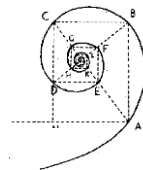




UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO



SCUOLA DI DOTTORATO IN MEDICINA MOLECOLARE

CICLO XXV

Anno Accademico 2012/2013

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

Settore scientifico disciplinare: **BIO13**

**MESSA A PUNTO DI TEST ALTERNATIVI PER LO  
SCREENING DI POTENZIALI INIBITORI DELLA  
PROTEASI DI HIV-1**

**Dottorando:** Debora PAROLIN

Matricola N°: R08632

TUTORE: Alberto CLIVIO

DIRETTORE DEL DOTTORATO: Mario CLERICI



## SOMMARIO

*Attualmente il trattamento farmacologico dell'AIDS si basa sull'utilizzo di inibitori che hanno come bersaglio molecolare il sito attivo di enzimi cruciali per il ciclo vitale di HIV-1. Tuttavia a lungo termine, a causa dell'elevata frequenza con cui il virus va incontro a mutazioni, si osserva la comparsa di varianti virali resistenti ai farmaci utilizzati. Nel tentativo di ovviare a questo problema, l'idea è quella di agire a livello degli enzimi essenziali per la sopravvivenza di HIV-1 ed in particolare la nostra attenzione è stata rivolta all'enzima proteasi e più nello specifico al precursore ed al processo di folding dell'enzima stesso.*

*I test disponibili per lo screening di inibitori dell'attività enzimatica si basano sull'utilizzo di colture cellulari infettate da HIV-1 che quindi utilizzano il virus attivo risultando laboriosi e costosi. Si è quindi pensato di sviluppare test alternativi sia in vitro che in vivo basati sull'utilizzo della proteina target degli inibitori in assenza di virus. Questi saggi possono essere utili per individuare nuovi inibitori che solo in seguito verrebbero testati in saggi di infezione.*

*Per raggiungere gli obiettivi proposti è stato necessario clonare ed esprimere il precursore della proteasi di HIV-1, dotato di spiccate proprietà intrinseche di auto-processamento e di auto-ripiegamento tridimensionale, al fine di studiarne il comportamento sia in vitro che in vivo in cellule batteriche ed eucariotiche.*

*Il primo obiettivo è stato la produzione e la purificazione del precursore della proteasi di HIV-1 in batteri, al fine di sviluppare un saggio immunoenzimatico per studiarne il folding e verificare l'efficacia di inibizione di questo processo da parte di ipotetici inibitori. Il precursore della proteasi di HIV-1 è stato prodotto e purificato sfruttando il tag di istidine. Tuttavia le procedure di estrazione utilizzate, necessarie al fine di stabilizzare il precursore, si sono rivelate troppo drastiche facendone perdere le proprietà maturative; pertanto si dovranno identificare metodi alternativi a quelli finora utilizzati per la sua purificazione e concentrazione.*

*Il secondo obiettivo è stato brillantemente raggiunto con la messa a punto di un saggio microbiologico rapido e attendibile per lo screening di nuovi inibitori del folding e dell'attività della proteasi di HIV-1. Il ceppo batterico indotto ad esprimere il precursore, il quale successivamente matura a proteasi attiva, va incontro ad un arresto della crescita, che viene ripristinata in presenza di inibitori del folding o dell'attività dell'enzima maturo.*

*Il test in questione è inoltre suscettibile di modifiche per applicazioni su vasta scala ed è servito da spunto per lo sviluppo di un test analogo in cellule di una linea linfoblastoide umana.*

## ABSTRACT

*Current AIDS therapies are mainly based on the use of inhibitors targeting the active site of enzymes which are crucial for the HIV-1 replication cycle. However, due to the HIV-1 high mutation frequency and the small target size, escape mutants emerge in the long term which show resistance to such inhibitors. In the attempt to overcome this problem, it is therefore desirable to switch the attention to target enzymes which are crucial for HIV-1 survival. My attention was drawn in particular to the HIV-1 protease precursor maturation process as a possible pharmacological target.*

*The currently available tests for the screening of putative inhibitors of enzyme activity are based on the use of HIV-1-infected cell cultures which make use of live virus and therefore are cumbersome and expensive. I therefore decided to try to set up alternative methods based on the inhibition of specific target functions by developing in vitro as well as in vivo assays based on both prokaryotic and eukaryotic cells, thus avoiding the use of live virus. These assays might be proposed as a first-line screening test which might subsequently be confirmed by performing the live-virus assay only on pre-selected promising candidates.*

*In order to meet the objectives it was necessary to clone and to express the HIV-1 protease precursor, a molecule endowed with intrinsic folding and self-processing features, with the aim of studying its properties in vitro on isolated molecules, as well as in vivo, inside bacterial as well as eukaryotic cells.*

*The first aim was the production and purification of the HIV-1 protease precursor in a prokaryotic cell. The purified protein would be used in immuno-enzyme assays for a detailed study of its folding process, thus gaining access to the possibility of checking the activity of putative folding inhibitors. The precursor was in fact purified making use of the His tag. However, the extraction procedures required to stabilize such a hydrophobic and maturation-prone molecule turned out to be too harsh and led to the loss of maturation capacity. Therefore, I decided to postpone this part of the project and to concentrate on the in vivo assay, which looked more promising in the short term.*

*The second target was more quickly met: the aim was to develop a quick and reliable microbiological assay suitable to screen for folding inhibitors and for inhibitors of HIV-1 protease activity. The bacterial strain carrying the precursor gene can be induced to express the precursor which quickly matures into protease, thus being toxic for the bacterial host. This growth arrest can be released by treatment with inhibitors of the folding process, which limit the amount of mature enzyme produced, and by inhibitors of the enzyme activity, thus resulting in bacterial cell survival. This test can be modified for large-scale application and has been used as the starting point for the development of a similar test making use of a human lymphoblastoid cell line expressing the protease precursor.*

# INDICE

## 1. INTRODUZIONE

<b>1.1 Patogenesi dell'infezione da HIV</b>	<b>1</b>
1.1.1 Introduzione alla patologia	1
1.1.2 Fasi dell'infezione: conta CD4 <sup>+</sup> e <i>viral load</i>	3
1.1.3 Tropismo cellulare di HIV	5
<b>1.2 Il virus HIV</b>	<b>8</b>
1.2.1 Classificazione e scoperta del virus	8
1.2.2 Struttura di HIV e genoma	9
1.2.3 Struttura e funzione delle proteine virali	11
1.2.3.1 <i>Proteine strutturali</i>	12
1.2.3.2 <i>Proteine regolatorie</i>	14
1.2.3.3 <i>Proteine accessorie</i>	16
<b>1.3 Ciclo vitale ed inibitori specifici</b>	<b>18</b>
1.3.1 Introduzione	18
1.3.2 Adesione e fusione	18
1.3.2.1 <i>Inibitori della fusione</i>	21
1.3.3 Uncoating e trascrizione inversa del genoma virale	22
1.3.3.1 <i>Inibitori della retrotrascrizione</i>	23
1.3.4 Integrazione	24
1.3.4.1 <i>Inibitori dell'integrazione</i>	25
1.3.5 Replicazione virale e trascritti virali	26
1.3.6 Assemblaggio e maturazione	31
1.3.6.1 <i>Inibitori della maturazione</i>	33
1.3.7 Terapia HAART	34
<b>1.4 HIV proteasi</b>	<b>36</b>
1.4.1 Struttura ed attività	36
1.4.2 Mutazioni associate alla resistenza ai PI	38
1.4.3 Maturazione del precursore della proteasi di HIV	41
1.4.4 Mutanti stabili della proteasi di HIV e del suo precursore	43
<b>1.5 Razionale del lavoro</b>	<b>43</b>

## 2. TEST SIB

<b>2.1 Razionale</b>	<b>45</b>
----------------------	-----------

<b>2.2 Clonaggio ed espressione del precursore della proteasi in <i>E. coli</i> per SIB test</b>	<b>45</b>
<b>2.3 SIB Test (salvataggio dei batteri con inibitori della proteasi di HIV)</b>	<b>46</b>
<b>2.4 Utilizzo del SIB test per saggiare potenziali inibitori del folding</b>	<b>49</b>
<b>2.5 Test SIB in terreno minimo</b>	<b>52</b>
<b>3. PRODUZIONE PRECURSORE HIV1-PROTEASI</b>	
<b>3.1 Razionale</b>	<b>55</b>
<b>3.2 Clonaggio precursore WT</b>	<b>56</b>
<b>3.3 Mutagenesi e Clonaggio precursore R8Q</b>	<b>59</b>
<b>3.3.1 Razionale</b>	<b>59</b>
<b>3.3.2 Mutagenesi e clonaggio</b>	<b>59</b>
<b>3.4 Espressione dei cloni WT e R8Q</b>	<b>60</b>
<b>3.4.1 Cloni WT</b>	<b>61</b>
<b>3.4.1.1 Modalità d'impiego dei cloni prodotti</b>	<b>65</b>
<b>3.4.2 Cloni R8Q</b>	<b>66</b>
<b>3.5 Purificazione e concentrazione del precursore</b>	<b>67</b>
<b>3.5.1 Purificazione in condizioni ibride</b>	<b>68</b>
<b>3.5.2 Purificazione in condizioni denaturanti</b>	<b>70</b>
<b>3.5.3 Purificazione in condizioni native</b>	<b>71</b>
<b>3.6 Prove di stabilità precursore</b>	<b>72</b>
<b>3.7 Dialisi precursore</b>	<b>76</b>
<b>4. TEST IN CELLULE JURKAT</b>	
<b>4.1 Razionale</b>	<b>78</b>
<b>4.2 Clonaggio del precursore della proteasi di HIV-1</b>	<b>78</b>
<b>4.3 Trasfezione cellule Jurkat e selezione cloni stabili</b>	<b>80</b>
<b>4.4 Espressione</b>	<b>81</b>
<b>4.4.1 B-galattosidasi assay</b>	<b>82</b>
<b>5. CONCLUSIONI</b>	<b>84</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>88</b>
<b>7. APPENDICI</b>	<b>100</b>

# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 *Patogenesi dell'infezione da HIV*

### 1.1.1 Introduzione alla patologia

La sindrome da immunodeficienza acquisita (Acquired Immune Deficiency Syndrome) è una patologia caratterizzata da un grave stato di immunodepressione riconducibile all'infezione da parte del virus HIV (Human Immunodeficiency Virus) [1].

L'infezione con HIV si verifica di norma a seguito del passaggio di sangue ed altri fluidi corporei (liquido seminale, secrezioni vaginali, latte materno, liquido amniotico...) da un soggetto infetto ad uno sano. Le vie di trasmissione principali sono la via sessuale e la via ematica. I rapporti sessuali, sia eterosessuali che omosessuali, non protetti dal profilattico sono la principale causa di passaggio del virus da uomo a uomo (85 % dei casi). Il sangue ed i suoi derivati, invece, risultano un veicolo importante di propagazione tra i tossicodipendenti, che usano droghe per via endovenosa condividendo la stessa siringa, e tra gli individui soggetti a trasfusioni. Ultima, ma non meno importante, è la via di trasmissione verticale da madre infetta a feto o neonato; è la modalità di contagio principale per i soggetti in età pediatrica e la trasmissione del virus può avvenire durante la gravidanza (4,4%), il parto (60%) o l'allattamento al seno (35,6%) [2-4].

La malattia inizia con un'infezione acuta controllata solo temporaneamente dalla risposta immunitaria dell'ospite e si trasforma in un'infezione cronica progressiva che, in assenza di terapia antiretrovirale, dopo un periodo di latenza variabile da otto a dieci anni porta a un drammatico quadro patologico, quasi inevitabilmente mortale, detto proprio AIDS conclamata [5, 6].

Una volta entrato nell'organismo, HIV infetta un gran numero di cellule CD4+ replicandosi rapidamente. Dopo un breve periodo di incubazione, circa il 70% dei soggetti infetti sviluppa una malattia acuta simil-influenzale o simil-mononucleosica, senza una sintomatologia definita, che si esaurisce nel giro di pochi giorni ed è difficilmente diagnosticabile. Durante la fase acuta dell'infezione, il sangue contiene numerose particelle virali che si diffondono in tutto l'organismo e si disseminano in vari organi, in particolare nei tessuti linfoidei periferici (linfonodi, milza, tonsille, adenoidi), in cui si assiste alla formazione di centri germinativi nella corticale e alla progressiva distruzione dei linfociti T CD4+ [7]. Man mano che l'infezione si diffonde, il sistema immunitario riesce a generare una risposta cellulo-mediata (picco a 2-3 settimane dal contagio) e umorale (picco a 12 settimane dal

contagio) HIV-specifica; tali risposte tengono parzialmente e temporaneamente sotto controllo l'infezione e la replicazione virale come si può evincere dal fatto che la viremia scende a livelli *undetectable* e la conta delle cellule T CD4+ ritorna all'80-90% del suo livello originale [8].

Dopo la fase di infezione acuta, si osserva una fase di latenza clinica che può durare anche molti anni: il sistema immunitario dell'ospite è ancora perfettamente in grado di fronteggiare la maggior parte delle infezioni dovute ad agenti patogeni e non sono presenti manifestazioni cliniche evidenti dell'infezione da HIV. Tuttavia, a questa fase di latenza clinica non corrisponde una reale e completa latenza virale: sebbene HIV non sia rilevabile a livello periferico, non viene mai definitivamente eliminato dall'ospite, continua a replicarsi attivamente a livello dei linfonodi e degli altri organi linfoidei instaurando un'infezione cronica progressiva. Il virus riesce infatti ad eludere la risposta immunitaria persistendo nei tessuti linfoidei principalmente in forma di complessi immuni legati ai recettori per il complemento presenti sulle cellule follicolari dendritiche [9]. In tale forma, HIV può infettare nuove cellule che risiedono stabilmente nel tessuto linfoideale oppure ricircolanti e, insieme al *pool* di cellule latentemente infette, assicura la persistenza dell'infezione nell'organismo. Pertanto, anche durante la fase di latenza, la sistematica distruzione delle cellule T CD4+ all'interno degli organi linfoidei (si stima che l'HIV distrugga giornalmente fino a  $1-2 \times 10^9$  linfociti T CD4+) correla con un lento ma progressivo calo del numero dei linfociti T *helper* circolanti che tuttavia non si traduce in manifestazioni cliniche rilevanti fino a quando i linfociti T si mantengono sopra i  $500-600/\text{mm}^3$ . Quando la replicazione virale a livello linfoideale raggiunge livelli critici e si rompe l'equilibrio dinamico che caratterizza l'omeostasi delle cellule T CD4+ (produzione *ex novo*, attivazione e proliferazione, distruzione), si manifestano i primi sintomi clinici [10].

La sintomatologia inizia in genere con la comparsa di una linfadenopatia persistente che caratterizza il cosiddetto quadro **LAS** o **PGL** (Lympho Adenopatic Syndrome or Persistent Generalized Lymphadenopathy). Subito dopo inizia lo stadio **ARC** (AIDS-related complex) caratterizzato da calo ponderale, febbre, diarrea e astenia che si accompagna ad un'ulteriore linfopenia, anemia, ipergammaglobulinemia e ad una ridotta o assente risposta immune cellulo-mediata.

In coincidenza con la diminuzione dei linfociti T-*helper* al di sotto dei  $200/\text{mm}^3$  inizia la fase di AIDS conclamata: la degenerazione istopatologica dei tessuti



linfoidi periferici è praticamente completa e il parenchima linfonodale viene interamente sostituito da tessuto fibrotico.

Tutto questo si traduce in un marcato deficit delle cellule *T-helper* e dei CTLs, in una totale compromissione della risposta immune e in un'aumentata suscettibilità a infezioni, trasformazioni neoplastiche e manifestazioni degenerative [10].

Infatti, i pazienti con AIDS sono soggetti ad infezioni opportunistiche provocate da protozoi, funghi, miceti, batteri e virus, come la toxoplasmosi viscerale, polmonite da *Pneumocystis jirovecii*, tubercolosi, candidosi esofagea, retinite da citomegalovirus ecc. In molti casi si presentano manifestazioni neoplastiche (Sarcoma di Kaposi, Linfoma di Burkitt, Carcinoma alla cervice), osservate raramente in pazienti affetti da altre immunodeficienze, che portano rapidamente a morte. In un numero variabile di pazienti sono presenti anche lesioni al sistema nervoso centrale (infezioni alla microglia) che in molti casi si esprimono, anche precocemente durante l'infezione, con sintomi psichiatrici di rilievo (AIDS-related dementia)[10].

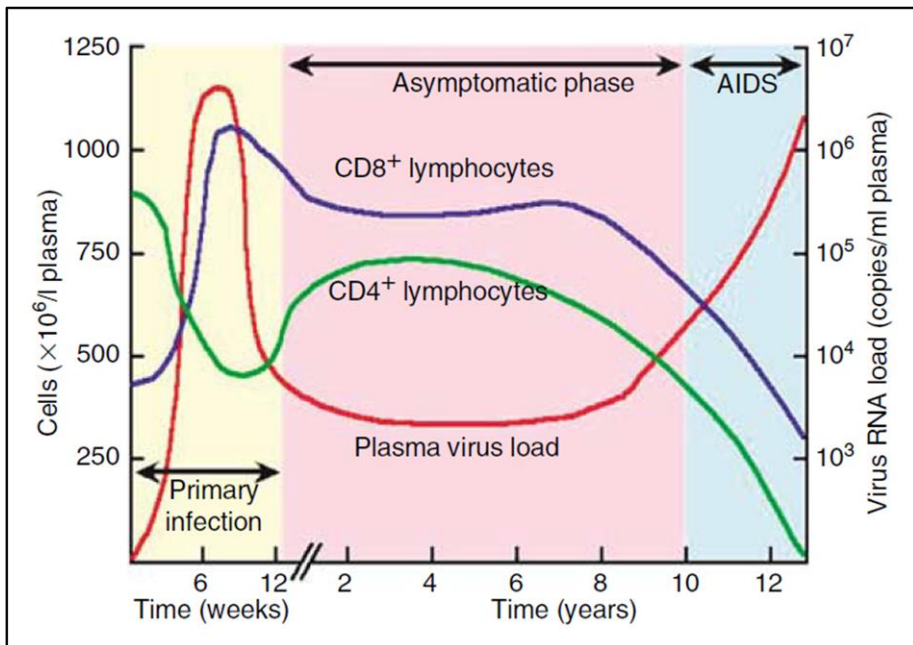
### **1.1.2 Fasi dell'infezione: conta CD4+ e viral load**

La patogenesi dell'infezione da HIV segue tre fasi principali che sono scandite da una variazione della conta dei linfociti T helper CD4+ e da un cambiamento costante del viral load (carica virale) [1].

#### **a. Infezione acuta**

Viene così definita la fase iniziale dell'infezione ossia il periodo immediatamente successivo al contagio. Ha una durata di 2-6 settimane ed è caratterizzata da una elevata replicazione del virus all'interno dei linfociti CD4+; la carica virale raggiunge infatti valori superiori a 10<sup>6</sup> copie/ml di plasma (cp/ml). La conta dei linfociti T helper, al contrario, cala bruscamente fino a raggiungere valori di 500-600 cell/mm<sup>3</sup> di sangue periferico (Figura 1). La durata dei sintomi simil-influenzali non supera i 28 giorni e si affievolisce solamente nell'ultima settimana; l'individuazione dell'infezione in questo periodo è molto importante in quanto il paziente possiede il massimo grado di infettività. Bisogna comunque ricordare che solo il 20-70% dei pazienti risulta sintomatico in questa fase. In queste prime settimane di infezione, il sistema immunitario agisce contro l'agente eziologico con una risposta cellulo-mediata che consente un innalzamento della conta dei linfociti T. Nel contempo, la risposta umorale, ossia la produzione di anticorpi contro proteine specifiche di HIV, non è ancora sufficiente per essere evidenziata mediante test diagnostici. L'intervallo di tempo che intercorre tra il contagio e la

positivizzazione al test viene definito “periodo finestra”, mentre la comparsa degli anticorpi in circolo viene definita sierconversione.



**Figura 1:** Andamento temporale dell'infezione. Il grafico mette in relazione i livelli di linfociti CD4 (verde) e CD8-T circolanti (viola) e i livelli di viremia (rosso). Oltre alla scala temporale, vengono riportati gli stadi della patologia corrispondenti.

## b. Fase di Latenza

L'infezione da HIV è caratterizzata da un lungo periodo di latenza durante il quale non si ha alcun sintomo o segno di malattia. In questa fase il viral load scende fra  $10^4$ - $10^5$  cp/ml (6-9 mesi dopo l'infezione), la replicazione virale è assente a livello del plasma ma si mantiene sempre attiva all'interno di linfonodi e milza (Figura 1). Non si ha quindi una latenza biologica dell'infezione dal momento che la persistenza di replicazione negli organi linfoidi provoca una lenta ma graduale perdita di linfociti CD4<sup>+</sup>: ogni giorno circa il 5% dell'intero comparto dei CD4<sup>+</sup> viene distrutto dal virus, ma per un certo periodo di tempo le cellule vengono rimpiazzate pressoché integralmente. In questa fase un individuo sieropositivo non può essere certamente riconosciuto come tale in base all'aspetto e, se non è a conoscenza del proprio stato, può inconsapevolmente trasmettere l'infezione ad altri. La durata del periodo di latenza è molto variabile e può essere influenzata da vari fattori tra i quali, soprattutto, l'impiego o meno di una terapia antiretrovirale. In assenza di trattamento la maggior parte dei pazienti evolve verso la malattia in un periodo

medio di circa 8-10 anni; una quota minore ha un'evoluzione più rapida, in circa 4-6 anni, mentre il 10-12% circa di soggetti sieropositivi hanno la tendenza a non presentare la patologia anche a distanza di 12 anni e oltre dall'infezione; questi ultimi vengono definiti "long term non-progressors". La spiegazione di questa lenta progressione potrebbe essere attribuita a fattori genetici che influenzano la capacità del sistema immunitario di contrastare l'infezione virale. Lo sviluppo di una sintomatologia clinica evolve parallelamente alla compromissione delle difese immunitarie, evidenziate dal calo dei linfociti CD4+ e dall'aumento della replicazione virale.

### **c. AIDS conclamata**

Quando il numero dei linfociti T scende sotto il livello critico di 200 cell/ mm<sup>3</sup>, la risposta immune da essi controllata viene meno e si scatena la sindrome vera e propria (Figura 1). Le difese immunitarie calano e l'organismo viene esposto al rischio di sviluppare gravi patologie, sia di tipo infettivo (infezioni opportunistiche) che neoplastico. La fase di malattia conclamata, definita proprio AIDS, inizia quando compaiono una di queste patologie e si conclude inevitabilmente con il decesso del paziente.

La prognosi per questa malattia è, ancora nel 2009, quella di morte. Con i farmaci oggi disponibili l'AIDS è diventata tuttavia una patologia controllabile: la terapia HAART è in grado di ridurre la viremia, permettendo così la rigenerazione dei linfociti e la ripresa dell'attività normale del sistema immunitario, mentre i farmaci antimicrobici ed antineoplastici consentono di contrastare le infezioni opportunistiche e le neoplasie che accompagnano l'infezione. Il virus, tuttavia, è in grado di restare in uno stato di latenza e di infettare cellule presenti in distretti raggiunti con difficoltà dai farmaci (tipicamente la microglia del SNC) ed è, inoltre, in grado di sviluppare rapidamente resistenza ai farmaci, il che rende ancora più difficile la sua eradicazione. Le nuove terapie antiretrovirali hanno permesso però un miglioramento della qualità e delle aspettative di vita dei pazienti sieropositivi ed una riduzione marcata dei gravi effetti collaterali che accompagnavano l'assunzione dei farmaci nei primi anni '80.

#### **1.1.3 Tropismo cellulare di HIV**

L'insieme delle cellule CD4+ presenti nell'organismo umano costituisce il bersaglio principale dell'azione patogena di HIV [11]. Ai fini dell'ingresso nella cellula, il recettore CD4+ da solo non è tuttavia sufficiente, il virus necessita infatti di una seconda interazione con la cellula attraverso il legame ad un corecettore. Questa

classe di molecole è rappresentata, prevalentemente, dai recettori chemochinici. I più importanti sono:

- Corecettore CXCR4: usato da ceppi di HIV definiti X4, con tropismo specifico per i linfociti T;
- Corecettore CCR5: tipico del ceppo R5, a tropismo selettivo per i macrofagi.

Altri recettori chemochinici possono funzionare da corecettori durante il processo infettivo (es. CCR3, CCR2b...), ma la loro efficacia e frequenza di legame risulta inferiore a quella di CCR5 e CXCR4. Negli ultimi dieci anni di studi, una grossa varietà di proteine di membrana si è scoperta associata all'infezione da HIV. Le più comuni sono la lectina di tipo C, fra cui DC-SIGN, l'antigene LFAs esposto dai leucociti, le molecole di adesione ICAM ed il glicosfingolipide GalC (Galactosylceramide), nelle infezioni che coinvolgono intestino, vagina e cervello. Recente è la scoperta dell'integrina  $\alpha 4\beta 7$  come sito di legame specifico per HIV sui linfociti T CD4+ memoria [1].

Nel corso dell'infezione si stabiliscono due diversi "compartimenti virologici" in comunicazione continua tra loro che contribuiscono all'immunodeficit e permettono al virus di persistere nonostante le risposte immunitarie dell'ospite e una terapia farmacologica antiretrovirale:

- compartimento attivo, costituito dal virus libero nel sangue e da quello contenuto nei linfociti T attivati e nei monociti. In queste cellule si stabilisce un'infezione produttiva: il virus è attivamente replicativo, ha un'azione citopatica diretta ed è in grado di danneggiare il sistema immunitario [12];
- compartimento di latenza (reservoir), costituito da alcuni distretti dell'organismo in cui il virus non si replica attivamente ma resta in fase latente. Questi compartimenti di riserva, che si formano fin dalle primissime fasi dell'infezione, sono rappresentati da organi come cervello e gonadi, le cui barriere anatomiche impediscono la libera circolazione delle cellule e dei farmaci, e da diversi tipi cellulari quali macrofagi, cellule dendritiche (cellule interdittale, cellule di Langherans), cellule follicolari dendritiche e linfociti T CD4+ memoria quiescenti [13].

I macrofagi esprimono livelli inferiori di CD4 rispetto i linfociti T-*helper* ma presentano sulla superficie il corecettore CCR5 e sono quindi suscettibili, come già riferito, all'infezione di HIV da parte di ceppi R5. I macrofagi possono anche infettarsi per vie indipendenti dall'interazione gp120-CD4, quali la fagocitosi di cellule infettate o l'endocitosi mediata da recettore Fc di virioni opsonizzati da anticorpi. Ciononostante, i macrofagi sono relativamente resistenti all'effetto

citopatico diretto e indiretto di HIV e proprio per questo costituiscono uno dei principali serbatoi di riserva del virus. Il motivo per cui i macrofagi sono infettati, ma non direttamente uccisi dal virus, può essere riconducibile alla necessità di un'elevata espressione di CD4 perché tale effetto si realizzi. In queste cellule, inoltre, l'assemblaggio e il *budding* dei virioni avviene principalmente a livello di vescicole citoplasmatiche (arricchite con molecole MHC II) e il rilascio avviene mediante un meccanismo di esocitosi. Poiché molte delle proteine virali sono espresse sulla membrana delle vescicole citoplasmatiche e non sulla membrana plasmatica, le cellule infettate sono meno suscettibili all'attacco da parte di linfociti T citotossici specifici verso peptidi virali [14].

Le cellule dendritiche (DC) possono promuovere la replicazione virale attraverso due distinti processi. Possono essere direttamente infettate da HIV, ma al pari dei macrofagi non sono sensibili all'azione citopatica diretta del virus. Inoltre queste cellule, grazie all'espressione sulla superficie della molecola DC-SIGN, sono in grado di legare e internalizzare i virioni e di promuovere l'infezione delle cellule T CD4+ con cui stabiliscono un intimo contatto al momento della presentazione dell'antigene. Si ritiene svolgano un ruolo importante nell'iniziale disseminazione del virus nei tessuti linfoidi [14].

