl₂-4H₂O 10 mM, CaCl₂ 50 mM, MES[2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid] 10 mM pH 6.3. Infine, i batteri sono stati nuovamente centrifugati e delicatamente risospesi in 12,5 ml nella precedente soluzione fredda addizionata di glicerolo al 15% (v/v) e quindi aliquotati e conservati a -80°C.

La trasformazione batterica è stata eseguita aggiungendo il DNA plasmidico (100-300 ng) o l'intero volume delle reazioni di ligazione a 50 μ l di cellule batteriche competenti. Dopo un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, la miscela è stata sottoposta a shock termico mediante esposizione a 37°C per 2 minuti. I batteri sono stati raffreddati immediatamente in ghiaccio e quindi incubati per 45 minuti a 37°C in 200 ml di LB, consentendo l'espressione e la sintesi della proteina che conferisce la resistenza all'antibiotico di selezione.

A seguire, la sospensione batterica è stata seminata in piastre Petri contenenti LB-Agar addizionato con ampicillina 100 µg/ml e incubata 16 ore a 30°C e per 12 ore a 37°C al fine di selezionare i batteri trasformati.

5.5 Preparazione di DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato estratto dai ceppi DH5α o TOP10 di *E. coli* applicando il metodo della lisi alcalina per preparazioni su piccola scala (*miniprep*) ottenute da piccoli volumi di coltura batterica (2-3 ml). Questo metodo prevede una lisi preventiva delle cellule batteriche e una successiva precipitazione delle molecole di DNA ad alto peso molecolare con potassio acetato ad elevata molarità (5 M). Il DNA plasmidico ottenuto mediante precipitazione con alcol etilico è stato risospeso in TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8) contenente RNasi pancreatica (20 µg/ml, Roche/Boehringer). Al fine di ottenere preparazioni di DNA su ampia scala e con un elevato grado di purezza (*maxiprep*) da impiegare nella trasfezione in cellule eucariotiche, il DNA plasmidico è stato purificato mediante “*QIAGEN Plasmid MAXI Kit*” con l’impiego di colonne a scambio anionico. Nello specifico, tale metodo si basa sul legame alla resina della colonna del DNA con l’eliminazione di RNA, impurità e proteine ad alto peso molecolare utilizzando tamponi a bassa concentrazione salina. L’eluizione del DNA plasmidico avviene mediante l’aggiunta di tamponi di elevata concentrazione salina in colonna. Quindi, il plasmide è stato concentrato e pulito dai sali, precipitandolo con isopropanolo e lavaggio con etanolo al 70% (v/v). Il pellet risultante è stato risospeso in TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8)

Il DNA plasmidico così ottenuto è stato sottoposto a controllo mediante restrizione enzimatica (paragrafo 5.11) e conseguente migrazione elettroforetica in gel d’agarosio. Inoltre, la quantificazione dell’acido nucleico e la presenza di eventuali contaminazioni è stata valutata con lettura allo spettrofotometro NanoDrop1000 (paragrafo 5.6).

5.6 Quantificazione degli acidi nucleici

Con il fine di determinare la quantità di DNA plasmidico dei prodotti di PCR ottenuti, è stata effettuata la lettura allo spettrofotometro UV-Visibile (NanoDrop 1000 Spectrophotometer, ThermoScientific®) della densità ottica (D.O.) alla lunghezza d’onda di 260 nm, corrispondente al picco massimo di assorbimento

delle basi azotate. La concentrazione degli acidi nucleici è stata estrapolata dalla legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon \times l \times C$$

dove A è l'assorbanza del campione, ε è il coefficiente di estinzione molare (pari a $6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ per DNA a doppio filamento), l è la lunghezza del cammino ottico (pari a 0.1 cm) e C è la concentrazione in soluzione. La presenza di eventuali contaminazioni proteiche è stata rilevata tramite la lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 280 nm, corrispondente al picco massimo di assorbimento del legame peptidico. Le preparazioni sono state considerate "pure" quando il rapporto tra la $D.O._{260}/D.O._{280}$ era compresa tra 1.8 e 2.0.

5.7 Estrazione dell'RNA virale e RT-PCR

In questo lavoro, le sequenze codificanti le proteine di matrice M1 e M2 sono state ottenute mediante estrazione dell'RNA e successiva retrotrascrizione a partire dalla sospensione virale ottenuta dai sovranatanti di cellule infettati con il virus dell'influenza A/WSN/33 H1N1, precedentemente prodotto nel nostro laboratorio. Per l'estrazione dell'RNA virale dai surnatanti di infezione è stato utilizzato il *QIAamp[®] MinElute[®] VirusSpin Kit* (QIAGEN), che si basa sull'impiego di colonnine ad affinità contenenti un apposita membrana che trattiene selettivamente gli acidi nucleici. La procedura sperimentale ha previsto una prima fase di lisi in presenza di un tampone contenente guanidina isotiocianato e proteinasi K per l'inattivazione rispettivamente delle RNAsi e delle proteasi. Inoltre, in questo tampone era presente l'RNA *carrier*, che lega dell'RNA favorendone l'associazione alla membrana. I campioni così trattati sono stati incubati per 15 minuti a 56°C e successivamente centrifugati a 13000 rpm per 15 secondi. Dopo l'aggiunta di etanolo 96% (v/v), l'estratto ottenuto è stato trasferito in colonna dove è stato centrifugato a 8000 rpm per un minuto. L'eluato è stato eliminato e la colonna è stata sottoposta a diversi lavaggi con opportuni tamponi per rendere il legame dell'RNA più restrittivo. Infine, l'RNA è stato eluito per aggiunta in colonna di 50 μl di buffer AVE.

L'RNA così estratto e purificato è stato quantificato mediante spettrofotometro (paragrafo 5.6) e poi retro trascritto da una trascrittasi inversa (RT) di MuLV utilizzando dei oligonucleotidi d'innescio universali, costituiti da esameri in sequenza casuale. La reazione prevede l'utilizzo dell'RNA estratto (10 μl), di un tampone (500 mM KCl e 100 mM Tris-HCl pH 8.3), di MgCl_2 (5.5 mM), di una miscela contenente i quattro dNTPs (0.5 mM), di 2.5 μM di primer universali, 0,6

U di un inibitore delle RNAsi (20 U/ μ l) e infine 1,5 μ l della retrotrascrittasi MuLV (50 U/ μ l)(Roche/Boehringer). I reagenti sono forniti tutti da Applied Biosystem, meno che l'enzima retrotrascrittasi inversa. La retrotrascrizione è stata effettuata in termociclatore (Verity 96 well Thermal Cyclers, Applied Biosystem) impostato con il seguente profilo termico: 10 minuti a 25°C (attivazione), 45 minuti a 42°C (allungamento), 3 minuti a 95°C (inattivazione) e blocco della reazione a 4°C. Il cDNA così ottenuto è stato sottoposto alla reazione a catena della polimerasi (PCR) (paragrafo 5.8) utilizzando le opportune coppie di oligonucleotidi innesco (Tabella 5.1) specifici per il trascritto ricercato.

5.8 Reazione a catena della polimerasi (PCR)

Per amplificare i frammenti di DNA d'interesse, è stata impiegata la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR). Questo metodo permette inoltre di incrementare considerevolmente la quantità di uno specifico segmento di DNA, partendo da una piccola aliquota utilizzata come stampo. Nello specifico, il frammento di genoma virale è stato amplificato mediante PCR, utilizzando come stampo il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione dell'RNA virale.

In generale, sono state preparate delle miscele contenenti 10 μ l di un tampone *5x i-Proof™High-Fidelity* buffer (Bio-Rad) o 5 μ l di tampone *10x PfuUltra HF reaction buffer* (Stratagene®) a seconda della polimerasi utilizzata, 2,5 μ l di ciascunoligonucleotide innesco (10 μ M), 5 μ l di dNTPs (100 mM) oppure 4 μ l di dNTPs (2,5mM), 0,5-1 μ l di *PfuUltra™High-Fidelity* DNA polimerasi (2 U/ μ l) (Stratagene®) o *i-Proof™High-Fidelity DNA Polimerase* (2,5 U/ μ l)(Biorad) a seconda dell'esigenza, 30-200 ng di DNA ed acqua deionizzata fino ad un volume di 50 μ l.

La reazione di amplificazione è stata effettuata in termociclatore Verity 96 well Thermal Cyclers (Applied Biosystem) con la replica di 30-40 cicli successivi costituiti da una fase di denaturazione a 98°C, una fase di appaiamento degli oligonucleotidi alla temperatura opportuna e una fase di elongazione a 72°C. A fine di denaturare il DNA stampo a doppia elica e di attivare la polimerasi, si è proceduto a incubare le miscele per 1 minuto a 98°C prima dei cicli di PCR precedentemente descritti.

I prodotti di PCR così ottenuti sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio paragonandoli agli opportuni marcatori di peso molecolare (Roche/Boehringer) per verificare che le dimensioni ottenute fossero corrette.

5.9 Mutagenesi sito-specifica

Al fine di introdurre la mutazione sito-specifica nella sequenza d'interesse, è stato utilizzato il kit “*QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit*” (Stratagene®). La procedura prevede all'inizio la sintesi del filamento mutante mediante PCR utilizzando opportuni oligonucleotidi innesco che appaiano perfettamente con la sequenza originaria meno che per uno o più nucleotidi. La miscela di reazione era costituita da: 5 µl di tampone 10X specifico per la polimerasi utilizzata (Stratagene®), 1,25 µl di oligonucleotidi innesco (10µM) (Tabella 5.1), 5µl di dNTPs (2,5 mM), 50 ng di DNA templato a doppio filamento, ed acqua MilliQ (Millipore) fino a volume di 50 µl. Alla miscela è stato aggiunto successivamente 1µl di polimerasi *PfuUltra™ High-Fidelity DNA* (2,5 U/µl) (Stratagene).

La reazione di amplificazione è stata effettuata in termociclatore Verity 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystem) tramite la ripetizione di 12 cicli successivi comprensivi di una fase di denaturazione a 95°C di 30 secondi, una di appaiamento degli oligonucleotidi a 55°C di un minuto e una fase di elongazione a 68°C per 14 minuti. Questi cicli sono preceduti da una fase di incubazione a 95°C per un minuto.

Al termine della reazione di amplificazione, la miscela è stata incubata in ghiaccio per 2 minuti, al fine di raffreddarla e in seguito si è proceduto ad aggiungere 1 µl dell'enzima DpnI (10 U/µl) per un ora a 37°C. Questa endonucleasi riconosce e digerisce specificamente il DNA metilato o emimetilato e quindi permette di eliminare tutto il DNA parentale mantenendo quello mutagenizzato.

L'ultima fase del protocollo prevede la trasformazione di 5 µl del DNA digerito in 50 µl di cellule batteriche competenti del ceppo DH5α (*E.coli*) con conseguente incubazione in ghiaccio per 30 minuti. La metodica di trasformazione prosegue con uno shock termico dei batteri a 37°C per 2 minuti, raffreddati poi in ghiaccio e l'incubazione della miscela a 37°C per un'ora in 200 µl di LB. Questo passaggio permette l'espressione e la sintesi della proteina che conferisce resistenza all'antibiotico di selezione. Quindi, la sospensione batterica è stata seminata su piastra Petri contenente LB agar addizionato con ampicillina (100 µg/ml) e poi incubata per 16 ore a 37°C, al fine di selezionare i batteri trasformati. Le colonie batteriche ottenute sono state inoculate in 3 ml di terreno liquido LB addizionato con ampicillina (100 µg/ml) e incubate in agitazione per 16 ore a 37°C. Il DNA plasmidico mutato è stato purificato mediante *miniprep* (paragrafo 5.5) e

sottoposto a sequenziamento per verificare l'introduzione della mutazione desiderata.

5.10 Strategie di clonaggio

Nel presente lavoro di tesi sono state utilizzate le seguenti strategie di clonaggio, specificate in maggior dettaglio successivamente (paragrafi 5.10.1, 5.10.2, 5.10.2, 5.10.3, 5.10.4, 5.10.5):

il frammento di DNA da clonare è stato ottenuto mediante amplificazione con la tecnica della reazione a catena della polimerasi (paragrafo 5.8). Gli oligonucleotidi innesco sono stati opportunamente disegnati per amplificare l'intera sequenza genica d'interesse addizionata all'estremità 5' o 3' dell'epitopo Flag e dei siti di taglio specifici per gli enzimi di restrizione prescelti inseriti sia all'estremità 5' che 3'. In alcuni clonaggi, sono state inserite anche le sequenze codificanti gli opportuni *Late Domain* e il segnale di miristilazione del Gag di HIV-1. Al termine della reazione di PCR, gli amplificati ottenuti sono stati analizzati tramite elettroforesi in gel di agarosio insieme ad un marker di peso molecolare noto per controllare le corrette dimensioni. I frammenti di gel contenenti le bande corrette sono stati tagliati mediante l'utilizzo di bisturi e il DNA è stato purificato con QIAGEN® *QIAquick gel extraction kit*. Questo protocollo prevede la solubilizzazione dell'agarosio e il conseguente legame dell'acido nucleico con una membrana di silice-gel in colonna a scambio ionico in presenza di un tampone ad alta concentrazione salina. Dopo alcuni lavaggi della membrana dalle impurità, il DNA è stato eluito con un tampone ad alta forza ionica. Quindi, si è proceduto ad effettuare la restrizione enzimatica del frammento per permetterne l'inserimento nel plasmide prescelto, anch'esso digerito con la stessa coppia di nuove endonucleasi. A tal fine, sono state sfruttate le proprietà enzimatiche della DNA ligasi del batteriofago T4 (4×10^5 U/ml) (Biolabs), capace 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 10 μ l, impiegando 0,5 unità di ligasi e incubate a 16°C per 16 ore. A seguito dell'incubazione, i prodotti di ligazione sono stati trasformati in cellule batteriche DH5 α secondo il protocollo descritto nel paragrafo 5.4. Le colonie resistenti all'ampicillina sono state inoculate in 3 ml di terreno LB, in presenza di

antibiotico e fatte crescere 16 ore a 37°C in agitazione. Quindi, il DNA plasmidico è stato estratto secondo il protocollo *miniprep* (si veda Paragrafo 5.5) e successivamente ne è stata verificata la correttezza mediante restrizione enzimatica, elettroforesi in gel d'agarosio e sequenziamento (si vedano Paragrafi 5.11, 5.12).

- L'altra strategia utilizzata si basava sull'amplificazione del frammento da clonare mediante PCR, successiva restrizione e ligazione in un vettore di subclonaggio. Effettuata l'analisi dell'avvenuta ligazione e della correttezza del frammento inserito, il plasmide ottenuto è stato digerito nuovamente con una coppia di enzimi di restrizione adeguata e l'inserito è stato inserito nel vettore d'espressione finale. Le quantità di vettore e dell'inserito da utilizzare nella reazione di ligazione sono state ottenute calcolate utilizzando la formula:

$$X(\text{ng}) = [100 \times Y (\text{bp})] / V (\text{bp})$$

Dove:

X = ng di inserto

100 = 100 ng di vettore

Y = paia di basi inserto

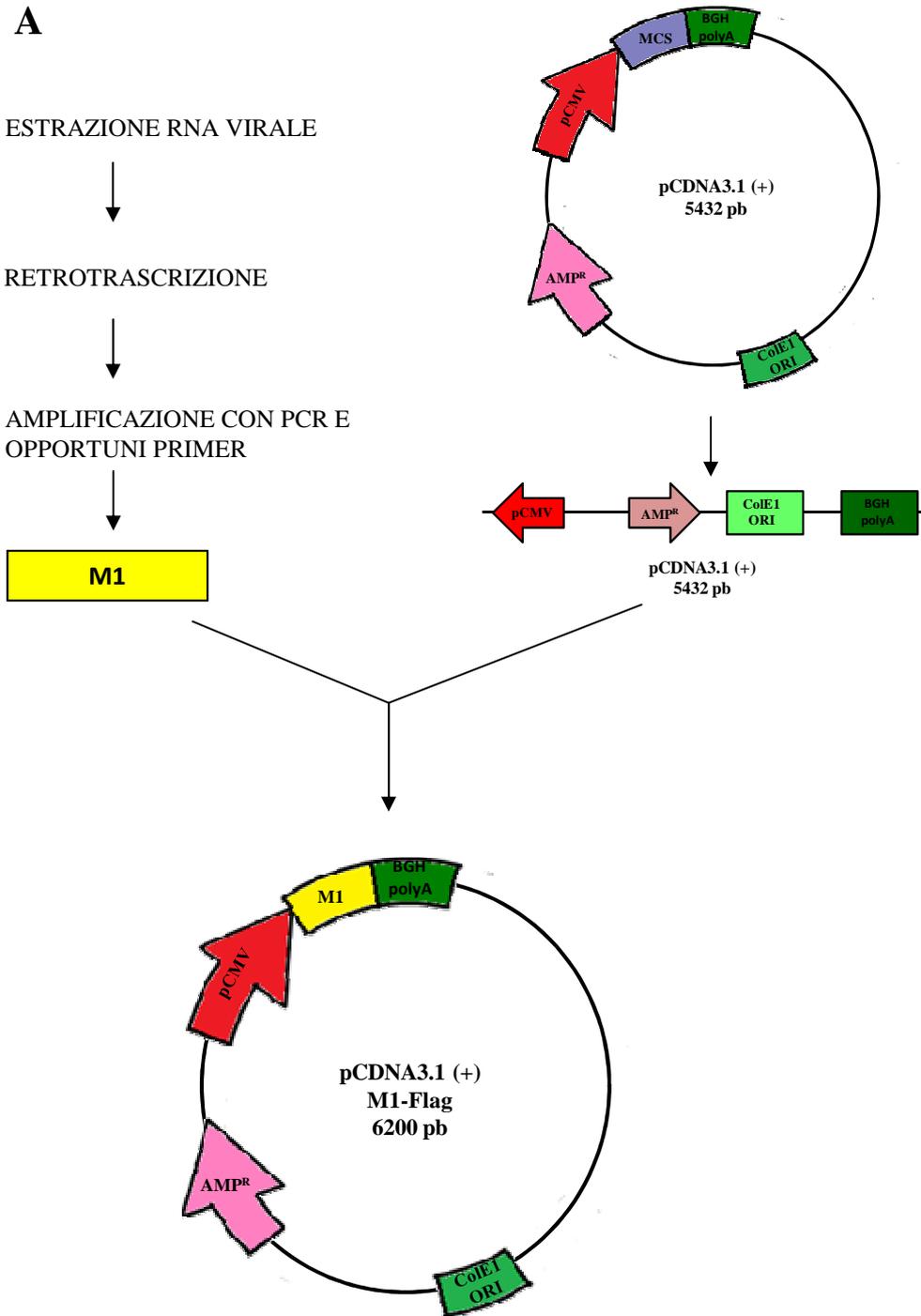
V = paia di basi di vettore

Prima della reazione di ligazione, i prodotti digeriti sono stati quantificati con lo spettrofotometro Nanodrop 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE), come descritto in paragrafo 5.6. Dopo l'incubazione, i prodotti di ligazione sono stati utilizzati per la trasformazione delle cellule batteriche DH5 α , come descritto nella prima strategia di clonaggio.

5.10.1 Ottenimento dei plasmidi esprimenti le proteine di matrice M1 e M2 del virus dell'influenza A/WSN/33 H1N1

L'RNA estratto dalle sospensioni virali è stato retrotrascritto (paragrafo 5.7) e amplificato mediante reazione di PCR (paragrafo 5.8) con gli opportuni *primer* riportati in Tabella 5.1, per ottenere la proteina M1 e la proteina M2 del virus dell'influenza A/WSN/33 H1N1 con l'epitopo Flag in posizione carbossiterminale. In seguito, i due prodotti di PCR sono stati sottoposti a restrizione enzimatica e successiva ligazione nei vettore d'espressione pcDNA3.1(+) e pBJ5. I plasmidi ottenuti sono stati denominati pcDNA3.1(+)M1-Flag, codificante la proteina M1, e pBJ5M2-Flag, codificante la proteina di

matrice M2. Il costrutto pcDNA3.1(+)-M1-Flag è stato sequenziato con gli oligonucleotidi universali T7 e BGH (Tabella 5.1), mentre il plasmide pBJ5M2-Flag è stato sequenziato mediante l'utilizzo dei *primer* utilizzati per l'amplificazione dell'inserito stesso.



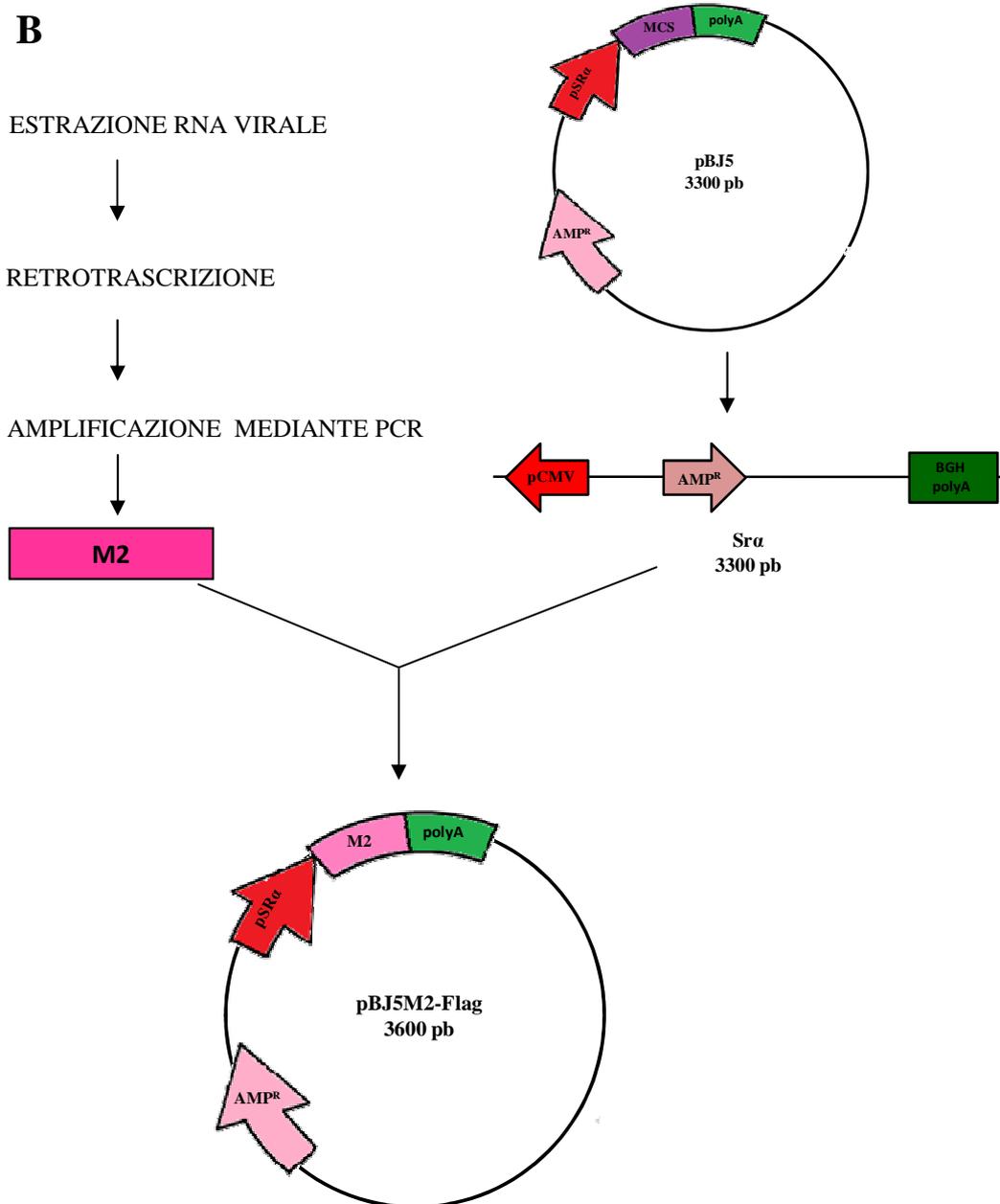


Figura 5.1: Rappresentazione schematica dell'ottenimento dei costrutti: pcDNA3.1(+)-M1-Flag, mediante ligazione del vettore pcDNA3.1(+) con l'inserto M1, estratto dalla sospensione virale del virus dell'influenza A/WSN/33, retrotrascritto e amplificato mediante reazione di PCR con specifici oligonucleotidi (**A**); e del costrutto pBJ5M2-Flag, mediante ligazione del vettore pBJ5 (srα) con il frammento della sequenza codificante la proteina di matrice M2, estratto dalla sospensione virale del virus dell'influenza A/WSN/33, retrotrascritto e amplificato mediante reazione di PCR con specifici oligonucleotidi (**B**). M1: porzione codificante proteina M1; pCMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-poly-A: segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina; M2: porzione codificante proteina M2; pSRα: promotore ibrido (SRα) composto dal promotore precoce del virus SV40 fusa al segmento R e a parte della sequenza U5 (R-U5) della LTR del virus HTLV-1.

5.10.2 Ottenimento dei plasmidi codificanti proteine chimeriche M1 derivate

Con il fine di inserire sequenze codificanti corti domini ricchi in proline o *Late Domain* (PTAP, PTAPPEY;YDDL) in posizioni diverse della proteina M1, la sua sequenza codificante è stata amplificata mediante la tecnica della reazione a catena della polimerasi (PCR; paragrafo 5.8) utilizzando gli specifici oligonucleotidi portati in Tabella 5.1 e come template il costrutto pcDNA3.1(+)-M1-Flag. Inoltre, sono stati generati anche costrutti in cui è stato inserito il segnale di miristilazione della proteina Gag di HIV-1 all'amminotermine di M1 in presenza/assenza degli *L-domain* precedentemente descritti. Tutti i costrutti sono stati dotati dell'epitopo Flag posto in posizione opposta ai Late Domain (estremità 5' o 3'). Al termine della reazione di PCR, gli amplificati sono stati digeriti con l'opportuna coppia di enzimi utilizzati anche per la restrizione del vettore pcDNA3.1(+) e quindi sono stati ligati insieme. I plasmidi ottenuti sono stati denominati: pcDNA3.1(+)-MyrM1YDDL-Flag; pcDNA3.1(+)-MyrYDDL-M1-Flag; pcDNA3.1(+)-FLAG-MyrM1YDDL; pcDNA3.1(+)-MyrM1PTAP-Flag; pcDNA3.1(+)-MyrPTAP-M1-Flag; pcDNA3.1(+)-FLAG-MyrM1PTAP; pcDNA3.1(+)-PTAP-M1-Flag; pcDNA3.1(+)-PTAPPEY-M1-Flag e pcDNA3.1(+)-MyrPTAPPEY-M1-Flag. I costrutti sono stati sequenziati con gli oligonucleotidi universali T7 e BGH riportati in tabella 5.1.

