

 **PDF Complete**
Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.
[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

DOTTORATO DI RICERCA IN VIROLOGIA E BIOTECNOLOGIE MICROBICHE
XX CICLO

**CARATTERIZZAZIONE FUNZIONALE E RICERCA DI
PARTNERS PROTEICI CELLULARI DELLA SUBUNITA ϕ
ACCESSORIA, UL44, DELLA DNA POLIMERASI DEL
CITOMEGALOVIRUS UMANO**

Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Arianna Loregian

Dottoranda: Dott.ssa Elisa Sinigalia

31 GENNAIO 2008



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[*Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features*](#)

Indice

Proteina (in forma sintetica):	7
Sommario.....	9
Summary.....	11
1. Introduzione	13
1.1 Herpesvirus: caratteristiche generali.....	13
1.2 Citomegalovirus umano (HCMV)	14
1.2.a Generalità.....	14
1.2.b Struttura del virione	15
1.2.c Organizzazione del genoma.....	15
1.2.d Replicazione del virus e del genoma.....	16
1.2.e Epidemiologia e patogenesi delle infezioni da HCMV	17
1.2.f Prevenzione, profilassi e terapia delle infezioni da HCMV.....	18
1.3 Il complesso replicativo di HCMV.....	20
1.4 DNA polimerasi erpetiche.....	23
1.4.a Caratteristiche generali dell'enzima.....	23
1.4.b La subunità catalitica della DNA polimerasi di HCMV: UL54	25
1.4.c La subunità accessoria della DNA polimerasi di HCMV: UL44	26
1.4.d Interattori proteici virali di UL44	29
1.4.e Inibitori dell'interazione tra le subunità delle DNA polimerasi erpetiche	30
1.5 Nuclear Bodies (NB)	32
1.5.a Generalità.....	32
1.5.b Formazione e mantenimento	32
1.5.c Funzioni	33
1.5.d Il processo di sumoilazione	34
1.5.e Substrati di SUMO e funzioni del processo di sumoilazione	37
1.5.f Alcune delle proteine che compongono gli NB e loro interazione con il processo di sumoilazione	38
PML	38
SP100.....	39
Daxx.....	40
TOPORS (<i>topoisomerase 1-binding RS protein</i>)	40
1.6 L'èxosoma.....	41
1.6.a Caratteristiche generali.....	41
1.6.b Proteine che compongono l'èxosoma	41
1.6.c Funzioni	43
1.7 Il ciclo cellulare e le chinasi ciclino-dipendenti.....	44
1.7.a Le chinasi ciclino-dipendenti cdc2 e cdk2	44
1.7.b Ruolo di cdc2 nella replicazione di HSV-1	44
1.8 Le interazioni proteina-proteina e le tecniche impiegate per	46
il loro studio	46
1.8.a Il sistema del doppio ibrido: aspetti storici, caratteristiche e applicazioni.....	47
1.8.b GST-pulldown	49
2. Scopo	51
3. Materiali e Metodi	53
3.1 Reagenti e materiali	53
3.1.a Proteine.....	53
3.1.b Reagenti.....	53
3.1.c Oligonucleotidi sintetici	54
Preparazione oligonucleotidi ds	56

	56
Terreni di coltura.....	56
3.2.b Terreni di coltura.....	56
3.3 Plasmidi.....	57
3.3.a Plasmidi utilizzati nel sistema di doppio ibrido.....	57
3.3b pRSETA	58
3.3.d pSI	59
3.3.e Altri plasmidi	59
3.4 Trasformazione batterica mediante elettroporazione.....	61
3.4.a Preparazione di batteri elettrocompetenti.....	61
3.4.b Trasformazione mediante elettroporazione	61
3.5 Trasformazione chimica di cellule di lievito.....	61
3.5.a Metodo rapido di trasformazione	61
3.5.b Trasformazione ad alta efficienza	62
3.5.c Trasformazione in larga scala	62
3.6 Saggio di attività -galattosidasica (saggio X-gal).....	63
3.7 Saggio di selezione con 3-AT.....	63
3.8 Tecniche di biologia molecolare.....	63
3.8.a Estrazione e purificazione di DNA plasmidico da <i>E. coli</i>	63
3.8.b Estrazione di DNA plasmidico da cellule di lievito.....	64
3.8.c Taglio di DNA con enzimi di restrizione	64
3.8.d PCR (öpolymerase chain reactionö, reazione a catena della polimerasi)	64
3.8.e Separazione dei frammenti di DNA con gel di agarosio	65
3.8.f Purificazione di DNA plasmidico da gel	65
3.8.g Legazione di frammenti di DNA	65
3.8.h Sequenziamento	65
3.8.i Mutagenesi sito-diretta.....	66
3.9 Trascrizione e traduzione in vitro delle proteine.....	66
3.10 Saggio GST-pulldown.....	67
3.11 Analisi elettroforetica di proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS PAGE).....	67
3.12 Trasfezione	68
3.13 Western blot.....	68
3.14 Saggi di attività DNA polimerasica in vitro	69
3.15 Saggi di processività	69
3.16 Saggi di legame al DNA su filtro	70
3.17 EMSA (electrophoretic mobility shift assay).....	70
3.18 Calcolo dei parametri relativi a interazioni elettrostatiche.....	71
4. Risultati	73
4.1 Caratterizzazione del ruolo della dimerizzazione di UL44.....	73
4.1.a Analisi della capacità della proteina UL44 intera di formare dimeri in soluzione	73
4.1.b Analisi dell'effetto delle mutazioni L86A/L87A e F121A sulla dimerizzazione di UL44 mediante il sistema del doppio ibrido.....	74
Costruzione dei plasmidi esprimenti le proteine di fusione wt e i mutanti.....	75
Trasformazione dei lieviti con i plasmidi ottenuti e saggio X-gal.....	76
4.1.c Analisi dell'effetto delle mutazioni L86A/L87A e F121A sulla capacità di UL44 di interagire con UL54 mediante saggi di doppio ibrido	78
4.1.d Analisi dell'effetto delle mutazioni L86A/L87A e F121A sulla capacità di UL44 di interagire con altri interattori virali noti.....	79

dei mutanti di UL44 che non dimerizzano di stimolare da UL54.....	80
Saggi di processività	80
Saggi di processività	82
4.1.f Effetto delle mutazioni che inibiscono la dimerizzazione di UL44 sulla replicazione del DNA di HCMV <i>in vivo</i>	83
Costruzione dei plasmidi pSI-UL44 <i>wild type</i> (wt) e mutanti	83
Risultati del saggio di complementazione della replicazione del DNA di HCMV	83
4.2 Caratterizzazione dell'attività di legame al DNA di UL44.....	86
4.2.a Analisi del legame di UL44 ad oligonucleotidi a singolo e doppio filamento mediante saggi su filtro.....	86
4.2.b Analisi dell'affinità di legame di UL44 per oligonucleotidi a doppio filamento e calcolo della stechiometria del legame UL44-DNA mediante saggi EMSA	91
4.2.c Analisi dell'effetto della variazione di concentrazione di sali mono- e divalenti sull'affinità di UL44 per il DNA	93
4.3 Ricerca e caratterizzazione preliminare di partners proteici cellulari di UL44.....	98
4.3.a Costruzione del plasmide pBTMK	99
4.3.b Costruzione del plasmide pBTMK-UL44 codificante la proteina öescaö LexA-UL44	100
4.3.c Caratterizzazione della proteina di fusione LexA-UL44	100
4.3.d <i>Screening</i> dell'interazione di UL44 con una libreria cellulare.....	102
Descrizione dello <i>screening</i>	102
Caratterizzazione dei lieviti trasformati.....	102
a). Saggi X-gal	102
b). Saggi con 3-AT	103
4.3.e Analisi dei cloni positivi ai due geni reporter.....	107
Trasformazione di <i>E. coli</i> con il DNA plasmidico estratto dai cloni di lievito risultati positivi sia al saggio X-gal che al saggio con 3-AT e analisi di tale DNA plasmidico	107
a). Recupero dei plasmidi da lievito.....	107
b). Trasformazione di <i>E. coli</i> e selezione con ampicillina.....	107
c). Estrazione del DNA plasmidico da <i>E. coli</i> e analisi di restrizione	107
Ritrasformazione di lieviti con il DNA plasmidico precedentemente caratterizzato e analisi della loro attività -galattosidasica e della capacità di crescita in presenza di 3-AT.....	108
a). Ritrasformazione dei lieviti e saggio X-gal	108
b). Riconferma, mediante saggi con 3-AT, della positività dei cloni di lievito ritrasformati e positivi ai saggi X-gal	112
Sequenziamento del DNA plasmidico dei cloni positivi di lievito	114
Sommario dei risultati finali ottenuti nello <i>screening</i> con öesca LexA-UL44	115
4.3.f Caratterizzazione preliminare degli interattori proteici di UL44 identificati durante lo <i>screening</i> con il sistema del doppio ibrido	116
Clonaggio in pACT2 dei geni codificanti le proteine intere e riconferma della loro interazione con UL44 mediante saggi X-gal.....	116
Clonaggio in pBTMK dei geni codificanti le proteine intere e riconferma della loro interazione con UL44 mediante saggi X-gal.....	117
Clonaggio in pRSET dei geni codificanti le proteine intere e conferma dell'interazione con UL44 tramite saggi <i>GST-pulldown</i>	119

.....	123
..... a dimerizzazione di UL44.....	123
..... i legame al DNA di UL44.....	125
5.2.a UL44 lega il DNA come dimero.....	126
5.2.b Legame di UL44 a frammenti di DNA di diversa lunghezza.....	126
5.2.c Il legame di UL44 al DNA coinvolge interazioni elettrostatiche.....	127
5.2.d Confronto tra UL44 e altri fattori di processività.....	127
5.2.e UL44: legame al DNA e meccanismo di processività.....	129
5.3 Ricerca e caratterizzazione preliminare di partners proteici cellulari di UL44..	129
Cdc2 e cdk2.....	130
EXOSC9.....	130
Ubc9, SP100, Daxx e TOPORS.....	130
6. Bibliografia.....	133

zioni (in ordine alfabetico):

3-AT: 3-amminotriazolo
A: adenina (base)
aa: amminoacido(i)
AD: *activation domain*
ANT: *Adenosine Nucleoside Transporter*
ATP: adenosina trifosfato
BD: *binding domain*
BHV: herpesvirus bovino
bp: *base pair*, paio di basi
C: citosina; oppure (°) Celsius
cDNA: *complementary DNA*
Daxx: *death-associated protein 6*
DMSO: dimetilsolfossido
DNA: *Deoxyribonucleic acid*, acido deossiribonucleico
ds/ss DNA: *double/single stranded DNA*, DNA a doppio/singolo filamento
DTT: ditionitrotolo
E. coli: *Escherichia coli*
EBV: Epstein-Barr virus
EDTA: Acido etilen-diammino tetraacetico (disodico)
EHV: herpesvirus equino
EXOSC9: *exosome component 9*
G: guanosina (base)
GST: glutatione-S transferasi
h: ora(e)
HCMV: Citomegalovirus umano
HHV: Herpesvirus umano
HP: *histon protein*
HSV: Herpes simplex virus
IE: *Immediate Early*, precoce immediato
IRs: *Inverted Repeats*, ripetizioni invertite
kb: kilobasi
kDa: kiloDalton
L: *long*, lungo; oppure *late*, tardivo; oppure litro
Maxiprep: maxi preparazioni
MCMV: citomegalovirus murino
MCS: *Multiple Cloning Site*, sito di clonaggio multiplo
min: minuto(i)
mRNA: RNA messaggero
NB: *Nuclear Bodies*
ND10: *nuclear domain 10*
NLS: *nuclear localization signal*
OD: *Optical density*, densità ottica
ORF: *Open Reading Frame*, putativa sequenza genica
PCR: *Polymerase Chain Reaction*, reazione a catena della DNA polimerasi
PEG: poli-etilen glicole
PML: *Promyelocytic Leukemia*
PRV: virus della pseudorabbia

SDS: sodio dodecil solfato

SDS-PAGE: *SDS-Polyacrilamide Gel Electrophoresis*, elettroforesi in gel di poliacrilammide

sec: secondo(i)

SUMO: *Small Ubiquitin-related MODifier*

T: timidina (base); oppure Temperatura

TAE: Tris-acetato-EDTA

TE: Tris-EDTA

T_m : *Melting Temperature*, temperatura di fusione

TOPORS: *topoisomerase I-binding RS protein*

Tris: Tris (idrossimetil) amminometano

TRs: *Terminal Repeats*, ripetizioni terminali

Ubc9: *Ubiquitin conjugating enzyme E2*

$U_{L,S}$: *Unique long/short*, (regione) unica lunga o corta

UTR: *Untranslated Region*, regione non tradotta

UV: ultravioletto

vICA: *viral Inhibitor of Caspase-8-Induced Apoptosis*

vMIA: *viral Mitochondria-localised Inhibitor of Apoptosis*

VZV: Varicella-Zoster virus

Sommario

La DNA polimerasi del citomegalovirus umano (HCMV) è un complesso eterodimerico costituito da una subunità catalitica, UL54, e da una subunità accessoria, UL44. UL44 è una fosfoproteina che lega il DNA a doppio filamento con alta affinità, è in grado di interagire in maniera specifica con UL54 e si suppone stimoli la processività della DNA polimerasi virale. La recente risoluzione della struttura cristallografica dei residui amminoacidici 1-290 di UL44 ha dimostrato che UL44 forma omodimeri. Sono stati inoltre identificati i residui importanti per la dimerizzazione (F121, L86, L87) ed è stato dimostrato che i mutanti UL44 F121A e UL44 L86A/L87A si comportano come monomeri e presentano una ridotta capacità di legare il DNA. UL44 presenta inoltre una regione che contiene diversi residui basici e può essere coinvolta nel legame al DNA mediante la formazione di interazione elettrostatiche con lo scheletro di fosfati del DNA. In questo lavoro di tesi sono stati condotti degli esperimenti per chiarire il ruolo e l'importanza della dimerizzazione di UL44 per le sue funzioni. È stata innanzitutto dimostrata la capacità di dimerizzare della proteina UL44 intera. È stata quindi valutata la capacità dei mutanti di UL44 che non dimerizzano di interagire con la subunità catalitica UL54 e di stimolarne l'attività. I risultati ottenuti indicano che i mutanti della dimerizzazione di UL44 interagiscono con UL54 e ne stimolano l'attività in maniera analoga a quella della proteina wt. Inoltre, i mutanti di UL44 che non dimerizzano mantengono la capacità di interagire con altri interattori noti virali di UL44 (UL97 e UL114) mentre risultati preliminari indicano che non siano in grado di interagire con la proteina UL84. Infine, per meglio chiarire il ruolo della dimerizzazione di UL44, è stato studiato (in collaborazione con il Prof. Pari, University of Nevada) l'effetto di queste mutazioni (F121A e L86A/L87A) sulla replicazione del DNA virale *in vivo* mediante un saggio di cotrasfezione. I risultati ottenuti indicano che la dimerizzazione di UL44 è essenziale per la replicazione del DNA virale e ciò suggerisce che il dimero di UL44 possa rappresentare un buon bersaglio per lo sviluppo di farmaci antivirali, così come dimostrato per l'interazione UL54/UL44.

Sebbene sia stato dimostrato che UL44 lega il DNA a doppio filamento, non sono però ancora chiari i dettagli di questa interazione e che ruolo abbia questo legame nella funzione di fattore di processività. Per cercare di chiarire come avviene e che ruolo ha il legame di UL44 al DNA, sono stati effettuati degli esperimenti di *filter-binding* ed EMSA. Inoltre, al fine di studiare l'effetto della forza ionica sull'attività di legame al DNA di UL44, i saggi su filtro sono stati effettuati in presenza di diverse concentrazioni di sale. I risultati ottenuti indicano che UL44 lega il DNA con una costante di affinità nell'ordine delle nanomoli, in maniera diretta e indipendentemente dall'idrolisi di ATP o da proteine accessorie. È stato inoltre dimostrato che UL44 lega il DNA come dimero, in maniera sequenza-indipendente e presenta affinità di legame 3-8 volte maggiore per il DNA ds rispetto al DNA ss. La lunghezza minima di DNA a cui UL44 è in grado di legarsi è di 12 bp. Inoltre, è stato evidenziato che l'affinità di UL44 per il DNA ds diminuisce all'aumentare della forza ionica e che questo effetto è legato al rilascio di cationi in soluzione; questo suggerisce che nel legame di UL44 al DNA siano coinvolte interazioni elettrostatiche tra i residui di lisina carichi positivamente della proteina e lo scheletro di fosfati del DNA.

Infine, alcune evidenze suggeriscono che UL44, oltre alla funzione di fattore di processività della DNA polimerasi virale, possa svolgere altri ruoli durante il ciclo replicativo di HCMV. Infatti UL44 continua ad essere espressa anche nelle fasi tardive della replicazione, è più abbondante rispetto alla subunità catalitica UL54 e inoltre altri fattori di processività con struttura e funzione simile a quella di UL44 interagiscono con

in le rispettive subunità catalitiche. Infine, la natura
re al secondo monomero di legare altre proteine
nte il ciclo replicativo virale.

Sulla base di questi presupposti, scopo di questo studio è stato anche la ricerca di possibili interattori cellulari di UL44 per poter individuare altri eventuali ruoli di questa proteina durante il ciclo replicativo virale. A tale scopo è stato effettuato uno *screening* con il sistema dei due ibridi utilizzando una libreria di cDNA cellulare. Tale *screening* ha portato all'identificazione di alcune proteine cellulari che potrebbero rappresentare interattori funzionali di UL44. Tra queste vi sono quattro delle proteine che compongono i *nuclear bodies*, ossia Ubc9 (un enzima coinvolto nella cascata sumoilativa), SP100 (una proteina in grado di legare le HP-1 [*Histon Protein-1*]), TOPORS (*topoisomerase 1-binding RS protein*, una proteina in grado di legare la topoisomerasi 1) e Daxx (*death-associated protein 6*, una proteina che controlla l'apoptosi); inoltre, altri potenziali interattori sono EXOSC9 (*exosome component 9*, uno dei componenti del complesso dell'exosoma umano) e infine le protein chinasi ciclina-dipendenti cdc2 e cdk2. L'interazione di UL44 con alcune di queste proteine (cdc2, cdk2, EXOSC9, Ubc9, SP100) è stata riconfermata anche mediante saggi *GST-pulldown*. Questo studio ha portato quindi all'identificazione di alcuni potenziali interattori cellulari di UL44, suggerendo che questa proteina virale potrebbe svolgere altri ruoli oltre a quello di fattore di processività della DNA polimerasi di HCMV. Ulteriori studi saranno comunque necessari per dimostrare se tali proteine sono veri interattori di UL44 e per chiarire il ruolo funzionale di queste interazioni.

Summary

The human cytomegalovirus (HCMV) DNA polymerase consists of a catalytic subunit, UL54, and an accessory protein, UL44, that is thought to act as a processivity factor. UL44 is a phosphoprotein that has been shown to bind double-stranded DNA, to specifically interact with UL54 and to stimulate long-chain DNA synthesis by UL54.

The crystal structure of UL44 has recently been solved and has revealed that UL44 possesses a structural fold similar to that of other processivity factors, including herpes simplex virus UL42 and the eukaryotic sliding clamp PCNA. It has also been shown that UL44 forms a homodimer. Similarly to UL42, the putative DNA-binding face of UL44 contains multiple basic residues that could interact electrostatically with the phosphate backbone of DNA.

Residues important for the dimerization of UL44 have been identified: L86, L87 and F121. Indeed, the F121A and L86A/L87A mutants, which behave like monomers, are impaired in the ability to bind double-strand DNA.

In this work we performed some experiments to better understand the role of UL44 dimerization *in vivo*. We demonstrated that, as already shown for truncated UL44 C290, full-length UL44 can form dimers both in solution and in a cellular context. Moreover, while UL44 dimerization has been shown to be important for binding to DNA, it appears to be not required for binding to UL54 and for stimulation of DNA synthesis by UL54 *in vitro*. We also investigated the ability of UL44 dimerization mutants to interact with known viral protein partners of UL44. While the mutants retained the ability to interact with UL97 and UL114, they were impaired in the ability to bind UL84 protein. Finally, we investigated the effect of the L86A/L87A and F121A mutations of UL44 on viral DNA replication through an *in vivo* assay. The homodimerization of UL44 turned out to be essential for the replication of the viral DNA in a cellular context. This observation suggests that the disruption of UL44 dimerization could represent a good strategy for the development of new antiviral compounds.

How UL44 binds to DNA and the role of DNA binding in processivity function have not been yet elucidated. To begin to understand these mechanism, we characterized the interaction of UL44 with DNA by means of filter-binding assays and electrophoretic mobility shift assays (EMSA). We found that, similar to HSV-1 UL42, UL44 binds directly to DNA with nanomolar affinity in a manner that does not require ATP hydrolysis or accessory proteins. UL44 binds DNA as a dimer in a sequence-non specific manner and displays higher affinity for ds DNA compared to ss DNA. The shortest length to which UL44 is able to bind in a detectable manner in filter-binding assays is 12 bp. Affinity of UL44 for ds DNA decreases with increasing ionic strength and this effect is mediated by ion release, suggesting that DNA binding entails electrostatic interactions between the negatively charged phosphates on DNA backbone and the positive charge of basic residues on the \bar{o} back \bar{o} face and disordered loops of UL44.

Finally, several observations suggest that UL44 could have other function(s) besides that of DNA processivity factor. Indeed, UL44 is more abundant than the viral DNA polymerase subunit UL54; UL44 has a leaky-late expression, and other processivity factors, like PCNA, interact with a wide array of other cellular proteins in addition to the DNA polymerase catalytic subunit. Moreover, the dimeric nature of UL44 could allow the second subunit of the complex to act as a scaffold to recruit other viral or cellular proteins during viral replication. Hence, we performed a two-hybrid system screening in order to identify cellular protein partners of UL44 using a cellular cDNA

1. Introduzione

1.1 Herpesvirus: caratteristiche generali

La famiglia *Herpesviridae* comprende molti virus, patogeni sia per l'uomo che per molti animali. Le manifestazioni patologiche delle infezioni da herpesvirus sono conosciute fin dall'antichità, tanto che il nome *herpes* deriva da una parola greca che significa insinuarsi.

Questi virus hanno alcune caratteristiche comuni, ma si differenziano anche per molti aspetti, in modo tale da poterli classificare in tre sottofamiglie sulla base dell'organizzazione del genoma, del tropismo tissutale, della citopatologia, della sede dell'infezione latente, nonché della patogenesi e dei sintomi clinici.

Le tre sottofamiglie sono:

a) *Alphaherpesvirinae*: a cui appartengono il virus dell'herpes simplex di tipo 1 e 2 (HSV-1 e -2), il virus della varicella-zoster (VZV), il virus della pseudorabbia (PRV), l'herpesvirus equino di tipo 1 e 4 (EHV-1 e -4), l'herpesvirus equino di tipo 3 (EHV-3) e l'herpesvirus bovino di tipo 1 (BHV-1).

b) *Betaherpesvirinae*: a cui appartengono il citomegalovirus umano e murino (HCMV e MCMV), gli herpesvirus umani di tipo 6 e 7 (HHV-6 e -7).

c) *Gammapherpesvirinae*: a cui appartengono il virus di Epstein-Barr (EBV), l'herpesvirus saimirii (HVS), l'herpesvirus umano di tipo 8 (HHV-8) e l'herpesvirus equino di tipo 2 e 5 (EHV-2 e -5).

Gli herpesvirus sono in generale un gruppo diversificato di virus a DNA di notevoli dimensioni, caratterizzati da una comune morfologia del virione, strategia replicativa e capacità di instaurare infezioni latenti/ricorrenti e litiche e, nel caso di EBV e HHV-8, anche immortalizzanti e con potenziale oncogenico.

Gli herpesvirus sono virus ubiquitari e le loro infezioni sono molto diffuse. Nell'uomo sono associati generalmente a patologie benigne, ma possono essere anche responsabili di elevata morbilità e mortalità in individui immunodepressi.

La struttura del virione è comune a tutti gli herpesvirus: presenta un genoma di notevoli dimensioni a DNA a doppio filamento associato a proteine che vanno a formare il nucleocapside, che è a sua volta circondato da un rivestimento glicoproteico detto pericapside.

Lo spazio compreso tra capsidi e pericapsidi è detto tegumento e contiene proteine ed enzimi virali che favoriscono l'inizio della replicazione. Come tutti i virus provvisti di pericapside, gli herpesvirus sono sensibili agli acidi, ai solventi, ai detergenti e all'essiccamento. L'organizzazione del genoma e il ciclo replicativo sono molto simili tra i membri della famiglia e saranno descritti più avanti in dettaglio per HCMV.

Il genoma è trascritto dall'enzima RNA polimerasi II dell'ospite, ma la trascrizione risulta essere sotto il controllo di proteine sia virali che cellulari. L'interazione tra questi fattori determina se l'infezione sarà litica, persistente o latente.

In tabella 1.1 sono riportati alcuni membri della famiglia *Herpesviridae* con le relative caratteristiche.

		BERSAGLIO PRIMARIO	SEDE DI LATENZA	TRASMISSIONE
	o 1 e 2			Stretto contatto
	virus della varicella-Zoster			Stretto contatto
<i>-Herpesvirinae</i>	Virus della pseudorabbia Herpesvirus equino di tipo 1 e 4 Herpesvirus equino di tipo 3 Herpesvirus bovino di tipo 1	Cellule mucopolituali	Neuroni	Stretto contatto e via respiratoria
<i>β-Herpesvirinae</i>	Citomegalovirus umano e murino	Monociti, linfociti, cellule epiteliali	Monociti, linfociti e?	Stretto contatto, trapianto, trasfusioni, congenita
	Herpesvirus umano di tipo 6 e 7	Cellule T e ?	Cellule T e?	Stretto contatto e via respiratoria
<i>-Herpesvirinae</i>	Virus di Epstein-Barr	Cellule B e epiteliali	Cellule B ed epiteliali	Saliva
	Virus associato al sarcoma di Kaposi (HHV-8) Herpesvirus equino di tipo 2 e 5	?	?	Saliva

Tabella 1.1: Membri della famiglia *Herpesviridae* e classificazione nelle tre sottofamiglie *alpha*, *beta* e *gamma*herpesvirinae (da *Fields Virology*, 4ª edizione, 2001, modificata).

1.2 Citomegalovirus umano (HCMV)

1.2.a Generalità

Il citomegalovirus umano (HCMV) è così denominato in quanto la caratteristica istologica dell'infezione da HCMV è la cellula citomegalica (figura 1.1): una cellula ingrandita (25-35 μm) con una voluminosa inclusione intranucleare e una o più inclusioni intracitoplasmatiche eosinofile formate da ammassi di virus neoformati e lisosomi.

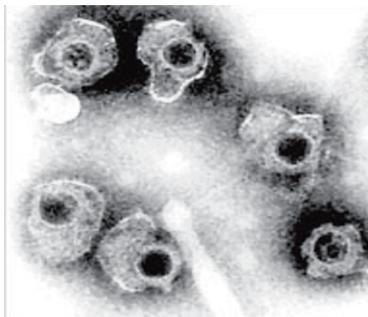


Figura 1.1: Citopatologia dell'infezione da HCMV (da Varnum *et al.*, 2004).

HCMV appartiene alla sottofamiglia *Betaherpesvirinae* ed è un virus ubiquitario specie-specifico responsabile di una varietà di patologie nei pazienti immunocompromessi, ma solo raramente causa malattie in individui immunocompetenti. È inoltre una delle maggiori cause di difetti congeniti nei neonati.

Il virione di HCMV è costituito da quattro elementi (figura 1.2), comuni a tutti gli herpesvirus: (a) un core elettron-opaco toroidale contenente una grossa molecola di dsDNA (*double-stranded DNA*, DNA a doppio filamento) associata a proteine; (b) un capside icosaedrico proteico con diametro di 100 nm, che racchiude il core, costituito da 162 capsomeri (150 esagonali e 12 pentamerici); (c) un tegumento amorfo che circonda il capside; e (d) un involucro esterno, *envelope*, contenente glicoproteine codificate dal virus (Wildy & Watson, 1963) che conferisce al virione un diametro finale di 180 nm.

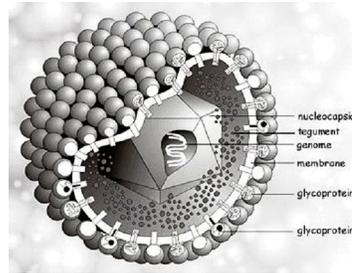


Figura 1.2: Struttura del virione di HCMV.

1.2.c Organizzazione del genoma

Il DNA di HCMV è lineare e a doppio filamento. Il ceppo di HCMV di cui per primo è stato completamente sequenziato il genoma è il ceppo di laboratorio AD169 (Rowe *et al.*, 1956), la cui sequenza è costituita da 230283 bp ed è tra i genomi virali animali più grandi e complessi. Attraverso lo studio diretto o per omologia con altri herpesvirus, nel genoma di HCMV sono stati identificati 213 geni.

Il genoma di HCMV è molto ricco in guanina (G) e citosina (C) ed è costituito da due frammenti covalentemente legati, detti L (frammento lungo, *long*) e S (frammento corto, *short*). Gli elementi L e S possono invertire la loro posizione l'uno rispetto all'altro, dando quattro possibili isomeri lineari (Hayward *et al.*, 1975). Il frammento L comprende un'unica sequenza (U_L) con alle estremità lunghe sequenze ripetute ed invertite b (TR_L/IR_L) e il componente S consiste in un'unica sequenza (U_S) fiancheggiata dalle sequenze ripetute ed invertite c (TR_S/IR_S ; Figura 1.3). È presente una sequenza diritta ripetuta nella parte terminale del genoma e nella zona di giunzione tra L e S che promuove l'inversione del genoma e, grazie a dei segnali in *cis*, detti pac-1 e pac-2, il taglio e l'impacchettamento del genoma (Kemble & Mocarski, 1989).

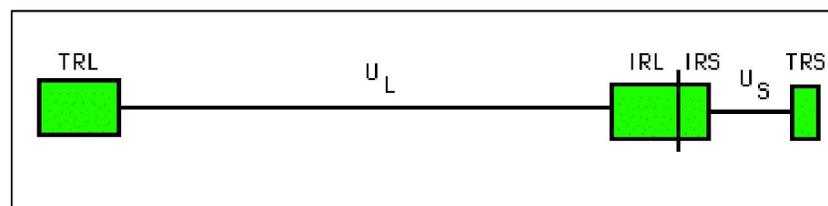


Figura 1.3: Rappresentazione schematica del genoma di HCMV: sono rappresentate le due sequenze uniche U_L e U_S affiancate dalle sequenze ripetute invertite rispettivamente TR_L/IR_L e IR_S/TR_S .

genoma

L'infezione inizia quando il virus interagisce con i recettori cellulari (fase di adsorbimento; Figura 1.4). Il legame alla superficie cellulare attiva un processo mediato da proteine virali di superficie che provoca la fusione dell'involucro virale esterno con la membrana plasmatica cellulare, consentendo al nucleocapside virale di penetrare direttamente nel citoplasma. In seguito all'ingresso del virus nella cellula, i capsidi sono trasportati attraverso i pori nucleari ed il DNA virale viene così rilasciato nel nucleo. In tale sede avvengono quindi la trascrizione, la replicazione del DNA virale e l'assemblaggio dei nuovi capsidi.

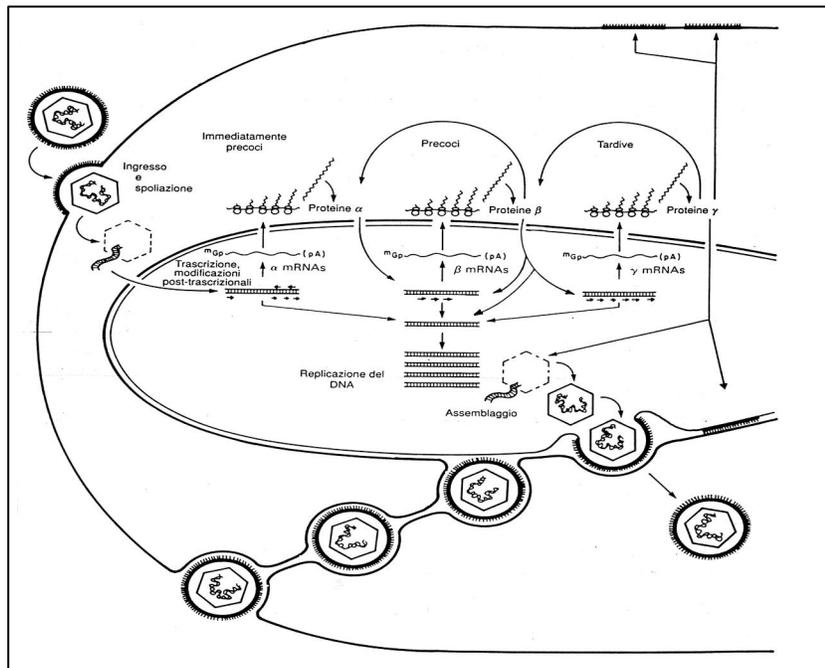


Figura 1.4: Ciclo replicativo di HCMV: sequenza di eventi nella replicazione di HCMV dall'ingresso del virus nella cellula bersaglio d'infezione fino all'assemblaggio e alla liberazione dei virioni (da Roizman & Sears, 1987, modificata).

Il DNA virale viene trascritto dalla RNA polimerasi II dell'ospite, tuttavia anche numerose proteine virali partecipano ad ogni stadio dell'infezione. La trascrizione del DNA virale e la sintesi dei prodotti genici è strettamente regolata. I geni, che vengono trascritti sequenzialmente a cascata, sono raggruppabili in almeno 3 gruppi (α , β , γ) sulla base di regolazioni sia trascrizionali che post-trascrizionali.

I geni α (precoci immediati o *Immediate-Early*, IE) sono i primi ad essere trascritti e regolano altri geni virali e cellulari dopo essere stati processati e tradotti. L'espressione dei geni α inizia immediatamente dopo l'entrata del virus nella cellula ospite. Le proteine IE creano all'interno della cellula bersaglio un ambiente favorevole alla replicazione del genoma virale inibendo l'apoptosi e la sintesi del DNA cellulare, bloccando la risposta del sistema immunitario e sfruttando il macchinario trascrizionale-traduzionale cellulare in modo da sintetizzare le proteine virali. Anche l'infezione latente e la riattivazione sono regolate dall'attività dei prodotti dei geni IE.

Delayed Early δ (DE) vengono espressi successivamente. L'espressione del genoma, infatti, viene denominata a cascata. I prodotti precedenti sono richiesti per l'espressione dei prodotti successivi (Figura 1.5). Tra i polipeptidi del gruppo β sono comprese anche le proteine del complesso di replicazione del DNA (UL44, UL54, UL57, UL70, UL102 e UL105). Dopo la trascrizione dei geni β inizia la replicazione del DNA virale. I geni γ (tardivi o δ Late δ , L) codificano principalmente proteine strutturali, infatti codificano proteine del capside, del tegumento e dell'envelope.

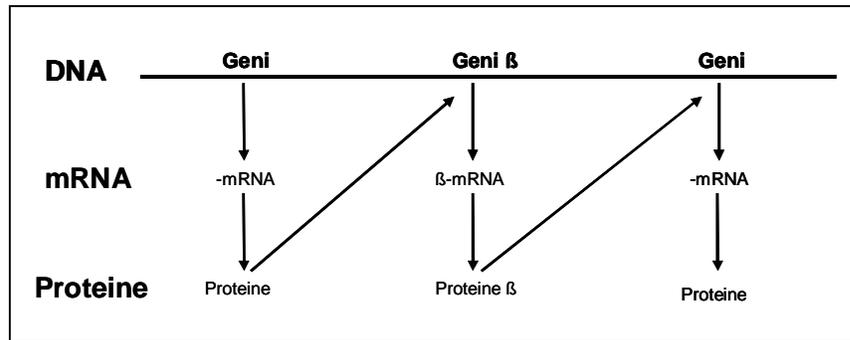


Figura 1.5: Cascata regolativa dell'espressione dei geni di HCMV

Il genoma virale viene sintetizzato dalla DNA polimerasi virale con un meccanismo detto a circolo rotante (*rolling circle*), formando concatameri che vengono poi tagliati in monomeri e impacchettati all'interno dei capsidi. L'assemblaggio delle particelle virali avviene in più fasi: dopo l'impacchettamento del DNA nei capsidi preassemblati, avviene la gemmazione del virus attraverso il foglietto interno della membrana nucleare; una volta trasportati a livello della membrana plasmatica attraverso il citoplasma, i virioni di nuova sintesi vengono rilasciati all'esterno della cellula per esocitosi o lisi cellulare (Figura 1.4).

Il virus può rimanere in latenza in cellule mieloidi, inclusi i precursori di granulociti, macrofagi, cellule dendritiche e cellule endoteliali. Durante la latenza l'espressione genica virale è limitata ai trascritti associati alla latenza e il genoma virale è mantenuto in forma di plasmide extracromosomiale. La riattivazione può essere causata da vari fattori tra cui: i) citochine che stimolino la differenziazione dei precursori cellulari in cui il virus è in latenza, rendendo la cellula permissiva all'infezione; ii) amplificazione virale dovuta ad una immunodeficienza; iii) malattie concomitanti.

1.2.e Epidemiologia e patogenesi delle infezioni da HCMV

HCMV è un patogeno ubiquitario che causa un ampio spettro di malattie sia nell'adulto che nel bambino. HCMV è molto diffuso tra la popolazione, infatti, il 50-90% degli adulti sono sieropositivi; la sieroprevalenza dipende da fattori socio-economici e dalla localizzazione geografica (Gandhi & Khanna, 2004).

La trasmissione del virus può avvenire in modo verticale o orizzontale. Nel primo caso ha una frequenza dello 0,5-1% e può avvenire attraverso la placenta durante la gravidanza o con l'allattamento se la madre è HCMV-sieronegativa e acquisisce l'infezione primaria in gravidanza. Il virus, infatti, infetta le cellule endoteliali materne

placentare e, attraverso cellule placentari infettate, ... Nel secondo caso, invece, avviene per contatto ... urine e in seguito a trapianti d'organo o di cellule staminali ematopoietiche (Zaia, 2002).

In persone immunocompetenti l'infezione primaria è generalmente asintomatica nonostante si osservino alti livelli di viremia nel sangue periferico e in cellule epiteliali. In seguito all'infezione primaria il virus instaura la latenza permanendo nell'ospite per tutta la vita. La viremia è mantenuta sotto controllo dalla risposta immunitaria cellulo-mediata e la riattivazione avviene periodicamente quando il controllo del sistema immunitario fallisce (Mocarski, 2004).

In individui immunocompetenti raramente HCMV è causa di patologie cliniche, sebbene nell'8% dei casi provochi una sindrome simile alla mononucleosi (Sissons *et al.*, 2002) con le stesse manifestazioni cliniche causate da EBV. Ci sono però quattro differenti scenari in cui HCMV si rivela un pericoloso patogeno: (1) nell'infezione primaria congenita; in individui immunocompromessi (2) nell'infezione primaria, (3) nella reinfezione e (4) nella riattivazione.

L'infezione congenita può essere asintomatica o sintomatica, ma in entrambi i casi può portare a serie conseguenze. Negli Stati Uniti si registrano 40.000 casi di bambini nati ogni anno con infezione congenita (Boppana *et al.*, 1999). Se l'infezione è asintomatica provoca nel 10-17% dei casi difetti uditivi o neuronali. Nel 5-10% dei casi, invece, l'infezione genera i classici sintomi da HCMV: disturbi al Sistema Nervoso Centrale (SNC), encefaliti, sordità (nel 10% dei casi), deficits psicomotori e più raramente miopatie e retiniti.

HCMV colpisce frequentemente e in modo grave, soprattutto nel caso di infezione primaria, persone immunocompromesse, ad esempio in seguito a trapianti d'organo e di cellule staminali ematopoietiche. Nel primo caso l'infezione aumenta il rischio di rigetto ed è più grave quando il donatore è positivo e il ricevente negativo. Nel secondo caso, invece, HCMV causa, con incidenza del 10-20%, polmonite con mortalità superiore al 50% (Gandhi *et al.*, 2003).

In persone affette da AIDS HCMV è associato alla progressione dell'infezione da HIV: aumenta la replicazione di HIV-1 o riattiva la forma latente poiché la proteina IE2-86 transattiva il promotore *Long Terminal Repeat* (LTR) di HIV-1 (Yeung *et al.*, 1993), induce l'espressione del recettore Fc e attiva il sistema immunitario con produzione di citochine infiammatorie. Nel caso di persone affette da AIDS HCMV causa principalmente retiniti, in seguito a riattivazione virale, manifestandosi in un primo momento con offuscamento della vista fino ad arrivare alla perdita della visione periferica.

HCMV, infine, sembra essere implicato nella progressione dell'arteriosclerosi ed è probabilmente associato a qualche forma di cancro anche se questo non è ancora stato dimostrato in modo conclusivo (Geder *et al.*, 1976).

1.2.f Prevenzione, profilassi e terapia delle infezioni da HCMV

L'infezione primaria da HCMV induce una risposta immunitaria primaria e il successivo instaurarsi di un'immunità a lungo termine che impedisce la riattivazione della replicazione virale. La risposta immunitaria non porta all'eliminazione del virus, ma riduce la concentrazione dello stesso nei siti mucosali e nel sangue periferico.

Sia l'immunità umorale che quella cellulare svolgono un ruolo importante nel controllo delle infezioni da HCMV.

raggiunge il 55% se si somministra il profarmaco (Valaciclovir, AxoSmithKline), L-valil estere dell'aciclovir. Il ganciclovir è nel trattamento delle infezioni da HSV e VZV. Il VACV è stato anche approvato in alcuni paesi per il trattamento profilattico delle infezioni da HCMV e delle malattie causate da ceppi di HCMV resistenti al GCV in pazienti sottoposti a trapianto d'organo solido o di midollo, ma non è abbastanza potente per essere utilizzato per la terapia in caso di malattia da HCMV.

Il ganciclovir (GCV, 9-[1,3-didrossi-2-propossimetil guanina]) è il primo agente antivirale che è stato approvato per il trattamento delle malattie da HCMV ed è fino ad oggi il farmaco antivirale più utilizzato contro HCMV (Razonable & Emery, 2004). Il GCV è costituito da una guanina legata a una molecola di zucchero aciclico mancante del gruppo CH_2 in 2'. Il GCV è convertito nella forma attiva trifosforilata in un processo *multi-step*, in modo analogo all'ACV. La forma attiva causa terminazione della replicazione. Il GCV è più efficiente come substrato rispetto all'ACV e nella forma tri-fosforilata ha una emivita 4-5 volte maggiore rispetto all'ACV-TP. Il GCV è disponibile in forma intravenosa (Cytovene IV®, Roche) e può essere anche somministrato intraocularmente con rilascio graduale (Vitrasert®, Baush e Lomb) per il trattamento di retiniti da HCMV.

Il valganciclovir (VGCV, Valcyte®, Roche) è L-valil estere del GCV. Il valganciclovir ha una biodisponibilità circa del 60% ed è rapidamente metabolizzato nella forma attiva (GCV) a livello delle pareti del lume intestinale. Nel 2000 è stato approvato per il trattamento delle retiniti da HCMV in pazienti affetti da AIDS e successivamente per il trattamento profilattico da HCMV in trapiantati.

Il cidofovir (CDV, Vistide®, Gilead; 1-[S-3-idrossi-2-(fosfonilmetossi) propil] citosina diidrate) è un analogo nucleosidico aciclico fosfonato del dCMP. Il meccanismo d'azione è simile a quello degli analoghi nucleosidici, ma la sua attivazione non dipende dall'attività di chinasi codificate dal virus. Le chinasi dell'ospite convertono il CDV nella forma attiva tri-fosforilata che agisce come inibitore competitivo della DNA polimerasi virale causando una terminazione prematura della catena nascente del DNA virale dopo incorporazione. Il CDV è attivo sia nei confronti degli herpesvirus che di altri virus a DNA (De Clercq & Holy, 2005), ma ha bassa biodisponibilità (<5%) ed è altamente tossico a livello renale, il che lo rende utilizzabile solo come farmaco di seconda scelta.

Inibitori non-nucleosidici delle DNA polimerasi erpetiche sono l'acido fosfonoacetico (PAA) e l'acido fosfonoformico o foscarnet (PFA). Grazie alla loro struttura simile al PPI, PFA e PAA sono in grado di inibire in maniera competitiva la replicazione virale legandosi alla DNA polimerasi nel sito di scambio del pirofosfato, bloccando il taglio del pirofosfato dal nucleoside trifosfato terminale aggiunto alla catena nascente di DNA virale.

Il foscarnet (Foscavir®, AstraZeneca) è utilizzato come agente terapeutico di seconda scelta nel trattamento contro HCMV, ma è il farmaco più utilizzato nel caso di pazienti resistenti al GCV o che non possono essere trattati con GCV a causa di neutropenia o leucopenia (Razonable & Emery, 2004).

1.3 Il complesso replicativo di HCMV

La replicazione del genoma di HCMV è un meccanismo complesso che richiede l'attività di molteplici proteine dalle diverse attività enzimatiche. È stato dimostrato

omici virali per la complementazione della replicazione o di trasfezione e replicazione transiente (Pari & Anders, 1992). Questi loci codificano proteine della forza di replicazione, identificate per similarità con proteine omologhe di HSV-1. Queste proteine sono la subunità catalitica della DNA polimerasi (UL54) e il suo fattore di processività (UL44) (la DNA polimerasi verrà trattata in maniera approfondita nel paragrafo 1.4), una proteina che lega il ssDNA (*single-stranded DNA*) (UL57) e le tre subunità del complesso elicasi-primasi (Figura 1.6). Il complesso elicasi-primasi è composto dall'elicasi UL105, dalla primasi UL70 e da un cofattore, la proteina UL102; le tre proteine si associano e formano un complesso eterotrimerico che ha la funzione di svolgere il DNA e di sintetizzare i primers di RNA (Ertl and Powell, 1992). La proteina UL57 si lega cooperativamente al DNA a singolo filamento rilasciato dall'elicasi virale, stabilizzandolo.

Per i restanti 5 loci genomici virali non sembrano esserci diretti omologhi in altri herpesvirus. Tre di questi loci codificano per proteine regolatorie IE [la *major immediate early region* (MIE, UL122-123), UL36-38, e IRS1/TRS1]; gli altri due loci codificano per proteine *early*: UL112-113 e UL84.

La regione *UL122/123* è localizzata sotto controllo del promotore/enhancer *Major Immediate Early* (MIE): un promotore molto forte in cui sono presenti numerosi siti di legame per fattori di trascrizione (TFs) cellulari. Questo gene codifica principalmente le proteine IE1-72 e IE2-86, le quali non sono direttamente coinvolte nella replicazione del DNA, ma agiscono come transattivatori dell'espressione di molti geni virali e cellulari.

Dalla regione *UL36-38* hanno origine diversi trascritti in base alla differente attivazione dei promotori e a diversi eventi di *splicing* (Tenney & Colberg-Poley, 1991). Questi geni codificano alcune proteine con attività anti-apoptotica. *UL36* codifica una proteina, detta vICA (*viral Inhibitor of Caspase-8-Induced Apoptosis*), in grado di legare la procaspasi-8 impedendone l'attivazione proteolitica, il successivo legame con Fas e quindi l'induzione dell'apoptosi (Skaletskaya *et al.*, 2001). *UL37*, invece, codifica le proteine gpUL37 e pUL37x1 (pUL37exon1). La prima è una glicoproteina virale detta vMIA (*viral Mitochondria-localised Inhibitor of Apoptosis*) che si localizza nel mitocondrio ed è in grado di inibire l'apoptosi mediata da Fas impedendo il rilascio del citocromo *c*; la seconda, invece, blocca il rilascio del citocromo *c* per interazione con l'*Adenosine Nucleoside Transporter* (ANT) mitocondriale (Goldmacher *et al.*, 1999). *UL38* codifica una proteina che agisce anch'essa bloccando l'apoptosi in seguito a infezione virale. Tuttavia il bersaglio cellulare della proteina UL38 resta ancora da chiarire, anche se recentemente è stato riportato che UL38 è in grado di bloccare l'apoptosi inibendo la via di segnali caspasi-dipendente permettendo, quindi, un'efficiente replicazione virale (Terhune *et al.*, 2007).

I geni *IRS1/TRS1* (*Internal Repeated Sequence 1/Terminal Repeated Sequence 1*) codificano rispettivamente le proteine IRS1 e TRS1, altamente omologhe. Le proteine IRS1 e TRS1, cooperando con altre proteine IE, sono coinvolte nella transattivazione di promotori virali e cellulari (Romanowsky *et al.*, 1997); per esempio sono in grado di transattivare i geni β insieme alle proteine IE1-72 e IE2-86 e aumentare l'attivazione del promotore MIE per cooperazione con UL69 (Romanowsky *et al.*, 1997).

In seguito a eventi di *splicing* alternativo i geni *UL112-113* originano quattro fosfoproteine con differenti pesi molecolari (34, 43, 50 e 84 kDa) espresse a differenti tempi e in grado di cambiare localizzazione durante il ciclo di replicazione virale. Le proteine UL112-113 richiamano inoltre UL44 al sito pre-replicativo (Wright & Spector, 1989) e sono in grado di legare il DNA (Ahn *et al.*, 1999). Inoltre la proteina da 84 kDa sembra essere responsabile della regolazione del trasporto nucleare delle altre proteine UL112-113 (Park *et al.*, 2006). Infine, per quanto riguarda la proteina UL84, nel corso

merose attività tra cui: una funzione di *shuttle* tra li interagire con IE2 e di inibire l'attivazione proteina, la capacità di legare l'RNA e l'attività UTPasica (Colletti *et al.*, 2005; Gebert *et al.*, 1997; Lischka *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004). In particolare, il complesso proteico UL84-IE2, è in grado di attivare un promotore bidirezionale forte all'interno di *oryLyt*, presumibilmente per dare inizio ad un evento trascrizionale per promuovere l'inizio della sintesi del DNA virale (Xu *et al.*, 2004). Inoltre, studi recenti indicano che UL84 possa essere l'*origin binding protein* (la proteina che si lega all'origine di replicazione) di HCMV rappresentando quindi la proteina iniziatrice della sintesi del DNA virale. UL84 infatti risulta essere associata al complesso replicativo virale, in particolare interagisce con la subunità della DNA polimerasi UL44 e con UL57 (Colletti *et al.*, 2005 ab; Gao *et al.*, 2007). È stato inoltre dimostrato che UL84 è in grado di interagire *in vivo* con l'origine di replicazione litica di HCMV, *oriLyt*, probabilmente in una regione che presenta strutture ibride RNA/DNA e *stem-loop* (Colletti *et al.*, 2007). Gli studi *in vitro* indicano che UL84 possa cambiare la conformazione delle strutture *stem-loop* e probabilmente portare così all'assemblaggio del complesso di replicazione (Colletti *et al.*, 2007). UL84 inoltre presenta omologia strutturale e possiede attività simili a quelle della famiglia di proteine *DExD/H box*. A queste proteine è stata attribuita attività RNA-elicasi, attività di *shuttle* nucleo-citoplasmatico e la capacità di regolare in maniera positiva o negativa la trascrizione (Tanner & Linder, 2001).

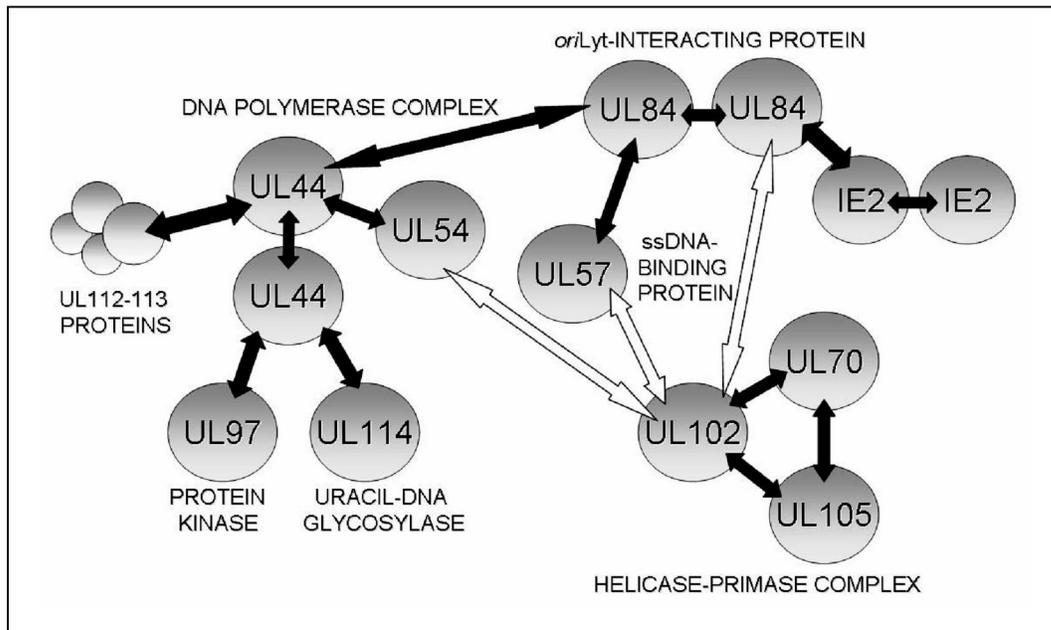


Figura 1.6: Interazioni tra le proteine di HCMV coinvolte direttamente o indirettamente nella replicazione del DNA virale. Con frecce nere sono indicate le interazioni dimostrate; con le frecce bianche sono indicate interazioni proteina-proteina non dimostrate, ipotizzate sulla base dell'omologia con le rispettive proteine di HSV-1 (da Mercorelli *et al.* 2007).

Vi sono inoltre altre proteine codificate dal genoma virale che, sebbene non siano strettamente richieste per la replicazione virale nelle cellule in coltura, sono coinvolte nel metabolismo dei nucleotidi ed in altri processi importanti per il ciclo replicativo

Queste proteine, la protein chinasi UL97 e l'aracil DNA (fig. 1.4.d), interagiscono con la subunità accessoria della

1.4 DNA polimerasi erpetiche

1.4.a Caratteristiche generali dell'enzima

Tutti i membri della famiglia *Herpesviridae* codificano una propria DNA polimerasi, essenziale per la replicazione del genoma virale. Allineamenti di sequenze hanno dimostrato che tutte le DNA polimerasi erpetiche hanno struttura e domini funzionali conservati. Inoltre le DNA polimerasi erpetiche sono costituite da due subunità proteiche distinte, una catalitica ed una accessoria, la cui interazione fisica è indispensabile per la replicazione del genoma virale.

In Tabella 1.2 sono riportate le DNA polimerasi di alcuni membri della famiglia *Herpesviridae*, con indicate le due subunità che costituiscono la forma attiva dell'enzima.

VIRUS	SUBUNITÀ CATALITICA	SUBUNITÀ ACCESSORIA	REFERENZA
HSV-1	UL30	UL42	Digard <i>et al.</i> , 1993b Tenney <i>et al.</i> , 1993
HSV-2	POL	ICSP34,35	Gallo <i>et al.</i> , 1989
HCMV	UL54	UL44	Ertl & Powell, 1992
VZV	POL	ORF16	Davison & Scott, 1986
EHV-1	ORF30	ORF18	Telford <i>et al.</i> , 1992
HHV-8	Pol-8	PF-8	Lin <i>et al.</i> , 1998
MCMV	POL	pp50	Loh <i>et al.</i> , 1991
HHV-6	Pol6	p41	Agulnick <i>et al.</i> , 1993
HHV-7	U38	U27	Nicholas., 1996

Tabella 1.2: DNA polimerasi di alcuni membri della famiglia *Herpesviridae*.

Per tutti gli herpesvirus in generale, la subunità catalitica del complesso della DNA polimerasi è una proteina molto grande (110-140 kDa) costituita da sei domini

...-NH₂ che presenta 6 amminoacidi altamente conservati coinvolti nell'interazione con il complesso elicasi/primasi; il dominio *finger* che lega l'RNA e quindi costituisce il centro catalitico dell'attività di RNasi; dominio con attività esonucleasica 3'→5' dominio *palm* che contiene amminoacidi conservati coinvolti nella catalisi; il dominio *fingers* implicato nel legame con i nucleotidi; dominio *thumb* che lega il DNA a doppio filamento (dsDNA).

La subunità catalitica possiede attività DNA polimerasica 5'→3' capace di utilizzare diversi templati di DNA e di estendere *primers* di RNA; presenta inoltre un'attività intrinseca esonucleasica 3'→5' di *proofreading*, un'attività esonucleasica 3'→5' capace di agire come una RNasi H e un'attività esonucleasica 5'→3'

La subunità catalitica da sola ha tuttavia una attività DNA polimerasica molto minore rispetto a quella dell'enzima (definita pertanto "attività basale"). Il legame della subunità accessoria, una proteina generalmente di dimensioni minori, a quella catalitica stimola sia l'affinità del complesso per il DNA a doppio filamento, sia il ritmo di incorporazione dei nucleotidi, sia la processività del complesso enzimatico, rendendolo in grado di replicare l'intero genoma virale. Il ruolo essenziale dell'interazione fisica tra le due subunità è stato dimostrato dal fatto che mutazioni che vanno a influenzare e/o eliminare tale associazione intermolecolare inibiscono anche la replicazione virale (Digard *et al.*, 1993b; Tenney *et al.*, 1993).