Le cellule follicolari dendritiche (FDC), localizzate nei follicoli linfatici sia primari che secondari degli organi linfoidi periferici, sono un bersaglio dell'infezione e un veicolo potente di trasmissione. Sebbene le FDC non vengano infettate con alta efficienza, esse possono contribuire significativamente alla patogenesi dell'immunodeficienza da HIV. Infatti, grazie all'espressione di recettori di membrana specifici per le proteine del complemento e per la porzione Fc di anticorpi HIV-specifici, le FDC dei centri germinativi della milza e dei linfonodi trattengono sulla loro superficie una grande quantità di particelle virali in grado di infettare in maniera persistente macrofagi e linfociti T CD4+ presenti nel linfonodo. Inoltre la persistenza del virus sulla membrana delle FDC altera la loro funzionalità nella risposta immunitaria e ne favorisce la loro distruzione inducendo, di conseguenza, un drammatico sovvertimento dell'architettura linfonodale e splenica [15].

Nei T linfociti CD4+ quiescenti o di memoria il virus non è in grado di replicarsi ma resta sempre presente come provirus. I linfociti CD4+ di memoria hanno una vita molto lunga, dato che la loro funzione biologica è proprio quella di garantire all'organismo una protezione immunitaria nei confronti di antigeni incontrati in precedenza; la riesposizione di queste cellule all'antigene per il quale sono

“programmate” stimola la loro riattivazione e quindi la replicazione virale. Dopo diversi cicli di replicazione, molte di queste cellule andranno incontro a morte, mentre altre ritorneranno alla fase di latenza, contribuendo così al mantenimento di una stabile riserva virale. Questo reservoir virale sarebbe quindi il principale responsabile della persistenza dell'infezione anche in corso di una efficace terapia antiretrovirale, rappresentando il più importante ostacolo alla eradicazione dell'infezione. E' stato infatti dimostrato che queste cellule di memoria, dotate di un'emivita di 44 mesi, richiedono un tempo pari circa a 73 anni per poter essere eliminate completamente [16, 17].

## **1.2 Il virus HIV**

### **1.2.1 Classificazione e scoperta del virus**

La pandemia HIV fu riconosciuta ufficialmente nel giugno 1981 quando si moltiplicarono, fra New York, Los Angeles e San Francisco, casi di polmonite da *Pneumocystis carinii* (ora *jirovecii*) e casi di Sarcoma di Kaposi [18, 19]. Queste patologie, rare in soggetti immunocompetenti, colpivano giovani uomini omosessuali che sviluppavano in breve tempo una profonda immunodeficienza con deplezione totale dei linfociti T CD4+ *helper* [5]. La malattia fu inizialmente definita **GRIDS** (Gay-related Immunodeficiency Syndrome), ma nel settembre 1982, dopo nuovi casi di infezione in tossicodipendenti e persone soggette a trasfusione, il nome venne modificato in **AIDS** (Acquired Immunodeficiency Syndrome) [20, 21]. La maggior parte dei ricercatori era convinta che l'agente eziologico responsabile del contagio fosse un virus trasmesso per via sessuale o per contatto diretto con sangue infetto. Ne dedussero, quindi, che fosse facilmente rintracciabile a livello periferico nel sangue di pazienti malati [22].

HIV fu isolato la prima volta in Francia nel 1983 da Françoise Barré-Sinoussi nel laboratorio di Luc Montagner e venne identificato con il termine **LAV** (Lymphadenopathy-associated virus) [23]. Non vi erano però evidenze sperimentali certe che fosse responsabile della sindrome da immunodeficienza acquisita. La correlazione fra infezione virale e sintomatologia fu chiarita solo nel 1984 dagli studi di Robert Gallo. Il gruppo di ricerca del National Institute of Health di Bethesda, da lui guidato, identificò il virus con la sigla **HTLV-III** (Human T-Lymphotropic virus type III) e fu in grado di studiarne le caratteristiche morfologiche e biologiche in modo esaustivo [24]. Nel 1986 il gruppo di Montagner identificò, invece, HIV-2 nell'Africa Occidentale, per cui il virus originale fu chiamato allora HIV-1 [25].

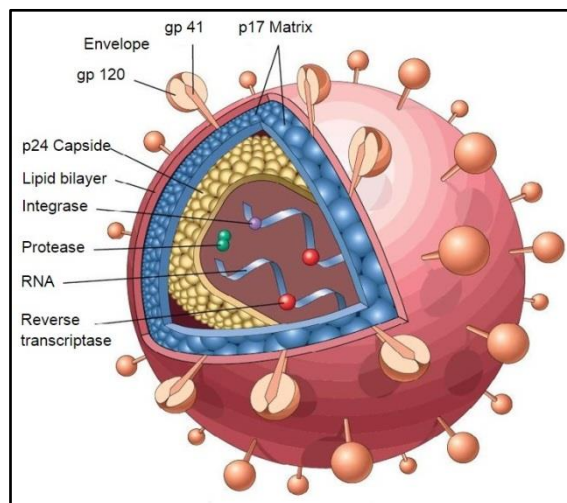
HIV è un *Lentivirus*, membro della famiglia *Retroviridae*. In base alle conoscenze attuali, è suddiviso in 2 ceppi con caratteristiche eterogenee ed estremamente variabili: HIV-1 e HIV-2. Il primo è localizzato prevalentemente in Europa, America ed Africa Centrale, è il ceppo più virulento ed è suddivisibile in tre gruppi: M (con 9 sottotipi e ricombinanti), N ed O. HIV-2 si riscontra per lo più in Africa Occidentale ed Asia e determina una sindrome clinicamente più moderata rispetto al ceppo precedente [1].

L'antenato più plausibile di HIV sembra essere **SIV** (Simian immunodeficiency virus) presente in alcune specie di scimmie dell'Africa Sub-Sahariana. Si pensa che nei primi decenni del XX secolo, con un salto di specie, sia entrato in contatto con l'uomo. L'origine zoonotica di HIV è supportata da cinque evidenze:

- similarità nell'organizzazione genomica;
- correlazione filogenetica;
- prevalenza nell'ospite naturale;
- sovrapposizione geografica fra uomo e primate;
- via di trasmissione plausibile (scimmia come alimento per l'uomo).

HIV-1 deriva dal virus SIVcpz ritrovato nello scimpanzé *Pan troglodytes troglodytes*, mentre HIV-2 origina da SIVsm che infetta principalmente *Sooty mangabey*.

### 1.2.2 Struttura di HIV e genoma



**Figura 2:** Struttura di HIV (da <http://php.med.unsw.edu.au>)

HIV è un virus a RNA rivestito ed ha un diametro di circa 120 nm. Il capsid di forma icosaedrica è circondato dall'envoltura, un doppio strato fosfolipidico di

origine cellulare che funge da involucro esterno ed ospita le proteine di membrana gp120 e gp41. Il materiale genetico virale è costituito da due filamenti di RNA singolo filamento con polarità positiva, associati ad una trascrittasi inversa, ed è localizzato all'interno del capsido, il core proteico del virus composto da 2000 copie della proteina p24. Al suo interno sono presenti, inoltre, le proteine essenziali per il ciclo vitale di HIV; tra queste: proteasi, ribonucleasi ed integrasi. Fra il capsido e l'envelope è presente una matrice costituita dalla proteina p17 (Figura 2) [1].

Le due copie di RNAss hanno una lunghezza di 9200 paia di basi e consentono la trascrizione di 9 geni HIV-specifici (gag, pol, env, tat, rev, nef, vif, vpr, vpu), tradotti in 15 proteine virali diverse. Tre di questi geni, gag, pol ed env, contengono le informazioni necessarie per la costruzione delle proteine strutturali dei nuovi virioni. Gag codifica infatti le proteine del core del virione, pol gli enzimi necessari alla replicazione ed al ciclo vitale mentre env codifica per le proteine dell'involucro esterno. I sei geni che rimangono tat, rev, nef, vif, vpr e vpu (o vpx nel caso di HIV-2) sono geni regolatori ed accessori che codificano per proteine implicate nel controllo dell'abilità di HIV di infettare la cellula ospite, producendo nuove copie di sé stesso [22][26]. All'estremità terminale 5' e 3' sono presenti le sequenze LTR, regioni di controllo che consentono il legame dei fattori trascrizionali (NF-kB, NFAT, Sp1, TBP) della cellula ospite, indispensabili per la trascrizione dei geni virali (Figura 3) [27].

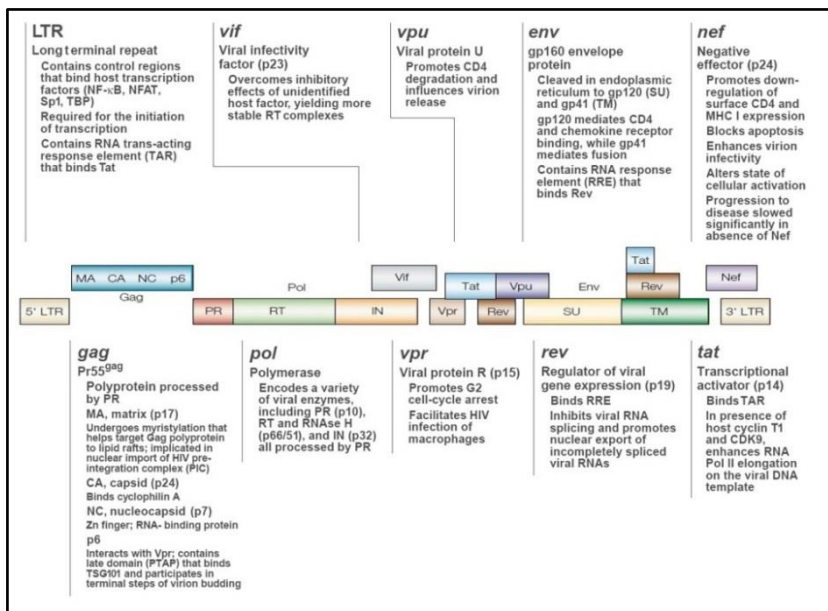


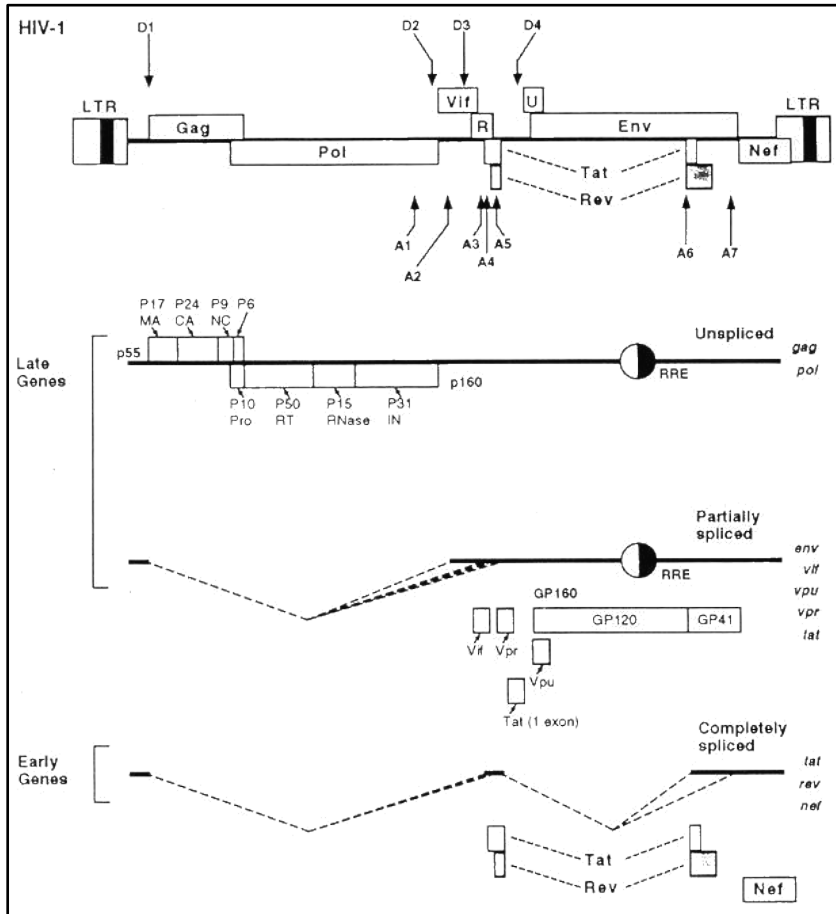
Figura 3: Genoma di HIV (da hivinsite.ucsf.edu).



### 1.2.3 Struttura e funzione delle proteine virali

I geni di HIV, come detto in precedenza, codificano per 3 classi di proteine:

- PROTEINE STRUTTURALI: gag, pol ed env;
- PROTEINE REGOLATORIE: tat e rev;
- PROTEINE ACCESSORIE: vpu, vpr, vif e nef.



**Figura 4:** Espressione del genoma di HIV-1 (da hivinsite.ucsf.edu).

In alto, una vista schematica del genoma provirale lineare, le sequenze codificanti per i geni di HIV sono raffigurate come rettangoli vuoti. I potenziali siti donatori di splicing sono designati come D1-4 mentre i potenziali siti accettori di splicing come A1-7. Le tre principali classi di RNA virale e le proteine virali da esse codificate sono mostrate in basso. I geni Gag, Pol, e Env sono espressi come precursori poliproteici, che vengono poi scissi per produrre le proteine virali mature. Abbreviazioni: LTR, long terminal repeat; RRE, Rev-Responsive Element; MA, matrix; CA, capsid; NC, nucleocapsid; Pro, protease; RT, reverse transcriptase; RNase, ribonucleas H; IN, integrase; p, protein; gp, glycoprotein.

### **1.2.3.1 Proteine strutturali**

#### **Gag**

Il gene gag codifica un precursore Gag di 55 kDa, definito p55, espresso a partire da un messaggero che non subisce il processo di splicing (Figura 4). Durante la traduzione, l'estremità N-terminale di p55 viene miristilata (legame covalente fra un gruppo miristilico ed il gruppo  $\alpha$  amminico dell'amminoacido N-terminale del peptide nascente), consentendo così il legame del precursore al lato citoplasmatico della membrana cellulare [28]. La poliproteina Gag, così associata, può reclutare 2 copie di RNAss virale e le proteine cellulari e virali necessarie ad HIV, favorendo la gemmazione di nuovi virioni dalla superficie della cellula ospite infettata. Durante il processo di maturazione virale (post gemmazione), p55 viene tagliata dalla proteasi virale in 4 piccole proteine identificate come: MA o p17, CA o p24, NC o p9 e p6 [28].

Il peptide MA (matrice) deriva dalla porzione N-terminale miristilata di p55. Molte molecole di MA rimangono legate alla superficie interna dell'envelope virale, dando origine ad una matrice che stabilizza il virione. Una parte di queste MA viene reclutata, invece, all'interno del virione, dove va a costituire un complesso proteico con la funzione di dirigere il DNA virale all'interno del nucleo della cellula ospite [29]. Queste molecole MA facilitano, infatti, il trasporto transnucleare del genoma di HIV. Ciò è reso possibile dalla presenza, su MA, di un segnale di localizzazione nucleare riconosciuto dal macchinario di importo nucleare della cellula. Questo fenomeno consente ad HIV di infettare cellule non in divisione, una proprietà inusuale per un retrovirus [30].

La proteina p24 (CA) dà origine al core o capside virale. È stato dimostrato recentemente che la ciclofilina A interagisce con la regione CA di p55, consentendo la sua incorporazione nel virus. L'interazione fra Gag e la ciclofilina A è essenziale per HIV, la rottura del legame fra i due sembra inibire, infatti, la replicazione virale [31].

La proteina NC è responsabile del riconoscimento specifico del segnale di assemblaggio [32]. Questo segnale consiste in 4 strutture stem-loop localizzate vicino all'estremità 5' dell'RNA virale ed è sufficiente per l'incorporazione di RNA eterologhi di virioni HIV-1. NC lega queste quattro strutture mediante 2 motivi Zn finger. NC facilita poi il processo di retrotrascrizione [33].

La regione p6 media l'interazione fra p55 Gag e la proteina Vpr, permettendo l'incorporazione di questa proteina accessoria nel virione in assemblaggio. La regione p6 contiene poi un dominio necessario al rilascio di nuovi virioni dalla cellula infettata [34].

## **Precursore Gag-Pol**

La proteasi (Pro), integrasi (IN), RNasi H e la trascrittasi inversa (RT) di HIV sono espresse a partire dalla proteina di fusione Gag-Pol. Il precursore Gag-Pol (p160) è generato da un evento di frameshift a livello ribosomiale, causato da una sequenza di 7 nucleotidi, seguita da una corta struttura stem-loop, nella regione distale dell'RNA Gag. Quando i ribosomi incontrano questo motivo, allungano il tempo di lettura del gene pol senza interrompere la traduzione e provocano così, uno spostamento di lettura del messaggero. Il precursore Gag e il precursore Gag-Pol, così generato, sono prodotti in rapporto 20:1 nella cellula. Durante la maturazione virale, la proteasi divide il polipeptide Pol da Gag e lo digerisce separando proteasi (p10), retrotrascrittasi (p50), RNasi H (p15) ed integrasi (p41). Queste divisioni non avvengono sempre in modo efficace, quasi il 50% della proteina RT rimane legata all'RNasi H come un unico polipeptide p65 [35].

La proteasi di HIV-1 è un enzima aspartico che agisce come dimero. La sua attività è necessaria per il taglio dei precursori Gag e Gag-Pol durante la maturazione del virione, come descritto in precedenza. La struttura tridimensionale del dimero è stata definita in modo preciso e la sua conoscenza ha permesso lo studio di nuove classi di farmaci atti ad inibire la sua funzione catalitica. Questi antiretrovirali hanno, in breve tempo, migliorato le aspettative di vita dei pazienti affetti da HIV [36].

Il gene pol codifica poi per la retrotrascrittasi. RT è una DNA polimerasi RNA dipendente che retrotrascrive l'ssRNA del virione a dsDNA. L'RNasi H è in grado di rimuovere l'RNA originale dal primo filamento di DNA, consentendo così la sintesi di un nuovo filamento di DNA complementare al primo. Il DNA virale può essere sintetizzato completamente entro le sei ore del contagio cellulare ma può rimanere integrato nelle cellule ospiti per un tempo molto più lungo. Molti elementi sull'RNA virale sono necessari per la formazione del DNA virale. Ad esempio TAR, una struttura stem-loop localizzata al 5' dell'RNAss, sito di legame per Tat, è fondamentale per l'inizio della retrotrascrizione. Tutti i prodotti del gene pol si localizzano all'interno del capsido di HIV-1 e HIV-2. La polimerasi del virus non è dotata di un'attività proofreading di correzione, la replicazione infatti inserisce più punti di mutazione in ogni nuova copia del genoma virale [37].

L'integrasi media invece l'inserzione del DNA provirale nel DNA genomico della cellula ospite. Questo processo è reso possibile da tre funzioni specifiche di IN. La prima, un'attività esonucleasica che taglia due nucleotidi da ciascuna delle due estremità 3' del DNA virale. A seguire un'attività endonucleasica che taglia il DNA

della cellula ospite nel sito di integrazione ed ultima un'attività di ligasi che genera un singolo legame covalente con ogni estremità libera del DNA provirale. Per questo processo non è richiesto alcun tipo di energia esterna, come ATP. L'accessibilità della cromatina e specifiche sequenze nucleotidiche del DNA cellulare sembrano influenzare la scelta del sito di integrazione [38].

### **Env**

La proteina Env (gp160) di 160 kDa è espressa a partire da un mRNA che subisce il processo di splicing singolarmente (Figura 4). Sintetizzata nel reticolo endoplasmatico, Env migra nell'apparato del Golgi dove subisce un processo di glicosilazione, con l'aggiunta di 25-30 catene glucidiche all'atomo di azoto di una catena laterale di asparagina. La glicosilazione di Env è indispensabile per la fase di infezione virale. Una proteasi cellulare taglia gp160 in due parti: gp41 e gp120. Gp41 è una proteina transmembrana mentre gp120 si localizza sulla superficie esterna della cellula infettata e del virione, attraverso interazioni non covalenti con gp41. Env esiste come trimero sulla superficie cellulare [39]. L'interazione fra HIV ed il suo recettore principale, CD4, è mediata da domini specifici di gp120. La struttura di questa proteina è stata identificata recentemente e contiene 9 legami disolfidici (legami fra 2 Cys) altamente conservati e 5 regioni ipervariabili, identificate con la sigla V1-V5, la cui sequenza amminoacidica può variare moltissimo tra i vari isotipi virali [40]. Una di queste regioni, V3, non è coinvolta nel legame al CD4, ma è importante per il tropismo di HIV-1 verso le cellule della linea T e dei macrofagi. Sequenze interne a V3 interagiscono infatti con i corecettori CXCR4 e CCR5. V3 è anche il bersaglio principale degli anticorpi contro HIV [41]. Gp120 può interagire anche con DC-SIGN che è espresso sulla superficie delle cellule dendritiche. Il loro legame potenzia l'infezione delle cellule CD4+ e DC-SIGN sembra facilitare la trasmissione del virus, trasportando HIV nei tessuti linfoidi [42]. La proteina gp41 contiene invece un dominio fusogenico N-terminale che media la fusione dell'envelope virale con la membrana cellulare e negli ultimi anni si stanno cercando farmaci in grado di inibire proprio il processo di fusione virale.

#### **1.2.3.2 Proteine regolatorie**

##### **Tat**

Tat è un attivatore trascrizionale essenziale per la replicazione di HIV [43]. Esistono due forme di Tat, una costituita da 72 e una da 101 amminoacidi, entrambe funzionano però come attivatori e sono localizzate all'interno dei nuclei e nucleoli delle cellule infettate. Tat è una proteina che lega le molecole di RNA virale, in particolare una piccola struttura stem-loop, definita "transactivation

response element" (TAR), localizzata nella terminazione 5'. Tat non si lega da sola, per svolgere il suo effetto necessita di una serie di proteine cellulari [44]. La funzione di Tat è stata chiarita solo recentemente e si è scoperto che agisce favorendo la fase di allungamento della trascrizione di HIV. In assenza di Tat infatti, HIV genera trascritti di piccole dimensioni (< di 100 nucleotidi), senza utilità per i nuovi virioni [45]. La stimolazione della polimerasi durante l'allungamento dei trascritti è possibile grazie al reclutamento di una chinasi che fosforila il dominio carbossiterminale (CTD) della RNA polimerasi II stessa. Questa chinasi, conosciuta come CDK9, fa parte di un complesso proteico che lega direttamente Tat. Per funzionare questa proteina regolatoria richiede il legame ad un cofattore, la Ciclina T, che facilita il riconoscimento del sito TAR [46]. Tat, inoltre, attiva l'espressione di un numero elevatissimo di geni tra cui TNF $\beta$  [47] e TGF $\beta$  [48], mentre inibisce l'espressione di alcuni geni cellulari fra cui bcl-2 [49] e la chemochina MIP-1 $\alpha$  [50]

### **Rev**

Rev è una proteina di 13 kDa che lega l'RNA virale e favorisce la transizione verso le ultime fasi dell'espressione genica di HIV [51]. Rev è codificata da due esoni e si accumula all'interno dei nuclei e nucleoli delle cellule infette. Rev lega una regione di 240 paia di basi dell'RNA, chiamata RRE (Rev Response Element) che si trova nel secondo introne di HIV. Il legame di Rev in questa regione facilita l'uscita dei messaggeri, che non hanno subito splicing o che ne hanno subito uno incompleto, dal nucleo della cellula ospite [52]. Normalmente i messaggeri che contengono degli introni sono trattenuti nel nucleo. La capacità di Rev di esportare dal nucleo messaggeri non maturi, ha effetti negativi anche sulla propria espressione, molti degli RNAs trasportati codificherebbero, infatti, per Rev maturo [53]. Questa proteina regolatoria contiene tre domini funzionali: un dominio di legame all'RNA virale, un dominio di multimerizzazione e un dominio effettore. Il primo dominio descritto è un dominio ricco di arginine e consente a Rev di creare legami con la regione RRE del genoma virale [54]. Il secondo dominio è necessario alla proteina per svolgere la propria funzione e studi recenti hanno dimostrato che Rev può esistere come omotetramero in soluzione. Il dominio effettore rappresenta il segnale di esporto dal nucleo della cellula ospite (NES- Nuclear Export Signal). L'esportazione degli RNA virali avviene seguendo la via utilizzata normalmente dagli snRNAs e 5sRNA ribosomiali, ma anche dai normali mRNA cellulari. Il trasporto dal nucleo al citoplasma è possibile grazie al legame fra Rev e il recettore per il dominio NES effettore, conosciuto come CRM1 [55]. Rev è necessario per la

replicazione virale: provirus che perdono la proteina Rev sono trascrizionalmente attivi ma non esprimono geni virali dello stadio avanzato e quindi non sono in grado di dare origine a nuovi virioni.

### **1.2.3.3 Proteine accessorie**

#### **Nef**

Nef è una proteina miristilata di 27 kDa, codificata da un unico esone che si estende fino al 3'LTR del genoma di HIV (Figura 4). Nef, un gene espresso precocemente, è la prima proteina che si accumula nella cellula dopo l'infezione. Inizialmente si credeva che Nef fosse responsabile dell'inibizione dell'attività trascrizionale, da questo derivava proprio il suo nome "negative factor". Oggi questa sua proprietà è stata completamente smentita. Nef risulta comunque importante per l'espressione genica di HIV e può svolgere diverse funzioni: inibizione dell'espressione dei CD4 di superficie, attivazione delle cellule T e stimolazione dell'infettività di HIV. Nef agisce a livello post-trascrizionale, riducendo il livello di espressione di CD4 sulla superficie cellulare. Nef aumenta infatti la velocità di endocitosi di CD4 e la sua degradazione lisosomiale [56]. La porzione citoplasmatica di CD4, e in particolare una sequenza di due leucine ripetute, è responsabile dell'effetto di Nef su CD4. La riduzione del recettore più importante per HIV sembra essere vantaggiosa per la produzione di nuovi virioni poiché un eccesso di CD4 sulla superficie cellulare può inibire l'incorporazione dell'envelope e la gemmazione di nuovi virus [57]. Nef down regola anche l'espressione sulla superficie cellulare delle MHC di classe I, riducendo così l'efficienza di uccisione delle cellule infettate dal virus da parte dei linfociti T citotossici [58]. Nef perturba poi l'attivazione dei linfociti T; studi sulla linea cellulare Jurkat hanno dimostrato che l'espressione di Nef ha un effetto negativo sull'induzione del fattore trascrizionale NF- $\kappa$ B e sull'espressione dell'IL-2 [59]. In contrasto con questi ultimi risultati, studi su topi transgenici hanno rivelato invece, che Nef aumenta il segnale delle cellule T [60]. Sicuro è che Nef stimoli l'infettività dei virioni, le particelle di HIV-1 infatti risultano essere, in presenza di questa proteina accessoria, dieci volte più infettive di quelle senza Nef. Questa molecola viene imballata nel virione, dove viene poi tagliata dalla proteasi virale durante la maturazione di HIV, ma l'utilità e l'importanza di questo processo non è stata ancora chiarita.