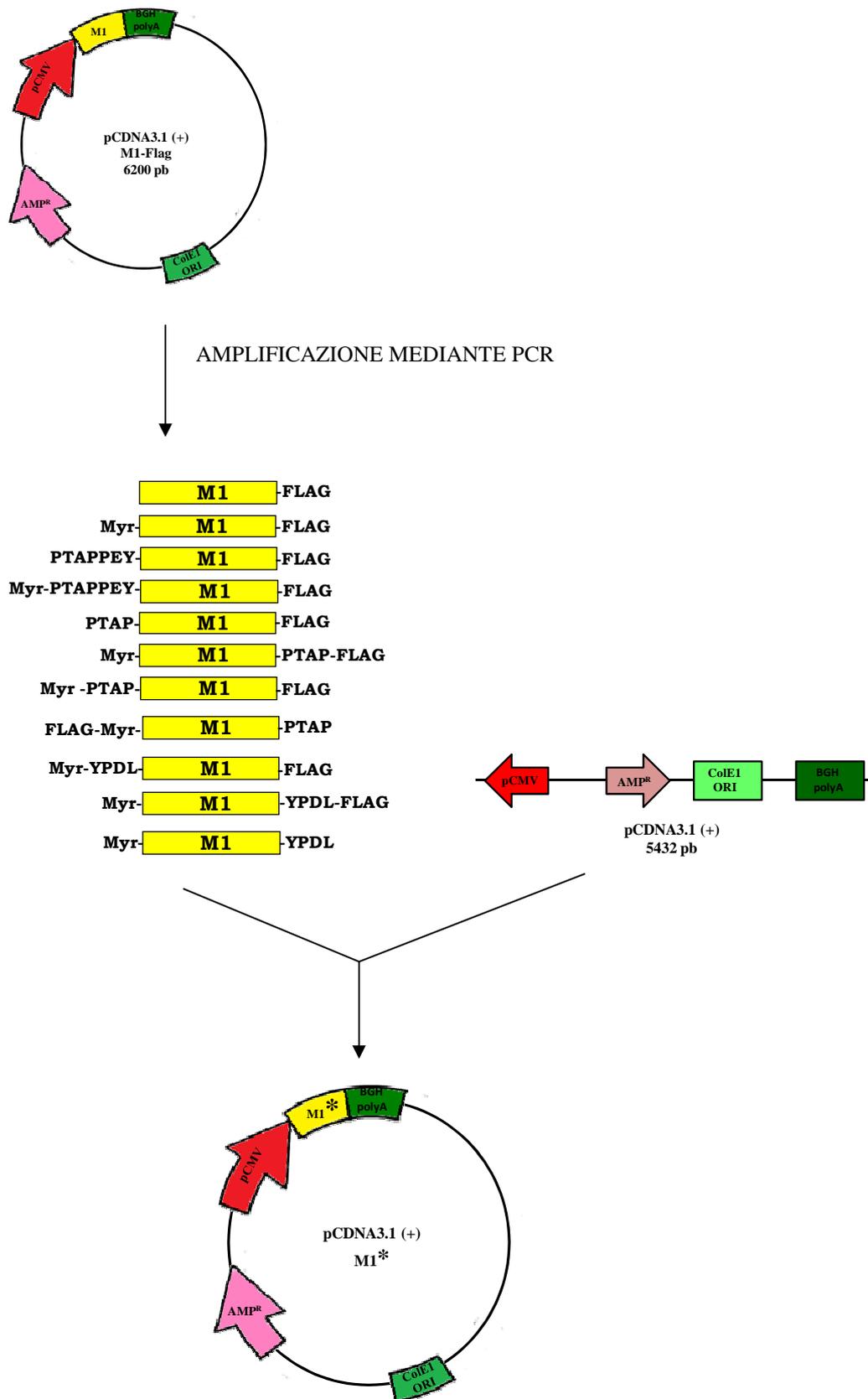


Figura 5.2: Rappresentazione schematica dell'ottenimento dei costrutti esprimenti la proteina M1 fusa ai Late Domain PTAP/PTAPPEY/YPDL all'estremità 5' o 3' con/senza il segnale di miristilazione della poliproteina Gag di FIV (Myr) al carbossitermine. Gli inserti sono stati ottenuti

mediante amplificazione della sequenza nucleotidica di M1 dal plasmide pcDNA3.1(+)M1-Flag con l'inserimento degli epitopi sopra indicati e dell'epitopo Flag all'estremità 3'. Successivamente, sono stati inseriti nel vettore pcDNA3.1(+). M1*: porzione di M1 addizionata degli *L-domain* e/o del segnale di miristilazione (Myr). pCMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-poly-A: segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina.

Inoltre, sono stati ottenuti dei costrutti esprimenti la proteina M1 fusa alla proteina CHMP3 o CHMP4B del complesso ESCRT-III con/senza il segnale di miristilazione del Gag di HIV-1. A partire dal costrutto pcDNA3.1(+)M1-Flag, è stata amplificata la sequenza codificante M1 inserendo al posto del codone di stop (TAG) un sito di taglio riconosciuto da uno specifico enzima di restrizione. Un altro sito di taglio è stato aggiunto all'estremità 5'. Al termine della reazione di PCR, l'amplificato è stato digerito e quindi ligato insieme al vettore di clonaggio intermedio pSP73. L'avvenuto inserimento e la correttezza dell'inserito è stata valutata mediante una nuova restrizione e successivo sequenziamento con i *primer* universali T7 e SP6, riportati in tabella 5.1. In parallelo, le sequenze rispettivamente di CHMP3 e di CHMP4B sono state amplificate partendo dai costrutti pBJ5CHMP3-Flag e pBJ5CHMP4B-Flag, eliminando il codone d'inizio (ATG) di entrambe e inserendoci lo stesso sito di restrizione utilizzato all'estremità 3' di M1. Questi frammenti di DNA sono stati dotati anche dell'epitopo Flag all'estremità 3'. Al termine della PCR, i frammenti CHMP3-Flag e CHMP4B-Flag digeriti sono stati inseriti nei vettori pSP73MyrM1 e pSP73M1 sottoposti alla medesima reazione di restrizione degli amplificati. Dopo aver verificato la correttezza nella ligazione come descritto prima, gli inserti ottenuti sono stati nuovamente digeriti e trasferiti nel vettore d'espressione finale pcDNA3.1(+). I plasmidi ottenuti sono stati denominati: pcDNA3.1(+)M1CHMP4B-Flag; pcDNA3.1(+)MyrM1CHMP4B-Flag e pcDNA3.1(+)MutMyrM1CHMP4B-Flag. I costrutti sono stati sequenziati con gli oligonucleotidi universali T7 e BGH riportati in tabella 5.1.

Inoltre, al fine di rendere non funzionale il segnale di miristilazione, mediante mutagenesi sito-specifica è stata variata la glicina in posizione 1 in alanina all'interno del costrutto pcDNA3.1(+)MyrM1CHMP4B-Flag (paragrafo 5.9). L'avvenuta introduzione della mutazione desiderata è stata valutata mediante il sequenziamento con i *primer* T7 e BGH (Tabella 5.1).

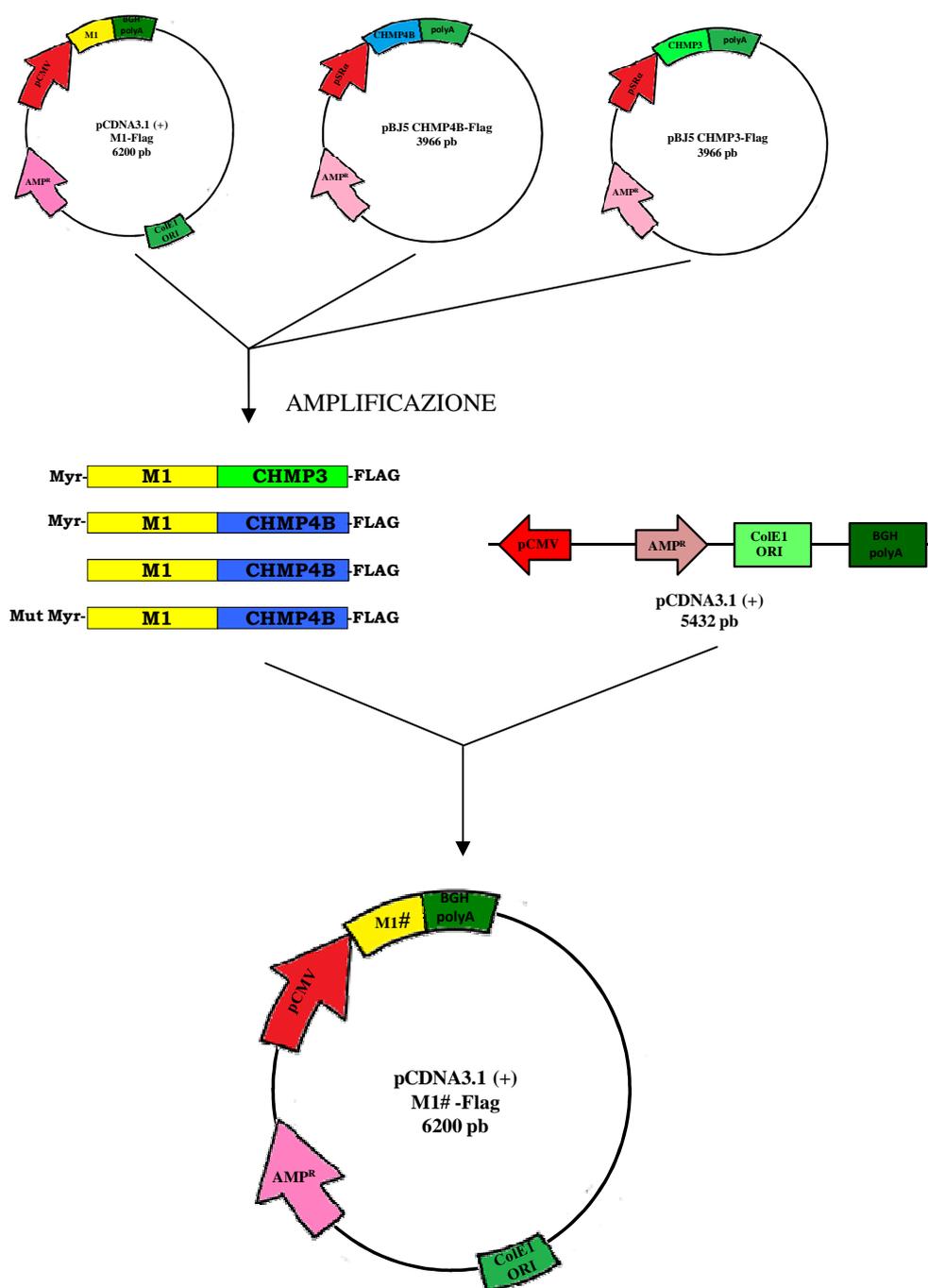


Figura 5.3: Rappresentazione schematica dell'ottenimento dei costrutti intermedi pSP73MyrM1 e pSP73M1 mediante amplificazione del segmento genico di M1 dal plasmide pcDNA3.1(+)-M1-Flag e ligazione nel vettore pSP73. I frammenti codificanti le proteine codificanti CHMP3 e CHMP4B sono stati ottenuti mediante amplificazione rispettivamente dai plasmidi pBJ5CHMP3-Flag e pBJ5CHMP4B-Flag e quindi ligati con i plasmidi pSP73MyrM1 e pSP73M1. Gli inserti Myr-M1CHMP3-Flag, Myr-M1CHMP4B-Flag, M1CHMP4B-Flag sono stati estratti dai costrutti intermedi e inseriti nel vettore pcDNA3.1(+). Il costrutto MutMyrM1CHMP4B-Flag è stato mutagenizzato nella prima glicina del segnale di miristilazione. M1#: porzione codificante la proteina M1 fusa alla sequenza codificante la proteina cellulare CHMP3/CHMP4B con o senza il segnale di miristilazione; pCMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-poly-A: segnale di

poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina.

5.10.3 Ottenimento dei plasmidi codificanti le fusioni della proteina M1 con la proteina M2 o parte di essa

Al fine di creare le proteine di fusione costituite dalle sequenze M1 e M2, sono stati utilizzati i plasmidi pcDNA3.1(+)-M1-Flag e pBJ5M2-Flag per amplificare i due frammenti codificanti M1 e M2. Nello specifico, per ottenere la proteina di fusione M2-M1 la sequenza nucleotidica M2 è stata amplificata mediante PCR con gli opportuni oligonucleotidi riportati in Tabella 5.1. Oltre al sito di restrizione posto all'estremità 5' di M2, è stato eliminato il suo codone di stop M1 (TAG) ed inserendo al suo posto un sito di taglio riconosciuto da uno specifico enzima di restrizione. Dopo la reazione di PCR, l'amplificato è stato digerito e inserito nel vettore pcDNA3.1(+), anch'esso sottoposto a restrizione. Al contempo, è stato amplificato l'inserito M1 a partire dal plasmide pcDNA3.1(+)-M1-Flag, a cui è stato eliminato il codone d'inizio (ATG) e sostituito dallo stesso sito di restrizione inserito al 3' dell'inserito M2. Inoltre, vi è stato aggiunto l'epitopo Flag nella porzione carbossiterminale. Il frammento è stato sottoposto alla digestione da parte della coppia di endonucleasi prescelta e quindi ligato all'interno del costrutto pcDNA3.1(+)-M2. L'avvenuto inserimento e la correttezza dell'inserito è stata valutata mediante una nuova restrizione e successivo sequenziamento con i *primer* universali T7 e BGH (Tabella 5.1). Il plasmide così ottenuto è stato denominato pcDNA3.1(+)-M2-M1-Flag. La stessa procedura è stata effettuata per ottenere la fusione pcDNA3.1(+)-M1-M2, solo che in questo caso il codone di stop a valle è stato sostituito al segmento genico di M1 e il codone d'inizio eliminato era quello della sequenza nucleotidica di M2. Al fine di inserire l'elica anfipatica della proteina M2 (E.A.) al carbossitermine di M1 in presenza o meno del segnale di miristilazione, la sequenza codificante i 18 amminoacidi dell'elica anfipatica è stata amplificata mediante la tecnica della PCR con gli opportuni oligonucleotidi (Tabella 5.1) e il plasmide pBJ5M2-Flag. L'epitopo Flag è stato inserito all'estremità 3'. L'amplificato ottenuto è stato sottoposto a restrizione enzimatica con l'appropriata coppia di enzimi e inserito nel vettore pcDNA3.1(+)-M1 e pcDNA3.1(+)-MyrM1. Gli inserti codificanti M1 e MyrM1, privi del codone di stop, sono stati ottenuti per restrizione enzimatica dai plasmidi pSP73M1 e pSP73MyrM1 (si veda paragrafo 5.10.2, parte clonaggio proteine CHMP) e quindi inseriti nel pcDNA3.1(+). I costrutti ottenuti sono stati

controllati mediante sequenziamento (*primer* T7 e BGH) e sono stati denominati: pcDNA3.1(+)*M1*-E.A.*M2*-Flag e pcDNA3.1(+)*Myr*-*M1*-E.A.*M2*-Flag.

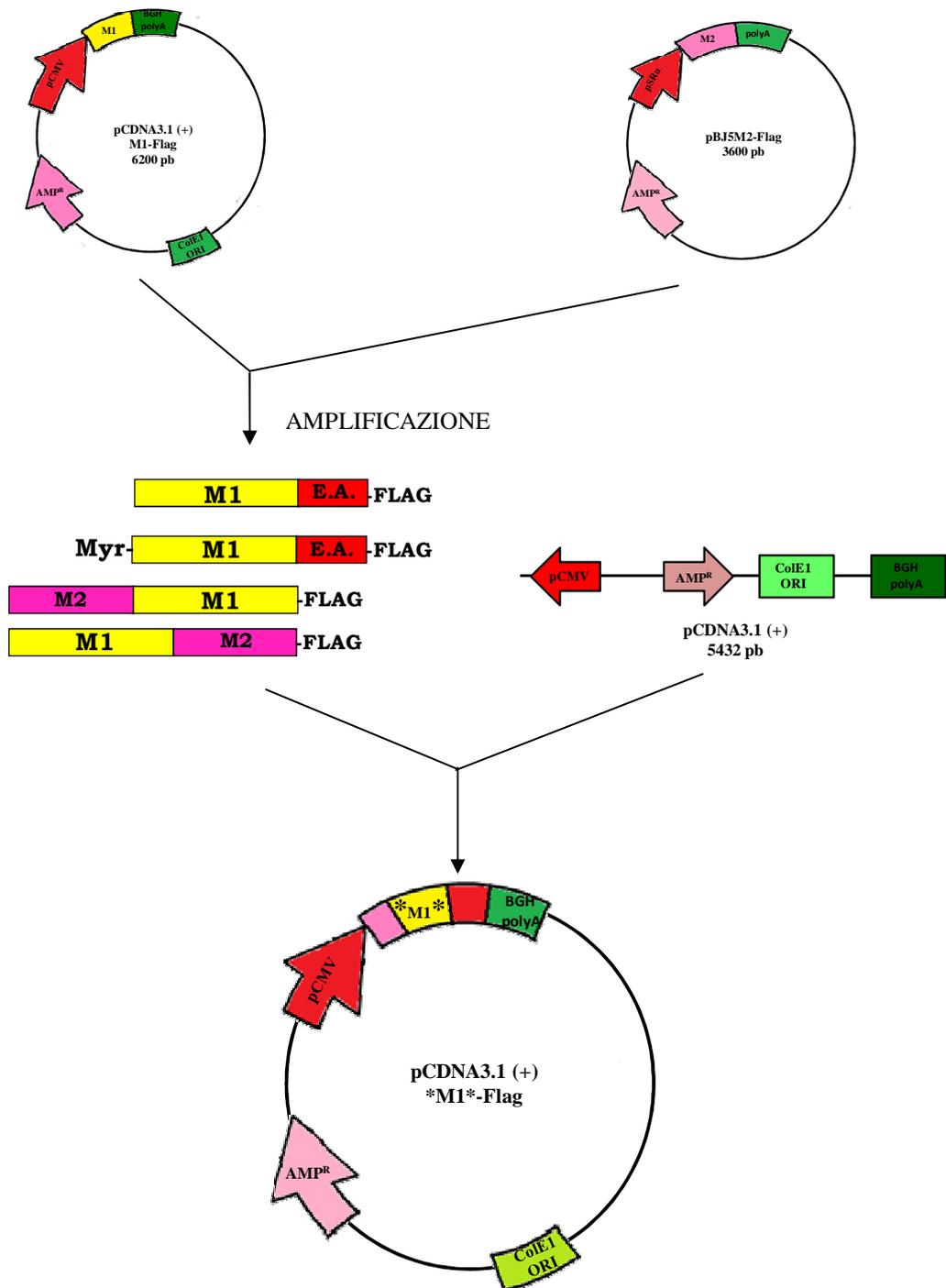


Figura 5.4: Rappresentazione schematica dell'ottenimento dei costrutti: pcDNA3.1(+)*M1*-E.A.*M2*-Flag e pcDNA3.1(+)*Myr*-*M1*-E.A.*M2*-Flag, mediante ligazione del vettore pcDNA3.1 con gli inserti *M1* e *MyrM1*, estratti dai plasmidi pSP73*M1* e pSP73*MyrM1*, e l'inserimento del frammento codificante l'elica anfipatica di *M2* (E.A.*M2*), amplificato a partire dal plasmide pBJ5*M2*-Flag; pcDNA3.1(+)*M2*-*M1*-Flag, mediante ligazione del vettore pcDNA3.1(+) con la

sequenza nucleotidica di M2 priva del codone di stop (TAG) al 3' e la sequenza di M1 senza il codone d'inizio (ATG) al 3'; pcDNA3.1(+)-M1-M2-Flag, mediante ligazione del vettore pcDNA3.1(+) con la sequenza nucleotidica di M1 priva del codone di stop (TAG) al 3' e la sequenza di M2 senza il codone d'inizio (ATG) al 3'. *M1*: porzione contenente la sequenza nucleotidica di M1 con gli inserimenti degli elementi all'estremità 5' e 3' precedentemente descritti; pCMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-poly-A: segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina.

5.10.4 Ottenimento dei costrutti codificanti la proteina M2 o parti di essa fuse a mutanti della proteina Gag di FIV

I frammenti codificanti la proteina Gag di FIV *wild type*, o deleva della regione p2 (Δ p2), o difettiva del Late Domain funzionale (Mut02, ASAA-LLDL) oppure con i due *L-domain* inattivati (Mut21ASAA, ASAA-AAAA) sono stati ottenuti mediante restrizione enzimatica dai costrutti p Δ env1, p Δ env1Mut Δ p2, p Δ env1Mut02 e p Δ env1Mut21-ASAA, precedentemente ottenuti nel nostro laboratorio. Gli inserti sono stati trasferiti all'interno del vettore pcDNA3.1(+).

Il plasmide pBJ5M2-Flag è stato utilizzato come templatò nella reazione di PCR (paragrafo 5.10.1) per l'amplificazione della proteina M2, la sua coda citoplasmatica (CT M2) e l'elica anfipatica (E.A:M2). A tutti i frammenti di DNA è stato inserito l'epitòpo Flag nella porzione carbossiterminale. Gli amplificati di PCR sono stati digeriti con un opportuna coppia di enzimi di restrizione e inseriti nei plasmidi pcDNA3.1(+)-GagFIV Δ p2, pcDNA3.1(+)-GagFIVMut02, pcDNA3.1(+)-GagFIVMut21ASAA. Il corretto inserimento è stato valutato mediante sequenziamento con gli oligonucleotidi universali T7, BGH e FIV2 (Tabella 5.1). I costrutti generati sono stati denominati: pcDNA3.1(+)-GagFIV WT; pcDNA3.1(+)-GagFIV Δ p2-M2-Flag; pcDNA3.1(+)-GagFIV Δ p2-CTM2-Flag; pcDNA3.1(+)-GagFIV Δ p2-E.A.M2-Flag; pcDNA3.1(+)-GagFIVMut02-M2-Flag; pcDNA3.1(+)-GagFIVMut02-CTM2-Flag; pcDNA3.1(+)-GagFIVMut02-E.A.M2-Flag; pcDNA3.1(+)-GagFIVMut21ASAA-CTM2-Flag; pcDNA3.1(+)-GagFIVMut21ASAA-E.A.M2-Flag.

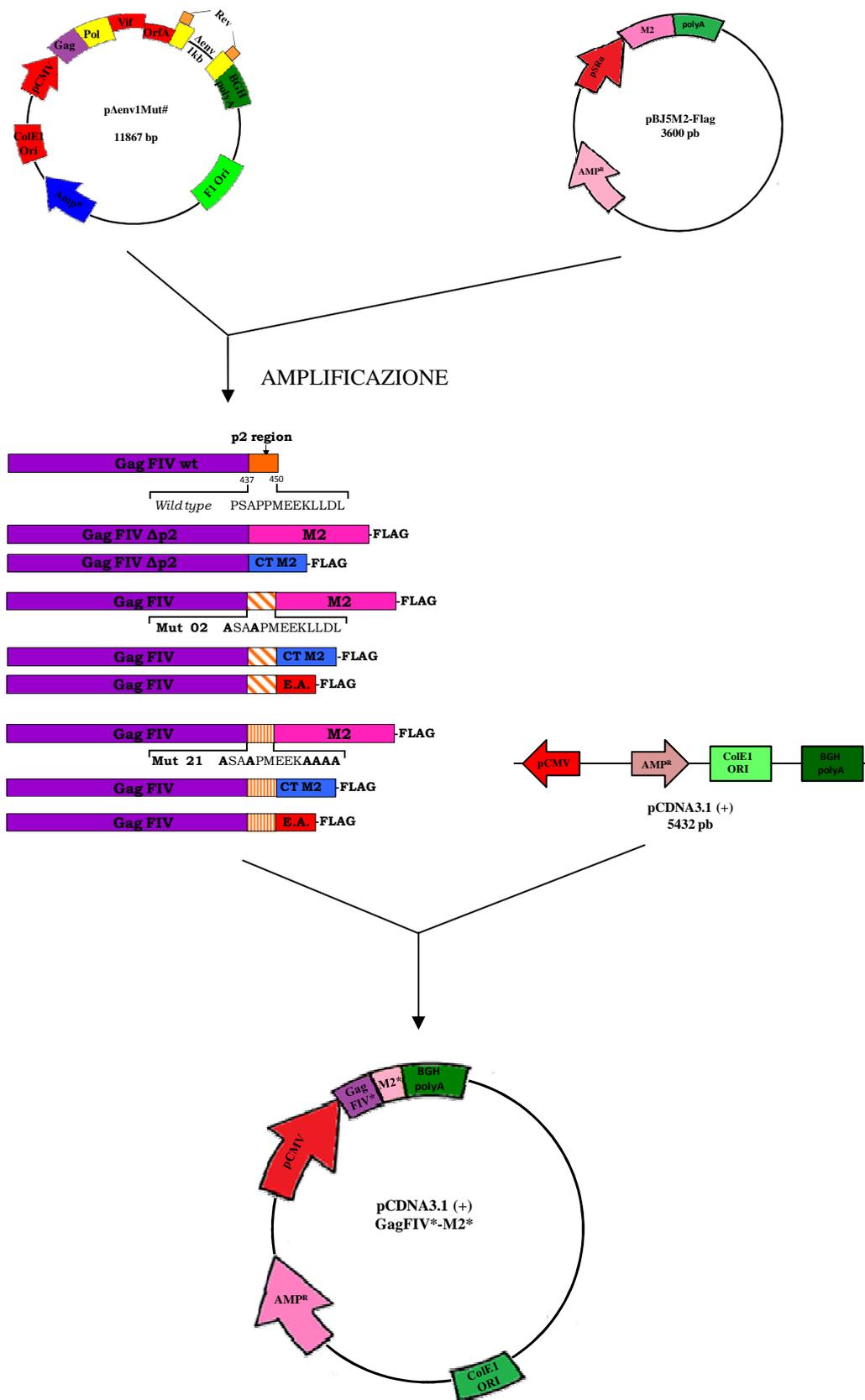


Figura 5.5: Rappresentazione schematica dell'ottenimento dei plasmidi codificanti la proteina Gag di FIV (*wild type*, *wt*) e suoi mutanti ($\Delta p2$, Mut02 e Mut21-ASAA) fusa alla proteina M2 e parti di essa (coda citoplasmatica CT, elica anfipatica E.A.). Gli inserti codificanti la proteina Gag di FIV

deleta della regione p2 ($\Delta p2$), o difettiva del Late Domain funzionale (Mut02, ASAA-LLDL) oppure con i due *L-domain* inattivati (Mut21ASAA, ASAA-AAAA) sono stati ottenuti mediante restrizione dai plasmidi p $\Delta env1Mut\Delta p2$, p $\Delta env1Mut02$ e p $\Delta env1Mut21-ASAA$ e inseriti nel vettore pcDNA3.1(+). La sequenza nucleotidica di M2, della porzione citoplasmatica e dell'elica anfipatica sono state ottenute mediante amplificazione a partire dal plasmide pBJ5M2-Flag e quindi ligate con i vettori pcDNA3.1(+)*GagFIV* $\Delta p2$, pcDNA3.1(+)*GagFIVMut02*, pcDNA3.1(+)*GagFIVMut21ASAA*. *Gag FIV**: porzione della ORF del gene *gag* di FIV deleta della regione p2 o mutato, come descritto precedentemente; pCMV: promotore del Citomegalovirus (CMV); BGH-poly-A: segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino; ColE1: origine di replicazione batterica; F1 Ori: origine di replicazione fagica; Amp^R: gene per la resistenza all'ampicillina.

5.10.5 Ottenimento dei costrutti codificanti le emoagglutinine senza il dominio globulare (HA *headless*)

Gli RNA estratti dalle sospensioni virali dei virus dell'influenza A/WSN/33 H1N1 e A/Brisbane/59/2007 H1N1 sono stati retrotrascritti (paragrafo 5.7) e amplificati mediante reazione di PCR (figura 5.6) con gli opportuni *primer* riportati in Tabella 5.1. Con due diversi protocolli di PCR (PCR1 e PCR2) sono stati ottenuti i frammenti di DNA codificanti rispettivamente: i primi 58 amminoacidi coniugati agli ultimi 70 amminoacidi della subunità H1 e l'intera subunità HA2, addizionata dell'epitopo Flag all'estremità 3'. Gli amplificati sono stati generati per essere parzialmente e quindi la loro fusione è stata effettuata mediante un secondo protocollo di PCR, o PCR di fusione (PCR3), in cui sono stati utilizzati come templati. Inoltre, sono stati ottenute altre due fusioni in cui è stato inserito un peptide di legame tra i due frammenti di PCR, costituito da 4 glicine o 4 arginine. Dopo questa reazione di PCR (PCR3), gli amplificati sono stati sottoposti ad opportuna restrizione e inseriti nel vettore pcDNA3.1(+). Utilizzando gli oligonucleotidi T7 e BGH (Tabella 5.1), i plasmidi ottenuti sono stati analizzati mediante sequenziamento e quindi denominati pcDNA3.1(+)*HA1-HA2-Flag* (I, Figura 5.6), pcDNA3.1(+)*HA1-GGGG-HA2-Flag* e pcDNA3.1(+)*HA1-RRRR-HA2-Flag* (II, Figura 5.6).