Il modello biochimico accettato attualmente per l'interazione tra le subunità UL30 e UL42 della DNA polimerasi di HSV-1, ma che si ritiene valido anche per le DNA polimerasi di altri herpesvirus, prevede che la subunità accessoria UL42 sia in grado di legare contemporaneamente sia il DNA che la subunità catalitica UL30, utilizzando domini proteici diversi, e in questo modo aumenti l'affinità di UL30 per il DNA stampo. In Figura 1.7 è rappresentata schematicamente l'interazione fisica e funzionale tra le due subunità delle DNA polimerasi erpetiche.

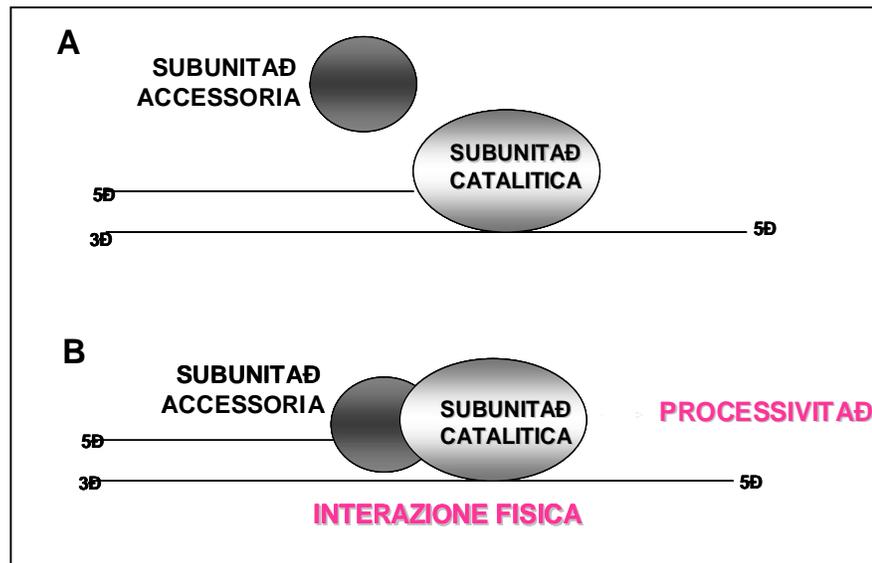


Figura 1.7: Rappresentazione schematica dell'interazione fisica e funzionale fra le subunità delle DNA polimerasi erpetiche.

A) La DNA polimerasi è un eterodimero costituito da una subunità catalitica ed una subunità accessoria.
 B) L'interazione fisica delle due subunità stimola l'attività catalitica e la processività della DNA polimerasi.

della DNA polimerasi di HCMV: UL54

Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features

Le DNA polimerasi sono classificate in sette diverse famiglie; le DNA polimerasi erpetiche appartengono alla famiglia γ . In generale le DNA polimerasi di tipo γ , sia virali che cellulari, contengono all'interno della loro sequenza 7 regioni conservate, designate come I, II, III, IV, V, VI e VII. Si ritiene che tali regioni conservate abbiano un ruolo importante per l'attività catalitica dell'enzima.

Cinque di queste regioni, I, II, III, V e VII e una diversa regione, detta δ -regione C, condivisa dalle DNA polimerasi erpetiche e dalle DNA polimerasi cellulari α ed β , sembrano essere coinvolte nel riconoscimento e legame dei substrati e di conseguenza anche degli analoghi nucleosidici con attività antivirale.

La porzione N-terminale, invece, dovrebbe essere quella che conferisce all'enzima l'attività di tipo RNasi H e che interagisce con altre proteine virali; mentre l'attività esonucleasica intrinseca $3' \rightarrow 5'$ dovrebbe risiedere nella regione IV (Matthews *et al.*, 1993) e nella δ -regione C. Inoltre nel sito catalitico si trovano tre regioni (Exo I, II, III) con attività esonucleasica $5' \rightarrow 3'$ che sono altamente conservate. In Figura 1.8 è riportata schematicamente la struttura dei domini conservati e la loro localizzazione, prendendo come esempio la subunità catalitica (UL30) della DNA polimerasi di HSV-1.

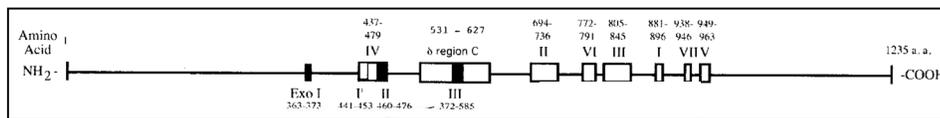


Figura 1.8: Struttura schematica delle regioni conservate e loro localizzazione nella sequenza proteica della subunità catalitica della DNA polimerasi di HSV-1 (da Hwang *et al.*, 2004, modificata).

La parte più conservata sembra essere quella situata all'N-terminale. Le regioni I, II, III sono altamente conservate in tutte le DNA polimerasi (dai batteriofagi ai mammiferi) e questo fa pensare che questi tre domini assolvano quasi tutte le funzioni essenziali per la catalisi.

La regione I sembra essere coinvolta nel riconoscimento dei substrati [dNTPs (deossiribonucleotidi trifosfato) e PPi (pirofosfato)], dal momento che molti mutanti in questa regione mostrano resistenza ad analoghi nucleosidici trifosfati e ad analoghi del pirofosfato, ma soprattutto sembra che mutazioni in questa regione causino una variazione nella velocità di catalisi della polimerasi.

Tuttavia, le mutazioni (singole sostituzioni amminoacidiche) che provocano alterazioni nella sensibilità ad analoghi del pirofosfato (per esempio PAA, acido fosfonoacetico, e PFA, acido fosfonoformico) e ad analoghi nucleosidici (ad esempio ganciclovir, GCV), sono localizzate soprattutto nelle regioni II e III (localizzate rispettivamente nei domini *palm* e *fingers*). Queste regioni potrebbero quindi essere coinvolte direttamente nel legame dei dNTPs oppure nell'idrolisi del pirofosfato (Larder *et al.*, 1987).

In realtà non è ancora stato possibile identificare singole regioni come uniche responsabili del legame dei dNTPs o del PPi; tale risultato suggerisce l'ipotesi che l'interazione tra questi composti e l'enzima sia subordinata al *folding* tridimensionale dell'enzima e che coinvolga più regioni non contigue della polimerasi.

Infine, le regioni V e VII, essendo meno conservate delle altre, sono state meno caratterizzate.

UL54 (140 kDa) costituisce il core dell'attività catalitica della DNA polimerasi; possiede elevata omologia con la proteina UL30 di HSV-1 e similarità di sequenza con

la famiglia . Inoltre UL54 presenta struttura simile a quella delle DNA polimerasi della famiglia *Herpesviridae* (domini *palm*, *fingers* e *thumb*) e ha regioni conservate (indicate da I a VII) che si ritrovano in quasi tutte le DNA polimerasi DNA-dipendenti della famiglia (Wang, 1991). In UL54 queste regioni conservate si trovano tra i residui amminoacidici 379-1100; in particolare, tra i residui 710-1100 è situato il principale dominio di polimerizzazione. Esperimenti condotti su proteine UL54 che presentavano mutazioni nei domini conservati (Ye & Huang, 1993) hanno confermato l'importanza di tali regioni per il legame al DNA e al substrato. UL54 possiede inoltre tre regioni (Exo I, II, III) che sono conservate nel sito catalitico delle esonucleasi 5'→3'. Si è, quindi, potuto concludere che l'attività esonucleasica di UL54 è situata nella metà N-terminale (Nishiyama *et al.*, 1983), il legame con il substrato e l'attività polimerasica (Mar *et al.*, 1981) nella zona centrale, ed il legame con la subunità accessoria UL44 nella parte C-terminale. A tal proposito è stato infatti dimostrato dal nostro gruppo di ricerca che i 22 residui C-terminali di UL54 (residui 1221-1242) sono necessari e sufficienti per il legame alla subunità accessoria UL44 (Loregian *et al.*, 2003). Ulteriori studi con proteine recanti mutazioni puntiformi in questa regione hanno dimostrato che gli aa Leu1227 e Phe1231 di UL54 sono cruciali per l'interazione UL54/UL44: infatti la loro sostituzione con l'aa Ala provoca la totale inibizione dell'interazione (Loregian *et al.*, 2004a).

1.4.c La subunità accessoria della DNA polimerasi di HCMV: UL44

La subunità accessoria della DNA polimerasi di HCMV, codificata dal gene *UL44*, è una fosfoproteina di 58 kDa indispensabile per la replicazione di HCMV (Ripalti *et al.*, 1995). È in grado di dimerizzare, legare il DNA a doppio filamento con alta affinità ed interagire in maniera specifica con UL54 (Ertl & Powell, 1992), aumentando la processività della DNA polimerasi lungo lo stampo di DNA (Weiland *et al.*, 1994).

Il nostro gruppo di ricerca ha di recente pubblicato la struttura cristallografica dei residui amminoacidici 1-290 di UL44 (Appleton *et al.*, 2004), forma tronca della proteina che è comunque attiva (Figura 1.9). Dalla struttura cristallografica è emerso che UL44 presenta una struttura molto simile a quella di altri fattori di processività, ad esempio la proteina UL42 di HSV-1 (Zuccola *et al.*, 2000) e il monomero di PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*, il fattore di processività delle DNA polimerasi eucariote ed ; Gulbis *et al.*, 1996), sebbene queste proteine non presentino una elevata omologia di sequenza. Tuttavia, mentre UL42 di HSV-1 è un monomero e PCNA un trimero, UL44 di HCMV forma omodimeri testa-testa formando una struttura di pinza a C.

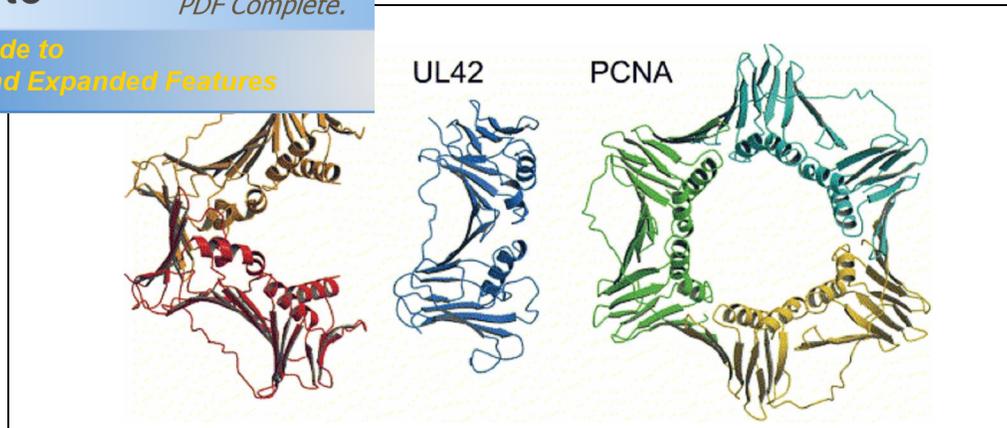


Figura 1.9: Comparazione tra il dimerico di UL44 di HCMV, il monomero di UL42 di HSV-1 e il trimero di PCNA (da Appleton *et al.*, 2004).

Come UL42, UL44 possiede un *loop* (residui 129-140) che connette 2 domini della proteina topologicamente simili e che lega la subunità catalitica della polimerasi (UL54). Studi con mutazioni puntiformi di UL44 hanno dimostrato che gli aa 133-136 del *loop* sono cruciali per il legame ad UL54 (Loregian *et al.*, 2004b): in particolare il più importante per il legame è il residuo Ile 135.

UL44 possiede due potenziali NLS (*Nuclear Localization Signal*), uno in corrispondenza degli aa 162-168 (NLS1), l'altro a livello degli aa 425-431 (NLS2); tuttavia il solo NLS2 è necessario e sufficiente a conferire la localizzazione nucleare di UL44 (Alvisi *et al.*, 2005). Pare inoltre che UL44 dimerizzi nel citoplasma prima di traslocare nel nucleo (Alvisi *et al.*, 2006).

UL44 dimerizza attraverso uno dei due assi cristallografici e l'interazione tra i due monomeri richiede l'interazione di foglietti antiparalleli, che coinvolge 6 legami tra le due catene principali e un impacchettamento delle catene laterali idrofobiche all'interfaccia. L'aa F121 di ogni monomero è posizionato in un *loop* idrofobico composto dai residui P85, L86 e L87 dell'altro monomero (Figura 1.10). I residui aminoacidici L86, L87 e F121 sono indispensabili per la dimerizzazione di UL44 ed è stato dimostrato infatti che la sostituzione con alanina dei residui F121 e L86/L87, previene la formazione di dimeri. Inoltre i mutanti F121A e L86A/L87A che si comportano come monomeri, presentano una ridotta capacità di legare il DNA.

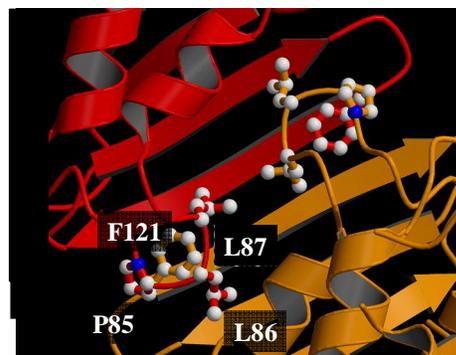


Figura 1.10: Interfaccia di dimerizzazione della proteina UL44: i residui idrofobici F121, L86 e L87 sono indispensabili per la dimerizzazione (Appleton *et al.*, 2004).

Studi con proteine UL44 mutate per delezione hanno dimostrato che i due terzi N-terminali della proteina sono indispensabili per il legame al DNA (Weiland *et al.*, 1994).

ettamente, a differenza delle *sliding clamps* (pinze) e della PCNA, che richiedono ATP e proteine per legarsi al DNA. In maniera simile a quanto osservato per UL2, UL42 e UL44 possiede una regione ad α -elica che contiene diversi residui basici (lisine) che possono interagire elettrostaticamente con lo scheletro di fosfati del DNA (Figura 1.11). Inoltre ciascun monomero che compone il dimero di UL44 contiene un *loop* disordinato (aa 163-175) che presenta diversi residui basici e può estendere la pinza a C attorno al DNA (Appleton *et al.*, 2004; Figura 1.11). Sebbene sia stato dimostrato che UL44 lega il DNA a doppio filamento, non sono però ancora chiari i dettagli di questa interazione e che ruolo abbia questo legame nella funzione di fattore di processività.

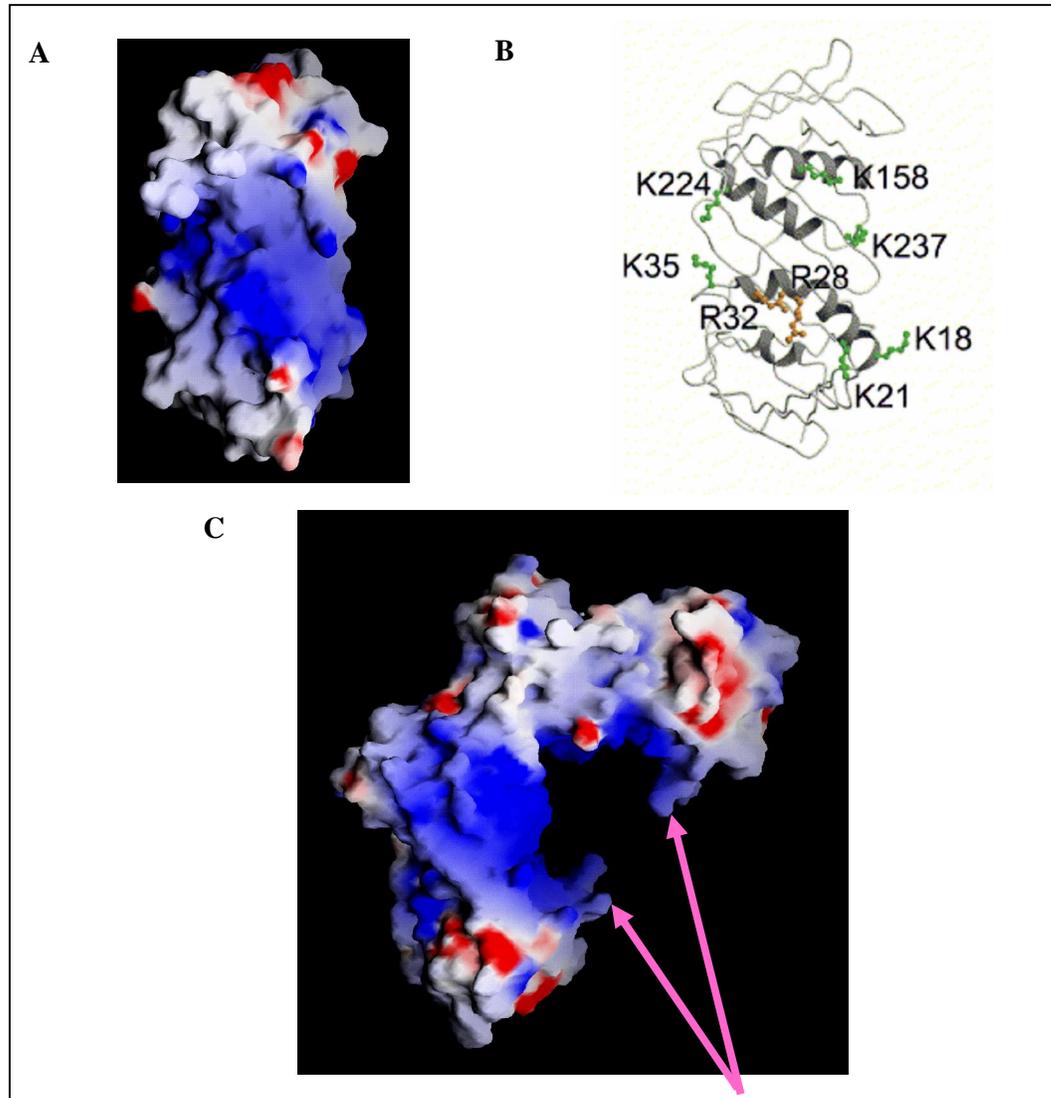


Figura 1.11: A, rappresentazione GRASP del monomero di UL44 dove i residui acidi e basici sono rappresentati rispettivamente in rosso e blu; B, rappresentazione del monomero di UL44 in cui i residui di lisina e arginina sono evidenziati rispettivamente in verde e arancione. I residui di lisina sono probabilmente coinvolti nell'interazione con il DNA; C, rappresentazione GRASP del dimero di UL44 in cui i residui acidi e basici sono rappresentati rispettivamente in rosso e blu, le frecce indicano i due *loop* disordinati (uno per ciascun monomero di UL44, aa 163-175) che contengono diversi residui basici e possono estendere la pinza a C formata dal dimero attorno al DNA (da Appleton *et al.*, 2004; Komazin *et al.*, comunicazione personale).

ali di UL44

È stato suggerito che UL44, oltre alla funzione di fattore di processività della DNA polimerasi virale, svolga altri ruoli durante il ciclo replicativo di HCMV. Infatti, UL44 è espressa in eccesso rispetto alla subunità catalitica UL54, è abbondantemente espressa anche nelle fasi tardive della replicazione (cinetica di espressione *leaky-late*), e per le sue funzioni di fattore processivo sono sufficienti i due terzi N-terminali della proteina, suggerendo che il terzo C-terminale possa essere coinvolto in altre funzioni. A favore di questa ipotesi è il fatto che PCNA e altre *sliding clamps* interagiscono con diverse proteine cellulari oltre che con le rispettive subunità catalitiche. Inoltre, la proteina UL42, omologo in HSV-1 di UL44, è in grado di interagire con la cdc2 (una chinasi cellulare ciclino-dipendente; Advani *et al.*, 2001; Advani *et al.*, 2003). Infine, la natura dimerica di UL44 può permettere alla seconda subunità di richiamare altre proteine cellulari e/o virali durante il ciclo replicativo virale.

Oltre all'interazione con UL54, è stata riportata in letteratura l'interazione di UL44 con altre proteine di HCMV: UL84 (Gao *et al.*, 2007), la putativa *origin binding protein*, che sembra essere coinvolta nelle fasi iniziali della sintesi del DNA virale (vedi paragrafo 1.3), la protein chinasi UL97 (Marschall *et al.*, 2003) e l'uracil DNA glicosilasi UL114 (Prichard *et al.*, 2005).

UL97 è una Ser/Thr protein chinasi ed è in grado di monofosforilare l'analogo nucleosidico GCV attivandolo (Sullivan *et al.*, 1993; Littler *et al.*, 1992). UL97 non riconosce i nucleotidi naturali come substrati, e ciò suggerisce che essa possa avere un ruolo biologico diverso, non coinvolto nel metabolismo dei nucleotidi. Sebbene UL97 non sia essenziale per la replicazione litica di HCMV (Pari *et al.*, 1993), possiede comunque un ruolo importante per la replicazione del virus, infatti virus che presentano la delezione di *UL97* mostrano una diminuzione della produzione virale di 2-3 logaritmi e carenze significative di crescita e replicazione (Prichard *et al.*, 1999). È stato osservato che l'attività di UL97 è richiesta a diversi stadi del ciclo replicativo virale: i). durante la sintesi del DNA, nello stadio di pre-elongazione (Wolf *et al.*, 2001; Biron *et al.*, 2002); ii). per l'encapsidazione e/o l'assemblaggio dei capsidi (Wolf *et al.*, 2001) e iii). per l'uscita dal nucleo (Krosky *et al.*, 2003). Il fatto che UL97 sia coinvolta nella sintesi del DNA virale è rafforzato dalla dimostrazione che è in grado di interagire appunto con UL44 e dal fatto che UL44 è un substrato di UL97 *in vitro*, anche se non sono ancora note le implicazioni biologiche di questa interazione (Krosky *et al.*, 2003; Marschall *et al.*, 2003).

UL114 è l'uracil DNA glicosilasi di HCMV. Praticamente tutti gli organismi codificano questo tipo di enzima. Le uracil DNA glicosilasi (UNG) riparano le lesioni che avvengono in seguito all'incorporazione di uracile nel DNA. L'incorporazione di uracile porta alla formazione di *mismatch* U:G che, se non riparati, danno origine a mutazioni di transizione A:T in una delle catene di DNA neo-sintetizzate (Lindahl, 1993). UL114 si localizza nei compartimenti di replicazione virale (Prichard *et al.*, 2005) ed è necessaria per la regolazione temporale sia della sintesi del DNA virale che della replicazione del virus (Prichard *et al.*, 1996). Come accennato, è stato dimostrato che UL114 coprecipita con UL44 (Prichard *et al.*, 2005) e ciò suggerisce che le due proteine possano associarsi nelle cellule infettate. Inoltre, UL44 recluta UL114 nel nucleo in cellule cotrasfettate e la porzione di UL114 coinvolta nell'interazione con UL44 è costituita dai residui 3-24 (Prichard *et al.*, 2005). Un'interazione analoga è stata osservata tra la proteina UNG2 cellulare e PCNA nel complesso di replicazione del DNA umano e anche in questa interazione sono coinvolti i residui N-terminali di UNG2 (Otterlei *et al.*, 1999). È stato ipotizzato che UL114 possa essere parte del complesso di replicazione del DNA virale e che possa essere richiesta per lo stabilirsi e per

del DNA virale, ma il meccanismo utilizzato per

1.4.e Inibitori dell'interazione tra le subunità delle DNA polimerasi erpetiche

Gli agenti antivirali attualmente utilizzati per il trattamento delle infezioni da HCMV hanno diversi svantaggi: presentano effetti tossici collaterali, hanno un meccanismo d'azione simile e la comparsa di molti ceppi virali resistenti o addirittura cross-resistenti ai farmaci comunemente utilizzati (GCV, CDV, PFA) comporta innumerevoli problemi soprattutto in persone immunodeficienti (Reusser, 1996).

Questi problemi hanno stimolato la ricerca di nuovi composti che siano più attivi, più specifici e meno tossici contro HCMV. Una nuova strategia per inibire la replicazione virale, proposta dal nostro gruppo di ricerca (Loregian *et al.*, 2002; Loregian & Palù, 2005a; Loregian & Palù, 2005b), si basa sulla dissociazione di complessi proteici virali attraverso l'uso di peptidi o composti peptidomimetici che mimano una delle parti coinvolte nell'interazione tra le subunità del complesso proteico. L'assoluta specificità delle interazioni proteina-proteina offre la possibilità di attuare una inibizione selettiva e virus-specifica. Questi composti potrebbero, inoltre, ovviare al problema dei ceppi resistenti in quanto, mentre mutazioni puntiformi nel sito catalitico dell'enzima spesso conferiscono resistenza a farmaci che sono analoghi dei substrati naturali, una singola mutazione in una subunità dell'interfaccia proteina-proteina richiede la mutazione complementare nell'altra subunità per mantenere intatto il complesso poiché è molto più difficile che insorgano due mutazioni complementari, ciò rende improbabile il fatto che la proteina bersaglio acquisisca resistenza all'inibitore. Infine, poiché questi composti hanno di solito come bersaglio siti differenti rispetto ai farmaci antivirali comunemente utilizzati, verosimilmente essi potrebbero essere attivi anche contro ceppi virali resistenti a questi farmaci.

Potenziati bersagli per questo tipo di strategia sono le DNA polimerasi erpetiche. Infatti, come detto precedentemente, le DNA polimerasi erpetiche sono dei complessi multiproteici costituiti da una subunità catalitica e una subunità accessoria. È stato dimostrato che mutazioni che dissociano l'interazione tra queste due subunità inibiscono anche la replicazione virale (Pilger *et al.*, 2004; Loregian & Coen, 2006). Per questo motivo composti che mimino l'interfaccia tra le subunità e prevengano l'eterodimerizzazione delle DNA polimerasi erpetiche costituiscono potenziali nuovi farmaci antivirali.

Una strategia simile è stata proposta anche per inibire la DNA polimerasi di HCMV. Poiché le subunità UL54 e UL44 interagiscono in modo specifico e sono essenziali per la replicazione virale (Pari & Anders, 1993), la loro interazione rappresenta un potenziale bersaglio per lo sviluppo di farmaci antivirali.

A dimostrazione della validità e fattibilità di tale strategia antivirale, dal nostro gruppo di ricerca è stato identificato un peptide, corrispondente ai 22 residui C-terminali (LPRRLHLEPAFLPYSVKAHECC) della subunità catalitica UL54, in grado di dissociare l'interazione fisica tra UL54 e UL44 e di inibire *in vitro* in modo specifico l'attività enzimatica della DNA polimerasi di HCMV (Loregian *et al.*, 2003). Successivamente studi sia cristallografici (Appleton *et al.*, 2004) sia di mutagenesi (Loregian *et al.*, 2004a; Loregian *et al.*, 2004b) hanno dimostrato che singoli residui di UL54 e di UL44 sono cruciali per la loro interazione e hanno quindi suggerito che

no dissociare l'interazione UL54-UL44 e quindi inibire lo screening di circa 50.000 "small molecules", dal nostro gruppo di ricerca sono state identificate delle molecole selettive contro HCMV che inibiscono l'interazione tra UL44 e i 22 residui C-terminali di UL54 (Loregian & Coen, 2006). In particolare sono stati identificati 5 composti con diversa struttura capaci di: (1) interferire *in vitro* con l'interazione fisica tra le proteine UL44 e UL54; (2) inibire l'attività enzimatica *in vitro* della DNA polimerasi di HCMV in maniera dose-dipendente, con valori di IC₅₀ (concentrazione inibitoria del 50%) compresi tra 5 e 15 M; (3) inibire in modo specifico la replicazione di HCMV in colture cellulari infettate; (4) inibire la replicazione virale ad una concentrazione tra le 11 e le 500 volte più bassa rispetto a quella citotossica (Loregian & Coen, 2006). Questi 5 composti (denominati AL5, AL9, AL12, AL18 e AL21) soddisfano due prerequisiti iniziali: non essere tossici e avere siti bersaglio differenti da quelli degli attuali farmaci diretti contro la DNA polimerasi (GCV, CDV e PFA) e quindi rappresentano un buon punto di inizio per lo sviluppo di nuovi farmaci contro HCMV. Un altro potenziale bersaglio per lo sviluppo di una strategia simile è la proteina UL44. Come descritto sopra, UL44 è un dimerico in soluzione e sono noti i residui cruciali coinvolti nella formazione del complesso. Inoltre, mutazioni a livello di questi residui (F121A e L86A/L87A) diminuiscono l'affinità di UL44 per il DNA, indicando che la dimerizzazione di UL44 è importante per il legame al DNA *in vitro* (Appleton *et al.*, 2004). Ulteriori studi volti a chiarire il ruolo e l'importanza della dimerizzazione di UL44 per la replicazione virale stabiliranno se la dissociazione dei dimeri di UL44 possa rappresentare una strategia utile per lo sviluppo di nuovi composti contro HCMV.

Nuclear Bodies (NB)

1.5.a Generalità

I *Nuclear Bodies*, [chiamati anche ND10 (*nuclear domain 10*), *PML bodies* (*Promyelocytic Leucemia bodies*), *PODs* (*PML Oncogenic Domain*), *Kr* (*Kremer Bodies*)] sono organelli nucleari privi di membrana, di diametro compreso tra 0,2 e 1 μ m. Questi organelli sono stati caratterizzati per la prima volta utilizzando anticorpi di pazienti autoimmuni affetti da cirrosi biliare primaria: da analisi di immunofluorescenza gli NB apparivano come dei puntini nucleari che contenevano diverse proteine colocalizzate (Koriotti *et al.*, 1996).

Non tutti i tipi di cellule ne sono provvisti, ad esempio non sono presenti nei centri germinali di milza e linfonodi, nelle placche di Peyer e nelle linee neuronali; vi sono al contrario molti NB in cellule tumorali o stimolabili da ormoni. Sono presenti in numero di 10-30 per cellula e sono molto eterogenei, infatti anche in uno stesso nucleo ogni NB può avere composizione diversa.

Sono situati nelle zone intercromosomiali, nelle tasche intercromatiniche. Solitamente sono vicino a certe zone nucleari quali: *Cajal coiled bodies* (probabilmente coinvolti nell'assemblaggio dello spliceosoma e del corpo trascrizionale), *cleavage bodies* (coinvolti nel processamento al 3' dell'mRNA) e *splicing speckles* (coinvolti in eventi di pre-processamento dell'mRNA) (Borden, 2002).

1.5.b Formazione e mantenimento

Gli NB sono composti da una cinquantina di proteine, molte delle quali sono coinvolte in processi chiave per la cellula quali traduzione, trascrizione, replicazione e riparazione del DNA e stabilità dell'mRNA (Negorev & Maul, 2001). Gli NB cambiano conformazione durante il ciclo cellulare, e pare che sumoilazione e fosforilazione siano coinvolte nella regolazione di tale processo. Gli NB si disassemblano durante la mitosi e sono presenti in maggior numero in fase G₀ rispetto alle fasi S e G₂.

L'assemblaggio e il mantenimento degli NB può essere riassunto in 5 fasi (Maul & Negorev, 2000): nella prima fase detta di *δ*nucleazione, vi è l'omo- e l'etero-multimerizzazione di PML (proteina chiave nel mantenimento e regolazione degli NB); in seguito aumenta la grandezza degli NB, cosa che può avvenire per svariate cause, per esempio per un'aumentata trascrizione di *PML* mediata da interferone. La terza fase è caratterizzata dalla modificazione (prevalentemente sumoilazione) di PML e di altre proteine. Nella quarta fase (detta di competizione), tali modificazioni possono far variare la capacità di alcune proteine degli NB di legare i loro substrati. Nella quinta ed ultima fase, interazioni secondarie permettono l'entrata di altre proteine negli NB: ad esempio Daxx reclutato da PML-sumo è in grado di legare altri substrati. Pare che altre proteine, come SP100, entrino negli NB con meccanismo indipendente dalla sumoilazione.

In seguito ad eventi quali shock termico, radiazioni UV, presenza di metalli pesanti, infezioni virali o desumoilazione attraverso SENP-1 (*sentrin-1 isopeptidase*) ci può essere l'uscita di proteine dagli NB.

Inoltre, in pazienti con leucemia promielocitica acuta (APL) si può notare la distruzione degli NB: in questa patologia vi è un evento di traslocazione reciproca t(15:17) che

alfa dell'acido retinoico (RARA;17). Ciò porta alla formazione PML-RARA e RARA-PML. In cellule sane PML è localizzata negli NB: se i soggetti vengono trattati con acido retinoico è possibile la riformazione degli NB.

Come già accennato sono molte le proteine che compongono gli NB. Tra queste, le più rilevanti sono PML, SP100, Daxx (*Death associated protein 6*), TOPORS (*Topoisomerase binding protein 1*), SUMO (*Small Ubiquitin-related Modifier*), (queste proteine verranno descritte in maniera più approfondita nel paragrafo **1.5.f**).

Altre proteine che si possono trovare all'interno degli NB sono: BLM (*bloom syndrome protein*), NDP55 (*Nuclear Dot Protein-55*, fa parte di un gruppo di proteine non ben caratterizzate che aumentano in caso di shock termico), CPB (*CREB binding protein* presente solo in alcune cellule, attiva la trascrizione mediata da GR [*glucocorticoid receptor*] e possiede attività DNA elicasi), pRb (*Retinoblastoma protein*, regola la trascrizione, se overespressa potenzia l'espressione genica mediata da GR), p53 (regola la trascrizione e se overespressa reprime l'espressione genica mediata da GR), e-IF-4 (*eukaryotic translation initiation factor 4E*, fattore coinvolto nell'inizio della traduzione), HAUSP (*Herpesvirus-associated ubiquitin specific protease*, enzima deubiquitinante), Int6 (fattore coinvolto nell'inizio della traduzione).

1.5.c Funzioni

Gli NB sono probabilmente coinvolti in diverse attività cellulari chiave come invecchiamento, proliferazione, apoptosi, ciclo cellulare, risposta agli stress, segnalazione ormonale, regolazione della trascrizione, sviluppo. Non è ancora chiaro se gli NB siano essenziali alla cellula o meno, ma è stato dimostrato che topi *knock-out* per *PML* possono sopravvivere, anche se sono più vulnerabili a stress cellulari. Poiché però i geni per *PML* non sono conservati in tutti gli eucarioti, si suppone che gli NB svolgano un ruolo importante solo nell'uomo (Zhong et al., 2000). Sono di seguito elencate le possibili funzioni degli NB che sono state proposte in letteratura.

- (1) *Deposito*. È stato proposto che gli NB sono troppo eterogenei per avere una precisa funzione, tanto più che la maggior parte delle proteine che li compongono svolgono la loro attività altrove nel nucleo. Probabilmente, infatti, gli NB agiscono come deposito di proteine, le quali possono essere indotte ad entrare o uscire in seguito a diversi stimoli e questa azione di bilanciamento di entrata-uscita negli NB potrebbe essere necessaria per la sopravvivenza cellulare (Negorev & Maul, 2001).
- (2) *Immunosorveglianza*. Durante attacchi virali o infiammazioni si possono innalzare i livelli di interferone, che stimola la trascrizione di geni quali *PML*, *SP100* e di altri componenti degli NB. Ciò provoca un aumento del numero e della grandezza degli NB, cosa che fa supporre abbiano un ruolo durante tali eventi di stress cellulare (Lavau et al., 2001).
- (3) *Patumiera*. Si è visto che negli NB possono accumularsi proteine associate a patologie, con conseguente ingrossamento di tali strutture. Essendo poi gli NB collocati vicino al proteosoma, potrebbero portare tali proteine alla degradazione (Negorev & Maul, 2001; Fabunmi et al., 2001).

coinvolgimento degli NB in tali processi cellulari. La capacità di PML di trimerizzare e di interagire con la cascatina apoptotica quali la proteina Daxx. PML agisce probabilmente anche come soppressore di tumori e inibitore della crescita cellulare tramite pRB e p53 (Zhong *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000 b).

(5) *Trascrizione.* Pare che gli NB abbiano un'azione sia nell'attivazione che nella repressione della trascrizione, infatti in essi sono presenti fattori di trascrizione e proteine che possono far cambiare la struttura della cromatina. Gli NB comunque non si associano con il sito attivo di trascrizione e non co-localizzano con il DNA nascente. In particolare si è notato che a seconda della sua conformazione e legame con altre proteine, PML può essere considerata i) un coattivatore (grazie alla sua interazione con CPB e con p53, PML stabilizza il complesso coattivatore-fattore di trascrizione), ii) un corepressore (inibendo Sp1 e pRB) o iii) un derepressore (con l'aiuto di Daxx o Tax) (LaMorte *et al.*, 1998). Sono stati proposti tre modelli per spiegare ipoteticamente il ruolo degli NB nella trascrizione (Zhong *et al.*, 2000):

(1) *Titolazione:* la trascrizione avviene nelle vicinanze degli NB, che fungono da riserva di fattori e cofattori trascrizionali, di cui regolano la concentrazione.

(2) *Modificazione:* la trascrizione avviene all'esterno degli NB, che tuttavia controllano le vie regolatorie coinvolte nella trascrizione (ad esempio negli NB avviene la sumoilazione di alcuni coattivatori o repressori, condizionandone l'attività).

(3) *Compartimentalizzazione:* gli NB possono essere un centro di compartimentalizzazione subnucleare dove fattori bifunzionali possono esercitare una delle loro funzioni. Ad esempio, alcuni fattori trascrizionali, se esclusi dagli NB, possono diventare degli attivatori e viceversa.

Oltre a queste funzioni è stato ipotizzato che gli NB siano coinvolti nella riparazione e replicazione del DNA, nel processamento dell'RNA e nella crescita cellulare (Zhong *et al.*, 2000).

1.5.d Il processo di sumoilazione

Molte delle proteine facenti parte degli NB subiscono sumoilazione, modifica che spesso regola la loro entrata negli NB. Inoltre, la desumoilazione di alcune proteine degli NB ne può causare la distruzione. Inoltre, una delle proteine che ho scoperto interagire con la proteina UL44 di HCMV (vedi Risultati, paragrafo 4.3.e) utilizzando il sistema del doppio ibrido è proprio un enzima facente parte della cascata sumoilativa.

SUMO (*Small Ubiquitin-related MOdifier*) è una piccola proteina di circa 100 aa che può legare reversibilmente molte proteine quali regolatori trascrizionali, della struttura cromatinica e proteine coinvolte nel riparo del DNA, modificando la loro attività o collocazione subcellulare. Ciò può portare alla modulazione della regolazione dell'espressione genica, del mantenimento del genoma e della trasduzione dei segnali.

Il complesso degli enzimi che legano e rimuovono SUMO dai substrati è molto simile a quello utilizzato nell'ubiquitinazione: in entrambi sono presenti E1 (*ubiquitin activating enzyme*), E2 (*ubiquitin conjugating enzyme*, detto Ubc9) ed E3 (*ubiquitin protein ligase*)

...). SUMO e Ubiquitina presentano una struttura simile, con un grado di identità (vedi Figura 1.12). Ubiquitina è una proteina di 76 aa in grado di legare moltissime proteine (Pickart & Eddins, 2004). Solitamente un substrato poli-ubiquitinilato viene indirizzato al proteasoma ove avviene la sua degradazione; al contrario il legame con una sola ubiquitina può modificare la collocazione e l'attività di un certo substrato. Spesso SUMO e ubiquitina competono per gli stessi substrati: legano entrambi, reversibilmente, attraverso le glicine C-terminali, le stesse lisine del substrato bersaglio con un ponte isopeptidico. Il loro legame può però portare a conseguenze molto diverse (Tabella 1.3). Entrambe hanno spesso la funzione di promuovere l'interazione tra proteine che, se non modificate, avrebbero una scarsa affinità per certi substrati.

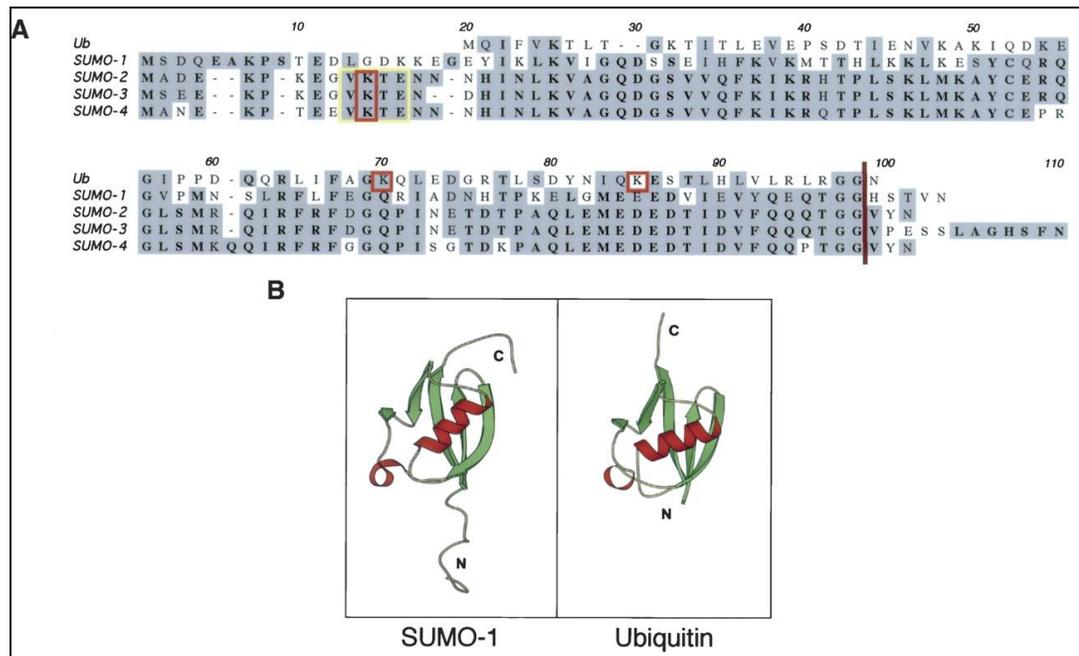


Figura 1.12: Sequenza amminoacidica e similarità strutturale tra SUMO e Ubiquitina. (A) Allineamento amminoacidico tra Ubiquitina e le 4 isoforme di SUMO: le identità sono indicate in azzurro, mentre sono riquadrati in giallo il motivo δ consenso per la sumoilazione e in rosso le lisine che legano SUMO. Le lisine 48 e 63 di Ubiquitina servono per la sua polimerizzazione. È indicato in marrone il sito di taglio che produce le proteine mature con i residui glicina-glicina C-terminali. (B) Modello che mostra la similarità tridimensionale tra SUMO e Ubiquitina: i foglietti sono colorati in verde e le eliche in rosso. Da notare che SUMO ha un'estensione N-terminale non presente nell'Ubiquitina (da Gill, 2004).

		della sumoilazione	Ruolo dell'ubiquitinazione	Lisina comune
		con Ub	Ne promuove la degradazione proteasoma-dipendente	si
NEMO	Traduzione del segnale/regolazione di IKK	Promuove la localizzazione nucleare	È richiesta per l'attivazione di IKK	
yPCNA	Replicazione e riparazione del DNA	Regola la riparazione del DNA durante la replicazione	La monoubiquitinazione promuove la translesion DNA repair; la poliUb promuove lo error-free DNA repair	si
PML	<i>Tumor suppressor</i>	Regola la collocazione subcellulare; importante per l'integrità degli NB	Ne promuove la degradazione proteasoma-dipendente	
p53	Fattore di trascrizione/tumor suppressor	Diversi effetti; riduce l'attivazione trascrizionale in alcuni contesti	Ne promuove la degradazione proteasoma-dipendente	
Glucocorticoid receptor (GR)	Fattore di trascrizione	Riduce l'attivazione trascrizionale in alcuni contesti	Ne promuove la degradazione proteasoma-dipendente	
c-Myb	Fattore di trascrizione	Riduce l'attivazione trascrizionale	Ne promuove la degradazione proteasoma-dipendente	
HDAC-1	Istone deacetilasi/corepressore trascrizionale	Promuove l'attività della deacetilasi/ repressione trascrizionale	Ne promuove la degradazione proteasoma-dipendente	

Tabella 1.3: Conseguenze della sumoilazione e dell'ubiquitinazione. In tabella sono elencati dei substrati, la cui sumoilazione od ubiquitinazione può portare a ruoli funzionali diversi (da Gill, 2004).

Nella cascata sumoilativa (Figura 1.13), il precursore di SUMO viene tagliato da una proteasi specifica (SENP) in modo da esporre le glicine C-terminali. In seguito, SUMO, tramite una reazione ATP-dipendente, si lega con un legame tioestereo allo SH di E1 (Aos1/Uba2). SUMO viene quindi trasferito alla cisteina 93 di Ubc9, con il quale forma sempre un legame tioestereo. Infine SUMO si lega tramite un ponte isopeptidico alla lisina bersaglio del substrato, cosa che avviene spesso con l'aiuto di E3. SUMO può venire rimosso da SENP, che ha attività isopeptidasica.

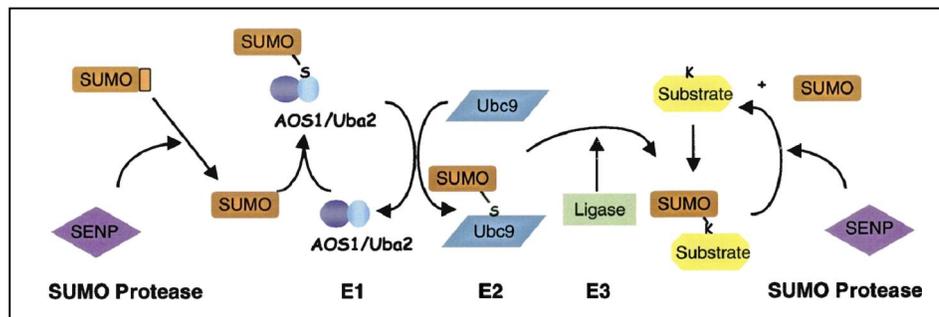


Figura 1.13: In figura è riportato uno schema delle fasi che portano alla sumoilazione di un substrato. (Da Gill, 2004).

La sumoilazione avviene in modo molto simile alla ubiquitinazione, fatta eccezione per alcune differenze. Innanzi tutto il legame di SUMO può avvenire solo in presenza della sequenza consenso KXE (= aa idrofobico). Nell'ubiquitinazione esistono molti tipi di E2 e vi sono vari tipi di E3, che legano E2 attraverso un RING domain (Really Interesting New Gene) e attraverso l'HECT domain (Homologous to E6AP Carboxy Terminus), trasferiscono l'Ubiquitina al substrato. Nella sumoilazione invece vi è un

Ubc9 è una proteina di 159 aa che è presente nell'uomo e si codificano per la stessa proteina. Il suo sito attivo è in posizione 93, attraverso cui può legare, con un ponte tioestereo la glicina terminale di SUMO. Ubc9 può essere associata agli NB.

Ci sono 3 diversi tipi di SUMO, simili tra loro. SUMO 2 e 3 sono identiche tra loro al 96% e al 46% con SUMO1. A differenza di SUMO 1, SUMO 2 e 3 posseggono la sequenza δ consenso δ KXE per la polisumoilazione. SUMO 1 è presente in prevalenza come forma coniugata ad altre proteine, invece SUMO2 e 3 si trovano in prevalenza in forma libera. La sumoilazione è regolata in risposta a stimoli esterni: in caso di stress termico od ossidativo vi è un aumento nella produzione di SUMO 2 e 3. Cellule che sovraesprimono SUMO 2 e 3 mostrano prematura senescenza (Gill, 2004). SUMO 1 viene iperprodotto in risposta a prolungata ipossia.

1.5.e Substrati di SUMO e funzioni del processo di sumoilazione

Molti substrati di SUMO sono proteine nucleari con un importante ruolo nella regolazione della trascrizione, della struttura cromatinica e della riparazione del DNA. Molto interessante è il fatto che gli stessi substrati possono venire ubiquitinati, spesso con conseguenze diverse (Tabella 1.3).

Molte proteine facenti parte degli NB sono sumoilate (Figura 1.14).

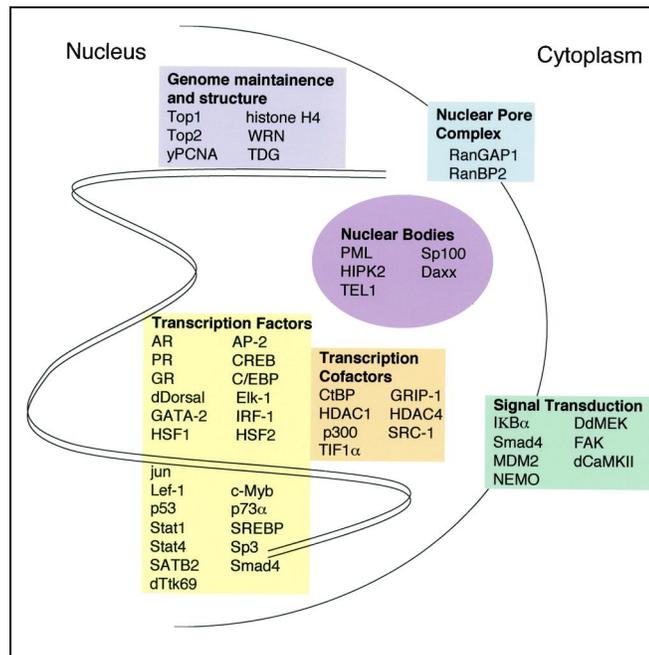


Figura 1.14: Rappresentazione schematica dei substrati che possono subire sumoilazione, raggruppati per funzione o collocazione subcellulare (da Gill, 2004).

Molte delle funzioni di SUMO non sono ancora note. È però stato osservato che le proteine che regolano il ciclo cellulare e la differenziazione vengono sumoilate ed infatti cancro, infezioni e disordini neurodegenerativi possono essere associati ad una alterazione della sumoilazione. Virus e batteri patogeni utilizzano il sistema sumoilativo

fezione. Ad esempio la proteina Yopj di *Yersinia* chinasi, in modo da inibire le difese immunitarie (Orthromielocitica acuta la proteina PML non riesce ad essere sumoilata, e solo con un trattamento che riporti PML allo stato modificato (sumoilazione) può portare alla regressione della patologia (Muller *et al.*, 1998). Si è visto anche che l'overespressione di SUMO 2 influenza il processamento della proteina -amiloide che conduce all'Alzheimer (Chan *et al.*, 2002).

Verranno di seguito elencate possibili funzioni della sumoilazione:

- (1) *Regolazione della localizzazione nucleare e subnucleare, tramite regolazione della stabilità proteica e di interazioni proteina-proteina.* Il legame di SUMO con un substrato può far cambiare l'affinità di quest'ultimo per altre proteine, con conseguente possibile modificazione nella localizzazione subcellulare di tali substrati. Per esempio RanGAP, *Ran GTPase Activating Protein* che è citoplasmatico, se sumoilato può legarsi ai pori nucleari. Anche NEMO, un regolatore della IKB chinasi (I-Kappa-B), se sumoilato può traslocare nel nucleo. Inoltre, la sumoilazione di PML è importante per il mantenimento e l'assemblaggio degli NB.
- (2) *Regolazione dell'espressione genica.* Molte delle proteine che vengono sumoilate sono fattori di trascrizione promotore-specifici, coattivatori o corepressori. Sebbene gli effetti della sumoilazione possano essere vari, nella maggior parte dei casi pare che in seguito a sumoilazione vi sia una repressione dell'attività di alcuni attivatori trascrizionali (Sp3, C/EPB, Elk-1, c-Myb, recettori steroidei). In molti casi la sumoilazione inibisce l'attività di fattori di trascrizione promuovendone l'interazione con proteine che reprimono la trascrizione. Il sistema è comunque molto complesso, in quanto spesso sia coattivatori che corepressori possono venire sumoilati.
- (3) *Modificazione degli istoni.* L'istone H4 si è visto essere direttamente modificato da SUMO: sebbene non si sappia con precisione l'effetto di tale modifica, pare che essa sia coinvolta nella repressione della trascrizione. A complicare il quadro vi è il fatto che sia l'acetiltransferasi che la deacetilasi istoniche possono essere SUMO-modificate.
- (4) *Riparo del DNA.* Molti fattori ed enzimi coinvolti nella replicazione e nel riparo del DNA come PCNA, l'elicasi WRN (*Werner syndrome helicase*), le topoisomerasi I e II e l'enzima Timina-DNA glicosilasi (TDG) possono venire sumoilate.

1.5.f Alcune delle proteine che compongono gli NB e loro interazione con il processo di sumoilazione

PML

PML è una proteina di 69 KDa ed è l'unica davvero essenziale per la formazione degli NB. Può venire sumoilata, ma non è necessario venga modificata per comporre gli NB, benché per la maggior parte PML negli NB sia coniugata a SUMO, fatta eccezione durante la mitosi, dove è invece fosforilata. Solo se sumoilata può reclutare Daxx.

PML ha 3 diversi siti di sumoilazione e appartiene a una famiglia di proteine che sono caratterizzate dalla presenza del motivo tripartito RBCC (RING, B-box, *coiled-coil*),

a di zinco (*RING finger*), in un altro ricco di cisteine in seguito da una spirale avvolta di residui di leucina (*coiled* che permette l'omodimerizzazione di PML, la sua interazione con altre proteine e la sua localizzazione negli NB. Possiede un NLS che le serve per entrare nel nucleo (Duprez *et al.*, 1999). PML è in grado di interagire con moltissime proteine, come CPB, pRb e p53.

SP100

SP100 è una proteina nucleare di 100 KDa, presente in 4 varianti di *splicing*: SP100-A, SP100-B, SP100-HMG (il dominio HMG, *Hight-Mobility Group*, le conferisce la capacità di legare il DNA) e SP100-C (che contiene un *bromo domain* caratteristico di alcune proteine cromatiniche). Le ultime tre varianti elencate posseggono inoltre un *SAND domain* (δSP100, AIRE-1, NucP41/75 and DEAF-1), di sconosciuta funzione, che non è presente in SP100A (Figura 1.15).

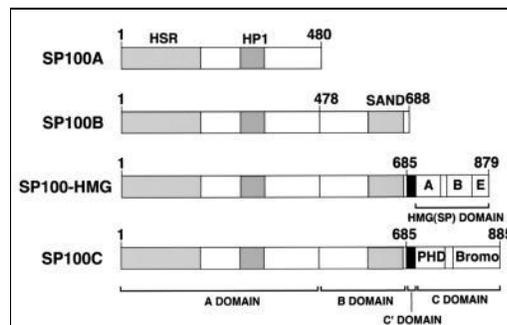


Figura 1.15: Sono rappresentati i maggiori domini delle 4 varianti di *splicing* della proteina cellulare SP100. Il dominio HSR permette l'omodimerizzazione, HP1 consente il legame con le *Heterocromatin binding protein*. La variante SP100-HMG possiede un dominio HMG che le consente di legare il DNA, mentre la variante SP100C contiene un *bromo domain* tipico delle proteine cromatiniche. Non è stata chiarita la funzione del *SAND domain* (da Seeler *et al.*, 2001).

Tutte le varianti posseggono il dominio di omodimerizzazione HSR, e sono in grado di legare con la porzione N-terminale le HP-1 (*heterocromatin binding proteins*). SP100 può inoltre legare le HMG2 (*Hight-Mobility Group protein 2*). Il legame di tali proteine con SP100, che in tal modo interagisce con il DNA, può avere una funzione di repressione trascrizionale, pertanto il sequestro di SP100 da parte degli NB può svolgere una azione regolatrice della trascrizione. Anche SP100 può venire sumoilata, ma non necessita di tale modifica per accumularsi negli NB; probabilmente lega una molecola adattatrice per entrare negli NB. Pare che una maggiore concentrazione di proteina in tali organelli si abbia nel caso in cui vi sia una scarsa attività del proteosoma, sebbene la capacità degli NB di accumulare al loro interno SP100 sembri limitata. È stato dimostrato che la maggior parte della proteina SP100 presente negli NB sia sumoilata, modificazione che scompare durante la mitosi, e che viene sostituita da fosforilazione. Pare che la sumoilazione renda più stabile il legame di SP100 con le HP-1 (Seeler *et al.*, 2001). È noto inoltre che SP100 è in grado di legare direttamente Ubc9 e indirettamente anche Daxx, altre due proteine che fanno parte degli NB.

è implicata nel controllo dell'apoptosi cellulare. È una delle tante proteine, tra cui la deacetilasi istonica. Trasporta quest'ultima nei pressi degli istoni, che possono così venire deacetilati: in conseguenza a ciò la cromatina acquisisce una struttura più chiusa, meno incline alla trascrizione, e per tale motivo Daxx può essere definita un corepressore trascrizionale. Daxx è in grado di legare direttamente i fattori di trascrizione Pax3 e ETS1, inibendoli, e svolgendo così la sua azione di repressore trascrizionale. Daxx agisce da coattivatore o corepressore trascrizionale di Pax5, che è in grado di legare direttamente, a seconda che recluti istone deacetilasi o acetiltransferasi. Daxx lega inoltre il *Fas receptor* (che media così l'apoptosi), PML, CENP-C (*centromere protein-C*), la DNA metiltransferasi 1, HSP27 (*Heat shock protein*), Ubc9, SUMO-1 e componenti della cromatina quali H2A, H2B, H3 e H4.