#### **Vpr**

Ciascun virione prodotto contiene approssimativamente 100 copie della proteina Vpr. L'incorporazione al loro interno è resa possibile dall'interazione con il C-terminale di p55 Gag, che corrisponde alla regione p6 clivata [61]. Vpr conferisce ad HIV la capacità di infettare cellule non in divisione, facilitando la localizzazione

nucleare del complesso di preintegrazione (PIC). Vpr si localizza proprio all'interno del PCI e può agire come fattore di trasporto nucleo-citoplasma, direzionando il genoma virale verso il nucleo della cellula ospite [62]. Vpr può inoltre bloccare la divisione cellulare, infatti, cellule che esprimono questa proteina possono arrestarsi in fase G2 del ciclo cellulare. L'espressione di Vpr previene poi l'attivazione del complesso p34cdc2/cyclinB, un regolatore del ciclo cellulare importante per innescare il processo di mitosi [63]. L'espressione costitutiva di un mutante attivo di questo complesso previene l'accumulo delle cellule in G2 causato da Vpr. Vpr sembra poi interagire con la proteina cellulare UNG (uracil-DNA glycosylase) ma le conseguenze biologiche di questa interazione sono ancora in fase di studio [64].

### **Vpu**

Vpu è una fosfoproteina integrale di membrana ed è espressa a partire dal messaggero che codifica anche per Env (Figura 4). Localizzata nella membrana plasmatica della cellula infetta, ha un peso di 16 kDa. Presenta principalmente due funzioni: inibizione del CD4 ed aumento del rilascio dei virioni [65]. Nelle cellule infettate, si formano complessi fra il recettore CD4 e la proteina dell'envelope virale causando, nel reticolo endoplasmatico, il ristagno di entrambe le proteine. La formazione di questo complesso intracellulare Env-CD4 interferisce con l'assemblaggio stesso dei virioni. Vpu allora libera l'envelope virale dal complesso, favorendo la degradazione delle molecole CD4. Vpu aumenta poi il rilascio di HIV dalla superficie di una cellula infettata. In assenza di Vpu, è possibile trovare un grande numero di virioni legati alla superficie della cellula infettata. HIV-2 non contiene vpu ma presenta un altro gene che codifica una proteina con funzioni analoghe, definito vpx [66, 67].

### **Vif**

Vif è un polipeptide di 23 kDa, essenziale per la replicazione del virus nei linfociti, macrofagi ed altre linee cellulari presenti nel sangue periferico [68]. In molti tipi cellulari, l'azione di Vif non è invece necessaria, ciò significa che queste cellule esprimono una proteina che svolge le stesse funzioni di Vif. Queste linee cellulari sono definite permissive per i mutanti Vif di HIV. I virioni prodotti dalle cellule permissive possono infettare le cellule non permissive ma il virus prodotto non è infettivo. Vif deve essere presente durante l'assemblaggio di nuovi virioni ed è incorporato al loro interno [69]. Questo fenomeno, comunque, non sembra essere specifico per il virus dell'immunodeficienza umana poiché Vif viene incorporato anche in altri retrovirus come quello della leucemia murina [70]. Studi che producono HIV da eterocarion, generati dalla fusione fra cellule permissive e non,

rivelano che le cellule non permissive contengono un fattore antivirale naturale che viene inibito da Vif [71]. Il fatto che Vif agisca in opposizione ad un fattore cellulare antivirale è confermato dall'osservazione che le proteine Vif di diversi lentivirus sono specie-specifiche [72]. Ceppi di HIV difettivi di Vif possono entrare nelle cellule ma non possono sintetizzare in modo efficiente il DNA provirale. Non è stato ancora chiarito se un difetto in Vif vada ad intaccare la retrotrascrizione in sé, l'uncoating del virus o l'intera stabilità del nucleo proteico virale.

### **1.3 *Ciclo vitale ed inibitori specifici***

#### **1.3.1 Introduzione**

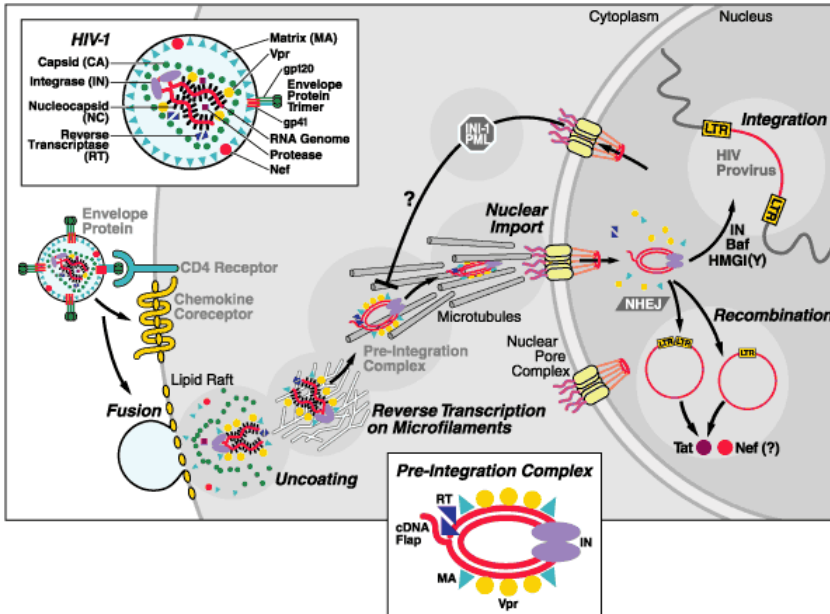
Mantenere sotto controllo l'infezione di HIV è la sfida principale del nostro secolo. L'uso dei farmaci antiretrovirali in commercio è affiancata, infatti, dallo studio di nuovi approcci farmacologici che possano prevenire e ridurre la diffusione di questo retrovirus. Le nuove terapie dovranno essere applicabili anche nei paesi in via di sviluppo, dove HIV provoca la morte del maggior numero di soggetti. Capire le dinamiche che intercorrono fra HIV e il suo ospite cellulare, consente di porre le basi per il controllo dell'epidemia. Importante è, allora, conoscere il suo ciclo vitale, con particolare interesse verso l'interazione tra le proteine virali ed il macchinario cellulare ed evidenziare punti futuri di attacco delle terapie.

#### **1.3.2 Adesione e fusione**

Il genoma di HIV, due molecole di RNA di circa 9 kilobasi, contiene 9 geni differenti che codificano 15 proteine diverse. Per infettare in modo efficace la cellula bersaglio, HIV deve essere in grado di introdurre il proprio materiale genetico nel citoplasma cellulare. Il processo richiede la fusione dell'envelope virale con la membrana cellulare della cellula ospite e necessita di interazioni specifiche fra l'involucro esterno e i recettori di superficie cellulare. Le due proteine virali coinvolte nella fusione sono gp120 e gp41. Queste proteine danno origine ad una conformazione trimerica costituita da tre molecole di gp120, esposte sulla superficie cellulare esterna del virione, associate a tre molecole di gp41, localizzate all'interno del doppio strato fosfolipidico virale. Le gp120 sono responsabili del legame al recettore CD4 sulla superficie della cellula bersaglio ed la loro interazione induce un cambio conformazionale della stessa gp120. Questa modifica consente il legame successivo fra il virione e recettori chemochinici specifici della cellula, che diventano corecettori di legame (Figura 5) [40]. Queste molecole giocano, normalmente, un ruolo importante nella chemioattrazione, meccanismo grazie al quale le cellule ematopoietiche si muovono, sfruttando il



gradiente di chemochine, verso siti specifici. Sebbene questi recettori, che contengono sette domini trans membrana, traducano generalmente il segnale attraverso proteine G, nel caso di HIV non è necessario, il virus attiva una via di trasduzione del segnale alternativa a quella usuale [73].



**Figura 5:** Primi eventi cellulari dopo l'infezione di una cellula target da parte di HIV.

Descrizione schematica dei primi eventi che si verificano dopo l'infezione di HIV in una cellula bersaglio: interazioni tra gp120, CD4 e i recettori per le chemochine (CCR5 o CXCR4) che portano alla fusione gp41-mediata seguita da uncoating del virione, trascrizione inversa dell'RNA genomico, trasporto nel nucleo del complesso di preintegrazione virale e integrazione del doppio filamento di cDNA virale nel cromosoma della cellula ospite che porta alla formazione del provirus di HIV. (da hivinsite.ucsf.edu).

Sono dodici i recettori chemochinici che possono funzionare da corecettori per HIV nelle cellule in coltura, ma solo due di questi, già citati nel testo, si sa che giocano un ruolo importante in vivo. Il primo, CCR5, lega virus con tropismo specifico per i macrofagi, che sono associati prevalentemente alla trasmissione mucosale e intravenosa di HIV e sono i grado di indurre sincizi (ceppi R5). Il secondo, CXCR4, lega virus con tropismo per le cellule T, che inducono sincizi (X4) e sono ritrovati, in modo più frequente, negli ultimi stadi della malattia [74]. Nel 13% degli individui del Nord d'Europa, una delezione naturale di 32 paia di basi nel gene CCR5 porta alla formazione di un recettore chemochinico mutato che non raggiunge mai la

superficie cellulare. Omozigoti per questa mutazione (1-2 % della popolazione caucasica) sono completamente resistenti all'infezione da parte di HIV [75]. Queste osservazioni permettono di comprendere il ruolo fondamentale di CCR5 nella diffusione del virus e suggerisce come piccole molecole, che prevengono l'interazione con CCR5, possano rappresentare una classe di farmaci estremamente efficace contro HIV.

Sia i recettori CD4 che i corecettori chemochinici si localizzano nel bilayer lipidico in domini ricchi di colesterolo e sfingolipidi, regioni che sembrano creare un ambiente favorevole alla fusione delle membrane di virus e cellula. La rimozione del colesterolo dall'envelope del virione, dalle cellule produttrici e dalle cellule bersaglio provoca infatti un brusco calo dell'infettività di HIV. Studi recenti stanno cercando di valutare se l'eliminazione del colesterolo possa essere efficace come microbicide topico a livello della superficie mucosale. Lo sviluppo di microbicidi, che inibiscano la trasmissione di HIV, rappresenta una strategia terapeutica futura molto importante [76].

Il legame fra gp120, CD4 e i corecettori chemochinici produce un cambiamento conformazionale anche in gp41. La proteina trimerica di membrana si apre e proietta verso l'esterno tre domini, definiti "di fusione", che legano saldamente il bilayer lipidico della cellula target. I domini di fusione formano infatti una struttura ad hairpin che facilita il processo di fusione ed il rilascio del core virale all'interno del citoplasma cellulare. Esistono in commercio inibitori (T-20 e T-1249) che prevengono la fusione del virione proprio bloccando la formazione di questa struttura ad hairpin [77].

I virioni di HIV possono entrare nella cellula anche mediante endocitosi. Questo meccanismo è utilizzato soprattutto dalle cellule dendritiche presenti nella sottomucosa. Le cellule dendritiche hanno la funzione di processare e presentare l'antigene alle cellule del sistema immunitario ed esprimono sulla loro superficie una molecola di legame specializzata, DC-SIGN. Questa lectina di tipo C lega gp120 con elevata affinità, ma non consente di portare a termine tutti i cambiamenti conformazionali necessari alla fusione del virione con la membrana cellulare. I virioni che legano DC-SIGN infatti, vengono internalizzati in un compartimento acido della cellula ed esposti sulla superficie cellulare solo quando le cellule dendritiche sono diventate mature e sono migrate nei nodi linfoidi. Le cellule dendritiche, che esprimono DC-SIGN, entrano in contatto con le cellule T dei nodi ed agiscono come "cavallo di troia", facilitando cioè la diffusione di HIV dalla superficie mucosale alle cellule T degli organi linfoidi [42].

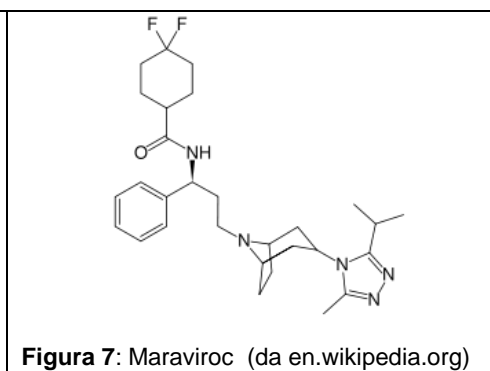
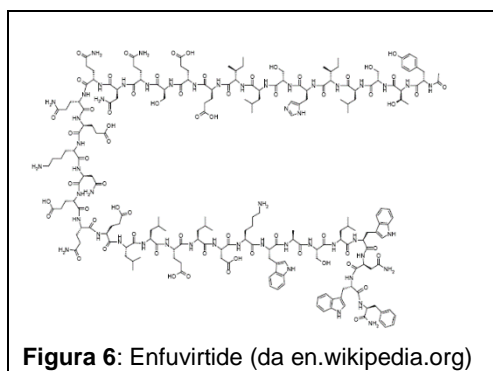
### 1.3.2.1 Inibitori della fusione

Gli inibitori della fusione, definiti anche inibitori dell'entrata, sono una classe di farmaci antiretrovirali usati frequentemente come terapia farmacologica nel trattamento dell'infezione da HIV [78]. Questa classe di farmaci interferisce con le fasi di legame, fusione ed entrata del virione nelle cellule umane. Bloccando questo passaggio del ciclo replicativo di HIV, si riesce ad abbassare la progressione dell'infezione verso lo stadio di AIDS conclamata. Nel processo di fusione fra virione e membrana cellulare, come detto in precedenza, sono coinvolte diverse molecole: CD4, gp120, gp41, CCR5 e CXCR4. Cinque sono le tappe fondamentali del processo:

1. legame fra gp120 ed il recettore CD4;
2. cambio conformazionale di gp120 con aumento dell'affinità per i corecettori ed esposizione di gp41;
3. legame fra gp120 e i corecettori CCR5 o CXCR4;
4. inserimento nella cellula ospite grazie al cambio conformazionale di gp41 che avvicina le membrane di HIV e delle cellule T, promuovendone la fusione;
5. entrata del core proteico virale nel citoplasma cellulare.

Gli inibitori della fusione possono interferire proprio con uno di questi cinque passaggi ed i più efficaci, approvati dalla FDA (Food and Drug Administration), risultano essere:

- Enfuvirtide (T-20, ENF-Fuzeon): lega la regione amminoterminale di gp41 ed impedisce così, l'avvicinamento delle due membrane e la formazione del poro di entrata per il capsido virale (Figura 6);
- Maraviroc (MVC-Selzentry/Celsentri): lega CCR5 sulla membrana cellulare impedendo l'interazione con gp120, fondamentale per l'entrata di HIV nella cellula ospite (Figura 7).



### 1.3.3 Uncoating e trascrizione inversa del genoma virale

Una volta entrato nella cellula, il virione subisce il processo di uncoating (svestimento) con il quale il core virale perde il proprio rivestimento proteico (Figura 5). Questo processo è ancora poco conosciuto ma sembra innescato dalla fosforilazione delle proteine della matrice da parte di una MAP chinasi [79] e l'azione successiva della Ciclofillina A [31] e delle proteine virali Nef e Vif. Nef è associata, infatti, ad una pompa protonica, una V-ATPasi, che può promuovere la degradazione del capsido inducendo cambi locali di PH [80]. Al termine dell'uncoating, il complesso di retrotrascrizione viene rilasciato nel citoplasma della cellula ospite. Questo complesso comprende: genoma virale ad RNA<sub>ss</sub>, tRNA<sub>lys</sub>, che agisce come primer per la retrotrascrizione, la trascrittasi inversa virale, l'integrasi, le proteine di matrice e del capsido, Vpr e molte altre proteine della cellula ospite. Il complesso di retrotrascrizione si lega ai microfilamenti di actina e questa interazione, mediata dalla matrice fosforilata, è necessaria per portare a termine, in modo efficiente la sintesi del DNA virale. Aggirati gli effetti destabilizzanti della proteina cellulare CEM15/APOBEC3G, di recente scoperta, Vif è in grado di stabilizzare il complesso all'interno della maggior parte delle cellule umane [81, 82].

La fase di retrotrascrizione permette la formazione di un complesso di pre-integrazione (PCI), composto da cDNA virale doppio filamento, integrasi, matrice, Vpr, retrotrascrittasi e la proteina HMGI (high mobility group I) che lega il DNA. PCI può muoversi attraverso il nucleo utilizzando, come binario, i microtubuli della cellula. HIV, quindi, sfrutta le strutture del citoscheletro per direzionare il proprio movimento, come fanno gli adenovirus e gli herpes simplex virus quando infettano le cellule bersaglio [83]. Come avvenga lo spostamento da microfilamenti di actina ai microtubuli rimane però ancora sconosciuto.

Studi scientifici recenti hanno rivelato il meccanismo attraverso il quale le cellule si difendono dall'attacco di HIV. Nei 30 minuti successivi all'infezione, proteine specifiche dell'ospite come INI-1 (Integrase Interactor 1), una componente del complesso di rimodellamento della cromatina SWI/SNF, e PML, una proteina presente normalmente nei domini oncogenici dei promielocitici, traslocano dal nucleo al citoplasma (Figura 5). L'aggiunta di triossido di arsenico, che blocca in modo brusco il movimento di PML, aumenta la suscettibilità della cellula all'infezione da parte di HIV, rendendo così chiaro che la normale funzione di PML è quella di opporsi all'entrata di HIV nell'ospite. Il legame fra integrasi virale ed INI-1, al contempo, risulta essere un processo virale necessario al reclutamento dei

fattori di rimodellamento della cromatina. Se questi complessi influenzino il sito di integrazione del virus o siano responsabili della successiva espressione del gene provirale, non è stato ancora chiarito [84].

A differenza dei retrovirus animali, HIV è in grado di infettare le cellule non in divisione, come i macrofagi. Questo è permesso dall'abilità e dalla capacità del virus di attraversare la membrana nucleare. PIC ha dimensioni elevate e supera il diametro del canale acquoso centrale del poro nucleare. La lunghezza del DNA, pari a 3µm, deve quindi subire una compattazione significativa e l'intero processo di importazione nucleare deve comportare modificazioni strutturali in alcune molecole [85].

Uno dei campi di ricerca più sviluppati su HIV riguarda proprio l'identificazione delle proteine virali chiave che mediano l'entrata nel nucleo del complesso PCI. Integrase, matrice e Vpr giocano un ruolo fondamentale in questo processo (Figura 5). Durante la trascrizione inversa dell'RNA virale, la sintesi del nuovo filamento è spesso discontinua ed è possibile che si formi un dominio a DNA tripla elica, definiti "DNA flap" [86]. Questo dominio è in grado di legare una proteina cellulare che contiene un segnale di localizzazione nucleare. La matrice possiede, anch'essa, lo stesso segnale che viene riconosciuto dalle importine  $\alpha$  e  $\beta$ , proteine coinvolte normalmente nel trasporto intranucleare. Studi recenti hanno però conferito un ruolo centrale in questo processo, sia all'integrase virale sia al DNA flap. La proteina Vpr contiene, invece, tre segnali di trasporto nucleare; essa non sfrutta il sistema delle importine, ma sembrerebbe legare direttamente fra loro il complesso PCI con una o più componenti del poro nucleare. Tutti i segnali nucleari presenti nel PCI possono funzionare in modo coordinato, ma possono giocare un ruolo importante anche singolarmente in linee cellulari specifiche. Ad esempio, Vpr è responsabile dell'infezione virale dei macrofagi, mentre non è necessario per l'infezione delle cellule T [87]. La scoperta che sia la matrice che Vpr si spostano fra nucleo e citoplasma ha reso chiara la loro importanza all'interno di nuovi virioni.

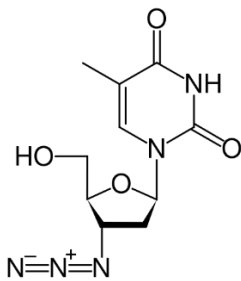
### **1.3.3.1 Inibitori della retrotrascrizione**

Gli inibitori della retrotrascrizione (RTI) sono una classe di farmaci antiretrovirali usati come inattivatori della polimerasi, enzima essenziale ad HIV per sintetizzare DNA virale. La trascrittasi inversa utilizza, come substrato, dNTP e converte RNA virale in DNA doppio filamento che può integrarsi al DNA genomico della cellula ospite. RTI si dividono in due classi: NRTI e NNRTI [78].

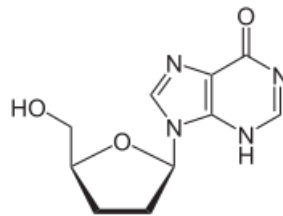
Gli NRTI sono analoghi nucleosidici o nucleotidici che hanno elevata affinità per il sito di legame dei dNTP sull'enzima RT. Bloccano infatti il processo di

retroscrittione da RNA a DNA, competendo proprio con i dNTP. NRTI agiscono da falso substrato per la RT: l'assenza di un OH libero in posizione 3' causa l'impossibilità di incorporare nuovi NRTI e di creare successivi legami fosfodiesterici 5'-3'. Gli NRTI necessitano, per funzionare, di essere attivati mediante fosforilazione da parte di una chinasi cellulare. I farmaci più diffusi e approvati dalla FDA sono:

- **Zidovudine** (AZT, ZDV - Retrovir): il primo farmaco approvato dalla FDA (Figura 8);
- **Didanosine** (ddI -Videx): il secondo farmaco approvato dalla FDA (Figura 9);
- **Abacavir** (ABC -Ziagen);
- **Lamivudine** (3TC -Epivir);
- **Emtricitabine** (FTC- Emtriva);
- **Stavudine** (d4T- Zerit);
- **Tenofovir Disoproxil Fumarate** ( TDF,PMPA -Viread);
- **Zalcitabine** (ddC o HIVID).



**Figura 8:** Zidovudine (da en.wikipedia.org)



**Figura 9:** Didanosine (da en.wikipedia.org)

### 1.3.4 Integrazione

Una volta entrato nel nucleo, il DNA virale può dare origine al provirus (Figura 5). L'integrazione del dsDNA all'interno del genoma della cellula ospite è mediato dall'enzima integrasi di HIV. Le proteine cellulari HMGI (Y) e BAF, fattore che funge da barriera all'autointegrazione, sono estremamente necessarie per portare a termine, in modo efficiente, la fase di integrazione, ma la loro funzione specifica rimane ancora sconosciuta [88].

L'integrasi catalizza due reazioni:

- reazione esonucleasica 3'-5': rimozione di due nucleotidi delle estremità 3' del DNA virale;
- reazione di traferimento: le code dei due nucleotidi in 3' vengono legate covalentemente al genoma della cellula ospite.

L'integrazione del provirus è un processo essenziale per la trascrizione successiva del genoma e delle proteine virali.

Non tutti i PCI che entrano nel nucleo danno origine ad un provirus funzionale. Le estremità del DNA virale possono unirsi infatti, per formare "circoli 2-LTR" che contengono entrambe le sequenze LTR oppure il genoma può subire ricombinazione omologa, dando origine ad un circolo con un solo LTR. Per ultimo, il DNA virale può autointegrarsi su se stesso, formando una struttura circolare riarrangiata. Sebbene alcuni di questi circoli possano essere responsabili della sintesi del fattore Tat o della proteina accessoria Nef, nessuna di essi produce virus infettivi [89]. In una cellula normale, in risposta ad una frammentazione del DNA, si attiva il sistema di riparo NHEJ (nonhomologous end-joining) che cerca di proteggerla dal danno, riunendo le due estremità di rottura, anche in assenza di un filamento stampo. Questo sistema è infatti responsabile del riparo rapido di interruzioni della doppia elica di DNA, prevenendo così l'innescarsi del processo apoptotico nei confronti della cellula danneggiata. Una singola rottura del doppio filamento di DNA può indurre la cellula ad arrestarsi in fase G1 del ciclo cellulare. Il sistema NHEJ dell'ospite sembra lui stesso responsabile della formazione di circoli 2-LTR, non attivi, del genoma virale [90].

#### 1.3.4.1 Inibitori dell'integrazione

L'integrasi è un enzima chiave nel ciclo vitale dell'HIV e rappresenta un target importante per il trattamento dell'infezione [78]. Molti inibitori di HIV agiscono infatti, bloccando direttamente l'azione dell'enzima e sono in grado di creare legami ad idrogeno con il residuo Gln 148 del suo sito attivo. L'unico farmaco antiretrovirale di questa classe, approvato dal FDA nell'ottobre 2007, è **Raltegravir** (Isentress) (Figura 13). Esiste, comunque, un secondo inibitore dell'integrasi che si trova attualmente in fase 2/3 di sperimentazione ed è stato chiamato **Elvitegravir** (GS9137 o JTK-303) (Figura 14).

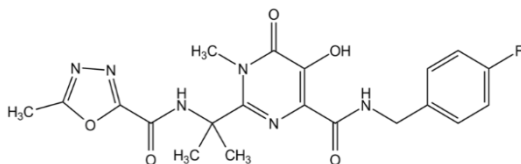


Figura 13: Raltegravir (da en.wikipedia.org)

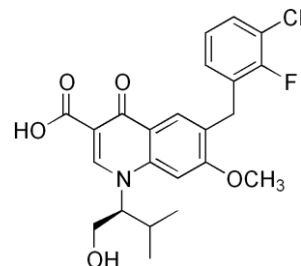


Figura 14: Elvitegravir (da en.wikipedia.org)

### 1.3.5 Replicazione virale e trascritti virali

L'integrazione può sviluppare forme di infezione latente o trascrizionalmente attiva. La capacità del genoma virale di integrarsi nella cellula ospite e di rimanere latente anche per molti anni, spiega l'inefficacia delle terapie antiretrovirali nell'eradicare completamente HIV dalla popolazione. Inoltre, pur insorgendo una potente risposta immunitaria a seguito dell'infezione primaria, questi provirus latenti rappresentano delle riserve infinite che consentono ad HIV di riemergere appena calano le difese immunitarie del paziente. Capire il meccanismo di latenza e sviluppare nuovi farmaci che agiscano proprio in questa fase, è una delle sfide più grandi del nostro secolo.

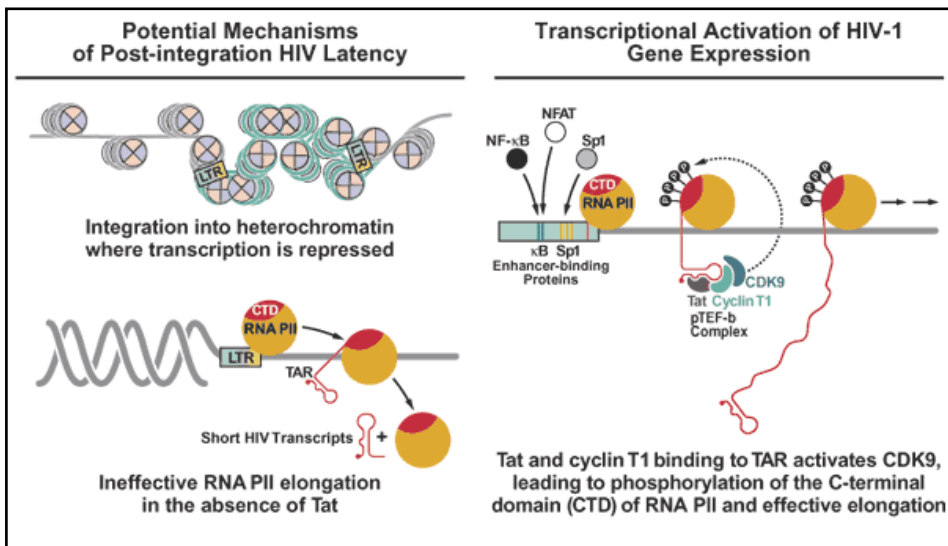
La struttura cromosomica è probabilmente responsabile dell'attivazione trascrizionale del provirus. Per questo motivo, l'integrazione in regioni eterocromatiche (condensate e silenziose dal punto di vista trascrizionale) dà spesso origine a latenza virale (Figura 15). Altre cause di questo fenomeno potrebbero riguardare, direttamente, le differenze tra cellule sia nella disponibilità di attivatori trascrizionali sia nella perdita di Tat, proteina regolatoria del virus. Delle numerose copie di provirus normalmente integrate nelle cellule infette, almeno una è probabile che sia trascrizionalmente attiva [91].