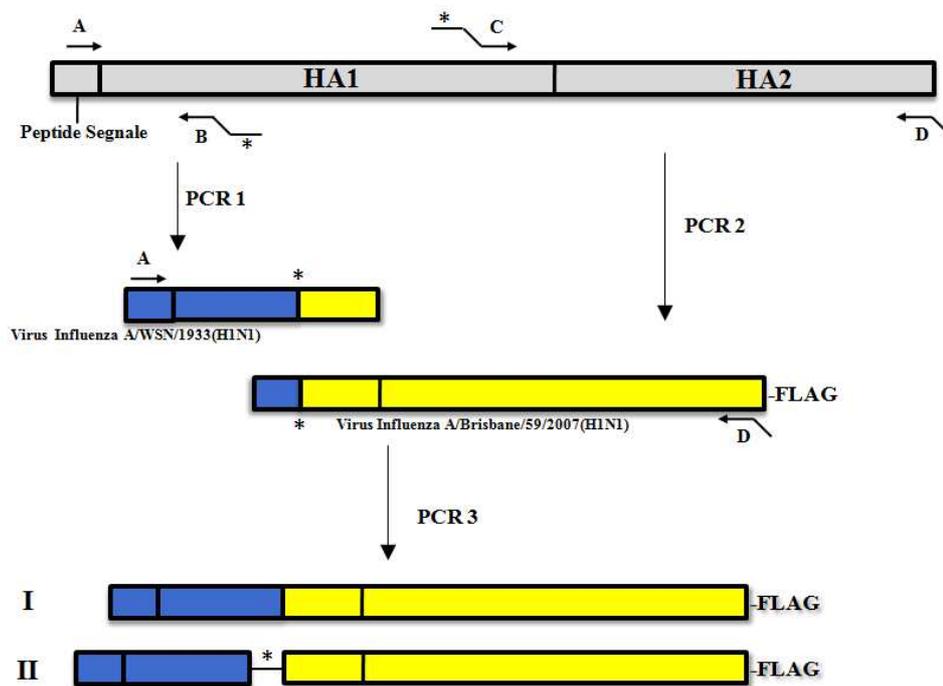


Figura 5.6: Rappresentazione schematica del protocollo utilizzato per la reazione di PCR di fusione per ottenere i costrutti codificanti le emoagglutinine senza testa (HA headless) (modificata da Hobert, 2002). Sono stati amplificati i due frammenti dagli RNA estratti e retrotrascritti delle sospensioni virali dell'influenza A/WSN/33 H1N1 e A/Brisbane/59/2007 H1N1 mediante due reazioni di PCR indipendenti utilizzando i primer A e B* (PCR1) e C* e D (PCR2). In particolare, gli oligonucleotidi B* e C* sono stati disegnati per amplificare due estremità che poi siano sovrapponibili. L'asterisco (*) rappresenta il sito in cui sono state aggiunte le 4 glicine/arginine del peptide di legame, che nei costrutti pcDNA3.1(+)-HA1-GGGG-HA2-Flag e cDNA3.1(+)-HA1-RRRR-HA2-Flag (**II**) sostituiscono la testa globulare dell'emoagglutinina. Dopo l'ottenimento dei due frammenti singoli, questi sono stati utilizzati come template nella PCR di fusione con gli oligonucleotidi A e D. La sovrapponibilità tra i frammenti permette la loro fusione in un unico frammento codificante l'emoagglutinina priva della testa globulare (**I**). Gli amplificati HA1-HA2(**I**), HA1-GGGG-HA2 e HA1-RRRR-HA2 (**II**) sono stati ligati nel vettore pcDNA3.1(+).

5.11 Restrizione enzimatica

Le reazioni di restrizione del DNA plasmidico o degli amplificati ottenuti mediante PCR sono state effettuate utilizzando gli opportuni enzimi di restrizione (Biolabs) nei rispettivi tamponi di reazione. Le restrizioni sono state condotte alla temperatura ottimale dell'enzima (generalmente 37°C) e per il tempo richiesto, in base alla tipologia dell'endonucleasi impiegata e al quantitativo di acido nucleico da digerire. In seguito, i campioni sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1% (p/v) (Seakem) addizionato dell'intercalante *Gel-Red* (0.5 µg/ml), che permette di visualizzare il DNA quando irradiato con luce UV. Inoltre, per ottenere una miglior visualizzazione del fronte

di migrazione della corsa elettroforetica e per facilitare l'entrata del campione di DNA nel pozzetto, i campioni sono stati diluiti con il colorante *Loading Dye 6x* (Blu di bromofenolo 0,15 % (p/v), Xilene cianolo 0,02% (p/v), Glicerolo 5% (p/v) ed EDTA 0,002 M). La corsa elettroforetica è stata effettuata utilizzando anche un opportuno tampone salino TBE 1X (Tris-borato 0,009 M, EDTA 1 mM pH 8). Il DNA contenuto nei diversi campioni viene fatto migrare insieme ad un opportuno marcatore molecolare, che varia a seconda della lunghezza dei frammenti attesi. 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) e il Marker VIII (0,25 µg/ml) (Roche/Boehringer).

5.12 Reazione di sequenziamento

I costrutti ottenuti in questo lavoro di tesi sono stati controllati mediante restrizione enzimatica, come descritto nel paragrafo 5.11, e successivamente tramite sequenziamento. Per il protocollo di sequenziamento, è stato utilizzato il *Big Dye® Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (AppliedBiosystem), basato sul metodo di Sanger modificato (Sanger *et al.*, 1977) e che sfrutta la DNA polimerasi *AmpliTaq® Gold* per sintetizzare copie di DNA a singolo filamento.

La miscela di reazione è composta da quattro deossinucleotidi trifosfato (dNTPs), altrettanti dideossinucleosidi trifosfato (ddNTPs) coniugati specificamente con un cromoforo, la polimerasi *AmpliTaq® Gold* e il suo tampone di reazione. In particolare, i dideossinucleosidi trifosfato marcati sono terminatori di catena, in quanto non possedendo il gruppo ossidrilico terminale, non permettono al successivo deossinucleotide di legarsi (dNTP). Inoltre, i cromofori ad essi associati quando eccitati sono in grado di emettere a lunghezze d'onda comprese tra 500 e 700 nm. Si ottengono così frammenti di DNA complementari al stampo e caratterizzati da lunghezze diverse, che vengono analizzati mediante gel elettroforesi capillare.

La miscela di reazione è stata allestita in un volume finale di 10 µl in presenza di: 250 ng di DNA plasmidico; 1 µl della miscela del kit; 1 µl del primer di innesco alla concentrazione 1 µM (Tabella 5.1); 1 µl di *buffer 5x* (Tris-HCl 200 mM, pH 9, MgCl₂ 5mM), e acqua MilliQ (Millipore) per arrivare ad un volume. Sono stati effettuati 35 cicli di amplificazione in un termociclatore (Verity 96 well Thermal Cycler, AppliedBiosystem), dove ogni ciclo comprende: 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. La reazione di

amplificazione è stata preceduta da un incubazione delle miscele di reazione a 95°C per 10 minuti.

I prodotti ottenuti sono stati precipitati in presenza di 1/10 del volume di sodio acetato 3M pH 4.6 e 2 volumi di etanolo e quindi risospesi in acqua per essere caricati nel sequenziatore automatico ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (AppliedBiosystem). Questo strumento permette la separazione dei frammenti di DNA mediante elettroforesi su gel capillare e il risultato viene visualizzato come profilo sensitometrico di picchi fluorescenti corrispondenti alle basi nucleotidiche.

5.13 Trasfezione di cellule 293T e COS-7

In questo lavoro sperimentale, il trasferimento genico di DNA esogeno in cellule 293T e COS-7 è stato effettuato sfruttando la capacità di alcune molecole denominate liposomi di formare complessi lipidici carichi positivamente che si complessano con il DNA d'interesse (Lipofectamine 2000™, Invitrogen).

Il giorno precedente la trasfezione, $1,2 \times 10^6$ cellule 293T o COS-7 sono state seminate in una fiasca con superficie di 25 cm² (T25) (Falcon) in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Gibco), addizionato al 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*, Gibco) in assenza di antibiotici in un volume finale di 5ml. A distanza di 24 ore, raggiunta una confluenza del 70-80%, si è proceduto con la trasfezione delle cellule con i plasmidi precedentemente ottenuti secondo le istruzioni riportate dal produttore. Nello specifico, sono state preparate due diverse miscele: la prima costituita da 8µg di DNA plasmidico in 500 µl di terreno di coltura privo di siero e l'altra contenente 20 µl di una soluzione di Lipofectamine 2000 (1 mg/ml, Invitrogen) in 500 µl di DMEM senza siero. In particolare, per gli esperimenti di cotrasfezione del costrutto pcDNA3.1(+)-M1-Flag con il costrutto pBJ5M2-Flag, le miscele di DNA sono state allestite nel seguente modo:

pcDNA3.1(+)-M1-Flag	7µg	7µg	1µg
pBJ5M2-Flag	1µg	/	/
pcDNA3.1(+)	/	1µg	7µg
DMEM senza siero	500 µl	500 µl	500 µl

Tabella 5.2 Schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la trasfezione di cellule 293T con il plasmide esperimenti la proteina M1 con il plasmide codificante la proteina M2.

Negli esperimenti di incorporazione delle emoagglutinina senza testa (HA headless) nelle particelle simil-virali ottenute dalla proteina Gag di FIV (pΔenv1Mut06), le miscele di DNA sono state preparate secondo le seguenti modalità:

pΔenv1Mut06	1μg	/	/	/	1μg	1μg	1μg
pcDNA3.1(+)-HA1-HA2-Flag	/	7μg	/	/	7μg	/	/
pcDNA3.1(+)-HA1-GGGG-HA2-Flag	/	/	7μg	/	/	7μg	/
pcDNA3.1(+)-HA1-RRRR-HA2-Flag	/	/	/	7μg	/	/	7μg
pcDNA3.1(+)	7μg	1μg	1μg	1μg	/	/	/
DMEM senza siero	500 μl						

Tabella 5.3 Schema delle quantità dei reagenti utilizzati per la trasfezione di cellule 293T con il plasmide pcDNA3.1(+)-HA1-HA2-Flag, pcDNA3.1(+)-HA1-GGGG-HA2-Flag, pcDNA3.1(+)-HA1-RRRR-HA2-Flag con il plasmide esprime la proteina Gag di FIV, difettiva della proteasi virale.

Le due miscele (DNA e lipofectamine) sono state riunite e lasciate ad incubare per 30 minuti a temperatura ambiente. In seguito, la miscela unica DNA-Lipofectamine è stata aggiunta al terreno di coltura delle cellule 293T o COS-7. Dopo 6 ore, il terreno contenente la miscela di trasfezione è stato eliminato e nelle fiasche è stato aggiunto del DMEM fresco addizionato al 10% di siero fetale bovino. La raccolta delle cellule trasfettate e dei surnatanti è stata effettuata 48 ore dopo la trasfezione.

Per le preparazioni di VLP utilizzate negli esperimenti *in vivo*, le cellule 293T sono state seminate ad una densità di $4,5 \times 10^6$, in fiasche con superficie pari a 75 cm^2 (T75) in 10 ml di DMEM addizionato al 10% di siero privo di antibiotici. Trascorse 24 ore, si è proceduto come descritto in precedenza con la preparazione di due miscele: la prima costituita da 24μg di DNA plasmidico in 1,5 ml di terreno di coltura privo di siero e l'altra contenente 40 μl di una soluzione di Lipofectamine 2000 (1 mg/ml, Invitrogen) in 1,5 ml di DMEM senza siero. Per ogni preparazione di particelle simil-virali, sono state trasfettate 10 fiasche T75. La raccolta dei surnatanti per la purificazione delle VLP (paragrafi 5.14 e 5.15) è stata effettuata a 72 ore di distanza dalla trasfezione.

5.14 Purificazione di *Virus Like Particles* (VLP) su cuscino di saccarosio

In questo lavoro di tesi, è stata effettuata l'analisi della produzione di particelle simil-virali o VLP mediante trasfezione di cellule 293T o COS-7 con i costrutti precedentemente descritti (si veda paragrafo 5.13).

La raccolta del mezzo di coltura, in cui sono state rilasciate le VLP, è stata effettuata 48 ore dopo la trasfezione. Il terreno è stato raccolto in tubi da centrifuga (Falcon) da 15 ml e sottoposto a centrifugazione a 1100 rpm per 10 minuti a 4°C, al fine di sedimentare i detriti cellulari in esso presenti. Il surnatante è stato successivamente filtrato (0.45 µm, Millipore).

Per la produzione su ampia scala delle VLP da utilizzare negli esperimenti *in vivo*, i surnatanti contenenti le VLP sono stati raccolti dopo 72 ore dalla trasfezione. In questo caso specifico, al fine di ottenere una maggiore concentrazione delle VLP prodotte, i mezzi di coltura derivanti dalla medesima trasfezione effettuata in doppio sono stati riuniti in un unico tubo da centrifuga (Falcon) da 50 ml. Quindi, i surnatanti sono stati centrifugati, filtrati e conservati come precedentemente descritto. Le VLP prodotte, sono state purificate mediante ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio. Questo metodo prevede la stratificazione dei surnatanti di trasfezione debitamente centrifugati e filtrati su 1 ml di una soluzione di saccarosio al 20% (p/v) in tubi da centrifuga (*Polyallomer Centrifuge Tubes* 13 x 51 mm, Beckman). Quindi, i campioni così preparati sono stati sottoposti a successiva centrifugazione a 27000 rpm per 2 ore a 4°C. Al termine della quale, sono stati aspirati delicatamente ed eliminati il mezzo di coltura e lo strato di saccarosio e il sedimento virale è stato risospeso in 25µl di RIPA 1X [NaCl 150 mM, IGEPAL CA-630 1% (v/v) (Sigma), acido deossicolico 0.5% (p/v), SDS 1% (p/v) (Bio-Rad), Tris-HCl 50 mM pH 8.0] e sottoposto a SDS-PAGE (Paragrafo 5.17) e successivo Western Blotting (Paragrafo 5.18).

Invece, per la preparazione delle VLP da utilizzare nel protocollo di vaccinazione, un volume di terreno pari a 10.5 ml è stato stratificato su 6 ml di saccarosio al 20% (p/v) in tubi da centrifuga (*Polyallomer Centrifuge Tubes* 25 x 89 mm, Beckman), sottoposti, poi, a centrifugazione a 27000 rpm per 2 ore a 4°C. Dopo eliminazione del terreno e del saccarosio, il sedimento virale è stato risospeso in 60 µl di tampone fosfato sterile PBS (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4) e quindi quantificato allo spettrofotometro Nanodrop 1000 (come descritto nel paragrafo 5.6).

5.15 Preparazione dei lisati cellulari

Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule 293T o COS-7 sono state staccate dalla superficie interna della fiasca e sono state lavate per tre volte con tampone fosfato (PBS) e successiva centrifugazione a 1100 rpm per 10 minuti a 4°C. I pellet cellulari sono stati quindi lisati mediante risospensione in 250 µl (fiasca T25) o in 350 µl (fiasca T75) di soluzione RIPA 1X addizionato di una miscela di inibitori della proteasi *Complete* 1X (Roche/Boehringer). Per favorirne la lisi, questi campioni così trattati sono stati incubati in ghiaccio per 30 minuti e successivamente sottoposti a centrifugazione a 4°C e 13000 rpm per eliminare i detriti cellulari in sospensione. I lisati cellulari così ottenuti sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide e successivo protocollo di Western Blotting (paragrafi 5.16 e 5.17).

5.16 Elettroforesi di proteine (SDS-PAGE)

Il contenuto proteico presente nei lisati cellulari (paragrafo 5.15) e nei campioni di VLP ottenuti dopo purificazione (paragrafo 5.14) sono stati analizzati mediante migrazione elettroforetica in gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti e successivo Western Blotting (paragrafo 5.17).

I campioni sono stati addizionati del tampone *Laemmli* 2X (Tris-HCl 100 mM pH 6.8 SDS 4% (p/v), glicerolo 20% (p/v), blu di bromofenolo 0.2% (p/v), DTT 200 mM, β-mercaptoetanol 5%) e incubati a 100°C prima di essere caricati in gel di poliacrilammide. In parallelo, è stato utilizzato un marcatore di peso molecolare *Page Ruler Prestained Protein Ladder* (Fermentas). Per l'analisi elettroforetica della proteina, sono stati preparati gel di acrilammide *Protean* dello spessore di 1 mm oppure minigel dello spessore di 1.5 mm, preparati come da ricetta:

- 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) (Bio-Rad); 20 µl di N,N,N,N',N'-tetrametiletilenediammina; TEMED (Bio-Rad); 80 µl di ammonio persolfato (APS) 10% (p/v) (Bio-Rad) e portato al volume finale di 16 ml con acqua deionizzata.
- Gel di separazione al 10% (o al 12%) (p/v) di acrilamide, 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) (Bio-Rad); 500 µl di SDS 10% (p/v) (Bio-Rad); 40 µl di TEMED (Bio-Rad); 200 µl di ammonio persolfato

(APS) 10% (p/v) (Bio-Rad) e portato al volume finale di 50 ml con acqua deionizzata.

La migrazione elettroforetica è stata effettuata con un'intensità di corrente costante (80V per circa 12 ore, nel caso dei gel delle dimensioni di 200 x 200 mm; 100V per 2 ore, nel caso di minigel) nel tampone di corsa: Tris 0.25 M (Bio-Rad), glicina 1.9 M (Bio-Rad), SDS 0.1% (p/v) (Bio-Rad) pH 9.2.

5.17 Western Blotting

Dopo la separazione in gel di poliacrilammide, le proteine separate sono state trasferite elettricamente su una membrana di nitrocellulosa (*Hybond-C*, Amersham LIFE SCIENCE), precedentemente idratata in acqua deionizzata ed equilibrata insieme al gel per 30 minuti nell'appropriato tampone di trasferimento [Tris 0,25 M (Bio-Rad), glicina 1.9 M (Bio-Rad), metanolo 20% (v/v)]. Il trasferimento è stato effettuato a 50 V per 2 ore a temperatura ambiente. Successivamente, allo scopo di saturare i siti di legame aspecifici, la membrana è stata incubata in agitazione a temperatura ambiente per 45 minuti con una soluzione bloccante costituita da latte scremato in polvere al 5% (p/v) (Bio-Rad), 0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma) e PBS 1X. A seguire, la membrana è stata immersa in una soluzione contenente l'anticorpo primario specifico per le proteine oggetto di analisi ed incubata in agitazione a 4°C tutta la notte. In tabella 5.4, sono riportati gli anticorpi impiegati e le modalità di utilizzo con cui sono stati utilizzati.

Anticorpo primario	Diluizione di utilizzo	Soluzione di saturazione
Monoclonale di topo anti-p24Gag (FIV) (AbD Serotec)	1:1000	latte scremato 1 % (p/v)
Monoclonale di topo anti-Flag (Sigma)	1:1000	latte scremato 5 % (p/v)

Tabella 5.4: Anticorpi primari utilizzati e loro principali caratteristiche.

Dopo trattamento con l'anticorpo primario, la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi in PBS-T (PBS 1X e 0.1% (v/v) di Tween 20) e successivamente incubata per 1 ora con l'anticorpo secondario anti-IgG antitopo, coniugato all'enzima perossidasi di rafano HRP (*horseradish peroxidase*) (Amersham Pharmacia iotech). Per entrambi gli anticorpi primari anti-p24Gag di FIV e anti-Flag, è stata utilizzata una stessa diluizione di anticorpo secondario (1:1000) con una diversa concentrazione in soluzione del latte scremato in polvere al 1% (p/v) o al 5%

(p/v), rispettivamente. Dopo 3 ulteriori lavaggi con PBS-T, la membrana è stata lavata per un'ultima volta solamente in PBS 1X e quindi si è proceduto ad un'incubazione per 2 minuti con una soluzione di sviluppo contenente il substrato per la reazione di chemiluminescenza (*ECL Plus Western Blotting Detection system*, Amersham Bioscience). Le lastre fotografiche (*Biomax light film*, Kodak) sono state impressionate mediante loro sovrapposizione alla membrana. Le esposizioni sono state effettuate con un tempo variabile tra 30 secondi e 10 minuti e successivamente sviluppate.

5.18 Modello murino e protocollo di vaccinazione

Per gli esperimenti in vivo, sono stati utilizzati topi maschi *inbred* BALB/c (Harlan) di età variabile tra le 6-8 settimane. Gli animali sono stati allevati in apposite gabbie di plastica in condizioni di temperatura e umidità controllate e suddivisi in 5 topi per ogni gabbia. Il cibo e l'acqua sono stati forniti *ad libitum*. Gli esperimenti sono stati condotti seguendo i protocolli approvati dal Comitato Etico di Ateneo per la Sperimentazione Animale (CEASA) dell'Università di Padova e in accordo con le linee guida europee per la manipolazione degli animali da esperimento. Le VLP di influenza sono state purificate mediante ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio e quindi quantificate mediante la stima dell'assorbimento proteico a 280 nm (A280) utilizzando lo spettrofotometro ND-1000 NanoDrop (Nanodrop, Wilmington, DE). Quindi, ogni preparazione è stata diluita alla concentrazione finale di 1µg/µl in PBS, pH 7.4. Ad ogni topo sono stati somministrati per via intranasale 10µg della corrispondente VLP addizionata della medesima quantità di subunità B della tossina colerica (Sigma Aldrich) in PBS sterile al giorno 0. A distanza di 21 giorni, i topi sono stati somministrati con la stessa dose per rafforzare la risposta immunitaria. Inoltre, un gruppo di topi BALB/c ha ricevuto un egual volume di PBS al posto delle VLP. I topi sono stati divisi in quattro gruppi differenti, come descritto a seguire:

- Gruppo1 (n=4): somministrato PBS;
- Gruppo2 (n=6): topi immunizzati con VLP costituite dalla proteina M2 (10µg/dose);
- Gruppo3 (n=6): topi immunizzati con VLP costituite dalla proteina M2-M1 (10µg/dose);
- Gruppo4 (n=6): topi immunizzati con VLP costituite dalla proteina Myr-M1-CHMP4B (10µg/dose).

Gli animali sono stati sacrificati a 21, 25 e 26 giorni dalla seconda immunizzazione, ne sono state isolate le milze ed è stato raccolto il sangue per le successive analisi.

5.19 Purificazione della proteina M1 mediante immunoprecipitazione

Per purificare la proteina M1, è stato applicato un protocollo che prevede l'impiego di una resina legata covalentemente all'anticorpo monoclonale murino Flag (IgG1), che permette di isolare proteine contenenti l'epitopo Flag da lisati cellulari. Il giorno precedente la trasfezione, cellule 293T sono state seminate in due fiasche di superficie di 75 cm²(T75) ad una densità di 4,5x10⁶ cellule per ogni fiasca. Passate 24 ore, ogni fiasca è stata trasfettata con 24 µg del costrutto pcDNA3.1(+)-M1-Flag utilizzando complessi liposomici cationici (Lipofectamine 2000™, Invitrogen). Dopo 48 ore, le cellule sono state raccolte e lisate con buffer specifico (50 mM Tris HCl, pH 7.4, with 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, and 1% TRITON®X-100). La proteina M1 è stata isolata dal lisato cellulare mediante legame con la resina *anti-FLAG M2 affinity gel* (Sigma Aldrich), precedentemente attivata con l'utilizzo di una soluzione 0.1 M glicina-HCl, pH 3.5. Dopo alcuni lavaggi con PBS e TBS (50 mM Tris-HCl, with 150 mM NaCl, pH 7.4), la proteina M1 è stata eluita per competizione con un peptide sintetico (N-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-C, Sigma Aldrich) costituito dall'epitopo Flag. La concentrazione della proteina M1 purificata è stata quantificata mediante calcolo del rapporto tra l'assorbanza rilevata a 280 nm utilizzando lo spettrofotometro UV-Visibile Cary 50 Scan (VarianInc.) contro il coefficiente di assorbanza specifico della stessa M1 (ε mg/ml).

5.20 Valutazione della risposta immunitaria umorale

Per rilevare la presenza di anticorpi specifici diretti contro le VLP utilizzate nel protocollo di vaccinazione, è stato realizzato un saggio immuno-enzimatico specifico, denominato ELISA (*enzyme-linked immuno sorbent assay*) sui sieri dei campioni di sangue raccolti. I pozzetti di micropiastre da 96 (*Corning® 96 Well EIA/RIA Microplates*, Corning Life Science) sono stati incubati con una soluzione 20µg/ml della proteina M1 purificata in buffer carbonato (100mM Carbonato/Bicarbonato, pH 9.6) per 16 ore a 4°C. Il giorno successivo, per saturare i siti aspecifici, i pozzetti sono stati incubati con una soluzione costituita da albumina di siero bovino (BSA) 2% (p/v) (Sigma Aldrich) e Tween 20 0,05%

(Sigma Aldrich) in PBS. Quindi, sono stati incubati con diluizioni dei sieri raccolti (diluizione 1:100). Successivamente, le piastre sono state sottoposte ad alcuni lavaggi con PBS-T (PBS 1X e Tween 20 0,05%) e nuovamente incubate con l'anticorpo anti-IgG di topo, coniugato con l'enzima perossidasi di rafano (Amersham Pharmacia Biotech), diluito 1:5000 in BSA 2% e Tween 20 0,05%. Infine, le piastre sono state nuovamente lavate con PBS-T per rimuovere l'anticorpo non legato e poi immerse in una soluzione utilizzata per la reazione colorimetrica utilizzando il substrato TMB (*TMB Substrate Kit For Peroxidase, Vector Laboratories*). La reazione è stata fermata mediante l'aggiunta di 100 µl di acido cloridrico (HCl) al 5% ed è stata rilevata la densità ottica a 450 nm tramite l'impiego di un lettore specifico per piastre (*ELISA plate reader*).

5.21 Analisi della proliferazione dei linfociti T

Le milze isolate dagli animali sacrificati sono state omogeneizzate tramite frizionamento del tessuto sulla trama metallica di un colino (80µm). Dalla sospensione ottenuta, sono state purificate le cellule mononucleate mediante centrifugazione su gradiente Ficoll. Le cellule sono state risospese in PBS sterile caldo e incubate per 10 minuti al buio con la sonda fluorescente CFSE [5,6-carboxylfluoresceindiacetatesuccinilester] (CellTrace™ CFSE cell Proliferation Kit, Invitrogen), addizionata alla concentrazione finale di 15µM. Le cellule marcate sono state lavate due volte con il terreno di coltura RPMI addizionato al 10% di siero fetale bovino (FBS). Successivamente, le cellule sono state seminate ad una densità di 10⁶ cellule/ml in una piastra da 24 pozzetti (MULTIWELL™24 well, Falcon) e sono stati aggiunti 3µg/ml delle specifiche VLP utilizzati nel protocollo di immunizzazione. In parallelo, è stata valutata la proliferazione delle cellule isolate mediante stimolazione mitogena con l'aggiunta di 5µg/well di PHA. Inoltre, al fine di ottimizzare il protocollo con l'aggiunta di un controllo interno per la sonda CFSE, è stata addizionata la citocalasina B alla concentrazione finale di 10µg/ml nel terreno di coltura di una serie di campioni. Infine, le cellule incubate solamente in RPMI con 10% di FBS sono state utilizzate come controlli negativi di tutta la procedura. Dopo 4 giorni di incubazione, le cellule sono state raccolte, lavate con 0,2% BSA in PBS freddo e marcate con un anticorpo coniugato al fluoroforo TRITC e diretto contro i linfociti T-CD3 (anti-CD3- TRITC, ImmunoTool) diluito 1:1000. Quindi, le cellule sono state analizzate mediante la citofluometria a flusso sfruttando l'attivazione del fluoroforo (FACSCalibur, BD Biosciences). Per ogni campione sono stati registrati

dieci mila eventi e i risultati ottenuti sono stati esaminati utilizzando il programma WinMDI 2.9 (Windows Multiple Document Interface per citofluorimetria).

6. RISULTATI

Premessa

Il virus dell'influenza rappresenta a tutt'oggi un rilevante problema di sanità pubblica a livello mondiale, in quanto responsabile di epidemie annuali e occasionalmente pandemie. L'elevata variabilità a cui il virus è soggetto è associata a fenomeni di *antigenic drift* e *antigenic shift*, che determinano la costante comparsa di nuove varianti antigeniche. La frequente insorgenza di farmaco-resistenze e i problemi nell'ottenimento delle preparazioni vaccinali incentivano lo studio e lo sviluppo di nuovi approcci da utilizzare nella terapia e nella profilassi.

Il lavoro svolto in questa tesi di dottorato si è incentrato sull'analisi dei fattori virali coinvolti nella fuoriuscita del virus dalla cellula infettata, allo scopo di porre le basi per la messa a punto di una strategia vaccinale efficiente basata sulla produzione di particelle simil-virali (VLP, *Virus Like Particles*). In questo contesto, è noto come la proteina di matrice M1 rappresenti il principale determinante virale nell'ambito del processo di gemmazione. Recentemente, è stato dimostrato che l'espressione di M1 in assenza di altri fattori virali non porta al rilascio di particelle simil-virali nel mezzo di coltura, per lo meno in cellule di mammifero. Tale particolarità rende M1 differente rispetto ad altre proteine strutturali, quali Gag dei retrovirus e L1 di HPV, che hanno la capacità di gemmare dalle cellule in assenza di altre componenti virali. Una delle ragioni alla base di questa caratteristica di M1 risiede nella mancanza di un segnale di indirizzamento alla membrana cellulare (Wang *et al.*, 2010a), paragonabile, ad esempio, al segnale di miristilazione presente nella proteina Gag dei retrovirus.