Daxx è inoltre in grado di legare il *glucocorticoid receptor* (GR) attraverso gli aa 501-740 e si è visto che tale interazione media un effetto di repressione trascrizionale. Quando Daxx è sequestrata negli NB non è più in grado di svolgere queste sue funzioni; Daxx, attraverso il suo NLS, può entrare negli NB ed interagisce con PML sumoilata.

TOPORS (*topoisomerase 1-binding RS protein*)

TOPORS è una proteina di 1045 aa, è presente in 6 varianti, ha localizzazione nucleare e possiede una regione centrale ricca in dipeptidi di arginina e serina (*RS domain*), una parte N-terminale in cui è presente un *RING Zinc finger domain* e una parte C-terminale ricca in lisine (Figura 1.16).

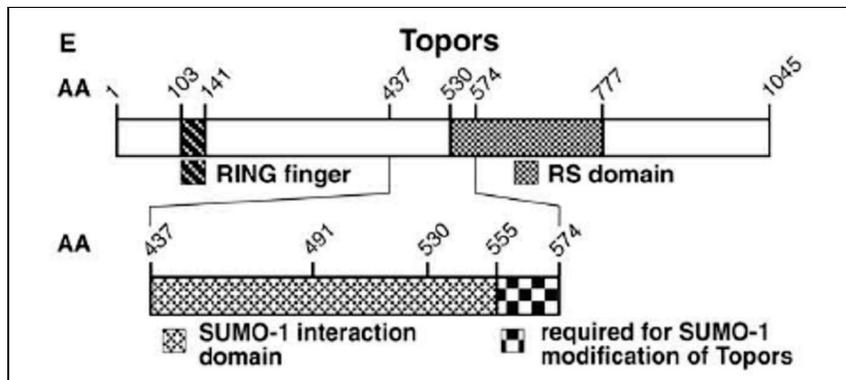


Figura 1.16: Rappresentazione schematica della proteina TOPORS, con il suo dominio a dita di zinco N-terminale (RING finger), la regione ricca in arginina e serina (RS domain) e la regione centrale necessaria per l'interazione e la modificazione con SUMO-1 (da Weger *et al.*, 2005).

TOPORS è in grado di legare attraverso il suo dominio RS la parte N-terminale della topoisomerasi 1. Il suo RING domain è simile a quello di ICP0 (proteina IE di HSV-1), che come lei possiede una funzione di attivatore trascrizionale; questo dominio le conferisce anche attività E3 SUMO-ligasica; TOPORS inoltre lega direttamente Ubc9 ed è probabilmente coinvolta nei processi di sumoilazione (Weger *et al.*, 2005). Anche la sua parte C-terminale ricca in lisine è simile a quella usata da ICP0 per entrare negli NB. Infatti anche TOPORS può localizzarsi negli NB: gli aa importanti per questa localizzazione subcellulare e per la sua sumoilazione sono a livello della porzione 437-574. Probabilmente la sumoilazione di TOPORS al C-terminale le consente di entrare

tale modifica non è stato ancora chiarito. Possiede anche
che però non le è indispensabile per andare nel nucleo
modulare la struttura cromatinica incrementando così la
trascrizione genica (decondensazione cromatinica, attivazione della trascrizione,
elongazione, *splicing* dell'mRNA). Queste sue attività potrebbero essere dovute al suo
RING domain, ricordando che però domini ricchi in RS sono tipici di proteine in grado
di legare il DNA e l'RNA (Haluska *et al.*, 1999). Il *RING domain* le conferisce anche
attività E3 ligasica su p53, che è in grado di legare: sumoilando p53 ne aumenta
l'attività trascrizionale. Oltre a p53 può indurre la sumoilazione di molte altre proteine.

1.6 L'exosoma

1.6.a Caratteristiche generali

L'exosoma è un complesso di numerose proteine con attività 3' → 5' esonucleasica,
evolutive conservate, che possono essere presenti nel nucleo o nel citoplasma. Vi
è un'alta concentrazione delle proteine exosomalie nel nucleolo, che è il sito della sintesi
ribosomiale: tale sintesi comprende la trascrizione e il processamento nucleolitico del
precursore dell'rRNA, le modificazioni nucleotidiche dell'rRNA e l'assemblaggio
dell'rRNA maturo. Infatti, l'exosoma è coinvolto nel processamento dell'rRNA e nella
sintesi ribosomiale.

Questo complesso è stato caratterizzato la prima volta utilizzando degli autoanticorpi
anti-PM/Scl in pazienti affetti da miosite e sclerodermia (Scl). Gli antigeni *self* così
riconosciuti furono chiamati PM/Scl-100 e PM/Scl-75 (Brower *et al.*, 2001).

1.6.b Proteine che compongono l'exosoma

Questo complesso è composto da 10-16 proteine con una grandezza variabile dai 110 ai
20 KDa.

In lievito l'exosoma è composto da 11 proteine, 10 delle quali hanno attività 3' → 5'
esoribonucleasica. Tutte queste proteine sono essenziali alla sopravvivenza del lievito
fatta eccezione per Rrp6p. Omologhi di tali proteine sono stati trovati in *E. coli* e
nell'uomo (Tabella 1.4).

<i>S. cerevisiae</i>	<i>E. coli</i>	Uomo
	RNA-binding domain	hRrp4p
Rrp40p	S1 RNA-binding domain	hRrp40p
Rrp41p/Ski6p	RNase PH	hRrp41p
Rrp42p	RNase PH	hRrp42p
Rrp43p	RNase PH	?
Rrp44p/Dis3p	RNase R	hRrp44p/hDis3p
Rrp45p	RNase PH	PM/Scl-75
		OIP2p
Rrp46p	RNase PH	hRrp46p
Rrp6p	RNase D	PM/Scl-100
Mtr3p	RNase PH	?
Csl4p/Ski4p	S1 RNA-binding domain	hCsl4p

Tabella 1.4: Componenti dell'exosoma in lievito, in *E. coli* e nell'uomo. Nell'uomo ci sono 10 omologhi dei componenti exosomiali del lievito. L'exosoma umano è però composto da 16 proteine, per alcune delle quali la funzione non è nota. Sei delle proteine umane sono omologhe alle RNasi PH di *E. coli* e altre 3 presentano il S1-RNA-binding domain (Brower *et al.*, 2001, modificata).

L'exosoma umano è composto da 16 proteine di cui 6 con dominio RNase-PH (Rrp41, Rrp42, Rrp46, PM/Scl-75, Mtr3, Oip2/Rpr43), 3 con un dominio RNA-binding S1 e KH (Rrp4, Rrp40, Csl4), una simile alla RNase-D (PM/Scl-100), una probabile elicasi (Kiaa0052) e una proteina che viene fosforilata specificatamente nella fase M del ciclo cellulare (Mpp6). Alcune di queste proteine sembrano interagire tra loro (Figura 1.17).

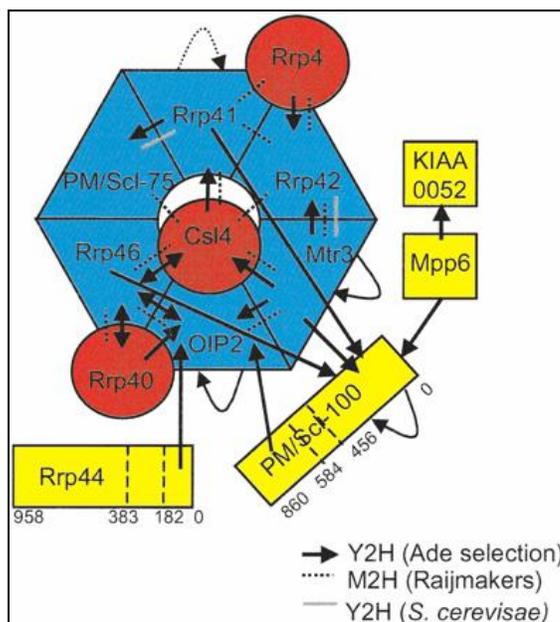


Figura 1.17: Modello del complesso proteico dell'exosoma umano. Sulla base della struttura cristallografica della PNPasi (*PoliNucleotide Phosphorilase*) di *S. antibioticus* e tenendo conto delle interazioni proteina-proteina rilevate tramite il sistema del doppio ibrido, è stato creato questo modello, in cui le 6 subunità simili alle RNasi pH formano un anello esamerico e le tre proteine contenenti il dominio S1 sono all'esterno di esso. Y2H=yeast two-hybrid; M2H=mammalian two-hybrid (Lehner & Sanderson, 2004; integrato con Rajmakers *et al.*, 2003).

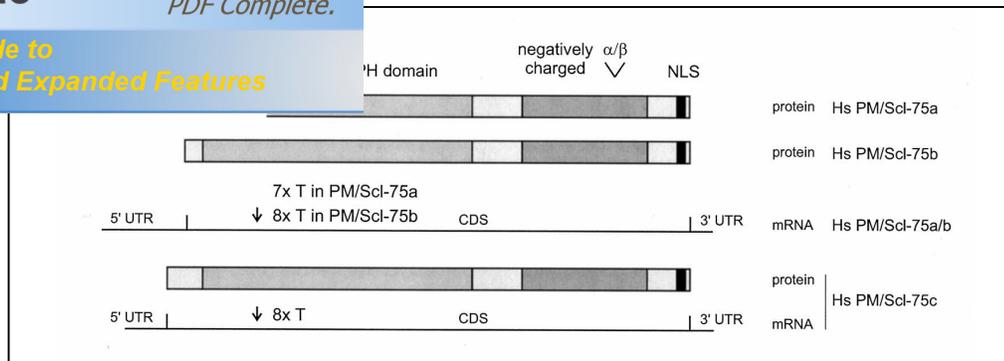


Figura 1.18: Isoforme di PML/Scl-75 (EXOSC9). Si può vedere in figura una rappresentazione schematica dei domini presenti nelle differenti isoforme di PML/Scl-75 (EXOSC9). Il dominio α RNase PH δ (che è incompleto nell'isoforma a), la regione carica negativamente, il sito nel quale gli amminoacidi (ELGFHHVGGQTGLEFLTS) codificati dall'esone extra 10 vengono inseriti in PML/Scl-75- e il putativo NLS. Sotto alle proteine vi è una rappresentazione schematica del loro mRNA. È mostrata la lunghezza relativa della sequenza codificante, le UTR al 5' e 3' e il numero di timidine nel tratto timidinico (Raijmakers *et al.*, 2003).

In particolare, PM/Scl-75 (detta anche δ exosome component 9 δ , EXOSC9) è una proteina di circa 39 KDa presente in varie isoforme (Figura 1.18). Interagisce specificamente con gli AREs (*AU Rich instability Elements*) ed è in grado di interagire mediante la sua porzione N-terminale con Rrp46p e Rrp41p. Il suo C-terminale, ricco in residui basici, è sufficiente per conferirgli la localizzazione nucleare (Raijmakers *et al.*, 2003; Raijmakers *et al.*, 2002).

1.6.c Funzioni

È stato osservato che alcune elicasi ed altri fattori coinvolti nel metabolismo dell' α RNA interagiscono con l'exosoma, suggerendo che tale complesso possa avere un ruolo nella regolazione e nella coordinazione di diversi processi riguardanti il metabolismo dell' α RNA. È stata studiata la funzione dell'exosoma creando dei mutanti di lievito deficienti per uno o più componenti. Si è così scoperto che l'exosoma è coinvolto nel processamento nucleolitico del precursore dell' α RNA durante la sintesi ribosomale, portando alla maturazione dell' α RNA.

Oltre a questa funzione l'exosoma sembra permetta il processamento di *small nuclear RNAs*, che giocano un ruolo importante come pre-messaggeri nello *splicing* dell' α RNA e nel processamento e modificazione dell' α RNA.

Inoltre si è visto che il complesso exosomiale compete con l'apparato di *splicing* per gli *unspliced nuclear mRNAs* al fine di degradarli (Brower *et al.*, 2001).

In generale la degradazione dell' α mRNA può esser dovuta a deadenilazione 5' \rightarrow 3' (in lievito) o 3' \rightarrow 5' (nell'uomo). Vi sono vari complessi che svolgono tale funzione, tra cui l'exosoma che pare essere la via preferita nell'uomo (Lehner & Sanderson, 2004). È stato dimostrato che in cellule HeLa il complesso exosomiale umano è indispensabile per una efficiente degradazione dell' α RNA, e che in presenza di AREs (*AU Rich instability Elements*) l'attività exonucleolitica aumenta (Mukherjee *et al.*, 2002). Gli AREs, presenti nelle 3'-UTRs (*untranslated regions*) di molti mRNA di mammifero, hanno la funzione di indirizzare i trascritti alla distruzione. Si è visto che alcune proteine dell'exosoma interagiscono con la poly(A) ribonucleasi e altre proteine degradative, il che suggerisce una coordinazione tra le diverse vie degradative (Lehner & Sanderson, 2004).

e le chinasi ciclino-dipendenti

La divisione cellulare è controllata da una rete complessa di segnali biochimici che sono simili in tutte le cellule eucariotiche. Tutti questi segnali regolano la transizione delle fasi del ciclo. Le transizioni maggiormente caratterizzate sono quelle dalla fase G₁ alla S e dalla fase G₂ alla mitosi. Nel lievito entrambe le fasi sono regolate dalla protein chinasi cdc2 (o cdc28; cdc= *cell division cycle*), che per poter svolgere la sua attività deve legare una specifica ciclina. Vi sono diversi tipi di cicline, alcune coinvolte nella transizione G₁/S (cicline G₁) e altre nella transizione G₂/M (cicline mitotiche). Anche negli eucarioti multicellulari vi sono molti tipi di cicline, ma, al contrario del lievito, le chinasi eucariotiche possono interagire contemporaneamente (in siti diversi) con più di una ciclina.

1.7.a Le chinasi ciclino-dipendenti cdc2 e cdk2

In cellule di mammifero, la cdc2 (o cdk1) si associa prevalentemente alle cicline di tipo A e B, mentre la cdk2 si associa alle cicline A, E, D. Le cdk4, cdk5 e cdk6 si associano prevalentemente con le cicline D. Sebbene la cdk3 non sia mai stata trovata in associazione con cicline, viene ugualmente chiamata così per la sua identità di sequenza con la cdc2.

Al fine di studiare la funzione di alcune chinasi ciclino-dipendenti sono stati creati dei mutanti dominanti negativi di tali chinasi (Asp¹⁴⁵→Asn in cdk2 e Asp¹⁴⁶→Asn in cdc2) ed espressi in cellule umane. Si è potuto osservare che cdc2 è indispensabile per la transizione dalla fase G₂ alla M, mentre cdk2 è indispensabile per la transizione dalla fase G₁ alla fase S (Van den Heuvel & Harlow, 1993).

Cdc2 è un membro della famiglia delle serin/treonin protein chinasi ed è la subunità catalitica del complesso protein chinasi conosciuto come MPF (*M phase promotion factor*) che è essenziale per la transizione dalla fase G₁ alla S e dalla G₂ alla M del ciclo cellulare eucariotico. Cicline mitotiche si associano stabilmente con queste proteine per svolgere la loro azione regolatoria. L'attività di queste proteine è controllata dall'accumulo e distruzione delle cicline durante il ciclo cellulare: in questi processi fosforilazione e defosforilazione giocano un ruolo importante.

Anche cdk2 è un membro della famiglia delle serin/treonin protein chinasi, ed è la subunità catalitica del complesso protein chinasi ciclino-dipendente, la cui attività è ristretta alla transizione dalla fase G₁ alla fase S. Questa proteina si associa ed è regolata dalle subunità regolatorie del complesso, inclusi gli inibitori p21Cip1 (CDKN1A) e p27Kip1 (CDKN1B). Inoltre la sua stessa fosforilazione ne regola l'attività.

1.7.b Ruolo di cdc2 nella replicazione di HSV-1

In cellule infettate con HSV-1, si è visto che la chinasi cdc2 è attivata da due proteine virali: la proteina infettante ICP22 e la proteina chinasi codificata da *UL13*. Le stesse proteine sono richieste per un'ottimale espressione di alcuni geni *late* (ossia *US11*, *UL38* e *UL41*). Utilizzando dei mutanti dominanti negativi per la proteina cdc2 si è

indispensabile al virus per la sintesi del gene tardivo *US11*, l'espressione di geni precoci (Advani *et al.*, 2000). *cdc2* è inibita dalla fosforilazione dovuta a *wee-1* e *myt-1*, ed è invece attivata attraverso la defosforilazione mediata da *cdc25c* e in seguito attraverso la fosforilazione mediata da una chinasi attivante ciclino-dipendente (CAK). In cellule infettate da HSV-1, *wee-1* viene inibito e *cdc25c* viene iperfosforilato, per mezzo di ICP22 e UL13. UL13 e ICP22 mediano così la stabilizzazione di *cdc2* e sono in grado di rimpiazzare il suo partner, la ciclina B, con il fattore di processività della DNA polimerasi di HSV-1, UL42. *Cdc2* infatti è in grado di legare l'N- e il C-termini di UL42 che possiede un dominio simile al *ciclin box*. Il C-termini di UL42 può venire inoltre fosforilato da *cdc2* (Figura 1.19). Oltre ad UL42 vi sono altre proteine virali coinvolte nella replicazione di HSV-1 che possono venire fosforilate da chinasi cellulari: UL9 (che lega UL42), UL30 (subunità catalitica della DNA polimerasi), UL52 (elicasi/primasi), UL29 (proteina che lega ssDNA) (Advani *et al.*, 2001).

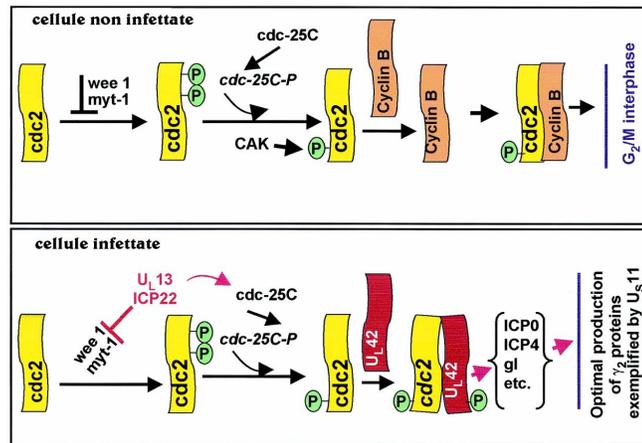


Figura 1.19: Schema dell'attività e della regolazione di *cdc2* in cellule non infettate (in alto) e infettate da HSV-1 (in basso). In cellule non infettate *cdc2* è inattivata da *wee-1* e *myt-1* ed è attivata dalla fosfatasi *cdc25c*, dalla chinasi attivante ciclino-dipendente (CAK) e dall'associazione con la ciclina B nell'interfase G_2/M . Durante l'infezione da HSV-1, *wee-1* e *myt-1* sono inattivati da ICP22 e UL13; UL42 può così associarsi a *cdc2*. I substrati di *cdc2* in cellule infettate includono ICP0, ICP4 e gI; l'attivazione di *cdc2* in cellule infettate è associata con l'accumulo di una serie di proteine, come ad esempio US11 (Advani *et al.*, 2001, modificato).

Inoltre si è visto che UL42 è in grado di legare la forma fosforilata della topoisomerasi II per mezzo di *cdc2*, e che tale legame dipende da ICP22. La topoisomerasi II è indispensabile per la sintesi del DNA virale, ma ICP22 non lo è, il che suggerisce che la topoisomerasi II abbia più di una funzione: pare che HSV-1 recluti la topoisomerasi II dopo la sintesi del DNA virale per distribuire i concatameri di DNA della progenie, al fine di ottenere un'ottimale trascrizione dei geni tardivi (Figura 1.20; Advani *et al.*, 2003).

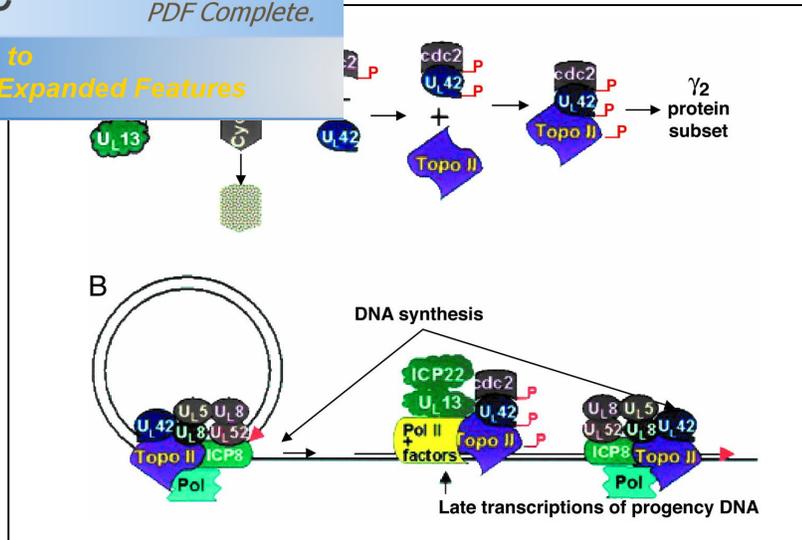


Figura 1.20: Modello del ruolo della topoisomerasi II nella replicazione di HSV-1. **A** Rappresentazione schematica dei passaggi coinvolti nella sintesi delle proteine γ_2 . La proteina regolatoria ICP22 e la protein chinasi UL13 mediano la stabilizzazione di cdc2 e la degradazione della ciclina B. Cdc2 è così in grado di legare UL42 e tale complesso può interagire con la topoisomerasi II. **B** Il ruolo della topoisomerasi II nel ciclo virale. È mostrata una rappresentazione schematica della sintesi del DNA virale a δ cerchio rotante e la trascrizione dei geni tardivi. Il complesso topoisomerasi-UL42 si associa in maniera dipendente da cdc2, in modo da rendere efficiente la trascrizione (Advani *et al.*, 2003, modificato).

1.8 Le interazioni proteina-proteina e le tecniche impiegate per il loro studio

Le interazioni proteina-proteina sono coinvolte praticamente in tutti i processi cellulari, tra cui la replicazione del DNA, la trascrizione, lo *splicing* e la traduzione, la secrezione, il controllo del ciclo cellulare, il metabolismo, la formazione di macrostrutture cellulari e di complessi enzimatici e la trasduzione del segnale. Interazioni proteiche transitorie sono coinvolte nell'assemblaggio dei complessi trascrizionali, nel trasporto delle proteine attraverso le membrane, nel ripiegamento di proteine native catalizzato dalle chaperonine e nella rottura e riformazione di strutture subcellulari durante il ciclo cellulare. Tutte le modificazioni a cui vanno incontro le proteine coinvolgono queste interazioni transitorie: enzimi come chinasi, fosfatasi, glicosil transferasi, acil transferasi e proteasi interagiscono con le loro proteine substrato per un breve periodo di tempo. Si sa che alterazioni di interazioni proteina-proteina contribuiscono all'insorgere di diverse malattie: la possibilità di modulare queste interazioni costituisce un'ipotetica strategia terapeutica.

Lo studio delle interazioni proteina-proteina riveste dunque una rilevante importanza biologica e proprio per questo sono state messe a punto numerose tecniche atte ad individuare tali interazioni (Phizicky & Fields, 1995). Alcuni dei metodi proposti sono di tipo chimico-fisico, quale ad esempio la cromatografia di affinità, che consiste nel legare covalentemente una proteina ad una colonna ed usarla per selezionare proteine presenti in un estratto cellulare in grado di reagire in modo specifico. Un esempio di tale

tato dal *GST-pulldown* (vedi paragrafo **1.8.b**). Altre sono *affinity blotting*, co-immunoprecipitazione, *cross-*

Per studiare le interazioni proteina-proteina esistono inoltre metodi genetici basati su librerie genomiche o di cDNA; l'enorme vantaggio di questi approcci è che i geni delle proteine così identificate sono immediatamente disponibili per ulteriori studi. Alcuni di questi metodi sono caratterizzati dall'espressione in batteri o fagi filamentosi di proteine che vengono poi saggiate per la capacità di legare una sonda proteica marcata (*protein probing*), oppure un ligando immobilizzato su un supporto (*phage display*). In particolare l'utilizzo delle librerie di peptidi *random* nei fagi filamentosi ha dato un forte impulso all'identificazione di nuovi anticorpi in grado di legare specificamente piccoli peptidi. Tra i metodi basati su librerie rientra anche il *two-hybrid system* o sistema del doppio ibrido.

1.8.a Il sistema del doppio ibrido: aspetti storici, caratteristiche e applicazioni

Gli studi sulla regolazione della trascrizione eucariotica hanno fin dall'inizio fatto emergere l'ipotesi che gli attivatori trascrizionali sito-specifici avessero una struttura modulare, fossero cioè costituiti da domini indipendenti con funzioni diverse (Frankel & Kim, 1991). Vari studi hanno confermato che questa è una caratteristica generale di molti attivatori, sia eucariotici che virali, e che queste unità funzionali degli attivatori trascrizionali possono essere utilizzate per la costruzione di attivatori ibridi costituiti da porzioni di proteine eterologhe (Brent & Ptashne, 1985).

Proprio sulla base di questi studi, è stato sviluppato il sistema del doppio ibrido. Questo è un sistema genetico per rilevare interazioni proteina-proteina e sfrutta il fatto che i due domini funzionali essenziali affinché un attivatore della trascrizione funzioni, cioè il BD (dominio di legame al DNA) e l'AD (dominio di attivazione), non devono necessariamente far parte della stessa proteina, ma possono essere avvicinati spazialmente dall'interazione di due proteine qualsiasi fuse a tali domini.

Il sistema del doppio ibrido richiede la costruzione di due proteine di fusione: una costituita dal BD fuso ad una proteina X, e l'altra derivante dalla fusione dell'AD con una proteina Y, o con una libreria di frammenti proteici codificati da una libreria genomica di cDNA. Se X e Y formano un complesso proteina-proteina e avvicinano pertanto spazialmente i due domini (BD e AD) dell'attivatore trascrizionale, si ha la trascrizione di un gene *reporter*, solitamente il gene *lacZ* di *E. coli*. Questo sistema, nella prima versione proposta (Fields & Song, 1989), utilizzava il BD della proteina Gal4 di *S. cerevisiae* (corrispondente agli aa 1-147) e la regione II dell'AD di Gal4 (aa 768-881), che sono appunto i due domini necessari e sufficienti perchè Gal4 agisca da attivatore trascrizionale (Figura **1.21**).

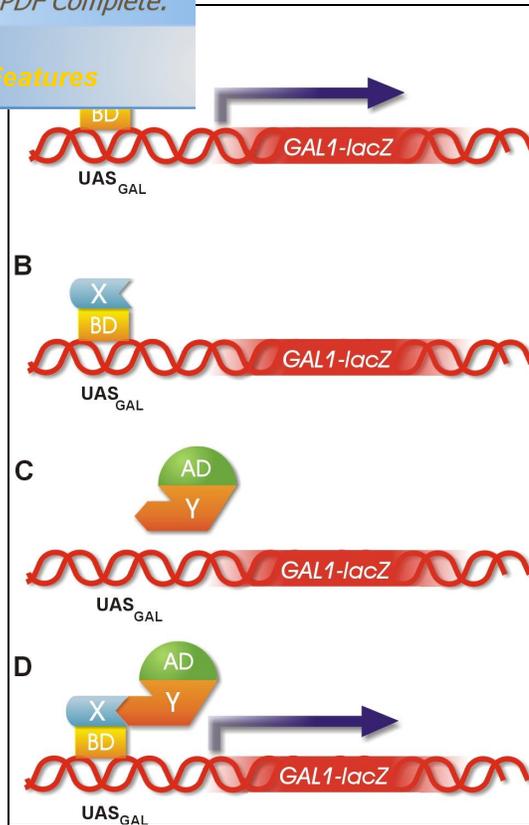


Figura 1.21: Il sistema del doppio ibrido: un modello del suo meccanismo. **A** L'attivatore trascrizionale Gal4 di *S. cerevisiae* contiene sia un dominio di legame al DNA (BD) che un dominio di attivazione (AD). Attraverso il BD lega sequenze UAS_{GAL} ed induce la trascrizione del gene *reporter* *GAL1-lacZ*. **B** Una proteina ibrida contenente il BD fuso ad una proteina X non è in grado di attivare da sola la trascrizione del gene "reporter". **C** Analogamente, una proteina ibrida che contiene l'AD fuso ad una proteina Y non è in grado da sola di attivare la trascrizione del gene "reporter". **D** L'interazione tra le proteine X ed Y porta i due domini di Gal4 in prossimità uno dell'altro, permettendo la trascrizione del gene "reporter" *GAL1-lacZ*.

Solitamente lo studio dell'interazione tra le proteine X e Y avviene nel nucleo di ceppi di *S. cerevisiae* mutagenizzati aventi le seguenti caratteristiche:

- integrazione nel genoma del gene *reporter lacZ* di *E. coli* (codificante l'enzima β -galattosidasi) sotto il controllo della regione regolatrice del gene *GAL1*, contenente i siti UAS_{GAL} o altri siti di legame per il BD. Questo enzima *reporter* idrolizza molti β -D-galattosidi, tra cui substrati incolori quali il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattopiranoside (X-gal) e β -nitrofenil- β -D-galattopiranoside (ONPG), dando prodotti colorati. *S. cerevisiae* non possiede un'attività β -galattosidasica endogena che possa interferire con quella del gene *reporter*. Nel genoma può essere integrato anche un secondo gene *reporter*.
- mutazioni in alcuni geni della biosintesi degli amminoacidi (per es. *his3-200* o *leu2-3,112*) per permettere la selezione dei plasmidi codificanti le proteine ibride e contenenti geni marcatori (per esempio *HIS3* o *LEU2*).
- delezione dei geni codificanti le proteine Gal4 e Gal80 endogene.

Esistono ormai numerose altre versioni del sistema del doppio ibrido: ad esempio come dominio di legame al DNA viene utilizzata l'intera proteina LexA di *E. coli* (202 aa) (Moretti *et al.*, 1994); in tal caso i siti UAS_{GAL} a monte del gene *reporter* vengono

operatore *lexA*. Oppure, in alternativa, come dominio di attivazione viene usata una regione della proteina VP16 (*virion*)-1 (Bogerd *et al.*, 1993).

Le tre maggiori applicazioni di questo sistema sono:

- a) Analisi dell'interazione tra due proteine note X e Y. Se i geni che codificano queste due proteine sono stati isolati, è possibile costruire degli ibridi fondendo la proteina X al BD e la proteina Y all'AD o viceversa e trasformare il lievito con i plasmidi corrispondenti. Successivamente si verifica la presenza o meno di attività β -galattosidasi, che dà l'indicazione di un'eventuale interazione fisica tra le due proteine oggetto di studio (Fields & Song, 1989).
- b) Una volta stabilita l'interazione tra le due proteine X e Y, si possono individuare i domini e gli amminoacidi essenziali per questa interazione, facendo un'analisi mutazionale con delezioni e mutazioni puntiformi nei geni che codificano X e Y e saggiando le porzioni con il sistema del doppio ibrido (Hardy *et al.*, 1992).
- c) È inoltre possibile mettere a confronto una proteina bersaglio X fusa al BD con un'intera libreria di cDNA fusa all'AD (Chien *et al.*, 1991). In questo modo all'interno di moltissime cellule di lievito ($>10^6$) vengono espresse proteine, diverse tra loro, fuse al dominio di attivazione. Solo le proteine che vengono avvicinate al DNA grazie all'interazione con la proteina ibrida X, attivano la trascrizione del gene *reporter*. I corrispondenti cloni cellulari presentano attività β -galattosidasi e contengono i frammenti di cDNA che codificano tali proteine, disponibili per ulteriori studi.

1.8.b GST-pulldown

Il saggio di *pulldown* è un metodo *in vitro* per determinare l'interazione fisica tra due o più proteine: può essere utile per riconfermare un'interazione proteina-proteina precedentemente rilevata con un'altra metodica (quali co-immunoprecipitazione e saggio del doppio ibrido) o per identificare nuove interazioni proteiche. Il saggio di *pulldown* è una cromatografia di affinità in cui un'esca proteica coniugata ad un *tag* (quali GST, 6HIS, Flag) è catturata da un ligando immobilizzato in grado di legare specificamente il *tag*, generando un supporto di affinità secondario per isolare altre proteine preda in grado di interagire con l'esca. Esca e preda possono essere ottenute da molteplici fonti, tra cui i lisati cellulari, proteine purificate, sistemi di espressione e sistemi di trascrizione/traduzione *in vitro*.

Le condizioni e i parametri di legame tra esca e preda da utilizzare dipendono dal tipo di interazione. Interazioni stabili sono più facili da rilevare e possono resistere ai lavaggi con tamponi ad alta forza ionica, che vengono effettuati per eliminare falsi positivi causati da interazioni non specifiche. Al contrario, interazioni deboli e transienti sono assai più difficili da rilevare in quanto possono dissociarsi durante il saggio.

Successivamente, l'identificazione dell'interazione esca-preda richiede che il complesso sia rimosso dal supporto di affinità e analizzato. L'intero complesso può essere eluito utilizzando il tampone di caricamento dello SDS-PAGE o per mezzo di uno specifico analita competitivo per il *tag* o per la proteina esca. L'utilizzo del tampone di caricamento per lo SDS-PAGE è un trattamento aggressivo che provoca la denaturazione delle proteine e può portare all'eluizione anche di altre proteine che si sono legate in modo aspecifico alla matrice. L'eluizione con analiti competitivi è invece più specifica e non causa la denaturazione del complesso. Altre tecniche prevedono l'eluizione della sola preda, utilizzando gradienti di sali o di pH. Una volta fluito, il

...ante SDS-PAGE e successivamente con metodi di o autoradiografia. Nell'autoautoradiografia vengono vengono incorporati ad esempio durante la traduzione *in vitro* della preda.

La tecnica utilizzata negli esperimenti descritti in questo lavoro è quella del *GST-pulldown*, che utilizza una proteina di fusione con la GST (esca) legata a particelle coniugate con glutatione (GSH) al fine di purificare per affinità delle proteine (prede) che interagiscono con tale esca. In Figura 1.21 è riportato uno schema esemplificativo dei passaggi che caratterizzano questo tipo di saggio.

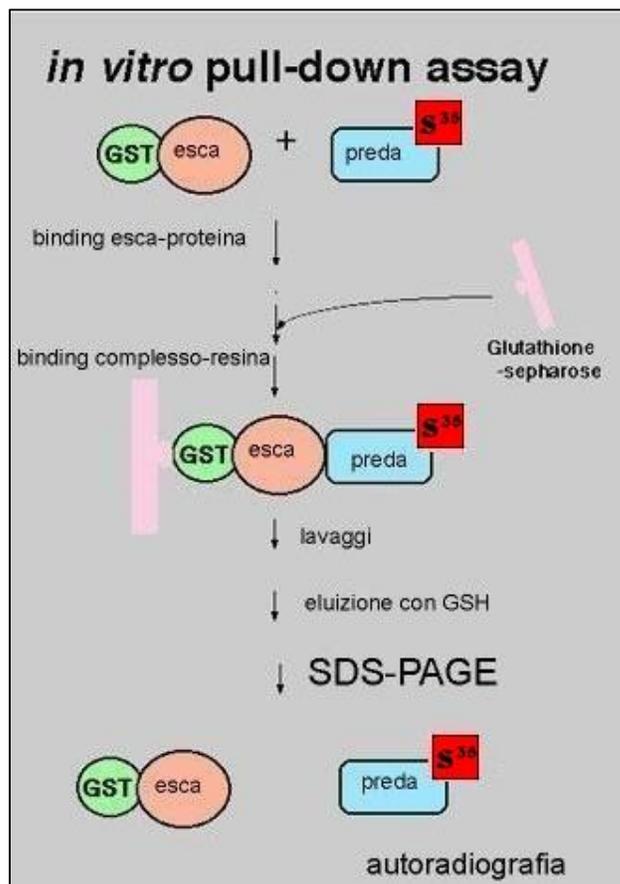


Figura 1.22: Saggio *GST-pulldown*. In figura sono schematizzati i passaggi principali di un saggio *GST-pulldown*. Si può notare che in tale saggio la preda è marcata con ^{35}S (quadratino rosso).

2. Scopo

Scopo di questo studio è la caratterizzazione funzionale della proteina UL44 di HCMV e la ricerca e caratterizzazione preliminare di nuovi interattori proteici cellulari di tale proteina.

UL44 è la subunità accessoria della DNA polimerasi di HCMV, la cui subunità catalitica è UL54. UL44 è una fosfoproteina indispensabile per la replicazione di HCMV (Pari *et al.*, 1993), è in grado di legare il DNA a doppio filamento e di interagire in maniera specifica con UL54, aumentando la processività della DNA polimerasi lungo lo stampo di DNA. Il nostro gruppo di ricerca ha recentemente pubblicato la struttura cristallografica dei residui 1-290 di UL44, forma tronca della proteina che è comunque attiva (Appleton *et al.*, 2004). Da tale struttura è emerso come UL44 presenti una struttura molto simile ad altri fattori di processività quali UL42 di HSV-1 e il monomero di PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) ma mentre UL42 è un monomero e PCNA un trimetro, UL44 forma omodimeri testa-testa in forma di pinza a C. Il nostro gruppo di ricerca ha inoltre recentemente individuato i residui amminoacidici (F121, L86 e L87) importanti per la dimerizzazione di UL44: infatti i mutanti di UL44 con le sostituzioni F121A e L86A/L87A si comportano come monomeri. Tali mutanti presentano inoltre una ridotta capacità di legare il DNA.

In questo lavoro di ricerca saranno analizzati tre aspetti principali della proteina UL44:

(i). la capacità di formare omodimeri in soluzione. Intendiamo effettuare degli esperimenti per chiarire il ruolo e l'importanza della dimerizzazione di UL44 per le sue funzioni. Come prima cosa intendiamo verificare che anche la proteina UL44 intera è in grado di dimerizzare; per questo effettueremo dei saggi di *GST-pulldown* e utilizzeremo inoltre il sistema del doppio ibrido. Valuteremo quindi la capacità dei mutanti di UL44 che non dimerizzano di interagire con la subunità catalitica, UL54 e di stimolarne l'attività. Analizzeremo inoltre, mediante il sistema del doppio ibrido, la capacità di questi mutanti di interagire con altri interattori noti virali di UL44: la protein chinasi UL97, l'uracil DNA glicosilasi UL114 e la putativa *origin binding protein* UL84. Infine, in collaborazione con il Prof. Pari (Università del Nevada) studieremo l'effetto delle mutazioni F121A e L86A/L87A sulla replicazione del DNA di HCMV *in vivo* mediante un saggio di complementazione della replicazione virale in colture cellulari.

(ii). la capacità di legare il DNA. Sebbene sia stato dimostrato che UL44 lega il DNA a doppio filamento, non sono però ancora noti i dettagli di questa interazione. Intendiamo quindi analizzare l'attività di legame al DNA di UL44 e determinare se, come ipotizzato, sono coinvolte nel legame al DNA interazioni elettrostatiche tra i residui di lisina presenti nella regione basica e nei *loops* disordinati di UL44 e lo scheletro di fosfati del DNA. A tale scopo effettueremo degli esperimenti su filtro (*filter binding assay*) e dei saggi EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*) per misurare l'affinità apparente di UL44 per oligonucleotidi a singolo e a doppio filamento di diversa lunghezza e sequenza e per determinare la stechiometria del legame. Inoltre, intendiamo effettuare i saggi su filtro in presenza di diverse concentrazioni di sale al fine di studiare l'effetto della forza ionica sull'attività di legame al DNA di UL44 e per poter quindi stabilire se il legame di UL44 al DNA coinvolge interazioni elettrostatiche.

(iii) la capacità di interagire con proteine della cellula ospite. Alcune osservazioni suggeriscono che UL44, oltre alla funzione di fattore di processività della DNA

el ciclo replicativo di HCMV, e che possa quindi
o cellulari, oltre che con UL54. Infatti UL44, è
le fasi tardive della replicazione, è più abbondante
rispetto alla subunità catalitica UL54, inoltre PCNA e altri fattori di processività
interagiscono con diverse proteine cellulari oltre che con le rispettive subunità
catalitiche. Infine, la natura dimerica di UL44 può permettere alla seconda subunità di
richiamare altre proteine cellulari e/o virali durante il ciclo replicativo virale.

Allo scopo di identificare eventuali interattori proteici cellulari di UL44, intendiamo
utilizzare il sistema del doppio ibrido in lievito ed effettuare uno *screening* utilizzando
UL44 come *descaõ* ed una libreria di cDNA cellulare. A tal fine, verrà innanzitutto
creato un vettore che esprima la proteina UL44 fusa alla proteina LexA. Verranno
quindi effettuati dei controlli preliminari per verificare la corretta espressione della
proteina di fusione LexA-UL44 e per escludere che essa sia in grado di attivare da sola
la trascrizione dei geni *reporter* nel sistema dei due ibridi utilizzato; inoltre, in questa
fase preliminare, verranno messe a punto le condizioni più adatte per effettuare lo
screening.

Una volta effettuato lo *screening*, i DNA plasmidici degli eventuali cloni positivi
ottenuti verranno estratti dalle cellule di lievito ed analizzati mediante analisi di
restrizione e sequenziamento. Qualora venissero identificate proteine cellulari o
porzioni di esse, intendiamo verificare l'interazione di queste con UL44 utilizzando una
metodica diversa (saggi *GS-pulldown*).

Materiali e Metodi

Sono di seguito descritti i materiali più importanti e le metodologie utilizzate per effettuare gli esperimenti riportati in questo elaborato di tesi.

3.1 Reagenti e materiali

3.1.a Proteine

GST

Questa proteina è stata espressa dal plasmide pD15 e purificata da *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (Novagen) mediante cromatografia di affinità con colonne di α -sepharoseö coniugato a glutatione (Loregian *et al.*, 2004 a).

GST-UL44

Questa proteina è stata espressa dal plasmide pD15-UL44 e purificata come sopra descritto per GST (Loregian *et al.*, 2004 a).

GST-UL44 C290

La proteina è stata espressa dal plasmide pD15-UL44 C290 e purificata come sopra descritto per GST (Loregian *et al.*, 2004 a).

MBP-UL42 C340

Questa proteina di fusione comprende i 340 residui N terminali di UL42; è stata purificata come descritto in Bridges *et al.* 2001.

bvUL54

UL54 espressa e purificata da cellule di insetto infettate con baculovirus ricombinante è stata preparata come descritto in Loregian *et al.*, 2003 ed è stata gentilmente fornita da Dott. H. S. Marsden (Institute of Virology, Glasgow, UK).

UL44 C290, UL44 C290 P85G, UL44 C290 L86A/L87A, UL44 C290 F121A, UL44 C290 I135A

Queste proteine sono state espresse in- e purificate da *E. coli* BL21(DE3)/pLysS come descritto in Appleton *et al.*, 2004.

3.1.b Reagenti

Substrato della β -galattosidasi

Nei saggi su filtro come substrato della β -galattosidasi è stato utilizzato il 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galattopiranoside (X-gal, Boheringer), alla concentrazione di 20 mg/ml in N,N-dimetilformammide 100%. Questa soluzione può essere conservata al buio, a -20°C per alcuni mesi. Il substrato incolore X-gal viene scisso dalla β -galattosidasi in galattosio e 5-bromo-4-cloro-3-indolo conferendo alle cellule un colore blu.

3-AT

Il 3-amminotriazolo (3-AT, PM=84,08) è una sostanza in grado di inibire il prodotto del gene *HIS3* (codificante l'imidazolo glicerol-fosfato deidratasi). Si conserva a -20°C ed è

preparazione la polvere (Sigma) è stata sciolta in
one 1 M.

3.1.c Oligonucleotidi sintetici

Gli oligonucleotidi sintetici usati in questo lavoro di tesi sono riportati nelle tabelle 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4.

Nome del òprimerö	Lunghezza del òprimerö	Sequenza nucleotidica
pCR-kan/for	31 bp	5øCAATATGACGTCGGGCGTTTTATGGACAGC-3ø
pCR-kan/rev	32 bp	5øATATGCCGGAAGGGCCCGCACATTTCCCGG-3ø
UL44FL/FOR 1	30 bp	5øCACGATGGATCCTTATGGATCGCAAGACGC-3ø
UL44FL/REV 1	28 bp	5øTTCCACCTGCAGCTAGCCGCACTTTTCGö3ø
UL44FL/REV 2	28 bp	5øTTCCACCTCGAGCTAGCCGCACTTTTCG ö 3ø
UL54 FL/FOR 1	27 bp	5øCAC GAT GAA TTC ATG TTT TTC AAC CCG ö 3ø
UL54 FL/REV 1	30 bp	5øö TTC CAC CCC GGG TCA ACA GCA TTC GTG CGC ö3ø
UL54FL/FOR 2	29 bp	5øCACGATCCATGGTTATGTTTTTCAACCCGö3ø
UL54FL/REV 2	30 bp	5øTTCCACGAATTCTCAACAGCATTCGTGCGCö3ø
UL97/FOR 1	31 bp	5øCAC GAT CCA TGG TTA TGT CCT CCG CAC TTC G ö 3ø
UL97/REV 1	31 bp	5øö TTC CAC CTC GAG TTA CTC GGG GAA CAG TTG G- 3ø
UL114/FOR 1	30 bp	5øö CAC TAC CCG GGT ATG GCC CTC AAG CAG TGG ö 3ø
UL114/REV 1	29 bp	5øö TTC CAC GAA TTC TCA CCC ACA GAG TCG CC ö 3ø
UL84/FOR 1	30 bp	5øö CAC GAT GAA TTC ATG CCA CGC GTC GAC CCC ö 3ø
UL84/REV 1	31 bp	5øö TTC CAC CTG CAG TTA GAG ATC GCC GCA GAC Cö3ø
cdk2pGBT for	30 bp	5øTATGTAGAATTCATGGAGAACTTCCAAAAG-3ø
cdk2pGBT rev	29 bp	5øTAGCACCTGCAGTCAGAGTCGAAGATGGG-3ø
exosc9pRSETA for	30 bp	5øGACGTACTCGAGATGAAGGAAACGCCACTC-3ø
exosc9pRSETA rev	30 bp	5øTTCTCTCGAATCTTAATTGGCAGCTCTCTT-3ø
cdk2pRSETA for	30 bp	5øGACGTAGGATCCATGGAGAACTTCCAAAAG-3ø
cdk2pRSETA rev	30 bp	5øTAGCACGAATCTCAGAGTCGAAGATGGGG-3ø
exosc9pACT for	29 bp	5øCACGTTCATGGTTATGAAGGAAACGCCA-3ø
exosc9pACT rev	30 bp	5øTTCTCTCTCGAGTTAATTGGCAGCTCTCTT-3ø
cdk2pACT for	33 bp	5øCACGAGGGATCCTTATGGAGAACTTCCAAAAGG-3ø
cdk2pACT rev	31 bp	5øTAGCACCTCGAGTCAGAGTCGAAGATGGGG-3ø
cdc2pACTfor	32 bp	5øCACGATGGATCCTTATGGAAGATTATACCAA-3ø
cdc2pACTrev	31 bp	5øTTCCACCTCGAGGCTACATCTTCTTAATCTG-3ø
cdc2pGBT for	32 bp	5øCGATGAATTCATGGAAGATTATACCAAATAG-3ø
cdc2pGBT rev	31 bp	5øTTCCACCTGCAGGCTACATCTTCTTAATCTG-3ø
cdc2pRSETA for	32 bp	5øCGATGGATCCATGGAAGATTATACCAAATAG-3ø
cdc2pRSETA rev	31 bp	5øTTCCACCTGCAGGCTACATCTTCTTAATCTG-3ø
SP100APRSETA FOR	32 bp	5øCTCCGGAGATCTCTATGGCAGGTGGGGGCGGC-3ø
SP100APRSETA REV	31 bp	5øCTCCGTAAGCTTCTAATCTTCTTTACCTGAC-3ø
SP100APACT2FOR	31 bp	5øCGATTACCCGGGTATGGCAGGTGGGGGCGGC-3ø
SP100APACT2REV	31 bp	5øCCATGGGAGCTCCTAATCTTCTTTACCTGAC-3ø
UBC9PGBT9FOR	30 bp	5øCCTGATGAATTCATGTCGGGGATCGCCCTC-3ø
UBC9PGBT9REV	31 bp	5øGATGATGTCGACTTATGAGGGCGCAAACCTC-3ø
SP100APGBT9FOR	30 bp	5øTATCTTGAATTCATGGCAGGTGGGGGCGGC-3ø
SP100APGBTREV	31 bp	5øGCTACTGTGCACCTAATCTTCTTTACCTGAC-3ø
UBC9PRSETA FOR	32 bp	5øCATAATGGATCCATGTCGGGGATCGCCCTCAG-3ø
UBC9PRSETA REV	31 bp	5øCTCCACGAATCTTATGAGGGCGCAAACCTC-3ø
exosc9 pBTMK for	30 bp	5øTACCATGAATTCATGAAGGAAACGCCACT-3ø
exosc9 pBTMK rev	31 bp	5øTATCACCTGCAGTTAATTGGCAGCTCTCTTC-3ø

Tabella 3.1: Oligonucleotidi sintetici utilizzati per i clonaggi.

Nome del òprimerö	Lunghezza del òprimerö	Sequenza nucleotidica
cdc2seq for	18 bp	5øACTAGCAACTAAGAAACC-3ø
cdc2seq rev	18 bp	5øATGTACTGACCAGGAGGG-3ø

		5'-ATCTGGAGCTGGGC-3'
		5'-GGAACAGATAGCTTTGA-3'
		5'-CTGGAAGTCCCAAATTGGA-3'
		5'-TCCATGAGTCGATTCAAC-3'
Kan-seq1	20 bp	5'-GGACATAGCGTTGGCTACCC-3'
Kan-seq2	20 bp	5'-GGT CTT GAC AAA AAG AAC CG-3'
LexA_primer	18 bp	5'-GAC CTT CGT CAG CAG AGC-3'
GAL 4 AD/SEQ	17 bp	5'-TAC CAC TAC AAT GGA TG -3'
GAL 4 AD/FOR	32 bp	5'-CTATTTCGATGATGAAGATACCCCAACAAACCC-3'
GAL 4 BD/SEQ	17 bp	5'-TCA TCG GAA GAG AGT AG -3'
gal843	21 bp	5'-GCG TTT GGA ATC ACT ACA GGG -3'
UL44 FL/for 1	20 bp	5'-CGTCGCTTATCTTGCAAACG-3'
UL44 FL/rev 1	20 bp	5'-GGTCCTTGCTGGAAGTCAGG-3'
UL44 FL/for 2	20 bp	5'-CCACGGTCTTTCCTCCAAGG-3'
SP100Aprimfor	18 bp	5'-AGAGCCCATGGATTTCAG-3'
SP100Aprimrev	18 bp	5'-CTCTGTACAGGGACCAGG-3'
Ubc9primfor	18 bp	5'-GGGAGTGCGCCATTCCAG-3'
Ubc9primrev	18 bp	5'-CCGAAGGGTACACATTCG-3'

Tabella 3.2: Oligonucleotidi sintetici utilizzati nel sequenziamento.

Nome del primer	Lunghezza del primer	Sequenza nucleotidica
Band 47/F	47 bp	5'-CCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACCGGG-3'
Band 47/R	47 bp	5'-CCCGGTACCCAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGG-3'
Band 30/1	30 bp	5'-GTGCGAAAGCCGGTCTGCGAGTACGTC AAG-3'
Band 30/1/R	30 bp	5'-CTTGACGTACTCGCAGACCCGGCTTTCGCAC-3'
Band 30/2	30 bp	5'-GCTTTCGCGCACACTGGCTTGACGTACAC-3'
Band 30/2/R	30 bp	5'-GTGTACGTACAAGCCAGTGTGCGCGAAAGC-3'
Band 30/3	30 bp	5'-AGCAGTCTTTCCTTGGGCTTTTTTTTGGG-3'
Band 30/3/R	30 bp	5'-CCCAAAAAAAAAAGCCCAAGGAAAGACTGCT-3'
Band 18/1	18 bp	5'-ATAGCATTTAGTTGACAC-3'
Band 18/1/R	18 bp	5'-GTGTCAACTAAATGCTAT-3'
Band 18/2	18 bp	5'-GTCCTACATCATCATCGC-3'
Band 18/2/R	18 bp	5'-GCGATGATGATGTAGGAC-3'
Band 18/3	18 bp	5'-GTGGATGATGTGGATAAC-3'
Band 18/3/R	18 bp	5'-GTTATCACAATCATCCAC-3'
Band15	15 bp	5'-CTAGCTGTAGTCAGC-3'
Band15/R	15 bp	5'-GCTGACTACAGCTAG-3'
Band12	12 bp	5'-CTAGCTGTAGTC-3'
Band12/R	12 bp	5'-GACTACAGCTAG-3'
Band 10	10 bp	5'-CTA GCT GTA G -3'
Band10/R	10 bp	5'-CTA CAG CTA G-3'
Band 8	8 bp	5'-CTA GCT GT -3'
Band8/R	8 bp	5'-ACA GCT AG -3'

Tabella 3.3: Oligonucleotidi sintetici utilizzati nei saggi di legame al DNA su filtro e nei saggi EMSA.

Nome del primer	Lunghezza del primer	Sequenza nucleotidica
P85G/for	38 bp	5'-CC ATT AAC AAT TCC ACG GGG CTG CTG GGT AAT TTC ATG-3' I N N S T G L L G N F M
P85G/rev	38 bp	5'-CATGAAATTACCCAGCAGCCCCGTGGAATTGTTAATGG-3'
L86A-L87A/for	42 bp	5'-AAT TCC ACG CCG GCG GCG GGT AAT TTC ATG TAC CTG ACT N S T P A A G N F M Y L T TCC-3' S
L86A-L87A/rev	42 bp	5'-GGAAGTCAGGTACATGAAATTACCCGCCCGCGGCGTGGAAATT-3'
F121A/for	37 bp	5'-C ATG TGC GCG CCC GAT GCC AAT ATG GAG TTC AGC TCG-3' M C A P D A N M E F S S
F121A/rev	37 bp	5'-CGAGCTGAACTCCATATTGGCATCGGGCGGCACATG-3'
I135A/for	31 bp	5'-GTG CAC GGC CAA GAC GCT GTG CGC GAA AGC G-3' V H G Q D A V R E S
I135A/rev	31 bp	5'-CGCTTTCGCGCACAGCGTCTTGGCCGTGCAC-3'

Tabella 3.4: Oligonucleotidi sintetici utilizzati nella mutagenesi sito-diretta (sono messi in evidenza gli aa mutati).

Il doppio filamento per i saggi di legame al DNA, i filamenti complementari sono state mescolate in buffer di *annealing* (NaCl 50 mM; Tris 10 mM pH8; EDTA 0,1 mM). In seguito gli oligonucleotidi sono stati completamente denaturati a 95°C e fatti appaiare lasciando raffreddare la reazione lentamente a temperatura ambiente.

3.1.d Cellule

Cellule primarie umane di fibroblasti di prepuzio (*Human Foreskin Fibroblasts*, HFF) sono state coltivate nel terreno di Eagle modificato secondo Dulbecco (DMEM; Gibco® Life Technologies) supplementato con siero fetale bovino (*Foetal Bovine Serum*, FBS; Gibco® Life Technologies) 10% precedentemente inattivato (per 30' a 56°C), penicillina e streptomicina 1% finale (P/S, Gibco® Life Technologies).

3.2 Ceppi batterici e di lievito e terreni di coltura

3.2.a Ceppi batterici e di lievito

Ceppo di <i>Escherichia coli</i>	
Ceppo	Genotipo
DH5	F ⁻ 80lacZ M15 (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(r _k ⁻ , m _k ⁺) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1

Ceppi di <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Ceppo	Genotipo
L40	MAT a; his3-200; trp1-901; leu3-3,112; ade2; LYS::(4lexAop-HIS3); URA3::(8lexAop-lacZ)
Y190	MATa;ura3-52;his3-200;ade2-101;lys2-801;trp1-901;leu2-3,112; gal4 ;gal80 ;cyh'2; LYS2::GAL1 _{UAS} GAL1 _{TATA} HIS3; URA3::GAL1 _{UAS} GAL1 _{TATA} lacZ

3.2.b Terreni di coltura

Terreni di coltura per batteri		
	Terreno completo LB	Terreno ricco SOC
Liquido		
Bacto Triptone (Difco)	1%	Bacto triptone 2%
Estratto di lievito (Difco)	0.5%	Estratto di lievito 0.5%
NaCl	0.5%	NaCl 0.5%
Aggiustare il pH a 7.5 con NaOH 1N		KCl 2,5mM
		MgCl ₂ 10mM
Solido:		MgSO ₄ 10mM
Come liquido + agar	1%	Glucosio 20mM
Note: quando necessario, sono stati aggiunti: l'antibiotico ampicillina alla concentrazione finale di 100 mg/l, il substrato cromogeno X-GAL alla concentrazione finale di 40 mg/l.		