Nel genoma della cellula il 5'LTR contiene il promotore con gli elementi necessari all'innesco del processo replicativo, tra cui Inr (sequenza iniziale), TATA-box e tre siti Sp1. Queste regioni consentono il posizionamento corretto della RNA polimerasi II sul sito di inizio della trascrizione e l'assemblaggio del complesso di pre-inizio. A monte del promotore si localizzano gli enhancer, che in HIV-1 sono legati dai fattori nucleari NF-κB e NFAT e i membri della famiglia Ets [92]. NF-κB, per essere attivato, deve dividersi dal proprio inibitore citoplasmatico, IκB, attraverso fosforilazione, ubiquitinazione e degradazione definitiva dell'inibitore all'interno del proteasoma cellulare [93]. NFAT è invece defosforilato dalla calcineurina (una reazione inibita dalla ciclosporina A) e, dopo il trasporto all'interno del nucleo, si lega alla proteina AP1 per formare un complesso trascrizionalmente attivo [94]. NF-κB, che è composta dalle subunità p50 e p65 (RelA), è responsabile dell'aumento di velocità della fase di inizio ed allungamento della trascrizione virale e sembra avere un ruolo centrale nell'attivazione della trascrizione dei provirus silenti.

Quando questi fattori legano LTR, inizia la trascrizione del genoma virale, ma in assenza di Tat, la polimerasi non è in grado di copiare lo stampo in modo completo (Figura 15). In questo caso, vengono sintetizzati, infatti, piccoli trascritti stabili che



persistono nella cellula grazie alla formazione di uno stem loop definito TAR (Transactivation Response Element) [95]. Tat aumenta, in modo significativo, la velocità di espressione dei geni virali. Insieme alla ciclina T1, Tat lega il TAR dei trascritti in via di formazione e recluta la chinasi 9 (Cdk9) sulla sequenza LTR di HIV. La Cdk9, che insieme alla ciclina forma il complesso pTEF-b (positive transcription elongation factor b), fosforila la coda CTD di RNApII, consentendo la progressione dell'enzima nel processo di trascrizione. Altri bersagli di pTEF-b sono i fattori inibitori: N-TEF (Negative Transcription Elongation Factor), DSIF (DRB-Sensitivity Inducing Factor) ed NELF (Negative Elongation Factor) [96].



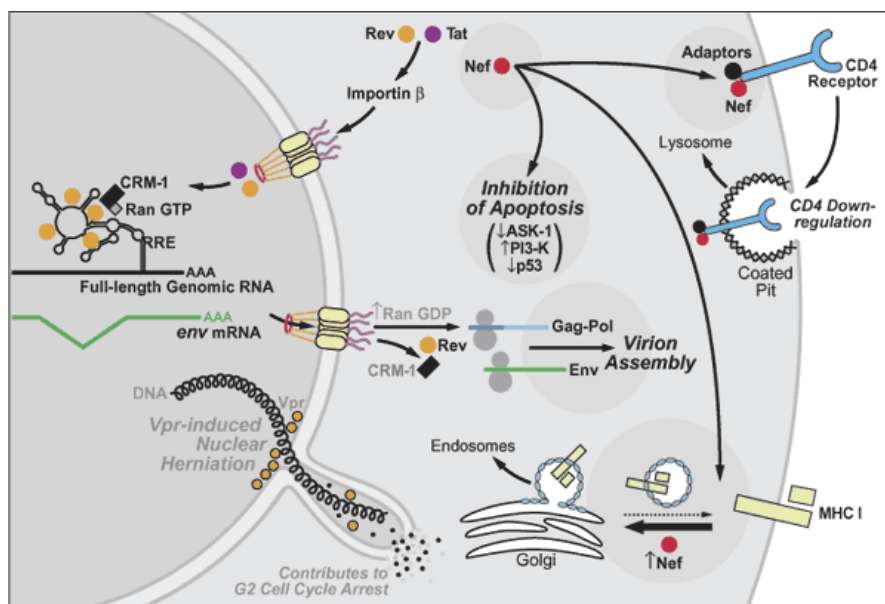
**Figura 15:** Meccanismi di latenza post integrazione. Ruolo di Tat (da hivinsite.ucsf.edu). Due meccanismi che stanno alla base della latenza dovuta alla integrazione di HIV, è messo in rilievo il ruolo centrale di Tat nel promuovere l'infezione produttiva delle cellule bersaglio.

L'elevata affinità di legame tra HIV LTR e questi fattori inibenti può spiegare perché LTR è un promotore poco efficiente in assenza di Tat. Un motivo ricco di arginine (ARM) interno a Tat ed alla ciclina T1 lega TAR sul messaggero in trascrizione. Cdk9 deve subire un processo di autofosforilazione di alcuni residui di serina e treonina vicino al C-terminale per consentire l'interazione tra Tat, P-TEFb e TAR. Nelle cellule quiescenti, livelli di P-TEFb possono essere bassi o solo parzialmente attivi a causa dell'interazione fra P-TEFb e 7SKRNA, uno small nuclear RNA che inibisce il complesso. Tutti questi eventi sembra possano contribuire al processo di latenza post integrazione [97, 98].

La trascrizione del genoma virale dà origine a più di una dozzina di trascritti differenti. Alcuni sono espressi contemporaneamente e, in assenza di sequenze inibitorie (IRS) sull'RNA, trasportati rapidamente nel citoplasma cellulare [99]. Questi trascritti, che subiscono il processo di splicing in modo completo, codificano per le proteine Nef, Tat e Rev. I trascritti che codificano per proteine strutturali, enzimatiche ed accessorie e rappresentano quindi gli RNA necessari per l'assemblaggio di nuovi virioni infettivi, vanno incontro a splicing incompleto e rimangono in nucleo. E' la stessa proteina Rev, regolatore dell'espressione genica, ad inibire lo splicing dei messaggeri interagendo con fattori specifici quali ASF/SF2 e la proteina p32 ad essi associata [100].

Il trasporto dal nucleo al citoplasma dei trascritti virali non completamente processati, come l'mRNA di Env, dipende da Rev. Rev è una piccola proteina che lega una porzione nucleotidica presente sull'RNA genomico virale definita RRE (Rev Response Element), localizzata nel gene env. Rev si lega inizialmente, con elevata affinità, ad una regione specifica di RRE, definita stem-loop IIB. Questo legame consente la multimerizzazione di Rev su tutto RRE (Figura 16). Insieme ad un segnale di localizzazione nucleare, Rev contiene una sequenza ricca di leucine di esporto nucleare (NES). Lo studio di Rev ha portato alla scoperta successiva di molte proteine con sequenza NES, appartenenti a varie linee cellulari, e ha consentito l'importante identificazione di un complesso fra CRM1 ed esportina-1, che lega Rev e regola il processo di replicazione [99].

L'uscita dal nucleo del complesso formatosi (trascritto virale, Rev e CRM1/esportina) dipende da un altro fattore della cellula ospite, RanGTP. Ran è una GTPasi monomeriche, presente nello stato attivo legata al GTP e inattivo al GDP. RanGDP si trova principalmente nel citoplasma e proprio in questo compartimento cellulare si localizza la proteina GAP (Gtpase Activator Protein) che idrolizza il GTP a GDP+Pi. Al contrario, RCC1 (Ran nucleotide exchange factor), che lega il GTP a Ran, è espresso prevalentemente nel nucleo. Il gradiente prodotto dalla localizzazione dei due enzimi, RanGTP e RanGDP, fra nucleo e citoplasma della cellula gioca un ruolo importante nel determinare la direzione del trasporto delle proteine da e verso il nucleo. L'uscita dei messaggeri dai pori del nucleo è direzionata poi da Rev/CRM1/esportina 1, in presenza di RanGTP. Quando il complesso raggiunge il citoplasma, il GTP viene idrolizzato a GDP, con conseguente rilascio delle varie componenti. La reazione opposta regola invece l'entrata nel nucleo ed è veicolata, in questo caso, dalle importine  $\alpha$  e  $\beta$ . RanGTP stimola il rilascio del carico a livello nucleare [99].



**Figura 16:** Sintesi degli eventi tardivi che avvengono nella cellula infettata da HIV e che portano all'assemblaggio di nuovi virioni infettivi. Sono evidenziati i ruoli delle varie proteine virali per ottimizzare l'ambiente intracellulare per la replicazione virale: la down-regolazione di CD4 e MHC I e l'inibizione dell'apoptosi attuate da Nef e l'induzione dell'arresto del ciclo cellulare in fase G2 effettuata da Vpr. È inoltre illustrata l'azione fondamentale della proteina Rev nel promuovere l'esportazione nucleare dei trascritti virali parzialmente processati che codificano per le proteine strutturali ed enzimatiche nonché del genoma virale dei nuovi virioni. (da hivinsite.ucsf.edu).

Per la propagazione dell'infezione di HIV, è necessario un equilibrio fra il processo di splicing e il trasporto dei messaggeri virali fra nucleo e citoplasma. Se lo splicing è efficiente, nel citoplasma si ritrovano solo alcuni tipi di messaggeri (es. Tat, Rev e Nef), ma le proteine regolatorie, codificate da essi, non sono sufficienti a portare a termine la replicazione virale. Al contempo se lo splicing è incompleto, non può avvenire una sintesi adeguata delle proteine Tat, Rev e Nef. In molte cellule animali i trascritti di HIV vengono completamente spliced, prevenendo così, in modo efficace, la replicazione del virus nell'ospite [101].

A differenza di Tat e Rev, che agiscono direttamente su strutture dell'RNA virale, Nef modifica l'ambiente citoplasmatico della cellula infettata per migliorare la replicazione del virus (Figura 16). L'assenza di Nef, infatti, è associata con una progressione più lenta della malattia verso lo stadio di AIDS conclamata [102]. L'aumento di virulenza dovuto a Nef sembra essere associato alla sua abilità di attivare alcune vie di trasduzione del segnale specifiche e alla sua capacità di

ridurre l'espressione dei CD4 sulla superficie della cellula. Nef promuove, poi, la produzione ed il rilascio di virioni che sono più infettivi. L'effetto di Nef sul pathway di PI3-K, che coinvolge l'attivazione a cascata dei fattori Vav, GTPasi Cdc42, Rac1 e p21, provoca grossi cambiamenti nei microfilamenti di actina intracellulare, promuove il movimento dei lipidi di membrana e la formazione di strutture coinvolte nella via di trasduzione del segnale del recettore delle cellule T. Infatti, Nef ed alcune proteine strutturali, con funzione analoga, si localizzano vicino alle membrane lipidiche cellulari. Altre due proteine di HIV agiscono, come Nef, inibendo l'espressione di CD4 in superficie [103, 104].

La proteina gp120 dell'envelope lega CD4 nel reticolo endoplasmatico, rallentando così il suo trasporto verso la membrana cellulare, mentre Vpu lega le code citoplasmatiche di CD4, promuovendo il reclutamento di TrCP e Skp1p (Figura 17). Il legame di questi due fattori provoca l'ubiquitinazione di CD4 ed il suo reclutamento nel proteasoma, dove viene degradato prima di raggiungere la superficie della cellula [105].

Nef agisce in molti modi per eludere e ridurre la risposta immunologica dell'organismo contro HIV. Nelle cellule T, Nef attiva l'espressione di FasL, un ligando che induce apoptosi in tutte quelle cellule che esprimono Fas, ad esempio, i linfociti T CD8+ [106]. Nef riduce poi l'espressione dei complessi MHC I sulla superficie della cellula e riduce così la capacità di riconoscimento e di eliminazione delle cellule infette da parte dei linfociti citotossici. Nef, nel contempo, non riduce l'espressione di HLA-C, cosa che impedisce il riconoscimento e l'uccisione delle stesse cellule infette da parte delle natural killer [107].

Nef inibisce anche l'apoptosi delle cellule. Blocca, infatti, la chinasi ASK-1 coinvolta nel pathway di Fas e TNRF e stimola la fosforilazione di Bad (proteina proapoptotica membro della famiglia Bcl-2), permettendo il suo sequestro da parte della proteina 14.3.3. Nef è in grado di legare poi la proteina p53, inibendo così un'altra potente proteina che stimola il processo apoptotico. Attraverso questi semplici e numerosi meccanismi, Nef prolunga la vita delle cellule infette dell'ospite, ottimizzando così la replicazione virale [108–110].

Esistono altre proteine virali che contribuiscono a modificare la cellula infettata. Vpr, ad esempio, induce l'arresto di queste cellule in fase G2/M del ciclo cellulare. Dato che l'LTR virale è molto più attivo durante la fase G2, questo arresto sembra essere strategico proprio per aumentare l'espressione dei geni virali. Difetti nella lamina nucleare sembrano essere coinvolti nel blocco del ciclo cellulare. Rotture nell'involucro nucleare provocano la fuoriuscita di porzioni di DNA verso il

citoplasma cellulare. Queste interruzioni della lamina causano il rimescolamento tra fattori nucleari e proteine citoplasmatiche. Sia le alterazioni della struttura della lamina che il rimescolamento delle proteine cellulari, che sono normalmente localizzate in specifici compartimenti cellulari, può spiegare la capacità di arresto del ciclo in G2 provocata da Vpr [111].

### 1.3.6 Assemblaggio e maturazione

Le nuove particelle virali devono gemmare dalla membrana plasmatica della cellula ospite (Figura 17). Ciascun nuovo virione è costituito da 1500 molecole di Gag e 100 proteine di fusione Gag-Pol, due RNAss virali e Vpr.[112] Molte altre proteine partecipano al processo di assemblaggio, inclusa le proteine Gag, Gag-Pol, Nef ed Env. Sembra essere coinvolta anche la proteina umana HP68 (ATP-binding protein), che agisce probabilmente come chaperonina e facilita cambiamenti conformazionali in Gag necessari all'assemblaggio dei capsidi virali [113]. Nei linfociti T CD4, Vif gioca un ruolo altrettanto importante ma poco riconosciuto. In assenza di Vif infatti, vengono prodotti livelli normali del virus, ma i virioni non sono infettivi e subiscono un arresto nella fase di retrotrascrizione nelle successive cellule infettate.

Come detto in precedenza, Vif supera gli effetti di un inibitore naturale della replicazione di HIV presente nella cellula. Questo fattore, inizialmente chiamato CEM15/APOBEC3G, è stato completamente identificato solo di recente ed è un omologo di APOBEC1, un enzima coinvolto nell'editing degli RNA [114].

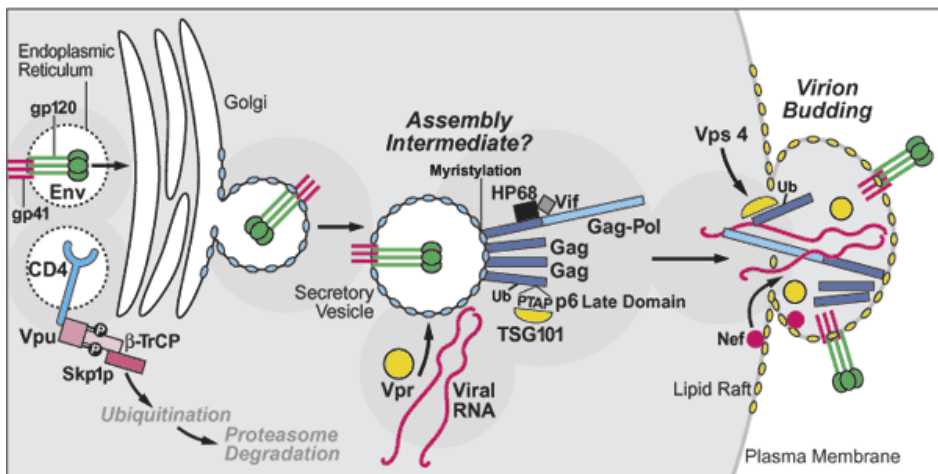


Figura 17: Ultimi eventi di assemblaggio dei nuovi virioni (da hivinsite.ucsf.edu).

La proteina Gag, in questa fase, subisce miristilazione, una modifica che consente una maggior affinità della proteina a domini di membrana ricchi di colesterolo e glicolipidi. La gemmazione dei virioni avviene, proprio, da queste regioni specifiche del doppio strato fosfolipidico, rendendo l'envelope dei virioni ricco di colesterolo. Questa composizione lipidica favorisce il rilascio, la stabilità e la fusione dei virioni con le successive cellule bersaglio [115]. La reazione di gemmazione (Figura 17) in sé coinvolge l'attività di molte proteine, ed un ruolo importante sembra svolgerla la sequenza PTAP presente nella porzione p6 di Gag. La proteina p6, in questa porzione, può essere modificata per ubiquitinazione. Il soppressore tumorale TSG101 lega il motivo PTAP su p6 e riconosce la modifica di ubiquitinazione attraverso il proprio dominio UEV (ubiquitin enzyme 2 domain). La proteina TSG101 si associa, normalmente, ad altre proteine cellulari, formando il complesso ESCRT-1 (complesso richiesto per il trasporto degli endosomi). Questo rappresenta un segnale necessario per la cessione delle proteine ubiquitinate all'interno di corpi multivescicolari, definiti MVB. Gli MVB si formano quando porzioni di endosoma gemmano e fondono con i lisosomi, rilasciando il loro contenuto all'interno di questi organelli per la degradazione. Nel caso di HIV, TSG101 sembra partecipare invece attivamente alla gemmazione dei virioni nello spazio extracellulare [116].

Le fasi finali del ciclo cellulare di HIV sono localizzate, quindi, vicino alla membrana plasmatica della cellula ospite. La proteina gp160, una volta superato il reticolo endoplasmatico, attraversa l'apparato del Golgi dove viene tagliata dalla proteasi nelle sue due componenti: gp41 e gp120. Queste vengono trasportate, già in forma trimerica, all'interno di vescicole secretorie, sulla membrana plasmatica dove gp41 si ancora e consente l'esposizione verso l'esterno della superficie di gp120. Le proteine Gag e Gag-pol, localizzate anch'esse a livello della membrana, insieme all'RNA virale, iniziano a gemmare verso l'esterno della cellula ospite. Il processo di maturazione del virione, ossia il passaggio da forma immatura a forma matura, è il passo successivo alla gemmazione. Il virione immaturo, dopo essersi allontanato dalla cellula ospite, subisce una serie di modificazioni ad opera della proteasi virale che taglia i due precursori Gag e Gag-Pol nelle proteine costituenti, necessarie al virione. Da Gag o p55 si ottengono p24, p17, p7, p9 che daranno rispettivamente origine alle proteine del capsido, della matrice e due proteine interne del nucleocapsido, mentre Gag-Pol viene tagliato in HIV proteasi (p10), RT (p50), RNAsi H (p15) ed integrasi (p41). Il virus è ora maturo e può infettare nuove cellule.

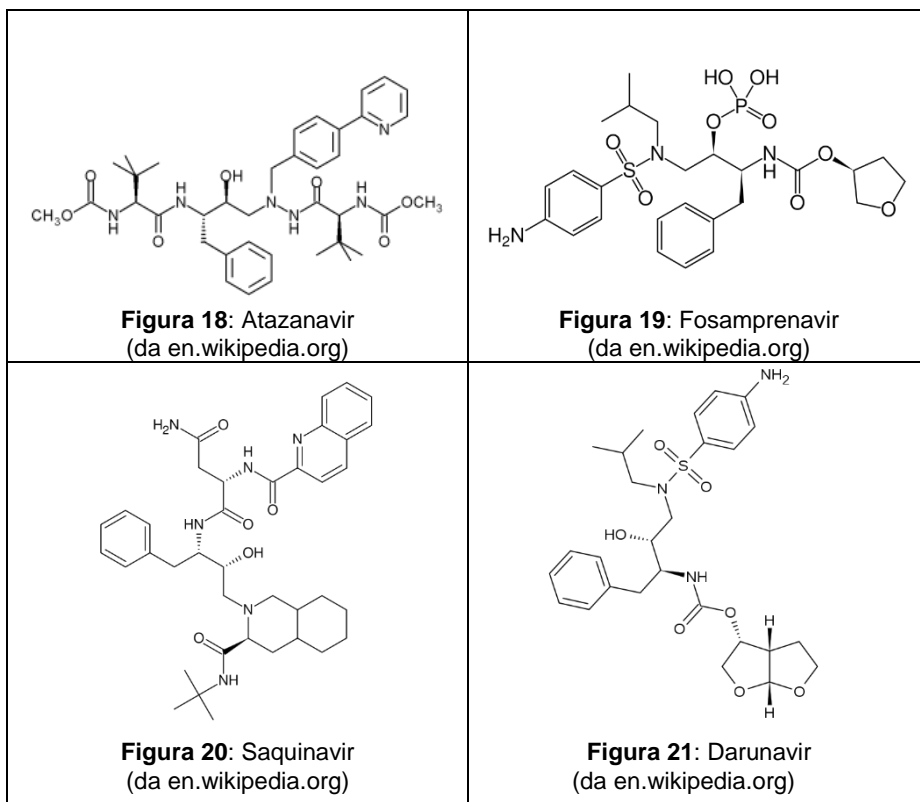
### 1.3.6.1 *Inibitori della maturazione*

Gli inibitori della maturazione sono una classe di farmaci antiretrovirali che vanno ad inibire l'attività della proteasi di HIV, enzima responsabile della maturazione dei virioni dopo il budding. Questa classe di farmaci, PI, blocca la processazione dei precursori delle proteine virali impedendo la generazione di proteine capsidiche e del core mature e, quindi, l'assemblaggio di virioni infettanti. I PI vengono riconosciuti dalla proteasi poiché mimano il legame peptidico scissibile fra Gag e Pol (Phe-Pro) ed agiscono, quindi, instaurando una competizione con il substrato per sito attivo dell'enzima. L'inibizione permane fino a quando il sito di legame viene occupato dall'inibitore, ovvero fino a quando la proteasi si trova sotto forma di dimerico [78].

Studi clinici hanno dimostrato che l'uso in monoterapia di questi composti riduce da 30 a 100 volte i livelli di viremia ma questo tipo di uso facilita la comparsa di farmaco resistenza. Inoltre, agendo tutti sullo stesso sito della proteasi e possedendo strutture tendenzialmente simili, si verificano spesso fenomeni di cross-resistenza nei confronti di più PI.

I farmaci oggi in commercio sono:

- **Amprenavir** (Agenerase): approvato dalla FDA nel 1999 e sostituito nel 2004 da Fosamprenavir, suo precursore metabolico;
- **Atazanavir** (ATV- Reyataz): approvato nel 2003 dalla FDA ed indicato con la sigla ATV o BMS232632. Atazanavir si distingue dagli altri PI poiché può essere assunto una sola volta al giorno ed ha minori effetti collaterali, ad esempio, non incrementa le quantità di colesterolo ed altri grassi nel sangue (Figura 18);
- **Fosamprenavir** (FPV- Lexiva): approvato dalla FDA nel 2003, viene metabolizzato dal corpo umano ad Amprenavir che rimane per un tempo più lungo nell'organismo come metabolita attivo (Figura 19);
- **Saquinavir** (SQV- Fortovase, Invirase): il primo PI approvato dalla FDA nel 1995 (Figura 20);
- **Lopinavir** (LPV/r - Kaletra);
- **Indinavir** (IDV- Crixivan);
- **Nelfinavir** (NFV-Viracept);
- **Ritonavir** (RTV-Norvir);
- **Darunavir** (DRV- Prezista);
- **Tipranavir** (TPV- Aptivus).



### 1.3.7 Terapia HAART

A seguito della sistematica diffusione di HIV e dell'insorgenza di AIDS, è emersa la necessità di una terapia antiretrovirale che fosse al contempo precoce ed aggressiva. La precocità è fondamentale per essere efficaci su una popolazione virale relativamente omogenea dal punto di vista genomico (pertanto maggiormente sensibile all'azione farmacologica) e, nel medesimo tempo, preservare le condizioni di relativa immunocompetenza del sistema immunitario, compresa la risposta HIV specifica. L'aggressività del trattamento riduce invece drasticamente la capacità replicativa del virus, e questo, da un lato limita l'emergenza di mutanti farmaco-resistenti evitando il fallimento farmacologico, dall'altro rallenta il danno immunitario cronico virus-indotto dilazionando nel tempo gli eventi clinici dovuti all'immunocompromissione.

Importanti studi clinici hanno tuttavia messo in evidenza l'inefficacia a lungo termine, come già riferito, della monoterapia. L'assunzione di una sola classe di



farmaci coincide con il mancato controllo della replicazione virale e con l'impossibilità di bloccare la progressione dell'infezione. Infatti, quando viene utilizzato un solo inibitore, la riduzione dei valori di viremia e l'incremento del numero di linfociti T CD4+ è transitoria; nel giro di poco tempo, a causa dell'estrema variabilità genetica virale e della pressione selettiva esercitata dal farmaco stesso, emergono nuove forme mutanti del virus, farmaco-resistenti. Tuttavia esiste la possibilità di dilazionare nel tempo la comparsa di ceppi resistenti, ottenendo una maggior efficacia clinica, mediante l'impiego di associazioni farmacologiche. Oggi l'approccio terapeutico più utilizzato consiste nell'unione di tre farmaci, generalmente un PI con due NRTI o in alternativa due NRTI con un NNRTI. Questo tipo di terapia, definita HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) si è dimostrata notevolmente efficace nel sopprimere in maniera drastica e duratura la replicazione virale e nel determinare un rapido aumento del numero dei linfociti T CD4+ nei pazienti HIV-infetti. La HAART provoca, quindi, un netto miglioramento dei risultati terapeutici con una drastica riduzione nell'incidenza delle infezioni opportunistiche e dei tumori e, in molti casi, consente un allungamento della vita dei malati [117].

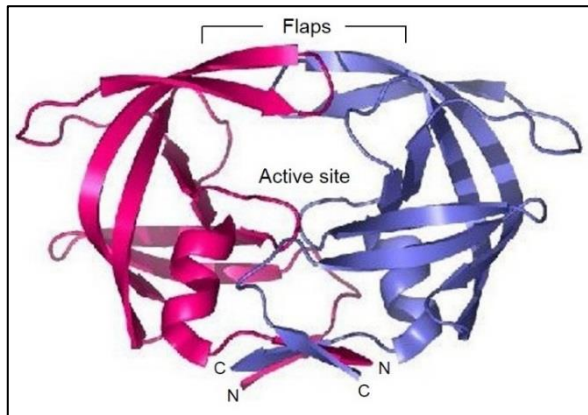
Accanto agli indubbi successi, stanno emergendo sempre più gli aspetti problematici della terapia. Innanzitutto la completa eradicazione del virus non è ancora ottenibile con i farmaci attualmente disponibili perché i reservoir virali, a causa della loro lunga emivita, non possono essere eliminati. Inoltre, i farmaci utilizzati provocano effetti collaterali inattesi e non ancora compresi nella loro patogenesi. Nel giugno 1997 la Food and Drug Administration riportava, per la prima volta, il caso di 83 pazienti sottoposti a terapia con PI in cui si era manifestata l'insorgenza di diabete mellito di tipo 2, mentre nel 1998 veniva fatta menzione di un'anomala distribuzione del grasso corporeo, definita, solo successivamente, sindrome lipodistrofica [118]. Oltre al diabete e alla lipodistrofia, la HAART risulta essere associata ad altre complicanze a lungo termine che comprendono ipertrigliceridemia, ipercolesterolemia, acidosi lattica, neuropatia periferica, miopatia, ginecomastia, pancreatite, osteopenia e alterazione dei livelli degli ormoni tiroidei. Tutto ciò ha ovviamente portato ad una crescente attenzione da parte del mondo scientifico sul potenziale rischio per questi pazienti di sviluppare più facilmente malattie cardiovascolari. Altri due problemi sono correlati alla HAART: il costo elevatissimo e la bassa *compliance* del paziente a causa di uno schema posologico molto complicato.