Inoltre, è stato recentemente dimostrato come M2, altro componente essenziale delle particelle influenzali infettive, svolga un ruolo importante nelle fasi finali della gemmazione dei virus influenzali. In particolare, Rossmann e colleghi hanno riportato diverse evidenze che avvalorano l'importanza di M2 e della sua elica anfipatica nella scissione dell'*envelope* virale dalla membrana plasmatica. M2 quindi compie le stesse funzioni che svolgono le proteine cellulari del complesso degli ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-III nella gemmazione di numerosi virus dotati di *envelope* (Rossmann *et al.*, 2010; Watanabe and Lamb, 2010). In conclusione, M1 mancherebbe di due funzioni fondamentali: la capacità di contattare la membrana plasmatica e la capacità di interagire con le proteine ESCRT-III per poter generare da sola VLP.

Alla luce di tutte queste evidenze, abbiamo ottenuto una serie di chimere virali ingegnerizzando la proteina M1 con il fine ultimo di renderla indipendente da M2 e capace di guidare il rilascio di particelle simil-virali dalle cellule.

6.1 Analisi degli effetti dell'inserimento di *L-domain* o di proteine facenti parte del complesso ESCRT e della miristilazione nella proteina M1 nelle *Virus-Like Particles* (VLP)

E' noto come molti virus dotati di *envelope* sfruttino l'interazione tra specifiche proteine cellulari coinvolte nella biogenesi dei *Multivescicular Bodies* (MVB) e particolari motivi amminoacidici presenti a livello delle loro proteine strutturali, detti domini tardivi (o *L-domain* o *Late Domain*), per eseguire efficientemente il processo di gemmazione (Calistri *et al.*, 2009b). Nello specifico, sono stati identificati tre diversi *Late Domain* e i loro partner di legame all'interno del *pathway* di biogenesi dei MVB: i) il motivo PPxY che recluta le ubiquitino-ligasi della famiglia Nedd4-like; ii) il motivo P(T/S)AP che interagisce con la proteina *tumor suppressor gene 101* (Tsg101) ed iii) il motivo YPX_nL che contatta la proteina AIP1/Alix (Calistri *et al.*, 2009b). Inoltre, è stato dimostrato che tali domini possono essere trasferiti in diverse posizioni della medesima proteina o da un virus ad un altro senza perdere la loro funzionalità. La sostituzione e/o l'introduzione di specifici *L-domain* di un virus con quelli di un altro virus sono in grado di influenzare l'efficienza di gemmazione del virus ricevente, attribuendo peculiari capacità di gemmazione. Partendo da queste evidenze, e considerando quanto noto nel caso del virus dell'influenza, con l'obiettivo di ottenere VLP basate sull'espressione della sola proteina M1 in cellule di mammifero, sono stati ottenuti diversi costrutti esprimenti la proteina M1 del virus dell'influenza A/WSN/33 (H1N1) fusa rispettivamente a: i) *L-domain* presenti nel Gag di di HIV-1 (PTAP), del virus dell'Anemia Infettiva Equina (YPDL), nella proteina di matrice del virus di Ebola (PTAPPEY); ii) il segnale di miristilazione del Gag di HIV-1; iii) proteine appartenenti al complesso ESCRT-III (CHMP3, CHMP4B). Queste fusioni sono state generate singolarmente o in diverse combinazioni, come illustrato in Figura 6.1.

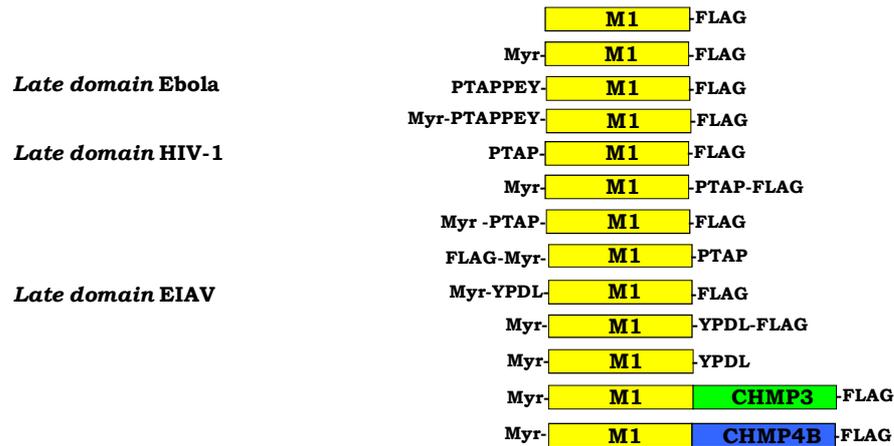


Figura 6.1: Schema rappresentativo dei costrutti basati su M1. I costrutti esprimono M1 (giallo) fusa al segnale di miristilazione del Gag di HIV-1 (Myr) e/o i) con i *L-domain* PTAP (HIV), YPDL (EIAV) o PTAPPEY (Ebola) o ii) con le proteine CHMP3 (verde)/CHMP4B (blu). L'epitopo Flag è stato aggiunto alla regione ammino o al carbossi-terminale di tutti i costrutti.

Con la finalità di fornire ad M1 tutti gli elementi necessari per il rilascio di particelle simil-virali, abbiamo dapprima concentrato la nostra attenzione sui costrutti contenenti i domini necessari al reclutamento di Tsg101 (PTAP) o AIP1/ALIX (YPDL) e dotati, inoltre, del segnale di miristilazione (Myr) del Gag di HIV-1 per l'indirizzamento alla membrana. I DNA ricombinanti relativi ai costrutti pcDNA3.1(+)-M1-Flag (M1-Flag), pcDNA3.1(+)-MyrM1YPDL-Flag (MyrM1YPDL-Flag), pcDNA3.1(+)-MyrYPDLM1-Flag (MyrYPDLM1-Flag), pcDNA3.1(+)-FLAG-MyrM1YPDL (Flag-MyrM1YPDL), pcDNA3.1(+)-MyrM1PTAP-Flag (MyrM1PTAP-Flag), pcDNA3.1(+)-MyrPTAPM1-Flag (MyrPTAPM1-Flag) e pcDNA3.1(+)-FLAG-MyrM1PTAP (Flag-MyrM1PTAP) sono stati trasfettati in cellule embrionali di rene umano 293T. Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte per l'estrazione delle proteine. I surnatanti di trasfezione sono stati purificati su di un opportuno cuscino di saccarosio e, in seguito, lisati. I campioni così ottenuti, lisati cellulari e surnatanti, sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide e successivo Western Blotting specifico per l'epitopo Flag.

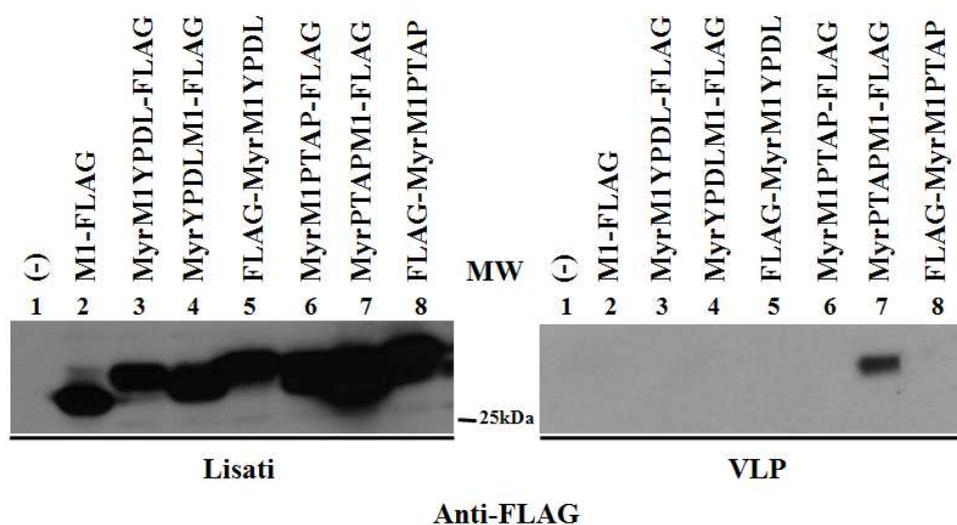


Figura 6.2: Cellule 293T sono state trasfettate con pcDNA3.1(+)*M1-Flag* (*M1-Flag*, corsia 2); pcDNA3.1(+)*MyrM1YPDL-Flag* (*MyrM1YPDL-Flag*, corsia 3); pcDNA3.1(+)*MyrYPDLM1-Flag* (*MyrYPDLM1-Flag*, corsia 4); pcDNA3.1(+)*FLAG-MyrM1YPDL* (*Flag-MyrM1YPDL*, corsia 5); pcDNA3.1(+)*MyrM1PTAP-Flag* (*MyrM1PTAP-Flag*), corsia 6; pcDNA3.1(+)*MyrPTAPM1-Flag* (*MyrPTAPM1-Flag*, corsia 7), oppure con pcDNA3.1(+)*FLAG-MyrM1PTAP* (*Flag-MyrM1PTAP*, corsia 8). Controllo negativo (-). Dopo 48 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (*Lisati*) e le particelle simil-virali (*VLP*) sono state analizzate con Western Blotting utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo *Flag*. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come è possibile osservare dalla figura 6.2, tutti i costrutti sono espressi correttamente a livello intracellulare, ma solamente *MyrPTAPM1-Flag* porta al rilascio di *VLP* (Figura 2, corsia 7/*VLP*). È stato ampiamente riportato in letteratura che il *Late Domain* *PTAPPEY*, identificato nella proteina di matrice del virus Ebola, risulti essere il più efficiente nel mediare il rilascio di *VLP*. Avvalendoci di queste evidenze, abbiamo generato quindi dei costrutti esperimenti la proteina *M1* a cui è stato aggiunto il dominio *PTAPPEY* in presenza/assenza del segnale di miristilazione del *Gag* di HIV-1. Al fine di valutare se tale *Late Domain* risulti essere efficace nell'indurre un maggior rilascio di *VLP*, cellule 293T sono state trasfettate con i costrutti pcDNA3.1(+)*M1-Flag* (*M1*), pcDNA3.1(+)*PTAPM1-Flag* (*PTAP-M1*), pcDNA3.1(+)*PTAPPEYM1-Flag* (*PTAPPEYM1*), pcDNA3.1(+)*MyrPTAPPEYM1-Flag* (*MyrPTAPPEYM1*). Dopo 48 ore dalla trasfezione, i campioni proteici ottenuti sono stati sottoposti a corsa elettroforetica e ad analisi con Western Blotting mediante l'utilizzo dell'anticorpo diretto contro l'epitopo *Flag* per la visualizzazione delle proteine contenenti questa corta sequenza amminoacidica.

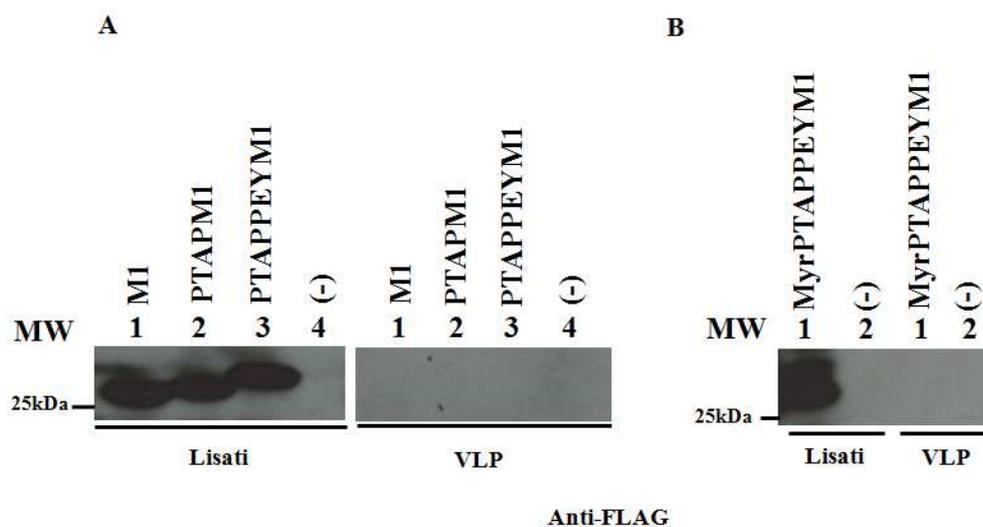


Figura 6.3: **A)** Cellule 293T sono state trasfettate con pcDNA3.1(+)*M1-Flag* (M1, corsia 1); pcDNA3.1(+)*PTAPM1-Flag* (PTAPM1, corsia 2); pcDNA3.1(+)*PTAPPEYM1-Flag* (PTAPPEYM1, corsia 3). Controllo negativo (-). **B)** Western Blotting dei lisati cellulari e dei surnatanti (VLP) derivati da cellule 293T trasfettate con il plasmide pcDNA3.1(+)*MyrPTAPPEYM1-Flag* (MyrPTAPPEYM1). Controllo negativo (-). Dopo 48 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate con Western Blotting utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Dalla figura 6.3, si può evincere come nessuno dei due costrutti caratterizzati dall'inserimento del *Late Domain* PTAPPEY determini il rilascio di VLP in presenza o assenza del segnale di miristilazione (Figura 6.3, pannello A, corsia 3/VLP; pannello B corsia 1/VLP), sebbene i costrutti risultino espressi nelle cellule (Figura 6.3, pannello A, corsia 3/Lisati; pannello B, corsia 1/lisati).

Un altro risultato interessante di questo esperimento è fornito dal costrutto PTAPM1 che, pur espresso a livello intracellulare (Figura 6.3, pannello A, corsia 2/Lisati), non media il rilascio di particelle simil-virali, avvalorando l'importanza del segnale di indirizzamento alla membrana per M1 (Figura 6.2, corsia 7/VLP).

Nel complesso, i risultati ottenuti ci permettono di trarre le seguenti importanti conclusioni: 1) il segnale di miristilazione è necessario ma non sufficiente per la gemmazione di M1 (si vedano i risultati ottenuti con il costrutto MyrYPDLM1) e deve essere posizionato nella regione N-terminale della proteina, dove risulta essere pienamente accessibile (si veda il risultato ottenuto con il costrutto FlagMyrPTAPM1, dove il segnale di miristilazione si trova posizionato dopo l'epitopo Flag); 2) il motivo PTAP è necessario ma non sufficiente per conferire ad M1 la capacità di gemmare, mentre sia i motivi YPDL, sia il motivo

PTAPPEY, non sembrano essere altrettanto efficaci. Questo risultato non è del tutto sorprendente, in quanto il costrutto MyrPTAPM1 caratterizzato dalla presenza del dominio tardivo PTAP, come detto, media il reclutamento della proteina *Tumor suppressor gene 101* (Tsg101). Infatti, Tsg101 è noto essere, tra tutte le proteine appartenenti al *pathway* di biogenesi dei MVB, quella più efficace nel mediare l'interazione tra le proteine strutturali virali e il complesso ESCRT-III, essenziale nella formazione e gemmazione di vescicole. Questo è soprattutto vero quando il PS/TAP è posizionato in proteine virali strutturali eterologhe (Strack *et al.*, 2000). Nonostante il motivo PTAPPEY contenga il dominio di legame per Tsg101, dati di letteratura dimostrano che provare l'interazione tra la proteina di matrice di Ebola e questa proteina cellulare risulta molto complesso (Liu *and* Harty, 2010). Quindi, i nostri risultati ci permettono di concludere che l'opportuno inserimento del motivo PTAP e del segnale di mistilazione del Gag di HIV-1 sono sufficienti a conferire alla proteina virale M1 la capacità di gemmazione, proprio come avviene nel caso del Gag di HIV-1.

Come precedentemente anticipato, tra i quattro complessi proteici ESCRT coinvolti nella formazione dei MVB è il complesso ESCRT-III, quello fondamentale per la fase di formazione e gemmazione delle vescicole e, nel contesto della fuoriuscita dei virus dalle cellule infettate, il suo reclutamento è la fase essenziale del processo (Morita, 2012). Ovvero, l'interazione con Tsg101, AIP1/Alix o con le ubiquitino-ligasi della famiglia Nedd-4 serve unicamente a contattare il complesso ESCRT-III, che deve essere funzionale per mediare la gemmazione dei virus. Ciò spiega il motivo per cui tutti i virus dipendenti dagli ESCRT siano sensibili all'espressione della versione dominante negativa dell'ATPasi Vps4 (Calistri *et al.*, 2009b).

A supporto delle nostre conclusioni e di quanto descritto in letteratura, abbiamo quindi deciso di valutare l'effetto della fusione alla porzione carbossi-terminale di M1 di proteine appartenenti al complesso ESCRT-III. In particolare, abbiamo selezionato CHMP3 e CHMP4B, essendo queste due proteine fondamentali per la funzione dell'intero complesso (Lata *et al.*, 2009). In questi costrutti abbiamo inserito inoltre nella regione ammino-terminale il segnale di miristilazione del Gag di HIV-1. I costrutti pcDNA3.1(+)*MyrM1CHMP4B-Flag* (*MyrM1CHMP4B*) e pcDNA3.1(+)*MyrM1CHMP3-Flag* (*MyrM1CHMP3*) sono stati quindi trasfettati in cellule 293T. Dopo 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte per l'estrazione delle proteine. I surnatanti sono stati, invece, purificati su di un opportuno cuscino di saccarosio e, in seguito, lisati. I campioni così ottenuti, lisati

cellulari e surnatanti, sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide e successivo Western Blotting contro specifico per l'epitopo Flag.

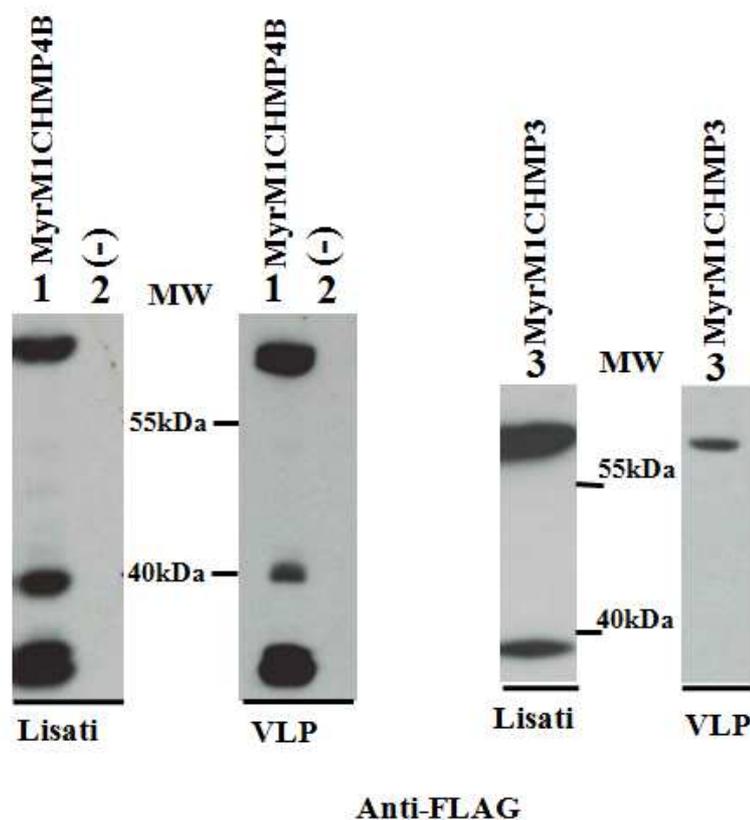


Figura 6.4: Cellule 293T sono state trasfettate con pcDNA3.1(+)*MyrM1CHMP4B-Flag* (*MyrM1CHMP4B*, corsia 1); pcDNA3.1(+)*MyrM1CHMP3-Flag* (*MyrM1CHMP3*, corsia 3). Controllo negativo (-). Dopo 48 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate con Western Blotting utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come si evince dalla figura 6.4, entrambi i costrutti sono in grado di portare alla gemmazione di VLP nel surnatante. In particolare, le VLP ottenute dal costrutto *MyrM1CHMP4B* sembrano essere prodotte con una maggior efficienza. Questi risultati supportano l'ipotesi dell'importanza del complesso ESCRT-III per la gemmazione virale.

6.1.2 Mutagenesi del segnale di miristilazione del costrutto *MyrM1CHMP4B*

In letteratura è noto come diverse mutazioni a carico del segnale di miristilazione della proteina matrice (MA) di HIV-1 influiscano sul processamento dei

precursori della poliproteina Gag (Pr160^{GAG-POL} and Pr55^{GAG}) e sul rilascio delle particelle virali (Freed *et al.*, 1994; Ono *and* Freed, 1999).

Al fine di valutare l'importanza del segnale di miristilazione nel contesto della produzione di VLP basate su M1 di influenza, abbiamo concentrato la nostra attenzione sul costrutto più efficiente, tra quelli da noi generati: MyrM1CHMP4B. Abbiamo quindi mutagenizzato la glicina amino-terminale del segnale di miristilazione in alanina (Figura 6.5). Infatti, questa stessa mutazione nel contesto della matrice di HIV-1 è in grado di prevenire la miristilazione ed il trasporto della poliproteina Gag, determinando quindi un assemblaggio difettivo delle particelle (Freed *et al.*, 1994).

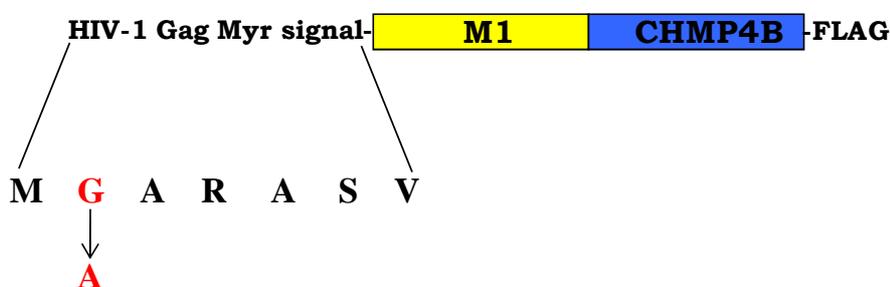


Figura 6.5: Schema della mutazione inserita a carico della prima glicina (G) del segnale di miristilazione del costrutto MyrM1CHMP4B. Evidenziato in rosso il residuo amminoacidico sostituito.

Inoltre, abbiamo generato un costrutto privo del segnale di miristilazione M1CHMP4. I diversi costrutti pcDNA3.1(+)M1-Flag (M1), pcDNA3.1(+)MyrM1-Flag (MyrM1), pBJ5CHMP4B-Flag (CHMP4B), pcDNA3.1(+)M1CHMP4B-Flag (M1CHMP4B), pcDNA3.1(+)MyrM1CHMP4B-Flag (MyrM1CHMP4B) e pcDNA3.1(+)MutMyrM1CHMP4B-Flag (MutMyrM1CHMP4B) sono stati trasfettati in cellule 293T e in cellule fibroblastoidi renali di scimmia COS-7, che sono ugualmente ampiamente utilizzate per lo studio e la produzione di VLP retrovirali. L'utilizzo di due linee cellulari di origine diversa è stato deciso per valutare eventuali fenomeni cellulo/specie-specifici. Dopo 48 ore dalla trasfezione, i campioni proteici ottenuti, lisati e surnatanti, sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide e successivo Western Blotting specifico per l'epitopo Flag.

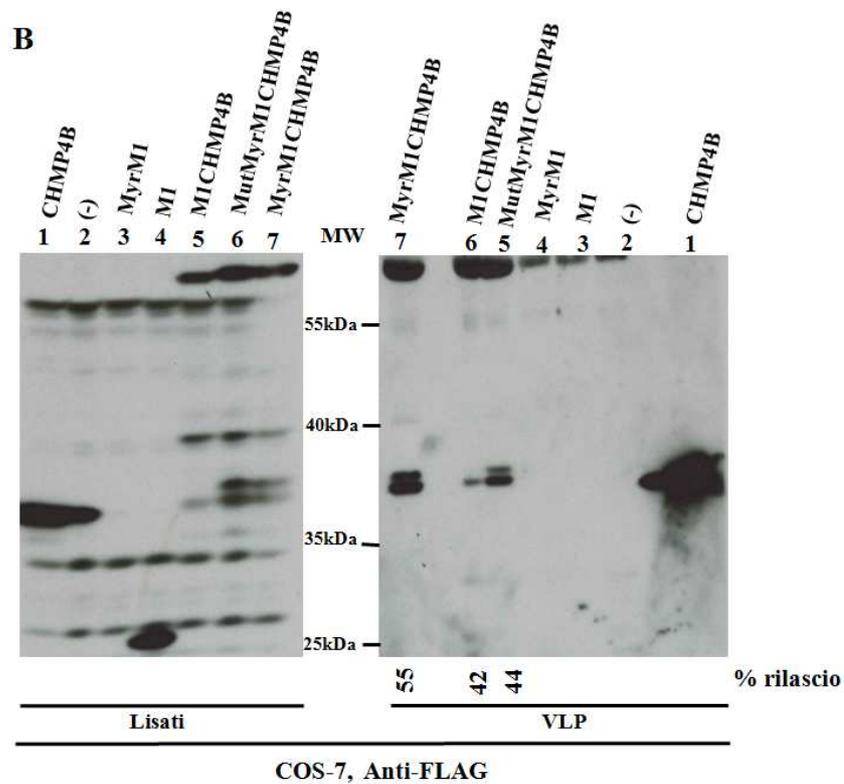
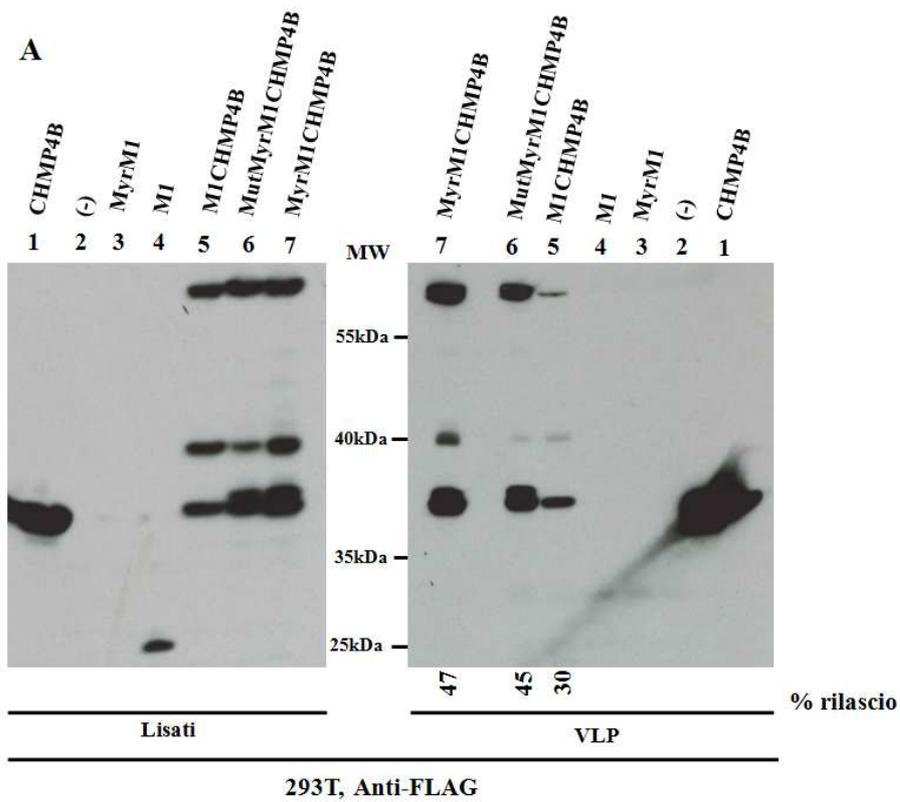


Figura 6.6: A) Cellule 293T sono state trasfettate con pBJ5CHMP4B-Flag (CHMP4B, corsia 1); pcDNA3.1(+)*MyrM1*-Flag (*MyrM1*, corsia 3); pcDNA3.1(+)*M1*-Flag (*M1*, corsia 4),

pcDNA3.1(+)M1-Flag (M1, corsia 4), pcDNA3.1(+)M1CHMP4B-Flag (M1CHMP4B, corsia 5), pcDNA3.1(+)MutMyrM1CHMP4B-Flag (MutMyrM1CHMP4B, corsia 6), pcDNA3.1(+)MyrM1CHMP4B-Flag (MyrM1CHMP4B, corsia 7). Controllo negativo (-). **B**) Cellule COS-7 sono state trasfettate con pBJ5CHMP4B-Flag (CHMP4B, corsia 1); pcDNA3.1(+)MyrM1-Flag (MyrM1, corsia 3); pcDNA3.1(+)M1-Flag (M1, corsia 4), pcDNA3.1(+)M1CHMP4B-Flag (M1CHMP4B, corsia 5), pcDNA3.1(+)MutMyrM1CHMP4B-Flag (MutMyrM1CHMP4B, corsia 6), pcDNA3.1(+)MyrM1CHMP4B-Flag (MyrM1CHMP4B, corsia 7). Controllo negativo (-). Dopo 48 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate con Western Blotting utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come è possibile osservare in figura 6.6, il costrutto esprimente la mutazione (MutMyrM1CHMP4B) risulta funzionale, in quanto porta al rilascio di VLP in entrambe le linee cellulari (Figura 6.6, pannello A, corsia 6/VLP; pannello B, corsia 5/VLP). È possibile affermare quindi che tale mutazione a livello del segnale di miristilazione non blocca la produzione di particelle simil-virali basate su MyrM1CHMP4B. Inoltre, mentre il costrutto MyrM1 non è rilevabile dall'analisi in Western Blotting (Figura 6.6, pannello A, corsia 3/Lisati; pannello B, corsia 3/Lisati), il resto dei costrutti risultano espressi sia nelle cellule 293T che nelle cellule COS-7. I risultati in figura 6 avvalorano ulteriormente l'evidenza sperimentale secondo cui la sola espressione della proteina M1 non determina il rilascio di VLP (Figura 6.6, pannello A, corsia 4/VLP; pannello B, corsia 3/VLP). D'altra parte è interessante notare come la fusione ottenuta tra M1 e la proteina CHMP4B, in assenza del segnale di miristilazione, porti comunque al rilascio di particelle simil-virali (Figura 6.6, pannello A, corsia 5/VLP; pannello B, corsia 6/VLP). Ciò non risulta sorprendente, considerando che l'espressione della proteina CHMP4B da sola permette la produzione di VLP (Figura 6.6, pannello A, corsia 1/VLP; pannello B, corsia 1/VLP). Inoltre, le VLP costituite da MyrM1CHMP4B vengono rilasciate in maniera più efficiente (Figura 6.6, parte bassa, corsia 7/VLP) rispetto a quelle prodotte dagli altri costrutti e tale evidenza è supportata dalle percentuali di rilascio riportate in figura 6.6. Infine, i risultati ottenuti sono confermati in entrambe le linee cellulari, sebbene il livello di espressione nelle cellule COS-7 risulti inferiore rispetto a quello nelle cellule 293T.