Medie di coltura per lievito			
PD		Terreno minimo W0	
Liquido		Liquido	
Bacto Peptone (Difco)	1%	Yeast nitrogen base (Difco)	0,17%
Estratto di lievito (Difco)	1%	Ammonio solfato	0,5%
Glucosio	2%	Glucosio	2%
Solido		Solido	
Come liquido + agar	2%	Come liquido + agar	2%

In alcuni casi è stato utilizzato il terreno W0 arricchito con alcune basi azotate e tutti gli amminoacidi oppure sono stati omessi alcuni amminoacidi al fine di mantenere uno o più plasmidi. Gli amminoacidi e le basi azotate erano presenti nella seguente concentrazione finale (g/ml):

Amminoacido o base azotata	Concentrazione finale (g/ml)
Ade	40
Arg	20
Asp	100
Glu	100
His	20
Leu	60
Lys	30
Met	20
Phe	50
Ser	375
Thr	200
Trp	40
Tyr	30
Val	150
Ura	20

3.3 Plasmidi

3.3.a Plasmidi utilizzati nel sistema di doppio ibrido

pACT2

Questo plasmide (8,1 kb; Figura 3.1) presenta il promotore del gene *ADHI* (alcol deidrogenasi 1) di *S. cerevisiae*, la sequenza del segnale di localizzazione nucleare dell'antigene T di SV40, la sequenza *GAD* codificante il dominio di attivazione (aa 768-881) della proteina Gal4 di *S. cerevisiae*, il sito di policlonaggio ed il terminatore del gene *ADHI*. Inoltre contiene l'origine di replicazione del plasmide 2μ di *S. cerevisiae* ed il gene di selezione *LEU2* per il lievito. Possiede anche l'origine di replicazione batterica *oriE* ed il gene per la resistenza all'ampicillina per il mantenimento in ceppi batterici. È stato impiegato per creare la fusione di *GAL4-AD* (a.a. 768-881) con l'epitopo HA e con le proteine espresse dalla banca genomica di lievito o altre proteine predaö.

3.1) avente il promotore del gene *ADHI* di *S. cerevisiae*, la sequenza *GAL4 BD* codificante il dominio di legame al DNA della proteina Gal4 di *S. cerevisiae*, un sito di policloneggiamento a valle di questa sequenza e il terminatore del gene *ADHI*. Inoltre contiene l'origine di replicazione del plasmide 2μ di *S. cerevisiae* ed il gene di selezione *TRP1* per il lievito. Possiede anche l'origine di replicazione batterica *oriE* ed il gene per la resistenza all'ampicillina per il mantenimento in ceppi batterici. È stato impiegato per creare la fusione tra la proteina utilizzata come esca e LexA.

pGBT9

È un plasmide (5,5 kb; Figura 3.1) avente il promotore del gene *ADHI* di *S. cerevisiae*, la sequenza *GAL4 BD* codificante il dominio di legame al DNA della proteina Gal4 di *S. cerevisiae*, un sito di policloneggiamento ed il terminatore del gene *ADHI*. Inoltre contiene l'origine di replicazione del plasmide 2μ di *S. cerevisiae* ed il gene di selezione *TRP1* per il lievito. Possiede anche l'origine di replicazione batterica *oriE* ed il gene per la resistenza all'ampicillina per il mantenimento in ceppi batterici. È stato impiegato per creare la fusione tra Gal4BD e la proteina utilizzata come esca.

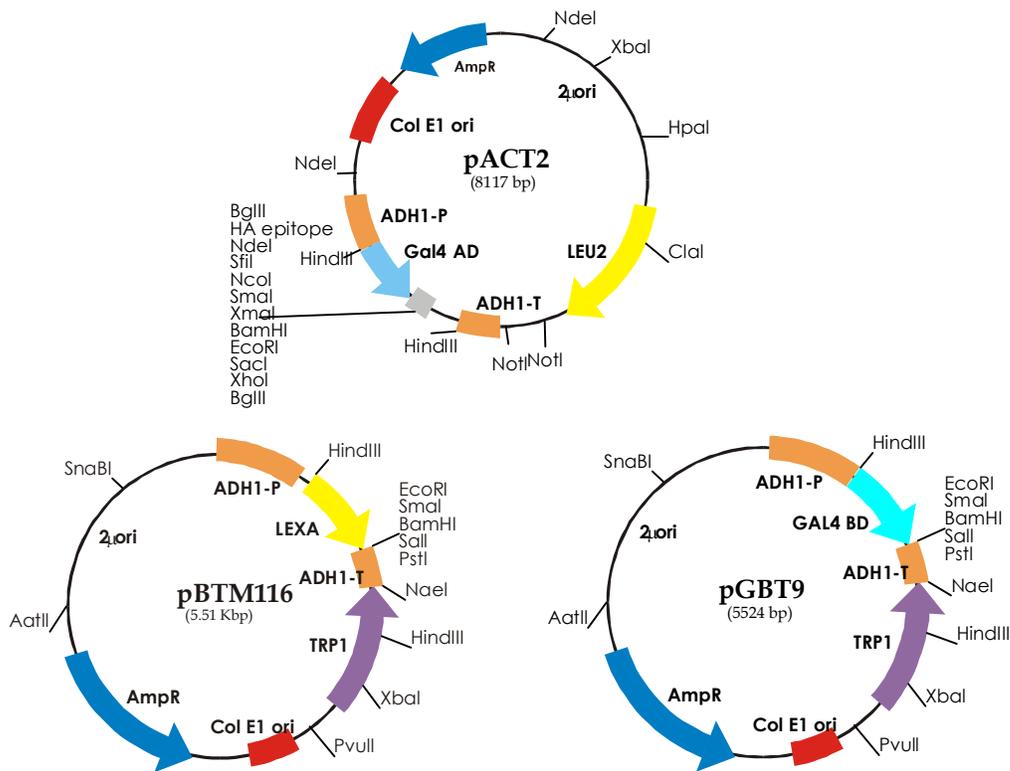


Figura 3.1: Mappa dei plasmidi utilizzati nel sistema di doppio ibrido: pACT2, pBTM116 e pGBT9.

3.3b pRSETA

PRSETA (2,897 kb, Invitrogen; Figura 3.2) presenta il promotore per le RNA polimerasi del fago T7 (basi 20-39), il *Ribosome binding site* (RBS), un *tag* di 6 his (basi 112-129), il sito di policloneggiamento (basi 202-248), il T7 *reverse priming site*, e il

lentemente nel nostro laboratorio inserendo il gene
RI di pRSETA.

pCMV-cdc2

Questo plasmide di 7475 bp contiene il gene (925 bp) che codifica la proteina *cdc2*, inserito nei siti BamHI (Addgene).

pCMV-cdk2

Questo plasmide di 7450 bp contiene il gene (900 bp) che codifica la proteina *cdk2*, inserito nei siti BamHI (Addgene).

pACT-Ubc9

Questo plasmide (fornito dal Prof. Gao George F., Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China) contiene il gene *Ubc9* (497 bp) clonato nei siti BamHI e EcoRI del plasmide pACT2 (8,1 kb); (Fan *et al.*, 2006).

pGEX.Ubc9

Questo plasmide (fornito dal Prof. Gao George F., Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China) contiene il gene *Ubc9* (497 bp) clonato nel plasmide pGEX (Fan *et al.*, 2006).

pEGFP-C1-PM/Sc175

Questo plasmide (fornito da Prof. Pruijin Ger, Department of Biomolecular Chemistry, Nijmegen, Netherlands) contiene il gene *PM/Sc175* (1320 bp) clonato nei siti BglII e KpnI del plasmide pEGFP-C1 (4,7 kb) (Raijmakers *et al.*, 2003).

pSG5 HS-SP100A

Questo plasmide (fornito dal Prof. Jacob Seeler, Institut Pasteur, Paris, France) contiene il gene *SP100A* (1440 bp) clonato nel plasmide pSG5 (Stratagene) (Seeler *et al.*, 2001)

I plasmidi contenenti i cDNA delle proteine di interesse ottenuti da ricercatori di altri gruppi sono stati risospesi con acqua sterile e con circa 5 μ l della risospensione sono stati elettroporati batteri *E. coli* DH5 .

Libreria di cDNA di cellule B

La libreria di cDNA (che ci è stata fornita dal Prof. Elledge S., Baylor College of Medicine, Houston, Texas) è stata costruita in ACT (vettore fagico) usando l'mRNA preparato da linfociti B umani. In questo modo è stata ottenuta la fusione della sequenza codificante λ AD di GAL4 con le sequenze di cDNA. La libreria conteneva un numero totale di ricombinanti pari a $1,1 \times 10^8$ e più del 95% contenevano l'inserto. La libreria è stata poi amplificata e convertita in forma plasmidica (mediante ricombinazione sito specifica mediata da *cre-lox*) (Durfee *et al.*, 1993).

Preparazione di batteri mediante elettroporazione

3.4.a Preparazione di batteri elettrocompetenti

Una singola colonia di *E. coli* DH5 è stata inoculata in 4 ml di LB e fatta crescere O/N a 37°C. In seguito, i 4 ml di coltura sono stati inoculati in 400 ml di LB, e i batteri sono stati fatti crescere per circa 3 ore fino al raggiungimento di un OD₆₀₀ pari a circa 0,5. In seguito è stata bloccata la crescita incubando le cellule in ghiaccio per 20-25 minuti. Le cellule sono state poi centrifugate a 4000 rpm per 10 minuti a 4°C. Il *pellet* cellulare è stato risospeso in 80 ml di acqua sterile fredda e ricentrifugato; successivamente è stato risospeso in 160 ml di glicerolo 10%, ricentrifugato e risospeso infine in 12 ml di GYT (glicerolo 10%, Yeast Extract 0,125%, bacto-triptone 0,25%). I batteri sono stati aliquotati (aliquote da 100 µl) e conservati a -80°C.

3.4.b Trasformazione mediante elettroporazione

Una volta scongelate in ghiaccio le aliquote di *E. coli* DH5, sono stati aggiunti circa 100-200 ng del plasmide con cui si intendeva effettuare la trasformazione e i batteri sono stati trasferiti in apposite cuvette per elettroporazione (BioRad) pre-raffreddate in ghiaccio. L'apparecchio Gene Pulser (BioRad) è stato programmato a 1,5 KV, 1000 µs, 25 °F e i batteri sottoposti ad uno *shock* elettrico. In seguito allo *shock* sono stati aggiunti 900 µl di SOC e i batteri sono stati incubati in agitazione a 225 rpm a 37°C per 30 minuti. Successivamente i batteri sono stati piastrati su terreno selettivo LB-agar e fatti crescere a 37°C O/N.

3.5 Trasformazione chimica di cellule di lievito

3.5.a Metodo rapido di trasformazione

Una singola colonia di cellule di lievito è stata inoculata in 2ml di terreno (YEPD o W0). Le colture sono state lasciate in incubazione a 30°C per circa 16 h a 250 rpm fino alla fase stazionaria di crescita. Le colture sono state poi centrifugate a 13000 rpm per 1 minuto. Successivamente al *pellet* sono stati aggiunti: 5 µl di DNA *carrier* 10 mg/ml precedentemente fatto bollire per 5 minuti; 1 µg di ciascun DNA plasmidico e 100 µl di soluzione di trasformazione (PEG 4000 40% w/v; LiAc 0,2 M; DTT 0,1 M) ed il tutto è stato agitato con vortex e poi incubato a 45°C per 30 minuti. I campioni sono stati quindi piastrati su piastre W0 (prive di alcuni amminoacidi, ad es. trp o leu, per permettere la selezione di plasmidi).

Una o più colonie di cellule di lievito sono state inoculate in 10 ml di W0 ed incubate a 30°C per circa 16 ore a 250 rpm fino ad avere $1-2 \times 10^8$ cellule/ml. La coltura è stata successivamente diluita in 50 ml di W0 fino alla concentrazione di 5×10^6 cellule/ml.

La diluizione è stata incubata a 30°C fino ad avere 2×10^7 cellule/ml (10^9 cellule totali). A questo punto le cellule sono state centrifugate a 4000 rpm per 5 minuti e lavate in 25 ml di H₂O sterile. Dopo questo lavaggio le cellule sono state ricentrifugate e risospese in 1 ml di LiAc 100 mM e quindi trasferite in eppendorf da 1.5 ml. I campioni sono stati centrifugati per 15 secondi a 13000 rpm e risospesi in un volume finale di 500 µl (2×10^9 cellule/ml) di LiAc 100 mM.

La sospensione di cellule è stata agitata con vortex ed è stata suddivisa in aliquote da 50 µl (2×10^8 cellule); le aliquote sono state quindi centrifugate ed è stato allontanato il LiAc.

A ciascun öpelletö sono stati poi aggiunti nel seguente ordine:

- 240 µl PEG (50% w/v)
- 36 µl LiAc 1 M
- 5 µl DNA carrier (10 mg/ml) precedentemente fatto bollire 5 minuti e lasciato in ghiaccio
- 70 µl H₂O con DNA plasmidico (0.1-10 µg)

ed il tutto è stato agitato con vortex. I campioni sono stati quindi incubati per 30 minuti a 30°C, a 42°C per 25 minuti e quindi centrifugati a 7000 rpm per 15 secondi. Il öpelletö è stato quindi risospeso in 1 ml di H₂O sterile e piastrato su piastre di terreno W0.

3.5.c Trasformazione in larga scala

Alcune colonie di lievito (di almeno 2-3 mm di diametro) sono state inoculate in 1 ml di terreno (YEPD o W0), risospese mediante agitazione con vortex e si trasferite in 50 ml di terreno (YEPD o W0). Sono state lasciate in incubazione a 30°C per circa 16 ore a 250 rpm fino alla fase stazionaria di crescita. La coltura è stata poi trasferita in 300 ml di terreno YEPD ad una OD₆₀₀ di circa 0,3. Eö stata lasciata incubare per circa 3 ore a 250 rpm fino ad ottenere unöOD₆₀₀ di circa 0,6. Eö stata centrifugata a 1000×g per 5 minuti e il öpelletö è stato risospeso in 25-50 ml di acqua sterile. Il öpelletö è stato ricentrifugato e risospeso in 1,5 ml di TE/LiAc (LiAc 100 mM in Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM). Le cellule risospese sono state divise in 3 aliquote e ad ognuna sono stati aggiunti 20 µg della libreria (vedi paragrafo 4.1 f) e 1 mg di DNA öcarrierö. Ad ogni aliquota sono stati poi aggiunti 2 ml di soluzione PEG/LiAc (PEG 4000 40%, LiAc 100 mM in Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1 mM) ed il tutto è stato agitato con vortex e poi incubato a 30°C per 30 minuti a 200 rpm. A ciascun campione sono stati in seguito aggiunti 350 µl di DMSO (dimetilsolfossido) mescolando gentilmente, dopo di che è stato incubato a 42°C per 15 minuti. Infine i campioni sono stati messi in ghiaccio per 1-2 minuti, centrifugati a 1000×g per 5 minuti, e i öpelletsö sono stati risospesi in 10 ml di acqua. I campioni sono stati quindi piastrati su piastre W0 (prive di alcuni amminoacidi, ad es. trp o leu, per permettere la selezione di plasmidi).

ività -galattosidasi (saggio X-gal)

Nei saggi su muro (Breedeen & Nasmyth, 1985), singole colonie di lievito sono state prelevate con un'ansa sterile e deposte su un filtro di carta. Il filtro di carta è stata poi messo per circa 15 min a -80°C al fine di rompere le pareti cellulari. Successivamente il filtro di carta è stato appoggiato, con le colonie di lievito verso l'alto, sopra un disco di carta 3MM (Whatmann) imbevuto con 2 ml di tampone Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,06 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,04 M, KCl 0,01 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 M, β -mercaptoetanol 0,27%) e X-gal 1 mg/ml. Infine il filtro è stato poi incubato a 30°C fino alla comparsa del colore blu.

3.7 Saggio di selezione con 3-AT

I pozzetti di piastre da 96 sono stati riempiti con 250 μl di W0 -L-W (terreno contenente tutti gli amminoacidi eccetto leu e trp) e in ciascuno di essi è stato inoculato un diverso clone di lievito. La piastra è stata quindi incubata a 30°C per circa 40 ore per consentire la crescita dei lieviti. A questo punto sono stati piastrati 7,5 μl di coltura da ciascuno dei pozzetti stemperando il liquido con un'ansa sterile su piastre solide selettive in cui è stato aggiunto il 3-AT alla concentrazione desiderata (0,5, 1 o 2 mM).

3.8 Tecniche di biologia molecolare

3.8.a Estrazione e purificazione di DNA plasmidico da *E. coli*

Per isolare il DNA plasmidico dalle cellule batteriche sono state effettuate preparazioni in grande scala (Maxiprep) da batteri in coltura (circa 0,5-1 l) da cui il DNA plasmidico è stato estratto seguendo il protocollo della lisi alcalina e successivamente purificato mediante precipitazione con polietilenglicole (PEG) (Sambrook *et al.*, 1989a). Secondo questa procedura, una volta lisate le cellule, è stato utilizzato cloruro di litio (LiCl_2) 2,5 M per precipitare selettivamente le molecole di RNA ad elevato peso molecolare; poi l'enzima RNasi per degradare l'RNA rimasto e infine il PEG 8000 per far precipitare selettivamente il DNA plasmidico.

Il DNA plasmidico ottenuto è stato risospeso in TE pH 8 (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) e, al fine di stabilirne purezza e concentrazione, una piccola aliquota è stata diluita in acqua e ne è stata letta la densità ottica (OD) a 260 e 280 nm in cuvette da 0,1 cm (Eppendorf). Il DNA è stato considerato sufficientemente puro quando il rapporto $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ era maggiore di 1,8. La misura della concentrazione di DNA si è basata sul fatto che ad una unità di densità ottica a 260 nm corrispondono 50 $\mu\text{g/ml}$ di DNA a doppia elica. La concentrazione in $\mu\text{g/ml}$ è stata quindi calcolata con la seguente formula:

$$\text{OD}_{260} \times 50 \times 10 \times \text{fattore di diluizione}$$

Le fatte preparazioni di DNA plasmidico in piccola (Murray *et al.*, 1989b). Tale purificazione è stata ottenuta con un protocollo simile a quello sopra descritto, anche se molto semplificato.

3.8.b Estrazione di DNA plasmidico da cellule di lievito

Una coltura di 1,5 ml di cellule di lievito è stata fatta crescere in terreno selettivo per tutta la notte ed è stata centrifugata per 5 minuti a 5000 rpm. Le cellule sono state risospese in 100 μ l di tampone STET (saccarosio 8%; Tris-HCl 50 mM pH 8; EDTA 5 mM; Triton X-100 5%) a cui sono stati aggiunti 0,2 g di palline di vetro. Il campione è stato agitato bene con vortex fino alla completa lisi delle cellule facendo tre cicli in cui si agita per un minuto e si lascia un minuto in ghiaccio. Sono stati poi aggiunti altri 100 μ l di tampone STET e il tutto è stato messo in acqua bollente per 3 minuti. Il campione è stato poi centrifugato 10 minuti a 13000 rpm a 4°C e 100 μ l di surnatante sono stati trasferiti in una nuova eppendorf a cui sono stati aggiunti 50 μ l di ammonio acetato 7,5 M. È stato incubato a -20°C per 1 ora e poi centrifugato a 4°C per 20 minuti: in questa fase si ha la precipitazione del DNA cromosomico, dell'rRNA ed di altre impurità che potrebbero inibire la successiva trasformazione di *E. coli*. Il surnatante è stato trasferito in una nuova eppendorf ed è stato precipitato con 2,5 volumi di etanolo 100% e 0,1 volumi di NaAc 3 M pH 5,2. Dopo aver lasciato a -80°C per 15 minuti, il surnatante è stato allontanato e il pellet è stato lavato con etanolo 70%. Il pellet finale è stato risospeso in 20 μ l di acqua sterile e, di questi, 10 μ l sono stati utilizzati per trasformare *E. coli*.

3.8.c Taglio di DNA con enzimi di restrizione

Le diverse reazioni di restrizione di DNA plasmidico sono state eseguite con enzimi NE BioLabs nei rispettivi tamponi di reazione. Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dell'enzima (37°C) per 1-6 ore.

3.8.d PCR (*polymerase chain reaction*), reazione a catena della polimerasi)

Le reazioni di PCR per i clonaggi sono state condotte utilizzando 100 ng del plasmide contenente l'inserto da amplificare in un volume di 100 μ l comprendente gli opportuni *primers forward* e *reverse* (Tabelle 3.1 e 3.2) alla concentrazione 0,2-0,3 μ M, dATP, dTTP, dCTP e dGTP 200 μ M, MgCl₂ 1,5 mM, 1,25 unità di Taq polimerasi (Taq Gold DNA polymerase, Perkin Elmer) in Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM. La reazione di amplificazione è stata condotta utilizzando un termocycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) secondo il seguente schema: denaturazione del DNA e attivazione della Taq Gold (10 min a 95°C), 30 cicli comprendenti ciascuno una reazione di denaturazione (1 min a 94°C), appaiamento (ad es. 1 min a 45°C) ed allungamento (1 min a 72°C). Al termine la reazione è stata protratta per 10 min a 72°C e poi bloccata a

mento e i tempi di allungamento variavano in funzione
la relativa coppia di *primers* utilizzata.

3.8.e Separazione dei frammenti di DNA con gel di agarosio

I plasmidi e i frammenti di DNA amplificati con PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi in gel d'agarosio 1-1,5% (SeaKem) in tampone TAE [Tris-Acetato-EDTA 1x, ossia Tris-acetato 0,04 M e EDTA 0,001M (Carlo Erba)] e visualizzati con un transilluminatore a raggi UV dopo colorazione del gel con bromuro d'etidio (Sigma-Aldrich) 0,5 g/ml.

Per verificare le dimensioni dei plasmidi o dei frammenti di DNA è stato utilizzato il marcatore 1 Kilobase DNA Ladder (NE BioLabs; 500-10000 bp).

3.8.f Purificazione di DNA plasmidico da gel

Dopo la separazione dei frammenti di DNA in gel di agarosio, la banda di interesse è stata tagliata, incubata per 20 minuti a -80°C e frantumata. Il DNA è stato estratto utilizzando un ugual volume di fenolo/cloroformio e successivamente precipitato utilizzando 0,1 volumi di NaAc 3 M pH 5,2 e 2 volumi di etanolo 100%. In seguito sono stati eseguiti dei lavaggi con etanolo 70% .

3.8.g Legazione di frammenti di DNA

Le reazioni di ligazione sono state effettuate utilizzando la DNA ligasi del batteriofago T4 (BioLabs) per 16 h a 14°C in un volume finale di 10 μl ; sono state usate 0,2 unità di enzima e un rapporto vettore:inserto 1:8. I prodotti di ligazione sono stati in seguito precipitati come sopra, lavati con etanolo 70% per rimuovere i sali ed infine risospesi in H_2O bidistillata ed utilizzati per la trasformazione di cellule batteriche.

3.8.h Sequenziamento

Il sequenziamento di DNA plasmidico è stato effettuato utilizzando l'ABI PRISM™ BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer), che si basa sul metodo enzimatico di Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Tale metodo utilizza dideossinucleotidi terminatori (ddNTPs) a cui è legato un gruppo donatore di fluorescenza (fluoresceina) collegato, tramite un *linker*, ad un gruppo accettore di fluorescenza (d-rodamina). Il *linker* assicura la massima efficienza di trasferimento di energia tra il gruppo donatore ed accettore di fluorescenza. Questi due gruppi sono associati ai ddNTPs in modo da non interferire stericamente con la reazione di incorporazione dei ddNTPs nel filamento neosintetizzato. Ognuno dei quattro ddNTPs lega un diverso gruppo accettore, che è eccitato dalla stessa lunghezza d'onda (448 nm), ma emette il massimo di fluorescenza in un diverso intervallo di lunghezza d'onda,

per la guanina, nel blu; dR6G per la adenina, nel giallo; dROX per la citosina, nel rosso).

precedentemente amplificati tramite PCR. Nella

miscela di reazione sono stati mescolati 1 μ l di BigDyeTM Terminator Mix (Applied Biosystem); 2 μ l di tampone 5x (Tris-HCl 200 mM pH 9,0, MgCl₂ 5 mM) e 700 ng di plasmide da sequenziare, in un volume finale di 20 μ l. La reazione è stata condotta utilizzando un termociclatore (Thermal Cycler, Eppendorf) secondo il seguente schema:

- 95°C per 10 min

e 30 cicli comprendenti ciascuno una reazione di:

- denaturazione per 30 sec a 95°C

- appaiamento per 5 sec a 50-55°C

- estensione per 4 min a 60°C

Al termine la reazione è stata bloccata a 4°C.

In seguito alla reazione di amplificazione il DNA è stato purificato dai nucleotidi non incorporati. Ai prodotti di PCR sono stati aggiunti 16 μ l di H₂O deionizzata e 64 μ l di etanolo 96% e sono stati incubati per 30 min a temperatura ambiente. Successivamente la miscela è stata centrifugata per 30 min, è stato eliminato il surnatante e il DNA precipitato lavato con 100 μ l di etanolo 70%. Infine il DNA da sequenziare è stato risospeso in 17 μ l di tampone contenente anche formamide e incubato a 95°C per 4 min e poi messo in ghiaccio. Dopo essere stati sottoposti a tale trattamento, i frammenti amplificati sono stati sequenziali utilizzando lo strumento 3130X/Genetic Analyser (Applied Biosystems).

3.8.i Mutagenesi sito-diretta

La mutagenesi sito-diretta è stata effettuata con il *QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). La mutagenesi è stata effettuata seguendo le indicazioni riportate dal manuale del kit. In Tabella 3.4 sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi mutati usati per l'amplificazione.

3.9 Trascrizione e traduzione *in vitro* delle proteine

Le sequenze codificanti le proteine da esprimere *in vitro* sono state clonate nel vettore di espressione pRSETA, sono state trascritte e tradotte *in vitro* utilizzando il kit *TnT T7® Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega). Tale sistema permette la trascrizione e traduzione di una sequenza genica in un'unica reazione, in quanto utilizza una miscela di reazione (Quick master mix[®]) contenente sia i reagenti per la trascrizione (tra cui la RNA polimerasi del fago SP6 o del fago T7), sia un lisato di reticolociti di coniglio che contiene l'intero apparato di traduzione cellulare che è in grado di tradurre l'mRNA in proteina.

Utilizzando questo kit, circa 1 μ g di ciascun plasmide è stato miscelato con 40 μ l di Quick master mix[®] e con 2 μ l di metionina marcata con [³⁵S] (GE Healthcare, 1000 Ci/mmol), in un volume finale di 50 μ l. Le miscele di reazione sono state incubate per 90 minuti ad una temperatura di 30°C in un bagnetto termico. Al termine

no stati analizzati in gel di poliacrilammide e successiva
re il livello di espressione proteica.

3.10 Saggio *GST-pulldown*

Innanzitutto è stata effettuata la trascrizione e traduzione *in vitro* di geni codificanti le diverse proteine da saggiare, utilizzando il kit *TnT T7[®] Quick Coupled Transcription/Translation System*.

Quindi 25 o 50 μ l delle proteine tradotte *in vitro* e marcate con [³⁵S]metionina sono stati incubati con 67,5 μ g di GST-UL44 o 28,4 μ g di GST per 1 h a RT o 2 h in ghiaccio, in presenza di 0,2 μ l di benzonase (Stratagene), 2,5 μ l di RNase-It (RNase cocktail, Sigma) e una quantità di tampone (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerolo 10%, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM, con o senza detergenti) tale da raggiungere un volume di 250 μ l.

Dopo l'incubazione, la miscela è stata caricata su colonnine preparate con 200 μ l di α -Sepharose[®] coniugato a glutatione (Amersham); le colonne sono state poi lavate con 5 ml di tampone di lavaggio (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, glicerolo 10%, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM, in presenza o meno di detergente). Le proteine legate sono state infine eluite con un tampone di eluizione (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 0 500 mM, glicerolo 10%, EDTA 0,1 mM, DTT 2 mM, in presenza o meno di detergente) contenente 15 mM glutatione.

Le frazioni eluite sono state fatte bollire a 100°C per 5 minuti e quindi sono state caricate in gel di acrilamide al 10%. Le proteine sono state visualizzate attraverso SDS-PAGE e autoradiografia.

3.11 Analisi elettroforetica di proteine in gel denaturante di poliacrilammide (SDS PAGE)

Dopo il saggio di *GST-pulldown* ciascun campione da analizzare è stato miscelato con il tampone di caricamento (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glicerolo 10%, sodio dodecilsolfato (SDS) 2%, β -mercaptoetanololo 5%, blu di bromofenolo 0,5%). I campioni così preparati sono stati fatti bollire per 5 minuti e successivamente caricati in gel di poliacrilammide 10% con SDS 0,1%. Come riferimento è stato utilizzato il marker *BenchMark Pre-Stained Protein Ladder* (Invitrogen). È stata effettuata successivamente una corsa elettroforetica a voltaggio costante (160 V) per circa 45 min in un tampone di corsa contenente Tris 0,3%, glicina 1,44%, SDS 0,1%.

La corsia del gel contenente il marker è stata tagliata e tenuta per 2 h in Blu Coomassie G-250 0,2% (Sigma), metanolo 40%, acido acetico 10% per la colorazione delle proteine, e decolorata per 1 h in metanolo 40%, acido acetico 10%. Il resto del gel è stato messo in soluzione di fissaggio (metanolo 30% e acido acetico 10%) per 1 h. Poiché le proteine da analizzare erano state precedentemente marcate con [³⁵S], dopo la corsa il gel è stato essiccato per due ore a 80° C (Gel Dryer Model 583, Bio-Rad) e successivamente posto a contatto con una lastra fotografica (X-O-MAT[™] AR, Kodak) per tempi variabili fra le 12 e le 24 ore. Infine la lastra è stata rimossa e sviluppata.

2 Trasfezione

Cellule HRP sono state piastrate a una concentrazione di 6×10^4 /ml per pozzetto in piastre da 24 pozzetti e incubate O/N a 37°C . Il giorno seguente le cellule sono state trasfettate utilizzando il reagente Arrest-IN $\hat{\text{I}}$ (Biosystems).

Sono state preparate diverse mix di trasfezione, una per ogni plasmide, diluendo il DNA (0,5-1 μg) in 50 μl di terreno DMEM senza FBS e P/S. Successivamente sono stati diluiti 2,5 μg di Arrest-IN $\hat{\text{I}}$ in 50 μl di terreno ai quali è stato aggiunto il DNA precedentemente diluito. Dopo aver mescolato velocemente, la miscela è stata incubata a temperatura ambiente per 10 minuti. Sono stati poi aggiunti 150 μl di terreno ad ogni miscela in modo da arrivare a un volume finale di 250 μl . A questo punto la miscela è stata aggiunta alle cellule, le quali sono state in seguito incubate per 3-6 ore a 37°C . Terminata l'incubazione, è stato aggiunto un volume uguale (250 μl) di terreno con FBS 20%.

3.13 Western blot

Dopo la corsa elettroforetica in SDS-PAGE il gel è stato messo ad equilibrare per 10 minuti nel tampone di trasferimento (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanolo 20% e SDS 0,1%). Successivamente è stato effettuato il trasferimento delle proteine dal gel ad una membrana in PVDF (BioRad) preventivamente saturata in metanolo. La membrana è stata quindi messa ad equilibrare nel tampone di trasferimento ed il blot è stato effettuato utilizzando l'apposito apparecchio a cui è stata applicata una corrente di 350 mA per 60 minuti. Terminato il trasferimento la membrana in PVDF è stata lavata in metanolo per 20 secondi ed una volta asciutta si è proceduto con la rivelazione anticorpale. La membrana è stata quindi incubata per 1 h a temperatura ambiente nella soluzione di bloccaggio (PBS: *Phosphate Buffer Saline*, tampone fosfato salino e latte 5%).

Per effettuare la rivelazione immunologica, la membrana in PVDF è stata immersa in una soluzione dell'anticorpo primario specifico per la proteina UL44 (anticorpo monoclonale 10-C50, Fitzgerald; diluizione 1:1000) in PBS e latte 5%, per 1 h a temperatura ambiente (oppure overnight a 4°C). In seguito sono stati effettuati:

- 3 lavaggi di circa 2 minuti ciascuno con il tampone PBS contenente Tween 0,2%;
- 3 lavaggi di circa 10 minuti ciascuno con tampone PBS contenente Tween 0,1%;
- incubazione con l'anticorpo secondario coniugato ad HRP (perossidasi di rafano; Santa Cruz Biotechnologies) (diluito 1:2000 in PBS + Tween 0,2% + latte 5%) per 1 h a temperatura ambiente a cui seguono 3 lavaggi di circa 30 secondi con PBS;
- 4 lavaggi con PBS contenente Tween 0,2% di 2 minuti; 3 lavaggi con PBS contenente Tween 0,2% di 10 minuti e 3 lavaggi ciascuno di 5 minuti in PBS;
- trattamento della membrana con 1ml di due soluzioni per chemiluminescenza (SuperSignal $\text{\textcircled{R}}$ West Dura Extended Duration Substrate, Pierce);
- rivelazione attraverso lo strumento Versa Doc Imaging System (Bio Rad); il tempo di esposizione è variabile da 1 a 5 minuti a seconda del substrato in esame.

attività DNA polimerasica *in vitro*

I saggi di attività polimerasica sono stati effettuati con proteine prodotte e purificate da cellule di insetto infettate con baculovirus ricombinanti o con proteine espresse e purificate da *E. coli* BL21(DE3)/pLysS (Novagen) (vedi paragrafo 3.1.a).

L'attività DNA polimerasica basale *in vitro* della subunità catalitica della polimerasi di HCMV (UL54) e la stimolazione della sua attività da parte rispettivamente delle proteine UL44 C290 wt e mutata sono state saggiate misurando l'incorporazione di [³H]-dTTP (deossitimidina trifosfato triziata) in un templatato sintetico omopolimerico poli(dA)-oligo(dT)₁₀₋₁₂.

La reazione è stata condotta utilizzando 100 fmol della proteina UL54 purificata in assenza o presenza della proteina UL44 C290 wt o mutata (da 200 a 400 fmol) purificata. Le proteine sono state aggiunte a una miscela di reazione contenente Tris-HCl 75 mM pH 7,5; MgCl₂ 6,5 mM; BSA 400 µg/ml; β-mercaptoetanolo 1,67 mM; KCl 150 mM; [³H]-dTTP 1,6 µM (attività specifica 53 Ci/mmol, Amersham Pharmacia); come substrato poli(dA)-oligo(dT)₁₀₋₁₂ 10 µg/ml (Amersham Pharmacia). I reagenti (volume finale 60 µl) sono stati mescolati in ghiaccio e la reazione è stata iniziata incubando a 37°C.

Campioni di 18 µl sono stati prelevati a vari tempi e deposti su filtrini di carta DE81 (Whatman), precedentemente imbevuti in una soluzione di EDTA 0,1 M e lasciati asciugare. I filtri di carta sono stati successivamente lavati 3 volte per 10 min in Na₂HPO₄ 5%, 2 volte per 5 min in H₂O bidistillata e 2 volte per 30 sec in metanolo, e poi lasciati asciugare. Una volta asciutti, sono stati posti in provette contenenti 5 ml di liquido di scintillazione (Insta-gel II, Packard) e sottoposti a conta della radioattività (1214 Rackbeta, LKB).

In parallelo sono state condotte una reazione con la sola proteina UL44 C290 da sola e una reazione di controllo senza proteine (bianco di reazione).

3.15 Saggi di processività

La capacità delle proteine UL44 C290 wt e mutata di stimolare la sintesi di lunghe catene di DNA da parte di UL54 è stata saggiata misurando l'incorporazione di [³²P]-dTTP (5 Ci/mmol; Perkin-Elmer Life Sciences) in un templatato sintetico omopolimerico poli(dA)-oligo(dT)₁₀₋₁₂.

La reazione è stata condotta utilizzando 200 fmol della proteina UL54 purificata in assenza o presenza della proteina UL44 C290 wt o mutata (400 e 800 fmol) purificata. Le proteine sono state aggiunte a una miscela di reazione contenente Tris-HCl 75 mM pH 7,5; MgCl₂ 6,5 mM; BSA 400 µg/ml; β-mercaptoetanolo 1,67 mM; KCl 150 mM; 50 µM [³²P]-dTTP (5 Ci/mmol; Perkin-Elmer Life Sciences); come substrato poli(dA)-oligo(dT)₁₀₋₁₂ 10 µg/ml (Amersham Pharmacia). I reagenti (volume finale 25 µl) sono stati mescolati in ghiaccio e la reazione è stata iniziata incubando a 37°C, l'incubazione è stata protratta per 90 minuti. Le reazioni sono state bloccate aggiungendo 5 µl di tampone di caricamento (EDTA 2mM; NaOH 50mM; glicerolo 2,5%; verde bromocresolo 0,025%) e quindi caricate in gel alcalino di agarosio al 4%. I gel sono stati essiccati ON (*overnight*) e quindi sottoposti ad autoradiografia. Sono stati considerati DNA a lunga catena frammenti di DNA di nuova sintesi maggiori di 20 bp.

legame al DNA su filtro

Per determinare l'affinità apparente di UL44 per il DNA ds (*double stranded*, doppio filamento) e ss (*single-stranded*, singolo filamento) sono stati effettuati dei saggi su filtro di legame al DNA. I saggi sono stati effettuati con la proteina UL44 C290 wt o mutata (UL44 C290 L86A/L87A) purificate e con la proteina UL44 intera prodotta e purificata da cellule di insetto infettate con baculovirus ricombinante.

La reazione è stata condotta incubando diverse quantità di proteina, con 1 fmol di oligonucleotide ds o ss marcato (~ 10000 c.p.m./fmol). Le proteine sono state aggiunte a una miscela di reazione contenente Tris-HCl 20 mM pH 7,5; MgCl₂ 3 mM; glicerolo 4%; NaCl 50 mM; EDTA 0,1 mM; DTT 0,5 mM; BSA 40 µg/ml, per 10 minuti in un volume di 10 µl. Dopo l'incubazione, i campioni sono stati depositi su due filtri sovrapposti di nitrocellulosa/DE81, precedentemente imbevuti nel tampone di legame utilizzando un *vacuum manifold*. In questo modo i complessi DNA-proteina rimangono intrappolati nel filtro di nitrocellulosa (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA), mentre il restante DNA non legato resta intrappolato nel filtro di DE81 (Whatman, Dassel, Germany) posto sotto il filtro di nitrocellulosa. I filtri sono stati quindi lavati con tampone di legame e, una volta asciugati, sono stati posti in provette contenenti 5 ml di liquido di scintillazione (Insta-gel II, Packard) e sottoposti a conta della radioattività (1214 Rackbeta, LKB). Tutti i valori sono stati corretti considerando il valore di fondo (ovvero la radioattività intrappolata nel filtro in assenza di UL44).

La concentrazione di DNA utilizzata in questi saggi risulta essere minore dei valori della costante di dissociazione apparente (K_d): in queste condizioni, si può applicare un'analisi di isoterma di saturazione e quindi i valori della costante sono equivalenti alla quantità di proteina per la quale si ha il 50% di DNA legato.

I saggi effettuati per misurare l'affinità di UL44 per il DNA in diversi ambienti ionici sono stati condotti come descritto sopra, eccetto l'utilizzo di tamponi contenenti Tris-HCl 1 mM pH 7,5; glicerolo 4%; EDTA 0,1 mM; DTT 0,5 mM; BSA 40 µg/ml e diverse concentrazioni di NaCl, KCl, NaCH₃CO₂ o MgCl₂.

3.17 EMSA (*electrophoretic mobility shift assay*)

Per determinare l'affinità apparente di UL44 per il DNA ds e ss e per determinare la stechiometria del legame, sono stati effettuati dei saggi EMSA. I saggi sono stati effettuati con la proteina UL44 C290 wt o mutata (UL44 C290 L86A/L87A) purificate e con la proteina UL44 intera prodotta e purificata da cellule di insetto infettate con baculovirus ricombinante.

Diverse quantità di proteina sono state incubate per 10 minuti a temperatura ambiente con una miscela di reazione contenente: un oligonucleotide ds marcato con [³²P] 1 nM; Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 50 mM; glicerolo 4%; EDTA 0,1 mM; DTT 0,5 mM; BSA 40 µg/ml; MgCl₂ 3 mM in un volume di reazione di 10 µl. In seguito all'incubazione è stato aggiunto ai campioni 1 µl di tampone di caricamento (blu di bromofenolo 0,025%; TBE 0,5X e glicerolo 4%) e i campioni sono stati analizzati in gel di poliacrilammide al 4% (per analizzare il legame di UL44 intera ad un 30-mero), al 5% (per il legame delle proteine UL44 C290 wt o mutata al 30-mero) o al 10% (per analizzare il legame di UL44 C290 ad un 18-mero). I gel sono stati fatti correre prima del caricamento dei campioni per 1 h a 10 mA a 4°C utilizzando il *Miniprotean II*

si nelle stesse condizioni. Dopo la corsa i gel sono stati
lizzato mediante autoradiografia. I dati ottenuti sono stati
antity One (Bio-Rad).

Il valore di K_d apparente è stato calcolato dai saggi EMSA condotti con il 18-mero
utilizzando l'equazione:

$$K_d = \frac{[P][DNA_{totale}]}{[DNA_{legato}] - P}$$

dove $[P]$ è la concentrazione di proteina totale, $[DNA_{totale}]$ è la concentrazione di DNA
totale e $[DNA_{legato}]$ è la concentrazione di DNA legato (Coligan, 1996).

Per i saggi condotti in presenza del 30-mero, i valori di K_d apparente sono stati calcolati
applicando un modello a due siti di Senear e Brenowitz (Senear & Brenowitz, 1991)
mediante le equazioni:

$$f_0 = \frac{1}{Z}$$

$$f_1 = K_1 \cdot \frac{L}{Z}$$

$$f_2 = K_2 \cdot \frac{L^2}{Z}$$

dove f_i è la frazione di molecole di DNA ed i il numero di ligandi legati, L la
concentrazione di proteina ligando, Z il polinomio di legame pari a $1 + K_1 \cdot L + K_2 \cdot L^2$ e
 K_1 e K_2 sono le costanti di associazione.

3.18 Calcolo dei parametri relativi a interazioni elettrostatiche

Per l'analisi degli effetti della variazione della concentrazione di sale sulla costante di
legame, K_{obs} , dell'interazione di UL44 con il 18-mero, è stata applicata la teoria di
legame sviluppata da Record (Record *et al.*, 1978; Record *et al.*, 1976). Secondo questa
teoria, quando un ligando con Z cariche positive (o una proteina con Z cariche positive
nel suo sito di legame per il DNA) si lega ad un acido nucleico, viene neutralizzato un
certo numero di gruppi fosfato, che corrispondente a Z . Di conseguenza, sono rilasciati
in soluzione gli ioni con carica opposta (controioni) che erano associati con i gruppi
fosfato Z . Secondo questa teoria, in presenza di un sale monovalente MX , la quantità di
ioni con carica opposta rilasciati in una interazione proteina-acido nucleico (quindi il
numero di interazioni elettrostatiche coinvolte), può essere calcolata misurando la
derivata $d \log K_{obs} / d \log [M^+]$. In una soluzione del sale MX sufficientemente diluita,
in cui gli effetti di idratazione possono essere trascurati e non ci sono complicazioni
dovute al legame di anioni al ligando, la dipendenza della K_{obs} da $[M^+]$ è:

$$\frac{d \log K_{obs}}{d \log [M^+]} = -Z$$

equazione 1

no condotte in assenza di cationi multivalenti, è
a forma B è pari a 0,88) e il $\log K_{obs}$ è una funzione
Z può essere determinato dalla dipendenza di \log

K_{obs} da $\log [M^+]$.

Gli effetti di ioni divalenti quali Mg^{2+} sulla K_{obs} sono qualitativamente simili; comunque è utilizzato il coefficiente (che rappresenta il numero di ioni divalenti di carica opposta associati termodinamicamente per gruppo fosfato) al posto del coefficiente dell'equazione 1 (deHaseth *et al.*, 1977):

$$\frac{d \log K_{obs}}{d \log [M^{2+}]} = -Z \quad \text{equazione 2}$$

Quindi, se sono escluse interazioni preferenziali con anioni, si ottiene la relazione tra i due termini, che risulta nell'equazione 3:

$$\frac{d \log K_{obs}}{d \log [M^{2+}]} = - \left(\frac{\beta}{\alpha} \right) \frac{d \log K_{obs}}{d \log [M^+]} \quad \text{equazione 3}$$

Per la forma B del DNA *duplex*, $\beta = 0,47$ e il rapporto $\beta / \alpha = 0,53$ (deHaseth *et al.*, 1977). Se l'equazione 3 non è applicabile per una particolare interazione ligando-acido nucleico, allora devono essere presi in considerazione altri effetti dovuti al sale, oltre a quelli dovuti al rilascio di ioni di carica opposta. Per gli esperimenti effettuati in questo lavoro di tesi, si è potuta applicare l'equazione 3.

4. Risultati

4.1 Caratterizzazione del ruolo della dimerizzazione di UL44

Come ricordato nell'Introduzione, è stata di recente risolta dal nostro gruppo di ricerca, la struttura cristallografica dei 290 residui N-terminali della proteina UL44 (forma tronca della proteina che è comunque attiva) e si è potuto osservare che UL44 forma omodimeri testa-testa formando una struttura di pinza a C (Appleton *et al.* 2004). Sono stati inoltre individuati alcuni residui amminoacidici, L86, L87 e F121, che sono indispensabili per la dimerizzazione di UL44 ed è stato dimostrato infatti che la sostituzione con alanina dei residui F121 e L86/L87, previene la formazione di dimeri. Inoltre i mutanti F121A e L86A/L87A, che si comportano come monomeri, presentano una ridotta capacità di legare il DNA (Appleton *et al.*, 2004).

In questo lavoro di tesi sono stati condotti degli esperimenti per chiarire il ruolo e l'importanza della dimerizzazione di UL44 per le sue funzioni. È stata innanzitutto saggiata la capacità di dimerizzare della proteina UL44 intera. È stata quindi valutata la capacità dei mutanti di UL44 che non dimerizzano di interagire con la subunità catalitica UL54 e di stimolarne l'attività. Inoltre è stata valutata l'interazione dei mutanti di UL44 che non dimerizzano con altri interattori noti virali di UL44: UL97, UL114 e UL84. In fine, in collaborazione con il Prof. Pari (Università del Nevada, USA) è stato effettuato uno studio sulla capacità di questi mutanti di promuovere la replicazione *ori*Lyt-dipendente del DNA di HCMV.

4.1.a Analisi della capacità della proteina UL44 intera di formare dimeri in soluzione

Per dimostrare che la proteina UL44 intera, così come la forma tronca UL44 C290, è in grado di dimerizzare, sono stati effettuati degli esperimenti di *GST-pulldown* (Materiali e Metodi paragrafo 3.10). È stata così saggiata la capacità di GST-UL44 di interagire con se stessa, in presenza o assenza di DNA, e per controllo con la polimerasi UL54 e con una forma tronca del fattore di processività di HSV-1 (UL42 C340).

Negli esperimenti sono state utilizzate le proteine purificate GST, GST-UL44, GST-UL44 C290 e MBP-UL42 C340 e le proteine UL44 e UL54 espresse *in vitro* e marcate con [³⁵S]metionina mediante il kit *TnT T7[®] Quick Coupled Transcription/Translation System* (Promega), a partire rispettivamente dai plasmidi pRSET-UL44 e pRSET-UL54.

Le proteine GST-UL44 o GST-UL44 C290 sono state incubate con UL44 stessa in presenza ed in assenza di DNA, come controllo positivo con UL54 e come controllo negativo con MBP-UL42 C340. Come ulteriore controllo negativo, GST è stata anch'essa incubata con UL44. La miscela di reazione è stata caricata in colonne di *sepharose* coniugato a glutatione. Le colonne sono state quindi sottoposte a lavaggi e le proteine sono state eluite con un tampone contenente glutatione 15 mM.

In seguito all'eluizione con glutatione, sono stati caricati in gel di acrilammide gli *input* (ovvero i campioni di partenza in cui la proteina UL44, UL54 o MBP-UL42 C340 è stata incubata con GST-UL44 o con GST) per verificare l'avvenuta traduzione *in vitro* delle proteine.

Inoltre è stato analizzato in gel, a fianco di ogni *input*, il rispettivo campione eluito con glutatione da ciascuna delle colonne, contenente la proteina GST o GST-UL44 e

catato con ^{35}S) legati a GST o a GST-UL44. Per approssimativamente il peso molecolare (PM) della proteina, è stato analizzato in parallelo, in ognuno dei

gel, un marcatore di pesi molecolari.

Le proteine radiomarcate sono state visualizzate con autoradiografia dopo analisi mediante SDS-PAGE (Figura 4.1).

I risultati ottenuti (Figura 4.1 A) indicano che UL44 intera è in grado sia di dimerizzare che di interagire con la subunità catalitica UL54 come già noto; inoltre la capacità di UL44 di dimerizzare non varia in presenza o in assenza di DNA. La dimerizzazione inoltre è specifica in quanto GST non è in grado di legare UL44. Come controllo negativo inoltre, si può vedere in Figura 4.1 B che GST-UL44 non è in grado di interagire con MBP-UL42 C340.

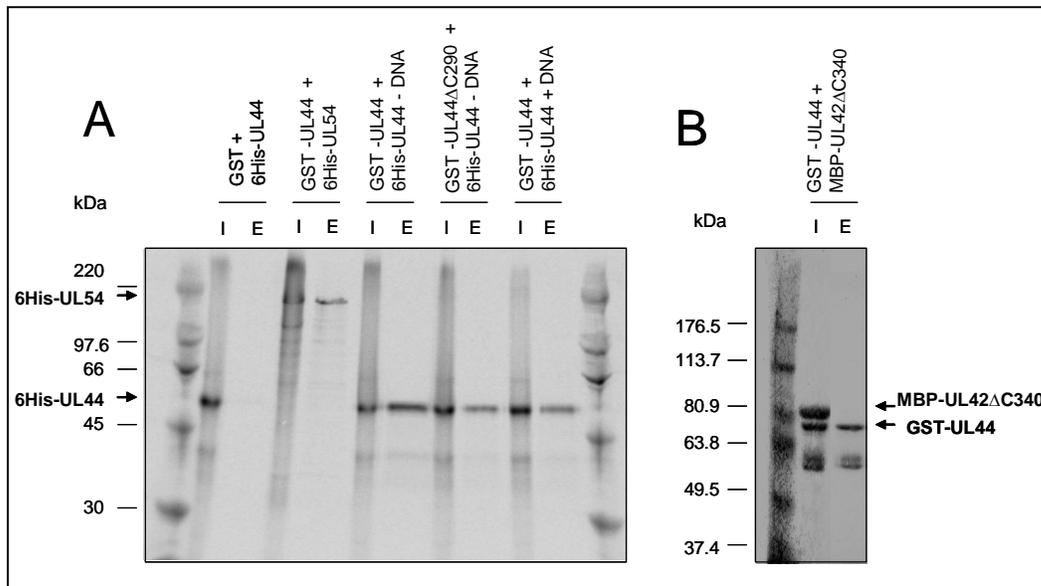


Figura 4.1: Analisi della capacità della proteina UL44 intera di dimerizzare mediante saggi *GST-pulldown*. Le proteine purificate GST o GST-UL44 sono state incubate con le proteine 6His-UL54 e 6His-UL44 (in presenza e assenza di DNA), tradotte *in vitro* e marcate con ^{35}S e con la proteina purificata MBP-UL42 C340. Le miscele di reazione sono state caricate su colonne di *sepharose* coniugato con glutazione. Le colonne sono state sottoposte a lavaggi e le proteine sono state eluite con glutazione 15 mM. Le proteine radiomarcate sono state visualizzate mediante autoradiografia dopo analisi SDS-PAGE. Le frecce indicano le bande corrispondenti a 6His-UL54, 6His-UL44, GST-UL44 e MBP-UL42 C340. Corsie: I, *input* (ovvero miscela di reazione in cui sono presenti entrambe le proteine incubate insieme); E, eluito (campioni eluiti dalla colonna).

4.1.b Analisi dell'effetto delle mutazioni L86A/L87A e F121A sulla dimerizzazione di UL44 mediante il sistema del doppio ibrido

Per effettuare un'ulteriore verifica che anche la proteina UL44 intera fosse in grado di dimerizzare è stato utilizzato il sistema del doppio ibrido. Con lo stesso sistema è stata anche analizzata la capacità di dimerizzare di alcune forme mutate della proteina.

Nel sistema di doppio ibrido utilizzato in questi esperimenti, il fattore di trascrizione sfruttato nel saggio è la proteina di lievito Gal4. Il ceppo ospite di lievito utilizzato è Y190, ceppo che presenta integrati nel genoma due geni reporter, *HIS3* e *lacZ*. Il gene reporter saggiato in questi esperimenti, *lacZ*, codifica per la β -galattosidasi, enzima

ere saggiata mediante un test colorimetrico; *lacZ* si trova
UAS di *GAL1*, che è attivata da Gal4.

Costruzione dei plasmidi esprimenti le proteine di fusione wt e i mutanti

La strategia di clonaggio utilizzata per la creazione dei vari costrutti utilizzati durante questo studio, si è basata sull'utilizzo della PCR: in generale, il frammento di DNA da clonare è stato amplificato a partire da un opportuno plasmide o altro DNA, utilizzando due oligonucleotidi che contengono opportuni siti di taglio per due diverse endonucleasi di restrizione, rispettivamente a monte e a valle della sequenza da amplificare. Il DNA amplificato viene quindi tagliato con gli enzimi i cui siti di restrizione sono presenti nei *primers* utilizzati. A sua volta, il vettore di destinazione viene tagliato con gli stessi enzimi (o con enzimi di restrizione che rilasciano estremità compatibili con quelle dell'inserto). Il vettore e l'inserto di DNA così tagliati vengono purificati dopo corsa elettroforetica in gel di agarosio mediante l'escissione delle bande corrispondenti. L'inserimento del frammento di DNA di interesse nel vettore avviene grazie all'enzima DNA ligasi del fago T4.

Per generare le proteine chimeriche sono stati impiegati due vettori per l'espressione in lievito: il plasmide pGBT9 (vedi Materiali e Metodi paragrafo 3.3.a), che consente la clonazione di frammenti di DNA codificante in fase di lettura aperta col DNA-BD (dominio di legame al DNA) di Gal4, portando alla produzione di una proteina di fusione generalmente usata come *esca* e il plasmide pACT2 (vedi Materiali e Metodi paragrafo 3.3.a), che permette l'espressione di polipeptidi di fusione con l'AD (dominio di attivazione) di Gal4 (*opreö*).

La sequenza codificante di UL44 è stata quindi clonata in entrambi i vettori pGBT9 e pACT2 in modo da ottenere rispettivamente le proteine di fusione Gal4BD-UL44 e Gal4AD-UL44. Per la costruzione del plasmide pGBT9-UL44 il gene per la proteina UL44 è stato amplificato mediante PCR dal plasmide pRSET-UL44 utilizzando i *primers* UL44FL/FOR1 e UL44FL/REV1 contenenti rispettivamente i siti di restrizione per BamHI e PstI. Il prodotto di PCR è stato quindi clonato nei siti BamHI e PstI del vettore. In seguito è stato verificato l'avvenuto clonaggio attraverso analisi di restrizione e sequenziamento utilizzando il *primer* GAL4BD/SEQ.

Per il clonaggio in pACT2, la sequenza codificante UL44 è stata amplificata con PCR dal plasmide pRSET-UL44 utilizzando i *primers* UL44FL/FOR1 e UL44FL/REV2 contenenti rispettivamente i siti di restrizione per BamHI e XhoI. Il prodotto di PCR è stato quindi clonato in siti BamHI e XhoI di pACT2. In seguito è stato verificato l'avvenuto clonaggio attraverso analisi di restrizione e sequenziamento utilizzando i *primers* GAL4AD/SEQ e GAL4AD/FOR.

In seguito, per saggiare la capacità di interagire delle forme mutate di UL44, sono state introdotte delle mutazioni puntiformi nella sequenza di *UL44* a partire dai plasmidi pGBT9-UL44 e pACT2-UL44.

Le mutazioni inserite nella sequenza di UL44 sono le seguenti:

- L86A/L87A, mutazione di due dei residui chiave per la dimerizzazione;
- F121A, mutazione di un residuo chiave per la dimerizzazione;
- P85G, mutazione di controllo, che mantiene inalterate le caratteristiche della proteina;
- I135A mutazione del residuo chiave per l'interazione di UL44 con la polimerasi UL54.

Le mutazioni puntiformi sono state introdotte avvalendosi del *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Inizialmente sono stati disegnati degli

ale alla regione del gene *UL44* in cui si volevano
che in corrispondenza dei codoni mutanti. La
scun oligonucleotide è stata stimata secondo la

seguente formula:

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\% \text{ GC}) \pm 675/N - \% \text{ mismatch}$$

N = lunghezza dell'oligonucleotide in numero di basi

(I valori di % GC e % mismatch devono essere espressi come numeri interi)

(Stratagene, manuale d'uso del kit)

e la sequenza degli oligonucleotidi è stata scelta in modo che $T_m > 78^\circ\text{C}$. Inoltre gli oligonucleotidi sono stati disegnati in modo da avere un contenuto di G/C (guanossina e citosina) almeno del 40% e da terminare con una G o con una C e in modo da essere complementari, assicurando così l'amplificazione dell'intero plasmide. Nella Tabella 3.4 della sezione *Materiali e Metodi* sono riportate le sequenze degli oligonucleotidi mutagenici.