Oggi sono al vaglio protocolli terapeutici che prevedono un alternarsi tra periodi di assunzione dei farmaci e periodi di sospensione della terapia. L'obiettivo delle interruzioni programmate della terapia antiretrovirale (structured therapy interruption, STI) è quello di migliorare la gestione a lungo termine della terapia stessa, riducendo i costi e aumentando la *compliance* del paziente, ma non sono esclusi anche potenziali benefici in termini clinici. Infatti, in pazienti con ripetuti fallimenti virologici, gli schemi di STI potrebbero ridurre la comparsa di mutazioni ed eventualmente ripristinare il fenotipo virale *wild-type*, che si presume non essere resistente ai farmaci. In questo caso la risposta virologica ad una successiva ripresa della terapia dovrebbe essere più valida e duratura. Alcuni studi hanno tuttavia dimostrato che se tale risposta si ottiene è, però, solo transitoria e spesso durante le sospensioni sono stati osservati casi di evoluzione verso AIDS conclamata. Invece, in pazienti che mostrano una risposta virologica stabile e duratura alla HAART, schemi di STI potrebbero ottenere un ripristino della risposta specifica anti-HIV. Diversi studi hanno evidenziato che in alcuni di questi pazienti si ottiene effettivamente un incremento della risposta CD4+ anti-HIV specifica e che la carica virale, dopo sospensioni progressive, tende ad aumentare in misura sempre minore. Tuttavia, studi successivi non hanno portato a risultati altrettanto incoraggianti dal punto di vista del beneficio a lungo termine. È stato infatti dimostrato che in seguito ai *rebound* della viremia durante i periodi di sospensione del trattamento, anche se modesti, si verifica un ripopolamento dei reservoir virali, rendendo irrealizzabile l'ipotesi dell'eradicazione[119, 120].

## **1.4 HIV proteasi**

### **1.4.1 Struttura ed attività enzimatica**

L'HIV proteasi è stata caratterizzata strutturalmente nel 1989 da un gruppo di ricercatori del Laboratorio Merck, guidati da M. Navia. Furono loro i primi ad ottenere la struttura cristallografica dell'enzima e, grazie alla loro scoperta, fu possibile iniziare studi riguardanti la sua funzione e la sua specificità di legame al substrato ed agli inibitori. Ricerche successive, svolte da S.B.H. Kent e dai suoi collaboratori, fornirono informazioni più accurate e precise sulla struttura e sul meccanismo d'azione di questo enzima di HIV (Figura 22) [36].



**Figura 22:** Struttura cristallografica di HIV-PR (da janu.ac.in).

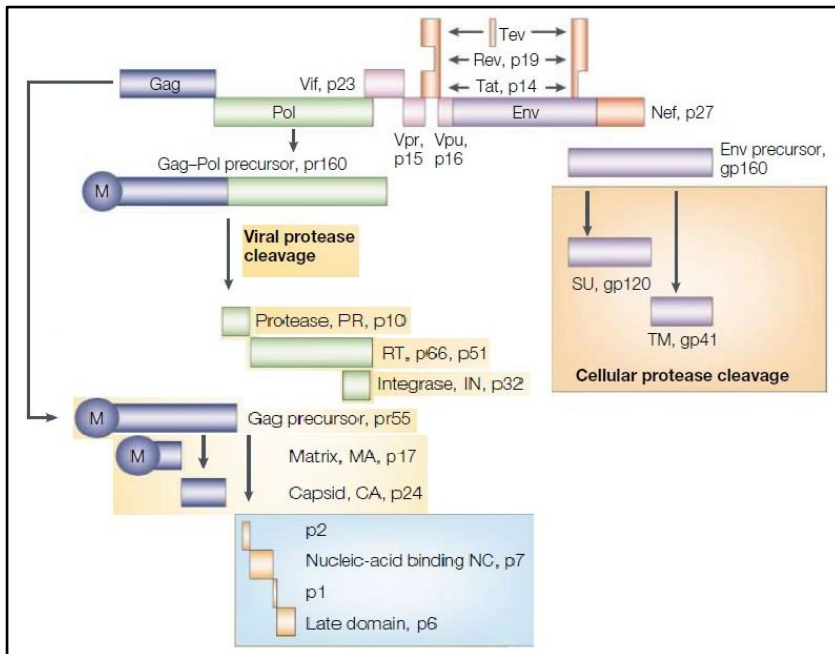
HIV-PR è una proteasi aspartica di 22 kDa che funziona come omodimero obbligato con un unico sito attivo. È un enzima auto-assemblante costituito da due monomeri identici, posizionati simmetricamente l'uno rispetto all'altro. L'assemblaggio delle due subunità dà luogo alla formazione di un sito attivo centrale di forma cilindrica, con una lunghezza di 23 Å e un diametro di 6-8 Å. Ciascun monomero è costituito da 99 amminoacidi e contiene al suo interno una serie di sequenze con conformazione  $\beta$ -strand,  $\beta$ -chain ed un' $\alpha$ -elica. Quattro di questi  $\beta$ -strand si organizzano a dare una conformazione a  $\Psi$ -sheet tipica di tutte le proteasi aspartiche (es. HIV proteasi, renina, pepsina e catepsine D ed E).

Ogni monomero presenta 2 domini strutturali fondamentali: il dominio "flap" ed il dominio "core". Il primo è una regione altamente flessibile della proteina, localizzata al di sopra del sito attivo e necessaria per isolare il sito di legame dell'enzima dall'ambiente cellulare circostante nel momento di binding del substrato. Le due regioni flap hanno infatti il compito di aprirsi all'arrivo del substrato e richiudersi dopo il legame della molecola con il sito attivo. Terminata l'azione catalitica della proteasi, i due flap si aprono e liberano i prodotti di taglio. Il dominio "core" è, al contrario, una regione compatta del monomero che contiene la triade catalitica, altamente conservata, Asp 25, Thr 26 e Gly 27. Il residuo aspartico si localizza nel fondo della tasca di legame ed è responsabile dell'interazione fra substrato ed enzima. Questo dominio sembra essere anche coinvolto nella stabilizzazione del dimero [121].

Il sito catalitico dell'enzima contiene una serie di sottositi ben definiti che determinano la selettività per il substrato e sono definiti S1-S2-S3...Sn. I sottositi sono composti per la maggior parte da amminoacidi idrofobici e legano residui

specifici della proteina substrato, indicati con P1-P2-P3...Pn. Data la natura simmetrica della proteasi, i sottositi del primo monomero (S1-Sn) sono strutturalmente e conformazionalmente uguali a quelli del secondo monomero, identificati con la sigla S'1-S'n [36].

La proteasi di HIV è responsabile del taglio proteolitico dei precursori Gag e Gag-pol e dell'origine alle proteine strutturali e funzionali più importanti di HIV (Figura 23).



**Figura 23:** Precursori Gag e Gag-Pol e proteine ottenute dal taglio proteolitico di HIV-PR.

Studi recenti sono stati in grado di spiegare il suo meccanismo d'azione: l'enzima è responsabile di una reazione di idrolisi del legame peptidico in siti specifici della proteina substrato, generalmente, all'N-terminale di residui di prolina e fenilalanina. La scissione dei precursori nelle loro componenti consente la maturazione definitiva del virione all'esterno della cellula ospite [121].

#### 1.4.2 Mutazioni associate alla resistenza ai PI

Sebbene esistano in commercio 9 inibitori anti-HIV PR, la loro efficacia risulta talmente scarsa da impedirne l'utilizzo in monoterapia. La causa di questa ridotta validità farmacologica dei PI va attribuita alla diffusione di ceppi virali che hanno

sviluppato resistenza farmacologica. Con il termine resistenza si indica la capacità di HIV di replicare all'interno dell'organismo anche in presenza di una terapia antiretrovirale. La comparsa di questa abilità di HIV è spiegata dall'insorgenza di mutazioni nel genoma virale. L'elevata velocità di replicazione del virus ( $10^8$ - $10^9$  virioni/die) e l'alto tasso di errore della retrotrascrittasi (1 su 10000 basi) sono la causa principale delle  $3,4 \times 10^{-5}$  mutazioni che avvengono per ogni ciclo vitale di HIV. Sette anni dopo l'infezione primaria nessun virione presenta, infatti, il genotipo originale ed è proprio per questo motivo che, ancora nel 2009, l'AIDS è una patologia non curabile in modo definitivo. Le mutazioni del genoma consentono la nascita e la sopravvivenza di varianti virali che sono più adatte a replicarsi all'interno dell'organismo ospite, eludendo il sistema immunitario e la terapia farmacologica in atto. Lo sviluppo delle resistenze in HIV è un processo di selezione clonale: l'elevata velocità con cui HIV muta produce una popolazione virale nella quale mutanti per la resistenza ad alcuni farmaci esistono ancora prima che la terapia abbia inizio. La terapia, infatti, non fa altro che selezionare, fra i miliardi di virus presenti, quelli che sono insensibili all'azione del farmaco, provocando l'eliminazione di tutti gli altri. Lo sviluppo di resistenza limita l'utilizzo a lungo termine degli inibitori, come PI, e per questo motivo non esistono ancor'oggi, strategie farmacologiche che siano in grado di ostacolare in modo continuativo ed efficace la diffusione pandemica di HIV.

L'analisi della sequenza genica dei cloni resistenti di HIV ha comunque mostrato che il meccanismo di sviluppo della resistenza ai PI è abbastanza complicato. La collocazione delle mutazioni, difatti, si distribuisce in quasi tutto l'enzima, non riguarda solo il sito attivo, ma può colpire l'interfaccia del dimero e le regioni flap di superficie. Le mutazioni che vanno a colpire il sito attivo interferiscono con il legame dell'inibitore all'enzima, modificando la sua specificità e/o la sua affinità. Le mutazioni che interessano regioni diverse da queste vanno invece ad influenzare l'attività catalitica dell'enzima o la sua stabilità, riducendo la costante di dissociazione dei monomeri. Probabilmente la resistenza ai PI è generata da una combinazione di questi fattori [36].

L'Organizzazione Mondiale della Sanità stila ogni anno una lista aggiornata delle mutazioni di HIV che conferiscono resistenza farmacologica. E' stato creato un database virtuale, HIV Drug Resistance Database (Stanford University), dal quale è possibile ricavare informazioni sulle mutazioni che colpiscono la proteasi di HIV e che provocano resistenza nei confronti dei PI. La Tabella 1 mostra i residui amminoacidici soggetti maggiormente a mutazione e tutte le sostituzioni possibili:

<b>Amminoacido</b>	<b>Mutazioni</b>
L23	I
L24	I
D30	N
V32	I
M46	I, L
I47	V, A
G48	V, M
I50	V, L
F53	L, Y

<b>Amminoacido</b>	<b>Mutazioni</b>
I54	V, L, M, A, T, S
G73	S, T, C, A
L76	V
V82	A, T, F, S, C, M, L
N83	D
I84	V, A, C
85	V
N88	L, D, S
L90	M

**Tabella 1:** Mutazioni di HIV-PR (da <http://hivdb.stanford.edu/> (DATABASE)).

La Tabella 2, invece, fornisce informazioni sulle mutazioni che vanno a modificare, specificatamente, l'azione farmacologica dei PI in commercio:

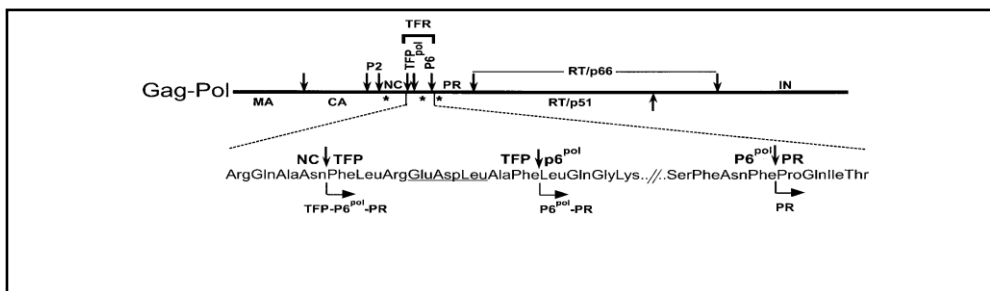
	<b>aa</b>	<b>ATV</b>	<b>DRV</b>	<b>FPV</b>	<b>IDV</b>	<b>LPV</b>	<b>NFV</b>	<b>SQV</b>	<b>TPV</b>
23	L						I		
24	L	I		I	I	I	I	I	
30	D						N		
32	V		I	I	I	I			I
33	L	F	F	F		F	F		F
46	M	IL		IL	IL	IL	IL		IL
47	I	V	VA	VA	V	VA	V		V
48	G	VM				VM	VM	VM	
50	I	L	V	V		V			
53	F	L			L		L	L	
54	I	VTALM	LM	VTALM	VTALM	VTALM	VTALM	VTALM	VAM
73	G	ST	ST	ST	ST		ST	ST	
76	K		V	V	V	V			
82	V	ATSF		ATFS	AFTS	AFTS	AFTS	AT	ATFSL
84	I	VAC	VAC	VAC	VAC	VAC	VAC	VAC	VAC
88	N	DS			S		DS	S	
90	L	M	M	M	M	M	M	M	M

**Tabella 2:** Mutazioni di HIV-PR che provocano farmaco-resistenza nei confronti dei PI oggi in commercio (da <http://hivdb.stanford.edu/> DATABASE).

Le mutazioni segnate in rosso sembrano essere responsabili della riduzione della risposta virologica in vitro, mentre la presenza in un soggetto delle mutazioni in rosso sottolineato è particolarmente controindicata per la terapia con il PI corrispondente. Ad esempio, in presenza della sostituzione della Asn<sup>88</sup> con una Ser, il soggetto sviluppa farmaco resistenza sicura nei confronti di Atazanavir.

### 1.4.3 Maturazione del precursore della proteasi di HIV

Nel genoma di HIV-1 la proteasi è localizzata all'interno del precursore Gag-Pol, affiancata in posizione N-terminale dalla regione p6 e in posizione C-terminale dalla regione RT (retrotrascrittasi). L'inizio della maturazione di Gag-Pol corrisponde alla dimerizzazione del dominio proteasico e alla formazione di un sito attivo capace di idrolizzare il legame peptidico in alcuni siti specifici del precursore [122]. Il taglio di questi siti rende possibile il rilascio di una proteasi matura con elevata attività catalitica e la conseguente liberazione delle proteine essenziali all'assemblaggio e alla maturazione del virione gemmato (Figura 24).



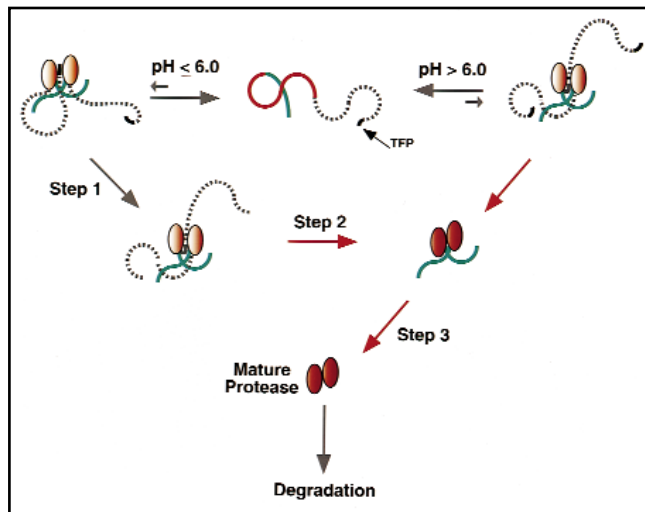
**Figura 24:** Organizzazione strutturale del precursore Gag-Pol nel virione HIV-1 [122].

Per studiare l'autoprocessamento della proteasi di HIV-1 alcuni autori hanno prodotto il precursore contenente la regione transframe (TFR) a monte dell'N-terminale della proteasi [122]. La regione TFR è formata da due domini: un octapeptide N-terminale (TFP), conservato in tutte le varianti di HIV-1, e la p6 formata da 48 o 60 amminoacidi. Questi due domini sono separati tra loro e dalla sequenza della proteasi da siti di taglio riconosciuti dalla proteasi stessa [123, 124]. La presenza della sequenza p6 è stata dimostrata essere importante per rallentare il processamento della proteasi, al contrario della sequenza nucleocapsid (NC), che si trova a monte della TFP nel precursore Gag-Pol, la quale ha invece un'azione di velocizzazione del processo. [126, 127]

Il precursore TFP-p6-PR presenta un basso livello di dimerizzazione rispetto all'enzima maturo e non è in grado di raggiungere una struttura terziaria stabile e cataliticamente attiva. Il taglio dell'estremità N-terminale (TFP) risulta importante per l'attivazione della proteasi in quanto permette la formazione di una struttura terziaria stabile e l'aumento dell'attività catalitica.

Nel modello proposto da Louis e colleghi la rimozione della regione TFR e la successiva maturazione di PR sono influenzati dal pH dell'ambiente in cui matura il precursore Gag-Pol (Figura 25).

Secondo le loro analisi NMR, l'attivazione della proteasi virale avviene in due passaggi successivi a pH inferiore a 6.0 mentre a pH superiori a 6.0 si ha un unico step. Nel primo caso, pH 4.0 - 5.0, si ha un primo step che corrisponde alla scissione del legame peptidico fra TFP-p6, questo taglio, che non andrebbe ad influenzare l'attività catalitica dell'enzima, viene fatto all'interno del virione attraverso un meccanismo intramolecolare. Il secondo step riguarda invece il taglio proteolitico del legame p6-PR che consente il rilascio dell'estremità N-terminale della proteasi ed è essenziale per la formazione di una struttura terziaria stabile e quindi di un'elevata attività catalitica. Al contrario di TFR, il dominio RT, localizzato al C-terminale di PR, non sembra influenzare l'attività catalitica dell'enzima. A pH superiori a 6.0 il rilascio della proteasi matura avverrebbe invece in un unico step in quanto il taglio si verificherebbe direttamente a livello del legame p6-PR con conseguente liberazione della proteasi dal dominio TFP-p6 (Figura 24) [122].



**Figura 25:** Modello a step di maturazione della proteasi di HIV [122]



#### **1.4.4 Mutanti stabili della proteasi di HIV e del suo precursore**

La proteasi di HIV-1 WT matura subisce una rapida autoproteolisi a temperatura ambiente, con conseguente formazione di prodotti di taglio intermedi e perdita di attività enzimatica già a concentrazioni di proteina molto basse (nanomolare). Il sito principale di autoproteolisi dell'enzima maturo è compreso tra gli amminoacidi Leu5 e Trp6; gli altri due siti minori sono tra la Leu33-Glu34 e Leu63-Ile64 [127, 128].

È stato osservato che la proteasi mutata recante le sostituzioni Q7K, L33I e L63I mantiene le proprietà e le specificità cinetiche dell'enzima WT ma risulta più resistente all'autoproteolisi permettendo così di effettuare gli studi strutturali mediante NMR. [128]

E' stato inoltre dimostrato che l'ossidazione di due cisteine altamente conservate, rispettivamente in posizione 67 e 95 della proteasi, riduce l'attività dell'enzima del 50-100%, i mutanti C67A e C95A e il doppio mutante C67A /C95A in cui le cisteine sono state sostituite da alanine risultano più stabili. [129].

La proteasi "pentamutata" recante tutte queste 5 mutazioni (Q7K, L33I, L63I, C67A e C95A) risulta maggiormente resistente sia all'autoproteolisi che all'inattivazione dovuta all'ossidazione e per questo motivo viene spesso utilizzata negli esperimenti in vitro. Anche Louis e colleghi, al fine di ottenere una proteina stabile, hanno prodotto il precursore fondendo la regione TFR alla sequenza della proteasi pentamutata anziché che a quella WT.

Il precursore della proteasi di HIV espresso in cellule di *E. coli* va incontro a processamento dando origine alla proteasi matura che risulta essere la forma predominante. Gli autori hanno dimostrato che l'introduzione un'ulteriore mutazione (R8Q) stabilizza il precursore riducendone il processamento e permettendo quindi di ottenerne maggiori quantità, nel caso del precursore mutato, si osservano infatti approssimativamente uguali quantità di precursore e di proteasi matura [122].

### **1.5 Razionale del lavoro**

Attualmente i test utilizzati nello screening di inibitori della replicazione virale si basano sull'utilizzo di colture cellulari infettate da HIV-1. Tuttavia questo sistema oltre a prevedere l'utilizzo del virus attivo richiede lunghi tempi di realizzazione risultando laborioso e costoso. Si è quindi pensato di sviluppare test alternativi che prevedano la determinazione dell'attività biologica della proteasi virale in seguito ad un processo di ripiegamento ottenibile in vitro.

Il primo obiettivo è stato la messa a punto di un test (SIB TEST) per lo screening di nuovi inibitori della proteasi di HIV-1 basato sull'espressione da parte di ceppi batterici (*E. coli*) del precursore della proteasi virale. A tal fine è stato utilizzato il precursore della proteasi WT per assicurare il massimo effetto citotossico.

L'espressione della proteasi matura risulta essere tossica per i batteri [130], mentre l'espressione del precursore ha un apparente effetto citostatico probabilmente legato al ritardo della maturazione dovuto al folding.

Il test messo a punto ha quindi una applicazione più ampia rispetto ad altri test tuttora disponibili in quanto consente di "individuare" potenziali inibitori sia del folding che della proteasi matura.

Il secondo obiettivo è stato quello di produrre e purificare il precursore della proteasi di HIV-1 al fine di caratterizzarlo ed utilizzarlo in test in vitro.

A tal fine il precursore WT e il precursore contenente la mutazione R8Q, che ne ritarda la maturazione, sono stati clonati in vettori di espressione per cellule batteriche contenenti specifici tag utili sia per la purificazione che per la visualizzazione in Western Blot.

Infine ci si è proposti di sviluppare un test in cellule eucariotiche in cui testare possibili inibitori del folding a conferma del saggio in batteri. Questo sistema, basato su cellule Jurkat, presenta diversi vantaggi rispetto ai classici test di infezione. Le cellule utilizzate presentano comportamento analogo rispetto ai linfociti per quanto riguarda tossicità e permeabilità. Questo test potrà risultare più rapido e sicuro rispetto ai saggi di infezione essendo effettuato in assenza di virus ed utilizzando solo la proteina ricombinante.

## 2. SIB TEST

### 2.1 *Razionale*

È stato messo a punto un saggio in batteri (*E. coli*) che consiste nell'espressione del precursore della proteasi di HIV-1. Il principio su cui si basa il test parte dall'osservazione che l'espressione della proteasi matura a livello intracellulare risulta citotossica [130]. Di conseguenza in presenza di inibitore della attività proteasica si dovrebbe osservare una minor mortalità cellulare.

A differenza di altri test che prevedono lo screening in batteri trasformati con la proteasi matura l'utilizzo del precursore della proteasi di HIV-1 consente di saggiare oltre a inibitori della proteina matura "potenziali" inibitori del folding proteico.

Attualmente i test utilizzati nello screening di inibitori della replicazione virale si basano sull'utilizzo di colture cellulari infettate da HIV-1. Questo sistema oltre a prevedere l'utilizzo del virus attivo richiede lunghi tempi di realizzazione risultando laborioso e costoso; il test messo a punto in ceppi batterici consente invece di effettuare un primo screening su ipotetici inibitori della proteasi di HIV-1 nonché del folding proteico riducendo di molto tempi e costi di analisi.

Il test risulta di facile realizzazione e fornisce il risultato nel giro di poche ore.

La principale limitazione del saggio è che alcuni inibitori possono risultare non permeabili alle cellule batteriche o insolubili in soluzioni acquose escludendo così la possibilità di analizzarli mediante questo test. Inoltre va tenuto presente che in queste condizioni il livello di espressione della proteina è molto più elevato rispetto ai valori fisiologici caratteristici dell'infezione da HIV-1. Questo spesso si traduce in una riduzione della sensibilità e costringe ad utilizzare concentrazioni più elevate di inibitore rispetto a quelle utilizzate nei saggi d'infezione o nei saggi enzimatici.

Tuttavia avvalendosi di questo test per effettuare un primo screening degli inibitori solo quelli risultanti positivi verrebbero poi testati in un sistema più complesso come quello delle cellule eucariotiche reale target di HIV.

### 2.2 *Clonaggio ed espressione del precursore della proteasi in E. coli per SIB test*

Il precursore della proteasi di HIV è stato amplificato mediante PCR con l'enzima Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) a partire dal genoma di cellule H9 (cellule di linfoblastoma umano cronicamente infette dal ceppo virale HTLV-IIIb). Per l'amplificazione sono stati utilizzati dei primers contenenti le sequenze per

l'enzima di restrizione Bsal (parte sottolineata) successivamente utilizzate per il clonaggio nel vettore d'espressione.

Primers utilizzati:

Forward: ATGGTAGGTCTCAAATGTTTTTTAGGGAAGATCTGGCCTTC

Reverse: ATGGTAGGTCTCAGCGCTAAAATTTAAAGTGCAACCAATCTGAG

Nel vettore pASK-IBA3plus (IBA BioTAGnology), utilizzato per il clonaggio, la cassetta d'espressione è sotto il controllo trascrizionale del promotore per la tetraciclina che consente di avere un'espressione regolata della proteina ricombinante mediante induzione con anidrotetraciclina (AHT).

L'amplificato e il plasmide pASK-IBA3plus sono stati digeriti con Bsal, purificati da gel di agarosio con il kit NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel) ed in seguito ligati con T4 DNA ligasi con un rapporto inserto:vettore 3:1.

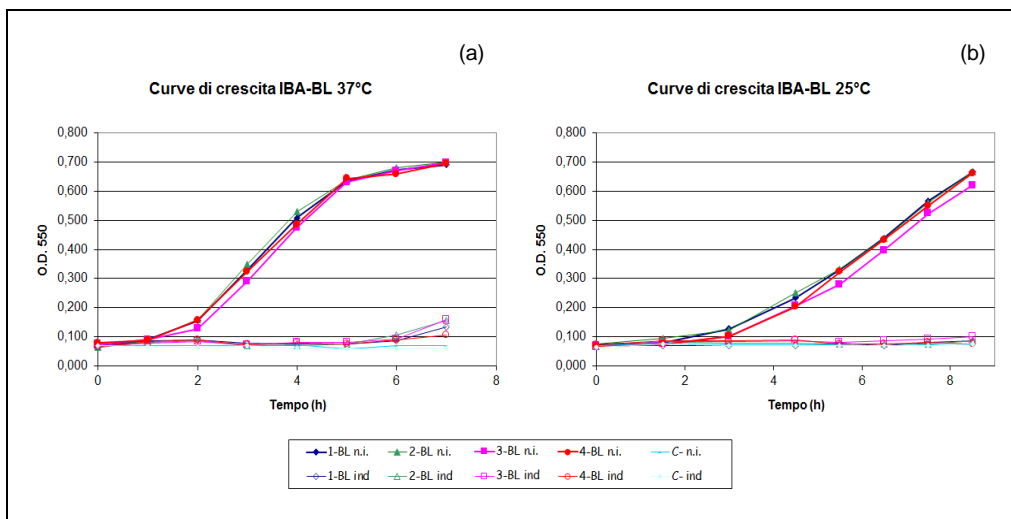
La reazione di ligazione è stata utilizzata per trasformare cellule di *E. coli* BL21 Star™ (DE3) (LifeTechnologies) e i batteri trasformati sono stati piastrati su piastre petri con LB agar più ampicillina per la selezione dei cloni contenenti il plasmide che gli conferisce la resistenza all'antibiotico stesso.

Le colonie selezionate sono state amplificate in coltura liquida di LB broth più ampicillina, il DNA plasmidico è stato estratto mediante mini-prep con kit Eurogold Plasmid (Euroclone) e successivamente analizzato per restrizione con l'enzima HindIII che linearizza il plasmide. I cloni positivi sono stati sequenziati e le sequenze sono state analizzate con il programma CLC Sequence Viewer.

Dopo l'analisi sono stati selezionati 4 cloni (IBA1-BL, 2-BL, 3-BL e 4-BL) da utilizzare negli esperimenti successivi. I cloni sono stati coltivati in presenza dell'induttore (AHT) e l'espressione della proteina eterologa (sia il precursore che la proteasi matura) è stata verificata mediante Western Blot.