6.2 Ruolo di M2 nel contesto della produzione di VLP basate sulla proteina M1

Nel complesso, i dati ottenuti supportano quanto riportato recentemente in letteratura, ovvero che il ruolo di M2 sarebbe quello di sostituire il reclutamento del complesso cellulare ESCRT-III nelle fasi finali della gemmazione del virus dell'influenza (Rossman *et al.*, 2010). Al fine di chiarire ulteriormente questo aspetto e nell'ottica di ottimizzare la produzione di VLP basate sull'espressione della sola M1, abbiamo focalizzato la nostra attenzione sulla proteina di matrice M2. Diversi studi hanno dimostrato come la coda citoplasmatica di M2 sia necessaria per l'interazione con M1 e influenzi l'assemblaggio del virus nel sito in cui avviene la gemmazione virale (Chen *et al.*, 2008). L'analisi della sequenza di questa regione di M2 ha evidenziato la presenza di un'elica anfipatica, che molte proteine, comprese quelle virali, sfruttano per modificare la curvatura della membrana (Rossmann *et al.*, 2010). Partendo dalle evidenze riportate in letteratura, abbiamo deciso di investigare se l'elica anfipatica di M2 sia sufficiente a mediare la gemmazione di M1. Con questo scopo, abbiamo creato diversi tipi di costrutti esprimendo la proteina M1 fusa nella regione carbossi-terminale all'elica anfipatica della proteina M2 del virus dell'influenza A/WSN/33 (H1N1), in presenza/assenza del segnale di miristilazione del Gag di HIV-1, inserito alla regione ammino-terminale di M1 (MyrM1-E.A.M2, M1-E.A.-M2). Inoltre, sono state generate due fusioni tra le sequenze codificanti di M1 e M2 (M1-M2, M2-M1) (Figura 6.7).

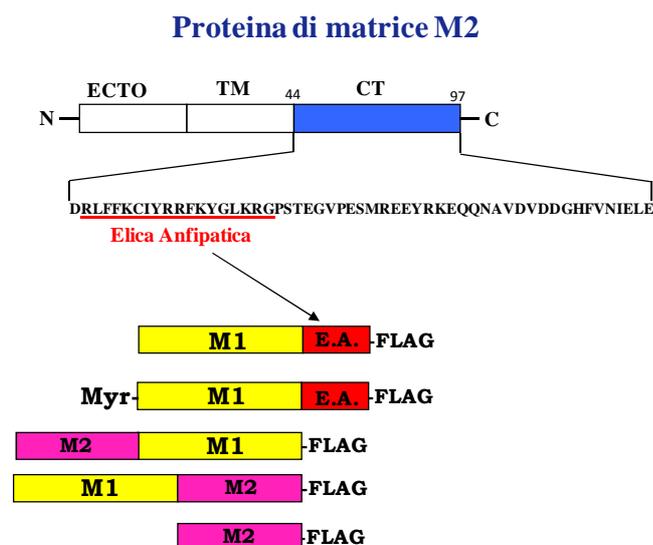


Figura 6.7: Schema rappresentativo dei costrutti basati su M1 e M2. In alto, raffigurazione della proteina M2 e della sua l'elica anfipatica (rossa) in dettaglio (modificato da Rossmann *et al.*, 2010). I costrutti esprimono M1 (giallo) fusa all'elica anfipatica (E.A.) di M2 (rosso) in

presenza/assenza del segnale di miristilazione del Gag di HIV-1 (Myr). È stata clonata anche l'intera sequenza codificante M2 (rosa). Sono state generate due proteine di fusione tra la proteina M1 e la proteina M2. L'epitopo Flag è stato aggiunto al carbossi-terminale di tutti i costrutti.

I costrutti generati [pcDNA3.1(+)M1-Flag (M1), pBJ5M2-Flag (M2), pcDNA3.1(+)M2-M1-Flag (M2-M1), pcDNA3.1(+)M1-M2-Flag (M1-M2), pcDNA3.1(+)M1-E.A.M2-Flag (M1-E.A.M2) e pcDNA3.1(+)Myr-M1-E.A.M2-Flag (Myr-M1-E.A.M2)] sono stati quindi trasfettati in cellule 293T. Inoltre, M1 e M2 sono state clonate in due diversi vettori d'espressione, rispettivamente pcDNA3.1(+) e pBJ5, ponendo le sequenze sotto il controllo di due differenti promotori. Quindi, i due costrutti pcDNA3.1(+)M1-Flag (M1) e pBJ5M2-Flag (M2) sono stati co-trasfettati in cellule 293T. A distanza di 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state raccolte per l'estrazione delle proteine. I surnatanti di trasfezione sono stati purificati su di un opportuno cuscino di saccarosio e, in seguito, lisati. I campioni così ottenuti, lisati cellulari e surnatanti, sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di poliaccrilammide e successivo Western Blotting specifico per l'epitopo Flag.

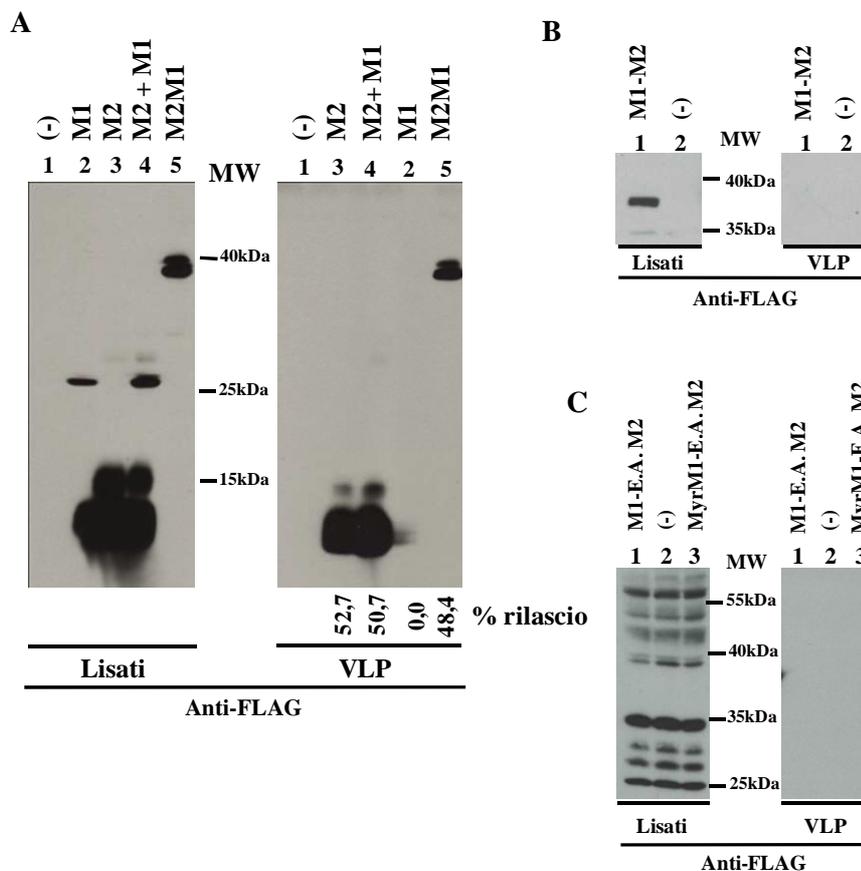


Figura 6.8: **A**) Cellule 293T sono state trasfettate con pcDNA3.1(+)M1-Flag (M1, corsia 2); pBJ5M2-Flag (M2, corsia 3), pcDNA3.1(+)M2-M1-Flag (M2-M1, corsia 5) e co-trasfettate con pcDNA3.1(+)M1-Flag (M1) e pBJ5M2-Flag (M2) (corsia 4). Controllo negativo (-). **B**) Cellule

293T sono state trasfettate con il plasmide pcDNA3.1(+)M1-M2-Flag (M-M2, corsia 1). Controllo negativo (-). C) Cellule 293T sono state trasfettate con pcDNA3.1(+)M1-E.A.M2-Flag (M1-E.A.M2, corsia 1), pcDNA3.1(+)MyrM1E.A.-Flag (MyrM1E.A.M2, corsia 3). Dopo 48 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate con Western Blotting utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Dalla figura 6.8, è possibile notare come i costrutti M2, M2-M1 e M1-M2 risultino espressi nelle cellule 293T (Figura 6.8, pannello A, corsie 3 e 5/Lisati, pannello B, corsia 1/Lisati). Al contrario, i due costrutti esprimenti M1 fusa all'elica anfipatica in presenza/assenza del segnale di miristilazione non sono stati rilevati a livello intracellulare con questo tipo di analisi (Figura 6.8, pannello C). Attualmente, stiamo verificando se la fusione dell'intera regione della coda citoplasmatica di M2 al carbossi-terminale di M1 in presenza/assenza del segnale di miristilazione possa migliorare la stabilità dei costrutti ottenuti. Inoltre, abbiamo dimostrato che la fusione M2M1 riesce a mediare la formazione di particelle simil-virali (Figura 6.8, pannello A, corsia 5/VLP), diversamente da quanto accade per la proteina di fusione M1M2 (Figura 6.8, pannello B, corsia 1/VLP). Questo indica che M2 deve trovarsi nella porzione amminotermine della proteina di fusione per poter svolgere la propria funzione. È possibile inoltre osservare che l'espressione di M2 da sola porta alla gemmazione di VLP con una buona efficienza (Figura 6.8, pannello A, corsie 3/VLP), in accordo con quanto riportato da Rossmann e colleghi (Rossmann *et al.*, 2010). E' quindi possibile concludere che M2 presenta entrambe le caratteristiche necessarie per la gemmazione: la capacità di contattare la membrana cellulare e la capacità di sostituire la funzione del complesso ESCRT-III.

Abbiamo quindi analizzato se l'espressione di M2 fosse in grado di promuovere la gemmazione di M1 quando espressa *in trans*. In nostri risultati, dimostrano che in tale contesto, M1 non viene rilasciata nel sovranatante, nonostante sia stato dimostrato che le due proteine interagiscono fisicamente (Wang *et al.*, 2010a) (Figura 6.8, pannello A, corsia 4/VLP). Quindi, mentre la fusione M2M1 è in grado di portare alla formazione di VLP, la co-espressione delle due proteine non porta alla gemmazione di M1 nel sovranatante delle cellule trasfettate. Ciò fa supporre che siano necessarie specifiche condizioni (ad esempio rapporti quantitativi ottimizzati tra le due proteine), non ottenute nel nostro contesto sperimentale, affinché queste possano interagire efficientemente e M2 possa conferire ad M1 le caratteristiche necessarie per fuoriuscire dalle cellule.

A ulteriore supporto di questa conclusione, quando il costrutto pBJ5M2-Flag (M2) è stato co-trasfettato in cellule 293T con il plasmide pcDNA3.1(+)-PTAPM1-Flag (PTAPM1) o al plasmide pcDNA3.1(+)-PTAPPEYM1-Flag (PTAPPEYM1), le uniche VLP ottenute dai surnatanti di trasfezione sono state quelle basate su M2 (Figura 6.9, corsie 2, 3, 4, 5/VLP). Questo risultato indica che, molto probabilmente, nelle condizioni testate, non avviene l'interazione fisica tra M1 e M2 che porta la prima a livello della membrana e quindi, costrutti privi del segnale di misirilazione non gemmano.

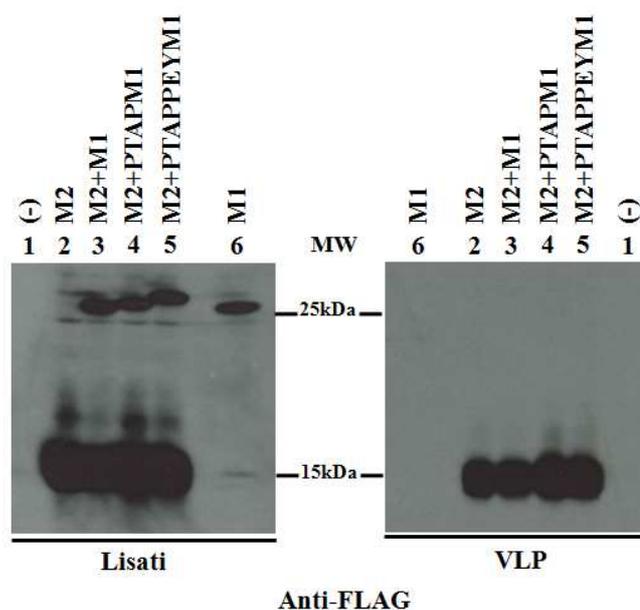


Figura 6.9: Cellule 293T sono state co-trasfettate con i costrutti pBJ5M2-Flag (M2) e pcDNA3.1(+)-M1-Flag (M1) singolarmente (corsie 2 e 6) o in combinazione (corsia 3). Inoltre, il costrutto pBJ5M2-Flag (M2) è stato co-trasfettato con il plasmide pcDNA3.1(+)-PTAPM1-Flag (PTAPM1) (corsia 4) oppure con pcDNA3.1(+)-PTAPPEYM1-Flag (PTAPPEYM1) (corsia 5). Controllo negativo (-). Dopo 48 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate con Western Blotting utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare (PageRulerTM Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

6.2.1 Analisi del ruolo di M2 e di parti di essa nel contesto di mutanti del virus dell'immunodeficienza felina (FIV) privi del dominio tardivo funzionale

I risultati ottenuti con i costrutti M2 e M2M1 indicano chiaramente che M2 presenta entrambe le caratteristiche necessarie per la gemmazione: la capacità di contattare la membrana cellulare e la capacità di sostituire la funzione del complesso ESCRT-III.

Al fine di approfondire il ruolo di M2 come sostituta di ESCRT-III nell'ambito della gemmazione virale abbiamo deciso di impiegare specifici costrutti basati sulla proteina Gag del Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV), precedentemente ottenuti dal nostro gruppo (Calistri *et al.*, 2009a). FIV è un lentivirus che infetta i non primati e causa una sindrome da immunodeficienza nel gatto domestico, molto simile a quella causata da HIV-1 nell'uomo. Diversi studi effettuati sulla fase di rilascio delle particelle di FIV, hanno permesso di identificare nel peptide carbossi-terminale (p2) della proteina Gag il motivo aminoacidico PSAP (*late domain* con sequenza consenso P(T/S)AP) che risulta critico per la gemmazione virale. Nello specifico, il nostro gruppo ha dimostrato che la sostituzione di entrambe le proline con alanine del motivo PSAP (ASAA, Mut02) inattiva la funzionalità del dominio stesso (Calistri *et al.*, 2009a). E' noto in letteratura che la fusione di Gag difettivo a livello dei *L-domain* con proteine in grado di interagire o appartenenti ai complessi ESCRT ripristina la gemmazione dei mutanti (Garrus *et al.*, 2001). Abbiamo quindi voluto analizzare l'eventuale capacità di M2 di ripristinare la gemmazione dei costrutti mutanti di FIV, esprimenti la poliproteina Gag deleta del dominio p2 ($\Delta p2$) oppure caratterizzati dalla sostituzione del solo motivo PSAP in ASAA (Mut02, ASAA-LLDL) o in combinazione con la distruzione del dominio accessorio LLDL (Calistri *et al.*, 2009a) in AAAA (Mut21ASAA, ASAA-AAAA). Inoltre, per identificare la regione specifica di M2 coinvolta nella putativa funzione di sostituta delle proteine ESCRT, sono stati ottenuti i seguenti costrutti esprimenti: i) M2 fusa alla regione carbossi-terminale del Gag di FIV deleta della regione p2 ($\Delta p2$, STOP); ii) M2 fusa al C-terminale del Mut02 del Gag di FIV; iii) la coda citoplasmatica di M2 (CT M2) fusa al carbossi-terminale del Gag di FIV $\Delta p2$; iv) la porzione CT M2 inserita alla regione carbossi-terminale del Mut02 del Gag di FIV; v) la regione CT M2 legata al C-terminale del Mut21ASAA del Gag di FIV; vi) l'elica anfipatica di M2 (E.A.) fusa alla porzione carbossi-terminale del Gag di FIV $\Delta p2$; vii) l'elica anfipatica di M2 fusa al C-terminale del Mut02 del Gag di FIV; viii) la sequenza dell'elica anfipatica di M2 fusa alla regione carbossi-terminale del Mut21ASAA del Gag di FIV (Fig.6.10).

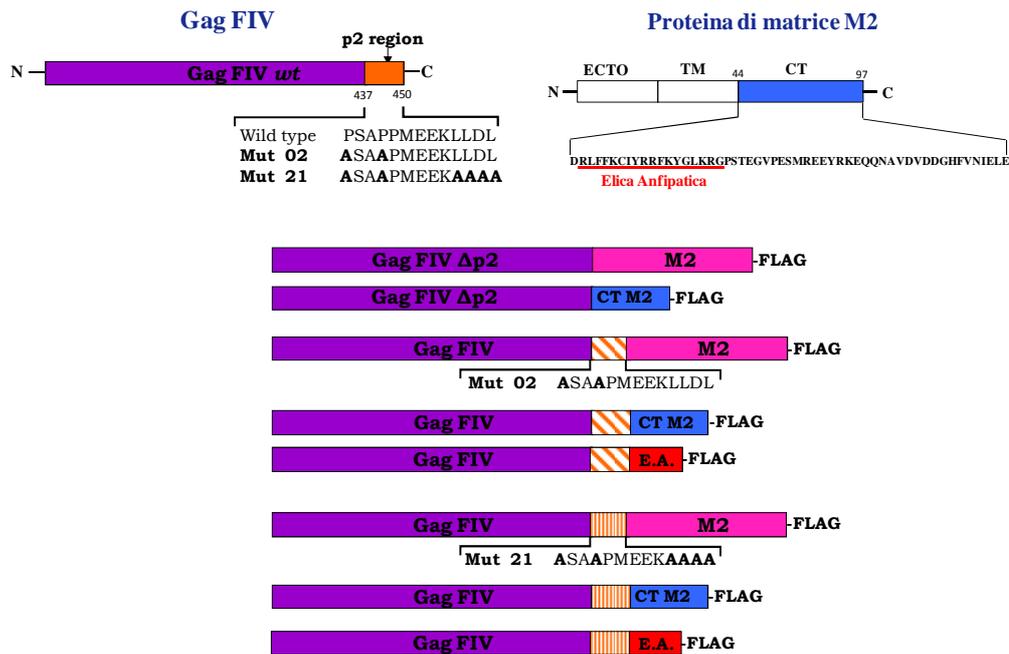


Figura 6.10: Rappresentazione schematica dei costrutti basati sulle fusioni della proteina dell'influenza M2 con il Gag di FIV. I costrutti esprimono M2 o la sua coda citoplasmatica (CIT) o la sua elica anfipatica (E.A.) fuse ai costrutti mutanti del Gag di FIV ($\Delta p2$, Mut 02 o Mut 21-ASAA). L'epitopo Flag è stato aggiunto al carbossi-terminale di tutti i costrutti.

In virtù dei risultati ottenuti ed esposti al paragrafo 6.2.1, abbiamo deciso di generare sia i costrutti contenenti l'elica anfipatica di M2, coinvolta nel processo di curvatura della membrana, sia i costrutti in cui è stata inserita la sua coda citoplasmatica, che influenza il processo di gemmazione del virale interagendo con M1.

Per questo, cellule 293T sono state trasfettate con i plasmidi pcDNA3.1(+)*GagFIV wild type* (Gag FIV WT), pcDNA3.1(+)*GagFIV $\Delta p2$ -M2-Flag* ($\Delta p2$ -M2), pcDNA3.1(+)*GagFIV $\Delta p2$ -CTM2-Flag* ($\Delta p2$ -CTM2), pcDNA3.1(+)*GagFIV $\Delta p2$ -E.A.-M2-Flag* ($\Delta p2$ -E.A.M2), pcDNA3.1(+)*GagFIVMut02-M2-Flag* (Mut02-M2), pcDNA3.1(+)*GagFIVMut02-CTM2-Flag* (Mut02-CTM2), pcDNA3.1(+)*GagFIVMut02-A.E.-M2-Flag* (Mut02-A.E.M2), pcDNA3.1(+)*GagFIVMut21ASAA-CTM2-Flag* (Mut21ASAA-CTM2), pcDNA3.1(+)*GagFIVMut21ASAA-A.E.-M2-Flag* (Mut21ASAA-A.E.M2). A distanza di 48 ore dalla trasfezione, le cellule sono state lisate per l'estrazione delle proteine, mentre i surnatanti sono stati purificati mediante ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio e successivamente anch'essi lisati. I campioni proteici così ottenuti sono stati separati su gel di poliaccrilammide e

analizzati mediante Western Blotting con l'utilizzo di un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina p24 di FIV.

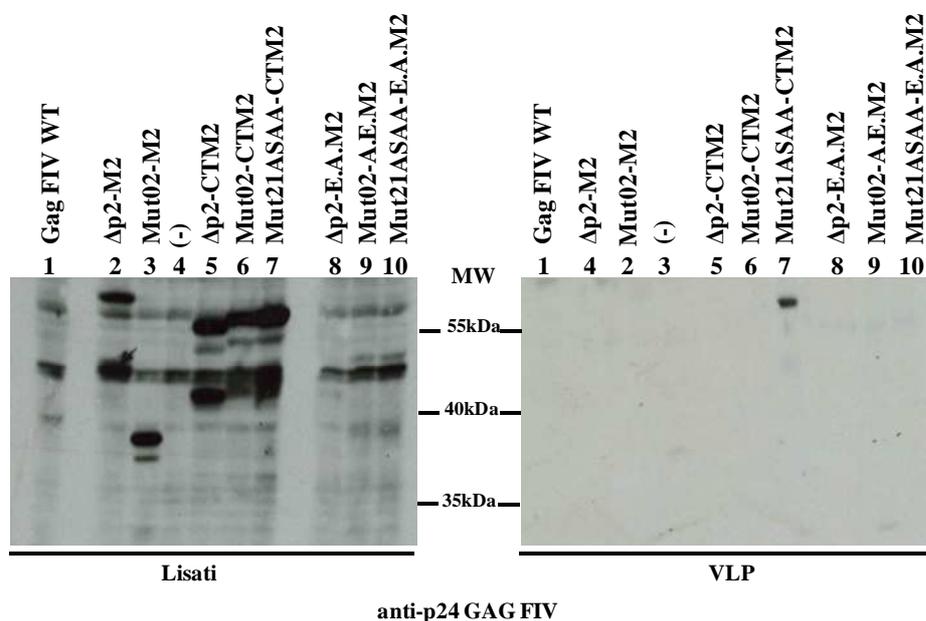


Figura 6.11: Cellule 293T sono state trasfettate con i costrutti pcDNA3.1(+)*GagFIV wild type* (Gag FIV WT, corsia1), pcDNA3.1(+)*GagFIV* Δ p2-M2-Flag (Δ p2-M2, corsia2), pcDNA3.1(+)*GagFIV*Mut02-M2-Flag (Mut02-M2, corsia 3) pcDNA3.1(+)*GagFIV* Δ p2-CTM2-Flag (Δ p2-CTM2, corsia 5), pcDNA3.1(+)*GagFIV*Mut02-CTM2-Flag (Mut02-CTM2, corsia 6) pcDNA3.1(+)*GagFIV*Mut21ASAA-CTM2-Flag (Mut21ASAA-CTM2, corsia 7) pcDNA3.1(+)*GagFIV* Δ p2-E.A.M2-Flag (Δ p2-E.A.M2, corsia 8), pcDNA3.1(+)*GagFIV*Mut02-A.E.M2-Flag (Mut02-A.E.M2, corsia 9), , pcDNA3.1(+)*GagFIV*Mut21ASAA-A.E.M2-Flag (Mut21ASAA-A.E.M2, corsia 10). Controllo negativo (-). Dopo 48 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate con Western Blotting utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina p24 del Gag di FIV. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come è possibile osservare in figura 6.11, il costrutto esprime il Gag di FIV *wild type* (pcDNA3.1(+)*Gag* WT) non è espresso in modo efficiente nelle cellule 293T (Figura 6.11, corsia 1/Lisati). Questo risultato non è sorprendente, in quanto la sequenza utilizzata non è ottimizzata per essere esportata dal nucleo in assenza della proteina virale Rev. Inoltre, il costrutto utilizzato manca del motivo RRE (*Rev Response Element*) e quindi anche esprimendo Rev *in trans* i livelli di espressione non potrebbero essere migliorati. Dalla figura 6.11, si nota come la proteina ottenuta dal costrutto Mut02-M2 (pcDNA3.1(+)*GagFIV*Mut02-M2-Flag) sembra andare incontro a un processo di degradazione (Figura 6.11, corsia 3/Lisati). Questo potrebbe essere dovuto al fatto che la fusione dell'intera

sequenza codificante M2 determina la produzione di una proteina instabile. Allo stesso modo, i tre diversi mutanti del Gag di FIV fusi all'elica anfipatica di M2 ($\Delta p2$ -E.A.M2, Mut02-E.A.M2, Mut21ASAA-E.A.M2) non sono stati rilevati dopo analisi in Western Blotting (Figura 6.11, corsie 8, 9, 10/Lisati). Questo risultato è analogo a quanto ottenuto fondendo l'elica antipatica ad M1 (paragrafo 6.2.1, Fig. 6.8) e ciò sembrerebbe indicare che questa regione di M2 fusa a proteine eterologhe ha un qualche impatto negativo sulla loro espressione/stabilità. D'altra parte, i costrutti $\Delta p2$ -M2, $\Delta p2$ -CTM2, Mut02-CTM2, Mut21ASAA-CTM2 risultano ben espressi a livello intracellulare, se paragonati al costrutto pcDNA3.1(+)*Gag* WT. Questi risultati sembrerebbero indicare che la regione carbossi-terminale della sequenza nucleotidica di M2, in particolare la porzione contenente la coda citoplasmatica, sia in qualche modo in grado di sostituire funzionalmente il motivo RRE e la sua interazione con Rev, conferendo al trascritto codificante il Gag di FIV la capacità di uscire dal nucleo e la stabilità necessaria per essere tradotto correttamente. Inoltre, come si evince in figura 6.11, la coda citoplasmatica di M2 è in grado di ripristinare il rilascio di particelle simil-virali almeno nel caso del mutante difettivo Mut21ASAA (Figura 6.11, corsia 7/VLP). Nel complesso questi esperimenti hanno fornito due importanti risultati che necessiteranno di ulteriori approfondimenti: 1) la funzione della coda citoplasmatica di M2 a livello dell'espressione del Gag di FIV e 2) la capacità della coda citoplasmatica di M2 di compensare la delezione del dominio tardivo PSAP essenziale per la gemmazione di FIV.