I mutanti nel plasmide pACT2 sono stati creati amplificando il plasmide pACT2-UL44 tramite una reazione di PCR in presenza degli opportuni oligonucleotidi e si è proceduto come indicato nel manuale d'uso del kit; per ognuno dei plasmidi mutanti ottenuti sono stati sequenziali 2-3 cloni utilizzando gli oligonucleotidi UL44 FL/for 1, UL44 FL/rev 1 e UL44 FL/for 2. Il sequenziamento ha rivelato la presenza della mutazione desiderata nella quasi totalità dei cloni. Questo risultato era atteso, in quanto il metodo di mutagenesi utilizzato permette di generare mutanti con una efficienza maggiore o uguale all'80% (cfr. manuale d'istruzioni del *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit*; Stratagene). Sono stati così ottenuti i plasmidi mutanti: pACT2-UL44 L86A/L87A, pACT2-UL44 F121A, pACT2-UL44 P85G e pACT2-UL44 I135A.

Per ottenere i plasmidi pGBT9-UL44L86A/L87A, pGBT9-UL44 F121A, pGBT9-UL44 P85G e pGBT9-UL44 I135A, le sequenze codificanti le proteine UL44L86A/L87A, UL44 F121A, UL44 P85G e UL44 I135A sono state subclonate rispettivamente dai plasmidi pACT2-UL44 L86A/L87A, pACT2-UL44 F121A, pACT2-UL44 P85G e pACT2-UL44 I135A mediante taglio di restrizione con gli enzimi BamHI e XhoI e quindi inserite nel plasmide pGBT9 tagliato con gli enzimi di restrizione BamHI e SalI.

Trasformazione dei lieviti con i plasmidi ottenuti e saggio X-gal

Una volta ottenuti, i vari plasmidi esprimenti la proteina UL44 wt e mutata sono stati utilizzati per trasformare cellule di lievito del ceppo Y190. Le cellule di lievito trasformate con i singoli plasmidi o con le diverse coppie di plasmidi (Tabella 4.1) sono state saggiate per l'attività β -galattosidasi. Solo nei trasformanti in cui vi è interazione tra la proteina fusa all'AD e quella fusa al BD può esservi la trascrizione del gene *reporter lacZ*, che codifica per la β -galattosidasi, enzima in grado di scindere il substrato X-gal dando un prodotto cromogeno blu. D'ora innanzi il saggio di attività β -galattosidasi sarà denominato *saggio X-gal*, per rendere più scorrevole la lettura del testo. Come si può vedere in Tabella 4.1, le proteine fuse al Gal4BD o al Gal4AD non sono in grado di attivare da sole la trascrizione del gene *reporter*, mentre si ha attività β -galattosidasi in presenza di Gal4BD-UL44 e Gal4AD-UL44. Ciò dimostra che la proteina intera è in grado di dimerizzare e tale interazione è specifica in quanto le proteine non sono in grado di attivare la trascrizione del gene *reporter* con i soli domini Gal4BD o Gal4AD. Per quanto riguarda le mutazioni che alterano la capacità di UL44 di dimerizzare, si può notare che la mutazione L86A/L87A sembra inibire completamente la dimerizzazione di UL44 quando presente in entrambi i monomeri,

è minore per la mutazione F121A. Come atteso, le
influiscono con la capacità di UL44 di formare dimeri.

Proteine		Attività - galattosidasiaca
Proteina òescaö	Proteina öpredaö	
Gal4BD-UL44	/	-
Gal4BD-UL44	Gal4AD	-
/	Gal4AD-UL44	-
Gal4BD	Gal4AD-UL44	-
Gal4BD-UL44	Gal4AD-UL44	++
Gal4BD-UL44 L86A/L87A	/	-
Gal4BD-UL44 L86A/L87A	Gal4AD	-
Gal4BD-UL44 L86A/L87A	Gal4AD-UL44	±
/	Gal4AD-UL44 L86A/L87A	-
Gal4BD	Gal4AD-UL44 L86A/L87A	-
Gal4BD-UL44	Gal4AD-UL44 L86A/L87A	±
Gal4BD-UL44 L86A/L87A	Gal4AD-UL44 L86A/L87A	-
Gal4BD-UL44 F121A	/	-
Gal4BD-UL44 F121A	Gal4AD	-
Gal4BD-UL44 F121A	Gal4AD-UL44	+
/	Gal4AD-UL44 F121A	-
Gal4BD	Gal4AD-UL44 F121A	-
Gal4BD-UL44	Gal4AD-UL44 F121A	+
Gal4BD-UL44 F121A	Gal4AD-UL44 F121A	±
Gal4BD-UL44 I135A	/	-
Gal4BD-UL44 I135A	Gal4AD	-
Gal4BD-UL44 I135A	Gal4AD-UL44	++
/	Gal4AD-UL44 I135A	-
Gal4BD	Gal4AD-UL44 I135A	-
Gal4BD-UL44	Gal4AD-UL44 I135A	++
Gal4BD-UL44 I135A	Gal4AD-UL44 I135A	++
Gal4BD-UL44 P85G	/	-
Gal4BD-UL44 P85G	Gal4AD	-
Gal4BD-UL44 P85G	Gal4AD-UL44	++
/	Gal4AD-UL44 P85G	-
Gal4BD	Gal4AD-UL44 P85G	-
Gal4BD-UL44	Gal4AD-UL44 P85G	++
Gal4BD-UL44 P85G	Gal4AD-UL44 P85G	++

Tabella 4.1: Analisi dell'effetto delle mutazioni L86A/L87A e F121A sulla dimerizzazione di UL44 mediante il sistema del doppio ibrido. Nella prima e seconda colonna sono descritte le proteine esca e preda di cui è stata saggiata l'interazione. Le proteine di fusione con Gal4BD sono state espresse mediante il plasmide pGBT9; le proteine di fusione con Gal4AD dal vettore pACT2. Nella terza colonna si è indicato con il segno ++ la comparsa di colorazione blu dopo 1 ó 2 h di incubazione; con + la comparsa della colorazione dopo 5 ó 8 h; con ± la comparsa di una debole colorazione dopo 12 h di incubazione e con 0 l'assenza di colorazione.

mutazioni L86A/L87A e F121A sulla capacità mediante saggi di doppio ibrido

Per saggiare la capacità dei mutanti di UL44 che non dimerizzano di interagire con la subunità catalitica UL54 sono stati effettuati dei saggi di doppio ibrido con la proteina UL44 wt o mutata fusa al Gal4BD o al Gal4AD e la proteina UL54 fusa al Gal4AD o al Gal4BD.

Per ottenere l'espressione in lievito della proteina di fusione GalBD-UL54, il gene codificante la proteina UL54 è stato clonato nel plasmide pGBT9. A questo scopo la sequenza *UL54* è stata amplificata mediante PCR dal plasmide pRSET-Pol utilizzando i primers UL54FL/FOR1 e UL54FL/REV1 contenenti rispettivamente i siti di restrizione per EcoRI e SmaI. Il prodotto di PCR è stato quindi clonato nei siti EcoRI e SmaI del vettore pGBT9. L'avvenuto clonaggio è stato verificato attraverso analisi di restrizione e sequenziamento utilizzando il primer GAL4BD/SEQ.

È stato così ottenuto il plasmide pGBT9-UL54 che è stato utilizzato per trasformare lieviti del ceppo *S. cerevisiae* Y190 assieme ai plasmidi pACT-UL44 wt o mutata.

Per ottenere invece l'espressione della proteina di fusione Gal4AD-UL54, sono stati utilizzati i primers UL54FL/FOR2 e UL54FL/REV2 per amplificare il gene codificante la proteina UL54. Il prodotto di PCR è stato quindi clonato nei siti NcoI ed EcoRI del vettore pACT2. Le cellule di lievito sono quindi state trasformate con il plasmide pACT-UL54 e con i plasmidi pGBT9-UL44 wt o mutata.

Come mostrato in Tabella 4.2, le proteine di fusione Gal4BD-UL54 e Gal4AD-UL54 non sono in grado di attivare da sole o rispettivamente con i soli Gal4AD o Gal4BD la trascrizione del gene reporter, mentre, come atteso, UL54, fusa ad entrambi i domini di Gal4, interagisce con UL44. Inoltre le proteine mutate UL44 L86A/L87A e F121A, che non dimerizzano, mantengono la capacità di interagire con UL54, in maniera simile alla proteina wt e alla proteina mutata UL44 P85G. Come controllo è stata saggiata l'interazione di UL54 con UL44 I135A e, come atteso, non si ha attività galattosidasi in quanto è noto che il residuo I135 di UL44 è indispensabile per l'interazione con la polimerasi.

proteine		Attività - galattosidasi
	Proteina òpredaö	
	/	-
Gal4BD-UL54	Gal4AD	-
Gal4BD-UL54	Gal4AD-UL44	+
Gal4BD-UL54	Gal4AD-UL44 L86A/L87A	+
Gal4BD-UL54	Gal4AD-UL44 F121A	+
Gal4BD-UL54	Gal4AD-UL44 I135A	-
Gal4BD-UL54	Gal4AD-UL44 P85G	+
/	Gal4AD-UL54	-
Gal4AD	Gal4AD-UL54	-
Gal4BD-UL44	Gal4AD-UL54	+
Gal4BD-UL44 L86A/L87A	Gal4AD-UL54	+
Gal4BD-UL44 F121A	Gal4AD-UL54	+
Gal4BD-UL44 I135A	Gal4AD-UL54	-
Gal4BD-UL44 P85G	Gal4AD-UL54	+

Tabella 4.2: Analisi dell'interazione dei mutanti di UL44 che non dimerizzano con la proteina UL54 mediante il saggio di doppio ibrido. Nella prima e seconda colonna sono riportate le proteine di cui è stata saggiata l'interazione. Nella terza colonna si è indicato con + comparsa di colorazione blu; con - assenza di colorazione.

4.1.d Analisi dell'effetto delle mutazioni L86A/L87A e F121A sulla capacità di UL44 di interagire con altri interattori virali noti

Per chiarire il ruolo e l'importanza della dimerizzazione di UL44 sono stati effettuati dei saggi di doppio ibrido con i mutanti di UL44 che non dimerizzano e altri interattori virali noti di UL44: ovvero la proteina chinasi UL97, di cui UL44 è anche un substrato, l'uracil DNA glicosilasi UL114 e UL84, per studiare appunto come varia la capacità di interagire con queste proteine dei mutanti di UL44 rispetto alla proteina wt.

A tale scopo le sequenze codificanti le proteine UL97, UL114 e UL84 sono state amplificate con opportuni *primers* (Materiali e Metodi Tabella 3.1) a partire da DNA genomico di HCMV estratto da cellule HFF infettate con il ceppo di HCMV AD169. I prodotti di PCR sono stati quindi digeriti con opportuni enzimi di restrizione e quindi inseriti nel plasmide pGBT9. Sono stati ottenuti i seguenti plasmidi: pGBT9-UL97, pGBT9-UL114 e pGBT9-UL84.

Tali plasmidi sono stati utilizzati per trasformare cellule di lievito del ceppo Y190 con i plasmidi esprimenti la proteina UL44 wt, i mutanti che non dimerizzano (UL44 L86A/L87A e F121A), con il mutante di UL44 che non interagisce con la DNA polimerasi (UL44 I135A) e con il mutante di controllo UL44 P85G.

Come si evince dalla Tabella 4.3, sono state riconfermate le interazioni, già note in letteratura, della proteina UL44 wt con le proteine UL97, UL114 e UL84. Inoltre, per quanto riguarda i mutanti di UL44 saggiati, questi mantengono inalterata la capacità di interagire con le proteine UL97 e UL114, mentre i mutanti UL44 L86A/L87A e F121A sembrano non interagire con la proteina UL84, indicando che forse la dimerizzazione potrebbe essere importante per l'interazione con questa proteina. Tali risultati dovranno comunque essere riconfermati.

		e	Attività - galattosidasiaca
		Proteina òpredaö	
		/	
Gal4BD-UL84		Gal4AD	
Gal4BD-UL84		Gal4AD-UL44	+
Gal4BD-UL84		Gal4AD-UL44 L86A/L87A	
Gal4BD-UL84		Gal4AD-UL44 F121A	
Gal4BD-UL84		Gal4AD-UL44 P85G	+
Gal4BD-UL84		Gal4AD-UL44 I135A	+
Gal4BD-UL97		/	
Gal4BD-UL97		Gal4AD	
Gal4BD-UL97		Gal4AD-UL44	+
Gal4BD-UL97		Gal4AD-UL44 L86A/L87A	+
Gal4BD-UL97		Gal4AD-UL44 F121A	+
Gal4BD-UL97		Gal4AD-UL44 P85G	+
Gal4BD-UL97		Gal4AD-UL44 I135A	+
Gal4BD-UL114		/	
Gal4BD-UL114		Gal4AD	
Gal4BD-UL114		Gal4AD-UL44	+
Gal4BD-UL114		Gal4AD-UL44 L86A/L87A	+
Gal4BD-UL114		Gal4AD-UL44 F121A	+
Gal4BD-UL114		Gal4AD-UL44 P85G	+
Gal4BD-UL114		Gal4AD-UL44 I135A	+

Tabella 4.3: Analisi dell'interazione dei mutanti di UL44 che non dimerizzano con le proteine UL97, UL114 e UL84 mediante il saggio di doppio ibrido. Nella prima e seconda colonna sono riportate le proteine di cui è stata analizzata l'interazione. Nella terza colonna si è indicato con + comparsa di colorazione blu; con 0 assenza di colorazione

4.1.e Analisi della capacità dei mutanti di UL44 che non dimerizzano di stimolare la sintesi di DNA mediata da UL54

Per saggiare l'importanza della dimerizzazione di UL44 per la sua funzione di fattore di processività, è stata analizzata la capacità dei mutanti di UL44 di stimolare la sintesi di DNA *in vitro* mediata da UL54 mediante due saggi di attività polimerasica *in vitro*: un saggio su filtro e un saggio che analizza la sintesi di lunghe catene di DNA.

Saggi su filtro

È stato innanzitutto utilizzato un saggio su filtro di attività DNA polimerasica *in vitro* che prevede l'incorporazione di dTTP triziato in un DNA stampo sintetico omopolimerico poli(dA)-oligo(dT). Studi recenti riportati in letteratura hanno dimostrato che questo substrato è il più idoneo a evidenziare la stimolazione della subunità catalitica della DNA polimerasi di HSV-1 da parte della subunità accessoria rispetto ad altri substrati normalmente utilizzati in questo tipo di saggi, come il DNA di timo di vitello oppure altri DNA stampo sintetici (Hamatake *et al.*, 1993). Questo

edentemente utilizzato per la caratterizzazione della
o gruppo di ricerca (Loregian *et al.*, 2004 a; Loregian *et*
to quindi già ottimizzato per quanto riguarda le quantità
di proteina da usare, il rapporto molare tra le due proteine ottimale per poter evidenziare
la stimolazione, ecc. Nei saggi di attività DNA polimerasica con i mutanti di UL44 sono
state mantenute costanti queste condizioni sperimentali secondo il protocollo descritto
nella sezione 3.14.

È stata saggiata l'attività polimerasica della proteina UL54 espressa e purificata da
cellule di baculovirus ricombinanti, in presenza o in assenza di UL44 C290 wt o dei
mutanti di UL44 che non dimerizzano. Come controllo è stato saggiato l'effetto sulla
stimolazione dell'attività DNA polimerasica di UL54 delle proteine UL44 C290 P85G
e UL44 C290 I135A. In questi saggi è stata utilizzata la forma tronca UL44 C290 (di
seguito indicata come UL44) della proteina UL44 che, come ricordato, presenta
inalterate le attività biochimiche note della proteina intera (Loregian *et al.*, 2004 b).

In Figura 4.2 è riportato il grafico dell'andamento dell'attività polimerasica di UL54 da
sola, o in presenza di UL44 wt o mutata. Come si evince dalla Figura 4.2, e come già
osservato in precedenza (Loregian *et al.*, 2004 a), l'attività DNA polimerasica di UL54
è molto più alta in presenza della subunità accessoria UL44 rispetto all'attività DNA
polimerasica basale dimostrata dalla sola UL54, in quanto UL44 stimola
l'incorporazione di nucleotidi da parte di UL54. I risultati indicano inoltre che i mutanti
di UL44 che non dimerizzano (UL44 L86A/L87A e F121A) stimolano l'attività DNA
polimerasica di UL54 in maniera simile alla proteina wt. Come atteso, una stimolazione
simile è indotta anche dal mutante UL44 P85G, mentre il mutante UL44 I135A, che non
è in grado di legare UL54, non stimola l'attività di UL54.

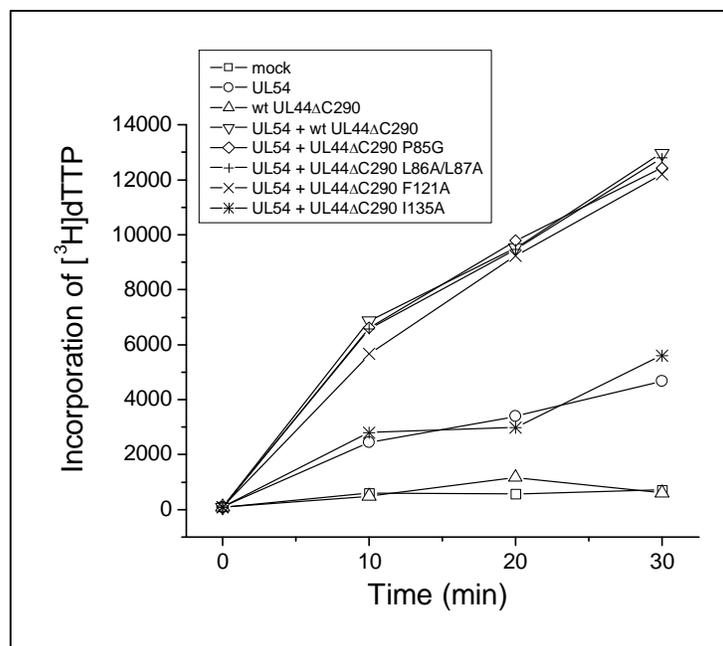


Figura 4.2: Stimolazione dell'attività DNA polimerasica di UL54 da parte dei mutanti di UL44 che non dimerizzano. L'attività DNA polimerasica della proteina UL54 da sola e in presenza della proteina UL44 wt o dei mutanti è stata misurata con un saggio di incorporazione di [³H]-dTTP nel DNA stampo poli(dA)-oligo(dT). Come controllo è stata saggiata anche l'attività della proteina UL44 da sola. I campioni sono stati prelevati dopo 0, 10, 20 e 30 minuti di incubazione a 37°C e deposti in filtri DE81. I filtri sono stati quindi lavati ed è stata effettuata la conta della radioattività.

I mutanti di UL44 che non dimerizzano sono stati testati in saggi di polimerasi *in vitro* in cui si misura la stimolazione da parte di UL44 della sintesi di lunghe catene di DNA da parte della polimerasi. In questi saggi si ha l'incorporazione di [³²P]-dTTP in un DNA stampo sintetico omopolimerico poli(dA)-oligo(dT) ed i prodotti ottenuti vengono analizzati in un gel alcalino di agarosio. Questo saggio era stato precedentemente utilizzato per la caratterizzazione della polimerasi di HCMV dal nostro gruppo di ricerca (Loregian *et al.*, 2003; Loregian *et al.*, 2004 a; Loregian *et al.*, 2004 b). Tale saggio era stato quindi già ottimizzato per quanto riguarda le quantità di proteina da usare, il rapporto molare tra le due proteine ottimale per poter evidenziare la stimolazione, ecc. Nei saggi di attività DNA polimerasica con i mutanti di UL44 sono state mantenute costanti queste condizioni sperimentali secondo il protocollo descritto nella sezione 3.15.

Anche in questi saggi come nei precedenti, è stata utilizzata la forma tronca UL44 C290 (di seguito indicata come UL44) della proteina UL44 che, come ricordato, presenta inalterate le attività biochimiche note della proteina intera (Loregian *et al.*, 2004 b). Come mostrato in Figura 4.3, e come dimostrato in precedenza (Loregian *et al.*, 2004 a), in assenza di UL44 si ha da parte di UL54 solo la produzione di corti frammenti di DNA (campione 1); non si osserva invece alcuna sintesi di DNA in presenza della sola UL44 (campione 2). In accordo con quanto osservato con i saggi su filtro, i mutanti di UL44 che non dimerizzano (UL44 L86A/L87A e F121A, campioni 7, 8, 9, 10), così come il mutante UL44 P85G (campioni 5 e 6), stimolano la sintesi di lunghe catene di DNA mediata da UL54 in maniera comparabile alla proteina wt (campioni 3 e 4). Come atteso, non si ha stimolazione dell'attività di UL54 da parte del mutante UL44 I135A che non è in grado di legare la DNA polimerasi (campioni 11 e 12).

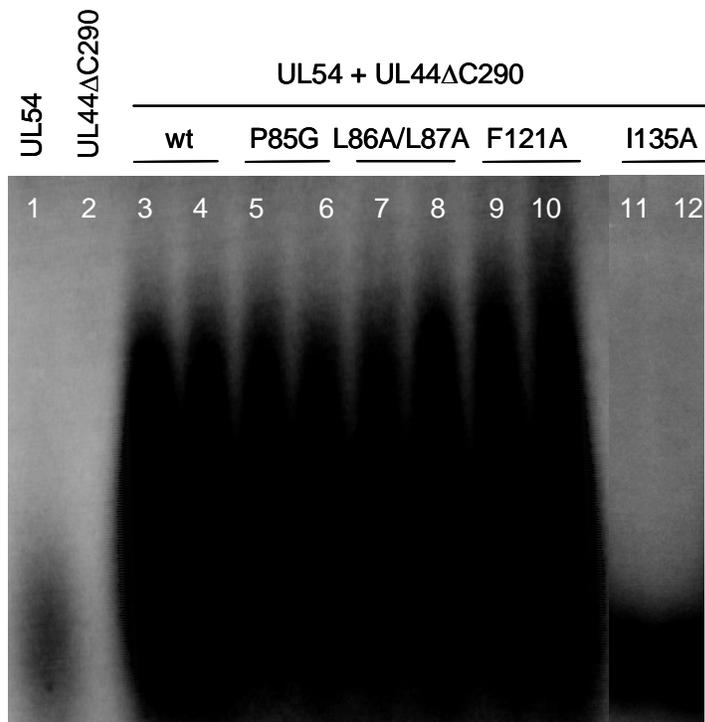


Figura 4.3: Stimolazione da parte della proteina UL44 wt o mutata della sintesi di lunghe catene di DNA mediata da UL54. La sintesi di lunghi frammenti di DNA è stata saggiata analizzando l'incorporazione di [³²P]-dTTP in un DNA stampo sintetico omopolimerico poli(dA)-oligo(dT). I prodotti di reazione sono stati visualizzati mediante autoradiografia in seguito ad elettroforesi in gel alcalino di agarosio al 4%.

che inibiscono la dimerizzazione di UL44 sulla HCMV *in vivo*

Per chiarire ulteriormente il ruolo e l'importanza della dimerizzazione di UL44 nel ciclo replicativo virale, è stato ritenuto interessante analizzare la capacità dei mutanti di UL44 che non dimerizzano di promuovere la replicazione *oriLyt*-dipendente del DNA di HCMV. A tale scopo è stato effettuato un saggio di complementazione della replicazione del DNA di HCMV in collaborazione con il Prof. Pari (Università del Nevada, USA). In questo saggio 11 loci genomici virali (che codificano le proteine del complesso replicativo e proteine ausiliarie) cooperano nel mediare la replicazione *oriLyt*-dipendente del DNA virale (Pari & Anders, 1993; Pari *et al.*, 1993).

Questo saggio permette lo studio dei geni essenziali per la replicazione *oriLyt*-dipendente di HCMV ma non prevede l'infezione delle cellule, bensì una complementazione transiente dell'attività di replicazione del DNA virale. Le cellule vengono cotrasfettate con cosmidi o plasmidi codificanti i fattori essenziali per la replicazione del DNA di HCMV insieme ad un plasmide contenente *oriLyt* che funge da *reporter* per la replicazione (pSP50). Gli 11 fattori richiesti per la complementazione transiente della sintesi di DNA sono le proteine della forza replicativa [UL57, UL70, UL102, UL105, UL54, UL44 e UL84, (per una descrizione di queste proteine vedi Introduzione, capitoli 1.3 e 1.4)] e alcune proteine regolatorie: IRS1/TRS1; UL36-38; IE1/IE2 (MIE); UL112-113 (vedi introduzione capitolo 1.3).

Successivamente viene estratto il DNA totale dalle cellule ed in seguito a trattamento con proteinasi K il DNA viene tagliato con DpnI, enzime che taglia il DNA *input* dammetilato ma non il DNA di nuova sintesi. In seguito ad elettroforesi in gel di agarosio 0,8% e trasferimento su membrana, il DNA viene ibridato con una opportuna sonda marcata.

Costruzione dei plasmidi pSI-UL44 *wild type* (wt) e mutanti

Per ottenere l'espressione della proteina UL44 wt e mutata, la sequenza codificante la proteina UL44 è stata introdotta nel plasmide di espressione eucariotico pSI (Materiali e Metodi paragrafo 3.3.d). A tale scopo la sequenza codificante UL44 è stata estratta mediante taglio di restrizione con gli enzimi XhoI e MluI dal plasmide pD15-UL44 ed inserita nei siti XhoI e MluI del plasmide pSI, ottenendo così il plasmide pSI-UL44. In seguito, sono state introdotte delle mutazioni puntiformi nella sequenza di *UL44* a partire dal plasmide pSI-UL44. Le mutazioni inserite nella sequenza di UL44 sono le seguenti: L86A/L87A, P85G, F121A, e I135A.

Le mutazioni puntiformi sono state introdotte avvalendosi del *QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) ed utilizzando opportuni *primers* (Tabella 3.4 della sezione *Materiali e Metodi*) come descritto nel paragrafo 4.1.b. Sono stati così ottenuti i plasmidi mutanti:

pSI-UL44 L86A/L87A

pSI-UL44 F121A

pSI-UL44 P85G

pSI-UL44 I135A

Risultati del saggio di complementazione della replicazione del DNA di HCMV

I plasmidi di espressione eucariotica codificanti le proteine UL44 wt o mutate sono quindi stati utilizzati dal Prof. Pari per effettuare il saggio di complementazione della

ale saggio è in fase di messa a punto nel nostro

ati ottenuti. La freccia superiore indica il DNA replicato, resistente al taglio da parte di DpnI, mentre la freccia inferiore indica il DNA *input*, non resistente al taglio da parte di DpnI. Si osserva replicazione del DNA virale dipendente da *oriLyt* in presenza della proteina UL44 intera wt, ma anche della forma tronca della proteina, UL44 C290, riconfermando, quindi, il fatto che la proteina composta dai 290 residui N-terminali mantiene inalterate le proprietà della proteina intera. Inoltre, come atteso, la mutazione P85G non altera la capacità di UL44 di promuovere la replicazione del DNA virale. Al contrario invece, non si osserva replicazione del DNA dipendente da *oriLyt* in presenza dei mutanti di UL44 che non dimerizzano suggerendo quindi che la capacità di formare dimeri da parte di UL44 è essenziale perché avvenga la replicazione del DNA virale. Inoltre, come si può osservare in Figura 4.4, non vi è replicazione del DNA virale nemmeno in presenza del mutante UL44 I135A in quanto esso non è in grado di interagire con la polimerasi UL54.

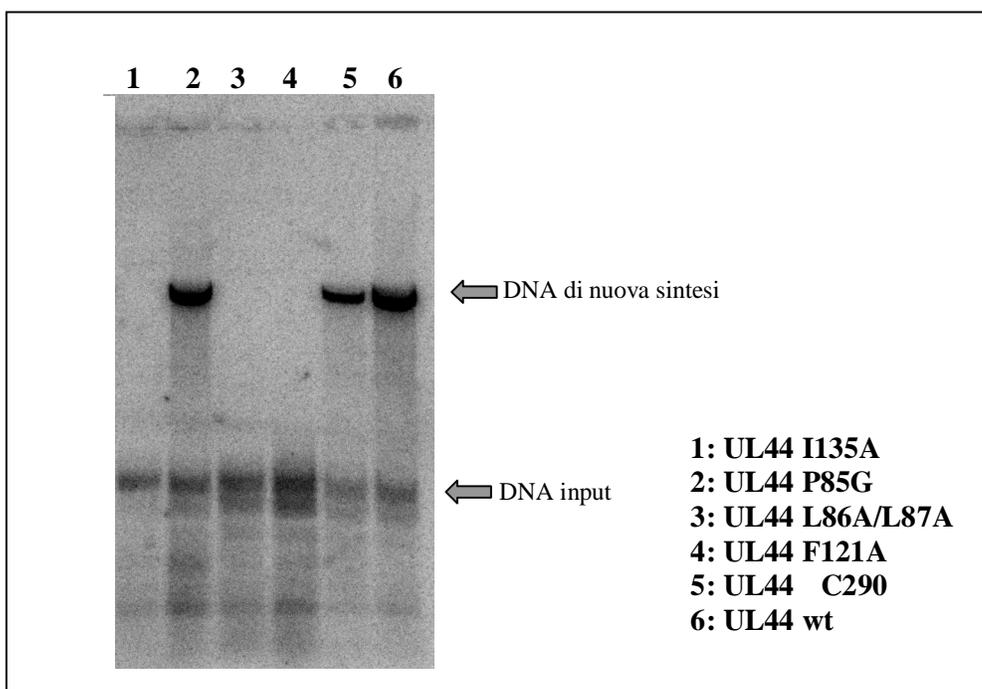


Figura 4.4: Saggio di complementazione della replicazione del DNA di HCMV per saggiare la capacità dei mutanti UL44 che non dimerizzano di promuovere la replicazione del DNA virale. Il saggio è stato effettuato come descritto in Pari *et al.* (Pari & Anders, 1993; Pari *et al.* 1993) (vedi paragrafo 4.1.e per un riassunto del protocollo utilizzato). La freccia superiore indica il DNA replicato, resistente al taglio da parte di DpnI, mentre la freccia inferiore indica il DNA *input*, non resistente al taglio da parte di DpnI.

Per confermare inoltre che le proteine wt e mutate fossero espresse allo stesso livello, sono stati effettuati degli esperimenti di *Western blot* (Materiali e Metodi, paragrafo 3.12). I risultati ottenuti indicano che le proteine mutate vengono espresse così come la proteina *wild-type* (Figura 4.5).

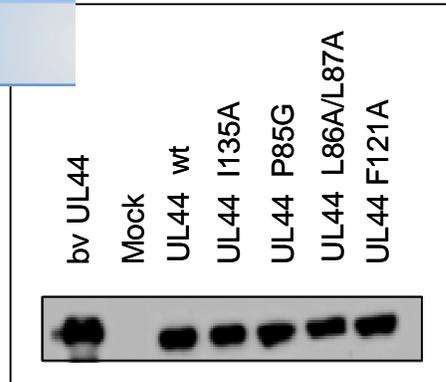


Figura 4.5: Analisi mediante *Western blot* dell'espressione delle proteine UL44 *wild-type* e mutate. Cellule HFF sono state trasfettate con i plasmidi esprimenti le proteine UL44. Dopo 48 h di incubazione le cellule sono state lisate e le proteine analizzate mediante SDS-PAGE e trasferite su membrana PVDF. Le proteine UL44 *wild-type* e mutate sono state rivelate mediante l'anticorpo monoclonale 10-C50 (Fitzgerald) diretto contro UL44.

Attività di legame al DNA di UL44

Come descritto nell'introduzione (paragrafo 1.4.c) UL44 è in grado di legare il DNA direttamente, a differenza di altri fattori di processività, quali le *sliding clamps* (pinze scorrevoli), che non hanno la capacità intrinseca di legare il DNA, ma vengono associate al DNA in maniera ATP-dipendente da proteine denominate *clamp loaders*, in modo da formare multimeri. UL44 presenta inoltre una regione basica ricca di lisine simile a quella ricca di arginine di UL42, il fattore di processività della DNA polimerasi di HSV-1. UL42 è anch'essa in grado di legare il DNA direttamente come monomero (Randell & Coen, 2004) e sebbene presenti un'alta affinità per il DNA, è in grado di diffondere linearmente lungo la doppia elica in assenza della DNA polimerasi UL30 a cui si associa (Randell & Coen, 2001). È stato proposto che le interazioni elettrostatiche tra i residui basici della regione basica di UL42 e lo scheletro di fosfati del DNA promuovono il legame di UL42 al DNA e gli permettano di diffondere lungo la doppia elica (Zuccola *et al.*, 2000). In supporto a questa ipotesi, è stato recentemente dimostrato che la sostituzione di residui di arginina nella regione basica di UL42 diminuisce l'affinità di legame al DNA di UL42 (Randell *et al.*, 2005). Analogamente, anche per UL44 è stato ipotizzato che la regione ricca di lisine potrebbe essere coinvolta nel legame al DNA tramite interazioni elettrostatiche e nella diffusione lungo lo scheletro di DNA.

UL44 potrebbe quindi funzionare come un fattore di processività ibrido, ossia sia in grado di circondare il DNA (come PCNA) sia di formare interazioni elettrostatiche (come UL42). Sebbene sia stato dimostrato che UL44 è in grado di legare il DNA a doppio filamento (ds), e le mutazioni che inibiscono la dimerizzazione alterano anche la capacità di legare il DNA, non sono ancora noti i dettagli dell'interazione DNA-UL44, e se UL44 lega effettivamente il DNA come dimero.

Quindi, per meglio caratterizzare la modalità con cui UL44 è in grado di legare il DNA, in questo lavoro sono stati effettuati degli esperimenti di legame al DNA su filtro e dei saggi EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*) per determinare l'affinità apparente di UL44 per il DNA, la stechiometria di questo legame e la sua dipendenza da alcune caratteristiche del DNA, quali lunghezza e sequenza nucleotidica. È stata inoltre valutata la dipendenza dalla forza ionica del legame di UL44 al DNA.

4.2.a Analisi del legame di UL44 ad oligonucleotidi a singolo e doppio filamento mediante saggi su filtro

Per caratterizzare la capacità di UL44 di legare il DNA, sono stati innanzitutto condotti degli esperimenti su filtro (*filter-binding assays*) in modo da determinare le costanti di affinità apparenti di UL44 per DNA a doppio e a singolo filamento.

In questi esperimenti è stata utilizzata UL44 C290 (indicata di seguito come UL44), forma tronca della proteina, che comprende i 290 residui N-terminali di UL44 e che possiede tutte le attività biochimiche note della proteina intera, così come la capacità di supportare la replicazione origine-dipendente del DNA virale in cellule trasfettate (Risultati, paragrafo 4.1.f). Quantità crescenti di UL44 sono state aggiunte a 1 fmole di DNA marcato all'estremità 5' con ³²P. Sono stati utilizzati in questi saggi, come DNA, diversi oligonucleotidi a singolo e doppio filamento di lunghezza (8 ó 47 nucleotidi) e sequenza nucleotidica diverse. In questi saggi è stata utilizzata una concentrazione di sale relativamente bassa (NaCl 50mM) in modo da poter comparare i risultati ottenuti

UL42, ottenuti precedentemente da esperimenti condotti (Weissbart *et al.*, 1999; Gottlieb & Challberg, 1994).

ha previsto l'utilizzo di due filtri sovrapposti di nitrocellulosa/DE81. In questo modo i complessi DNA-proteina rimangono intrappolati nel filtro di nitrocellulosa che è carico negativamente ed è quindi in grado di legare proteine (in quanto la maggior parte delle proteine presenta carica netta positiva) ma non DNA libero (carico negativamente) che resterà invece intrappolato nel filtro di DE81 posto sotto il filtro di nitrocellulosa. Questo tipo di saggio era stato già utilizzato dal nostro gruppo di ricerca per l'analisi della capacità di legare il DNA dei mutanti di UL44 che non dimerizzano (Appleton *et al.*, 2004).

È stata quindi misurata la quantità di radioattività incorporata nei due filtri (nitrocellulosa e DE81) per ciascuna concentrazione proteica, ed è stata determinata la frazione di DNA legato; tale frazione è stata messa in grafico in relazione alla concentrazione di proteina (Figura 4.6). Questi saggi sono stati condotti con concentrazioni molto basse di DNA ed in queste condizioni la costante di dissociazione apparente K_d , corrisponde alla concentrazione di proteina in cui si hanno metà dei siti di legame occupati (ossia il 50% di DNA legato). Le K_d sono apparenti e non assolute perché per ogni frammento di DNA più lungo del sito di legame per UL44 ci possono essere più di un potenziale sito di legame per la proteina (McGhee & von Hippel, 1974; Epstein, 1978).

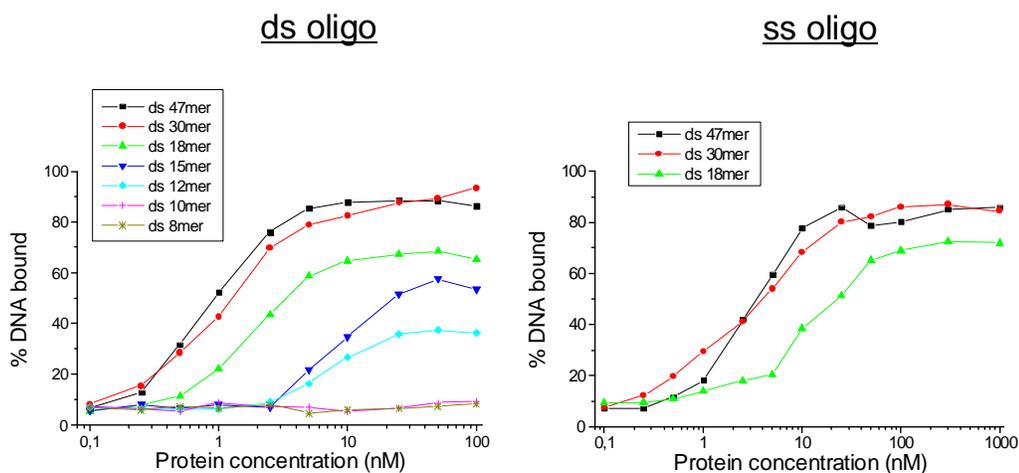


Figura 4.6: Analisi del legame di UL44 C290 ad oligonucleotidi a singolo o doppio filamento di diversa lunghezza. Concentrazioni crescenti di UL44 C290 sono state incubate con 1 fmol di oligonucleotide marcato a singolo (B) o doppio (A) filamento (concentrazione finale 0,1 nM). Il DNA libero e il DNA legato alla proteina sono stati quantificati mediante saggi su filtro e la frazione di DNA legato alla proteina è stata messa in relazione alla concentrazione di proteina di ciascun campione.

I risultati ottenuti (Figura 4.6) indicano che UL44 lega oligonucleotidi a doppio filamento di 18 o più bp con K_d apparenti nell'ordine delle nanomoli (Tabella 4.4). Per gli oligonucleotidi di 15 e 12 bp le K_d sono marcatamente più alte e, in queste condizioni, UL44 non è in grado di legare tutto il DNA alle concentrazioni più alte di proteina saggiate, anche se il legame sembra andare a *plateau* (Figura 4.6 A). Possibili spiegazioni vengono date nel capitolo Discussione e Conclusioni. Si può osservare inoltre che UL44 non si lega ad oligonucleotidi di lunghezza inferiore a 12 bp.

	K_d apparente (nM)	
	oligonucleotidi ds	oligonucleotidi ss
47	$0,9 \pm 0,3$	$3,5 \pm 1,2$
30	$1,2 \pm 0,6$	$4,0 \pm 1,6$
18	$3,1 \pm 1,1$	$23,5 \pm 9,8$
15	$22,3 \pm 8,4$	-
12	> 100	-
10	n.d.	-
8	n.d.	-

Tabella 4.4: Costanti di dissociazione apparenti del legame di UL44 C290 ad oligonucleotidi a singolo e doppio filamento di diversa lunghezza. Le costanti di dissociazione apparenti sono state determinate dai dati riportati in Figura 4.6. K_d apparente = $[P][D]/[PD]$, dove [P], [D] e [PD] sono rispettivamente le concentrazioni di proteina libera, DNA libero e del complesso DNA-proteina. I saggi sono stati condotti in condizioni in cui $[D] \ll K_d$, quindi le costanti di dissociazione apparenti corrispondono alle concentrazioni di proteina in cui si hanno metà dei siti di legame occupati (K_d apparente = $[P] = K/2$). n.d.: non misurabile. - : non determinato. I valori riportati rappresentano la media delle misure effettuate (da 3 a 5) \pm la deviazione standard.

L'analisi del legame di UL44 ad oligonucleotidi a singolo filamento di 18-47 nucleotidi, (Figura 4.6 B) mostra che UL44 possiede un'affinità per il DNA a doppio filamento che è circa 3-8 volte maggiore rispetto a quella per il DNA a singolo filamento, per frammenti della stessa lunghezza (Figura 4.6, Tabella 4.4).

Per investigare se il legame al DNA di UL44 è dipendente dalla sequenza nucleotidica, i saggi sono stati condotti con vari oligonucleotidi a singolo o doppio filamento di identica lunghezza ma diversa sequenza nucleotidica. Come mostrato in Tabella 4.5, sono stati ottenuti valori simili di K_d con DNA aventi la stessa lunghezza, indipendentemente dalla sequenza (Tabella 4.5). Quindi il legame al DNA di UL44 non è influenzato dalla sequenza del DNA.

Oligonucleotide	K_d apparente (nM)
<u>oligonucleotidi di 30 bp o nt</u>	
5 ϕ -GTGCGAAAGCCGGTCTGCGAGTACGTCAAG-3 ϕ 3 ϕ -CACGCTTTCGGCCAGACGCTCATGCAGTTC-5 ϕ	1.2 \pm 0.6
5 ϕ -GCTTTCGCGCACACTGGCTTGGACGTACAC-3 ϕ 3 ϕ -CGAAAGCGCGTGTGACCGAACATGCATGTG-5 ϕ	0.9 \pm 0.3
5 ϕ -AGCAGTCTTTCCTTGGGCTTTTTTTTTTGGG-3 ϕ 3 ϕ -TCGTCAGAAAGGAACCCGAAAAAAAAAACCC-5 ϕ	1.3 \pm 0.4
5 ϕ -GTGCGAAAGCCGGTCTGCGAGTACGTCAAG-3 ϕ	4.0 \pm 1.6
5 ϕ -GCTTTCGCGCACACTGGCTTGGACGTACAC-3 ϕ	5.9 \pm 1.8
5 ϕ -AGCAGTCTTTCCTTGGGCTTTTTTTTTTGGG-3 ϕ	5.4 \pm 1.2
5 ϕ -AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-3 ϕ	5.1 \pm 1.7
5 ϕ -GGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG-3 ϕ	6.3 \pm 1.9
<u>oligonucleotidi di 18 bp o nt</u>	
5 ϕ -ATAGCATTAGTTGACAC-3 ϕ 3 ϕ -TATCGTAAATCAACTGTG-5 ϕ	3.1 \pm 1.1
5 ϕ -GTCCTACATCATCGC-3 ϕ 3 ϕ -CAGGATGTAGTAGTAGCG-5 ϕ	3.6 \pm 1.5
5 ϕ -GTGGATGATGTGGATAAC-3 ϕ 3 ϕ -CACCTACTAACACTATTG-5 ϕ	2.8 \pm 0.8
5 ϕ -ATAGCATTAGTTGACAC-3 ϕ	23.5 \pm 9.8
5 ϕ -GTCCTACATCATCGC-3 ϕ	25.7 \pm 11.3
5 ϕ -GTGGATGATGTGGATAAC-3 ϕ	20.6 \pm 10.3

Tabella 4.5: Costanti di dissociazione apparenti del legame di UL44 C290 ad oligonucleotidi a singolo e doppio filamento di identica lunghezza ma diversa sequenza. Le costanti di dissociazione apparente sono state calcolate come descritto nella legenda della Tabella 4.4. I valori riportati rappresentano la media delle misure effettuate (da 3 a 5) \pm la deviazione standard.

Per determinare se la porzione C-terminale di UL44 (deleta nella forma utilizzata in questi saggi) è coinvolta nella sua attività di legame al DNA, i saggi su filtro sono stati ripetuti utilizzando la proteina UL44 intera prodotta e purificata da cellule di insetto infettate con baculovirus ricombinante (denominata bvUL44; Loregian *et al.*, 2003).

In figura 4.7 è mostrato il grafico relativo alla variazione della frazione di DNA legato a UL44 in funzione della concentrazione di proteina, per i diversi oligonucleotidi saggati. In Tabella 4.6 sono riportati i valori delle costanti di dissociazione per il legame di bvUL44 ai diversi oligonucleotidi. Come si può vedere, bvUL44 possiede un'affinità per gli oligonucleotidi sia a doppio (Figura 4.7) che a singolo filamento (dato non mostrato), paragonabile a quella della proteina tronca. Ciò suggerisce che le proprietà di legame al DNA di UL44 risiedono completamente nei due terzi N-terminali della proteina.

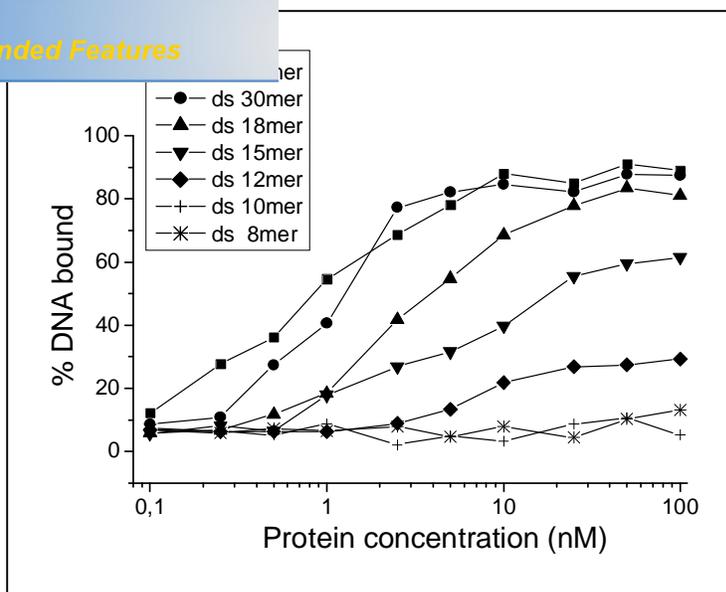


Figura 4.7: Attività di legame al DNA di bvUL44. Le reazioni sono state effettuate come descritto nella legenda della Figura 4.6 in presenza di concentrazioni crescenti di bvUL44.

Lunghezza oligonucleotide (bp)	K_d apparente (nM)
47	$0,8 \pm 0,2$
30	$1,1 \pm 0,4$
18	$3,7 \pm 1,2$
15	$18,8 \pm 10,9$
12	> 100
10	n.d.
8	n.d.

Tabella 4.6: Costanti di dissociazione apparenti del legame di bvUL44 ad oligonucleotidi ds di diversa lunghezza. Le costanti di dissociazione apparenti sono state calcolate come descritto nella legenda della Tabella 4.5 dai dati riportati in Figura 4.7. n.d. non misurabile; - : non determinato. I valori riportati rappresentano la media delle misure effettuate (da 3 a 5) \pm la deviazione standard.

In conclusione, i dati ottenuti indicano che UL44 lega preferenzialmente il DNA a doppio filamento in maniera indipendente dalla sequenza e che la formazione di complessi DNA-UL44 non richiede il terzo C-terminale di UL44. In questi saggi, UL44 è in grado di legare oligonucleotidi a doppio filamento di 12 bp o più lunghi con K_d dell'ordine delle nanomoli.

legame di UL44 per oligonucleotidi a doppio chiometria del legame UL44-DNA mediante

Al fine di determinare la stechiometria con cui UL44 lega il DNA a doppio filamento sono stati condotti dei saggi EMSA (*Electrophoretic Mobility Shift Assay*; Materiali e Metodi, paragrafo 3.17). Una delle modalità di esecuzione di questi saggi è quella di incubare la proteina di cui si vuole analizzare l'attività di legame al DNA con un frammento di DNA marcato con ^{32}P e contenente uno o più siti di legame per la proteina. I complessi DNA-proteina vengono quindi separati dal DNA non legato mediante elettroforesi in un gel non denaturante di poliacrilammide. La proteina ritarda la corsa del frammento di DNA a cui si lega, quindi il DNA libero migra più velocemente attraverso il gel rispetto ai complessi DNA-proteina. Un vantaggio di questa tecnica è quello di poter risolvere complessi DNA-proteina con diversa stechiometria o conformazione; inoltre, se sono note le concentrazioni di proteina e DNA utilizzate, è possibile calcolare le costanti di dissociazione del legame DNA-proteina.

Gli esperimenti sono stati condotti utilizzando oligonucleotidi a doppio filamento di 18 e 30 bp marcati con radioattivo (^{32}P). Sebbene UL44 sia in grado di legare oligonucleotidi di 12 bp nei saggi su filtro, non è stato possibile rilevare alcun legame con oligonucleotidi di 12 e 15 bp nei saggi EMSA (dati non mostrati). Probabilmente è necessario un frammento di DNA leggermente più lungo (almeno 18 bp) per assicurare una sufficiente stabilità di legame tra UL44 e il DNA durante l'elettroforesi su gel. I saggi sono stati condotti con una quantità costante di DNA marcato al 5% e in presenza di quantità crescenti di UL44 C290. Dopo 10 minuti di incubazione i complessi DNA-proteina sono stati risolti in un gel non denaturante di poliacrilammide e il DNA è stato visualizzato mediante autoradiografia.

Come mostrato in Figura 4.8 A, in seguito ad incubazione di concentrazioni crescenti di UL44 C290 con un oligonucleotide di 18 bp marcato con ^{32}P si ha la formazione, via via crescente, di un singolo complesso proteina-DNA (C1) che presenta ridotta mobilità elettroforetica se paragonato al DNA incubato senza proteina. L'incubazione di UL44 con un oligonucleotide marcato di 30 bp, risulta invece nella formazione di due complessi (C1 e C2) (Figura 4.8 B). Aumentando la quantità di UL44, si ha la predominanza del complesso C2, che presenta minore mobilità elettroforetica. Come mostrato in Figura 4.8 C si ottengono risultati simili anche in presenza della proteina bvUL44 e dell'oligonucleotide marcato di 30 bp.

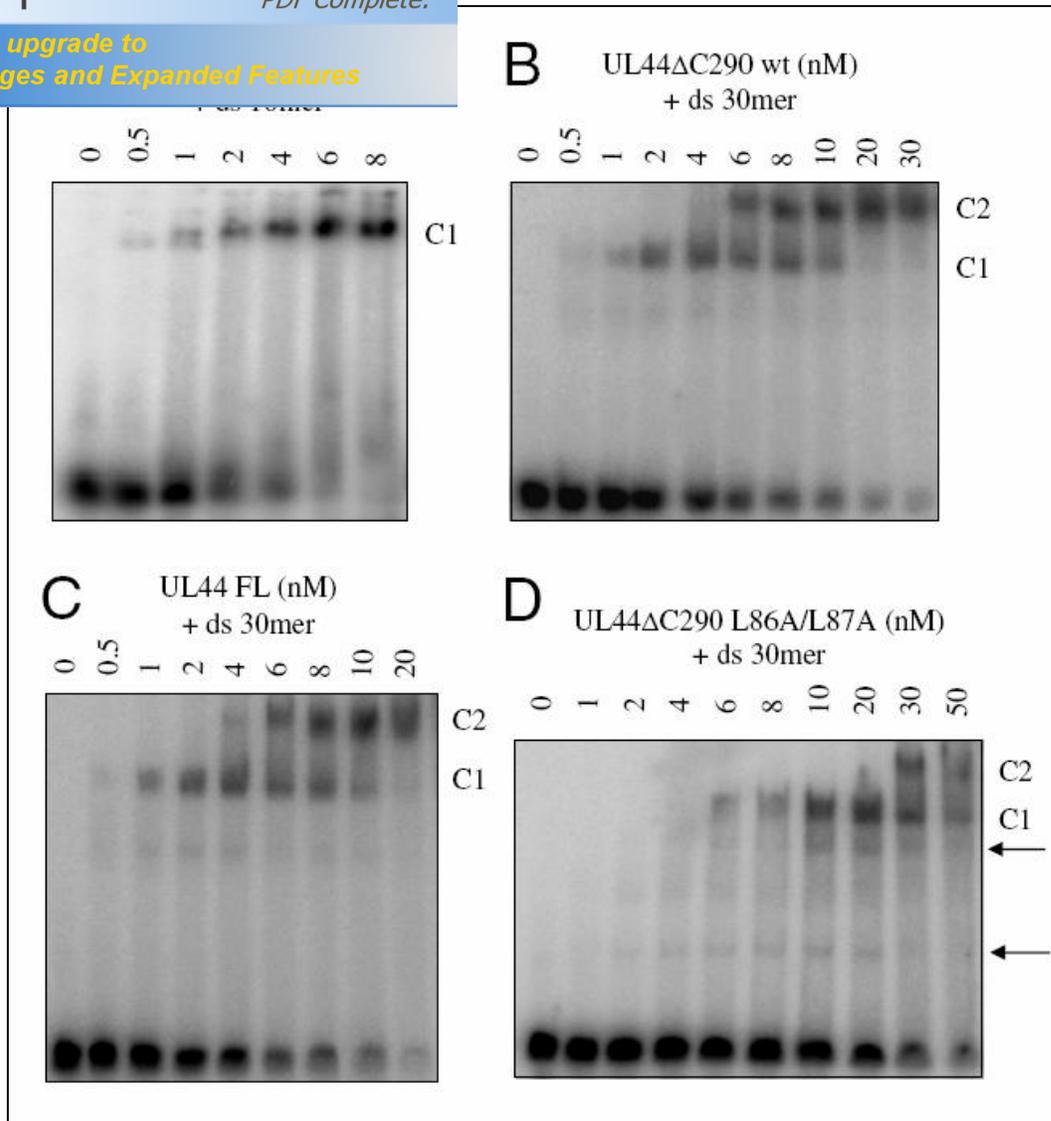


Figura 4.8: Analisi mediante saggi EMSA del legame di UL44 ad oligonucleotidi a doppio filamento. Le reazioni di legame contenenti l'oligonucleotide di 18 bp (ds 18mer) 1 nM e le concentrazioni indicate di proteina UL44 C290 wt (A), o l'oligonucleotide di 30 bp (ds 30mer) 1 nM e UL44 C290 wt (B) o UL44 wt intera (C) o il mutante UL44 C290 L86A/L87A che non dimerizza (D), sono state incubate per 10 minuti a temperatura ambiente in tampone di legame prima della separazione in gel non denaturante di poliacrilammide. Gli oligonucleotidi a doppio filamento sono stati creati appaiando ciascun oligonucleotide sintetico con il rispettivo complementare. Gli oligonucleotidi appaiati sono stati marcati e purificati (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.1.c). Le frecce in D indicano specie che migrano più velocemente e che probabilmente corrispondono a complessi DNA-monomero di UL44. Tali specie si osservano nelle analisi EMSA del mutante UL44 C290 L86A/L87A che non dimerizza ma non nelle analisi EMSA della proteina wt.

È noto che UL44 omodimerizza in soluzione (Appleton *et al.*, 2004; Risultati paragrafo 4.1.a) e che la dimerizzazione è importante per il legame al DNA (Appleton *et al.*, 2004); alla luce di queste caratteristiche di UL44, i risultati dei saggi EMSA possono indicare che i due complessi C1 e C2 che si riscontrano in presenza dell'oligonucleotide di 30 bp rappresentano rispettivamente un rapporto di 1:1 e 2:1 dimeri di UL44 per oligonucleotide di 30 bp. Tale interpretazione è supportata da analisi EMSA condotte

44 (UL44 C290 L86A/L87A) che non è in grado di (2004; Risultati paragrafo 4.1.b). In presenza di tale alle bande più basse (indicate dalle frecce in Figura 4.8 D) rispetto a quelle dei complessi C1 e C2. Tali bande rappresentano complessi DNA-proteina che migrano più velocemente, i quali sono verosimilmente formati da monomero/monomeri di UL44 legati al DNA (Figura 4.8 D).

In seguito, per determinare l'affinità di legame di UL44 per l'oligonucleotide di 18 bp, è stata effettuata una analisi densitometrica sulle bande corrispondenti ai complessi DNA-proteina e al DNA non legato, ottenute alle diverse concentrazioni di UL44. Come prima descritto, l'incubazione di questo corto DNA a tutte le concentrazioni proteiche saggiate dà luogo ad un solo complesso (C1) che migra più lentamente rispetto al DNA non legato (Figura 4.8 A), quindi l'affinità misurata si riferisce ad un dimerico di UL44 legato ad una molecola di DNA. La K_d apparente calcolata (per il calcolo vedi Materiali e Metodi paragrafo 3.17) è pari a 2.7 ± 0.9 nM. Tale valore è paragonabile, nei limiti dell'errore sperimentale, a quello ottenuto con i saggi su filtro con lo stesso oligonucleotide (Tabella 4.4).