### **2.3 SIB Test (salvataggio dei batteri con inibitori della proteasi di HIV)**

Per la messa a punto del test sono state dapprima valutate le condizioni di crescita ottimali dei batteri esprimenti la proteina ricombinante; i cloni selezionati sono stati coltivati a due temperature, 25°C o 37°C, in assenza o in presenza dell'induttore, anidrotetraciclina (AHT), monitorando la crescita batterica attraverso lettura spettrofotometrica (OD<sub>550</sub>) ad intervalli di tempo di 1h. Le curve di crescita sono state costruite mettendo in grafico i valori di OD<sub>550</sub> rispetto al tempo (Figura 26).



**Figura 26:** Grafici delle curve di crescita dei cloni IBA-BL a 37°C (a) e 25°C (b).

Come si osserva dai grafici (Figura 26) ad entrambe le temperature i batteri indotti ad esprimere il precursore della proteasi non crescono a differenza di quelli non indotti, confermando la tossicità della proteina stessa.

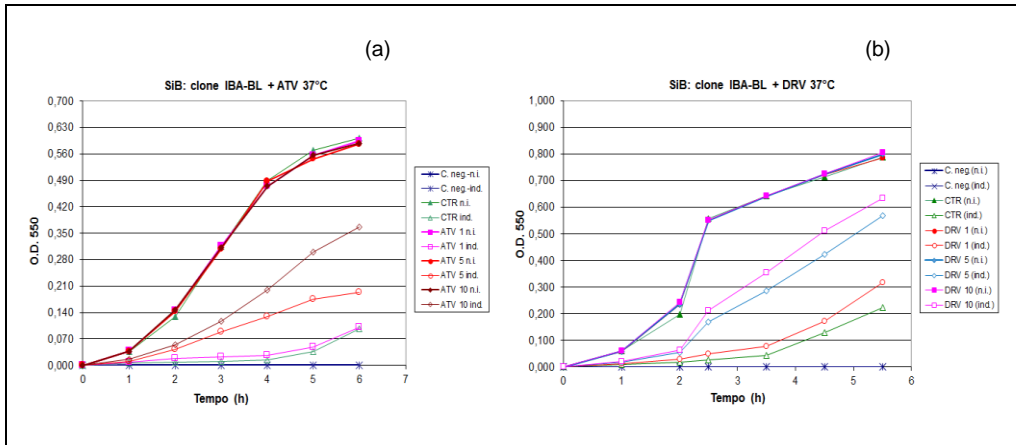
Dato che le curve di crescita alle due temperature sono risultate essere simili si è deciso di effettuare le prove seguenti a 37°C, condizione in cui la crescita è più veloce e consente di effettuare il test in un tempo più breve.

Per testare l'effetto degli ipotetici inibitori della proteasi di HIV-1 è stato selezionato il clone IBA1-BL il quale è stato coltivato in presenza dell'induttore per l'espressione della proteina eterologa. Al fine di valutare la potenziale tossicità degli inibitori stessi sulle cellule batteriche, il test è stato condotto in parallelo anche sul clone non-indotto (controllo).

Il test proposto servirebbe sia per saggiare inibitori della proteasi matura che eventuali inibitori del folding del precursore della proteasi, tuttavia non essendo ancora disponibili inibitori del folding il test è stato messo a punto utilizzando inibitori della proteasi di HIV.

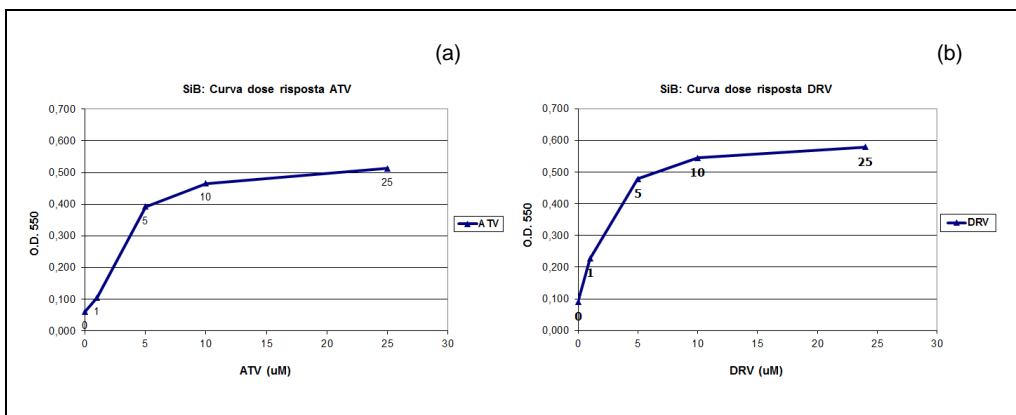
Due inibitori noti della proteasi di HIV, atazanavir (ATV) e darunavir (DRV) sono stati utilizzati per la messa a punto del test e per saggiarne la sensibilità, tenendo presente che trattandosi di un sistema di espressione spinto le quantità di inibitore necessarie risultano elevate.

Sono state effettuate prove con diverse concentrazioni dei due inibitori e la crescita batterica a 37°C è stata monitorata mediante lettura spettrofotometrica (OD<sub>550</sub>) ad intervalli di 1h. (Figura 27)



**Figura 27:** Grafici delle curve di crescita del clone IBA1-BL a 37°C in presenza di ATV (a) o DRV (b).

Dai risultati ottenuti si osserva come all'aumentare della concentrazione di inibitore utilizzata aumenti la sopravvivenza dei batteri indotti ad esprimere la proteasi. Gli inibitori testati inoltre non danno alcuna tossicità alle concentrazioni utilizzate, infatti i batteri non-indotti crescono allo stesso modo sia in assenza che in presenza degli inibitori alle diverse concentrazioni. Dai dati ricavati sono state costruite le seguenti curve dose-risposta (Figura 28).



**Figura 28:** Grafici delle curve dose-risposta del clone IBA1-BL a 37°C in presenza di ATV (a) o DRV (b).

## **2.4 Utilizzo del SIB test per saggiare potenziali inibitori del folding**

In collaborazione con un gruppo di ricerca interessato a verificare sperimentalmente un ipotetico meccanismo per il folding e la maturazione della proteasi di HIV-1 abbiamo utilizzato il test SIB su una famiglia di peptidi suggeriti dai collaboratori stessi.

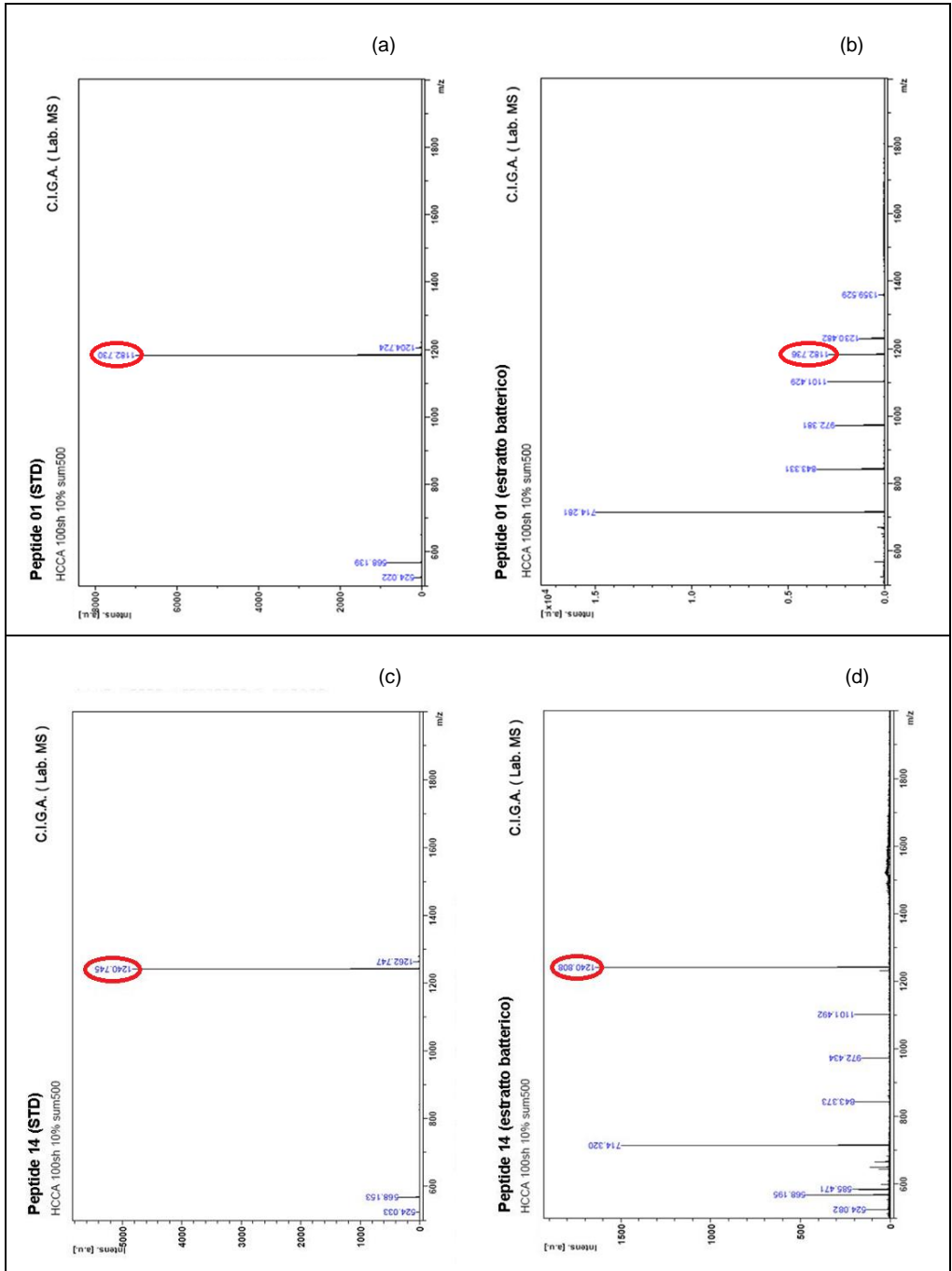
Il primo passo è stato quello di verificare l'ingresso dei peptidi nelle cellule batteriche valutando la loro presenza a livello intracellulare mediante spettrometria di massa.

### - Principio spettrometria di massa (MALDI-TOF)

Il principio su cui si basa la spettrometria di massa è la possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica. In questa tecnica il campione, dopo essere stato miscelato con un eccesso di un'opportuna matrice, viene cristallizzato su un apposito supporto metallico denominato target e sottoposto ad irradiazione con luce laser. In seguito all'irraggiamento le molecole risultano ionizzate e si frammentano in ioni più leggeri che si ritrovano ora in fase gassosa. Gli ioni così generati vengono accelerati generalmente tramite campi magnetici statici o oscillanti, spostandosi così dalla sorgente verso l'analizzatore con una velocità dipendente dal loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ). Negli analizzatori TOF (time of flight) gli ioni con massa minore, e quindi caratterizzati da velocità d'uscita dalla sorgente più elevate, raggiungeranno per primi il rivelatore rispetto agli ioni di massa maggiore.

### - Spettroscopia di massa (MALDI-TOF) su *E. coli*

In questi esperimenti le cellule vengono coltivate in terreno completo LB Broth fatte crescere O.N. in agitazione (225rpm) a 37°C. ed il mattino seguente ad  $OD_{550}$  di circa 1 vengono aggiunti gli inibitori. I batteri vengono quindi fatti crescere ancora per 3h in agitazione (225rpm) a 37°C e successivamente lisati mediante sonicazione. Infine le membrane cellulari vengono pellettate ed il surnatante contenente le proteine citosoliche nonché il terreno di coltura precedentemente conservato vengono miscelati con un'apposita matrice (HCCA 5 mg in 1 ml di una soluzione composta da 30% Acetonitrile, 0,1% TFA). I campioni vengono così caricati sul target (AnchorChip 600/384) e successivamente analizzate al MALDI-TOF (Figura 29).



**Figura 29:** Spettroscopia di massa (MALDI-TOF) su *E. coli*, tracciati dei peptidi 1 (a, b) e 14 (c, d) con rispettivi STD (standard) ed estratto batterico.

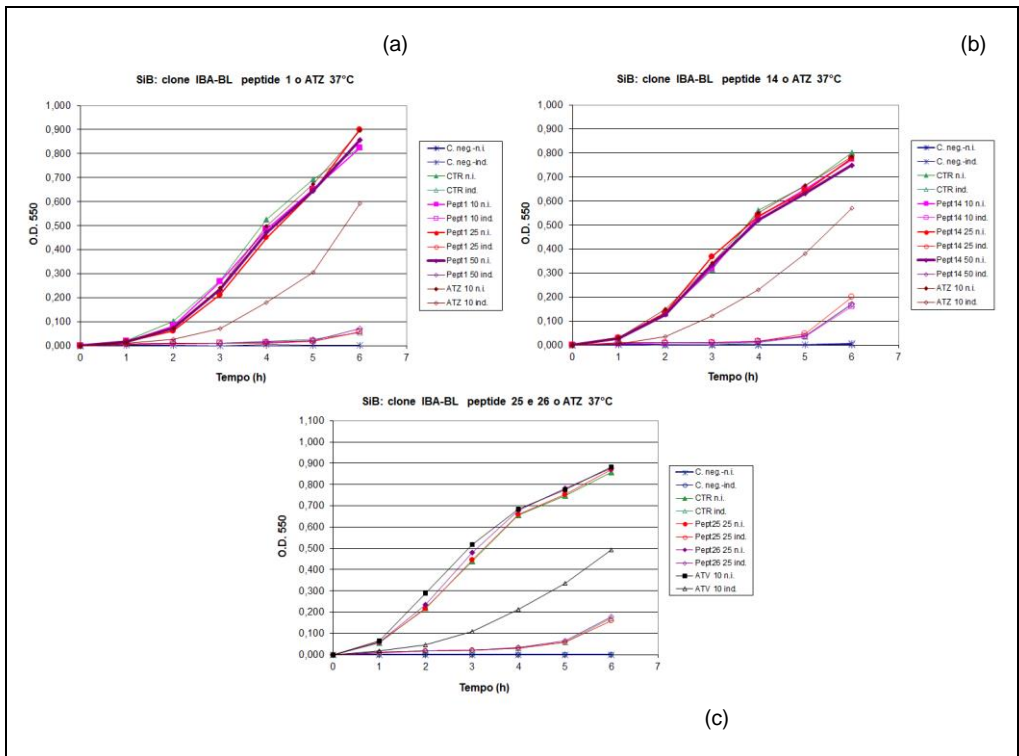


Dai grafici si osserva che entrambi i peptidi analizzati sono presenti negli estratti batterici. È stato anche analizzato il terreno di coltura delle cellule batteriche incubate con il rispettivo peptide per verificare l'effettiva presenza dello stesso ed in tutti si è rilevata la presenza dello stesso picco (tracciati non mostrati).

Per verificare la presenza dei peptidi nel terreno di coltura è stato analizzato anche quest'ultimo dove è stata rilevata la presenza del picco corrispettivo a quello osservato nell'estratto citosolico (tracciati non mostrati).

#### - Saggio SIB sui peptidi

Una volta verificato il loro effettivo ingresso nei batteri, i peptidi sono saggiati nel test SIB. La condizione di ATV 10 $\mu$ M è stata utilizzata come controllo del test.



**Figura 30:** Nella figura vengono riportati solo alcuni esempi di peptidi saggiati nel test SIB sul clone IBA1-BL a 37°C in presenza di ATV (controllo). (a) peptide 1, (b) peptide 14 (c) peptide 25 e 26.

Come si evince dai risultati ottenuti (Figura 30) è emerso che l'effetto dei diversi peptidi testati nei confronti dei batteri indotti ad esprimere la proteasi di HIV-1 è praticamente nullo a differenza di ATV. Abbiamo ipotizzato che essendo il nostro inibitore un peptide possa legarsi a componenti del terreno di coltura (LB broth) come ad esempio i peptidi da triptone e/o estratto di lievito, risultando quindi meno disponibile a livello intracellulare. Per evitare ciò abbiamo deciso di effettuare i saggi utilizzando un terreno di coltura minimo, contenente solo sali e glucosio. Inoltre per verificare che l'azione dei nuovi inibitori sia effettivamente un'inibizione sul folding proteico e non ci siano invece altri effetti dovuti semplicemente alla presenza di un peptide, abbiamo deciso di inserire un controllo utilizzando un peptide scorrelato (K4H2, peptide dell'istone H3 umano).

## 2.5 Test SIB in terreno minimo

Prima di effettuare l'esperimento è stato necessario scegliere il terreno minimo adeguato, a tal fine è stata osservata la crescita batterica in tre diversi tipi di terreno minimo (formulazione dei terreni: Paliy 2007 [131]):

- M9
- M9 + PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>
- LR
- LB (come controllo)

10µl di batteri IBA1-BL sono stati inoculati in 10 ml dei rispettivi terreni e lasciati crescere o.n. a 37°C in agitazione (225rpm). Il giorno seguente è stata valutata la crescita dei batteri mediante lettura spettrofotometrica (OD<sub>550</sub>) (Tabella 3):

	OD <sub>550</sub> O.N.
LB + <i>E. coli</i>	1.019
LB -	0.057
M9 + <i>E. coli</i>	0.453
M9 -	0.050
M9 + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> + <i>E. coli</i>	0.512
M9 + PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> -	0.051
LR + <i>E. coli</i>	0.045
LR -	0.040

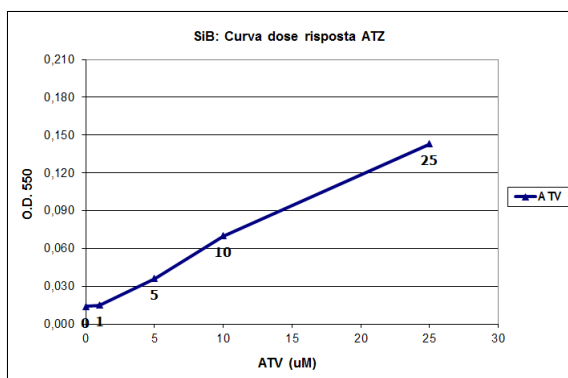
**Tabella 3**

Dai risultati è emerso che in LR i batteri non crescono mentre in M9 da solo o con aggiunta di fosfato crescono più lentamente rispetto al terreno completo.

L'esperimento è stato poi ripetuto seguendo la crescita durante il giorno ad intervalli di circa 1h; dai risultati è emerso che in LR i batteri non crescono, in M9 da solo crescono male mentre in M9 più fosfato crescono più lentamente rispetto che in LB ma in modo lineare. Abbiamo quindi deciso di condurre i nostri esperimenti utilizzando come terreno minimo M9 +  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Dato che la crescita in terreno minimo è più rallentata rispetto a quella in terreno completo, l' $\text{OD}_{550}$  dopo crescita o.n. risulta circa la metà, per l'inoculo iniziale del test è stato utilizzato il doppio del volume in modo da partire dalla stessa quantità iniziale di batteri.

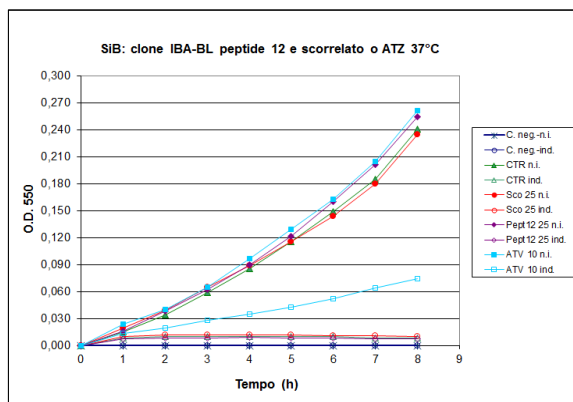
Il test è stato messo a punto utilizzando ATV rispettivamente 1, 5, 10, 25  $\mu\text{M}$  ed è stata ripetuta la curva dose-risposta per confrontarla con quella ottenuta in terreno completo (Figura 31).



**Figura 31:** curva dose-risposta del clone IBA1-BL a  $37^\circ\text{C}$  in presenza di ATV in terreno minimo M9 +  $\text{PO}_4^{3-}$ .

I peptidi sono stati testati anche con questo test in terreno minimo mantenendo ATV (10  $\mu\text{M}$ ) come controllo ma nessuno ha mostrato attività inibitoria (dati non mostrati).

Come ulteriore controllo è stato effettuato l'esperimento SIB in terreno minimo utilizzando anche il peptide scorrelato, in grafico sono evidenziati i risultati del test eseguito sul peptide 12 (25  $\mu\text{M}$ ), il peptide scorrelato (25  $\mu\text{M}$ ) e ATV (10  $\mu\text{M}$ ) come controllo;



**Figura 32:** Curve di crescita del clone IBA1-BL a 37°C in presenza del peptide 12, peptide scorrelato e di ATV (controllo).

Come si può osservare dal grafico, né il peptide 12 né il peptide scorrelato hanno avuto effetto sulla reversione della mortalità dei batteri dovuta all'espressione della proteasi di HIV-1; mentre si osserva aumento della sopravvivenza in presenza di ATV (Figura 32);

Questo test dimostra che i peptidi potenziali inibitori del folding della proteasi di HIV-1 finora testati non revertano l'effetto tossico della proteasi sul ceppo batterico BL21 indotto. Atazanavir invece mostra sempre azione protettiva negli indotti. Dai risultati possiamo affermare che il test di screening funziona in batteri BL21 risultando rapido, attendibile e riproducibile e pronto per l'utilizzo con altri potenziali inibitori.

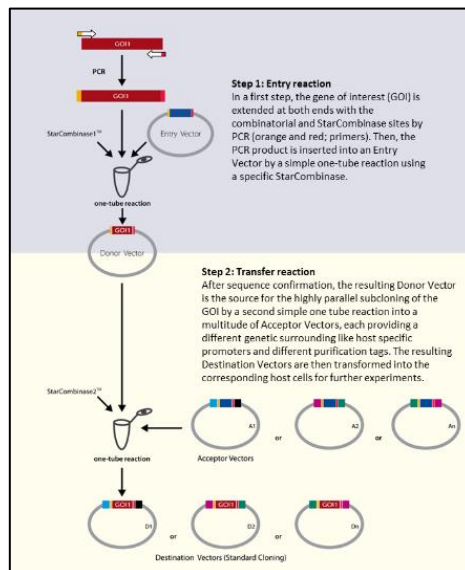
### 3. PRODUZIONE PRECURSORE HIV1-PROTEASI

#### 3.1 Razionale

Per verificare l'efficacia di inibizione del folding proteico da parte di ipotetici inibitori il precursore della proteasi di HIV-1 è stato clonato in vettori di espressione contenenti tag specifici che permettono l'isolamento e la successiva purificazione del precursore dalla proteasi matura. Una volta ottenuto il precursore purificato l'idea è quella di utilizzarlo in saggi enzimatici. Il sistema di clonaggio prescelto, *StarGate*<sup>®</sup> IBA (IBA BioTAGnology), è un sistema versatile che permette di trasferire facilmente il frammento da un vettore all'altro e di ottenere così diversi vettori di espressione con tag differenti sia all'N che al C-terminale.

Il sistema prevede un primo clonaggio del prodotto di PCR all'interno di un ENTRY-VECTOR con formazione di un DONOR-VECTOR dal quale il frammento può essere facilmente trasferito in diversi vettori di espressione mediante una reazione di ricombinazione omologa (Figura 33):

- 1° STEP: ricombinazione tra prodotto di PCR ed ENTRY-VECTOR → generazione DONOR VECTOR
- 2° STEP: ricombinazione tra DONOR-VECTOR ed ACCEPTOR VECTOR → generazione DESTINATION VECTOR



**Figura 33:** Sistema di clonaggio *StarGate*<sup>®</sup> IBA (IBA BioTAGnology).

### 3.2 Clonaggio precursore WT

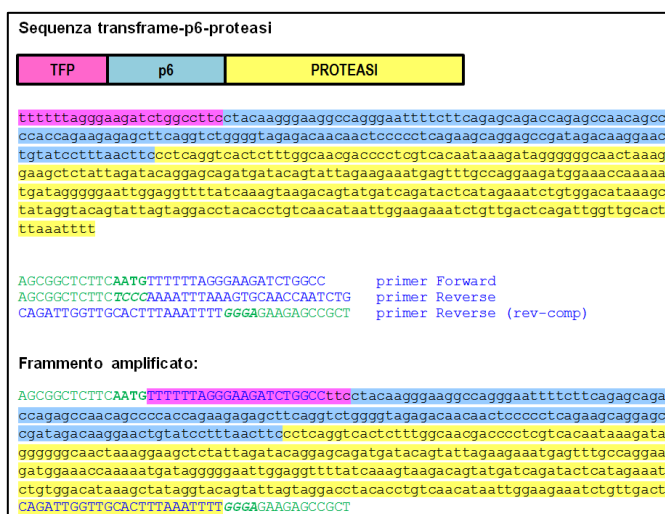
Il precursore della proteasi di HIV-1 è stato amplificato mediante PCR con l'enzima Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) a partire dal DNA plasmidico del clone IBA1-BL contenente la sequenza di interesse. Per l'amplificazione sono stati utilizzati i seguenti primers:

Forward: AGCGGCTCTTCAATGTTTTTTAGGGAAGATCTGGCC

Reverse: AGCGGCTCTTCTCCCAAATTTAAAGTGCAACCAATCTG

contenenti la sequenza del sito di ricombinazione (grassetto) e la sequenza di riconoscimento della StarCombinasi (sottolineata)

I primers sono stati disegnati mediante il programma IBA Starprimer D'Signer scaricabile dal sito IBA (Figura 34).



**Figura 34:** Sequenza del precursore della proteasi di HIV-1 (TFP-p6-proteasi) a cui si legano i primers per il clonaggio e sequenza del frammento amplificato.

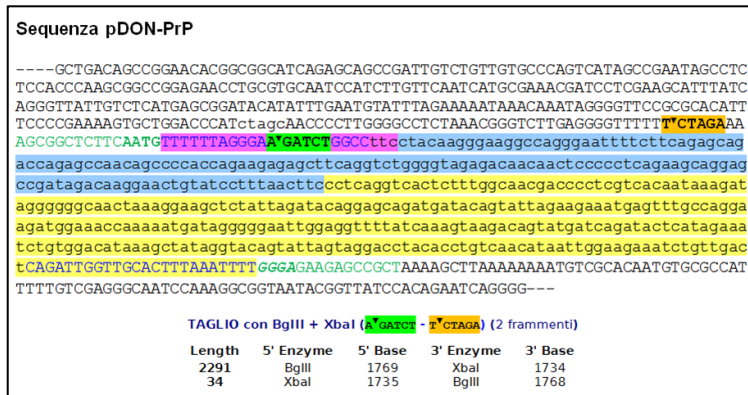
L'amplificato è stato purificato con il kit NucleoSpin Extract II (Machery-Nagel) e clonato all'interno dell'Entry-Vector (pENTRY-IBA51) mediante ricombinazione omologa con l'enzima StarCombinasi con conseguente formazione del Donor-Vector.

amplificato + Entry Vector (pENTRY-IBA51) → Donor Vector (pDON-PrP)

Il plasmide così ottenuto è stato utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* TOP10 e i cloni contenenti il plasmide sono stati selezionati su piastre petri con LB agar più

kanamicina. La presenza dell'inserto è stata verificata mediante colony-PCR ed i cloni positivi sono stati amplificati in coltura liquida di LB broth più kanamicina ed in seguito sottoposti a MiniPrep (kit Eurogold Plasmid - Euroclone).