6.3 Valutazione dell'immunità indotta dalle VLP composte dalla proteina di matrice M1

Tutte le evidenze fin qui descritte ci hanno permesso di selezionare due costrutti MyrM1CHMP4B e M2M1, particolarmente efficienti nel portare al rilascio di VLP nel sovrantante cellulare. Attualmente, la densità e la morfologia di queste VLP sono in fase di valutazione, attraverso saggio di ultracentrifugazione su gradiente e di microscopia elettronica. Tuttavia, abbiamo voluto utilizzare questi costrutti per disegnare un esperimento pilota *in vivo* al fine di valutare l'immunogenicità delle VLP prodotte e quindi la validità dell'approccio di vaccinazione sviluppato. A tal fine abbiamo prodotto particelle simil-virali basate sull'espressione dei costrutti: i) MyrM1CHMP4B; ii) M2M1, e iii) M2, come controllo (Fig. 6.12).

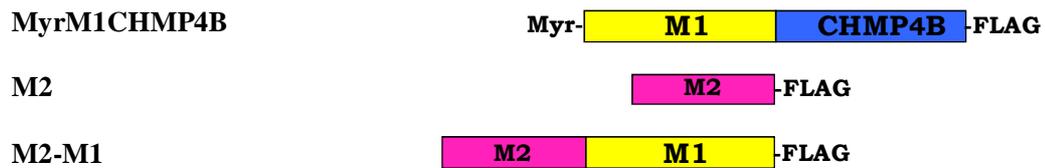


Figura 6.12: Costrutti basati sulle proteine di matrice M1 e M2 utilizzati negli esperimenti *in vivo*.

Con lo scopo di ottenere un cospicuo quantitativo di VLP, sono state allestite 10 fiasche di cellule 293T ($4,5 \times 10^6$ cellule/fiasca) per ogni preparazione di particelle simil-virali e ogni fiasca è stata trasfettata con 24 μg di DNA plasmidico del corrispondente costrutto descritto in figura 6.12. Dopo 48 ore, le VLP sono state isolate dai surnatanti di trasfezione tramite ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio e i pellet ottenuti da due fiasche sono stati riuniti e risospesi in 60 μl di buffer salino fosfato (PBS). Avvalendoci dei dati riportati in letteratura (Peacey *et al.*, 2007; Kalnciema *et al.*, 2012, Cadena-Nava *et al.*, 2012), abbiamo deciso di quantificare le VLP prodotte mediante la stima dell'assorbanza a 280 nm rilevata tramite l'utilizzo dello spettrofotometro ND-1000 NanoDrop (Nanodrop, Wilmington, DE). Quindi, topi BALB/c (6 animali per ogni gruppo) sono stati immunizzati per via intranasale con 10 μg /dose delle VLP di Myr-M1CHMP4B, M2-M1 o M2 addizionate della subunità B della tossina colerica in un volume di finale di 10 μl . Un gruppo di animali è stato utilizzato come controllo ed ha ricevuto la somministrazione del medesimo volume di PBS per ogni dose. A tre settimane dal primo inoculo (settimana 0), è stata somministrata una egual dose di richiamo (settimana 4). A tutte le preparazioni di VLP è stata aggiunta la subunità B della tossina colerica con lo scopo di aumentare l'immunogenicità delle particelle simil-virali nelle formulazioni. A distanza di 3 settimane dal richiamo (settimana 7), gli animali sono stati sacrificati e sono stati prelevati campioni di sangue e milze. I campioni di sangue diluiti di 100 volte sono stati utilizzati per determinare il quantitativo totale di immunoglobuline G (IgG) presenti e specifiche contro M1 mediante un saggio immuno-enzimatico denominato ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). Per effettuare tale rilevazione abbiamo utilizzato come antigene la proteina M1, purificata da cellule 293T trasfettate con il costrutto pcDNA3.1(+)-M1Flag sfruttando delle resine che legano per affinità l'epitopo Flag (anti-FLAG M2 *affinity gel*). Dopo eluizione dalla colonna, il quantitativo di M1 ottenuto è stato quantificato come rapporto tra il valore d'assorbanza a 280 nm misurato con lo spettrofotometro UV-Visibile e lo specifico coefficiente di assorbimento della proteina stessa (€ mg/ml).

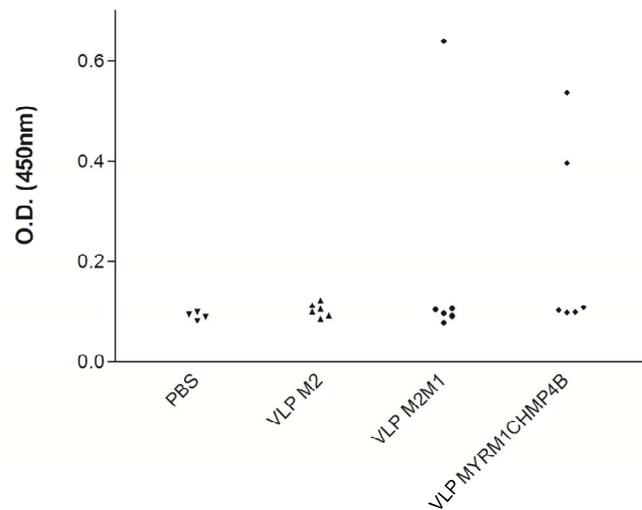


Figura 6.13: Risposta anticorpale dopo la vaccinazione con le VLP. Quattro gruppi di topi sono stati immunizzati per due volte con 10 µg di ogni VLP o di PBS (controlli negativi) alla settimana 0 e alla settimana 4. I campioni di sangue sono stati prelevati dopo tre settimane dal richiamo. I livelli di IgG dirette contro M1 sono stati quantificati mediante ELISA, rilevando il valore di densità ottica a 450 nm (sieri diluiti 100 volte).

Come si può osservare in figura 6.13, sono stati rilevati anticorpi specifici e diretti contro M1 nel siero di due topi immunizzati con VLP di MyrM1CHMP4B (0,397; 0,536) e di un solo animale del gruppo M2-M1 (0,639). Inoltre, il gruppo immunizzato solamente con VLP di M2 funge da ulteriore controllo nel saggio in quanto questi animali non mostrano una risposta immunitaria di tipo anticorpale contro M1. Per quanto incoraggianti, il basso numero di topi responsivi fa sì che i risultati ottenuti non siano statisticamente significativi.

I sieri risultati positivi all'ELISA sono stati analizzati anche mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide delle corrispettive proteine ottenute da cellule trasfettate (MyrM1CHMP4B, M2-M1) e successivo Western Blotting con l'utilizzo di un anticorpo secondario diretto contro le IgG di topo.

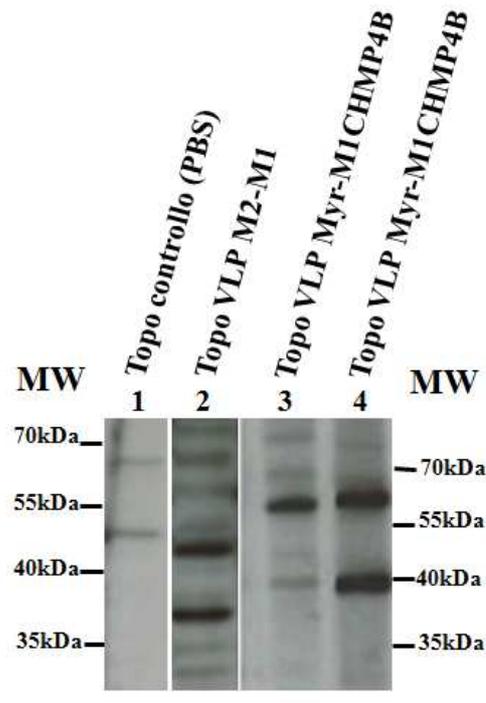


Figura 6.14: Cellule 293T sono state trasfettate con i costrutti pcDNA3.1(+)M1-Flag (M1, corsia 1), pcDNA3.1(+)M2-M1-Flag (M2-M1, corsia 2) e pcDNA3.1(+)MyrM1CHMP4B-Flag (MyrM1CHMP4B, corsie 3 e 4). Dopo 48 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) sono stati analizzati con Western Blotting utilizzando i sieri dei topi immunizzati con le VLP ottenute dai rispettivi costrutti. Le IgG totali sono state rilevate mediante l'uso di un anticorpo secondario diretto contro le immunoglobuline di topo. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

In figura 6.14, è possibile notare la presenza di bande specifiche nei sieri dei topi vaccinati con M2-M1 e MyrM1CHMP4B (Figura 6.14, corsie 2, 3, 4) e questo risultato conferma quanto ottenuto con l'ELISA. Inoltre, a dimostrazione della specificità della risposta da noi ottenuta, tutti i sieri dei controlli negativi degli animali a cui è stato somministrato solo PBS, come si può osservare dal campione rappresentativo riportato in figura (Figura 6.14, corsia 1), presentano un'unica flebile banda non specifica.

Parallelamente all'analisi della risposta anticorpale, abbiamo valutato *in vitro* la possibilità di un coinvolgimento della risposta cellulo-mediata. La proliferazione delle cellule T è stata determinata mediante l'utilizzo di un metodo in cui viene impiegata una sonda fluorescente (CFSE), che dopo stimolazione dei linfociti T si divide tra le cellule figlie. A tale scopo, abbiamo dapprima rimosso le milze dagli animali sacrificati, ne abbiamo isolato gli splenociti e li abbiamo incubati con CFSE. Inoltre, per indurre la proliferazione abbiamo stimolato gli splenociti

aggiungendo al mezzo di coltura le VLP specifiche utilizzate per immunizzare di ogni topo. Dopo 4 giorni di incubazione, le cellule sono state raccolte e marcate con l'anticorpo anti-CD3, marcatore pantropico dei linfociti TCD4 e TCD8, e quindi sottoposte all'analisi di citofluorimetria (Fig.6.15).

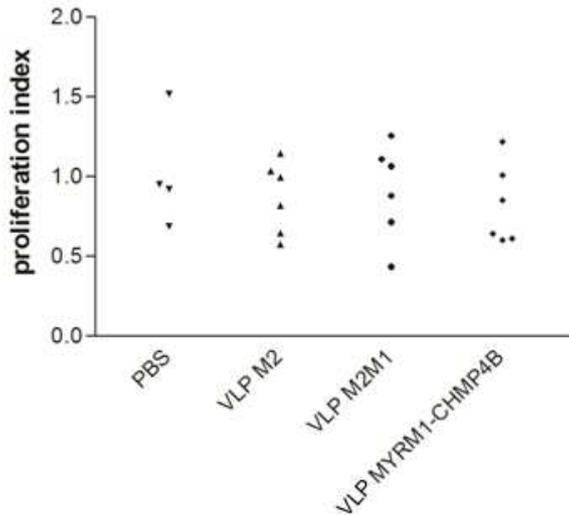


Figura 6.15: Dot plot rappresentativo di citofluorimetria a flusso delle cellule T-CD3⁺ ottenute da diversi gruppi di topi immunizzati. Gli splenociti sono stati marcati con CFSE e incubati con/senza le corrispondenti VLP per quattro giorni. I diversi simboli rappresentano singolarmente ogni animale.

Dalla figura 6.15 si evince come in nessuno dei campioni isolati dagli animali immunizzati è stata registrata una significativa proliferazione a seguito dell'esposizione alle specifiche VLP. Questi risultati potrebbero indicare una risposta cellulo-mediata poco significativa, anche se, dati i risultati ottenuti precedentemente, ci si aspetterebbe di evidenziare per lo meno una risposta di tipo Th2 (risposta umorale). Ci proponiamo, pertanto, di ripetere gli esperimenti utilizzando saggi specifici e più sensibili che discriminino tra risposta di tipo Th1 e di tipo Th2.

D'altra parte, questi risultati uniti a quelli ottenuti con il saggio ELISA possono essere spiegati dal fatto che, visto il protocollo utilizzato per la preparazione e purificazione delle VLP in questo esperimento pilota, la qualità o la quantità di particelle simil-virali utilizzate non siano sufficienti ad ottenere un buon livello d'immunizzazione. Questa ipotesi è confermata da quanto ottenuto caricando in gel di poliacrilammide di una dose di VLP somministrata ai topi seguita da analisi al Western Blotting con un anticorpo diretto contro l'epitopo Flag.

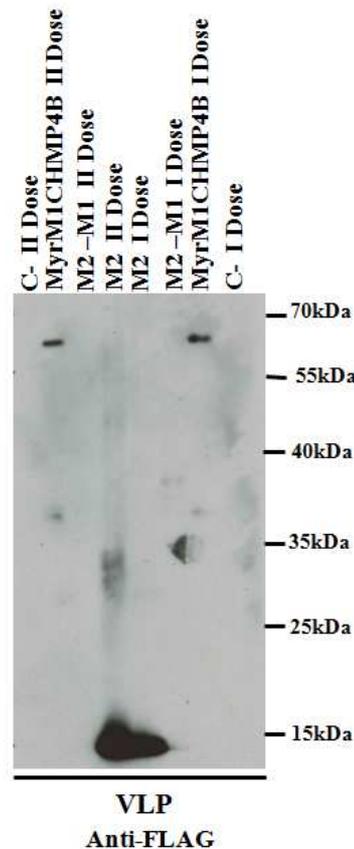


Figura 6.16: Western Blotting rappresentativo della prima (I) e della seconda dose (II) di VLP inoculate nei topi. Sono state caricate le dosi rimanenti delle VLP somministrate a un animale per ogni gruppo e sono state analizzate mediante Western Blotting utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come è possibile osservare in figura 6.16, le VLP nelle diverse corsie non risultano paragonabili. In particolare, le quantità di VLP dei campioni MyrM1CHMP4B e M2-M1 risultano essere molto basse rispetto alle VLP di M2. A maggior ragione e considerando che proprio i topi immunizzati con VLP di MyrM1CHMP4B e M2-M1 hanno prodotto anticorpi specifici contro M1, i risultati ottenuti, almeno in termini di risposta anticorpale, risultano estremamente incoraggianti. Questo anche in considerazione del fatto che precedenti protocolli di immunizzazione con VLP basate sulla sola M1, prodotte in cellule di insetto, non avevano portato allo sviluppo di anticorpi rilevabili verso la proteina virale (Quan *et al.*, 2007)

6.4 Valutazione dell'incorporazione delle diverse proteine HA *headless* in particelle virali di FIV

Come descritto in precedenza, i vaccini antinfluenzali stagionali attualmente in uso inducono una limitata risposta anticorpale e per di più ceppo specifica, che non protegge verso sottotipi antigenicamente distinti o nuovi virus pandemici (Budimir *et al.*, 2012). Le limitazioni sono imputabili alle continue mutazioni a cui le glicoproteine di superficie sono sottoposte, in particolare a carico delle regioni antigeniche dell'emoagglutinina. Inoltre, il vaccino influenzale universale dovrebbe indurre anticorpi neutralizzanti diretti contro la porzione conservata dell'emoagglutinina, prevenendo la fusione HA-mediata e l'infezione del virus. È stato ampiamente dimostrato come la vaccinazione basata sull'utilizzo di particelle simil-virali contenenti molecole di emoagglutinina protegga verso virus influenzali omologhi (Song *et al.*, 2010). Una delle nuove strategie impiegate per sviluppare vaccini ad ampio spettro protettivo è focalizzata sulla porzione conservata dell'HA. L'emoagglutinina è un polipeptide, consistente in una testa globulare della regione HA1 e nel dominio denominato "stelo" (*stalk*) composto da parte di HA1 e parte di HA2 e coinvolto nell'ancoraggio dell'HA all'*envelope* virale. Recenti studi hanno dimostrato che tale dominio risulta essere la regione maggiormente conservata tra le proteine HA di diversi virus influenzali (Chun *et al.*, 2008). Inoltre, Steel e i suoi collaboratori hanno indagato e comprovato che la cosiddetta emoagglutinina senza testa, come da loro denominata, ovvero costituita dal solo dominio *stalk*, risulta immunogenica e accessibile alle cellule B (Steel *et al.*, 2010). Ad ulteriore conferma, l'utilizzo di un peptide sintetico basato su questa regione di HA2 come vaccino ha fornito protezione contro diversi sottotipi di virus dell'influenza A (Wang *et al.*, 2010b). A partire da queste evidenze abbiamo generato una serie di emoagglutinine mancanti della testa globulare, ovvero emoagglutinine senza testa, con o senza l'inserimento di un corto peptide di legame costituito da quattro glicine (4G) o quattro arginine (4R) per mantenere la stabilità strutturale della proteina nativa (Figura 6.17).

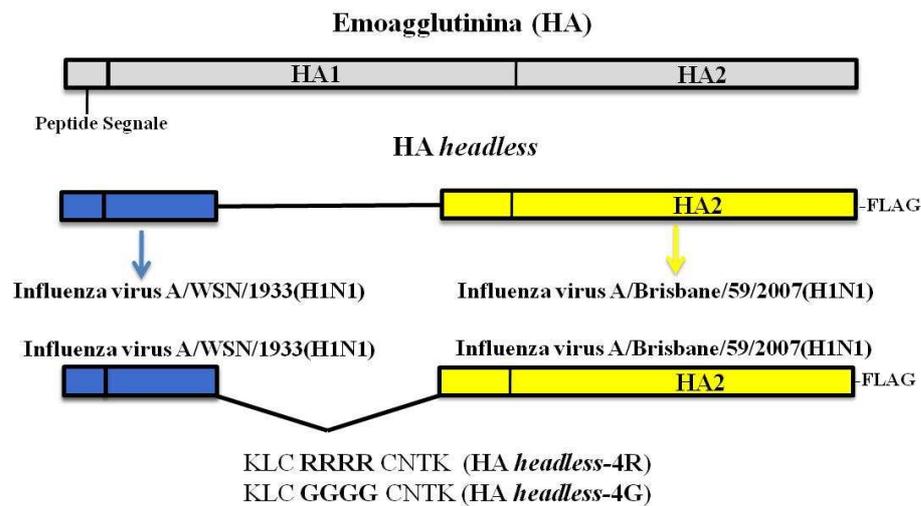


Figura 6.17: Diagramma schematico della struttura lineare della proteina HA (grigio chiaro). Il costrutto HA *headless* è composto dalla porzione conservata dello stelo, ottenuta dalla fusione dei primi 52 amminoacidi del segmento dello stelo del virus dell'influenza A/WSN/1933 HA (blu) con il resto del dominio della proteina HA del virus A/Brisbane/59/2007 (gialla). Nelle due proteine HA *headless*-4R e and HA *headless*-4G, la testa globulare è stata sostituita con un corto peptide di legame, rispettivamente di quattro arginine (4R) o di quattro glicine (4G). L'epitopo Flag è stato aggiunto al carbossi-terminine di tutti i costrutti (modificata da Steel *et al.*, 2010).

Precedentemente, Steel e i suoi collaboratori hanno dimostrato come l'inserimento di quattro glicine (4G) al posto della testa globulare conferisca stabilità alla proteina ottenuta, permettendone la corretta espressione (Steel *et al.*, 2010). Oltre a creare il costrutto con questo stesso tipo di peptide, abbiamo deciso di generare anche una HA *headless* contenente quattro arginine (4R). L'arginina è di per sé un amminoacido carico positivamente, e più complesso della glicina in quanto presenta una lunga catena laterale. Quindi, questo costrutto HA-*headless*-4R risulta essere un ottimo controllo dell'influenza del peptide nella capacità delle proteine generate di essere incorporate in VLP. Il nostro obiettivo finale è, infatti, quello di incorporare HA-*headless* nelle VLP basate su MyrPTAPM1, MyrM1CHMP4B e M2M1. Al fine di dimostrare che questo approccio sia perseguibile, e non avendo ancora messo a punto il protocollo per la purificazione delle VLP basate sulle proteine M1 ingegnerizzate, siamo partiti studiando l'incorporazione delle emoagglutinine ottenute in particelle simil-virali basate sul virus dell'immunodeficienza felina (FIV), che potrebbe comunque rappresentare una strategia vaccinale alternativa e comunque valida. A questo scopo cellule 293T sono state co-trasfettate con i plasmidi pcDNA3.1(+)-HA1-HA2-Flag (HA *headless*) (HA *headless*), pcDNA3.1(+)-HA1-GGGG-HA2-Flag (HA *headless*-4G), o pcDNA3.1(+)-HA1-RRRR-HA2-Flag (HA *headless*-4R) in presenza o meno di

p Δ env1 Mut06 (FIVGagPR⁻). Quest'ultimo costrutto è stato da noi precedentemente ingegnerizzato per altri scopi in modo da rendere inattiva la proteasi virale mediante l'inserimento di un codone di stop a valle del gene codificante la poliproteina Gag di FIV (Calistri *et al.*, 2009a). Con la finalità di verificare che le diverse emoagglutinine senza testa non venissero rilasciate in maniera costitutiva nel surnatante, cellule 293T sono state trasfettate con il plasmide pcDNA3.1(+)-HA1-HA2-Flag (HA *headless*), o pcDNA3.1(+)-HA1-GGGG-HA2-Flag (HA *headless*-4G), oppure pcDNA3.1(+)-HA1-RRRR-HA2-Flag (HA *headless*-4R). Dopo 48 ore, le cellule sono state lisate e le proteine estratte, mentre i surnatanti sono stati purificati su cuscino di saccarosio. I campioni proteici sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica e successiva analisi in Western Blotting con un anticorpo diretto contro la proteina p24 dell'immunodeficienza felina e con un altro diretto contro l'epitopo Flag.

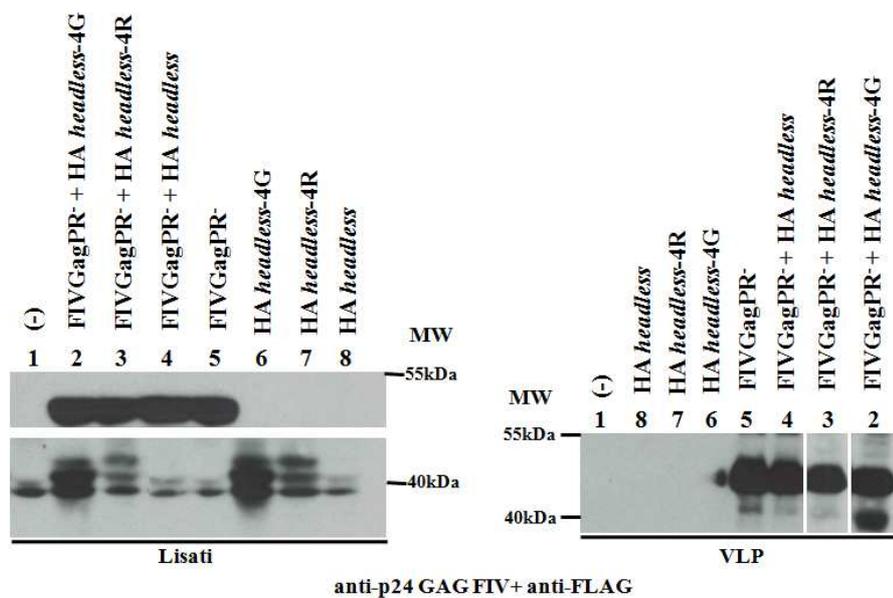


Figura 6.18: Cellule 293T sono state co-trasfettate con i costrutti pcDNA3.1(+)-HA1-HA2-Flag (HA *headless*), pcDNA3.1(+)-HA1-RRRR-HA2 (HA-4R *headless*), pcDNA3.1(+)-HA1-GGGG-HA2 (HA-4G *headless*) singolarmente (corsie 8, 7, 6) o in combinazione con il plasmide p Δ env1 Mut06 (FIVGagPR⁻, corsie 2, 3, 4). Le cellule 293T sono state trasfettate anche con il costrutto p Δ env1 Mut06 (FIVGagPR⁻, corsia 5) Controllo negativo (-). Dopo 48 ore dalla trasfezione, i lisati cellulari (Lisati) e le particelle simil-virali (VLP) sono state analizzate con Western Blotting utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina p24 del Gag di FIV e un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo Flag. MW: marker di peso molecolare (PageRulerTM Prestained Protein Ladder, Fermentas) proteine 170/130/100/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Dalla figura 6.18 si può notare come i costrutti HA-*headless*-4G e HA-*headless*-4R siano espressi nelle cellule 293T (Figura 6.18, corsie 6 e 7/Lisati), mentre la proteina HA-*headless* non risulta visibile (Figura 6.19, corsia 8/Lisati). Tale risultato è da imputare, probabilmente, a difetti conformazionali della proteina prodotta, che hanno un impatto negativo sulla sua stabilità, confermando quanto precedentemente riportato da Steel e colleghi (Steel *et al.*, 2010). Il dato più significativo è rappresentato dall'incorporazione di HA-*headless*-4G nelle particelle simil-virali basate sul Gag di FIV (Figura 6.18, corsia 2/VLP). Infatti, la proteina non è rilasciata costitutivamente (Figura 6.18, corsia 6/VLP), ma è visibile nel sovranatante quando il Gag di FIV è co-espresso. L'incapacità del costrutto HA-*headless*-4R di fornire lo stesso risultato, è probabilmente da imputare a problemi a livello di conformazione e/o di interazioni con la proteina Gag associati alla presenza delle 4R in luogo delle 4G, che ne limitano l'incorporazione nelle VLP. Questo risultato conferma la specificità e le conclusioni ottenute con HA-*headless*-4G.

7. DISCUSSIONE

L'infezione causata dai virus influenzali è caratterizzata da un'elevata morbilità e mortalità e rappresenta una delle maggiori minacce alla salute dell'uomo a livello globale (Haynes, 2009). L'influenza è una sindrome respiratoria acuta altamente contagiosa, che contribuisce in maniera sostanziale alla perdita di giorni lavorativi e scolastici, aumentando anche le ospedalizzazioni e comportando ingenti danni economici. I virus dell'influenza sono responsabili di annuali eventi epidemici e di occasionali pandemie (Kang *et al.*, 2011). Questi virus sono soggetti a costanti modifiche del loro patrimonio genetico, che possono essere associate all'accumulo di mutazioni puntiformi (*antigenic drift*) a carico degli antigeni di superficie HA e NA o a fenomeni di riassortimento genico (*antigenic shift*), i quali determinano la comparsa di nuove varianti antigeniche. Questi due meccanismi, uniti all'ampia varietà dei virus influenzali, incidono sulla capacità delle nuove varianti di evadere l'immunità ottenuta dalle pregresse infezioni e vaccinazioni. Tuttavia, la terapia antivirale risulta limitata dalla continua insorgenza di farmaco-resistenze e la sua efficacia è strettamente correlata alla tempestività della somministrazione. Quindi, la miglior strategia rimane la vaccinazione, che permette di prevenire l'infezione e le complicazioni ad essa associate. L'immunità indotta dai vaccini attualmente utilizzati nelle campagne di profilassi contro il virus dell'influenza è diretta verso le glicoproteine di superficie, in particolare l'emoagglutinina. La continua evoluzione molecolare del virus influenzale e, soprattutto, la possibilità di diffusione di ceppi pandemici, caratterizzati da HA completamente distinte rispetto a quelle dei virus circolanti, incentivano lo studio e lo sviluppo di nuovi approcci vaccinali, che permettano anche l'ottenimento di una risposta ad ampio spettro (Kang *et al.*, 2011). In particolare, l'interesse della comunità scientifica si è focalizzato sulla produzione di particelle simil-virali o *Virus-like particles* (VLP), anche a seguito del successo ottenuto con i vaccini contro il virus dell'epatite B e quello contro il papilloma virus. Queste strutture mimano la particella virale, ma sono prive del corredo genomico al loro interno per cui non risultano infettive e si possono ottenere mediante l'espressione di specifiche proteine strutturali virali, che sono capaci di autoassemblarsi e gemmare dalla cellula (es: Gag dei retrovirus, quali il virus dell'immunodeficienza umana, HIV). Anche nel caso del virus dell'influenza è possibile immaginare lo sviluppo di un approccio vaccinale basato sulla produzione di VLP. Tuttavia uno dei maggiori limiti a questa strategia è rappresentato dal fatto, che a differenza di quanto descritto nel caso dei retrovirus, del virus dell'epatite B e del papillomavirus, al fine di ottenere VLP di

influenza in un sistema basato su cellule di mammifero, è necessario esprimere più di una proteina virale (Wei *et al.*, 2011). Ovviamente, questo limita notevolmente la possibilità di produrre tali VLP su ampia scala, in particolare se queste sono intese come piattaforma per la presentazione di epitopi immunodominanti.