Sono state determinate le costanti di dissociazione anche per i due eventi di legame che si riscontrano in presenza dell'oligonucleotide di 30 bp, mediante analisi densitometrica delle bande corrispondenti al DNA non legato e ai due complessi (C1 e C2) che si formano alle diverse concentrazioni di UL44 saggiate. In questo caso i valori di K_d apparente sono stati calcolati applicando il modello a due siti di Senear e Brenowitz (Senear & Brenowitz 1991), come descritto nel capitolo di Materiali e Metodi (paragrafo 3.17). Il primo evento di legame, che porta alla formazione del complesso C1, ha una K_d apparente di 2.1 ± 0.8 nM, mentre il secondo, che porta alla formazione del complesso C2, di 16.2 ± 2.1 nM. Nel caso della proteina UL44 espressa da baculovirus, le due costanti apparenti erano pari rispettivamente a 1.7 ± 0.9 nM e 20.3 ± 6.2 nM. Nel capitolo di Discussione e Conclusioni verranno espone possibili spiegazioni per le differenze di affinità osservate per i due eventi di legame.

4.2.c Analisi dell'effetto della variazione di concentrazione di sali mono- e divalenti sull'affinità di UL44 per il DNA

Analisi mediante ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) condotte dalla Prof.ssa Loregian (Loregian *et al.*, 2007) hanno evidenziato che il legame di UL44 al DNA è un processo endotermico, entalpicamente sfavorevole e guidato invece da un aumento di entropia. L'aumento di entropia in seguito alla formazione di questo legame è verosimilmente dovuto al rilascio in soluzione di ioni legati, caratteristica peculiare delle interazioni elettrostatiche. In maniera simile, studi sull'interazione di diverse proteine (quali oligolisine, RNAsi, il repressore *lac* e la RNA polimerasi di *E. coli*) con acidi nucleici hanno dimostrato che queste reazioni di associazione sono guidate dall'effetto entropico di rilascio di cationi legati da parte dell'acido nucleico (Lohman & Mascotti, 1992). In questi casi, l'analisi della dipendenza della costante di legame di equilibrio, K_{obs} , dagli ioni ha reso possibile ai ricercatori misurare il numero di ioni coinvolti nel legame e ha permesso di acquisire informazioni sui dettagli molecolari della reazione di legame. In particolare, mettendo in grafico il logaritmo della K_{obs} in funzione del logaritmo della concentrazione di catione ($\log[M^+]$) è possibile calcolare il numero di interazioni elettrostatiche coinvolte nel legame tra proteina e acido nucleico. Per verificare ulteriormente se effettivamente il legame di UL44 al DNA coinvolge interazioni elettrostatiche tra i residui basici di UL44 e lo scheletro di fosfati del DNA è

ionica sul legame di UL44 al DNA mediante dei
tattati nel paragrafo 4.2.a ma in presenza di diverse
(NaCH_3CO_2).

In Figura 4.9 sono riportati i grafici relativi alla variazione della frazione di DNA legato a UL44 in funzione della concentrazione di proteina, in presenza di diverse concentrazioni di NaCl. In Tabella 4.7 sono riportati i valori della costante di dissociazione apparente K_d che corrisponde, nelle condizioni utilizzate, alla concentrazione di proteina in cui si hanno metà dei siti di legame occupati.

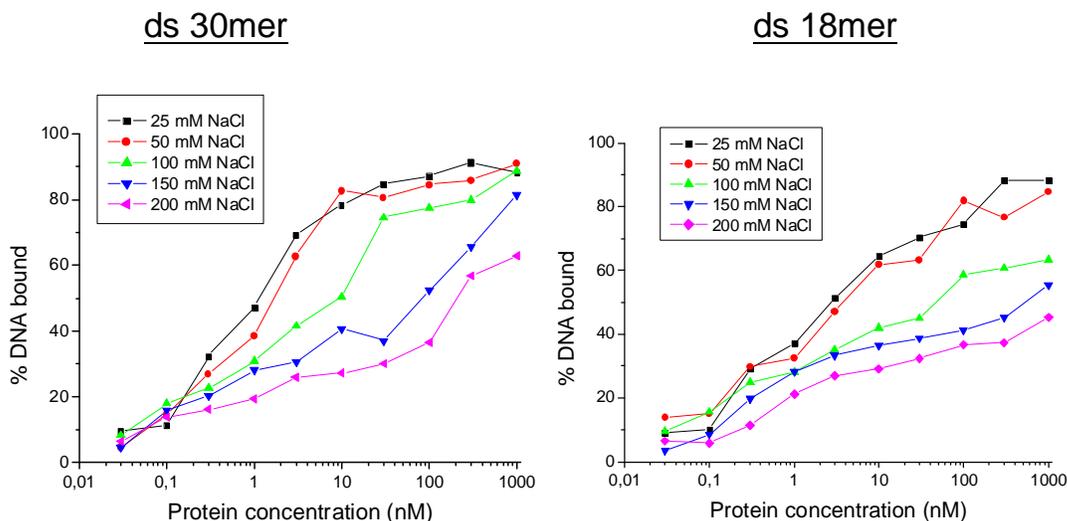


Figura 4.9: Effetto della concentrazione di sale sull'affinità di legame di UL44 per oligonucleotidi a doppio filamento. I saggi sono stati condotti come descritto nella Figura 4.6, ma i tamponi di legame utilizzati in questi esperimenti contengono le concentrazioni di NaCl indicate

Concentrazione NaCl (mM)	K_d apparente (nM)	
	30 mero	18 mero
25	1,1	2,9
50	1,5	3,5
100	11	48
150	83	520
200	190	> 1000

Tabella 4.7: Affinità di legame apparenti di UL44 C290 per oligonucleotidi a doppio filamento in presenza di diverse concentrazioni di NaCl. Le costanti di dissociazione apparente sono state calcolate come descritto nella legenda della Tabella 4.4.

I risultati indicano che il legame di UL44 al DNA è sensibile alla forza ionica in quanto si osserva un significativo aumento nei valori di K_d in presenza di concentrazioni crescenti di sale (Tabella 4.7). Questo suggerisce che probabilmente il legame di UL44 al DNA coinvolge interazioni elettrostatiche tra le cariche negative dello scheletro di fosfati del DNA e le cariche positive dei residui basici presenti nella faccia basica e nel *loop* disordinato di UL44.

riori saggi su filtro in presenza di diverse concentrazioni do come substrato di DNA un oligonucleotide di 18 bp; i grafico (analogo a quelli mostrati in Figura 4.9, dato non mostrato) e sono state calcolate le K_d apparenti come descritto nella legenda della Tabella 4.4. A questo punto sono state calcolate le costanti di legame osservate, K_{obs} , il cui valore corrisponde al reciproco delle rispettive K_d a ciascuna concentrazione di sale saggiata.

Per analizzare quindi l'effetto della variazione della concentrazione di sale sulla costante di legame di equilibrio, K_{obs} , del legame di UL44 al 18-mero, è stata utilizzata la teoria di legame sviluppata da Record *et al.* (Record *et al.*, 1978; Record *et al.*, 1976). Secondo questa teoria, quando un ligando con Z cariche positive (o una proteina con Z cariche positive nel suo sito di legame per il DNA) si lega ad un acido nucleico, viene neutralizzato un certo numero di gruppi fosfato, che corrispondente a Z. Di conseguenza, sono rilasciati in soluzione gli ioni con carica opposta (öcontroioniö) che erano associati con i gruppi fosfato Z. Secondo questa teoria, in presenza di un sale monovalente MX, la quantità di ioni con carica opposta rilasciati in una interazione proteina-acido nucleico (quindi il numero di interazioni elettrostatiche coinvolte) può essere calcolata misurando la derivata $d \log K_{obs} / d \log [M^+]$. In una soluzione del sale MX sufficientemente diluita, in cui gli effetti di idratazione possono essere trascurati e non ci sono complicazioni dovute al legame di anioni al ligando, la dipendenza della K_{obs} da $[M^+]$ è descritta dall'equazione 1 (Materiali e Metodi paragrafo 3.18).

Si è potuto così valutare la dipendenza della K_{obs} del legame UL44-DNA dalla concentrazione di elettroliti monovalenti in diversi tamponi, contenenti i cationi Na^+ o K^+ e gli anioni Cl^- o CH_3COO^- . In ciascuna condizione, il $\log K_{obs}$ risulta essere una funzione lineare del $\log[M^+]$, come predetto dall'equazione 1 (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.18). La Figura 4.10 mostra i risultati di esperimenti condotti in tampone Tris-HCl (1 mM, pH 7,5) usando NaCl e $NaCH_3CO_2$, rispettivamente, come sali monovalenti. Sono stati ottenuti dei valori di $\frac{d \log K_{obs}}{d \log [Na^+]}$ (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.18) pari a -3.53 ± 0.76 e -3.76 ± 0.55 rispettivamente: ciò implica che vengono rilasciati in soluzione circa 4 ± 1 ioni nell'interazione di ciascun monomero di UL44 con il DNA, nelle condizioni sperimentali utilizzate. Si può quindi stimare, dividendo il valore del termine $\frac{d \log K_{obs}}{d \log [Na^+]}$ con -0.88 , (che corrisponde al numero di ioni Na^+ termodinamicamente legati per fosfato nel DNA ds) che un massimo di 4 ± 1 gruppi fosfato del DNA sono coinvolti nelle interazioni ioniche con i gruppi carichi positivamente della proteina. Un altro set di dati è stato ottenuto utilizzando lo stesso tampone e come sale monovalente KCl. Le costanti di legame ottenute con questi esperimenti corrispondono a quelle ottenute in presenza di NaCl (dati non mostrati). Quindi si può concludere che gli effetti degli ioni Na^+ e K^+ sono simili e che il catione Tris del tampone ha un effetto minimo sull'interazione tra proteina e DNA in presenza delle concentrazioni di sale utilizzate negli esperimenti.

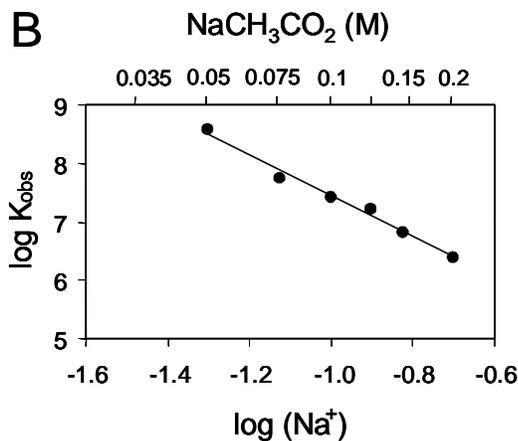
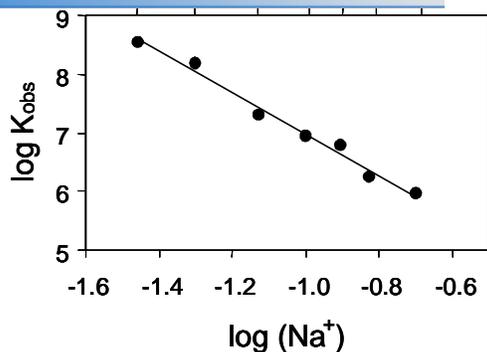


Figura 4.10: Dipendenza delle costanti di legame osservate (K_{obs}) dell'interazione tra UL44 e il DNA dalla concentrazione di sale monovalente. Gli esperimenti sono stati effettuati incubando concentrazioni crescenti di proteina UL44 C290 con 1 fmole di oligonucleotide di 18 bp marcato in presenza di diverse concentrazioni di sodio cloruro (A) o sodio acetato (B). Il DNA libero o legato alla proteina è stato quantificato mediante saggi su filtro, e per ciascuna concentrazione di sale è stato costruito un grafico come quelli mostrati in Figura 4.6, dove i valori di K_d corrispondono alla concentrazione di proteina in cui si hanno metà dei siti di legame occupati. La K_{obs} a ciascuna concentrazione di sale è stata calcolata come il reciproco del valore di K_d . È stato quindi messo in grafico il $\log K_{obs}$ in funzione del $\log [Na^+]$ nell'asse X inferiore. Le concentrazioni di sale utilizzate in questi esperimenti sono indicate nell'asse X superiore.

Se il contributo del rilascio di anioni sul totale degli ioni rilasciati durante il legame DNA-proteina è piccolo, allora Z , il numero di gruppi fosfato coinvolti nelle interazioni ioniche, corrisponde effettivamente a quello stimato dall'equazione 1 (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.18). Se il rilascio di anioni è invece cospicuo, allora Z è minore rispetto a quello stimato dall'equazione 1. Comparando le Figure 4.10 A e B si può notare che l'effetto del rilascio in soluzione di anioni sulla K_{obs} è piuttosto basso. Infatti le condizioni in cui sono stati effettuati gli esperimenti riportati in Figura 4.10 A e B sono identiche eccetto che in un caso è stato usato Cl^- come anione, nell'altro CH_3COO^- . I valori di K_{obs} erano circa solo tre volte maggiori per gli esperimenti in cui è stato utilizzato sodio acetato rispetto a quelli con sodio cloruro, alla stessa concentrazione di ioni Na^+ . Invece, per esempio, per l'interazione non specifica del repressore *lac* di *E. coli* con il DNA è stata osservata una differenza di 40 volte sostituendo l'anione Cl^- con CH_3COO^- (deHaseth, 1977). Quindi, il fatto che la pendenza delle curve nelle Figure 4.10 A e B differisca solo del 6% (che è ben all'interno dell'errore standard) suggerisce che il rilascio di anioni, dovuto al legame DNA-UL44, se avviene, non differisce di molto quantitativamente nelle due condizioni analizzate.

Per cercare di stabilire con maggior chiarezza se il legame di anioni influisce o meno sulla determinazione del valore Z , si possono effettuare degli esperimenti di legame al DNA in presenza di un sale divalente (MgX_2). In queste condizioni, le concentrazioni di X^- utilizzate sono più basse (vedi Figura 4.11) e quindi in questo modo l'importanza del legame degli anioni risulta essere minore. L'effetto degli ioni divalenti Mg^{2+} sulla K_{obs} è qualitativamente simile a quello degli ioni monovalenti ma viene applicata l'equazione 2 (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.18) in cui il parametro Z (che corrisponde al numero di ioni Na^+ termodinamicamente legati per fosfato nel DNA ds) dell'equazione 1 viene sostituito con Z' (che rappresenta il numero di ioni divalenti di carica opposta associati termodinamicamente per gruppo fosfato).

l'interazione UL44-DNA dal $\log [Mg^{2+}]$ è mostrato in on $\log [Mg^{2+}]$ in maniera lineare, nei limiti dell'errore all'equazione 2 in assenza di cationi monovalenti. Ciò dimostra che l'effetto di legame degli anioni non è grande. Dalle pendenze delle curve dei minimi quadrati in Figura 4.11 (-1.93 ± 0.42) si può concludere che 2 ± 1 ioni divalenti vengono rilasciati in seguito alla formazione del complesso UL44-DNA in presenza di $MgCl_2$, che concorda con il numero di 4 ± 1 ioni monovalenti rilasciati in presenza di NaCl. Questi risultati sono in accordo anche con l'osservazione che non si ha un significativo legame di anioni. Infatti, secondo la teoria di deHaseth (deHaseth *et al.* 1977), se sono escluse interazioni preferenziali con anioni, si ottiene la relazione tra i due termini delle equazioni 1 e 2, che risulta nell'equazione 3 (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.18).

In questo caso il rapporto dei termini dovrebbe essere 0,53 (vedi equazione 3 Materiali e Metodi, paragrafo 3.18); il valore sperimentale si avvicina molto ed è di circa 0,5. Comunque, non si può escludere che sia presente un piccolo numero di siti di legame per anioni con alta o bassa affinità. Ad ora, l'interpretazione più semplice dei dati ottenuti è che il rilascio di anioni non è un fattore rilevante nella termodinamica della reazione tra UL44 e DNA.

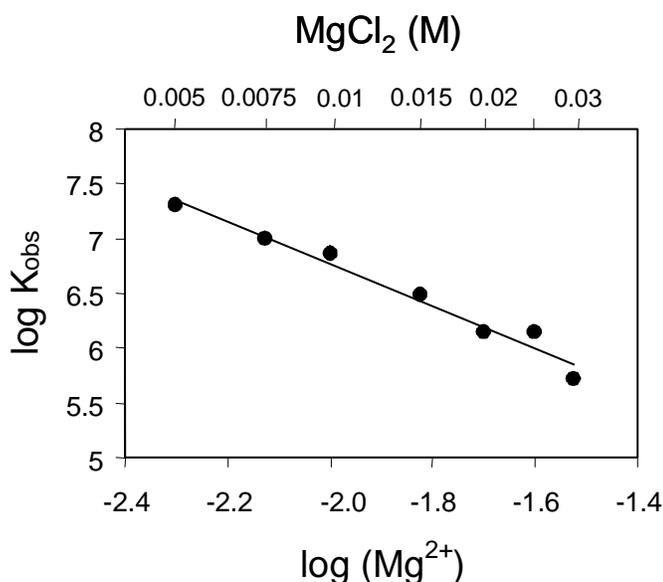


Figura 4.11: Dipendenza della costante di legame osservata (K_{obs}) dell'interazione UL44-DNA dalla concentrazione di $MgCl_2$. Gli esperimenti sono stati effettuati come descritto in Figura 4.10 ma in presenza di diverse concentrazioni di $MgCl_2$. Il $\log K_{obs}$ è stato messo in grafico in funzione del $\log [Mg^{2+}]$ (asse X inferiore). Le concentrazioni di sale divalente utilizzate sono riportate nell'asse X superiore.

zione preliminare di *partners* proteici cellulari di UL44

Come accennato nell'introduzione, il sistema del doppio ibrido è una delle tecniche maggiormente utilizzate per lo studio delle interazioni proteina-proteina e soprattutto per identificare interattori non noti di una proteina di interesse. Come già detto, esistono diverse versioni di sistema dei due ibridi.

Il sistema di doppio ibrido utilizzato in questo studio (Figura 4.12), sfrutta l'utilizzo del ceppo di lievito *S. cerevisiae* L40 che presenta integrati, in due diversi loci del genoma, i geni *reporter lacZ* di *E. coli* e *HIS3*. *LacZ* codifica per la β -galattosidasi, enzima in grado di scindere il substrato X-gal dando un prodotto cromogeno blu. *HIS3* codifica per l'imidazolo glicerol-fosfato deidratasi, un enzima coinvolto nella biosintesi dell'istidina. Il ceppo di lievito *S. cerevisiae* L40 è auxotrofo per l'istidina, ma il gene *HIS3* può avere una espressione residua, dovuta al mantenimento di parte del promotore nativo, sufficiente a permettere la crescita del lievito in assenza di istidina. In tal caso può essere necessario inibire questa espressione residua con 3-amminotriazolo (3-AT), sostanza in grado di inibire il prodotto del gene *HIS3*. A monte dei geni *reporter* sono inserite sequenze operatore di *LexA* (*lexO*). I geni *reporter* vengono trascritti in presenza di un fattore di trascrizione che presenti un dominio di legame al DNA (*binding domain*, BD), che nel sistema utilizzato è appunto la proteina *LexA* di *E. coli*, e di un dominio di attivazione (*activation domain*, AD), che è una porzione della proteina *Gal4* di *S. cerevisiae*.

L'AD e il BD sono codificati da plasmidi differenti che contengono geni di selezione per auxotrofia. Il ceppo di lievito *S. cerevisiae* L40 è stato mutagenizzato nei geni *TRP1* (codificante la β -isopropilmalato deidrogenasi) e *LEU2* (codificante la N-5'-fosforibosil antranilato isomerasi), che codificano rispettivamente enzimi coinvolti nella biosintesi di triptofano e leucina. Questo ceppo, auxotrofo quindi per la leu e il trp, permette il mantenimento di plasmidi aventi il gene *LEU2* e/o plasmidi aventi il gene *TRP1*.

Per la ricerca di interattori proteici cellulari di UL44 è stato utilizzato questo sistema di doppio ibrido, e non il sistema utilizzato per gli esperimenti con i mutanti di UL44 che non dimerizzano (il quale prevedeva l'utilizzo del ceppo di lievito *S. cerevisiae* Y190 e *Gal4AD* e *Gal4BD*), in quanto tale sistema è ritenuto spesso più sensibile e, verosimilmente, potrà portare all'identificazione anche di interattori deboli di UL44.

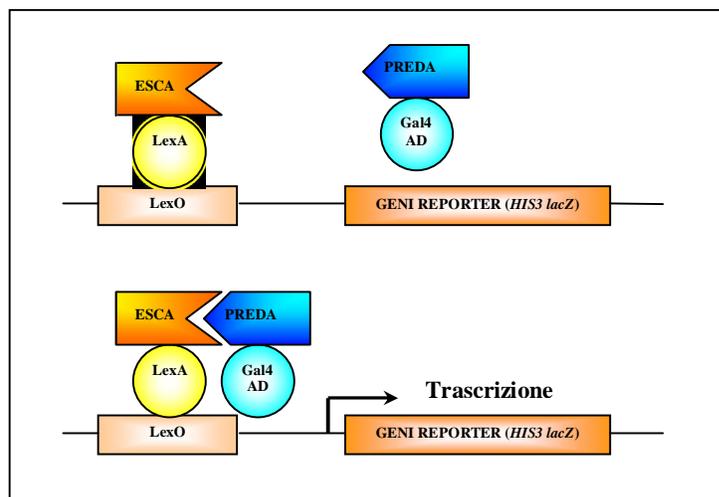


Figura 4.12: Versione del sistema di doppio ibrido utilizzato per la ricerca di interattori proteici cellulari di UL44..

side pBTMK

Prima di creare il plasmide finale codificante la proteina *õescaõ* (ossia la proteina di fusione LexA-UL44) a partire dal plasmide pBTM116 (codificante LexA, vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.3.a), si è voluto innanzitutto sostituire in questo plasmide il gene per la resistenza all'ampicillina con un gene che codifica la resistenza alla kanamicina. Il fine di questa sostituzione era quello di poter selezionare, una volta effettuato lo *screening* con il sistema dei due ibridi, tale plasmide in seguito alla trasformazione di batteri con i plasmidi estratti dai cloni di lievito positivi identificati durante lo *screening*. I cloni positivi infatti, oltre al plasmide codificante *lõesca* (che ha il gene di resistenza alla kanamicina) contengono uno o più dei plasmidi della libreria utilizzata per lo *screening* (che ha il gene di resistenza all'ampicillina). Quindi, dopo trasformazione dei batteri, la selezione in piastre con ampicillina permette l'isolamento del solo plasmide della libreria.

Per creare quindi il plasmide pBTMK (vedi Figura 4.13) è stato amplificato con PCR il gene per la resistenza alla kanamicina dal plasmide pCR-Blunt II-TOPO utilizzando i *primers* pCR-Kan/for e pCR-Kan/rev contenenti rispettivamente i siti di restrizione per AatII e BglI. Il prodotto di PCR è stato quindi digerito con i due enzimi e clonato in siti AatII e BglI di pBTM116. L'avvenuto clonaggio è stato verificato mediante sequenziamento utilizzando i *primers* Kan-seq1 e Kan-seq2.

È stato ottenuto il plasmide pBTMK (5776 bp), successivamente utilizzato per la costruzione del plasmide pBTMK-UL44, codificante *lõesca* LexA-UL44.

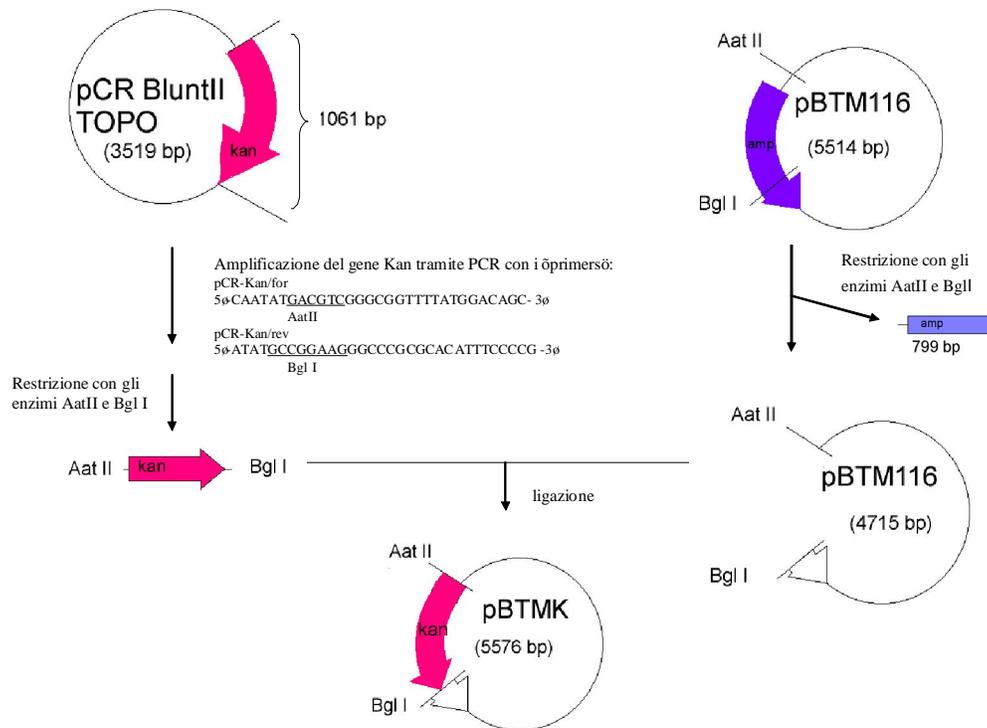


Figura 4.13: Costruzione del plasmide pBTMK, in cui il gene per la resistenza all'ampicillina viene sostituito con quello per la resistenza alla kanamicina.

BTMK-UL44 codificante la proteina öescaö

In seguito, è stata clonata nel plasmide pBTMK la sequenza di DNA codificante la subunità accessoria della polimerasi di HCMV, UL44, al fine di creare la proteina di fusione LexA-UL44 da utilizzare come esca negli *screening* con il sistema di doppio ibrido. Per la costruzione del plasmide pBTMK-UL44 è stato amplificato con PCR il gene per la proteina UL44 dal plasmide pRSET-UL44 utilizzando i *primers* UL44FL/FOR1 e UL44FL/REV1 contenenti rispettivamente i siti di restrizione per BamHI e PstI. Il prodotto di PCR tagliato con i suddetti enzimi è stato quindi inserito nei siti BamHI e PstI del plasmide. L'avvenuto clonaggio è stato verificato attraverso PCR di sequenza utilizzando il *primer* pBTMLexAseq.

È stato così ottenuto il plasmide pBTMK-UL44, che è stato utilizzato, dopo caratterizzazione, per lo *screening* con il sistema del doppio ibrido.

4.3.c Caratterizzazione della proteina di fusione LexA-UL44

Prima di poter utilizzare il plasmide pBTMK-UL44 come esca nello *screening* con il saggio di doppio ibrido, è stato necessario innanzitutto verificare che in lievito tale plasmide non desse dei falsi positivi dovuti ad una trascrizione dei geni *reporter* mediata da un'intrinseca funzione transattivante di LexA-UL44 oppure dal legame di LexA-UL44 all'AD di GAL4.

Inoltre, al fine di verificare che la proteina di fusione LexA-UL44 venisse espressa in lievito con un *folding* corretto ed importata nel nucleo cellulare, è stata verificata la sua capacità di interagire con interattori proteici noti, ossia la stessa UL44 (in quanto è noto che UL44 forma omodimeri) e UL54 (la subunità catalitica della DNA polimerasi di HCMV). A tale scopo sono stati utilizzati i plasmidi pACT2-UL44 e pACT2-UL54 (per la costruzione vedi paragrafi 4.1.b e 4.1.c), che codificano rispettivamente per le proteine di fusione Gal4AD-UL44 (costituita dalla fusione di UL44 al dominio di attivazione AD della proteina Gal4 di *S. cerevisiae*, da ora denominato GAD) e GAD-UL54. Questi esperimenti preliminari permettono di verificare che per interattori noti dell'esca il sistema funzioni, anche se questo non dà la garanzia che non vi possano essere dei falsi negativi durante lo *screening*.

Per verificare il primo punto, ossia che l'esca LexA-UL44 non promuovesse da sola la trascrizione dei geni *reporter*, cellule del ceppo di lievito *S. cerevisiae* L40 sono state trasformate con i plasmidi pBTMK, pBTMK-UL44 e pACT2. Questo ceppo è stato fatto crescere in terreno completo YEPD e le trasformazioni sono state fatte con il metodo di trasformazione ad alta efficienza (vedi Materiali e Metodi paragrafo 3.5 b) e fatte crescere in terreno selettivo (senza trp per selezionare il plasmide pBTMK, senza leu per selezionare il plasmide pACT2) in modo da selezionare i trasformanti.

Le cellule trasformate sono state incubate 2 giorni a 30°C per consentirne la crescita e sono state poi saggiate per l'attività α -galattosidasi (vedi Tabella 4.8). Solo nei trasformanti in cui vi è interazione tra la proteina fusa all'AD e quella fusa al BD può esservi la trascrizione del gene *reporter lacZ*, che codifica per la β -galattosidasi, enzima in grado di scindere il substrato X-gal dando un prodotto cromogeno blu. Come si vede nella Tabella 4.8, nei lieviti derivanti dalle trasformazioni n° 1 e 2 non vi è attività α -galattosidasi; si può quindi concludere che sia LexA che LexA-UL44 non sono in grado da sole di promuovere la trascrizione del gene *lacZ*. Anche nei lieviti derivanti

vi è attività β -galattosidasiaca; si può quindi concludere di interagire con LexA-UL44.

precedentemente trasformati con pBTMK-UL44 sono stati a loro volta trasformati con i plasmidi pACT2-UL54 o pACT2-UL44. Come si può notare in Tabella 4.8, i lieviti derivanti dalla trasformazione 4 possiedono attività β -galattosidasiaca come atteso. Tale dato riconferma inoltre la capacità della proteina UL44 intera di dimerizzare (vedi Risultati paragrafo 4.1.a). Inoltre, come atteso, anche i lieviti derivanti dalla trasformazione 5 mostrano attività β -galattosidasiaca, poiché UL44 è in grado di interagire con UL54.

Come controllo, i lieviti precedentemente trasformati con pBTMK sono stati a loro volta trasformati con i plasmidi pACT2-UL54 o pACT2-UL44; come si può vedere in Tabella 4.8, le colonie derivanti dalle trasformazioni 6 e 7 non si colorano di blu (ossia non possiedono attività β -galattosidasiaca), da cui si deduce che la sola proteina LexA non interagisce con GAD-UL44 o con GAD-UL54.

In conclusione, dai risultati ottenuti è possibile affermare che la proteina di fusione LexA-UL44 non è in grado di attivare, da sola o in presenza del solo GAD, la trascrizione del gene *reporter lacZ*. Inoltre LexA-UL44 è in grado di interagire con GAD-UL44 e con GAD-UL54, suggerendo che la proteina di fusione LexA-UL44 venga espressa ed abbia un *folding* corretto. Considerati questi risultati preliminari positivi, si è deciso di proseguire e di utilizzare il plasmide pBTMK-UL44 nello *screening* con il sistema dei due ibridi.

N° trasformazione	Plasmide		Attività - β -galattosidasiaca	Immagine del saggio X-gal su filtro
	Plasmide β -escaö	Plasmide β -predaö		
1	pBTMK	-	-	
2	pBTMK-UL44	-	-	
3	pBTMK-UL44	pACT2	-	
4	pBTMK-UL44	pACT2-UL44	+	
5	pBTMK-UL44	pACT2-UL54	+	
6	pBTMK	pACT2-UL44	-	
7	pBTMK	pACT2-UL54	-	

Tabella 4.8: Attività β -galattosidasiaca su filtro dei controlli positivi e negativi di interazione proteina-proteina. Nella seconda e terza colonna sono descritti i plasmidi con cui è stato trasformato il ceppo di lievito *S. cerevisiae* L40 nelle 7 diverse trasformazioni. Nella quarta colonna (attività β -galattosidasiaca) si è indicato con il segno + la presenza di attività e con il segno - la assenza di attività. Infine, nella quinta e ultima colonna, vi è un'immagine rappresentativa del saggio X-gal su filtro effettuato per saggiare l'attività β -galattosidasiaca dei lieviti trasformati.

li UL44 con una libreria cellulare

Descrizione dello screening

Alcune delle colonie di lievito *S. cerevisiae* L40 precedentemente trasformato con il plasmide pBTMK-UL44 sono state trasformate (circa 6×10^9 cellule) con il metodo di trasformazione su larga scala (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.5.c) con 20 μ g di una libreria di cDNA cellulare. La libreria di plasmidi è costituita da frammenti di cDNA, proveniente da cellule B umane, inseriti nel plasmide pACTII in modo da creare una fusione con GAD. I frammenti di questa libreria (fornita dal Prof. Elledge J., Baylor College of Medicine, Houston, Texas) presentano una lunghezza di 500-1500 bp (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.3.e).

Al fine di calcolare l'efficienza di trasformazione sono state fatte delle diluizioni 1:100, 1:1000 e 1:10000 con 10 μ l di lieviti trasformati e sono stati piastrati in terreno selettivo senza trp e leu. Si è così potuto calcolare il numero di trasformanti totali, che era di $5,7 \times 10^6$.

I restanti lieviti trasformati (circa 10 ml) sono stati piastrati su 7 piastre di terreno selettivo privo di his, trp e leu (1400 μ l per piastra): è stato deciso di piastrare tale quantità di lieviti sulla base di risultati ottenuti da precedenti trasformazioni su larga scala effettuate nel nostro laboratorio. Al terreno selettivo non vengono aggiunti trp e leu in modo da selezionare solo i lieviti co-trasformati con entrambi i plasmidi, che contengono i geni *LEU2* e *TRP1* e consentono al lievito di vivere in assenza di tali amminoacidi. Inoltre, non aggiungendo l'his nel terreno di coltura, solo nei lieviti in cui avviene l'interazione tra la proteina fusa all'AD e quella fusa a LexA dovrebbe esservi l'espressione del gene *HIS3* e quindi la sopravvivenza, operando già così una prima selezione sui lieviti trasformati. Come già accennato prima, *HIS3* codifica l'imidazolo glicerol-fosfato deidratasi, un enzima coinvolto nella biosintesi dell'his; in realtà però può esservi una debole espressione residua di tale gene anche in assenza di interazione tra le due proteine di fusione, tale da consentire la sopravvivenza cellulare senza his esogena. In totale, sulle 7 piastre di terreno selettivo sono cresciute 497 colonie. Da notare che nei lieviti trasformati può esservi l'acquisizione contemporanea di più di un plasmide della libreria.

Caratterizzazione dei lieviti trasformati

Le 497 colonie ottenute dalla trasformazione su larga scala e fatte crescere in assenza di his sono state saggiate per l'attivazione della trascrizione dei geni *reporter lacZ* e *HIS3*, rispettivamente tramite saggi X-gal e saggi con 3-amminotriazolo (3-AT).

a). Saggi X-gal

È stato fatto un calco delle 7 piastre ottenute dalla trasformazione su larga scala, ossia è stato appoggiato un foglio di carta assorbente sterile su ogni piastra in modo da trasferire parte delle colonie e su questo è stata saggiata l'attività β -galattosidasi. Solo nei trasformanti in cui vi è interazione tra la proteina UL44 fusa al BD e la proteina o il frammento proteico codificato dal cDNA della libreria fusa all'AD può esservi la trascrizione del gene *reporter lacZ*. Con questo saggio sono state identificate 167 colonie, tra le 497 cresciute, in cui vi era attività β -galattosidasi (vedi Tabella 4.9). Queste colonie sono state numerate da 1 a 167 (vedi Figura 4.14) e denominate YUL44-1, í ..YUL44-167.

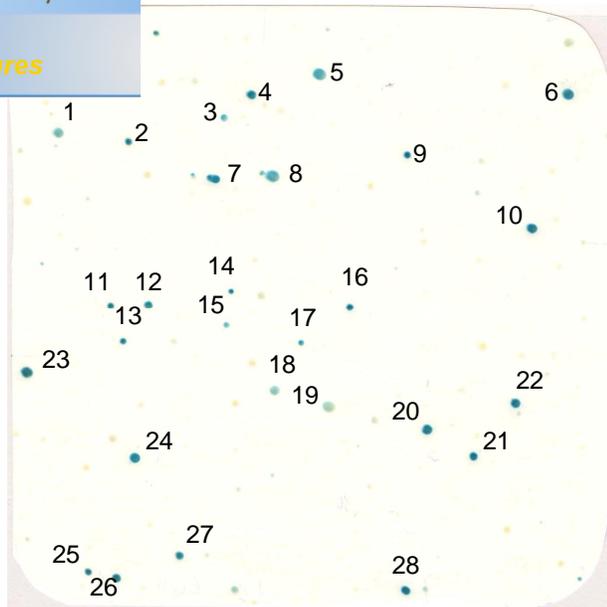


Figura 4.14: Attività β -galattosidasi delle colonie ottenute dalla trasformazione del ceppo di lievito *S. cerevisiae* L40 con pBTMK-UL44 e con la libreria di plasmidi contenenti cDNA cellulare. In figura è mostrato il calco su filtro di carta proveniente da una delle 7 piastre di terreno selettivo senza his, leu e trp, dove sono cresciuti i lieviti trasformati e su cui è stata saggiata l'attività β -galattosidasi.

b). Saggi con 3-AT

È stata inoltre saggiata l'attivazione del gene *reporter HIS3*. Poiché però, come già accennato prima, spesso il gene *HIS3* può avere una espressione residua sufficiente a permettere la crescita del lievito anche in assenza dell'amminoacido his, è stato aggiunto al terreno di coltura il 3-amminotriazolo, sostanza in grado di inibire il prodotto del gene *HIS3*.

Le 167 colonie sono state fatte crescere in piastre da 96 pozzetti contenenti terreno selettivo senza leu e trp e poi piastrate su piastre di terreno solido selettivo senza leu, trp e his a cui era stato aggiunto 3-AT 0,5 mM o 1 mM. È stato deciso di utilizzare il 3-AT a tali concentrazioni dopo aver fatto delle prove in piccola scala e constatato che tali concentrazioni erano adeguate per ottenere l'inibizione dell'espressione residua del gene *HIS3*. Le piastre sono state osservate dopo il piastramento dei lieviti dal 3° fino a 12° giorno (vedi Tabella 4.9). Come controllo positivo per verificare l'avvenuta crescita dei lieviti, le 167 colonie sono state piastrate anche in terreno selettivo senza leu e trp (che permette la crescita di lieviti trasformati con plasmidi contenenti i geni *LEU2* e *TRP1*): in tale terreno tutte le 167 colonie di lievito sono cresciute (dato non mostrato).

Clone	Attività β -galattosidasi	Saggio con 3-AT	
		3-AT 0,5 mM	3-AT 1 mM
YUL44-1	+	+	+/-
YUL44-2	+	+	+/-
YUL44-3	+	+	+/-
YUL44-4	+	+/-	+/-
YUL44-5	+	+	+/-
YUL44-6	+	+	+/-
YUL44-7	+	+/-	-

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

		+	+/-	-
		+	+/-	-
		+	+	-
	YUL44-11	+	-	-
	YUL44-12	+	+	+/-
	YUL44-13	+	++	++
	YUL44-14	+	+	+/-
	YUL44-15	+	+	+/-
	YUL44-16	+	+	+/-
	YUL44-17	+	-	-
	YUL44-18	+	+	+/-
	YUL44-19	+	-	-
	YUL44-20	+	+	+/-
	YUL44-21	+	+	+/-
	YUL44-22	+	+	+/-
	YUL44-23	+	+	+/-
	YUL44-24	+	+	+
	YUL44-25	+	+	+/-
	YUL44-26	+	+	+/-
	YUL44-27	+	++	+
	YUL44-28	+	+/-	+/-
	YUL44-29	+	+/-	+/-
	YUL44-30	+	+	+
	YUL44-31	+	++	+
	YUL44-32	+	-	-
	YUL44-33	+	+	+
	YUL44-34	+	++	+/-
	YUL44-35	+	+	+/-
	YUL44-36	+	+	+/-
	YUL44-37	+	++	+
	YUL44-38	+	+	+/-
	YUL44-39	+	+	+/-
	YUL44-40	+	+	+/-
	YUL44-41	+	+	+
	YUL44-42	+	+	+/-
	YUL44-43	+	-	-
	YUL44-44	+	-	-
	YUL44-45	+	+	+/-
	YUL44-46	+	+	+/-
	YUL44-47	+	+/-	-
	YUL44-48	+	-	-
	YUL44-49	+	+	+/-
	YUL44-50	+	+	+/-
	YUL44-51	+	+	+
	YUL44-52	+	+	+/-
	YUL44-53	+	++	+
	YUL44-54	+	+	+/-
	YUL44-55	+	+	+/-
	YUL44-56	+	+	+/-
	YUL44-57	+	+	+/-
	YUL44-58	+	++	+
	YUL44-59	+	+	+
	YUL44-60	+	++	+

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

	+	+	+/-
	+	+	+/-
	+	+	+/-
YUL44-64	+	+	+/-
YUL44-65	+	+	+/-
YUL44-66	+	+	+/-
YUL44-67	+	+/-	-
YUL44-68	+	+/-	-
YUL44-69	+	+/-	-
YUL44-70	+	++	+
YUL44-71	+	+/-	-
YUL44-72	+	-	-
YUL44-73	+	-	-
YUL44-74	+	++	+
YUL44-75	+	+	+/-
YUL44-76	+	+	+/-
YUL44-77	+	+	+/-
YUL44-78	+	-	-
YUL44-79	+	-	-
YUL44-80	+	+/-	-
YUL44-81	+	++	+
YUL44-82	+	-	-
YUL44-83	+	-	-
YUL44-84	+	+	+/-
YUL44-85	+	-	-
YUL44-86	+	-	-
YUL44-87	+	+/-	-
YUL44-88	+	+	+/-
YUL44-89	+	-	-
YUL44-90	+	-	-
YUL44-91	+	+	+/-
YUL44-92	+	+	+/-
YUL44-93	+	-	-
YUL44-94	+	++	+
YUL44-95	+	-	-
YUL44-96	+	+/-	-
YUL44-97	+	+	+/-
YUL44-98	+	+	+/-
YUL44-99	+	-	-
YUL44-100	+	++	+
YUL44-101	+	+/-	-
YUL44-102	+	-	-
YUL44-103	+	+	+
YUL44-104	+	-	-
YUL44-105	+	+	+/-
YUL44-106	+	-	-
YUL44-107	+	+/-	-
YUL44-108	+	+++	++
YUL44-109	+	-	-
YUL44-110	+	+/-	-
YUL44-111	+	+/-	-
YUL44-112	+	-	-
YUL44-113	+	++	+

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

		+	-	-
		+	+	+/-
		+	+/-	-
	YUL44-117	+	-	-
	YUL44-118	+	+/-	-
	YUL44-119	+	-	-
	YUL44-120	+	+	+/-
	YUL44-121	+	+	+/-
	YUL44-122	+	-	-
	YUL44-123	+	+/-	-
	YUL44-124	+	++	+/-
	YUL44-125	+	+	+/-
	YUL44-126	+	+	+/-
	YUL44-127	+	-	-
	YUL44-128	+	-	-
	YUL44-129	+	+/-	-
	YUL44-130	+	+/-	-
	YUL44-131	+	++	+
	YUL44-132	+	+/-	-
	YUL44-133	+	-	-
	YUL44-134	+	-	-
	YUL44-135	+	-	-
	YUL44-136	+	+/-	-
	YUL44-137	+	+/-	++
	YUL44-138	+	+	+/-
	YUL44-139	+	+	+/-
	YUL44-140	+	-	-
	YUL44-141	+	+/-	-
	YUL44-142	+	+/-	-
	YUL44-143	+	-	-
	YUL44-144	+	-	-
	YUL44-145	+	++	+
	YUL44-146	+	-	-
	YUL44-147	+	++	++
	YUL44-148	+	++	+
	YUL44-149	+	-	-
	YUL44-150	+	-	-
	YUL44-151	+	+	+/-
	YUL44-152	+	+	+
	YUL44-153	+	+	+/-
	YUL44-154	+	-	-
	YUL44-155	+	-	-
	YUL44-156	+	+	+/-
	YUL44-157	+	+/-	-
	YUL44-158	+	+/-	-
	YUL44-159	+	++	+
	YUL44-160	+	-	-
	YUL44-161	+	+	+/-
	YUL44-162	+	++	+/-
	YUL44-163	+	-	-
	YUL44-164	+	+/-	-
	YUL44-165	+	-	-
	YUL44-166	+	+	+/-

+	-	-
---	---	---

e saggio con 3-AT sulle colonie ottenute dalla trasformazione del ceppo di lievito *S. cerevisiae* L40 con pBTMK-UL44 e con la libreria di plasmidi contenenti il cDNA cellulare. In tabella sono elencati i 167 trasformanti di lievito che possiedono attività β -galattosidasi ed è mostrato il risultato della crescita di questi in presenza di 3-AT 0,5 mM e 1 mM. Con il segno ++ si intende una crescita cospicua delle colonie, con + una buona crescita, con +/- una crescita moderata e con 0 un'assenza di crescita. In grassetto sono evidenziati i cloni considerati positivi per la crescita in presenza di 3-AT.

Sono stati considerati come positivi i lieviti in grado di crescere in presenza di 3-AT 1 mM. Come si può vedere nella Tabella 4.9, i trasformanti che presentavano una significativa crescita in presenza di 3-AT 1 mM erano 93. Questi potrebbero contenere dei cDNA della libreria che codificano per proteine o frammenti di proteine in grado di interagire con UL44 e quindi tali cloni sono stati ulteriormente analizzati.

4.3.e Analisi dei cloni positivi ai due geni reporter

Trasformazione di *E. coli* con il DNA plasmidico estratto dai cloni di lievito risultati positivi sia al saggio X-gal che al saggio con 3-AT e analisi di tale DNA plasmidico

a). Recupero dei plasmidi da lievito

Innanzitutto le 93 colonie di lievito trasformate, cresciute in presenza di 3-AT e con attività β -galattosidasi, sono state inoculate in terreno liquido selettivo privo di trp e leu e si è proceduto con l'estrazione del DNA come descritto in Materiali e Metodi. In tale fase vengono isolati sia il plasmide pBTMK-UL44 che i plasmidi della libreria, contenuti nei cloni positivi.

b). Trasformazione di *E. coli* e selezione con ampicillina

Cellule di *E. coli* DH5 sono state trasformate mediante elettroporazione, come descritto in Materiali e Metodi, con 10 μ l di ciascuno dei 93 DNA plasmidici precedentemente estratti dai lieviti. Al fine di selezionare i batteri trasformati con il plasmide pACTII, in cui è presente il cDNA della libreria e che presenta il gene per la resistenza all'ampicillina, i batteri trasformati sono stati piastrati su piastre di terreno contenente ampicillina. Su tali piastre, i batteri trasformati con il plasmide dell'escsa (pBTMK-UL44), che presenta invece il gene per la resistenza alla kanamicina, non crescono. Ogni colonia sarà formata da una popolazione batterica contenente un solo tipo di plasmide, poiché una cellula batterica elettroporata è in grado di incorporare un solo DNA esogeno.

c). Estrazione del DNA plasmidico da *E. coli* e analisi di restrizione

Da ogni piastra di trasformazione batterica sono state analizzate separatamente 2 colonie di *E. coli* (A e B): questo perché il DNA estratto dai lieviti poteva contenere più di un plasmide. Sul DNA estratto è stata fatta una analisi di restrizione con l'enzima BglII, in grado di scindere il plasmide in due frammenti: uno di circa 7600 bp, che

altro che consiste nel frammento di cDNA della Figura 4.15). Nel caso di plasmidi in cui non fosse stata fatta l'analisi del DNA (vettore vuoto) è stata fatta l'analisi del DNA

plasmidico di ulteriori due colonie (C e D).

In totale è stata fatta l'analisi di restrizione di 208 plasmidi. Di questi, 24 sono risultati essere vettori pACTII vuoti (ossia senza frammento della libreria di cDNA), mentre i restanti 184 contenevano un inserto. In alcuni casi è stata rilevata la presenza di un unico plasmide nel clone di lievito positivo identificato nello *screening* (e quindi in questo caso i plasmidi delle colonie batteriche A e B contenevano lo stesso inserto); in altri casi si è riscontrata la presenza nei cloni di lievito positivi di più plasmidi (e quindi in questo caso i plasmidi delle colonie A e B, ed eventualmente C e D, contenevano inserti diversi). In conclusione sono stati trovati 121 plasmidi con frammenti di cDNA diversi (vedi Tabella 4.10).

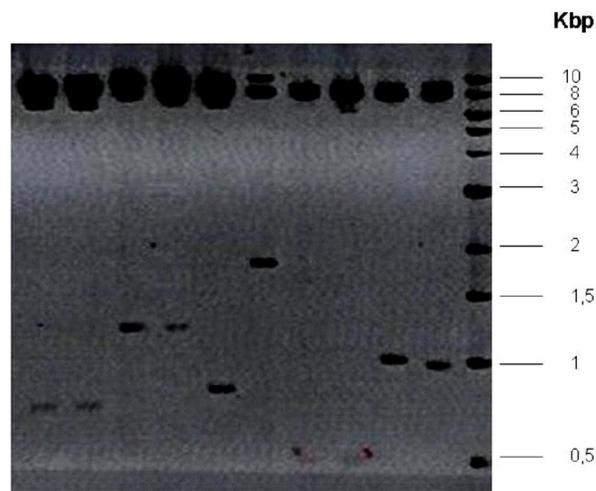


Figura 4.15: Analisi in gel di agarosio 1% di DNA plasmidici estratti da *E. coli*. In figura è mostrata l'immagine di un gel di agarosio in cui sono stati analizzati alcuni dei plasmidi batterici estratti da *E. coli* e tagliati con l'enzima BglII. All'estrema destra sono indicate le Kbp dei frammenti del marcatore Kilobase. I frammenti che si trovano all'altezza di circa 8 Kbp rappresentano il vettore pACTII, mentre i frammenti più piccoli indicano il cDNA della libreria.

Ritrasformazione di lieviti con il DNA plasmidico precedentemente caratterizzato e analisi della loro attività β -galattosidasi e della capacità di crescita in presenza di 3-AT

a). Ritrasformazione dei lieviti e saggio X-gal

Al fine di riverificare che i plasmidi isolati codificassero per una proteina od un frammento di proteina in grado di interagire con la proteina esca, il ceppo di lievito *S. cerevisiae* L40 precedentemente trasformato con pBTMK-UL44 è stato trasformato con i 121 plasmidi sopra identificati. Le colonie dei lieviti trasformati sono state quindi saggiate per la loro attività β -galattosidasi.

Contemporaneamente, per poter escludere che l'espressione del gene *reporter* fosse dovuta all'interazione tra le proteine fuse all'AD con la sola LexA, il ceppo *S. cerevisiae* L40 è stato trasformato con pBTMK (che esprime la sola LexA) e con ciascuno dei 121 DNA plasmidici estratti da *E. coli* mediante il metodo rapido di trasformazione (Vedi Materiali e Metodi paragrafo 3.5.a) Le colonie dei lieviti trasformati sono state quindi anch'esse saggiate per la loro attività β -galattosidasi.

la **4.10** sono riportati i risultati dei saggi X-gal, dove con la colorazione blu (indicante attività β -galattosidasi) nella colorazione in un tempo compreso tra 1 h e 2 h, con +/- la comparsa della colorazione dopo 2 h e con β assenza di colorazione. La precocità della colorazione può essere indice di interazione più forte, anche se questo tipo di saggio ha più un valore qualitativo che quantitativo.

In ognuno dei filtri in cui è stata saggiata l'attività β -galattosidasi dei lieviti trasformati, è stata contemporaneamente saggiata anche l'attività di due trasformazioni di controllo (dato non mostrato):

- L40 trasformato con pBTMK-UL44 e pACT2-UL54, come controllo positivo: come già spiegato precedentemente, poiché le proteine UL44 e UL54 interagiscono, nei lieviti trasformati con questi plasmidi vi è l'espressione del gene *reporter lacZ*. La mancata colorazione delle colonie derivate da tale trasformazione può indicare che vi sono stati problemi nell'esecuzione del saggio (ad esempio incompleta lisi dei lieviti, degradazione del substrato cromogeno, ecc.). In tal caso è necessario ripetere il saggio.
- L40 trasformato con pBTMK-UL44 e pACT2, come controllo negativo: come già spiegato precedentemente, nei lieviti trasformati con questi plasmidi non vi è l'espressione del gene *reporter lacZ*, poiché LexA-UL44 non interagisce con il solo GAD (vedi Risultati paragrafo **4.3.c**).

Plasmide estratto da <i>E. coli</i>	n°clone	Lunghezza inserto (kbp)	Saggio X-gal su lieviti trasformati con pBTMK-UL44	Saggio X-gal su lieviti trasformati con pBTMK	Saggio con 3-AT 2 mM su lieviti trasformati con pBTMK-UL44	Saggio con 3-AT 2 mM su lieviti trasformati con pBTMK
YUL44-1	A	1,35	-	-		
YUL44-1	B	1,4	-	-		
YUL44-2	A,B	0,8	+	-	+	-
YUL44-3	A	0,75	-	-		
YUL44-3	B	0,7	-	-		
YUL44-4	A,B	1,1	++	+	+	-
YUL44-5	A,B	1,3	-	-		
YUL44-6	A,B	0,8	-	-		
YUL44-12	A	0,8	-	-		
YUL44-12	B	0,9	-	-		
YUL44-13	A	1,1	++	+	+	+/-
YUL44-13	B	vuoto				
YUL44-14	A,B	1,3	++	+	++	+/-
YUL44-15	A,B	0,6	-	-		
YUL44-16	A,B	0,9	-	-		
YUL44-18	A,B	0,9	-	-		
YUL44-20	A	0,9	-	-		
YUL44-20	B	1,35	-	-		
YUL44-21	A,B	1,2	++	+	+	-
YUL44-22	A,B	0,85	-	-		
YUL44-23	A,B	1,7	-	-		
YUL44-24	A,B	1,75	++	+/-	++	+/-
YUL44-25	A,B	1	-	-		
YUL44-26	A,B	1,35	++	+/-	+	-
YUL44-27	A	1,4	-	-		
YUL44-27	B	1	++	+	++	+

				-	-		
				-	-		
				-	-		
YUL44-30	A,B	0,85	++	-	+	-	
YUL44-31	A,B	vuoto					
YUL44-31	C	0,9	-	-			
YUL44-31	D	1,35	++	+/-	+	-	
YUL44-33	A,B	1,5	-	-			
YUL44-34	A,B	1,3	++	+	++	+	
YUL44-35	A,B	1,4	+	+/-	+	-	
YUL44-36	A,B	0,85	-	-			
YUL44-37	A,B	0,8	-	-			
YUL44-38	A,B	1,25	++	+	++	+	
YUL44-39	A,B	1,4	-	-			
YUL44-40	A	0,9	-	-			
YUL44-40	B	1,85	+	+/-	++	+	
YUL44-41	A,B	0,5	-	-			
YUL44-42	A	1,1	-	-			
YUL44-42	B	1	-	-			
YUL44-45	A	1,2	++	+	++	-	
YUL44-45	B	0,9	-	-			
YUL44-46	A	1,4	-	-			
YUL44-46	B	1,3	-	-			
YUL44-49	A, B, D	vuoto					
YUL44-49	C	0,8	-	-			
YUL44-50	A,B,C	vuoto					
YUL44-50	D	0,7	-	-			
YUL44-51	A	vuoto					
<i>YUL44-51</i>	C	1,7	+	++	-	-	
YUL44-51	B	1,87	-	-			
YUL44-51	D	1,1	-	-			
YUL44-52	A	0,9	-	-			
YUL44-52	B	1,6	-	-			
YUL44-53	A	vuoto					
YUL44-53	B,C	0,85	-	-			
YUL44-53	D	0,5	++	+	+/-	-	
YUL44-54	A	1,55	-	-			
YUL44-54	B	0,9	-	-			
YUL44-55	A	0,7	-	-			
YUL44-55	B	1,4	-	-			
YUL44-56	A,B	0,7	-	-			
YUL44-57	A,B	vuoto					
YUL44-57	C,D	0,9	-	-			
YUL44-58	A,B	1	-	-			
YUL44-59	A	vuoto					
YUL44-59	B,C,D	1,4	-	-			
YUL44-60	A	1,35	++	+	++	-	
<i>YUL44-60</i>	B	1,3	-	-	-	-	
YUL44-61	A	1,9	-	-			
YUL44-61	B	0,85	-	-	-		
YUL44-62	A	vuoto					
YUL44-62	B,D	1,1	-	-	-		
YUL44-62	C	0,8	-	-			

				-	-	-	
YUL44-64	C,D	1	-	-	-		
YUL44-65	A,B	0,95	++	-	+	-	
YUL44-66	A	1,1	-	-			
YUL44-66	B	vuoto					
YUL44-66	C,D	0,9	-	-			
YUL44-70	A	1,05	-	+	-	-	
YUL44-70	B	1,2	+/-	+	-	-	
YUL44-74	A,B	1	+	+	-	-	
YUL44-75	A,B	0,85	-	-			
YUL44-76	A,B	1	-	-			
YUL44-77	A,B	0,9	-	-			
YUL44-81	A,B	0,5	-	-			
YUL44-84	A,B	0,5	++	-	++	+/-	
YUL44-88	A,B	0,75	-	-			
YUL44-91	A,B	0,8	-	-			
YUL44-92	A,B	0,95	-	-			
YUL44-94	A,B	1,1	-	-			
YUL44-97	A,B	0,5	++	+	+	-	
YUL44-98	A,B	1,2 + 0,85	-	+	-	-	
YUL44-100	A,B	1,1	-	-			
YUL44-103	A,B	1	-	-			
YUL44-105	A,B	1,3	-	-			
YUL44-108	A	1,3	++	+	+	-	
YUL44-108	B	0,9	-	-			
YUL44-113	A,B	0,9	++	+	+	-	
YUL44-115	A	0,95	-	-			
YUL44-115	B	1,15	-	-			
YUL44-120	A	1,4	-	+			
YUL44-120	B	1	-	-			
YUL44-121	A,B	1,3	++	+	++	+/-	
YUL44-124	A,B	0,8	-	-			
YUL44-125	A,B	1	-	-			
YUL44-126	A,B	1,2	-	-			
YUL44-131	A	vuoto					
YUL44-131	B	1,55	++	+	+	-	
YUL44-137	A,B	vuoto					
YUL44-138	A	vuoto					
YUL44-138	B	1	++	+	+	-	
YUL44-139	A,B	1	-	-	-	-	
YUL44-145	A,B	1,05	-	-			
YUL44-147	A,B	0,85	-	-			
YUL44-148	A,B	0,9	++	-	+	-	
YUL44-151	A,B	0,75	-	+			
YUL44-152	A	0,85	+	+	-	-	
YUL44-152	B	1,1	++	+	+	-	
YUL44-153	A,B	0,88	-	-			
YUL44-156	A,B	0,83	-	-			
YUL44-159	A	1,5	-	-			
YUL44-159	B	0,9	-	-			
YUL44-161	A,B	0,9	-	-			

			-	-		
			-	-		
			++	+	+	-
YUL44-166	B	1,6	-	-		

Tabella 4.10: Saggi X-gal e saggi con 3-AT sui cloni di lievito ritrasformati con il DNA plasmidico isolato da *E. coli* e precedentemente analizzato mediante analisi di restrizione. Nella prima colonna sono elencati i plasmidi estratti da *E. coli*, e nella colonna seguente sono indicate le singole colonie (A, B) di *E. coli* da cui il DNA plasmidico è stato isolato e analizzato dopo trasformazione con i plasmidi estratti da lievito. Nella terza colonna è indicata la grandezza approssimativa del frammento della libreria presente nel plasmide batterico, dove con ϕ vuoto ϕ si intende un plasmide in cui non sia presente alcun frammento della libreria. Nelle due colonne seguenti sono indicati i risultati dei saggi X-gal effettuati sui lieviti trasformati con i 121 plasmidi estratti da *E. coli* e con pBTMK-UL44 o pBTMK: con ++ è indicata la comparsa della colorazione blu (indicante attività β -galattosidasi) entro 1 h, con + la comparsa della colorazione in un tempo compreso tra 1 h e 2 h, con +/- la comparsa della colorazione dopo 2 h e con ϕ assenza di colorazione.