I DNA plasmidici dei cloni pDON-PrP sono stati analizzati per doppia digestione con l'enzima BgIII (che taglia nell'inserto) e XbaI (che taglia nel vettore) (Figura 35)



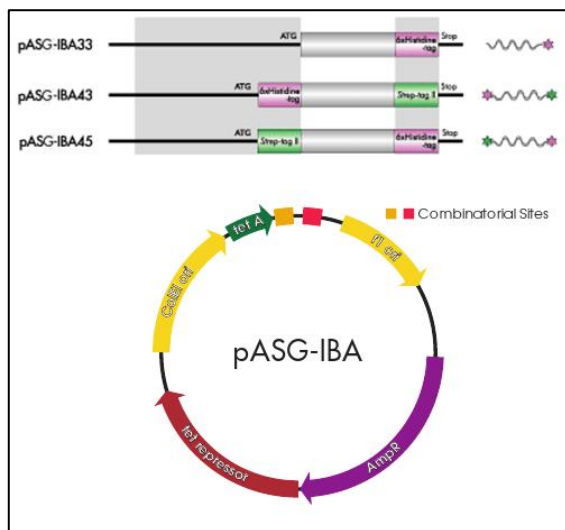
**Figura 35:** Schema della analisi di restrizione del DNA plasmidico dei cloni pDON-PrP con l'enzima BgIII (verde) e XbaI (arancione).

I cloni positivi sono stati sequenziati e le relative sequenze sono state analizzate con il programma CLC Sequence Viewer.

Dopo l'analisi è stato selezionato un clone (pDON-PrP11) che è stato utilizzato per la generazione dei successivi Destination Vector.

Sono stati scelti tre diversi Acceptor Vector per l'espressione della proteina ricombinante in batteri che presentano tag diversi (Figura 36):

- **pASG-IBA33:** 6xHis-C-term
- **pASG-IBA43:** 6xHis-N-term e Strep-tag-C-term
- **pASG-IBA45:** Strep-tag-N-term e 6xHis-C-term



**Figura 36:** Acceptor Vector per l'espressione del precursore della proteasi di HIV-1 in *E. coli*; sistema di clonaggio StarGate® IBA (IBA BioTAGnology).

Il Donor Vector è stato utilizzato in una reazione di ricombinazione sempre mediata dalla StarCombinasi per subclonare il frammento codificante il precursore della proteasi all'interno dei tre Acceptor Vector creando i seguenti Destination Vector.

Donor Vector + Acceptor Vector → Destination Vector  
 (pDON-PrP11) (pASG-IBA43) (pASG43-PrP11)

Donor Vector + Acceptor Vector → Destination Vector  
 (pDON-PrP11) (pASG-IBA45) (pASG45-PrP11)

Donor Vector + Acceptor Vector → Destination Vector  
 (pDON-PrP11) (pASG-IBA33) (pASG33-PrP11)

I tre Destination Vector sono stati utilizzati per trasformare cellule di *E. coli* TOP10, i cloni sono stati selezionati su piastre petri con LB agar più ampicillina e la presenza dell'inserito è stata verificata mediante colony-PCR. I cloni positivi sono stati amplificati in coltura liquida di LB broth più ampicillina, sottoposti a MiniPrep (kit Eurogold Plasmid - Euroclone) e analizzati mediante sequenziamento. È stato scelto un clone per ogni Destination Vector e utilizzato per la trasformazione di cellule *E. coli* T7-Express (NEB) che hanno una elevata efficienza di trasformazione e risultano più resistenti all'espressione di proteine tossiche.



### 3.3 Mutagenesi e Clonaggio precursore R8Q

#### 3.3.1 Razionale

Al fine di ottenere un precursore più stabile è stata introdotta la mutazione R8Q all'interno della sequenza codificante per la proteasi mediante mutagenesi sito specifica. In base ai dati presenti in letteratura questa mutazione risulta stabilizzare il precursore [122].

Per introdurre la mutazione puntiforme all'interno del plasmide pDON-PrP11 contenete la sequenza del precursore WT è stato disegnato un solo primer mutagenico che presenta il nucleotide mutato nel mezzo della sequenza e 10-11 nucleotidi che si appaiano correttamente da entrambi i lati. Il secondo primer è stato invece disegnato in modo da essere posto coda-coda con il primer mutagenico, in questo modo viene amplificato un plasmide lineare contenente la sequenza mutata che viene poi ri-circularizzato in seguito a ligazione.

#### 3.3.2 Mutagenesi e clonaggio

Il precursore della proteasi di HIV-1 è stato mutagenizzato mediante mutagenesi sito-specifica. Il vettore pDON-PrP11 è stato amplificato mediante una PCR mutagenica con l'enzima Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Finnzymes) e i seguenti primers (Figura 37):

Forward: CAATAAAGATAGGGGGGCAACTAAAGG

Reverse (mutagenico): TGACGAGGGGTIGTTGCCAAAG

La mutazione introdotta nel primer mutagenico è sottolineata.



**Figura 37:** Sequenza del vettore pDON-PrP11 a cui si legano i primers utilizzati per la mutagenesi, sono indicati i primers (in verde e blu), la direzione della polimerizzazione e la mutazione introdotta.

La corretta amplificazione del plasmide lineare ottenuto è stata verificata mediante elettroforesi su gel di agarosio. L'amplificato è stato in seguito quantificato su gel di

agarosio e sottoposto a ligazione con Quick T4 DNA ligasi (Finnzymes) 5 min. a 25°C al fine di ri-circularizzare il plasmide. La reazione di ligazione è stata utilizzata per trasformare cellule di *E. coli* TOP10 e i cloni contenenti il plasmide sono stati selezionati su piastre petri con LB agar più kanamicina.

Dato che nella reazione di ligazione usata per la trasformazione è presente anche lo stampo iniziale della PCR (vettore WT) è possibile che alcuni batteri vengano trasformati con il vettore non mutagenizzato. Al fine di verificare quale sia la percentuale di colonie WT rispetto alle colonie mutagenizzate sono stati trasformati dei batteri con una concentrazione di plasmide WT pari a quella presente nella mix contenete il vettore mutagenizzato. La percentuale di colonie cresciute sulla piastra del controllo WT è molto bassa, meno di 1:10.000 rispetto a quelle sulla piastra del clone mutagenizzato, è quindi molto improbabile prelevare una colonia WT dalla piastra del clone mutagenizzato.

La presenza dell'insero è stata verificata mediante colony-PCR ed i cloni positivi sono stati amplificati in coltura liquida di LB broth più kanamicina ed in seguito sottoposti a MiniPrep (kit Eurogold Plasmid - Euroclone).

Successivamente i cloni sono stati sequenziati e le relative sequenze sono state analizzate con il programma CLC Sequence Viewer.

Dopo l'analisi è stato selezionato il clone (pDON-PrP11-R8Q) che è stato utilizzato per la generazione dei seguenti Destination Vector, mediante ricombinazione omologa come precedentemente fatto per i cloni WT:

Donor Vector +	Acceptor Vector →	Destination Vector
(pDON-PrP11-R8Q)	(pASG-IBA43)	(pASG-IBA43-PrP11-R8Q)

Donor Vector +	Acceptor Vector →	Destination Vector
(pDON-PrP11-R8Q)	(pASG-IBA45)	(pASG-IBA45-PrP11-R8Q)

Dopo l'analisi è stato scelto un clone per ogni Destination Vector e utilizzato per la trasformazione di cellule *E. coli* T7-Express (NEB).

### **3.4 Espressione dei cloni WT e R8Q**

I vettori di espressione utilizzati possiedono la cassetta d'espressione sotto il controllo trascrizionale del promotore per la tetraciclina che permette di ottenere l'espressione regolata della proteina ricombinante in seguito ad induzione con anidrotetraciclina (AHT).

Per l'espressione è stato preparato un pre-inoculo in terreno liquido (LB Broth + Amp.) che è stato cresciuto o.n. e il giorno seguente utilizzato per inoculare del terreno fresco (150ml – 1L). La crescita batterica è stata monitorata mediante lettura spettrofotometrica e una volta raggiunta una OD<sub>550</sub> attorno a 0,7 l'espressione della proteina ricombinante è stata indotta mediante aggiunta di anidrotetraciclina (AHT) ad una concentrazione di 200ng/ml. L'espressione della proteina ricombinante è stata indotta a diversi tempi e sono state effettuate prove sia in presenza che in assenza dell'inibitore della proteasi atazanavir (ATV) alla concentrazione di 10µM.

Dopo l'induzione i batteri sono stati raccolti e lisati, sono state recuperate le proteine sia dalla frazione solubile (lisati) che dalla frazione insolubile che contiene i corpi di inclusione (pellet). Da dati presenti in letteratura è noto infatti che il precursore della proteasi di HIV-1 rappresenta la frazione di proteine totali espressa che risulta non foldata e che non viene sottoposta a maturazione, accumulandosi nella frazione insolubile (corpi di inclusione) [122].

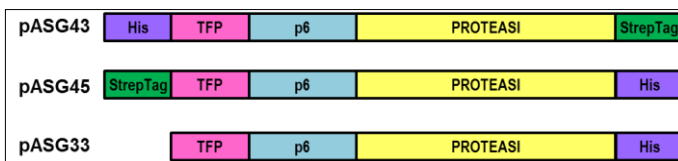
Le frazioni sono state successivamente analizzate mediante SDS-PAGE e successivo Western-Blot con anticorpi specifici per visualizzare il precursore e la proteasi matura.

Anticorpi utilizzati:

<i>Anticorpo</i>	<i>Diluizione</i>	<i>Utilizzo</i>
Anti-proteasi	1:2000	rileva "solo" la proteasi matura
Anti-His	1:2000	rileva solo il precursore nei cloni pASG43 e sia il precursore che la proteasi matura nei cloni pASG45 e pASG33
Anti-StrepTag	1:1000	rileva sia il precursore che la proteasi matura nei cloni pASG45 e solo il precursore nei cloni pASG43

### 3.4.1 Cloni WT

Inizialmente è stata valutata l'espressione del precursore e della proteasi matura nei tre cloni **pASG43-PrP11** (N-His-precursore-StrepTag-C), **pASG45-PrP11** (N-StrepTag-precursore-His-C) e **pASG33-PrP11** (precursore-His-C), dopo 3h di induzione sia in presenza che in assenza di ATV (Figura 38).

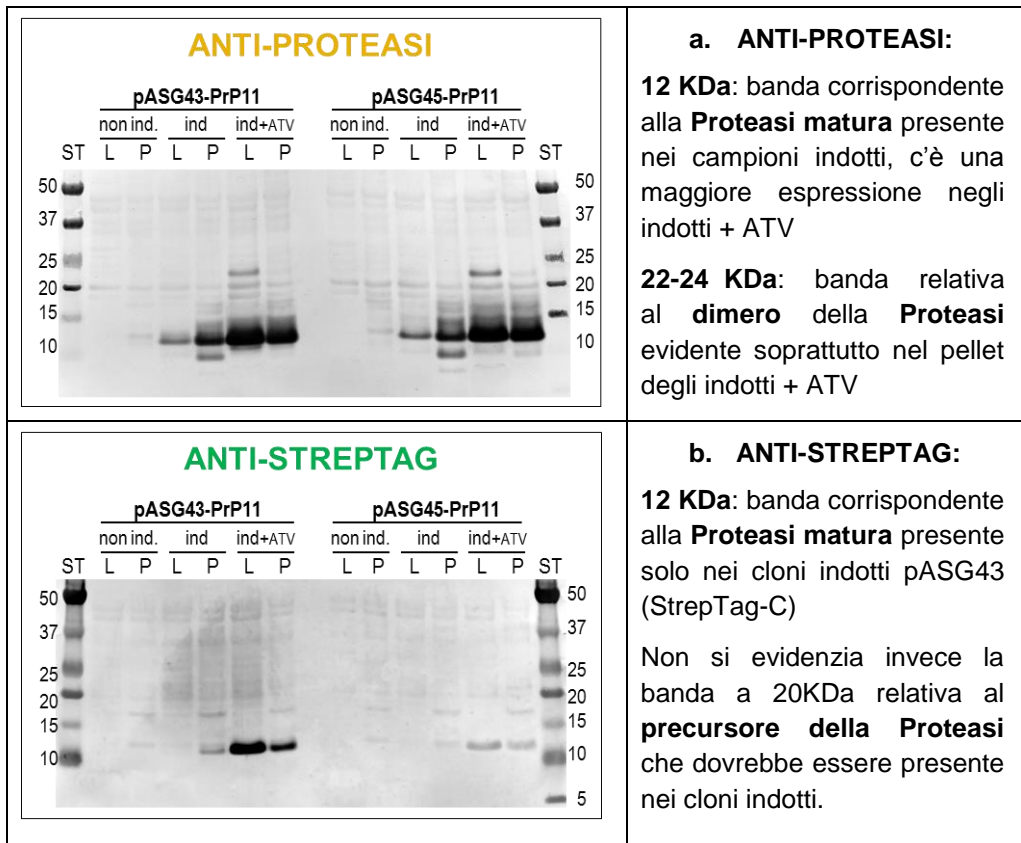


**Figura 38:** Schema dei tre cloni

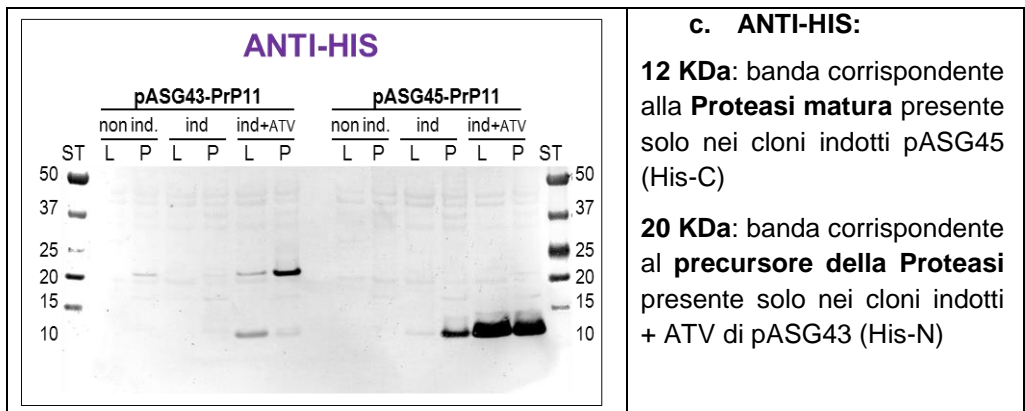
Dall'analisi in Western Blot si evidenziano le seguenti bande:

- 22-24 KDa: banda corrispondente al dimero della Proteasi
- 20 KDa: banda corrispondente al precursore della Proteasi
- 12 KDa: banda corrispondente alla Proteasi matura

la descrizione dettagliata è nelle didascalie delle figure: cloni **pASG43-PrP11** e **pASG45-PrP11** (Figura 39 a,b,c) e clone **pASG33-PrP11** (figura 40).



**Figura 39 (a, b):** cloni pASG43-PrP11 e pASG45-PrP11

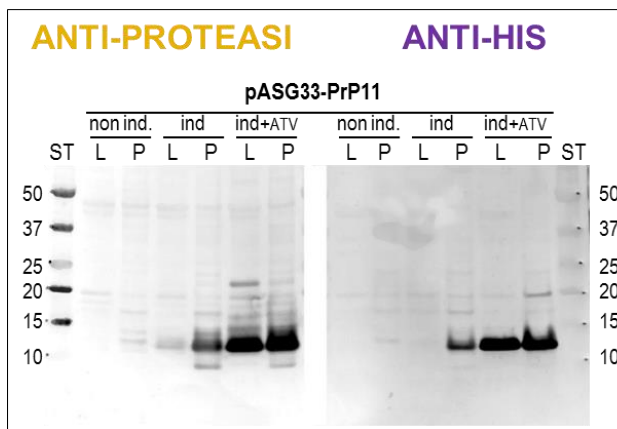


**c. ANTI-HIS:**

**12 KDa:** banda corrispondente alla **Proteasi matura** presente solo nei cloni indotti pASG45 (His-C)

**20 KDa:** banda corrispondente al **precursore della Proteasi** presente solo nei cloni indotti + ATV di pASG43 (His-N)

**Figura 39 (c):** cloni pASG43-PrP11 e pASG45-PrP11



**Figura 40:** Clone pASG33-PrP11

**12 KDa:** banda corrispondente alla **Proteasi matura** visibile sia con **anti-HIS** che **anti-proteasi** presente nei campioni indotti, c'è una maggiore espressione negli indotti + ATV

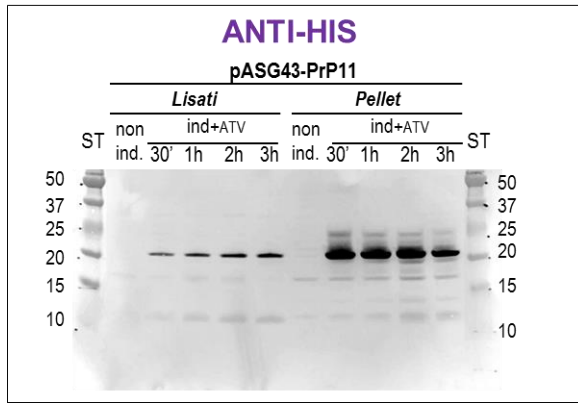
**22-24 KDa:** banda corrispondente al **dimero** della **Proteasi** evidenziabile con **anti-proteasi**, presente soprattutto nel pellet degli indotti + ATV

**20 KDa:** banda corrispondente al **precursore Proteasi** visibile con **anti-HIS**, presente solo nei cloni indotti + ATV

Dato che l'espressione del precursore è visibile solo in presenza di ATV sono stati condotti altri esperimenti inducendo l'espressione a diversi tempi (30', 1h, 2h, 3h) ma sempre in presenza di ATV.

Nei cloni **pASG43-PrP11** (N-His-precursore-StrepTag-C) con anticorpo anti-His si evidenzia che il precursore è presente già dopo 30' di induzione. Il precursore è

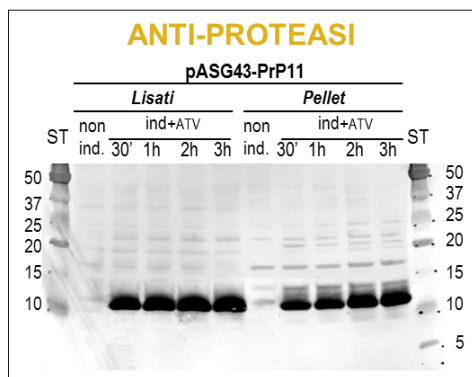
maggiormente espresso all'interno dei corpi di inclusione e la sua quantità è maggiore all'inizio (30') e poi decresce con il tempo, l'andamento del precursore nel citoplasma è inverso, si ha una minore quantità all'inizio e poi aumenta (Figura 41).



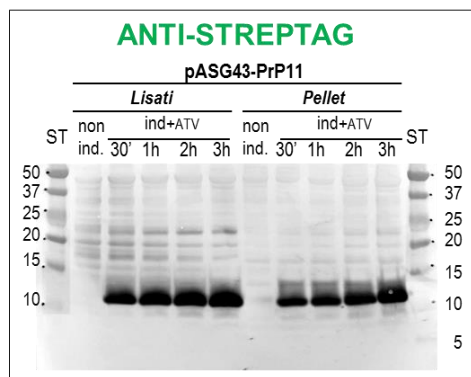
**Figura 41:** Espressione del precursore nel clone pASG43-PrP11 visualizzato in WB con anti-His.

Andando a valutare la presenza di proteasi matura con anticorpo anti-proteasi e anti-StrepTag si vede l'inverso, la proteasi matura è maggiormente presente nel citoplasma che non nei corpi di inclusione (Figura 42).

Nei corpi di inclusione la proteasi presenta un andamento inverso rispetto a quello del precursore, è minore all'inizio e poi aumenta.



(a)



(b)

**Figura 42:** Espressione della proteasi matura nel clone pASG43-PrP11 visualizzata in WB con anti-proteasi (a) e anti-streptag (b).

Quindi il precursore della proteasi viene prodotto molto presto dopo l'induzione e viene subito processato, con l'aumentare del tempo si ha meno precursore e più proteasi matura. La banda aggiuntiva attorno ai 17-18KDa visibile con anti-StrepTag si è rivelata essere un aspecifico in quanto è presente con la stessa intensità in tutti i campioni, anche i non indotti.

Lo stesso esperimento è stato condotto anche sui cloni **pASG45-PrP11** (StrepTag-N e His-C) e sui cloni **pASG33-PrP11**. Il precursore come per il clone pASG43-PrP11 è presente già dopo 30' di induzione ma è visualizzabile solo nei corpi di inclusione sembra però prodotto in quantità minori (dati non mostrati).

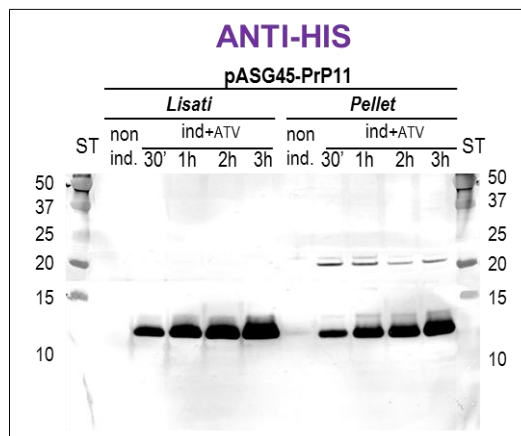
I tre cloni presentano un comportamento simile con espressione del precursore della proteasi a tempi brevi e rapido processamento.

### 3.4.1.1. Modalità d'impiego dei cloni prodotti

I cloni prodotti possono essere utilizzati per due differenti scopi:

**pASG43-PrP11:** Il tag di His all'N-terminale consente di rilevare solo il precursore in quanto viene perso in seguito a processamento a proteasi. Questa caratteristica è importante per la purificazione, in quanto purificando per affinità su colonnine Ni-IDA è possibile ottenere solo il precursore eliminando la proteasi matura.

**pASG45-PrP11 e pASG33-PrP11:** Il tag di His al C-terminale consente di rilevare sia il precursore che la proteasi matura. Questi cloni risultano quindi adatti per lo screening in batteri di potenziali inibitori del folding della proteasi di HIV-1 in quanto con lo stesso anticorpo è possibile valutare la presenza di entrambe le forme (Figura 43).



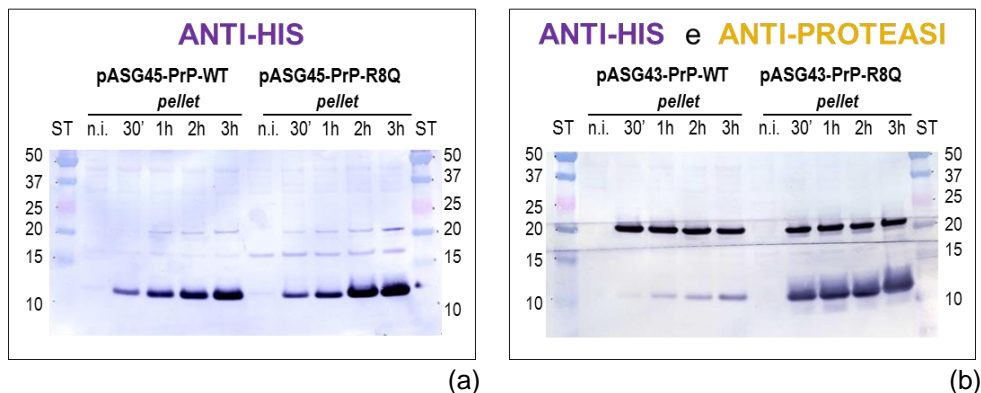
**Figura 43:** Clone pASG45-PrP11, espressione del precursore e della proteasi matura di HIV-1 rilevati in WB con anticorpo anti-istidina.

Come si osserva dal risultato il precursore si accumula nel pellet (corpi di inclusione); viene espresso già dopo 30', e si osserva uno shift delle bande nel tempo (da 30' a 3h) con diminuzione del segnale del precursore e aumento del segnale della proteasi matura.

### 3.4.2 Cloni R8Q

Sui cloni mutagenizzati pASG43-PrP-R8Q e pASG45-PrP-R8Q sono state ripetute le stesse prove di induzione a diversi tempi per confrontare l'espressione del precursore e della proteasi matura di HIV-1 come per i rispettivi cloni WT. Dai risultati è emerso un comportamento dei cloni R8Q analogo a quello osservato nei rispettivi cloni WT (dati non mostrati).

È stato fatto un confronto diretto dell'espressione a diversi tempi tra cloni WT e R8Q, sia pASG43 che pASG45. Considerando che il precursore viene accumulato nella frazione insolubile (corpi di inclusione) la valutazione della maturazione del precursore a proteasi matura è stata fatta solo sui campioni di pellet (Figura 44).



**Figura 44:** Confronto tra i cloni WT e R8Q, sia pASG43 che pASG45, dell'espressione del precursore e della proteasi matura di HIV-1 rilevati in WB con anticorpi anti-istidina e anti-proteasi.

Dal risultato si osserva che la banda del precursore del clone pASG45-PrP-WT è più debole rispetto a quella del clone R8Q ma entrambi possono essere utilizzati per lo screening in batteri.

Nel clone pASG43-PrP-WT si osserva nel tempo una diminuzione del precursore con aumento del segnale della proteasi matura. Nel clone R8Q il segnale del precursore sembra essere più stabile confermando l'ipotesi che la mutazione introdotta aumenti la stabilità della proteina ricombinante (Figura 44).

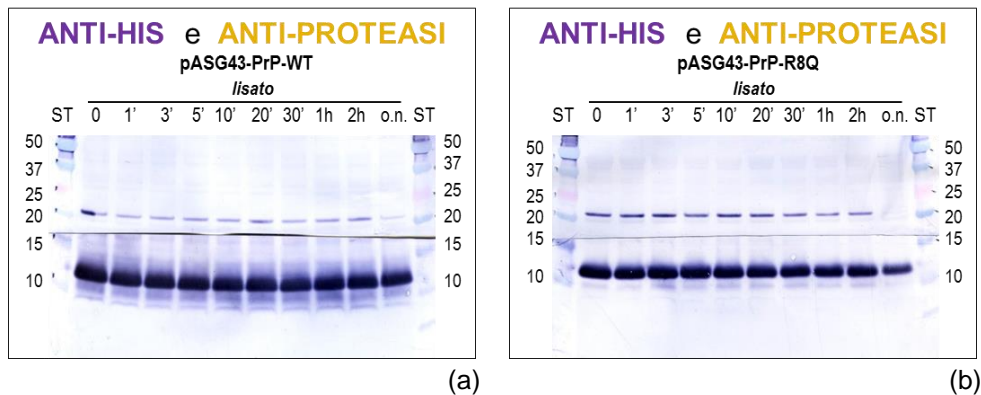


I cloni pASG43-PrP-WT e R8Q sono stati successivamente utilizzati per la purificazione del precursore.

Prima di procedere con la purificazione è stata verificata la stabilità del precursore per avere un'idea di quanto impiega ad attivarsi a proteasi matura. Non essendo possibile fare tale valutazione nel pellet in cui abbiamo la presenza di urea la prova è stata condotta sui lisati in cui il precursore, anche se in quantità minori, è comunque presente.

Le prove di stabilità sono state eseguite incubando i lisati indotti, sia dei cloni WT che R8Q, a 37°C e prelevando delle aliquote a diversi tempi (1' - o.n.) (Figura 45).

I campioni sono stati analizzati mediante WB con anti-His (per visualizzare il precursore) e con anti-proteasi.



**Figura 45:** Prove di stabilità del precursore della proteasi di HIV-1.

Dal risultato si osserva che il precursore è stabile fino a 2h di incubazione a 37°C sia nel clone WT che R8Q, tuttavia è comunque presente molta proteasi matura il che rende difficile valutare se parte del precursore sia stato attivato. Il dato ci dà comunque un'idea che nel tempo necessario alla purificazione (meno di due ore) il precursore non si attivi.