Partendo da queste considerazioni, il lavoro di ricerca presentato in questo elaborato di dottorato si è proposto di ricercare i minimi fattori virali necessari per la produzione di VLP basate sul virus dell'influenza, al fine di: - facilitarne la produzione/purificazione su grande scala; - testarne l'immunogenicità; - utilizzarle come piattaforma per la presentazione di epitopi immunodominanti, appartenenti ad altre proteine virali, ed in particolare all'antigene di superficie emoagglutinina.

E' noto come una delle proteine strutturali più rappresentate nel virione sia la proteina di matrice M1, che gioca un ruolo fondamentale nella morfogenesi, costituendo lo strato proteico sottostante l'*envelope* virale. Non sorprende, quindi, che M1 risulti essere altamente conservata tra i diversi sottotipi virali e rappresenti il fattore chiave anche per la fuoriuscita del virus dalla cellula infettata, nel processo noto come gemmazione. Tuttavia, come accennato in precedenza, a differenza di quanto descritto per altre proteine strutturali, quali il Gag dei retrovirus o L1 del papillomavirus, la sola espressione di M1 in cellule di mammifero, in assenza di altre componenti virali, non comporta il rilascio di VLP. Questa evidenza contrasta con quanto osservato in altri sistemi d'espressione, quali il baculovirus, in cui è possibile ottenere VLP basate su M1 grazie, probabilmente, all'azione di qualche fattore ancora non caratterizzato, presente nelle cellule di insetto o legato espressamente al sistema sperimentale utilizzato (Haynes, 2009). Recentemente, l'assenza di un segnale di indirizzamento alla membrana cellulare in M1, rappresentato invece nella regione aminotermine della proteina Gag dei retrovirus dal segnale di miristilazione, è stata indicata come una delle possibili ragioni di questo diverso comportamento (Wang *et al.*, 2010a). Va anche sottolineato che la gemmazione dalle cellule infettate del virus dell'influenza rappresenta una delle poche eccezioni tra i virus ad RNA dotati di *envelope*, in quanto avviene in modo indipendente dal complesso ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*)-III funzionale (Watanabe and Lamb, 2010). ESCRT-III è l'ultimo dei quattro complessi proteici che, insieme ad altre proteine cellulari note come Vps (*Vesicular sorting proteins*), viene reclutato dal citoplasma a livello delle membrane degli endosomi tardivi, determinando la formazione dei *Multivesicular bodies* (MVB). Questi organelli cellulari sono fondamentali per la degradazione delle proteine transmembrana ed è

stato ampiamente dimostrato in letteratura che numerosi virus utilizzano proprio il *pathway* di biogenesi degli MVB per fuoriuscire dalla cellula ospite (Calistri *et al.*, 2009b). In particolare, numerose evidenze sperimentali indicano come questo processo avvenga grazie ad un'interazione fisica tra specifiche proteine cellulari coinvolte nella biogenesi degli MVB e proteine strutturali virali, con il fine ultimo di reclutare ESCRT-III al sito di gemmazione. Infatti, ESCRT-III media due funzioni essenziali: i) la curvatura della membrana plasmatica o dell'organello (sito di acquisizione dell'*envelope* virale); ii) la scissione della particella virale neoformata dalla membrana cellulare (sito di gemmazione). L'interazione tra le proteine virali e le proteine appartenenti al *pathway* di biogenesi degli MVB è da ascrivere a particolari motivi amminoacidici, detti domini tardivi o *L-domain*, presenti a livello delle proteine strutturali virali coinvolte nel processo (Calistri *et al.*, 2009b). In particolare, sono stati identificati tre tipi diversi di *L-domain*, definiti canonici: P(T/S)AP, che recluta la proteina *Tumor suppressor gene 101* (Tsg101), YP(X)nL, che interagisce con *Apoptosis-linked gene 2* (ALG-2)-*interacting protein X* (AIP1/Alix), e PPXY, che contatta le ubiquitino-ligasi della famiglia *Nedd4-like*. È stato anche ampiamente osservato come l'inserimento o lo spostamento di questi domini in diverse posizioni delle proteine strutturali non alteri la loro funzionalità (Calistri *et al.*, 2009b). E' stato recentemente ipotizzato, sulla base di solide osservazioni sperimentali, che le due principali funzioni svolte da ESCRT-III nel caso della maggior parte dei virus, sono compiute, nell'ambito del ciclo replicativo del virus dell'influenza, da una seconda proteina strutturale, M2. Nello specifico, è stato dimostrato che la proteina M2, ed in particolare un'elica anfipatica presente nella regione carbossi-terminale della proteina stessa, è essenziale per la scissione dell'*envelope* virale dalla membrana plasmatica, analogamente a quanto effettuato dalle proteine cellulari del complesso degli ESCRT-III (Rossmann *et al.*, 2010; Watanabe and Lamb, 2010).

A partire da queste evidenze, abbiamo ipotizzato che fosse possibile ottenere VLP basate su M1 in cellule di mammifero, in modo indipendente dall'espressione di M2, fornendo ad M1: i) la capacità di contattare la membrana plasmatica mediante l'inserimento di un opportuno segnale di indirizzamento e ii) la possibilità di reclutare ESCRT-III al sito di gemmazione, tramite l'inserimento di specifici *L-domain* (PTAP di HIV-1, YDPL del virus dell'anemia infettiva equina, EIAV, PTAPPEY del virus Ebola) o iii) mediante la sua fusione diretta con proteine appartenenti ad ESCRT-III (nello specifico CHMP3 e CHMP4B). Per valutare questa ipotesi, abbiamo, innanzitutto, generato una serie di costrutti esprimenti la proteina M1 del virus dell'influenza A/WSN/33 (H1N1) in cui i domini tardivi

precedentemente descritti sono stati inseriti in differenti posizioni singolarmente o in combinazione al segnale di miristilazione (Myr) del Gag di HIV-1, fuso alla regione amminotermale di M1. I diversi costrutti sono stati testati in cellule 293T, una linea cellulare embrionale di rene umana, che consente un'elevata espressione proteica. I risultati ottenuti ci permettono di asserire che sia il segnale di miristilazione che il dominio PTAP sono necessari, ma non sufficienti a determinare la gemmazione di M1, se presenti singolarmente nella proteina chimerica. La loro azione congiunta, invece, permette a M1 di formare VLP e di fuoriuscire dalla cellula, in particolare nella condizione in cui questi siano entrambi inseriti a livello della regione amminotermale della proteina (MyrPTAPM1). Questo avvalora l'ipotesi che, non solo l'assenza di un segnale di indirizzamento alla membrana, ma anche l'incapacità di curvare la membrana e di eseguire la scissione tra l'*envelope* virale e quest'ultima, siano le funzioni che mancano a M1 per poter gemmare in forma di VLP. Un'altra interessante osservazione che deriva da questa prima serie di esperimenti è che il dominio PTAP risulta più efficiente rispetto agli altri due motivi studiati nel mediare la produzione di VLP. Questo risultato potrebbe essere associato alla sua capacità di interagire direttamente con la proteina Tsg101. Infatti, questa proteina cellulare non solo è una componente essenziale del complesso ESCRT-I, che interagisce direttamente con le proteine, in cui è il motivo amminoacidico PT/SAP, ma recluta efficientemente anche il complesso essenziale nella gemmazione delle vescicole, ovvero il complesso ESCRT-III (Carlson *and* Hurley, 2012). E' vero che anche AIP1/Alix, reclutata dal motivo YPDL, lega direttamente uno dei componenti del complesso ESCRT-III (CHMP4), ma è stato dimostrato come la delezione del motivo PT/SAP a livello del Gag di HIV-1, determini un blocco potente nella gemmazione del virus che pur mantiene la capacità di interagire con AIP1/Alix (Garrus *et al.*, 2001). Quindi, i nostri risultati e i dati in letteratura sembrerebbero indicare che, in generale, il legame diretto con Tsg101 è il sistema più efficiente per il reclutamento del complesso ESCRT-III. Interessante notare come l'inserimento in M1 del dominio PTAPPEY del virus Ebola, riportato in letteratura come il motivo caratterizzato dalla miglior efficienza nel rilascio di VLP quando inserito in proteine virali eterologhe (Strack *et al.*, 2000, Liu *and* Harty, 2010), non comporti la produzione di VLP nel mezzo di coltura, anche congiuntamente al segnale di miristilazione (si vedano i risultati ottenuti esprimendo il costrutto MyrPTAPPEYM1). Questo risultato potrebbe essere spiegato dal fatto che nel caso del motivo PTAPPEY non è stata chiaramente dimostrata un'interazione diretta con Tsg101 (Urata *et al.*, 2007) e in effetti il

ruolo di questa proteina cellulare nella gemmazione di Ebola non sembra essere essenziale (Silvestri *et al.*, 2007). In conclusione, i nostri dati permettono di asserire che, per la gemmazione di M1, oltre al segnale di indirizzamento alla membrana, sia essenziale un'interazione diretta con Tsg101. Per testare questa ipotesi, stiamo attualmente eseguendo una serie di esperimenti basati sulla tecnica di co-immunoprecipitazione (Strack *et al.*, 2003) e sull'utilizzo di specifici mutanti del costrutto MyrPTAPM1 per saggiarne l'interazione con Tsg101. In ogni caso, il dato ottenuto è estremamente interessante perché dimostra che pochi amminoacidi (7 nel caso del segnale di miristilazione e 4 nel caso del *L-domain*) opportunamente fusi ad una proteina non dotata intrinsecamente della proprietà di fuoriuscire dalla cellula, ne determinano il rilascio nel sovrinatante cellulare, potenzialmente in forma di VLP. Stiamo ovviamente analizzando se questo vale solo nel caso specifico di M1 o se lo stesso risultato si ottiene fondendo Myr e PTAP ad altre proteine virali e non. Le implicazioni anche puramente biotecnologiche sarebbero, infatti, estremamente significative.

Inoltre, per avvalorare l'importanza del reclutamento del complesso ESCRT-III nella gemmazione di VLP basate su M1, la proteina virale è stata fusa direttamente con due proteine appartenenti a tale complesso cellulare, CHMP4 e CHMP3. Come detto precedentemente, ESCRT-III è essenziale nella gemmazione delle vescicole, durante la genesi degli MVB, e nella fuoriuscita del virus dalla cellula infettata (Morita, 2012). Infatti, quando la funzionalità di questo complesso viene compromessa dall'espressione di una forma cataliticamente inattiva di un'ulteriore proteina appartenente al *pathway* degli MVB, l'ATPasi Vps4, la gemmazione virale e la formazione degli MVB risulta inibita (Calistri *et al.*, 2009b). Come detto, nello specifico, abbiamo fuso alla regione carbossiterminale di M1, caratterizzata dal segnale di miristilazione del Gag di HIV-1, la proteina CHMP3 o la proteina CHMP4B, importanti fattori del complesso ESCRT-III. In particolare, la scelta di utilizzare la proteina CHMP3 è rappresentata dal fatto che essa negli MVB funge da piattaforma per l'interazione con le altre proteine CHMP (CHMP2A; CHMP4/6 o CHMP1/5), che sono importanti per la fissione della membrana. Inoltre, CHMP3 possiede altre due caratteristiche importanti ovvero la capacità di interagire con la membrana e con Vps4 per il disassemblaggio di tutto il complesso ESCRT-III (Muziol *et al.*, 2006; Calistri *et al.*, 2007). Per quanto riguarda la proteina CHMP4B è noto dalla letteratura che se overespressa in cellule di mammifero, polimerizza in filamenti circolari con la formazione di tubuli protrudenti dalla cellula (Hanson *et al.*, 2008). Nel contesto di HIV-1, questo meccanismo è importante per l'evento di scissione della

particella virale dalla membrana cellulare (Usami *et al.*, 2012). Infatti, la deplezione della proteina CHMP4B può inibire il rilascio delle particelle virali di HIV-1 (Morita *et al.*, 2011).

Sebbene entrambi i costrutti determinano il rilascio di VLP nel mezzo di coltura, le VLP ottenute dalla fusione con la proteina CHMP4B (MyrM1CHMP4B) sembrano essere prodotte con una maggiore efficienza. Tale risultato potrebbe essere spiegato da quanto dimostrato nel caso della gemmazione di HIV-1, in cui è evidente come la polimerizzazione delle proteine CHMP4, a livello della particella formata dal Gag di HIV-1, permetta la strozzatura della vescicola e il suo successivo rilascio (Weiss *and* Gottlinger, 2011). In modo analogo a quanto accade per HIV-1, è possibile ipotizzare che nel caso di MyrM1CHMP4B, M1 determini la struttura della particella neoformata ed il successivo rilascio sia da imputare alla proprietà intrinseche di CHMP4B.

Dalle evidenze riportate in letteratura, è chiaro come mutazioni in posizioni differenti del segnale di miristilazione di HIV-1 abbiano un notevole impatto sul rilascio delle particelle virali (Freed *et al.*, 1994; Ono *and* Freed, 1999). Abbiamo deciso, quindi, di utilizzare il costrutto caratterizzato dalla maggior efficienza nel rilascio delle proteine virali (MyrM1CHMP4B) per valutare l'importanza del segnale di miristilazione nella produzione delle VLP basate su M1, in questo contesto. A tale scopo, abbiamo sostituito con un'alanina la prima glicina del segnale di miristilazione del costrutto in esame. Infatti, tale sostituzione nella proteina Gag di HIV-1 previene la miristilazione ed il trasporto della poliproteina alla membrana cellulare con un conseguente assemblaggio difettivo delle particelle virali (Freed *et al.*, 1994). In parallelo, abbiamo anche generato un costrutto caratterizzato dalla fusione tra M1 e la proteina CHMP4B, in assenza del segnale di miristilazione (M1CHMP4B). Tutti i costrutti ottenuti sono stati testati sia in cellule embrionali di rene umano, 293T, sia in cellule fibroblastoidi di rene di scimmia, COS-7. L'utilizzo di due linee cellulari di diversa derivazione ci ha permesso di escludere che gli esperimenti fossero eventualmente viziati da fenomeni cellulo/specie-specifici. I risultati ottenuti ci hanno permesso di concludere che quando M1 è fusa a CHMP4, la presenza di un segnale di miristilazione funzionale non è necessaria. Questo risultato è facilmente spiegabile e correlabile con quanto descritto precedentemente, ovvero al fatto che esistono evidenze sperimentali (Hanson *et al.*, 2008), e i nostri stessi dati lo confermano, secondo cui l'espressione di CHMP4B da sola in cellule eucariotiche determina il suo rilascio nel mezzo di coltura. Inoltre, i dati ottenuti sono confermati in entrambe le linee cellulari 293T e COS-7. In conclusione, abbiamo generato due

costrutti, MyrPTAPM1 e MyrM1CHMP4B (ma anche la sua versione senza Myr) che permettono di ottenere VLP in seguito alla loro espressione in cellule eucariotiche. Va sottolineato che stiamo attualmente eseguendo esperimenti di purificazione in gradiente e di microscopia elettronica per valutare densità e morfologia delle VLP ottenute, che verranno paragonate agli stessi parametri ottenuti nel caso delle VLP prodotte con i sistemi classici (basati sulla co-espressione di M1, M2, emoagglutinina e neuroaminidasi) e ai virioni ottenuti infettando le cellule con il virus influenzale.

In ogni caso, possiamo concludere che i nostri dati supportano quanto riportato in letteratura, ovvero l'importanza del segnale di indirizzamento alla membrana e la possibilità di sfruttare direttamente il complesso ESCRT-III per la gemmazione di M1 (Wang *et al.*, 2010a; Rossman *et al.*, 2010, Yondola and Carter, 2011). In questo contesto, come precedentemente accennato, Rossman e colleghi hanno dimostrato l'importanza di M2 e in particolare della sua elica anfipatica nelle ultime fasi della gemmazione del virus dell'influenza (Rossmann *et al.*, 2010) nel sostituire funzionalmente il complesso ESCRT-III. Inoltre, è stato chiaramente evidenziato come la presenza di M1 a livello del sito di assemblaggio virale sia da ascrivere alla sua interazione fisica con la porzione citoplasmatica di M2 (Chen *et al.*, 2008). Queste e altre evidenze sperimentali portano a concludere che M2 sia la proteina in grado di fornire ad M1, nel contesto dell'infezione virale, le funzioni necessarie a mediare la sua gemmazione. Partendo da questi dati e dai risultati precedentemente ottenuti, sempre con il fine di rendere M1 in grado di gemmare autonomamente dalle cellule eucariotiche, abbiamo analizzato il ruolo dell'elica anfipatica di M2, porzione minima necessaria per indurre la curvatura della membrana cellulare (Rossmann *et al.*, 2010). Abbiamo quindi valutato se la fusione nella regione carbossiterminale di M1 dell'elica anfipatica di M2, unitamente al segnale di miristilazione del Gag di HIV-1 nella regione amminoterminale, potessero portare alla produzione di una M1 ingegnerizzata in grado produrre di VLP. Tuttavia, il costrutto generato non è risultato espresso. Stiamo attualmente sviluppando altri costrutti nei quali l'elica anfipatica sarà posizionata in altre regioni della proteina M1. Inoltre, abbiamo ottenuto e stiamo testando un costrutto in cui l'intera regione carbossiterminale di M2 è fusa ad M1, in presenza del segnale di miristilazione di Gag. Questi costrutti dovrebbero permetterci di chiarire il ruolo svolto dalle specifiche regioni di M2 nella gemmazione di M1. Infatti, un altro costrutto da noi generato e basato sulla fusione dell'intera regione codificante M2 ad M1, M2-M1, è risultato efficiente nella produzione di VLP, a riprova del fatto che M2 esplica le minime funzioni

necessarie alla gemmazione. Il fatto che tra queste ci sia la capacità di contattare la membrana cellulare attraverso la regione amminoternale, è dimostrato dal fatto che il costrutto M1-M2, dove M2 è fusa alla regione carbossiterminale di M1, non è in grado di gemmare nel sovrantante cellulare. Infine, M2 da sola è in grado di fuoriuscire dalle cellule eucariotiche. Di nota, anche le VLP prodotte dalla fusione M2-M1 e dalla sola M2 sono in fase di caratterizzazione in gradiente e in microscopia elettronica. Va sottolineato, che negli esperimenti in cui M2 è stata espressa *in trans* non abbiamo ottenuto rilascio di M1 nel sovrantante cellulare. Questa discrepanza tra i nostri risultati e quelli precedentemente ottenuti in letteratura (Wang *et al.*, 2010a), è probabilmente da ascrivere alle condizioni sperimentali utilizzate e alla necessità di ottimizzare, per esempio, il rapporto molecolare tra le due proteine al fine di ottenere un'interazione efficiente e in grado di mediare la gemmazione di M1. Tuttavia, i dati ottenuti con le proteine di fusione e con l'espressione della sola M2, ci permettono chiaramente di concludere che M2 fornisce ad M1 quanto necessario per fuoriuscire dalla cellula, ed in particolare, l'interazione con la membrana cellulare e la capacità di curvare la stessa, sostituendosi, in questa funzione, ad ESCRT-III.

Ad avvalorare quest'ultima conclusione, abbiamo dimostrato chiaramente che M2 è in grado di ripristinare la gemmazione di alcuni costrutti, precedentemente ottenuti e caratterizzati dal nostro gruppo, basati sulla proteina Gag del Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) e difettivi nella capacità di fuoriuscire dalla cellula ospite. Studi condotti dal nostro gruppo di ricerca hanno infatti dimostrato che la gemmazione di FIV è strettamente dipendente dal dominio tardivo PSAP, contenuto nella regione carbossiterminale p2 di Gag in presenza o meno di una proteasi virale attiva. Attraverso il *Late domain* PSAP, FIV è in grado di sfruttare il *pathway* degli MVB per la sua fuoriuscita dalle cellule (Calistri *et al.*, 2009a). I nostri dati indicano chiaramente che M2, ed in particolare la sua regione carbossiterminale, sono in grado di ripristinare la gemmazione del Gag di FIV privo di un dominio PSAP funzionale. E' stato precedentemente riportato che la fusione del Gag di HIV-1, privo di un *L-domain* funzionale può essere ripristinato grazie all'azione di proteine in grado di interagire con o appartenenti ai complessi ESCRT (Garrus *et al.*, 2001). Considerando che difficilmente M2 è in grado di interagire con proteine appartenenti al *pathway* di biogenesi degli MVB, cosa che comunque stiamo vagliando con opportuni esperimenti, è possibile concludere che M2 agisca come una proteina appartenente al complesso ESCRT-III, esattamente come ipotizzato in letteratura (Rossmann *et al.*, 2010). Inoltre, il nostro approccio sperimentale basato sulla fusione a Gag di M2 o di parti di esse, ci ha permesso

chiaramente di distinguere il suo ruolo nella gemmazione da quello esplicito da M1 tramite l'interazione con RACK1 e il *pathway* legato a questa proteina cellulare (Demirov *et al.*, 2012). Questo ci permette di concludere che effettivamente M2 è di per sé in grado di guidare la gemmazione anche di proteine eterologhe e che quindi, nel caso della gemmazione del virus dell'influenza ha certamente un ruolo centrale, senza che questo escluda il coinvolgimento di ulteriori *pathway* cellulari. Inoltre, un altro aspetto interessante dei nostri risultati è che M2, e in particolare la sua coda citoplasmatica, sembra consentire un efficiente trasporto del trascritto Gag fuori dal nucleo, azione che, nel contesto delle cellule infettate da FIV, viene svolta dall'interazione tra la proteina virale Rev e il motivo RRE (*Rev Response Element*), presente a livello dell'RNA virale (Tomonaga and Mikami, 1996; Phillips *et al.*, 1992). Questo risultato è molto interessante e merita certamente di essere ulteriormente approfondito.

Questa serie di esperimenti ci ha permesso di ottenere una serie di informazioni molto interessanti, anche dal punto di vista puramente biologico e legato alla replicazione virale. Inoltre, abbiamo sviluppato e stiamo caratterizzando 3 set di VLP MyrPTAPM1, MyrM1CHMP4B, M2-M1 che possono costituire un'ottima piattaforma per lo sviluppo di vaccini efficaci nei confronti del virus dell'influenza, in particolare per la presentazione di antigeni immunodominanti.

Va anche detto che VLP basate su M1 potrebbero di per sé stimolare una risposta immunitaria in grado da sola, o in combinazione con altri approcci, di proteggere verso l'infezione da virus influenzale. È stato, infatti, riportato in letteratura che a seguito dell'infezione naturale nell'uomo, specifici linfociti T citotossici (CTL) diretti contro M1 e la nucleoproteina (NP) sono stati rilevati negli organi linfoidi e in circolazione. È noto come queste proteine risultino altamente conservate tra i diversi sottotipi virali e per tale motivo questa risposta CTL mediata mostra un'elevata cross-reattività tra i differenti virus influenzali (Kreij *et al.*, 2011). Nonostante questo, i dati finora presenti in letteratura, relativi ad approcci vaccinali basati sulla somministrazione nel modello animale di VLP di M1 prodotte in cellule di insetto, non hanno fornito risultati incoraggianti (Quan *et al.*, 2007). Tuttavia, è possibile ipotizzare che il sistema di produzione delle VLP stesso possa conferire a quest'ultime caratteristiche che ne influenzano l'immunogenicità (Zeltins, 2013). Inoltre, anche nel caso di voler utilizzare le VLP basate su M1 come piattaforma per la presentazione di epitopi immunodominanti è comunque interessante valutare la risposta immunitaria legata ad un antigene altamente conservato, che potrebbe, quindi, avere un effetto positivo sulla capacità protettiva generale della strategia vaccinale messa a punto.

Partendo da queste considerazioni, i costrutti MyrM1CHMP4B e M2-M1, ovvero i due costrutti sviluppati caratterizzati dalla migliore efficienza in termini di produzione di VLP, e il costrutto esprimente solo M2 (come controllo), sono stati impiegati in un protocollo pilota di vaccinazione al fine di valutare l'immunogenicità delle VLP *in vivo*. Il modello animale scelto è stato quello murino e in particolare il ceppo di topi BALB/c, che è il maggiormente impiegato nei protocolli vaccinali sviluppati nei confronti del virus dell'influenza (Brett *and* Johansson, 2009). Diversi studi hanno dimostrato che nei topi BALB/c la risposta immunitaria indotta dall'infezione di diversi patogeni oppure stimolata in seguito a vaccinazione è in predominanza di tipo Th2, ovvero caratterizzata dall'attivazione di cellule TCD4⁺ e dalla produzione di IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, in definitiva una risposta di tipo umorale (Brett *and* Johansson, 2009). Al contrario, nel caso del virus dell'influenza, l'infezione primaria e la prima immunizzazione con diversi tipi di vaccino, inducono nei topi BALB/c una risposta di tipo Th1. Alla seconda immunizzazione, si ottiene, invece, l'attivazione dell'immunità Th2 mediata (Brett *and* Johansson, 2009). Nel nostro protocollo sperimentale, l'immunizzazione dei topi BALB/c è stata effettuata per via intranasale, perché oltre a rendere la somministrazione meno traumatica per l'animale rispetto alla somministrazione parenterale, questa via risulta essere quella utilizzata dal virus stesso nel corso dell'infezione naturale. Inoltre, è stato dimostrato come la somministrazione intranasale di un vaccino costituito dal virus influenzale inattivato induca una risposta anticorpale altamente cross-protettiva con la produzione di IgA secretorie dirette contro l'emoagglutinina e di IgG debolmente reattive nel siero (Tamura, 2010). In contrasto, la somministrazione dello stesso vaccino per via subcutanea determina la sola produzione di anticorpi (IgG) nel siero, che non forniscono però cross-protezione (Tamura, 2010). Inoltre, nel nostro protocollo di vaccinazione, la subunità B della tossina colerica è stata aggiunta alle dosi di VLP. Precedenti studi hanno, infatti, evidenziato come l'aggiunta della tossina colerica aumenti significativamente l'immunogenicità dei vaccini basati su virus inattivati determinando inoltre una risposta immunitaria eterosubtipica (Kang *et al.*, 2009a). Infine, il protocollo sperimentale utilizzato prevedeva una prima somministrazione di VLP, un richiamo in quarta settimana e i prelievi per i diversi saggi tre settimane dopo. Come precedentemente accennato, le VLP basate sui costrutti da noi generati e utilizzate nell'esperimento pilota di immunizzazione (MyrM1CHMP4B, M2-M1, M2) sono ancora in fase di caratterizzazione dal punto di vista della densità e della morfologia. Pertanto, non abbiamo potuto procedere ad una purificazione su gradiente delle VLP prima di

dell'inoculo nell'animale. Abbiamo quindi utilizzato una preparazione su larga scala con semplice purificazione su gradiente di saccarosio. Ovviamente, questo protocollo di purificazione ha lo svantaggio di ottenere VLP che, per quanto pulite, sono quasi certamente contaminate da proteine presenti nel sovrantante cellulare e in particolare dalla BSA del siero contenuto nel terreno di coltura. Questo può comportare errori anche di una certa entità nella quantificazione delle VLP, anche se eseguita, come nel caso di questo lavoro di tesi, con sistemi descritti in letteratura (Peacey *et al.*, 2007; Kalnciema *et al.*, 2012, Cadena-Nava *et al.*, 2012). Va sottolineato che l'eliminazione anche parziale del siero dal terreno ha un impatto estremamente negativo sulla produzione di VLP (dati da noi ottenuti ma non riportati nella tesi). Pur tenendo conto di questi aspetti negativi, di cui abbiamo avuto conferma caricando su gel di poliacrilammide parte delle dosi di VLP utilizzate nell'esperimento pilota, abbiamo comunque ottenuto dati incoraggianti. Infatti, in un certo numero di animali, anche se non statisticamente significativo, è stata rilevata sia in ELISA che in *western blot* la presenza, a livello del siero, di anticorpi specifici verso M1. Dati ancor più incoraggianti se si considera lo studio precedentemente accennato, in cui non era stata dimostrata una significativa risposta anticorpale in animali immunizzati con VLP basate sulla sola M1 (Quan *et al.*, 2007). Al contrario, i nostri risultati non hanno evidenziato alcuna proliferazione cellulare negli animali vaccinati, questo nonostante il saggio utilizzato avrebbe dovuto mettere in evidenza tanto una risposta di tipo Th1, quanto di tipo Th2. Considerando i dati relativi alla produzione anticorpale e a quanto noto in letteratura, seppure utilizzando strategie vaccinali diverse dalla nostra, ci saremmo aspettati risultati positivi nella proliferazione cellulare, legati per lo meno ad una risposta di tipo Th2. Il risultato negativo può essere ascrivibile, ancora una volta, ai problemi sperimentali legati alla purificazione delle VLP, o ad un livello molto basso o completamente assente di risposta tanto Th1, quanto Th2. Ci proponiamo, pertanto, dopo aver purificato efficientemente le VLP, di ripetere non solo gli esperimenti per la valutazione della produzione di anticorpi specifici per M1, ma anche la valutazione delle risposte Th1 e Th2, utilizzando eventualmente saggi più mirati, come l'analisi della produzione di specifiche citochine a livello intracellulare.