Nelle ultime due colonne sono riportati i risultati dei saggi con 3-AT su alcuni dei cloni di lievito ritrasformati e piastrati in presenza di 3-AT 2 mM. Con il simbolo ++ o + si intende una buona crescita, con +/- una crescita debole e con il segno ϕ assenza di crescita. Sono in grassetto i cloni di lievito positivi in entrambi i saggi e in corsivo quelli che invece erano negativi ai saggi X-gal e su cui è stato comunque fatto il saggio con 3-AT come controllo.

In conclusione vi sono 28 cloni in cui si ha la comparsa del colore blu nei lieviti trasformati con pBTMK-UL44 prima che in quelli trasformati con pBTMK. Solitamente la colorazione in presenza dell'escsa LexA-UL44 avveniva entro 1 ora, mentre in presenza di LexA la colorazione compariva dopo 2-3 h. Questa differenza nella comparsa di colorazione è stata considerata significativa, pertanto questi 28 cloni codificano proteine o frammenti di proteine che sono dei probabili interattori di UL44.

In 2 cloni, 74 A e 152 A, la colorazione blu nei lieviti trasformati con pBTMK-UL44 avveniva nello stesso momento di quelli trasformati con pBTMK. L'attivazione della trascrizione del gene *reporter lacZ* in assenza dell'escsa può essere dovuta a una capacità intrinseca della proteina codificata dal plasmide della libreria di legare le sequenze *lexO* o in alternativa tali proteine sono in grado di interagire con la sola proteina LexA. Questi cloni potrebbero quindi rappresentare dei falsi positivi.

In 2 cloni, 51 C e 70 B, la comparsa della colorazione blu nei lieviti trasformati con pBTMK-UL44 avveniva dopo che in quelli trasformati con pBTMK. In altri 5 cloni (70 A, 88 A, 98 A, 120 A, 151A) si ha la comparsa del colore blu solo nei lieviti trasformati con pBTMK. Questi 7 cloni non sono stati considerati come probabili interattori.

b). Riconferma, mediante saggi con 3-AT, della positività dei cloni di lievito ritrasformati e positivi ai saggi X-gal

Come ulteriore conferma dell'interazione tra UL44 e le porzioni proteiche codificate dal cDNA della libreria è stata rivalutata l'espressione del gene *reporter HIS3*.

Il saggio è stato effettuato sui 28 cloni considerati come probabili interattori in seguito ai risultati ottenuti nei saggi X-gal e sui due cloni, 74 A e 152 A, la cui colorazione nei lieviti trasformati con pBTMK-UL44 avveniva nello stesso momento di quelli trasformati con pBTMK.

Per verificare che i cloni considerati negativi al saggio X-gal fossero negativi anche al saggio 3-AT, sono stati saggiati alcuni cloni: 51C, 60 B, 70 A, 70B, 98 A e 139 A.

Le 36 colonie di lievito trasformate con ciascuno dei 36 plasmidi della libreria selezionati e con pBTMK-UL44 e le 36 colonie trasformate con i plasmidi della libreria e con pBTMK sono state fatte crescere in piastre da 96 pozzetti con terreno selettivo e poi piastrate su piastre solide con terreno selettivo privo di leu, trp e his a cui era stato

M (la concentrazione di 3-AT è più alta che nei saggi di controllo della massima stringenza). Le piastre sono state incubate dal 3° fino a 12° giorno (vedi immagine rappresentativa

di una delle piastre in Figura 4.16).

Sono stati inseriti nel saggio anche un controllo positivo, ovvero lieviti trasformati con pBTMK-UL44 e pACT2-UL54, e un controllo negativo, ovvero lieviti trasformati con pBTMK-UL44 e pACT2.

Sono stati considerati positivi tutti i cloni che, trasformati con pBTMK-UL44, fossero in grado di crescere in presenza di 3-AT 2 mM meglio dei rispettivi cloni trasformati con pBTMK.

Come riassunto in Tabella 4.10, i 28 cloni considerati come probabili interattori nei saggi X-gal si sono riconfermati positivi anche con i saggi con 3-AT.

I due cloni 74 A e 152 A, in cui la colorazione blu nel saggio X-gal nei lieviti trasformati con pBTMK-UL44 avveniva nello stesso momento di quelli trasformati con pBTMK, sono risultati negativi con il saggio con 3-AT, rafforzando l'ipotesi che siano dei falsi positivi.

Nei 2 cloni 51 C e 70 B (la cui comparsa della colorazione blu nel saggio X-gal nei lieviti trasformati con pBTMK-UL44 avveniva dopo che in quelli trasformati con pBTMK), nei 2 cloni 70 A e 98 A (la cui colorazione nel saggio X-gal si ha solo nei lieviti trasformati con pBTMK) e nei cloni 60 B e 139 A (in cui nel saggio X-gal non vi era alcuna colorazione dei lieviti), sono risultati negativi al saggio 3-AT, confermando che l'interpretazione dei risultati del saggio X-gal era adeguata, ovvero che è corretto considerare positivi al saggio X-gal solo i cloni in cui si ha la comparsa del colore blu nei lieviti trasformati con pBTMK-UL44 prima che in quelli trasformati con pBTMK.

Come ci si aspettava il controllo positivo era in grado di crescere in presenza di 3-AT mentre il controllo negativo no (dato non mostrato in tabella).

In conclusione i cloni che sono stati riconfermati positivi saggiando l'espressione del gene reporter *HIS3* sono 28. Questi cloni sono stati ulteriormente analizzati.

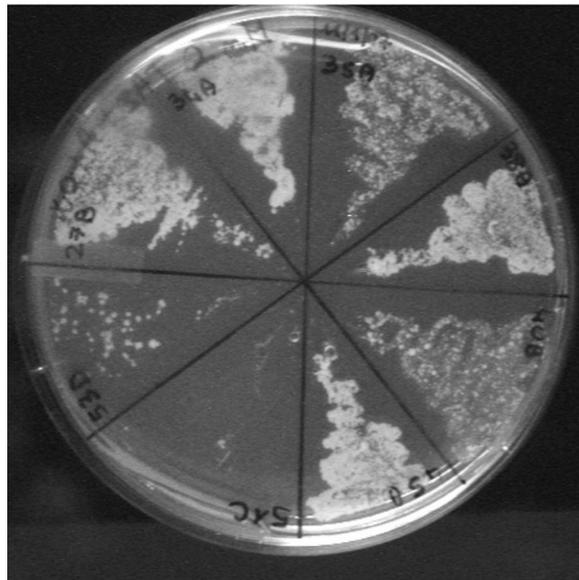


Figura 4.16: Saggi con 3-AT su alcuni dei cloni di lievito ritrasformati con il DNA plasmidico isolato da *E. coli* e che possiedono attività β -galattosidasi. In figura è mostrata una delle piastre con terreno selettivo privo di his, leu e trp in cui è stato aggiunto 3-AT 2 mM e in cui sono stati piastrati i lieviti per il saggio 3-AT. Si può notare la buona crescita dei cloni 27 B, 34 A, 35 A, 38 A, 40 B, 45 B, mentre il clone di lievito 53 D ha una crescita minore e il clone 51 C non cresce.

Sequenziamento dei cloni positivi di lievito

Se i cloni sono risultati positivi sia nei saggi X-gal sia nei saggi di sequenziamento, sono stati utilizzati al fine di stabilire la sequenza del frammento della libreria di cDNA in essi contenuto.

Pertanto, dopo aver ottenuto il sequenziamento dell'inserto di cDNA della libreria (o di parte di tale inserto) con il procedimento descritto in Materiali e Metodi (vedi paragrafo 3.8.h) utilizzando i *primers* gal843 e pprev, la sequenza degli inserti è stata confrontata con le sequenze di DNA presenti nel *database* del genoma umano (www.ncbi/blastn). Inoltre è stato verificato che il frammento di cDNA fosse stato inserito *in frame* con la sequenza codificante λ AD di GAL4. I risultati del sequenziamento sono mostrati in Tabella 4.11.

Plasmide	N°clone	Gene	in frame
YUL44-2	A	citocromo C, mitocondrio	no
YUL44-4	A	Ubc9	sì
YUL44-13	A	Ubc9	sì
YUL44-14	A	Ubc9	sì
YUL44-21	A	Ubc9	sì
YUL44-24	A	SP100	sì
YUL44-26	A	Ubc9	sì
YUL44-27	B	Ubc9	sì
YUL44-30	A	HLADRB2	no
YUL44-31	C	polipeptide simile alla ferritina	no
YUL44-34	A	Ubc9	sì
YUL44-35	A	Ubc9	sì
YUL44-38	A	Ubc9	sì
YUL44-40	B	Ubc9	sì
YUL44-45	A	Ubc9	sì
YUL44-53	D	EXOSC9	sì
YUL44-60	A	Ubc9	sì
YUL44-65	A	cdc2	sì
YUL44-84	A	EXOSC9	sì
YUL44-97	A	EXOSC9	sì
YUL44-108	A	Ubc9	sì
YUL44-113	A	Daxx	sì
YUL44-121	A	Ubc9	sì
YUL44-131	B	TOPORS	sì
YUL44-138	B	cdk2	sì
YUL44-148	A	cdc2	sì
YUL44-152	B	Spermidina sintasi	no
YUL44-166	A	EXOSC9	sì

Tabella 4.11: Sequenziamento dei plasmidi dei cloni positivi. Nella prima e seconda colonna sono elencati i plasmidi dei cloni positivi il cui frammento di cDNA è stato sequenziato. Nella terza colonna sono indicati i geni il cui DNA presenta maggior omologia con il frammento del cDNA della libreria sequenziato. È inoltre indicato se la sequenza codificante il frammento di cDNA è *in frame* o meno con la sequenza nucleotidica di GAD.

Come si può notare in Tabella 4.11, 4 cloni (YUL44-2 A, YUL44-30 A, YUL44-31 C e YUL44-152 B) non sono stati considerati dei possibili *partners* cellulari di UL44 in quanto la sequenza codificante non era *in frame* con la sequenza codificante GAD.

quindi 7 diverse proteine (per la descrizione vedi 1.5.f; 1.6.b; 1.7.a) in grado di interagire con UL44 in queste 7 proteine, 4 sono state individuate una sola volta, ossia SP100, cdk2, TOPORS e Daxx. Altre proteine sono invece state individuate più volte: cdc2 due volte, EXOSC9 quattro volte e Ubc9 quattordici volte.

Sommario dei risultati finali ottenuti nello *screening* con la sonda LexA-UL44

In Figura 4.17 sono schematizzate le varie fasi sperimentali effettuate durante lo *screening* con la sonda LexA-UL44 e la libreria di cDNA cellulare.

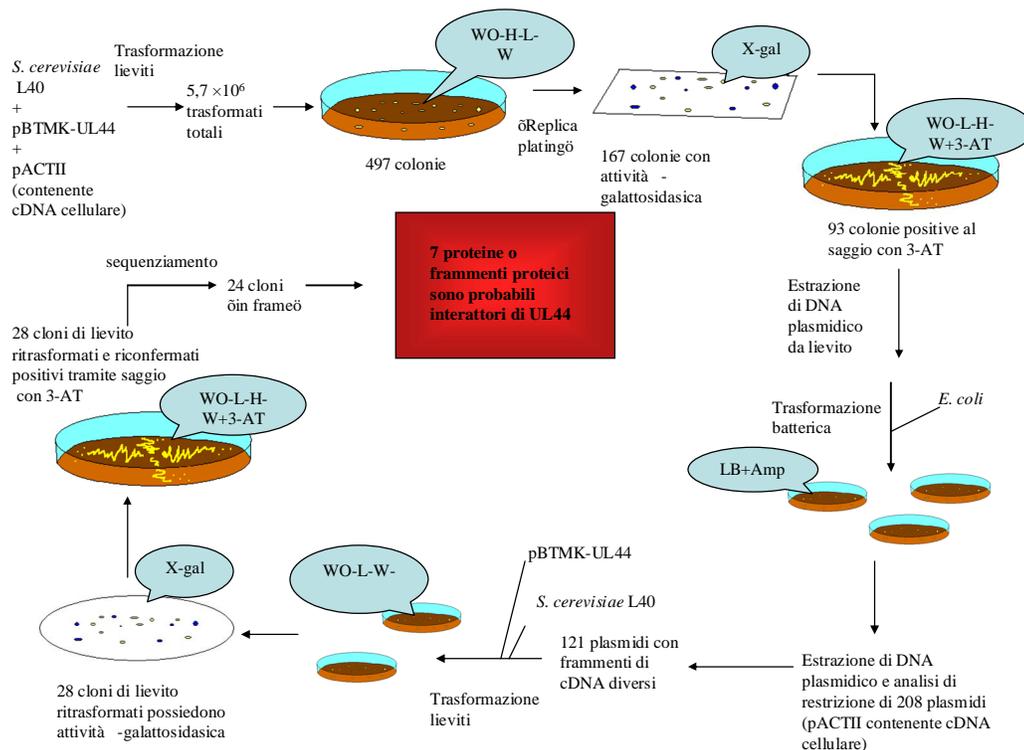


Figura 4.17: Schema dei risultati ottenuti dallo *screening* sulla libreria di cDNA. La sigla WO indica il terreno selettivo, mentre le sigle δ H, -L, -W, indicano rispettivamente l'assenza dal terreno selettivo di his, leu e trp.

Dopo aver effettuato il sequenziamento dei frammenti di cDNA (o di parte di tali frammenti) contenuti nei plasmidi dei cloni di lievito positivi (vedi paragrafo precedente), sono state analizzate le sequenze di questi frammenti, codificanti possibili *partners* cellulari di UL44, per vedere se codificavano proteine intere o porzioni di proteine. I risultati sono mostrati in Tabella 4.12. I frammenti di cDNA codificanti cdc2, cdk2 e Ubc9 codificano le proteine intere. I frammenti di cDNA codificanti SP100 codificano la proteina intera priva solo dei primi 5 aa N-terminali. I frammenti di cDNA codificanti Daxx e TOPORS codificano rispettivamente i 176 e i 226 aa C-terminali delle proteine. I frammenti di cDNA codificanti EXOSC9 codificano la parte centrale e quasi tutta la parte C-terminale della proteina (EXOSC9 è composta da 440 aa). Questa analisi permette di ipotizzare con quale porzione proteica il probabile *partner* è in grado di legare UL44, e questo potrebbe essere utile per focalizzare solo su alcune porzioni

studi, mediante mutagenesi, volti ad identificare i
interattori proteici da noi identificati).

Gene	N°clone	Omologia nucleotidica	Omologia amminoacidica
Ubc9	4A	1-477	1-159
	13 A	1-477	1-159
	14 A	1-477	1-159
	21 A	1-477	1-159
	26 A	1-477	1-159
	27 B	1-477	1-159
	34 A	1-477	1-159
	35 A	1-477	1-159
	40 B	1-477	1-159
	38 A	1-477	1-159
	45 A	1-477	1-159
	60 A	1-477	1-159
	108 A	1-477	1-159
121 A	1-477	1-159	
SP100	24 B	15-1443	6-481
Daxx	113 A	1692-2223	565-741
TOPORS	131 B	2459-2645; 2687-3214	820-882 e 896-1046
EXOSC9	53 D	826-1221	276-407
	84 A	826-1221	276-407
	97 A	826-1221	276-407
	166 A	826-1221	276-407
cdc2	65 A	1-893	1-298
	148 A	1-893	1-298
cdk2	138 B	1-897	1-299

Tabella 4.12: Analisi della sequenza dei frammenti di cDNA codificanti possibili *partners* cellulari di UL44. In tabella sono indicati per ogni clone il nome del gene identificato tramite ricerca di omologia nel *database* del genoma umano. È inoltre indicata la regione di omologia con il cDNA dei cloni e la rispettiva omologia amminoacidica.

4.3.f Caratterizzazione preliminare degli interattori proteici di UL44 identificati durante lo *screening* con il sistema del doppio ibrido

Clonaggio in pACT2 dei geni codificanti le proteine intere e riconferma della loro interazione con UL44 mediante saggi X-gal

Poiché alcuni dei frammenti della libreria individuati nello *screening* codificano porzioni di una proteina e non la proteina intera, si è voluto verificare se l'interazione con LexA-UL44 veniva mantenuta anche in presenza delle proteine intere. A tale scopo i cDNA codificanti le proteine intere SP100 ed EXOSC9 sono stati clonati nel vettore di doppio ibrido pACT2. Inoltre, alcuni dei frammenti della libreria che codificano le proteine cdc2, cdk2 e Ubc9 contengono, oltre alla sequenza codificante le proteine intere, dei frammenti di DNA non codificante, perciò anche le sequenze codificanti cdc2 e cdk2 intere sono state clonate nel vettore pACT2.

invece fornito dal Prof. Gao George (Chinese Academy di Materiali e Metodi, paragrafo 3.3.e).

Le TOPORS intere nel plasmide pACT2 sono in corso.

Le sequenze codificanti le proteine *cdc2*, *cdk2*, SP100 ed EXOSC9 intere sono state amplificate rispettivamente dai plasmidi pCMV-*cdc2*, pCMV-*cdk2*, pSG5-HA-SP100A e pEGFPC1-PM/Sc175 con opportuni *primers* (rispettivamente *cdc2*pACTfor e rev; *cdk2*pACTfor e rev; SP100PACT2FOR e REV e *exosc9*pACTfor e rev). I prodotti di PCR sono stati tagliati con opportuni enzimi di restrizione e quindi inseriti nel plasmide pACT2, tagliato con gli stessi enzimi. L'avvenuto clonaggio è stato verificato mediante analisi di restrizione e sequenziamento con i *primers* GAL4AD/SEQ e GAL4AD/FOR.

Cellule di lievito L40 sono state trasformate con pBTMK o pBTMK-UL44 e fatto crescere in terreno selettivo senza triptofano. Quindi entrambi i cloni (trasformati con pBTMK o con pBTMK-UL44) sono stati trasformati con pACT-Ubc9, pACT2-*cdc2*, pACT2-*cdk2*, pACT2-SP100 o pACT2-EXOSC9. È stata quindi saggiata l'attività -galattosidasi delle colonie. In Tabella 4.13 sono riportati i risultati ottenuti.

In ognuno dei filtri in cui è stata saggiata l'attività -galattosidasi dei lieviti trasformati è stata contemporaneamente saggiata anche l'attività di due trasformazioni di controllo (dato non mostrato): L40 trasformato con pBTMK-UL44 e pACT2-UL54, come controllo positivo; L40 trasformato con pBTMK-UL44 e pACT2, come controllo negativo (vedi Risultati e Discussione, paragrafo 4.3.c). Come si può vedere in Tabella 4.13, i lieviti derivanti dalle trasformazioni 6, 12, 18, 24 e 30 (trasformati con plasmidi codificanti l'esca LexA-UL44) presentano colorazione blu (attività -galattosidasi) prima dei lieviti derivanti rispettivamente dalle trasformazioni 5, 11, 17, 23 e 29 (trasformati con plasmidi codificanti la sola proteina LexA). Questa differenza nel tempo di comparsa della colorazione è stata considerata significativa. Si può pertanto affermare che anche le proteine intere SP100, *cdc2*, *cdk2*, Ubc9 ed EXOSC9 sembrano interagire con UL44. Questo conferma l'ipotesi di interazione di SP100, *cdc2*, *cdk2*, Ubc9 ed EXOSC9 con UL44, suggerita dai dati ottenuti precedentemente.

Clonaggio in pBTMK dei geni codificanti le proteine intere e riconferma della loro interazione con UL44 mediante saggi X-gal

Per effettuare un'ulteriore verifica che le proteine identificate mediante lo *screening* fossero effettivamente interattori di UL44, sono state create delle proteine di fusione in cui il BD e l'AD sono stati invertiti, ossia UL44 è stata fusa a GAD (anziché a LexA) ed i putativi interattori proteici di UL44 sono stati fusi a LexA (anziché a GAD) ed è stato poi effettuato un saggio X-gal sui cloni di lievito trasformati con plasmidi codificanti questi costrutti. Questo tipo di saggio con il sistema del doppio ibrido verrà chiamato invertito.

Per effettuare tali saggi, le proteine *cdc2*, *cdk2*, SP100, EXOSC9 e Ubc9 sono state clonate nel vettore pBTMK per ottenere l'espressione delle proteine in fusione con LexA. Le sequenze codificanti le proteine *cdc2*, *cdk2*, SP100, EXOSC9 e Ubc9 intere, sono state amplificate rispettivamente dai plasmidi pCMV-*cdc2*, pCMV-*cdk2*, pSG5-HA-SP100A, pEGFPC1-PM/Sc175 e pGEX-Ubc9 con opportuni *primers* (rispettivamente *cdc2*pGBTfor e rev; *cdk2*pGBTfor e rev; SP100PGBT9FOR e REV, *exosc9*pBTMKfor e rev e UBC9PGBT9FOR e REV). I prodotti di PCR sono stati tagliati con gli opportuni enzimi di restrizione e quindi inseriti nel plasmide pBTMK, tagliato con gli stessi enzimi. L'avvenuto clonaggio è stato verificato mediante analisi di restrizione e sequenziamento con il *primer* pBTMLexAseq.

Il ceppo di *S. cerevisiae* L40 è stato quindi trasformato con pACT2 o con pACT2-UL44 e fatto crescere in terreno selettivo senza leu. Successivamente sono stati trasformati

rispetto ai precedenti trasformati con pBTMK-cdc2, pBTMK-EXOSC9 e pBTMK-Ubc9. In Tabella **4.13** è riportato il risultato di questo caso, in ognuno dei filtri in cui è stata saggiata l'attività α -galattosidasi dei lieviti trasformati è stata contemporaneamente saggiata anche l'attività di due trasformazioni di controllo (dato non mostrato): L40 trasformato con pBTMK-UL44 e pACT2-UL54, come controllo positivo; L40 trasformato con pBTMK-UL44 e pACT2, come controllo negativo (vedi Risultati, paragrafo **4.3.c**). Come si può vedere in Tabella **4.13**, i lieviti derivanti dalle trasformazioni 3, 9, 15, 21 e 27 (trasformati con il plasmide codificante la proteina di fusione GAD-UL44) presentano colorazione blu (attività α -galattosidasi), mentre i lieviti derivanti dalle trasformazioni 2, 8, 14, 20 e 26 (trasformati con il plasmide codificante la sola proteina GAD) non presentano attività α -galattosidasi. Pertanto è possibile affermare che anche invertendo l'AD con il BD nelle proteine di fusione, le proteine intere cdc2, cdk2, SP100, EXOSC9 e Ubc9 sembrano in grado di interagire con UL44. Questi dati confermano ulteriormente l'ipotesi di interazione di tali proteine con UL44, suggerita dai dati precedenti.

N° trasforma zione	Plasmide		Attività α - galattosidasi
	Plasmide α escaö	Plasmide α predaö	
1	pBTMK-SP100	/	-
2	pBTMK-SP100	pACT2	-
3	pBTMK-SP100	pACT2-UL44	++
4	/	pACT2-SP100	-
5	pBTMK	pACT2-SP100	±
6	pBTMK-UL44	pACT2-SP100	++
7	pBTMK-cdc2	/	-
8	pBTMK-cdc2	pACT2	-
9	pBTMK-cdc2	pACT2-UL44	++
10	/	pACT2-cdc2	-
11	pBTMK	pACT2-cdc2	-
12	pBTMK-UL44	pACT2-cdc2	++
13	pBTMK-cdk2	/	-
14	pBTMK-cdk2	pACT2	-
15	pBTMK-cdk2	pACT2-UL44	++
16	/	pACT2-cdk2	-
17	pBTMK	pACT2-cdk2	+
18	pBTMK-UL44	pACT2-cdk2	++
19	pBTMK-Ubc9	/	-
20	pBTMK-Ubc9	pACT2	-
21	pBTMK-Ubc9	pACT2-UL44	++
22	/	pACT-Ubc9	-
23	pBTMK	pACT-Ubc9	±
24	pBTMK-UL44	pACT-Ubc9	++

	EXOSC9	/	-
	EXOSC9	pACT2	-
	EXOSC9	pACT2-UL44	++
28	/	pACT2-EXOSC9	-
29	pBTMK	pACT2-EXOSC9	±
30	pBTMK-UL44	pACT2-EXOSC9	++

Tabella 4.13: Attività α -galattosidasi di cloni di lievito *S. cerevisiae* L40 trasformati con i plasmidi indicati esprimenti le proteine identificate nello *screening*. Nella seconda e nella terza colonna sono descritti i plasmidi con cui è stato trasformato il ceppo di lievito *S. cerevisiae* L40 nelle 30 diverse trasformazioni. Nella quarta colonna è indicata l'attività α -galattosidasi: con il segno ++ è indicata la comparsa della colorazione blu (indicante attività α -galattosidasi) entro 1 h di incubazione a 30°C, con + la comparsa della colorazione in un tempo compreso tra 1 h e 2 h, con +/- la comparsa della colorazione dopo 2 ore, con - l'assenza di colorazione.

Clonaggio in pRSET dei geni codificanti le proteine intere e conferma dell'interazione con UL44 tramite saggi *GST-pulldown*

In generale, i dati di interazione proteina-proteina rivelati mediante esperimenti con il sistema del doppio ibrido vengono solitamente confermati mediante l'utilizzo di un'altra tecnica. In questo lavoro si è scelto di effettuare degli esperimenti di conferma delle interazioni individuate mediante saggi *GST-pulldown* (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.10) in quanto questo saggio, oltre ad essere stato utilizzato per saggiare la capacità di dimerizzare della proteina intera UL44 (Risultati, paragrafo 4.1.a) era stato precedentemente utilizzato dal nostro gruppo di ricerca per la caratterizzazione dell'interazione tra la polimerasi di HCMV e UL44 (Loregian *et al.*, 2004 a; Loregian *et al.*, 2004 b).

Una delle modalità di esecuzione di questi saggi è quella di saggiare l'interazione di una proteina di interesse (in questo caso GST-UL44) con proteine espresse *in vitro* e marcate con [³⁵S]metionina (vedi Introduzione, paragrafo 1.8.b). Poiché l'espressione *in vitro* delle proteine di interesse può essere effettuata con dei *kits* commerciali che utilizzano miscele di reazione contenenti RNA polimerasi fagiche (ad esempio la RNA polimerasi del fago T7) che effettuano la trascrizione *in vitro*, i geni codificanti le proteine oggetto di studio devono essere clonati in opportuni vettori plasmidici (es. pRSETA) sotto il controllo di un promotore riconosciuto da una RNA polimerasi fagica (es. promotore T7). A questo scopo, quindi, i geni codificanti alcune delle proteine identificate durante lo *screening* con il sistema del doppio ibrido, ossia *cdc2*, *cdk2*, SP100, EXOSC9 e Ubc9, sono stati clonati nel plasmide pRSETA.

Il clonaggio dei geni codificanti per gli altri potenziali interattori di UL44 identificati nello *screening* (ossia Daxx e TOPORS) nel plasmide pRSETA sono tuttora in corso. Il plasmide pRSET-Pol, codificante la proteina UL54 di HCMV (che può essere usata come controllo positivo di interazione con UL44) era già disponibile in laboratorio (vedi Materiali e Metodi, paragrafo 3.3.e).

Per effettuare i clonaggi in pRSETA, i cDNA delle proteine *cdc2*, *cdk2*, SP100, EXOSC9 e Ubc9 sono stati amplificati rispettivamente dai plasmidi pCMV-*cdc2*, pCMV-*cdk2*, pSG5-HA-SP100A, pEGFPC1-PM/Sc175 e pGEX-Ubc9 con opportuni *primers* (rispettivamente *cdc2*pRSETAfor e rev, *cdk2*pRSETAfor e rev, SP100PRSETAFOR e REV, *exosc9*pRSETAfor e rev e UBC9PRSETAFOR e REV; vedi Materiali e Metodi Tabella 3.1). I prodotti di PCR sono quindi stati tagliati con opportune endonucleasi di restrizione ed inseriti nel plasmide pRSETA tagliato con gli stessi enzimi.

a proteina GST e la proteina di fusione GST-UL44 (Figura 3.1.a) e le proteine cdc2, cdk2, SP100, EXOSC9, (Materiali e Metodi, paragrafo 3.9) e marcate con

³⁵S. La proteina GST-UL44 è stata incubata con le diverse proteine prodotte *in vitro* e la miscela di reazione è stata successivamente caricata in colonne di *sepharose* coniugato a glutatione. Come controllo positivo di interazione è stata saggiata anche l'interazione di GST-UL44 con UL54. Come controllo negativo, GST è stata anch'essa incubata con le proteine cdc2, cdk2, SP100, EXOSC9, Ubc9 o UL54, e la miscela di reazione è stata caricata in colonne di *sepharose* coniugato a glutatione. Le colonne sono state quindi sottoposte a lavaggi e le proteine legate sono state eluite con un tampone di eluizione contenente glutatione 15 mM. La proteina GST-UL44, e come controllo negativo la sola GST, sono state inoltre incubate contemporaneamente con le proteine Ubc9 ed SP100 tradotte *in vitro* per vedere se e come varia la capacità di queste proteine di interagire con UL44 quando presenti nella stessa mix di reazione. È noto infatti che Ubc9 è in grado di interagire direttamente con SP100.

Sono state inizialmente utilizzate le condizioni per l'incubazione delle proteine (2 h in ghiaccio) e di eluizione (presenza del detergente NP-40 allo 0,5% nel tampone di eluizione) messe a punto precedentemente dal nostro gruppo di ricerca, per rilevare l'interazione di UL44 con UL54. Poiché però, utilizzando tali condizioni, non è stata rilevata alcuna interazione tra UL44 e cdc2, cdk2, SP100, Ubc9 o EXOSC9, sono state analizzate altre condizioni sperimentali, ad esempio incubando le proteine 1 h a temperatura ambiente o 2 h in ghiaccio e utilizzando un tampone di eluizione con o senza detergente NP-40 o altri detergenti (in quest'ultimo caso le condizioni sono meno denaturanti).

Sono state pertanto determinate le condizioni ritenute ottimali per rilevare l'interazione tra UL44 e le proteine oggetto di studio, tali condizioni sono:

- incubazione di GST-UL44 con EXOSC9 per 1 h a temperatura ambiente; utilizzo di tamponi di legame, lavaggio ed eluizione senza NP-40;
- incubazione di GST-UL44 con cdc2, cdk2 o Ubc9 per 1 h a temperatura ambiente; utilizzo di tamponi di legame, lavaggio ed eluizione con NP-40 0,5%;
- incubazione di GST-UL44 con SP100 da sola o con sia SP100 che Ubc9 per 1 h a temperatura ambiente; utilizzo di tamponi di legame, lavaggio ed eluizione contenenti Tween 20 0,1%, MgCl₂ 1 mM.

In seguito all'eluizione con glutatione, sono stati caricati in gel di acrilamide gli *input* (ovvero i campioni di partenza in cui le proteine cdc2, cdk2, SP100, EXOSC9, Ubc9 da sola o con SP100 o UL54 sono state incubate con GST-UL44 o con GST) per verificare l'avvenuta traduzione *in vitro* delle proteine.

Inoltre è stato analizzato in gel, a fianco di ogni *input*, il rispettivo campione eluito con glutatione da ciascuna delle colonne, contenente la proteina GST o GST-UL44 e l'eventuale interattore proteico (marcato con ³⁵S) legati a GST o a GST-UL44. Per confronto, al fine di stabilire approssimativamente il peso molecolare (PM) della proteina radiomarcata eluita dalle colonne, è stato analizzato in parallelo, in ognuno dei gel, un marcatore di pesi molecolari.

Le proteine radiomarcate sono state visualizzate con autoradiografia dopo analisi in SDS-PAGE (vedi Figura 4.18).

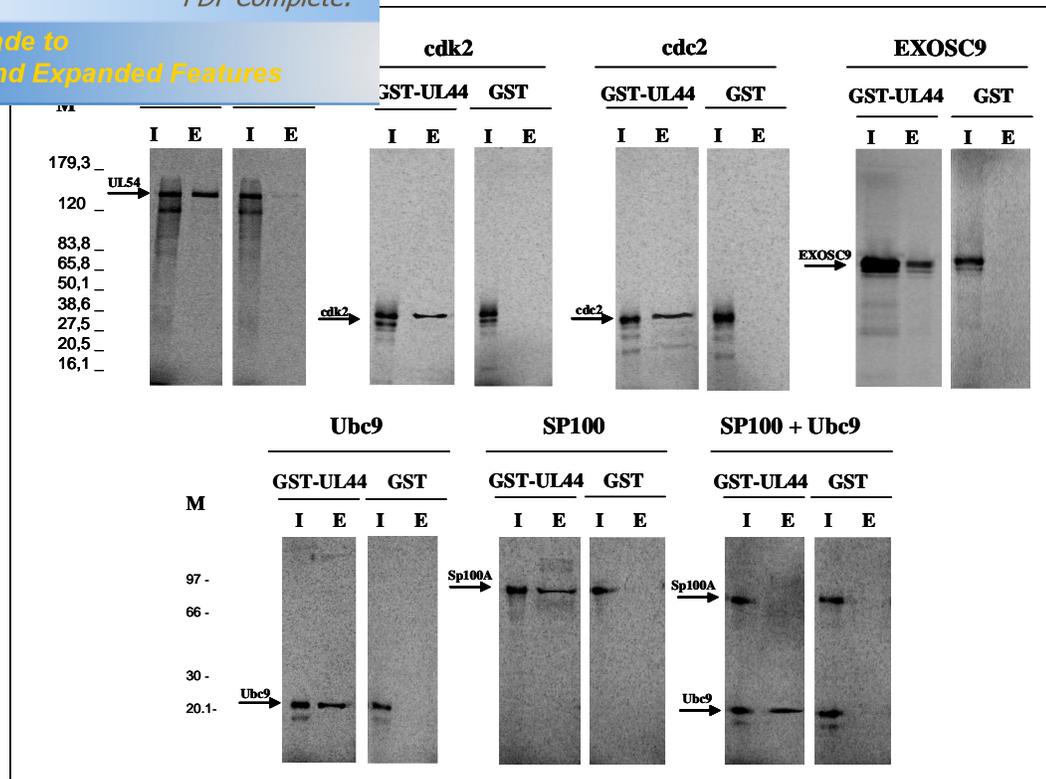


Figura 4.18: Rilevazione dell'interazione di UL44 con alcune delle proteine individuate nello *screening* di doppio ibrido mediante saggi *GST-pulldown*. Le proteine GST o GST-UL44 sono state incubate con le proteine cdk2, cdc2, EXOSC9, SP100, Ubc9 da sola o con SP100, UL54 come controllo positivo, tradotte *in vitro* e marcate con ^{35}S (come indicato nella parte alta della figura) e le miscele di reazione sono state caricate su colonne di *sepharose* coniugato con glutazione. Le colonne sono state sottoposte a lavaggi e le proteine sono state eluite con glutazione 15 mM. Le proteine radiomarcate sono state visualizzate mediante autoradiografia dopo analisi in SDS-PAGE. Le frecce indicano le bande corrispondenti a cdk2, cdc2, EXOSC9, SP100, Ubc9 o UL54. Corsie: I, *Input* (ovvero miscela di reazione in cui è presente la proteina cdc2, cdk2, EXOSC9, SP100, Ubc9 o UL54 incubate con GST-UL44 o con GST); E, Eluito (campione eluito dalla colonna).

Come possiamo vedere in Figura 4.18, è stata ottenuta la traduzione *in vitro*, oltre che di UL54, anche delle cinque proteine; cdk2 presenta un PM di circa 33 KDa, cdc2 di circa 31 KDa, EXOSC9 corre in gel ad un'altezza di circa 70 KDa (anche se il peso molecolare atteso sarebbe di circa 39-40 KDa) così come già riportato da altri autori (Raijmakers *et al.*, 2003; Alderuccio *et al.*, 1991); Ubc9 presenta un PM di circa 20 KDa ed SP100 di circa 80 KDa. Per alcune di queste proteine sono inoltre visibili altre bande che potrebbero corrispondere a prodotti di degradazione delle proteine o a prodotti di traduzione più δ corti dovuti alla presenza di più di un codone ATG nella sequenza codificante.

I risultati ottenuti indicano che UL44 è in grado di legare cdk2, cdc2, SP100, Ubc9 e EXOSC9, in quanto nei campioni eluiti da ciascuna delle colonne sono visibili le bande corrispondenti a ciascuna delle cinque proteine (confronta in Figura 4.18 il campione δ I δ con il rispettivo campione δ E δ). Inoltre UL44 lega UL54 come atteso (Loregian *et al.*, 2004 a). Nel caso in cui sono state incubate entrambe le proteine Ubc9 ed SP100 con GST-UL44, viene mantenuta l'interazione di UL44 con Ubc9 ma non con SP100.

Gli esperimenti di controllo indicano che il legame è specifico, in quanto GST non è in grado di legare cdc2, cdk2, EXOSC9, SP100, Ubc9 o UL54 (infatti non è visibile



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

uiti dalle colonne degli esperimenti di controllo, in
c9 o UL54 sono state incubate con GST).
saggi *GST-pulldown* confermano che alcune delle
proteine identificate come potenziali interattori proteici di UL44 mediante lo *screening*
con il sistema dei due ibridi, ossia cdc2, cdk2, EXOSC9, Ubc9 e SP100A sono
effettivamente in grado di interagire fisicamente con la proteina UL44 di HCMV.

scussione e conclusioni

La proteina di HCMV UL44 è un omodimero in grado di legare il DNA a doppio filamento con alta affinità e di interagire in maniera specifica con la subunità catalitica della DNA polimerasi, UL54. È stato quindi proposto che la funzione principale di UL44 sia quella di stimolare la processività della DNA polimerasi virale lungo lo stampo di DNA. In questo lavoro di ricerca sono stati analizzati tre aspetti principali della proteina UL44: 1. la caratterizzazione del ruolo della sua dimerizzazione, 2. la caratterizzazione della sua interazione con il DNA e 3. la sua capacità di interagire con proteine della cellula ospite.

5.1 Caratterizzazione del ruolo della dimerizzazione di UL44

Come ricordato nell'introduzione, il nostro gruppo di ricerca ha recentemente pubblicato la struttura cristallografica dei residui 1-290 di UL44, forma tronca della proteina che è comunque attiva (Appleton *et al.*, 2004). Da tale struttura è emerso come UL44 presenti una struttura molto simile ad altri fattori di processività quali UL42 di HSV-1 e il monomero di PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) ma a differenza di queste proteine, UL44 forma omodimeri testa-testa in forma di pinza a C. Sono stati inoltre individuati i residui amminoacidici (F121, L86 e L87) importanti per la dimerizzazione di UL44: infatti i mutanti di UL44 con le sostituzioni F121A e L86A/L87A si comportano come monomeri. Tali mutanti presentano inoltre una ridotta capacità di legare il DNA.

In questo studio sono stati effettuati degli esperimenti volti a dimostrare che anche la proteina UL44 intera fosse in grado di dimerizzare. Esperimenti di *GST-pulldown* e di doppio ibrido hanno infatti evidenziato che anche UL44 intera, come UL44 C290, forma dimeri sia in soluzione che in un contesto cellulare (Figura 4.1 e Tabella 4.1). Inoltre, è stata riconfermata con saggi di doppio ibrido utilizzando la proteina intera wt o i mutanti, l'importanza dell'integrità dei residui F121, L86 e L87 per la dimerizzazione di UL44 (Tabella 4.1).

Per caratterizzare l'importanza della dimerizzazione di UL44 per il suo ruolo di fattore di processività, è stata valutata la capacità dei mutanti che non dimerizzano di interagire con la DNA polimerasi UL54 e di stimolarne l'attività. Per quanto riguarda il primo punto, sono stati effettuati dei saggi di doppio ibrido per saggiare l'interazione dei mutanti di UL44 (UL44 L86A/L87A, F121A, P85G e I135A) con la proteina UL54. I risultati ottenuti indicano che i mutanti di UL44 che non dimerizzano mantengono inalterata la capacità di interagire con la DNA polimerasi, così come il mutante UL44 P85G che è in grado di dimerizzare, ed è stata inoltre riconfermata l'incapacità del mutante UL44 I135A di interagire con UL54 (Tabella 4.2). Risultati analoghi sono stati inoltre ottenuti da esperimenti di ITC condotti dalla Prof.ssa Loregian, in cui è stato dimostrato che i mutanti di UL44 che non dimerizzano legano un peptide corrispondente ai 22 residui C-terminali di UL54 con affinità paragonabili a quella della proteina wt.

Per valutare la capacità dei mutanti di UL44 che non dimerizzano di stimolare l'attività della DNA polimerasi, sono stati effettuati dei saggi di attività DNA polimerasica *in vitro*, sia saggi su filtro che esperimenti per valutare la sintesi di lunghe catene di DNA. I risultati ottenuti indicano che i mutanti che non dimerizzano stimolano la DNA

proteina wt sia nei saggi su filtro che in quelli di (figure 4.2 e 4.3). Come atteso invece il mutante UL44 interagisce con la DNA polimerasi, non ne stimola l'attività.

Quindi, mentre è stato dimostrato che la dimerizzazione di UL44 è importante per il legame al DNA, sembra che essa non sia indispensabile per legare UL54 e per stimolare la sintesi del DNA mediata da UL54 *in vitro*. Questi risultati, apparentemente contraddittori, possono essere dovuti alle tecniche utilizzate, che non permettono di valutare a pieno l'effetto della stimolazione di UL44 sulla processività della polimerasi in quanto, per esempio le concentrazioni di DNA utilizzate non sono adatte o serve uno stampo di DNA più lungo per poter valutare meglio la processività del complesso. Per escludere, quindi che tali risultati siano un artefatto dovuto alle condizioni sperimentali utilizzate, sono in corso dei saggi di processività *in vitro*, simili a quelli effettuati in questo lavoro (paragrafo 4.1.e) ma in cui si utilizza uno stampo di DNA più lungo (M13, X174). In alternativa, i dati ottenuti possono suggerire che la capacità residua dei mutanti UL44 L86A/L87A e F121A di dimerizzare e di legare il DNA, può essere sufficiente a stimolare la processività di UL54 nelle condizioni sperimentali saggiate. Infine, questi dati possono indicare che la dimerizzazione di UL44 possa essere coinvolta in altre funzioni svolte da UL44 e non nell'attività di stimolazione della processività di UL54.

Quindi, anche per verificare se la dimerizzazione di UL44 possa essere coinvolta in altre funzioni della proteina, è stata analizzata la capacità dei mutanti che non dimerizzano di interagire con altri interattori virali noti di UL44: la protein chinasi UL97, l'uracil DNA glicosilasi UL114 e la putativa *origin binding protein* UL84. I risultati dei saggi di doppio ibrido indicano che i mutanti che non dimerizzano, così come i mutanti UL44 P85G e UL44 I135A, saggiati per controllo, mantengono la capacità di interagire con le proteine UL97 e UL114, in maniera analoga alla proteina wt (Tabella 4.3). Diversamente, invece i mutanti che non dimerizzano sembrano non interagire con la proteina UL84, al contrario dei mutanti UL44 P85G e UL44 I135A (Tabella 4.3). Questi risultati indicando che forse la dimerizzazione potrebbe essere importante per l'interazione di UL44 con UL84. Tali risultati dovranno comunque essere riconfermati, per esempio mediante saggi di coimmunoprecipitazione in cellule cotrasfettate in presenza della proteina UL44 wt o mutata. Alla luce del fatto che non è noto il ruolo funzionale dell'interazione di UL44 con UL84, un'interpretazione dei risultati preliminari ottenuti è che la proteina UL84 interagisca con il dimero di UL44, quindi con una particolare conformazione della proteina e non sia in grado di interagire con la forma monomeric di UL44 (o che le mutazioni L86A/L87A e F121A alterino la conformazione della regione di UL44 coinvolta nell'interazione con UL84). Potrebbe quindi essere utile effettuare degli studi per individuare la regione delle due proteine coinvolta nell'interazione. Come riportato nell'Introduzione (paragrafo 1.3), studi recenti indicano che UL84 possa essere l'*origin binding protein* (la proteina che si lega all'origine di replicazione) di HCMV rappresentando quindi la proteina iniziatrice della sintesi del DNA virale. UL84 infatti risulta essere associata al complesso replicativo. È stato inoltre dimostrato che UL84 è in grado di interagire *in vivo* con l'origine di replicazione litica di HCMV, *oriLyt*, probabilmente in una regione che presenta strutture ibride RNA/DNA e *stem-loop* (Colletti *et al.*, 2007). Gli studi *in vitro* indicano che UL84 possa cambiare la conformazione delle strutture *stem-loop* e probabilmente portare così all'assemblaggio del complesso di replicazione. Quindi, per quanto riguarda il ruolo funzionale dell'interazione tra UL84 e UL44, si può ipotizzare che UL84 recluti UL44, in complesso con UL54, sul sito di origine della replicazione del DNA virale e questo può a sua volta suggerire che UL44 possa avere anche un ruolo nell'inizio della sintesi di DNA in fase litica. Un'altra ipotesi è che, in maniera analoga

e UL9 di HSV-1, omologhi rispettivamente a UL44 e UL84 e favorisca il legame (legame) di UL84 sul DNA di UL44 e il ruolo della dimerizzazione di UL44 in questa interazione saranno oggetto di studi futuri.

È stata infine valutata la capacità dei mutanti della dimerizzazione UL44 L86A/L87A e F121A, del mutante UL44 I135A che non interagisce con UL54 e, come controllo, di UL44 P85G, di promuovere la replicazione del DNA di HCMV *ori*Lyt-dipendente, mediante un saggio di complementazione transiente della replicazione. I dati ottenuti hanno evidenziato la mancata sintesi di DNA in presenza dei mutanti di UL44 che non dimerizzano e del mutante che non interagisce con UL54. Da tale saggio sono stati ottenuti due risultati importanti: (i) si ha la dimostrazione in un contesto cellulare che l'interazione tra UL54 e UL44 è essenziale per la replicazione del virus e che quindi la distruzione dell'interazione tra le due proteine è una buona strategia per lo sviluppo di farmaci antivirali (vedi Introduzione paragrafo 1.4.e); (ii) inoltre i risultati indicano che la capacità di UL44 di formare dimeri è essenziale perché si abbia la replicazione *ori*Lyt-dipendente del DNA di HCMV in un contesto cellulare. Molto importante, questa osservazione suggerisce che, come per l'interazione tra UL44 e UL54, anche la dissociazione dei dimeri di UL44 rappresenta un'ottima strategia per lo sviluppo di nuovi composti antivirali. Si potrà quindi effettuare, in futuro, uno *screening* di *small molecules* per identificare composti che siano in grado di inibire la dimerizzazione di UL44, analogo a quello effettuato per la dissociazione dell'interazione tra UL54 e UL44. In Tabella 5.1 sono schematicamente riassunte le proprietà dei mutanti di UL44 analizzati.

Mutazione	legame a UL54	legame a UL97	legame a UL114	legame a UL84	legame al DNA	Stimolazione dell'attività di UL54	capacità di promuovere la sintesi di DNA
P85G	+	+	+	+	+	+	+
L86A/L87A	+	+	+	-	±	+	-
F121A	+	+	+	-	±	+	-
I135A	-	+	+	+	+	-	-

Tabella 5.1: Riassunto delle proprietà dei mutanti di UL44. +, indica un livello di attività analogo a quello della proteina wt (*wild type*); ±, attività parzialmente alterata rispetto a quella della proteina wt; -, assenza di attività. Il legame a UL54, UL97, UL114 e UL84 è stato analizzato mediante saggi di doppio ibrido (Tabelle 4.2 e 4.3); la stimolazione dell'attività della DNA polimerasi è stata misurata mediante saggi su filtro (Figura 4.2) e mediante analisi dei prodotti in gel alcalino di agarosio (Figura 4.3); il legame al DNA è stato saggiato mediante saggi di legame al DNA su filtro (Appleton *et al.*, 2004).

5.2 Caratterizzazione dell'attività di legame al DNA di UL44

In questo studio, per analizzare l'interazione di UL44 con il DNA, sono stati condotti esperimenti di legame al DNA su filtro e saggi EMSA. La combinazione di queste due metodiche, insieme a studi ITC condotti dalla Prof.ssa Loregian (Loregian *et al.*, 2007), dà un quadro di come la subunità accessoria della DNA polimerasi di HCMV interagisce con il DNA e fornisce alcune nozioni riguardo il meccanismo di processività.

Questi studi possono anche contribuire al chiarimento del legame al DNA sequenza-indipendente. La dipendenza del legame di UL44 al DNA (a), in seguito, la dipendenza di questa interazione dalla lunghezza del DNA (b), l'importanza delle interazioni elettrostatiche nel legame UL44-DNA (c) e quindi verrà tracciato un confronto tra UL44 e altri fattori di processività (d). Saranno inoltre (e) esaminati i risultati ottenuti nell'ottica di dare alcune delucidazioni sul meccanismo di processività.

5.2.a UL44 lega il DNA come dimero

I dati ottenuti in questo lavoro insieme a risultati presentati precedentemente (Weiland *et al.*, 1994; Appleton *et al.*, 2004) mostrano che UL44, diversamente dalle *öpinze* scorrevoli, interagisce direttamente con il DNA e il legame non richiede l'idrolisi di ATP o proteine accessorie. È noto inoltre che UL44 dimerizza e che i mutanti di UL44 che non dimerizzano presentano una ridotta capacità di legare il DNA (Appleton *et al.*, 2004). Questi risultati suggerivano, ma non dimostravano, che UL44 lega il DNA come dimero. I risultati qui ottenuti con i saggi EMSA (Figura 4.8) hanno chiaramente evidenziato che UL44 lega il DNA come dimero. Tale risultato è stato inoltre riconfermato mediante saggi ITC condotti dalla Prof.ssa Loregian (Loregian *et al.*, 2007). I risultati ottenuti da queste analisi indicano che UL44 si lega ad un oligonucleotide ds di 18 bp con una stechiometria di 0,5 molecole di DNA per monomero di UL44, ovvero un dimero di UL44 per molecola di DNA.

5.2.b Legame di UL44 a frammenti di DNA di diversa lunghezza

Gli esperimenti di legame al DNA su filtro con frammenti di DNA di diversa lunghezza hanno mostrato che UL44 è in grado di legare oligonucleotidi a doppio filamento di 12 bp o più lunghi con K_d dell'ordine delle nanomoli e presenta un'affinità apparente 3-8 volte maggiore per gli oligonucleotidi a doppio filamento rispetto a quelli a singolo filamento. I saggi sono stati inoltre ripetuti con oligonucleotidi di sequenza diversa ottenendo valori di K_d simili: questo indica che il legame di UL44 al DNA non è influenzato dalla sequenza nucleotidica. Alcuni di questi esperimenti sono stati condotti anche con UL44 intera purificata da cellule di insetto infettate con un baculovirus ricombinante. UL44 intera presenta un'affinità apparente per il DNA a doppio filamento paragonabile a quella osservata per la proteina tronca (UL44 C290) (Figura 4.7); ciò suggerisce che la capacità di UL44 di legare il DNA risieda nei due terzi N-terminali della proteina e anche che tale attività non sia dipendente da modifiche post-traduzionali. Il fatto che UL44 legni, anche se debolmente, oligonucleotidi di almeno 12 bp (Figura 4.6) suggerisce che la lunghezza minima di DNA a cui UL44 è in grado di legarsi è di 12 bp. Questa stima è in accordo con studi di *modeling* in cui si è visto che il dimero di UL44 è in grado di accomodare 12 bp di doppia elica di DNA (Komazin *et al.*, in preparazione). UL44 lega più fortemente DNA di 15 bp rispetto a 12 bp e lega con ancora maggiore affinità DNA di 18 bp come singolo dimero. Da notare è il fatto che UL44 non è in grado di legare tutto il DNA di 12 e 15 bp, neanche alle più alte concentrazioni (Figura 4.6). Ci sono diversi meccanismi che possono contribuire all'incapacità di arrivare alla saturazione del legame. Una spiegazione è che le estremità del corto frammento di DNA si *örovininoö*, ovvero diventano ss, in presenza delle concentrazioni di sale relativamente basse utilizzate. UL44 si lega al DNA ss con minore affinità rispetto al ds e questa differenza di affinità aumenta al diminuire della

NA (Figura 4.6; Tabella 4.4). Quindi probabilmente le più corti limitano la quantità di DNA che viene legato. Ciò che è che UL44 diffonda e si stacchi velocemente dai frammenti corti. Un meccanismo simile è stato precedentemente dimostrato per UL42 di HSV-1 (Randell & Coen, 2001; Randell *et al.*, 2005).

I risultati dei saggi EMSA (Figura 4.8) hanno mostrato che ad un oligonucleotide di 30 bp si legano due dimeri di UL44, ma mentre il primo dimeri si lega con una affinità simile a quella osservata per l'oligonucleotide di 18 bp, il secondo dimeri si lega con minore affinità; questi risultati sono stati confermati anche da analisi mediante ITC. Questa differenza nell'affinità per i due eventi di legame si spiega alla luce della dipendenza del legame di UL44 al DNA dalla lunghezza del DNA stesso: infatti mentre il primo dimeri si lega ad un DNA > 18 bp, il secondo ha a disposizione solo 15 bp.