Nel contempo, come accennato inizialmente, uno dei nostri obiettivi era anche quello di utilizzare le eventuali VLP ottenute come piattaforma per la presentazione di proteine/epitopi immunodominanti e preferibilmente altamente conservati, tanto da poter risultare nello sviluppo di un vaccino universale. Infatti, la risposta anticorpale indotta dai vaccini trivalenti attualmente a disposizione è

diretta prevalentemente verso gli antigeni di superficie HA e NA, sottoposti a forte pressione selettiva, altamente variabili e che, quindi, non forniscono una protezione di lunga durata e diretta contro sottotipi virali divergenti. La necessità di variare la formulazione vaccinale ogni anno e la possibilità dell'insorgenza di un eventuale ceppo pandemico, come si è verificato nel 2009, hanno incentivato gli sforzi verso l'identificazione e la caratterizzazione di epitopi altamente conservati tra i diversi virus influenzali. Tali antigeni possono essere utilizzati come base per lo sviluppo di un vaccino universale ad ampio spettro e in grado di indurre un'immunità di lunga durata. In questo contesto, è stato recentemente dimostrato che la cosiddetta HA senza testa, ovvero costituita dal solo dominio dello stelo o *stalk*, risulta ricca di epitopi altamente immunogenici e conservati tra ceppi influenzali diversi, che, a differenza di quanto avviene a livello della proteina *wild-type* a causa della presenza del dominio globulare (testa o *head*), diventano accessibili alle cellule B (Steel *et al.*, 2010). Abbiamo, pertanto, prodotto una serie di costrutti codificanti HA prive della testa globulare e caratterizzate o meno dalla sua sostituzione con un corto peptide, al fine di mantenere la stabilità strutturale della proteina nativa (Steel *et al.*, 2010). Abbiamo quindi verificato il livello di espressione e di stabilità di questi costrutti, confermando i dati di Steel e collaboratori, che dimostrano come la mancanza del peptide abbia un impatto negativo sull'espressione e sulla stabilità della proteina HA-*headless* (Steel *et al.*, 2010). Inoltre, abbiamo evidenziato che solo un'HA-*headless* dotata di un peptide costituito da quattro glicine (HA-*headless*-4G) viene incorporata in VLP basate sul Gag FIV senza essere costitutivamente rilasciata nel surnatante di coltura. Le VLP sviluppate sono attualmente in fase di caratterizzazione.

Questi risultati rappresentano un punto di partenza importante per lo sviluppo di un vaccino universale contro il virus dell'influenza. Infatti, non solo le VLP basate sul Gag di FIV presentanti HA-*headless* verranno saggiate in protocolli di vaccinazione sul modello murino, ma lo stesso antigene verrà montato o fatto incorporare dalle VLP basate su M1 ingegnerizzata, precedentemente descritte, in maniera da valutare la combinazione di questi antigeni nell'indurre una risposta protettiva verso diversi ceppi di virus influenzale.

8. ABBREVIAZIONI

A	alanina
AAA	<i>ATPase associated with various cellular activities</i>
AIP-1	<i>ALG-2 interacting protein 1</i>
Alix	<i>ALG-2 interacting protein x</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	adenosina trifosfato
BGH	<i>Bovine Growth Hormone</i>
BSA	Albumina di Siero Bovino
CFSE	<i>5,6-carboxylfluorescein diacetate succinil ester</i>
CHMP	<i>charged multivesicular body protein</i>
CRAC	<i>Cholesterol Recognition/interaction aminoacid consensus motif</i>
cRNA	RNA complementare
CT	coda citoplasmatica
CTL	linfociti T citotossici
DEPC	dietil-piropcarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	acido desossiribonucleico
dNTP	desossiribonucleotide trifosfato
dTTP	desossitimidina trifosfato
dUTP	desossiuridina trifosfato
D.O.	densità ottica
E.A.	Elica anfipatica
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
EIAV	Virus dell'Anemia Infettiva Equina
ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complexes Required for Transport</i>
FBS	siero fetale bovino
FIV	virus dell'immunodeficienza felina
HA	emoagglutinina
HCMV	Citomegalovirus Umano
HECT	<i>Homologous to E6AP C-terminus</i>
HEF	<i>Hemoagglutinin-Esterase-Fusion</i>
HIV-1	Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1
HPV	Human Papillomavirus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HRS	<i>Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate</i>
IFN	interferone
Ig	immunoglobuline
ILV	<i>intraluminal vesicles</i>
kb	chilo basi
kDa	chilo Dalton
L	leucina

L	<i>late</i>
LB	Luria Bertani
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
Lys	lisina
M	metionina
M1	proteina di matrice 1
M2	proteina di matrice 2
MA	proteina della matrice
mRNA	RNA messaggero
MVB	<i>Multivesicular Body</i>
Myr	Segnale di miristilazione
NA	neuraminidasi
NCBI	<i>National Center for Biotechnology information</i>
Nedd4	<i>Neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated-4</i>
NC	proteina nucleocapsidica
NP	nucleoproteina
NS	protein non-strutturali
NLS	segnale localizzazione nucleare
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P	prolina
PA	polimerasi acida
pb	paia di basi
PB1	polimerasi basica 1
PB2	polimerasi basica 2
PBS	tampone fosfato
PCR	reazione a catena della polimerasi
PFV	<i>Prototype Foamy virus</i>
PI3K	fosfoinositide 3-chinasi
PIV-5	<i>Paramyxovirus parainflueza-5</i>
PPxY	Pro-Pro-x-Tyr
PSAP	Pro-Ser-Ala-Pro
PTAP	Pro-Thr-Ala-Pro
P(T/S)AP	Pro-(Thr/Ser)-Ala-Pro
PTAPPEY	Pro-Thr-Ala-Pro-Pro-Glu-Tyr
PR	proteasi
p/v	peso su volume
R	arginina
Rab11	<i>Ras-related proteins in brain 11</i>
RACK1	<i>Receptor of activated c kinase 1</i>
rpm	rivoluzioni per minuto
RNA	acido ribonucleico
RNAsi	ribonucleasi
RRE	<i>Rev Responsive Element</i>
RSV	Virus Sarcoma di Rous
RT	retrotrascrittasi inversa

S	serina
SDS	sodio dodecil-solfato
SV40	Virus Vacuolante della Scimmia 40
T	treonina
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N,N',N'-tetrametiletilenediammina
TGN	<i>Trans Golgi Network</i>
Th	linfociti <i>T helper</i>
TM	proteina transmembrana
T _m	temperatura di fusione
Tsg101	<i>Tumor susceptibility gene 101</i>
U	unità enzimatica
U3	sequenza unica in 3'
U5	sequenza unica in 5'
Ub	ubiquitina
UTP	uridina trifosfato
UV	luce ultravioletta
VLP	<i>Virus Like Particles</i>
VPS	<i>Vacuolar Protein Sorting</i>
vRNP	ribonucleoproteine virali
Y	tirosina
YPxL	Tyr-Pro-x-Leu
YDDL	Tyr-Pro-Asp-Leu
v/v	volume su volume
WD	ripetizioni triptofano-aspartato
WHO	<i>World Health Organization</i>

9. BIBLIOGRAFIA

Arias CF, Escalera-Zamudio M, Soto-Del Río Mde L, Cobián-Güemes AG, Isa P, López S. 2009. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res.* 40:643-654.

Baigent SJ and McCauley JW. 2003. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *Bioessays.* 25: 657-671.

Bouvier NM and Palese P. 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 26:D49-53.

Brett IC and Johansson BE. 2009. In: Fulop T, Franceschi C, Hirokawa K, Pawelec G (Eds), Handbook on Immunosenescence: Basic Understanding and Clinical Applications, Volume 1, *Springer Publisher*, pp. 118-120.

Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrillov V, Massare M, Punsko P, Mytle N, Rowe T, Smith G, Ross TM. 2007. Influenza virus-like particles elicit a broader immune response than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine* 25: 3871-3878.

Bruce EA, Medcalf L, Crump CM, Noton SL, Stuart AD, Wise HM, Elton D, Bowers K, Digard P. 2009. Budding of filamentous and non-filamentous influenza A virus occurs via a VPS4 and VPS28-independent pathway. *Virology.* 390: 268-278.

Bruce EA, Digard P, Stuart AD. 2010. The Rab11 pathway is required for influenza A virus budding and filament formation. *J Virol.* 84:5848-5859.

Budimir N, Huckriede A, Meijerhof T, Boon L, Gostick E, Price DA, Wilschut J, De Haan A. 2012. Induction of heterosubtypic cross-protection against influenza by a whole inactivated virus vaccine: the role of viral membrane fusion activity. *PlosOne.* 1:e30898.

Cadena-Nava RD, Comas-Garcia M, Garmann RF, Rao-ALN, Knobler CM and Gelbart WM. 2012. Self-assembly of viral capsid protein and RNA molecule of different sizes: requirement for a specific high protein/RNA mass ratio. *J. Virol.* 86:3318-3326.

Calistri A, Sette P, Salata C, Cancellotti E, Forghieri C, Comin A, Göttlinger H, Campadelli-Fiume G, Palù G, Parolin C. 2007. Intracellular trafficking and maturation of herpes simplex virus type 1 gB and virus egress require functional biogenesis of multivesicular bodies. *J. Virol.* 81:11468-78.

Calistri A, Del Vecchio C, Salata C, Celestino M, Celegato M, Göttlinger H, Palù G, Parolin C. 2009a. Role of 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: 175-182.

Calistri A, Salata C, Parolin C, Palù G. 2009b. Role of multivesicular bodies and their components in the egress of enveloped RNA viruses. *Rev. Med. Virol.* 19: 31-45.

Carlson LA and Hurley JH. 2012. In vitro reconstitution of the ordered assembly of the endosomal sorting complex required for transport at membrane-bound HIV-1 Gag clusters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109:16928-33.

Chen BJ, Leser GP, Morita E, Lamb RA. 2007. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid derived virus-like particles. *J. Virol.* 81: 7111-7123.

Chen BJ and Lamb RA. 2008. Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT? *Virology.* 372: 221-232.

Chun S, Li C, Van Domselaar G, Wang J, Farnsworth A, Cui X, Rode H, Cyr TD, He R, Li X. 2008. Universal antibodies and their applications to the quantitative determination of virtually all subtypes of the influenza A viral hemagglutinins. *Vaccine.* 26: 6068-76.

Demirov D, Gabriel G, Schneider C, Hohenberg H, Ludwig S. 2012. Interaction of influenza A virus matrix protein with RACK1 is required for virus release. *Cell. Microbiol.* 14: 774-789.

Duan S, Boltz DA, Seiler P, Li J, Bragstad K, Nielsen LP, Webby RJ, Webster Rg, govorkova EA. 2010. Oseltamivir-resistant pandemic H1N1/2009 influenza virus possesses lower transmissibility and fitness in ferrets. *Plos. Path.* 6:1-10.

Enami M and Enami K. 1996. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J. Virol* 70:6653-6657.

Freed EO, Orenstein JM, Buckler-White AJ, and Martin MA 1994. Single amino acid changes in the human immunodeficiency virus type 1 matrix protein block virus particle production. *J. Virol.* 68: 5311-5320.

Galarza JM, Latham T, Cupo A. 2005. Virus-like particles (VLP) vaccine conferred complete protection against a lethal influenza virus challenge. *Viral. Immunol.* 18: 244-251.

Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Ramer PC, Lee M, Strowig T, Arrey F, Conenello G, Pypaert M, Andersen J, Garcia-Sastre A, Munz C. 2009. Matrix protein 2 of influenza virus blocks autophagosome fusion with lysosome. *Cell Host & Microbe.* 6: 367-380.

Garrus JE, von Schwedler UK, Pornillos OW, Morham SG, Zavitz KH, , Wang HE, Wettstein DA, Stray KM, Côté M, Rich RL, Myszka DG, Sundquist WI. 2001. Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell.* 107: 55-65.

Gomez-Puertas P, Albo C, Perez-Pastrana E, Vivo A, Portela A. 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J. Virol.* 74: 11538-11547.

Goodman AG, Heinen PP, Guerra S, Vijayan A, Sorzano CO, Gomez CE, Esteban M. 2011. A human multi-epitope recombinant vaccinia virus as a universal T cell vaccine candidate against influenza virus. *PLoS One*. 6: e25938.

Gorai T, Goto H, Noda T, Watanabe T, Kozuka-Hata H, Oyama M, Takano R, Neumann G, Watanabe S, Kawaoka Y. 2012. F1Fo-ATPase, F-type proton-translocating ATPase, at the plasma membrane is critical for efficient influenza virus budding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109: 4615-4620.

Göttlinger HG, Dorfman T, Sodroski JG, Haseltine WA. 1991. Effect of mutations affecting the p6 gag protein on Human Immunodeficiency Virus particle release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88: 3195-3199.

Göttlinger HG. 2010. Influenza exits the cell without an ESCRT. *Cell*. 142: 839-841.

Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. 2008. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. *J.Gen.Virol.* 89: 2359-2376.

Hanson PI, Roth R, Lin Y, Heuser JE. 2008. Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *J. Cell Biol.* 180: 389-402.

Haynes JR. 2009. Influenza virus-like particle vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 8: 435-445.

Hobert O. 2002. PCR fusion-based approach to create reporter gene constructs for expression analysis in transgenic *C. elegans*. *Biotechniques.* 32: 728-730.

Horimoto T and Kawaoka Y. 2005. Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 591-600.

Hui EK, Barman S, Yang TY, Nayak DP. 2003. Basic residues of the helix six domain of influenza virus M1 involved in nuclear translocation of M1 can be replaced by PTAP and YPDL late assembly domain motifs. *J. Virol.* 77: 7078-7092.

Hui EK, Barman S, Tang DH, France B, Nayak DP. 2006a. YRKL sequence of influenza virus M1 functions as the L domain motif and interacts with VPS28 and Cdc42. *J. Virol.* 80: 2291-2308.

Hui EK, Barman S, Yang TY, Tang DH, France B, Nayak DP. 2006b. Retraction. *J. Virol.* 80: 10289.

Kalciema I, Skrastina D, Ose V, Pumpens P and Zeltins A. 2012. Potatoes virus Y-Like particles as a new carrier for the presentation of foreign protein stretches. *Mol. Biotechnol.* 52: 129-139.

Kang SM, Song JM, Quan FS, Compans RW. 2009a. Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus Res.* 143: 140-146.

Kang SM, Yoo DG, Lipatov AS, Song JM, Davis CT, Quan FS, Chen LM, Donis RO, Compans RW. 2009b. Induction of long-term protective immune responses by influenza H5N1 Virus-like particles. *PLoS One.* 4: e4667.

Kang SM, Song JM, Compans RW. 2011. Novel vaccines against influenza viruses. *Virus Res.* 162: 31-38.

Kreijtz JHCM, Fouchier RAM, Rimmelzwaan GF. 2011. Immune responses to influenza virus infection. *Virus Res.* 162: 19-30.

Lata S, Schoehn G, Solomons J, Pires R, Gottlinger HG, Weissenhorn W. 2009. Structure and function of ESCRT-III. *Biochem. Soc. Trans.* 37: 156-160.

Latham T and Galarza JM. 2001. Formation of wild-type and chimeric influenza virus-like particles following simultaneous expression of only four structural proteins. *J. Virol.* 75: 6154-6165.

Liu Y and Harty RN 2010. Viral and host proteins that modulate filovirus budding. *Future Virol.* 5: 481-491.

Luttge BG, Shehu-Xhilaga M, Demirov DG, Adamson CS, Soheilian F, Nagashima K, Stephen AG, Fisher RJ, Freed EO. 2008. Molecular characterization of feline immunodeficiency virus budding. *J. Virol.* 82: 2106-2119.

Martin-Serrano J, Zang T, Bieniasz PD. 2001. HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat. Med.* 7: 1313-1319.

Martin-Serrano J, Perez-Caballero D, Bieniasz PD. 2004. Context-dependent effects of L domain and ubiquitination on viral budding. *J. Virol.* 78: 5554-5563.

Martin-Serrano J, Eastman SW, Chung W, Bieniasz PD. 2005. HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J. Cell Biol.* 168: 89-101.

McCown MF and Pekosz A. 2005. The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging. *J. Virol.* 79: 3595-3605.

McCown MF and Pekosz A. 2006. Distinct domains of the influenza A virus M2 cytoplasmic tail mediate binding to the M1 protein and facilitate infectious virus. *J. Virol.* 80: 8178-8189.

Morita E and Sundquist WI. 2004. Retrovirus Budding. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 395-425.

Morita E, Sandrin V, McCullough J, Katsuyama A, Hamilton IB, Sundquist WI. 2011. ESCRT-III protein requirements for HIV-1 budding. *Cell Host & Microbe* 9: 235-242.

Morita E. 2012. Differential requirements of mammalian ESCRTs in multivesicular body formation, virus budding and cell division. *FEBS J.* 279: 1399-406.

Muziol T, Pineda-Molina E, Ravelli RB, Zamborlini A, Usami Y, Gottlinger H, Weissenhorn W. 2006. Structural basis for budding by the ESCRT-III factor CHMP3. *Dev. Cell.* 10: 821-830.

Nagata K, Kawaguchi A, Naito T. 2008. Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Reviews in Medical Virology.* 18: 247-260.

Nayak DP, Hui EKW, Barman S. 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research.* 106: 147-165.

Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Research.* 143: 147-161.

Newmann G and Kawaoka Y 2006. Host range restriction and pathogenicity in the context of influenza pandemic. *Emer. Infect. Dis.* 12: 881-886.

Ono A and Freed EO. 1999. Binding of human immunodeficiency virus type 1 Gag to membrane: role of the matrix amino terminus. *J. Virol.* 73: 4136-4144.

Parent LJ, Bennett RP, Craven RC, Nelle TD, Krishna NK, Bowzard JB, Wilson CB, Puffer BA, Montelaro RC, Wills JW. 1995. Positionally independent and exchangeable late budding functions of the Rous sarcoma virus and human immunodeficiency virus Gag proteins. *J. Virol.* 69: 5455-5460.

Patton GS, Morris SA, Chung W, Bieniasz PD, McClure MO. 2005. Identification of domains in gag important for prototypic foamy virus egress. *J. Virol.* 79: 6392-6399.

Peacey M, Willson S, Baird MA and Ward VK. 2007. Versatile RHDV Virus like particles: incorporation of antigens by genetic modification and chemical conjugation. *Biotechnologies and bioengineering.* 98: 968-977.

Phillips TR, Lamont C, Konings DA, Shacklett BL, Hamson CA, Luciw PA, Elder JH. 1992. Identification of the Rev transactivation and Rev-responsive elements of feline immunodeficiency virus. *J. Virol.* 66: 5464-5471.

Pistello M, Vanucci L, Ravani A, Bonci F, Chiuppesi F, Del Santo B, Freer G, Bendinelli M. 2007. Streamlined desing of self-inactivating feline immunodeficiency virus vector for transducing ex vivo dendritic cells and T lymphocytes. *Genet. Vaccines Ther.* 19: 5-8.

Puffer BA, Parent LJ, Wills JW, Montelaro RC. 1997. Equine Infectious Anemia Virus utilizes a YXXL motif within the late assembly domain of the Gag p9 protein. *J. Virol.* 71: 6541-6546.

Quan FS, Huang C, Compans RW, Kang SM. 2007. Virus-like particle vaccine induces protective immunity against homologous and heterologous strains of influenza virus. *J Virol.* 81: 3514-3524.

Raiborg C and Stenmark H. 2009. The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitylated membrane proteins. *Nature.* 458: 445-452.

Rossman JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA. 2010. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell.* 142: 902-913.

Rossman JS and Lamb RA. 2011. Influenza virus assembly and budding. *Virology.* 411: 229-236.

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

Shaw KL, Lindemann D, Mulligan MJ, Goepfert PA. 2003. Foamy virus envelope glycoprotein is sufficient for particle budding and release. *J. Virol.* 77: 2338-2348.

Schmitt AP, Leser GP, Waning DL, Lamb RA. 2002. Requirements for budding of paramyxovirus simian virus 5 virus-like particles. *J. Virol.* 76: 3952-3964.

Silvestri LS, Ruthel G, Kallstrom G, Warfield KL, Swenson DL, Nelle T, Iversen PL, Bavari S, Aman MJ. 2007. Involvement of vacuolar protein sorting pathway in Ebola virus release independent of TSG101 interaction. *J Infect Dis.* 196: S264-70.

Song JM, Hossain J, Yoo DG, Lipatov AS, Davis CT, Quan FS, Chen LM, Hogan RJ, Donis RO, Compans RW, Kang SM. 2010. Protective immunity against H5N1 influenza virus by a single dose vaccination with virus-like particles. *Virology*. 405: 165-175.

Song JM, Wang BZ, Park KM, Van Rooijen N, Quan FS, Kim MC, Jin HT, Pekosz A, Compans RW, Kang SM. 2011. Influenza virus-like particles containing M2 induce broadly cross protective immunity. *PLoS One* 18: e14538.

Steel J, Lowen AC, Wang TT, Yondola M, Gao Q, Haye K, García-Sastre A, Palese P. 2010. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio*.1: e00018-10.

Strack B, Calistri A, Accola MA, Palu G, Gottlinger HG. 2000. A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 13063-13068.

Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Göttlinger HG. 2003. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell*. 114: 689-99.

Suzuki Y. 2005. Sialobiology of Influenza Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 28: 399-408.

Takebe Y., Seiki M., Fujisawa J., Hoy P., Yokotta K., Arai K., Yoshida M., Arai N. 1989. SR alpha promoter: an efficient and versatile mammalian cDNA expression system composed of the Simian Virus 40 early promoter and the R-U5 segment of Human T-cell Leukemia Virus type-1 long terminal repeat. *Mol. Cell Biol.* 8: 466-472.

Tamura S 2010. Studies on the usefulness of intranasal inactivated influenza vaccines. *Vaccine* 28: 6393-6397.

Tomonaga K and Mikami T. 1996. Molecular biology of the Feline Immunodeficiency Virus auxiliary genes. *J. Gen. Virol.* 77: 1611-1621.

Urata S, Noda T, Kawaoka Y, Morikawa S, Yokosawa H, Yasuda J. 2007. Interaction of Tsg101 with Marburg virus VP40 depends on the PPPY motif, but not the PT/SAP motif as in the case of Ebola virus, and Tsg101 plays a critical role in the budding of Marburg virus-like particles induced by VP40, NP, and GP. *J. Virol.* 81: 4895-4899.

Usami Y, Popov S, Weiss ER, Vriesema-Magnuson C, Calistri A, Göttlinger HG. 2012. Regulation of CHMP4/ESCRT-III function in human immunodeficiency virus type 1 budding by CC2D1A. *J. Virol.* 86: 3746-3756.

Yondola M and Carter C. 2011. Un-"ESCRT"-ed Budding. *Viruses.* 3: 26-31.

Wang D, Harmon A, Jin J, Francis DH, Christopher-Hennings J, Nelson E, Montelaro RC, Li F. 2010a. The lack of an inherent membrane targeting signal is responsible for the failure of the matrix (M1) protein of influenza A virus to bud into Virus-like particles. *J. Virol.* 84: 4673-4681.

Wang R, Song A, Levin J, Dennis D, Zhang NJ, Yoshida H, Koriazova L, Madura L, Shapiro L, Matsumoto A, Yoshida H, Mikayama T, Kubo RT, Sarawar S, Cheroutre H, Kato S. 2008. Therapeutic potential of a fully human monoclonal antibody against influenza A virus M2 protein. *Antiviral. Res.* 80: 168-177.

Wang TT, Tan GS, Hai R, Pica N, Ngai L, Ekiert DC, Wilson IA, García-Sastre A, Moran TM, Palese P. 2010b. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107:18979-18984.

Watanabe R and Lamb RA. 2010. Influenza virus budding does not require a functional AAA+ ATPase, VPS4. *Virus Res.* 153: 58-63.

Wei HJ, Chang W, Lin SC, Liu WC, Chang DK, Chong P, Wu SC. 2011. Fabrication of influenza virus-like particles using M2 fusion proteins for imaging single viruses and designing vaccines. *Vaccine.* 29: 7163-7172.

Weiss ER and Gottlinger H. 2011. The role of cellular factors in promoting HIV budding. *J. Mol. Biol.* 410: 525-533.

Wong SSY, Path MRC, Yuen KY. 2005. Avian influenza virus infections in humans. *Chest.* 129: 156-168.

Wu F, Huang JH, Yuan XY, Huang WS, Chen YH. 2007. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine* 25: 8868-8873.

Zeltins A. 2013. Construction and characterization of Virus-Like Particles: a review. *Mol Biotechnol.* 53: 92-107.

Siti internet:

1-WHO: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs211/en/index.html>;

2CDC: <http://www.cdc.gov/flu/professional/antivirals/antiviral-use-influenza.htm>.

10 RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto, voglio ringraziare mamma Carla e papà Alberto per avermi sostenuto, incentivato e per aver sempre creduto in me. Questo titolo lo dedico a voi! Grazie Rugg e Cate...le mie piccole pesti... ma anche i miei *life coach*!

Desidero ringraziare il Prof. Giorgio Palù per avermi dato la possibilità di svolgere il dottorato presso il Dipartimento di Medicina Molecolare.

Un grazie particolare alla mia tutor, la Dott.ssa Arianna Calistri, per la pazienza, i consigli e la fiducia in me riposta.

Desidero ringraziare anche il Dottor Cristiano Salata per il supporto e la gentilezza.

Ringrazio il Prof. Ignazio Castagliuolo e la Dott.ssa Paola Brun per avermi seguito negli esperimenti *in vivo* e per avermi dedicato tempo e forze.

Ringrazio tutte le persone del laboratorio e dell'ospedale...presenti e passate...perché da ognuno ho potuto imparare qualcosa...

A Michy, Samu, Ele e Ale un grazie enorme per tutto e veramente tutto...

A Genny...grazie perché mi stai insegnando cosa significano forza e coraggio!

Agli amici tutti e ai parenti...Grazieeee!!!

E a voi che non ci siete più... anche se è passato poco tempo,mi mancate un sacco e spero che siate contenti ...Ciao nonna Piera e nonno Mario!!!

11. PUBBLICAZIONI ALLEGATE

Parallelamente al lavoro descritto in questo lavoro di tesi e condotto durante questo dottorato, ho contribuito anche ad altri progetti di ricerca che sono stati oggetti di pubblicazione di seguito allegata:

Caduco M, Comin A, Toffoletto M, Munegato D, Sartori E, Celestino M, Salata C, Parolin C, Palù G, Calistri A. 2013 Tsg101 interacts with Herpes Simplex Virus 1 VP1/2 and is a substrate of VP1/2 ubiquitin-specific protease domain activity. *J. Virol.* 87(1): 692-696.