5.2.c Il legame di UL44 al DNA coinvolge interazioni elettrostatiche

L'analisi della struttura cristallografica di UL44 ha portato all'ipotesi che UL44 legni il DNA mediante interazioni elettrostatiche tra i residui di lisina carichi positivamente e lo scheletro di fosfati del DNA (Appleton *et al.*, 2004). Alcuni dei risultati ottenuti in questo lavoro sono in accordo con questa ipotesi. Le osservazioni che UL44 lega il DNA in maniera sequenza-indipendente e che presenta maggiore affinità per il DNA ds rispetto al ss suggeriscono infatti che il legame coinvolga interazioni elettrostatiche tra i residui di lisina carichi positivamente e lo scheletro di fosfati del DNA. Questa ipotesi è inoltre supportata da risultati di analisi ITC condotte dalla Prof.ssa Loregian (Loregian *et al.*, 2007) in cui si è visto che il legame è endotermico indicando che l'interazione è entalpicamente sfavorevole e favorita invece da un aumento di entropia. Queste osservazioni a loro volta suggeriscono che l'aumento di entropia è dovuto al rilascio di ioni legati, caratteristica delle interazioni elettrostatiche. Infine, anche l'osservazione che l'affinità di UL44 per il DNA ds diminuisce all'aumentare della forza ionica e che questo effetto è dato dal rilascio di cationi in soluzione è in accordo con l'ipotesi che interazioni elettrostatiche tra i residui di lisina carichi positivamente di UL44 e lo scheletro di fosfati del DNA siano coinvolte nel legame DNA-proteina.

5.2.d Confronto tra UL44 e altri fattori di processività

L'attività di legame al DNA di UL44 presenta diverse analogie con quella di UL42 di HSV-1. UL44 è in grado, come UL42, di legare il DNA direttamente con un'affinità relativamente alta. Inoltre, come per UL42 (Chaudhuri *et al.*, 2002), anche per UL44 l'affinità di legame al DNA diminuisce all'aumentare della forza ionica. I risultati ottenuti in questo lavoro indicano anche che UL44 lega il DNA in maniera indipendente dalla sequenza; in maniera analoga, anche per il legame di UL42 al DNA non è stata riportata specificità di sequenza.

Comunque, dall'analisi dell'attività di legame al DNA delle due proteine emergono anche delle interessanti differenze. Anche se UL44, come UL42, lega con maggiore affinità il DNA ds rispetto al ss, la differenza tra le costanti di affinità per i due tipi di DNA è maggiore per UL42 (Weisshart *et al.*, 1999) (circa 20 volte, invece 3-8 per UL44). La differenza è dovuta probabilmente al fatto che mentre UL42 lega il DNA come monomero (Randell & Coen, 2004), UL44 invece lega il DNA come dimeri. Quindi, legando il DNA come monomero, UL42 ha meno opportunità di interagire con il DNA ss rispetto alla pinza a C del dimeri di UL44.

al DNA, inoltre, assomigliano a quanto osservato per la DNA polimerasi dell'herpesvirus umano di tipo α sia in soluzione che legato al DNA (Chen *et al.*, 2004) ed è stato osservato che la dimerizzazione di PF-8 è importante per il legame al DNA (Chen *et al.*, 2004). Inoltre, in maniera analoga a UL44, il frammento più corto a cui PF-8 è in grado di legarsi è composto da 14 bp (Chen *et al.*, 2004). Anche se non ancora determinato quantitativamente, è probabile che PF-8, come UL44, ma diversamente da UL42, abbia un'affinità apparente per il DNA ds di poco maggiore a quella per il DNA ss. Infatti, esperimenti di cromatografia su DNA *cellulose*, hanno dimostrato che la quantità di PF-8 eluito da DNA ds è solo circa 5 volte maggiore rispetto a quello eluito da DNA ss, in presenza della stessa concentrazione di sale (Chan e Chandran, 2000).

Alcune analogie si riscontrano anche tra UL44 e il fattore di processività della DNA polimerasi mitocondriale, pol B. Pol B, come UL44, ha la capacità intrinseca di legare il DNA e presenta maggiore affinità per il DNA ds (Carrodeguas *et al.*, 2002). Come osservato per UL44, pol B forma omodimeri sia in soluzione sia quando lega il DNA (Carrodeguas *et al.*, 2001; Yakubovskaya *et al.*, 2006). Comunque, i siti di legame al DNA di UL44 e pol B sono diversamente collocati nelle loro strutture quaternarie. Nella struttura cristallografica, l'omodimero in forma di pinza a C di UL44 presenta una cavità centrale che è stato suggerito essere coinvolta nel legame al DNA (Appleton *et al.*, 2004) e può essere quindi analoga al canale centrale di PCNA che circonda il DNA (Gulbis *et al.*, 1996; Krishna *et al.*, 1994). Per pol B invece, delezioni sito-specifiche hanno portato all'identificazione di due *loop* di superficie che si trovano su lati opposti del dimero simmetrico di pol B e che sono richiesti per il legame al DNA ed è stato visto che una singola molecola di DNA deve interagire con residui basici posti su entrambi i lati di pol B per un legame stabile (Carrodeguas *et al.*, 2002; Carrodeguas *et al.*, 2001). La diversità della posizione del sito di legame per il DNA nelle due proteine può spiegare perché UL44 è in grado di legare DNA ds di 12 bp, mentre per pol B si è osservato legame a frammenti di DNA di almeno 47 bp (Carrodeguas *et al.*, 2002). Come UL44, pol B lega la sua subunità catalitica in assenza di DNA e ne stimola l'attività (Loregian *et al.*, 2003; Lim *et al.*, 1999); l'attività di legame al DNA di pol B non è richiesta per stimolare la polimerasi (Carrodeguas *et al.*, 2002; Carrodeguas *et al.*, 2001). È stata riportata in letteratura una correlazione tra la perdita dell'attività di legame al DNA per UL44 mutata e la perdita della capacità di stimolare la DNA polimerasi (Weiland *et al.*, 1994), ma non è chiaro, in questo lavoro, se gli effetti sul legame al DNA siano specifici, in quanto non è stata valutata la capacità dei mutanti di interagire con UL54. Quindi, non è stato rigorosamente dimostrato che l'attività di legame al DNA di UL44 è richiesta per stimolare la DNA polimerasi. In conclusione, sebbene pol B presenti delle caratteristiche simili a UL44, non è chiaro se queste due proteine utilizzino un meccanismo simile per stimolare l'attività delle rispettive DNA polimerasi.

Il fatto che UL44 legni il DNA come dimero suggerisce la possibilità di tracciare un paragone con PCNA. Il trimetro di PCNA è in grado di interagire con numerose proteine cellulari coinvolte nella replicazione del DNA, nella ricombinazione e nel riparo del DNA, così come nel controllo del ciclo cellulare (Maga e Hubscher, 2003). In maniera simile, il dimero di UL44, quando legato al DNA e associato ad UL54, può interagire con altre proteine virali e/o cellulari durante la replicazione virale. Dati riportati in letteratura (Ertl e Powell, 1992; Weiland *et al.*, 1994; Krosky *et al.*, 2003; Marschall *et al.*, 2003; Loregian *et al.*, 2004 a; Loregian *et al.*, 2004 b; Prichard *et al.*, 2005) e i risultati riportati in questo lavoro di tesi (vedi Risultati paragrafo 4.3)

e UL44 può interagire non solo con UL54, ma anche con

5.2.e UL44: legame al DNA e meccanismo di processività

Un ruolo chiave di tutti i fattori di processività è quello di impedire la dissociazione della DNA polimerasi dal DNA senza ritardarne la traslocazione. PCNA e altre δ pinze scorrevoli risolvono questo problema formando una struttura ad anello che tiene legata la polimerasi e che diffonde liberamente lungo il DNA durante la traslocazione. Diversamente, i fattori di processività degli herpesvirus legano il DNA con elevata affinità. Nel caso di UL42, questo non rallenta la traslocazione del DNA (Weissbart *et al.*, 1999), evidentemente perché UL42 può diffondere lungo il DNA alla stessa velocità di traslocazione della polimerasi (Randell & Coen, 2001; Randell *et al.*, 2005). Anche se non è stato ancora dimostrato, è verosimile che UL44, come UL42 e PCNA, possa scorrere lungo lo stampo di DNA. Come suggerito precedentemente per UL42 (Randell & Coen, 2001), i residui basici di UL44 possono essere posizionati in modo da interagire con le cariche negative dei gruppi fosfato del DNA per facilitare sia il legame ad alta affinità che lo scorrimento lungo il DNA. I risultati ottenuti in questo lavoro grazie all'analisi del legame UL44-DNA in presenza di tamponi contenenti sali diversi, indicano che in seguito al legame di un dimero di UL44 vengono rilasciati in soluzione circa 8 cationi dal DNA. Questi risultati indicano che circa 8 interazioni carica-carica tra residui basici della proteina e gruppi fosfato del DNA sono importanti per questo legame. Sono due le regioni di UL44 ricche di residui basici: una faccia ad α -elica che comprende residui di arginina e in maggior numero di lisina, e un *loop* (aa 163-175) che contiene residui di arginina e lisina. Questo *loop* non è visibile nella struttura cristallografica, ma può estendere la pinza a C del dimero attorno al DNA. UL44 può quindi funzionare come un fattore di processività ibrido che circonda il DNA ds, come PCNA, e che interagisce con il DNA mediante interazioni elettrostatiche, come UL42.

5.3 Ricerca e caratterizzazione preliminare di partners proteici cellulari di UL44

In questo studio sono stati ricercati interattori proteici cellulari di UL44 attraverso uno *screening* con il sistema del doppio ibrido utilizzando una libreria di cDNA cellulare. Come riportato nei Risultati (paragrafo 4.3.e), 7 proteine, ovvero *cdc2*, *cdk2*, EXOSC9, TOPORS, Daxx, Ubc9 e SP100, sembrano poter interagire con UL44. L'interazione è stata riconfermata con saggio X-gal su lieviti trasformati con plasmidi contenenti il gene per le proteine intere *cdc2*, *cdc2*, EXOSC9, SP100 e Ubc9; inoltre per le stesse proteine l'interazione con UL44 è stata riconfermata anche tramite saggio del doppio ibrido δ invertito e mediante saggi *GST-pulldown*.

Un primo obiettivo futuro sarà quello di riconfermare anche gli altri 2 probabili *partners* di UL44, Daxx e TOPORS, con queste tre metodiche; in seguito potrebbe essere utile mutagenizzare tali proteine per individuare porzioni delle proteine o singoli amminoacidi responsabili del legame con UL44. Inoltre, per investigare il significato funzionale di queste interazioni, sarà necessario effettuare ulteriori studi.

Di seguito verranno espone brevemente alcune ipotesi sul potenziale ruolo funzionale dell'interazione tra UL44 e le 7 proteine identificate nello studio.

cdk2 può legare direttamente PCNA, il fattore eucariotico, e che tale complesso è in grado di fosforilare altri interattori di PCNA, come il *Replication Factor C* e la DNA ligasi I (Koundrioukoff *et al.*, 2000). Inoltre sembra che durante la replicazione di HSV-1 cdc2 sia in grado di legare UL42 (omologo strutturale e funzionale di UL44), e che questo permetta un'ottimale trascrizione di geni virali tardivi. Oltre ad UL42, vi sono altre proteine virali coinvolte nella replicazione di HSV-1 che possono venire fosforilate da chinasi cellulari: UL9 (che lega UL42), UL30 (subunità catalitica della DNA polimerasi), UL52 (elicasi/primasi) e UL29 (che lega ssDNA). Pertanto è stato anche ipotizzato che UL42 potrebbe fungere da adattatore o ponte per legare substrati che poi vengono fosforilati dalla chinasi cdc2 (vedi Introduzione, Paragrafo 1.7.b).

Anche per UL44 si potrebbe forse ipotizzare un'interazione con cdc2 e cdk2 con funzione simile a quella identificata per PCNA e UL42, dato che il monomero di UL44 ha una struttura ed una funzione molto simile a questi due fattori di processività (vedi Introduzione, Paragrafo 1.4.c). A tale scopo potrebbe essere utile verificare con saggi di fosforilazione *in vitro* se avviene la fosforilazione di UL44 in presenza di cdc2 o di cdk2. Inoltre si potrebbero effettuare degli esperimenti di immunoprecipitazione, in cellule infettate o meno con HCMV, con anticorpi che riconoscono porzioni di UL44, di cdc2 o di cdk2 e successivamente saggiare l'attività chinasi dell'immunoprecipitato in presenza o meno di roscovitina (un inibitore selettivo delle chinasi cdc2 e cdk2).

Infine, per studiare più in generale il ruolo funzionale di cdc2 e cdk2 durante la replicazione di HCMV si potrebbero fare degli esperimenti trattando cellule infettate con HCMV con siRNA diretti contro i geni *cdc2* e/o *cdk2*. Infatti, in precedenti studi è stato osservato che durante la replicazione di HCMV un'attività chinasi ciclino α dipendente sensibile a roscovitina è necessaria sia per un'ottimale espressione di geni virali IE e la progressione dell'infezione (Sanchez & Spector, 2003), sia per un'efficiente espressione e modifica post-traduzionale di proteine virali e per la produzione di particelle virali extracellulari (Sanchez & Spector, 2006).

EXOSC9

EXOSC9 è un componente dell'exosoma umano, un complesso di numerose proteine che ha un ruolo nella regolazione e nella coordinazione di diversi processi riguardanti il metabolismo dell'RNA, tra cui il processamento nucleolitico del precursore dell'RNA durante la sintesi ribosomale, il processamento di *small nuclear RNAs* e la degradazione degli *unspliced nuclear mRNAs* (vedi Introduzione, Paragrafo 1.6.c).

Non vi è alcuna evidenza in letteratura dell'interazione tra EXOSC9 e proteine erpetiche, ma dato che UL44 è abbondantemente espressa anche nelle fasi tardive della replicazione (ha infatti una cinetica di espressione *leaky-late*, si potrebbe ipotizzare un suo ruolo nel processamento dell'RNA. Per verificare tali ipotesi si potrebbe studiare il ruolo di EXOSC9 durante la replicazione di HCMV infettando le cellule con il virus e trattandole con con siRNA diretti contro EXOSC9.

Ubc9, SP100, Daxx e TOPORS

Ubc9 (un enzima coinvolto nella cascata sumoilativa), SP100 (una proteina in grado di legare le HP-1 [*Histon Protein-1*]), TOPORS (*topoisomerase 1-binding RS protein*, una proteina in grado di legare la topoisomerasi I) e Daxx (*death associated protein 6*, una proteina che controlla l'apoptosi) sono tutte proteine facenti parte dei *Nuclear bodies* (vedi Introduzione, Paragrafo 1.5).

meno quelli per i quali questo aspetto è stato studiato, in compiano la replicazione e inizino la loro trascrizione, nelle cui vicinanze depositano il loro genoma. È stato osservato che tali virus sono in grado di modificare la struttura degli NB o di distruggerli nei primi stadi dell'infezione (Maul, 1998).

Durante la replicazione di HSV-1 l'espressione genica, la replicazione e l'incapsidazione del DNA virale avvengono in domini nucleari globulari deputati alla replicazione. Questi domini contengono tutte le proteine virali necessarie alla replicazione, e la formazione di questi compartimenti replicativi è in parte dovuta all'interazione con gli NB. Il DNA virale viene depositato in prossimità degli NB e alcuni trascritti IE virali possono essere visualizzati in loro vicinanza. Nelle prime fasi di formazione dei compartimenti di replicazione virale, ICP0 fa diminuire la frazione di PML sumoilato legando con il suo C-terminale l'enzima HAUSP, distruggendo così gli NB (Burkham *et al.*, 1998). Inoltre ICP0, per mezzo di UbcH5, è in grado di legare indirettamente SP100, di farla uscire dagli NB e portarla al proteasoma (Gu & Roizman, 2003). In uno stadio successivo vi è la formazione del sito prereplicativo, dove, per mezzo della subunità catalitica UL30 della DNA polimerasi viene reclutato PML. Pare non sia necessaria la presenza della subunità accessoria UL42, sebbene essa incrementi il reclutamento di PML (Burkham *et al.*, 1998).

Sembra che anche durante la replicazione di HCMV la distruzione degli NB giochi un ruolo fondamentale, infatti a 2 h dall'infezione le proteine IE1 (IE72) e IE2 (IE86) colocalizzano con gli NB e dopo 4 h sono distribuite in tutto il nucleo, cosa che è accompagnata dalla completa distruzione degli NB. Pare inoltre che sia sufficiente IE1 per la distruzione degli NB, che quindi sembra avere una funzione simile a quella della proteina ICP0 di HSV-1 (Korioth *et al.*, 1996). IE1 provoca la de-sumoilazione di PML, però, al contrario di ICP0, non può condurre substrati alla degradazione proteasomiale (Muller & Dejean, 1999). Inoltre IE1 può venire sumoilata a livello dei residui di lisina 175 e 180 e pare che tale modifica sia associata ad un aumento di IE1 (Ishov *et al.*, 1997).

Infine, recentemente è stato scoperto che una delle proteine del tegumento di HCMV, pp71, che ha attività transattivante, si accumula a livello degli NB prima che vengano trascritti i geni virali IE. L'entrata e l'uscita di pp71 negli NB è facilitata dal suo legame con la regione ad elica avvolta di Daxx, che a sua volta lega, attraverso il suo C-terminale, PML sumoilata. La proteina pp71 è così in grado di far fuoriuscire proteine dagli NB e di condurre Daxx alla degradazione proteasomiale (Ishov *et al.*, 2002). Sembra che quest'ultima, insieme a PML, sia molto importante nella difesa della cellula ospite contro HCMV, infatti facendo sovraesprimere tale proteina in linee cellulari si è notata inibizione della trascrizione di geni virali IE (Woodhall *et al.*, 2006).

Il fatto che nel nostro studio siano state identificate ben quattro proteine facenti parte degli NB come probabili interattori della proteina UL44 di HCMV, suggerisce che queste interazioni potrebbero essere significative. È noto che Ubc9 è in grado di interagire direttamente con Daxx, TOPORS e SP100 e che Daxx e SP100 interagiscono in maniera indiretta. Le interazioni tra UL44 e le proteine Ubc9 e SP100 sono state riconfermate anche mediante saggi *GST-pulldown*. In presenza di entrambe tuttavia, mentre si è riconfermata l'interazione tra UL44 e Ubc9, SP100 non si lega ad UL44. Questo può significare anche che forse Ubc9 ed SP100 competono per lo stesso sito di legame su UL44, e che l'interazione con Ubc9 è più forte o forse le condizioni sperimentali adottate non sono adatte per studiare in dettaglio le interazioni che intercorrono tra queste tre proteine. Però l'osservazione che Ubc9 è in grado di interagire direttamente con Daxx, TOPORS e SP100 e che Daxx e SP100 interagiscono tra loro in maniera indiretta, potrebbe suggerire il seguente modello di complesso

...e proteine (vedi Figura 5.1). In tale modello, Ubc9 è diretta, mentre le interazioni tra UL44 e Ubc9. A questo stadio del nostro studio è difficile stabilire se questo modello sia effettivamente corretto ed inoltre è difficile fare ipotesi certe sulla funzione del legame di UL44 a Ubc9, ma, dato che SP100 e Daxx sono degli inattivatori trascrizionali e che la loro attività viene inibita da proteine di HSV-1 e di HCMV (vedi sopra), si potrebbe ipotizzare che UL44 possa legarli al fine di indurli, in qualche modo, alla degradazione. Essendo invece TOPORS un attivatore trascrizionale, esso potrebbe forse legare UL44 per promuovere l'attivazione della trascrizione di alcuni geni virali e/o cellulari.

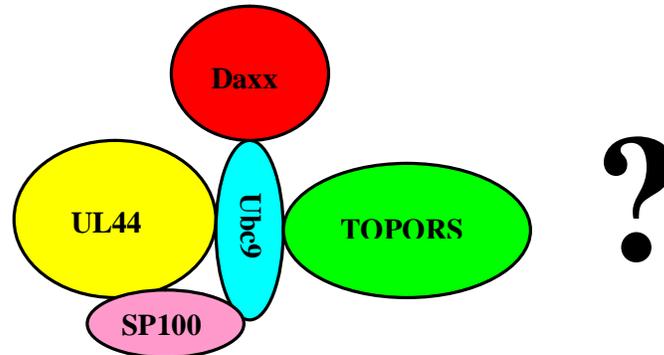


Figura 5.1: Modello dell'ipotetico complesso proteico costituito da UL44 e Ubc9, Daxx, SP100 e TOPORS.

Poiché UL44 interagisce con Ubc9, si può ipotizzare che possa venire sumoilata. A sostegno di tale ipotesi, abbiamo osservato che in UL44 è presente la sequenza ϕ consenso per la sumoilazione (vedi Figura 5.2). Forse, tale modifica in UL44 potrebbe mediare una funzione di riparo del DNA simile a quella vista per l'omologo yPCNA (la sumoilazione conferisce infatti alla proteina PCNA la capacità di avere funzione di riparo del DNA) (Gill, 2004).

Anche in questo caso, per verificare tutte queste ipotesi si potrebbero forse studiare gli effetti di siRNA diretti contro i geni cellulari di interesse in cellule infettate da HCMV.

```

1  MDRKTRLSEPPTLALRLKPKYKTAIQQLRSVIRAL $\phi$ KENTTVTFLPTPSLILQTVRSHCVSK
61  ITFNSSCLYITDKSFQPKTINNSTPLLGNFMYLTSSKDLTKFYVQDISDLSAKISMCAPD
121 FNMEFSSACVHGQDIVRESENSAVHVDLDFGVVADLLKWIGPHTRVKRNVKKAPCPTGTV
181 QILVHAGPPAIFILTNNGSELEFTANNRVSFHGVKNMRINVQLKNFYQTLNCAVTKLPC
241 TLRIVTEHDTLLYVASRNGLFAVENFLTEEPFQRGDPFDKNYVGNSSGKSRGGGGGGGSLS
301 SLANAGGLHDDGPGLDNDLMNEPMGLGGLGGGGGGGKKHDRGGGGGSGTRKMSSGGGGG
361 DHDHGLSSKEKYEQHKITSYLTSGGGGGGGGGGGG LDRNSGNYFND $\phi$ KEE $\phi$ SDSEDSVT
421 FEFV $\phi$ PNTKKQK $\phi$ CG

```

Figura 5.2: Sequenza amminoacidica di UL44. La parte in giallo corrisponde agli aa 1-290 di UL44 (UL44 Δ C290), di cui è stata risolta la struttura cristallografica (Appleton *et al.*, 2004). La parte in grigio corrisponde al *connector loop* (aa 129-142) che è coinvolto nell'interazione con UL54; in particolare gli aa importanti per il legame a UL54 sono Gln133, Asp134, Ile135, Val136 (indicati in grigio scuro). I residui importanti per la dimerizzazione di UL44 (Leu86, Leu87, Phe121) sono segnati in azzurro. In viola sono indicate le lisine (Lys35, Lys158, Lys224, Lys237) potenzialmente implicate nel legame al DNA; anche il *loop* disordinato corrispondente agli amminoacidi 163-174 è potenzialmente implicato nel legame al DNA. In verde è evidenziato il segnale di localizzazione nucleare (NLS2, 425-PNTKKQK-431). Infine, in rosso è indicata la putativa sequenza ϕ consenso per la sumoilazione (ϕ KXE, dove ϕ è solitamente un amminoacido idrofobico e X un amminoacido qualunque).

6. Bibliografia

- Adlish JD, Lahijani RS, St Jeor SC.; Identification of a putative cell receptor for human cytomegalovirus; J. Virol., vol 176, pag 3376345,1990.
- Advani S. J., Weichselbaum R. R. and Roizman B.; Herpes simplex virus 1 activates cdc2 to recruit topoisomerase II for post-DNA synthesis expression of late genes, PNAS, vol 100 n° 8, pag 4825-4830, 2003.
- Advani S.I J., Weichselbaum R. R. and Roizman B., The role of cdc2 in the expression of herpes simplex virus genes, Proc. Natl Acad. Sci. USA, vol 97 n° 20, pag 10996-11001, 2000.
- Advani sunil J., Weichselbaum Ralph R. and Roizman Bernard, cdc2 Cyclin-Dependent Kinase Binds and Phosphorylates Herpes Simplex Virus 1 UL42 DNA Synthesis Processivity Factor, J. Virol., vol 75 n° 21, pag 10326-10333, 2001.
- Agulnick A.D., Thompson J.R., Iyengar S., Pearson G., Ablashi D., Ricciardi R.P.; Identification of a DNA-binding protein of human herpesvirus 6, a putative DNA polymerase stimulatory factor; J. Gen. Virol., vol 74, pag 1003-1009, 1993.
- Ahn J.H., Jang W.J., Hayward G.S.; The human cytomegalovirus IE2 and UL112-113 proteins accumulate in viral DNA replication compartments that initiate from the periphery of promyelocytic leukemia protein-associated nuclear bodies (PODs or ND10); J. Virol., vol 73, pag 10458-10471, 1999.
- Alderuccio F., Chan E. K. L. and Tan E. M.; Molecular characterization of an autoantigen of PM-Scl in the Polymyositis/Scleroderma overlap syndrome: a unique and complete human cDNA encoding an apparent 75-kD acidic protein of the nucleolar complex; J. Exp. Med., vol 173 pag 941-952, 1991.
- Alvisi G., Jans D. A. and Ripalti A.; Human Cytomegalovirus (HCMV) DNA Polymerase Processivity Factor ppUL44 Dimerizes in the Cytosol before Translocation to the nucleus; Biochemistry, vol 45 n° 22, pag 6866-6972, 2006.
- Alvisi G., Jans D. A., Guo J., Pinna L. and Ripalti A.; A protein kinase CK2 site flanking the nuclear targeting signal enhances nuclear transport of human cytomegalovirus ppUL44; Traffic, vol 6, pag 1-12, 2005.
- Appleton B. A., Brooks Justin, Loregian A., Filman D. J., Coen Donald M., Hogle J. M.; Crystal Structure of the Cytomegalovirus DNA Polymerase Subunit UL44 in Complex with the C Terminus from the Catalytic Subunit; J. Biol. Chem., vol 281 n°8, pag 5224-5232, 2006.
- Appleton, B.A., Loregian, A., Filman, D.J., Coen, D.M., Hogle, J.M.. The Cytomegalovirus Dna Polymerase Subunit UL44 Forms a C Clamp-Shaped Dimer; Mol. Cell, vol 15, pag 1-20, 2004.
- Biron K.K., Harvey R.J., Chamberlain S.C., *et al.*, Potent and selective inhibition of human cytomegalovirus replication by 1263W94, a benzimidazole L-riboside with a unique mode of action; Antimicrob. Agents Chemother., vol 46, pag 2365-2372, 2002.
- Bogerd, H.P., R.A. Fridell, W.S. Blair, and B.R. Cullen; Genetic evidence that Tat proteins of human immunodeficiency virus types 1 and 2 can multimerize in the eukaryotic cell nucleus; J. Virol., vol 67, pag 5030-5034, 1993.
- Bold S, Ohlin M, Garten W, Radsak K.; Structural domains involved in human cytomegalovirus glycoprotein B-mediated cell-cell fusion; J. Gen. Virol., vol 77, pag 229762302, 1996.

Britt WJ, Stagno S, Pass RF.; ÷Symptomatic
infection in infant born to mothers with preexisting
; Pediatric, vol 104, pag 55-60, 1999.

- Borden B. L. K.; ÷Pondering the promyelocytic Leukemia Protein (PML) Puzzle: Possible Functions of PML Nuclear Bodies; Mol. Cell. Biol., vol 22 n°15, pag 5259-5269, 2002.
- Breeden, L., and K. Nasmyth; ÷Regulation of the HO gene; Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol, vol. 50, pag 643-650, 1985.
- Brent, R., and M. Ptashne; 2A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor; Cell, vol 43, pag 729-736, 1985.
- Britt WJ, Mach M; ÷Human cytomegalovirus glycoproteins; Intervirology, vol 39, pag 401-412, 1996.
- Brower R., Pruijn G. J. M. and van Venrooij W.; ÷The human exosome: an autoantigenic complex of exoribonucleases in myositis and scleroderma; Arthritis Res., vol 3 n°2, pag 102-106, 2001.
- Burkham J., M. Coen D., and Weller S.; ÷ND10 Protein PML Is Recruited to Herpes Simplex Virus Type 1 Prereplicative Sites and Replication Compartments in the Presence of Viral DNA Polymerase; J. Virol., vol 72 n°12, pag 10100-10107, 1998.
- Carrodeguas JA, Pinz KG, Bogenhagen DF; ÷DNA binding properties of human pol gammaB; J Biol Chem, vol 277(51), pag 50008-50014, 2002.
- Carrodeguas JA, Theis K, Bogenhagen DF, Kisker C.; ÷Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase gamma, Pol gamma B, functions as a homodimer; Mol Cell, vol 7(1), pag 43-54, 2001.
- Chan H. Y., Warrick J. M., Andriola I., Merry D. and Bonini N. M.; ÷Genetic modulation of polyglutamine toxicity by protein conjugation pathways in Drosophila; Hum. Mol. Genet., vol 11, pag 2895-2904, 2002.
- Chan SR, Chandran B.; ÷Characterization of human herpesvirus 8 ORF59 protein (PF-8) and mapping of the processivity and viral DNA polymerase-interacting domains; J Virol, vol 74(23), pag 10920-10929, 2000.
- Chaudhuri M, Parris DS.; ÷Evidence against a simple tethering model for enhancement of herpes simplex virus DNA polymerase processivity by accessory protein UL42; J Virol, vol 76(20), pag 10270-10281, 2002.
- Chen X, Lin K, Ricciardi RP.; ÷Human Kaposi's sarcoma herpesvirus processivity factor-8 functions as a dimer in DNA synthesis; J Biol Chem, vol 279(27), pag 28375-28386, 2004.
- Chien, C.-T., P.L. Bartel, R. Sternglanz., and S. Fields; ÷ The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 88, pag 9578-9582, 1991.
- Coen, D. M.; ÷Molecular aspects of antiherpesvirus drugs; Seminars Virol., vol 3, pag 3-12, 1992.
- Coligan JE.; In Current Protocols In Protein Science.: Wiley, Brooklyn, NY, 1996.
- Colletti K. S.; ÷Human cytomegalovirus UL84: proposed initiator protein of lytic DNA replication; presented at *The 30th Herpesvirus Workshop*, 2005, Turku, Finland, Abstract 1.13.
- Colletti K. S., Xu Y., Yamboliev I., *et al.*; ÷Human cytomegalovirus UL84 is a phosphoprotein that exhibits UTPase activity and is a putative member of the DExD/H box family of proteins; J Biol Chem, vol 280, pag 11955-11960, 2005.

- urg K. M., Xu Y., Pari G. S.; *Human cytomegalovirus RNA stem-loop sequence found within the RNA/DNA*; *J Virol.*, vol 81, pag 7077-7085, 2007.
- Compton T, Nepomuceno RR, Nowlin DM.; *Human cytomegalovirus penetrates host cells by pH-independent fusion at the cell surface*; *Virology*, vol 191, pag 3876395, 1992.
 - Compton T, Nowlin DM, Cooper NR.; *Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate*; *Virology*, vol 193, pag 8346841, 1993.
 - Davison A.J., Scott J.E.; *The complete DNA sequence of varicella-zoster virus*; *J. Gen. Virol.*, vol 67, pag 1759-1816, 1986.
 - De Clercq E., Holy A.; *Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs*; *Nat. rev. Drug Discov.*, vol 4, pag 928-940, 2005.
 - deHaseth PL, Lohman TM, Record MT, Jr.; *Nonspecific interaction of lac repressor with DNA: an association reaction driven by counterion release*; *Biochemistry (Mosc)*, vol 16(22), pag 4783-4790, 1977.
 - Digard P., Bebrin W., Weisshart K., Coen D.M.; *The extreme C-terminus of herpes simplex virus DNA polymerase is crucial for functional interaction with processivity factor UL42 and for viral replication*; *J. Virol.*, vol 67, pag 398-406, 1993 b.
 - Duprez E., Saurin A. J., Desterro J. M., Lallemand-Breitenbach V., Howe K., Boddy M.N., Solomon E., de Thè H., Hay R. T. and Freemont P. S.; *SUMO-1 modification of the acute promyelocytic leukaemia protein PML: implications for nuclear localisation*; *J. Cell Sci.*, vol 112, pag 381-393, 1999.
 - Durfee T., Becherer K., Chen P.-L., Yeh S.-H., Yang Y., Kilburn A. E., Lee W.-H. and Elledge S. J.; *The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit*; *Genes Dev.*, vol 7, pag 555-569, 1993.
 - Elion G.B., Furman P.A., Fyfe J.A., de Miranda P., Beauchamp L., Schaeffer H.J.; *Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine*; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol 74, pag 5716-5720, 1977.
 - Epstein, I.R.; *Cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a finite one-dimensional lattice. A model for ligand-oligonucleotide interactions*; *Biophys Chem*, vol 8(4), pag 327-39, 1978.
 - Ertl, P. F., K. L. Powell.; *Physical and functional interaction of human cytomegalovirus DNA polymerase and its accessory protein (ICP36) expressed in insect cell*; *J. Virol.*, vol 66, pag 4126-4133, 1992.
 - Fabumni R. P., Wigley W. C., Thomas P. J. and DeMartino G. N.; *J. Cell. Sci.*, vol 114, pag 29-36, 2001.
 - Fan Z., Zhuo Y., Tan X., Yuan J., Quiang B., Yan J., Peng X. and Gao G. F.; *SARS-CoV Nucleocapsid Protein Binds to hUbc9, a Ubiquitin Conjugating Enzyme of the Sumoylation System*; *J. Med. Virol.*, vol 78, pag 1365-1373, 2006.
 - Fields, S., and O.-K. Song; *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*; *Nature*, vol 340, pag 245-246, 1989.
 - Frankel, A.D., and P.S. Kim; *Modular structure of transcription factors: implications for gene regulation*; *Cell*, vol 65, pag 717-719, 1991.
 - Gallo M.L., Dorsky D.I., Crumpacker C.S., Parris D.S.; *The essential 65-kilodalton DNA-binding protein of herpes simplex virus stimulates the virus-encoded DNA polymerase*; *J. Virol.*, vol 63, pag 5023-5029, 1989.

- positivity and enhances replication fidelity; J. Virol., vol 76, pag 7705-7712, 2002.
- Ishov A. M., Vladimirova O. V. and Maul G. G.; *Human Cytomegalovirus Immediate Early Interaction with Host Nuclear Structures: Definition of an Immediate Transcript Environment*; J. Cell. Biol., vol 138 n°1, pag 5-16, 1997.
 - Ishov A. M., Vladimirova O. V. and Maul G. G.; *Daxx-Mediated Accumulation of Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp71 at ND10 Facilitates Initiation of Viral Infection at These Nuclear Domains*; J. Virol., vol 76 n°15, pag 7705-7712, 2002.
 - Keay S, Baldwin B.; *Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment*; J Virol., vol 65, pag 5124-5128, 1991.
 - Kemble GW, Mocarski ES.; *A host cell protein binds to a highly conserved sequence element (pac-2) within the cytomegalovirus genome*. J Virol., vol 63, pag 4715-4728. 1989
 - Koriotti Frank, Maul Gerd G., Placitner Bodo, Stamminger Thomas and Frey Jurgen *The Nuclear Domain 10 (ND10) Is Disrupted by the Human Cytomegalovirus Gene Product IE1*; Experimental Cell Research, vol 229 pag 155-158, 1996.
 - Krishna TS, Kong XP, Gary S, Burgers PM, Kuriyan J.; *Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA*; Cell, vol 79(7), pag 1233-1243, 1994.
 - Krosky P.M., Baek M.C., Coen D.M.; *The human cytomegalovirus UL97 protein kinase, an antiviral drug target, is required at the stage of nuclear egress*; J. Virol., vol 77, pag 905-914, 2003.
 - Koundrioff S., Jönsson Z. O., Hasan S., Jong R. N., van der Vliet P. C., Hottiger M. O. and Hubscher U.; *A Direct Interaction between Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) and cDK2 Targets PCNA-interacting Proteins for Phosphorylation*; J. Biol. Chem., vol 275 n°30, pag 22882-22887, 2000.
 - LaMorte V. J., Dyck J. A., Ochs R. L. & Evans R. M.; *Localization of nascent RNA and CREB binding protein with the PML-containing nuclear body*; Proc. Natl Acad. Sci. USA, vol 95, pag 4991-4996, 1998.
 - Larder B.A., Kemp S.D., Darby G.; *Related functional domains in virus DNA polymerases*; EMBO J., vol 6, pag 169-175, 1987.
 - Lavau C.; *The acute promyelocytic leukaemia-associated PML gene is induced by interferon*; Oncogene, vol 11, pag 871-876, 1995.
 - Lehner B. and Sanderson C. M. *A Protein Interaction Framework for Human mRNA Degradation*; Genome Res., pag 1315-1323, 2004.
 - Lim SE, Longley MJ, Copeland WC.; *The mitochondrial p55 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance*; J Biol Chem, vol 274(53), pag 38197-38203, 1999.
 - Limaye A.P., Bakthavatsalam R., Kim H.W.; *Late-onset CMV disease in liver transplant recipients despite antiviral prophylaxis*; Transpl., vol 78, pag 9-16, 2004.
 - Lin K., Dai C.Y., Ricciardi R.P.; *Cloning and functional analysis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus DNA polymerase and its processivity factor*; J. Virol., vol 72, pag 6228-6232, 1998.
 - Lindhal T.; *Instability and decay of the primary structure of DNA*; Nature, vol 362, pag 709-715, 1993.

R., *et al.*; δ Human cytomegalovirus UL84 protein signals and shuttles between the nucleus and the ag 10274-10280.

- Little E., Stuart A. D., Chee M. S.; δ Human cytomegalovirus UL97 open reading frame encodes a protein that phosphorylates the antiviral nucleoside analogue ganciclovir; *Nature*, vol 358, pag 160-162, 1992.
- Loh L.C., Balachandran N., Britt W.J.; δ Characterization of a membrane-associated phosphoprotein of murine cytomegalovirus (pp50) and its immunological cross-reactivity with a human cytomegalovirus protein; *Virology*, vol 183, pag 181-194, 1991.
- Lohman T.M., Mascotti D.P.; δ Thermodynamics of ligand-nucleic acid interactions; *Methods Enzymol*, vol 212, pag 400-424, 1992.
- Loregian A., Marsden H.S., Palù G.; δ Protein-protein interaction as target for antiviral chemotherapy; *Rev. Med. Virol.*, vol 12, pag 239-262, 2002.
- Loregian, A., Appleton B., Hogle J. M., Coen D. M.; δ Residues of Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Catalytic Subunit UL54 That are Necessary and Sufficient for Interaction with the Accessory Protein UL44; *J. Virol.*, vol 78 n°1, pag 158-157, 2004 a.
- Loregian, A., Appleton B., Hogle Ja. M., Coen D. M.; δ Specific Residues in the Connector Loop of the Human Cytomegalovirus DNA Polymerase Accessory Protein UL44 Are Crucial for Interaction with the UL54 Catalytic Subunit; *J. Virol.*, vol 78 n°17, pag 1-9, 2004 b.
- Loregian, A., Rigatti, R., Murphy, M., Schievano, E., Palù, G., Marsden, H.S.; δ Inhibition of human cytomegalovirus (HCMV) DNA polymerase by C-terminal peptides from the UL54 subunit; *J. Virol.* 77, 8336-8344, 2003.
- Loregian A., Palù G.; δ Disruption of the interactions between the subunits of herpesvirus DNA polymerases as a novel antiviral strategy; *Clin. Microbiol. Infect.*, vol 11, pag 437-446, 2005 a.
- Loregian A., Palù G.; δ Disruption of protein-protein interactions: towards new targets for chemotherapy; *J. Cell. Physiol.*, vol 204, pag 750-762, 2005 b.
- Loregian A., Coen D.M.; δ Selective anti-cytomegalovirus compounds discovered by screening for inhibitors of subunit interactions of the viral polymerase; *Chem. Biol.*, vol 13, pag 191-200, 2006.
- Loregian A., Sinigaglia E., Mercorelli B., Palù G., Coen D.M.; δ Binding parameters and thermodynamics of the interaction of the human cytomegalovirus DNA polymerase accessory protein, UL44, with DNA: implications for the processivity mechanism; *Nucleic Acids Res.*, vol 35, pag 4779-4791, 2007.
- Maga G, Hubscher U.; δ Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners; *J Cell Sci*, vol 116(Pt 15), pag 3051-3060, 2003.
- Mar E. C., Patel P. C. and Huang E. S.; δ Human cytomegalovirus-associated DNA polymerase and protein kinase activities; *J. Gen. Virol.*, vol 57, pag 149-156, 1981.
- Marschall M., Freitag M., Suchy Y., Ramaker D., Kupfer R., Hanke M. and Stamer T.; δ The protein kinase pUL97 of human cytomegalovirus interacts with and phosphorylates the DNA polymerase processivity factor pUL44; *Virology*, vol 311, pag 60-71, 2003.
- Masse MJ, Karlin S, Schachtel GA, Mocarski ES. δ Human cytomegalovirus origin of DNA replication (oriLyt) resides within a highly complex repetitive region. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, vol 89, pag 5246-5252, 1992.

- J., Field A.K.; "The structure and function of the HSV proteins: defining novel antiviral targets"; *Antiv. Res.*, vol 20,
- Maul G. G. and Negorev D.; "Properties and Assembly Mechanism of ND10, PML Bodies or PODs"; *J. Struct. Biol.*, vol 129, pag 278-287, 2000.
 - Maul G. G. "Nuclear domain 10, the site of the DNA virus transcription and replication"; *BioEssays*, vol 20, pag 660-667, 1998.
 - McGavran MH, Smith MG. "Ultrastructural, cytochemical and microchemical observations on cytomegalovirus (salivary gland virus) infection of human cells in tissue culture". *Exp Mol Pathol*, vol 4, pag 1610, 1965.
 - McGhee, J.D. and P.H. von Hippel; "Theoretical aspects of DNA-protein interactions: co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice"; *J Mol Biol*, vol 86(2), pag 469-89, 1974.
 - Mercorelli B., Sinigaglia E., Loregian A., Palù G.; "Human cytomegalovirus DNA replication: antiviral targets and drugs"; *Rev. Med. Virol.*, vol 17, pag 1-34, 2007.
 - Mocarski E.S.; "Immunomodulation by cytomegalovirus: manipulative strategies beyond evasion"; *Trends Microbiol.*, vol 10, pag 332-339, 2002.
 - Mocarski E.S.; "Immune escape and exploitation strategies of cytomegalovirus: impact on and imitation of the major histocompatibility system"; *Cell. Microbiol.*, vol 6, pag 707-717, 2004.
 - Moretti, P., K. Freeman, L. Coodly, and D. "Shore Evidence that a complex of SIR proteins interacts with the silencers and telomere-binding protein RAP1". *Genes Dev.*, vol 8, pag 2257-2269, 1994.
 - Mukherjee Devi, Gao Min, O'Connor J. Patrik, Raijmakers Reinout, Pruijijn Ger, Lutz Carol S. and Wilusz Jeffrey; "The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements"; *EMBO J.*, vol 21 n°1 e 2, pag 165-174, 2002.
 - Muller S., Matunis M. J. and Dejean A.; "Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus"; *EMBO J*, vol 17, pag 61-70, 1998.
 - Muratani, M., Gerlich D., Janicki S. M., Gebhard M., Elis R. and Spector D. L.; "Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus"; *Nature Cell Biol*, vol 21, pag 1-21, 2001.
 - Negorev Dmitri and Maul Gerd G.; "Cellular proteins localized at and interacting within ND10/PML nuclear bodies/PODs suggest functions of a nuclear depot"; *Oncogene*, vol 20, pag 7234-7242, 2001.
 - Nicholas J.; "Determination and analysis of the complete nucleotide sequence of human herpesvirus"; *J. Virol.*, vol 70, pag 5975-5989, 1996.
 - Nischiyama Y, Maeno K. and Yoshida S.; "Characterization of human cytomegalovirus-induced DNA polymerase and the associated 3'5' exonuclease"; *J. Virol.*, vol 124, pag 221-231, 1983.
 - Orth K., Xu Z., Mudgett M. B., Bao Z. Q., Palmer L. E., Bliska J. B., Mangel W. F., Staskawicz B. and Dixon J. E.; "Disruption of signaling by Yersinia effector YOPj, a ubiquitin-like protein protease"; *Science*, vol 290, pag 1594-1597, 2000.
 - Otterlei M., Warbrick E., Nagelhus T.A., *et al.*; "Post-replicative base excision repair in replication foci"; *EMBO J.*, vol 18, pag 3834-3844, 1999.
 - Park M.Y., Kim Y.E., Seo M.R., Lee J.R., Lee C.H., Ahn J.H.; "Interactions among four proteins encoded by the human cytomegalovirus UL112-113 region

targeting and the recruitment of UL44 to
vol 80, pag 2718-2727, 2006.

seven loci encoding transacting factors are required

- for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA replication; J. Virol., vol 67, pag 6979-88, 1993.
- Pari, G.S., Kacica, M.A., Anders, D. G.; "Open reading frame UL44, IRS1/TRS1, and UL36-38 are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA synthesis"; J. Virol., vol 67 n° 5, pag 2575-82, 1993.
- Pilger B.D., Cui C., Coen D.M.; "Identification of a small molecules that inhibits herpes simplex virus DNA polymerase subunit interactions and viral replication"; Chem. Biol., vol 11, pag 647-654, 2004.
- Phizicky, E.M. and S. Fields; "Protein-protein interactions: methods for detection and analysis"; Microbiol. Rev., vol 59, pag 94-123, 1995.
- Pickart Cecile M., Eddins Michael J., "Ubiquitin: structure, functions, mechanism"; Biochim. et Biophys. Acta 1695, pag 55-72, 2004.
- Prichard M.N., Duke G.M., Mocarski E.S.; "Human cytomegalovirus uracil DNA glycosylase is required for the normal temporal regulation of both DNA synthesis and viral replication"; J. Virol, vol 70, pag 3018-3025, 1996.
- Prichard M.N., Gao N., Jairath S., *et al.*; "A recombinant human cytomegalovirus with a large deletion in UL97 has a severe replication deficiency"; J. Virol., vol 73, pag 5663-5670, 1999.
- Prichard M.N., Lawlor H., Duke G.M., Mo C., Wang Z., Dixon M., Kemple G. and Kern E.R.; "Human cytomegalovirus uracil DNA glycosilase associates with ppUL44 and accelerates the accumulation of viral DNA"; J. Virol., vol 15, pagg 2-55, 2005.
- Rajmakers R., Vree Egberts W., van Venrooij W. J. and Pruijin G.; "The Association of the Human PM/Scf-75 Autoantigen with the Exosome Is Dependent on a Newly Identified N Terminus"; J. Biol. Chem., vol 278 n°33, pag 30698-30704, 2003.
- Rajmakers R., Vree Egberts W., van Venrooij W. J. and Pruijin G., "Protein-Protein Interactions between Human Exosome Components Support the Assembly of RNase PH-type Subunits into a Six-membered PNPase-like Ring"; J. Mol. Biol., vol 323, pag 653-663, 2002.
- Randell J.C., Coen D.M.; "Linear diffusion on DNA despite high-affinity binding by a DNA polymerase processivity factor"; Mol Cell, vol 8(4), pag 911-920, 2001.
- Randell JC, Coen DM.; "The herpes simplex virus processivity factor, UL42, binds DNA as a monomer"; J Mol Biol, vol 335(2), pag 409-413, 2004.
- Randell J.C., Komazin G., Jiang C., Hwang C.B., Coen D.M.; "Effects of substitutions of arginine residues on the basic surface of herpes simplex virus UL42 support a role for DNA binding in processive DNA synthesis"; J Virol, vol 79(18), pag 12025-12034, 2005.
- Rasheed Z. A., Saleem A., Ravee Y., Pandolfi P. P. and Rubin E. H.; "The Topoisomerase I-Binding Protein, Topors, is Associated with Promyelocytic Leukemia Nuclear Bodies"; Exp. Cell. Res. vol 277, pag 152-160, 2002.
- Razonable R.R., Emery V.C.; "Management of CMV infection and disease in transplant patients"; Herpes, vol 11, pag 77-86, 2004.
- Record MT, Jr., Lohman ML, De Haseth P.; "Ion effects on ligand-nucleic acid interactions"; J Mol Biol, vol 107(2), pag 145-158, 1976.

- son CF, Lohman TM; δ Thermodynamic analysis of ion and conformational equilibria of proteins and nucleic acid association or release, screening, and ion effects on water activity; *Q Rev Biophys*, vol 11(2), pag 103-178, 1978.
- Reusser, P. δ Herpesvirus resistance to antiviral drugs: a review of the mechanism, clinical importance and therapeutic options. *J. Hosp. Infect.*, vol 33, pag 235-248, 1996.
 - Ripalti A, Boccuni M.C., Campanini F., Landini M.P.; δ Cytomegalovirus-mediated induction of antisense mRNA expression to UL44 inhibits virus replication in an astrocytoma cell line: identification of an essential gene; *J. Virol*, vol 69, pag 2047-2057, 1995.
 - Roizman B., Sears A.E.; δ An inquiry into the mechanism of herpes simplex virus latency; *Annu. Rev. Microbiol.*, vol 41, pag 543-571, 1987.
 - Romanowski M.J., Garrido-Guerrero E., Shenk T.; δ pIRS1 and pTRS1 are present in human cytomegalovirus virions; *J. Virol.*, vol 71, pag 5703-5705, 1997.
 - Rowe WP, Hartley JW, Waterman S.; δ Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, vol 92, pag 418-424, 1956.
 - Sambrook, J., Fritsch, J.F., and Maniatis, T.; δ Extraction and purification of plasmid DNA. In δ Molecular cloning: a laboratory manual, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, vol. 1, sections 1, pag 25-1.33, 1989.
 - Sanchez V. and Spector H.; δ Cyclin dependent kinase activity is required for efficient expression and posttranslational modification of human cytomegalovirus proteins and for production of extracellular particles; *J. Virol.*, vol 80 n $^{\circ}$ 12, pag 5886-5896, 2006.
 - Sanchez V., McElroy A. K. and Spector H.; δ Mechanism governing maintenance of cdk1/cyclin B1 kinase activity in cells infected with human cytomegalovirus; *J. Virol.*, vol 77 n $^{\circ}$ 24, pag 13214-13224, 2003.
 - Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.; δ DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol 74, pag 5463-5467, 1977.
 - Schiestl, R.H., and Gietz, R.D.; δ High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier; *Curr. Genet.*, vol 16, pag 339-346, 1989.
 - Schoppel K., Schmidt C., Einsele H., Hebart H., Mach M.; δ Kinetics of the antibody response against human cytomegalovirus-specific proteins in allogeneic bone marrow transplant recipients; *J. Infect. Dis.*, vol 178, pag 1233-1243, 1998.
 - Seeler J., Marchio A., Losson R., Desterro J. M. P., Hay R. T., Chambon P. and Dejean A.; δ Common Properties of Nuclear Body Protein SP100 and TIF1 Chromatin Factor: Role of SUMO Modification; *Mol. Cell. Biol.*, vol 21 n $^{\circ}$ 10, pag 3314-3324, 2001.
 - Senear DF, Brenowitz M.; δ Determination of binding constants for cooperative site-specific protein-DNA interactions using the gel mobility-shift assay; *J Biol Chem*, vol 266(21), pag 13661-13671, 1991.
 - Sinzger C, Grefte A, Plachter B.; δ Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues; *J. Gen. Virol.* vol 76, pag 741-750, 1995.

McKinney N., Sinclair J.H., Wills M.R.; *Human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives*. Springer Semin. Immunopathol., vol 37, pag 19-25, 1993.

- Skaletskaya A., Bartle L.M., Chittenden T., McCormick A.L., Mocarski E.S., Goldmacher V.S.; *A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation*; Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., vol 98, pag 7829-7834, 2001.
- Spaete RR, Gehrz RC, Landini MP.; *Human cytomegalovirus structural proteins*. J Gen Virol; vol 75, pag 328763308, 1994.
- Sullivan V., Biron K. K., Malarico C., *et al.*; *A point mutation in the human cytomegalovirus DNA polymerase gene confers resistance to ganciclovir and phosphonylmethoxyalkyl derivatives*; Antimicrob. Agents Chemother., vol 37, pag 19-25, 1993.
- Tanner N. K., Linder P.; *DEXD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions*; Mol. Cell., Vol 8, pag 251-262.
- Taylor HP, Cooper NR.; *The human cytomegalovirus receptor on fibroblasts is a 30-kilodalton membrane protein*. J. Virol.; vol 64, pag 248462490, 1990.
- Telford E., Watson M.S., Mc Bride K., Davison A.J.; *The DNA sequence of equine herpesvirus 1*; Virology, vol 189, pag 304-316, 1992.
- Tenney D.J., Colberg-Poley A.M.; *Expression of the human cytomegalovirus UL36-38 immediate early region during permissive infection*; Virology, vol 182, pag 199-210, 1991.
- Tenney D.J., Micheletti P.A., Stevens J.T., Hamatake R.K., Matthews J.T., Sanchez A.R., Hurlburt W.W., Bifano M., Cordingley M.G.; *Mutations in the C terminus of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase can affect binding and stimulation by its accessory protein UL42 without affecting basal polymerase activity*; J. Virol., vol 67, pag 543-547, 1993.
- Terhune S., Torigoi E., Moorman N., Silva M., Qian Z., Shenk T., Yu D.; *Human cytomegalovirus UL38 protein blocks apoptosis*; J. Virol., vol 81, pag 3109-3123, 2007.
- Tong H., Hateboer G., Perrokis A., Bernards R. and Sixmo T. K.; *Crystal structure of murine/human Ubc9 provides insight into the variability of the ubiquitin-conjugating system*; J. Biol. Chem, vol 272, pag 21381-21387, 1997.
- Van den Heuvel S. and Harlow Ed, *Distinct Roles for Cyclin-Dependent Kinases in Cell Cycle Control*, Sci., vol 262, pag 2050-2054, 1993.
- Wang TS-F.; *Eukaryotic DANN polymerase*. Ann. Rev. Bioch., n°60 pag 513-522, 1991.
- Weger S., Hammer E., Heilbronn R., *Topors acts as a SUMO-1 E3 ligase for p53 I vitro and in vivo*, FEBS letters 29894, published by Elsevier, vol 579, pag 5007-5012, 2005.
- Weiland K. L., Oien N. L., Homa F. and Wathen M. W.; *Functional analysis of human cytomegalovirus accessory protein*; Virus Res., vol 34, pag 191-206, 1994.
- Weisshart K., Chow C.S., Coen D.M.; *Herpes simplex virus processivity factor UL42 imparts increased DNA-binding specificity to the viral DNA polymerase and decreased dissociation from primer-template without reducing the elongation rate*; J Virol, vol 73(1), pag 55-66, 1999.
- Wildy P., Watson D.H.; *Some serological properties of herpes virus particles studied with the electron microscope*; Virology, vol 21, 100-111, 1963.

- .T., Prichard M.N., *et al.*; *Distinct and separate roles of UL97 kinase in cytomegalovirus DNA synthesis and* *atl. Acad. Sci USA*, vol 98, pag 1895-1900, 2001.
- Woodhall D. L., Groves I. J., Reeves M. B., Wilkinson G. and Sinclair J. H.; *Human Daxx-mediated Repression of Human Cytomegalovirus Gene Expression Correlates with a Repressive Chromatin Structure around the Major Immediate Early Promoter*; *J. Biol. Chem.*, vol 281 n°49, pag 37652-37660, 2006.
 - Wright D.A., Spector D.H.; *Posttranscriptional regulation of a class of human cytomegalovirus phosphoproteins encoded by an early transcription unit*; *J. Virol.*, vol 63, pag 3117-3127, 1989.
 - Wright HT Jr, Goodheart CR, Lielausis; *A. Human cytomegalovirus. Morphology by negative staining*. *Virology*, vol 23, pag 4196424, 1964.
 - Xu Y., Cei S.A., Rodriguez Huete A., *et al.*; *Human cytomegalovirus DNA replication requires transcriptional activation via an IE2- and UL84-responsive bidirectional promoter element within oriLyt*; *J Virol.*, vol 78, pag 11664-11677.
 - Yakubovskaya E, Chen Z, Carrodegua JA, Kisker C, Bogenhagen DF.; *Functional human mitochondrial DNA polymerase gamma forms a heterotrimer*; *J Biol Chem*, vol 281(1), pag 374-382, 2006.
 - Ye L-B and Huang E-S; *In vitro expression of the human cytomegalovirus DNA polymerase gene: effects of sequence alterations on enzyme activity*; *J. Virol.*, vol 67, pag 6339-6347, 1993.
 - Yeung K.C., Stolfus C.M., Stinski M.F.; *Mutation of the human cytomegalovirus immediate-early 2 protein defines regions and amino acid motif important in transactivation of transcription from the HIV-1 LTR promoter*; *Virology*, vol 195, pag 786-792, 1993.
 - Zaia J.A.; *Prevention and management of CMV-related problems after hematopoietic stem cells transplantation*; *Bone marrow Transplant.*, vol 29, pag 633-638, 2002.
 - Zhong S., Salomoni P. and Pandolfi P. P. ; *PML and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis*; *J. Exp. Med.*, vol 191, pag 631-640, 2000. b.
 - Zhong S., Salomoni P. and Pandolfi P. P.; *The Transcriptional Role of PML and the nuclear body*; *Nat. Cell Biol.*, vol 2, pag E85-E90, 2000.
 - Zuccola, H. J., Filman, D.J., Coen, D.M., Hogle, J.M., *Mol. Cell*, vol 5, pag 267-78, 2000.