### **3.5 Purificazione e concentrazione del precursore**

Al fine di ottenere una quantità sufficiente di proteina ricombinante per gli studi enzimatici successivi il precursore della proteasi di HIV-1 è stato prodotto in grandi quantità (1L di coltura batterica) e purificato per affinità su colonnine Ni-IDA (ProBond™ Purification System - Life Technologies).

La resina presente nelle colonnine è derivatizzata con acido Iminodiacetico (IDA) caricato con ioni Nickel divalenti ( $\text{Ni}^{2+}$ ); il Nickel immobilizzato è in grado di legare selettivamente i residui di Istidina (His) esposti sulle proteine ricombinanti aventi tag di istidina permettendo alle stesse di essere purificate per affinità.

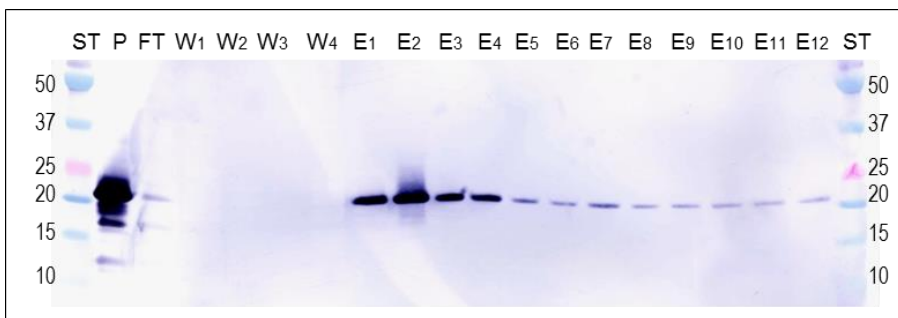
In seguito alla purificazione su colonna gli eluati che hanno dato un segnale positivo in WB sono stati riuniti in un unico pool e concentrati mediante filtri Amicon Ultracell 10K (Millipore), al fine di ottenere una preparazione di precursore più concentrata.

La purificazione è stata eseguita:

- in condizioni ibride (allegato 2) che permettono partendo da un campione denaturato (8M urea) di ottenere una proteina purificata in condizioni native (Figura 46).
- in condizioni denaturanti (allegato 2), mantenendo l'urea 8M la quale sfavorendo il folding proteico rallenta la maturazione del precursore a proteasi matura (Figura 48).
- in condizioni native (assenza di urea) (allegato 2), in cui il folding del precursore a proteasi matura è favorito (Figura 50).

### 3.5.1 Purificazione in condizioni ibride

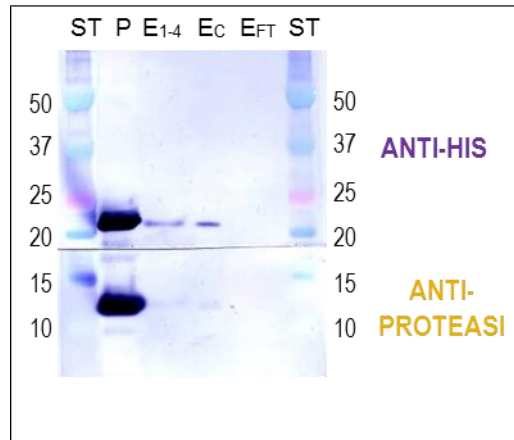
Il precursore della proteasi di HIV-1 presente nel pellet dei cloni indotti è stato purificato in condizioni ibride e i campioni sono stati analizzati mediante WB (Figura 46).



**Figura 46:** Purificazione del precursore della proteasi di HIV-1 in condizioni ibride, sviluppato con anticorpo anti-HIS. (P = pellet, FT = flow through, W = lavaggi, E = eluati)

Il precursore viene eluito subito ed è maggiormente presente negli eluati da 1-4, ma si osserva un residuo anche negli eluati successivi.

Gli eluati 1-4 sono stati successivamente riuniti in un unico pool e concentrati. Il campione concentrato è stato analizzato in WB e confrontato con i campioni iniziali (Figura 47).



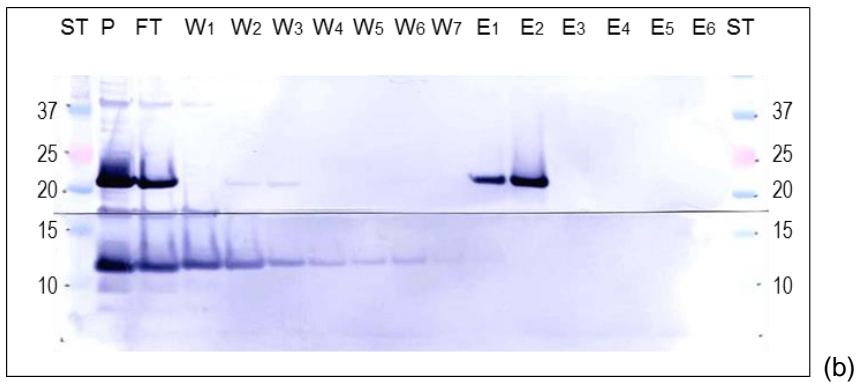
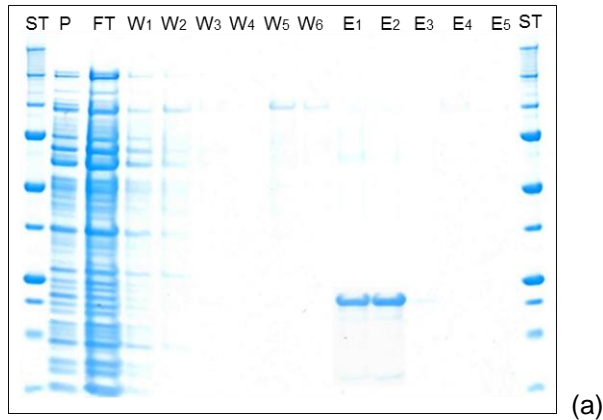
**Figura 47:** WB della concentrazione del precursore della proteasi di HiV-1 con Amicon Ultracell 10K (Millipore), sviluppato con anticorpo anti-HIS e anti-proteasi. (P = pellet, E<sub>1-4</sub> = pool eluati, E<sub>C</sub> = eluato concentrato, E<sub>FT</sub> = flow through eluato)

Dall'analisi in WB con anticorpo anti-His e anti-proteasi si può osservare che l'eluato risulta poco concentrato rispetto al campione di partenza. Tuttavia in entrambi gli eluati si osserva solo un debole segnale della proteasi matura; questo suggerisce che probabilmente l'assenza di urea porta ad una instabilità del precursore che non folda a proteasi matura ma si si degrada.

Alla luce dei risultati ottenuti dalla purificazione in condizioni ibride, considerando che per i saggi enzimatici è necessario disporre del precursore purificato in assenza di urea, si decide di procedere con la purificazione in condizioni denaturanti ed effettuare solo in seguito la concentrazione della proteina ricombinante riducendo la percentuale di urea.

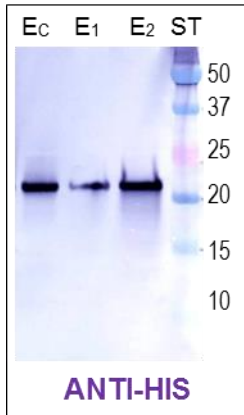
### 3.5.2 Purificazione in condizioni denaturanti

Il precursore della proteasi di HIV-1 presente nel pellet dei cloni indotti è stato purificato in condizioni denaturanti e i campioni sono stati analizzati mediante SDS-PAGE seguito da colorazione con Coomassie e da WB (Figura 48).



**Figura 48:** Purificazione del precursore della proteasi di HIV-1 in condizioni denaturanti; sviluppato con Bio-Safe Coomassie (BIO-RAD) ed in WB con anticorpo anti-HIS e anti-proteasi. (P = pellet, FT = flow through, W = lavaggi, E = eluati)

Dai risultati si osserva che in seguito a purificazione in condizioni denaturanti si recupera una quantità di precursore elevata tanto che la banda è visibile anche in Coomassie (Figura 48). La proteasi matura viene eliminata durante i lavaggi mentre il precursore è presente nei primi due eluati. Gli eluati 1 e 2 sono quindi stati riuniti in un unico pool, concentrati e analizzati mediante WB (Figura 49).



**Figura 49:** WB del precursore della proteasi di HIV-1 concentrato con Amicon Ultracell 10K (Millipore); dall'analisi con anticorpo anti-His si può osservare che l'eluato (E<sub>C</sub> 1 µl) risulta in media 20 volte più concentrato rispetto al campione di partenza (E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> 20 µl).

Al fine di eliminare l'urea il precursore concentrato in buffer denaturante (8M urea) è stato risospeso in buffer nativo (senza urea) e successivamente riconcentrato. Dopo concentrazione tuttavia non si osserva più nessun segnale né del precursore né della proteasi matura sia in Coomassie che in WB (dato non mostrato).

Ipotizzando inizialmente che il problema fosse la stabilità del precursore, sono state fatte diverse prove utilizzando tamponi a pH differenti ed effettuando la concentrazione con filtri di diversa tipologia (Amicon – Vivaspin). Tuttavia in tutte le prove effettuate si è riscontrata sempre una perdita di campione.

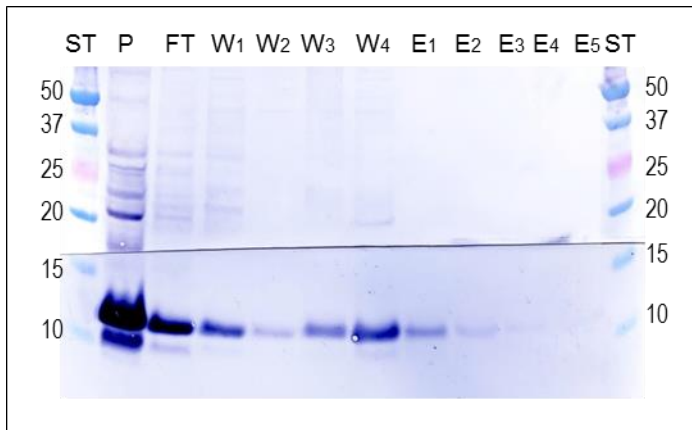
Ulteriori analisi hanno dimostrato che in assenza di urea il precursore si lega al filtro dei concentratori ed è possibile recuperare il campione solo in presenza di forti detergenti (SDS).

Per ovviare a questo problema le prove di stabilità sono state condotte a partire dal campione concentrato in buffer denaturante (8M urea) riducendo gradualmente per diluizione la percentuale di urea.

### 3.5.3 Purificazione in condizioni native

È stata eseguita anche una prova di purificazione in condizioni native, quindi in totale assenza di urea (allegato 2). A tal fine si è dovuto procedere alla purificazione partendo dal lisato batterico anziché dal pellet. Dato che il precursore, che si accumula nei corpi di inclusione, è poco presente nel lisato è stato necessario utilizzare quantità maggiori.

I campioni sono stati analizzati mediante WB con anticorpi anti-His e anti-proteasi (Figura 50).



**Figura 50:** Purificazione del precursore della proteasi di HIV-1 in condizioni native; sviluppato in WB con anticorpo anti-HIS e anti-proteasi. (P = pellet, FT = flow through, W = lavaggi, E = eluati)

Dai risultati è emerso che il precursore, la cui concentrazione è già in partenza molto inferiore rispetto a quella della proteasi matura, in seguito alla purificazione in condizioni native matura rapidamente e non è quindi possibile recuperarlo.

### **3.6 Prove di stabilità precursore**

A partire dal precursore purificato e concentrato in buffer denaturante (urea 8M a pH 4.0), sono state effettuate tre prove di stabilità con differenti concentrazioni di urea e a due pH 4.0 e 6.0.

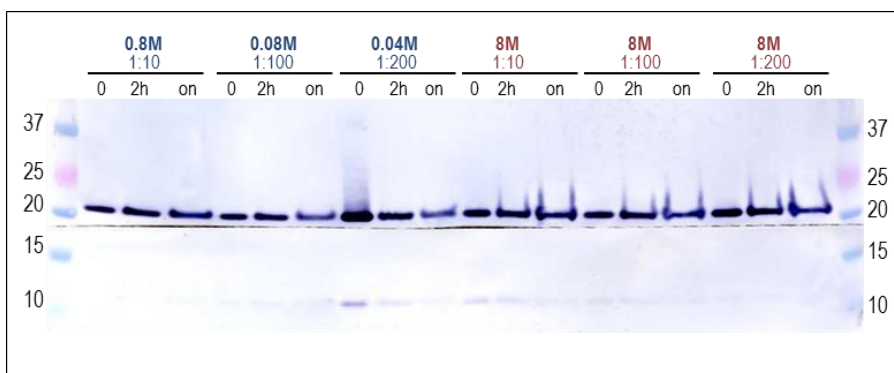
Il campione è stato diluito sia in assenza di urea (Native buffer) che in presenza di urea (Denaturing buffer) come controllo. Inoltre le diluizioni sono state effettuate considerando di poter seminare per ogni diluizione un volume sufficiente ad ottenere lo stesso segnale del campione indiluito, al fine di avere dei dati confrontabili. (Tabelle 4-5-6).

La prova di stabilità è stata effettuata incubando i vari campioni a 37°C a tre diversi tempi: tempo zero – 2h – over night.

L'eventuale diminuzione del precursore e il rispettivo aumento della proteasi matura sono stati successivamente verificati in WB con anti-His e anti-proteasi. (Figure 51, 52 e 53)

## Tabella 4

Diluizioni	DENATURING BUFFER	BUFFER NATIVE	UREA
	8M UREA pH 6.0	pH 6.0	
1:10	dil. 1:10 da E <sub>c</sub> 8M	dil. 1:10 da E <sub>c</sub> 8M	0.8M
1:100	dil. 1:10 dalla dil. 1:10 in DENATURING BUFFER	dil. 1:10 dalla dil. 1:10 in NATIVE BUFFER	0.08M
1:200	dil. 1:2 dalla dil. 1:100 in DENATURING BUFFER	dil. 1:2 dalla dil. 1:100 in NATIVE BUFFER	0.04M



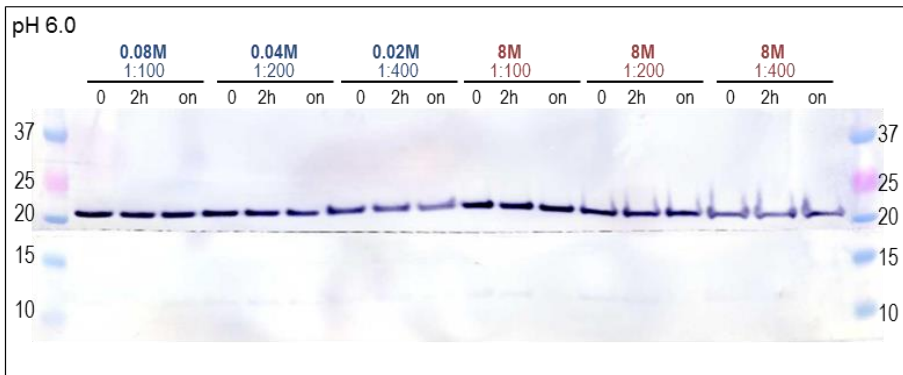
**Figura 51:** Prova di stabilità del precursore della proteasi di HIV-1 a pH 6.0 con diverse diluizioni di urea (0.8 M, 0.08 M, 0.04 M) e con concentrazione di urea costante (8 M). WB sviluppato con anticorpo anti-HIS ed anti-proteasi.

In WB non si osserva uno shift della banda del precursore a proteasi matura in nessuna delle condizioni e la banda del precursore sembra rimanere stabile. L'ipotesi è che la concentrazione di urea 0.04 M sia ancora tale da stabilizzare il precursore.

Viene quindi ripetuto lo stesso esperimento prima mantenendo i due buffer (Denaturing e Native) a pH 6.0 ma riducendo ulteriormente la concentrazione di urea fino a 0.02 M (Tabella 5) e successivamente con le medesime concentrazioni di urea ma utilizzando i due buffer a pH 4.0 (Tabella 6).

**Tabella 5**

Diluizioni	DENATURING BUFFER	BUFFER NATIVE	UREA
	8M UREA pH 6.0	pH 6.0	
1:100	dil. 1:100 da E <sub>c</sub> 8M	dil. 1:100 da E <sub>c</sub> 8M	0.08M
1:200	dil. 1:2 dalla dil. 1:100 in DENATURING BUFFER	dil. 1:2 dalla dil. 1:100 in NATIVE BUFFER	0.04M
1:400	dil. 1:2 dalla dil. 1:200 in DENATURING BUFFER	dil. 1:2 dalla dil. 1:200 in NATIVE BUFFER	0.02M



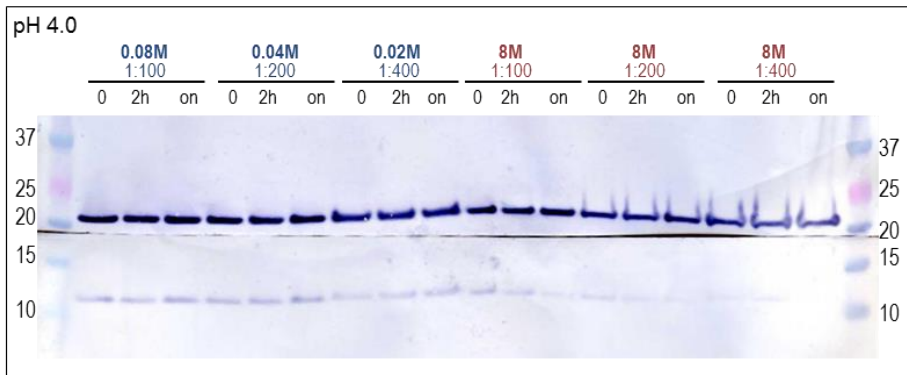
**Figura 52:** Prova di stabilità del precursore della proteasi di HIV-1 a pH 6.0 con diverse diluizioni di urea (0.08 M, 0.04 M, 0.02 M) e con concentrazione di urea costante (8 M). WB sviluppato con anticorpo anti-HIS ed anti-proteasi.

In questo esperimento osserviamo che la banda del precursore è visibile anche a concentrazione molto bassa di urea fino a 0.02 M, tuttavia non si osserva uno shift a proteasi matura. Questo ci suggerisce che probabilmente anche in presenza di concentrazioni minime di urea il precursore rimane stabile. Si effettua quindi la prova utilizzando i due buffer a pH 4.0, a tale pH il folding dovrebbe essere favorito.



**Tabella 6**

Diluizioni	DENATURING BUFFER	BUFFER NATIVE	UREA
	8M UREA pH 4.0	pH 4.0	
1:100	dil. 1:100 da E <sub>c</sub> 8M	dil. 1:100 da E <sub>c</sub> 8M	0.08M
1:200	dil. 1:2 dalla dil. 1:100 in DENATURING BUFFER	dil. 1:2 dalla dil. 1:100 in NATIVE BUFFER	0.04M
1:400	dil. 1:2 dalla dil. 1:200 in DENATURING BUFFER	dil. 1:2 dalla dil. 1:200 in NATIVE BUFFER	0.02M



**Figura 53:** Prova di stabilità del precursore della proteasi di HIV-1 a pH 4.0 con diverse diluizioni di urea (0.08 M, 0.04 M, 0.02 M) e con concentrazione di urea costante (8 M). WB sviluppato con anticorpo anti-HIS ed anti-proteasi.

Dall'analisi in WB della prova a pH 4.0 si osserva in condizioni native la comparsa della banda della proteasi. Tuttavia non sembra esserci differenza di segnale in funzione della concentrazione di urea.

I risultati ottenuti dimostrano che il precursore risulta essere stabile fino ad una concentrazione di urea 0.02 M. Non è stato possibile ridurre ulteriormente l'urea onde evitare di abbassare troppo la concentrazione del precursore che non sarebbe più visualizzabile in WB.

Considerando che per i saggi enzimatici è necessario disporre sia del precursore purificato in assenza di urea, sia di un campione concentrato si decide di procedere provando ad eliminare l'urea mediante dialisi.

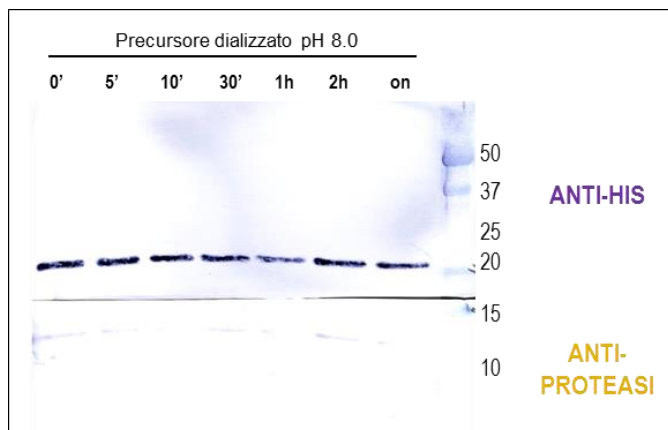
### 3.7 Dialisi precursore

Al fine di eliminare l'urea ed ottenere il precursore in condizioni native è stata effettuata una dialisi con le cellette Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes (3.5K MWCO) (Pierce) che possiedono una membrana di cellulosa rigenerata low-binding, alla quale il precursore non si dovrebbe legare.

La dialisi è stata provata in tre diverse condizioni, al fine di seguire l'attivazione del precursore sono stati utilizzati tamponi a pH diversi: a pH acido (pH 4.0), neutro (6.5) o basico (pH 8.0).

In queste condizioni è stato effettivamente possibile eliminare l'urea e recuperare il precursore.

Sui campioni ottenuti dalla dialisi sono state effettuate le prove di stabilità del precursore incubandolo a 37°C per vari tempi e visualizzando i risultati in WB con anti-His e anti-proteasi (Figura 54, sono mostrati solo i risultati a pH 8.0)



**Figura 54:** Prova di stabilità del precursore della proteasi di HIV-1 su campione dializzato a pH 8.0. WB sviluppato con anticorpo anti-HIS ed anti-proteasi

Dai risultati si vede che il precursore, anche dopo eliminazione dell'urea, non si attiva a nessun pH e rimane stabile anche dopo una incubazione over night.

Visti i risultati ottenuti è verosimile che l'urea modifichi irreversibilmente la struttura della proteina impedendone l'attività. L'urea è un agente caotropico capace di rompere i legami idrofobici e i legami idrogeno delle proteine denaturandole e mettendole in soluzione. Essendo il precursore della proteasi di HIV-1 una proteina altamente idrofobica, l'urea oltre che per isolarlo dai corpi di inclusione è necessaria per mantenerlo in soluzione. È tuttavia noto che l'urea carbamila le

proteine e sebbene questa modificazione in genere non influenzi l'attività delle proteine è possibile che nel caso del precursore ne precluda la capacità di autoprocessarsi.

## 4. TEST IN CELLULE JURKAT

### 4.1 *Razionale*

Per ovviare al limite del test SIB che fa uso di batteri, i quali non sono il target naturale di HIV-1, si è pensato di mettere a punto un test analogo in cellule eucariotiche al fine di effettuare uno screening dei possibili inibitori in un sistema più complesso e più simile alla situazione reale.

Questo sistema presenta diversi vantaggi, in quanto utilizza delle cellule eucariotiche (Jurkat) che presentano comportamento analogo rispetto ai linfociti per quanto riguarda tossicità e permeabilità, ma risulta comunque un test molto più rapido, più sicuro (viene usata solo la proteina ricombinante e non il virus) e meno costoso rispetto al classico test d'infezione.

Il sistema utilizzato per l'espressione è un sistema regolato in cui l'espressione del transgene è inibita dal legame del repressore della tetraciclina (Tet-R) all'operatore e viene indotta mediante l'aggiunta di tetraciclina. A questo scopo sono state utilizzate le cellule Jurkat T-REx (Tetracycline-Regulated Expression) che esprimono stabilmente il repressore della tetraciclina (plasmide pcDNA™6/TR) sotto il controllo dell'immediata early-promoter del citomegalovirus (CMV). Il plasmide utilizzato pT-REx-DEST31 contiene la cassetta di espressione sotto il controllo del promotore CMV nel quale sono state inserite due copie della sequenza dell'operatore  $O_2$  (Tet $O_2$ ) a cui si lega il repressore della tetraciclina (Tet-R), l'espressione del transgene risulta quindi repressa e può essere indotta mediante l'aggiunta di Tetraciclina che stacca il repressore dall'operatore. Il vettore pT-REx-DEST31 presenta inoltre un tag di istidine all'N-terminale che risulta utile per la rivelazione della proteina in Western Blot.

### 4.2 *Clonaggio del precursore della proteasi di HIV-1*

Il gene codificante il precursore della proteasi di HIV-1 è stato amplificato mediante PCR a partire dal vettore utilizzato per la produzione del precursore in batteri (pDon-PrP), utilizzando una polimerasi proof-reading (Phusion - Finnzymes) e un primer forward contenente la sequenza CACC per il clonaggio direzionale con il sistema TOPO-Cloning (Life Technologies).

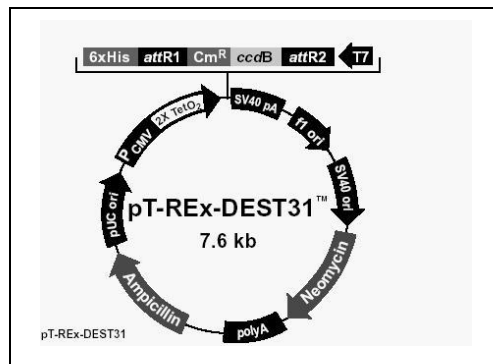
Primer F: **CACC**ATGTTTTTTAGGGAAGATCTGG

Primer R: **TC**AAAAATTTAAAGTGCAACCAATCTGAG

L'amplificato è stato quindi clonato nell'entry vector pENTR™/D-TOPO (Life Technologies) a cui è legata la topoisomerasi, l'enzima riconosce la sequenza CACC e lega il frammento all'interno del vettore nel giusto orientamento.

Il plasmide ottenuto, **TOPO-PrP**, è stato amplificato in cellule di *E. coli* TOP10 (Life Technologies) selezionate con kanamicina, i cloni sono stati analizzati mediante Colony-PCR e quelli risultati positivi sono stati sottoposti a Mini-prep (kit Eurogold Plasmid - Euroclone) e successivo sequenziamento del DNA plasmidico.

Dopo l'analisi delle sequenze con il programma CLC Sequence Viewer un clone è stato selezionato per i passaggi successivi. Il frammento è stato trasferito nel vettore di espressione **pT-REx-DEST31** (Life Technologies) mediante ricombinazione omologa con sistema Gateway (Life Technologies) (Figura 55).



**Figura 55:** Mappa del vettore di espressione **pT-REx-DEST31**, Life Technologies.

Nel vettore entry (TOPO-PrP) e nel vettore di destinazione (pT-REx-DEST31) sono presenti delle sequenze omologhe (sequenze attL e attR) che in presenza di una ricombinasi (LR Clonase) ricombinano e il frammento viene trasferito da un vettore all'altro. Nel vettore di destinazione è inoltre presente un gene letale (ccdB) che esce quando entra il frammento, in questo modo le cellule di *E. coli* che venissero trasformate con il vettore senza il frammento di interesse non sarebbero in grado di crescere, questo dà la certezza che le colonie che si formano su piastra contengano il vettore corretto.

Il plasmide ottenuto **pT-REx-PrP** è stato utilizzato per trasformare cellule di *E. coli* TOP10 e i cloni contenenti il plasmide sono stati selezionati su piastre petri con LB agar più ampicillina. I cloni sono stati screenati mediante colony-PCR e un clone è stato selezionato e ulteriormente espanso in terreno liquido contenente ampicillina. Dal clone selezionato è stata effettuata una Midi-Prep (Eurogold Plasmid Midiprep

– Euroclone) al fine di ottenerne una quantità sufficiente per la successiva trasfezione delle cellule eucariotiche.

### **4.3 Trasfezione cellule Jurkat e selezione cloni stabili**

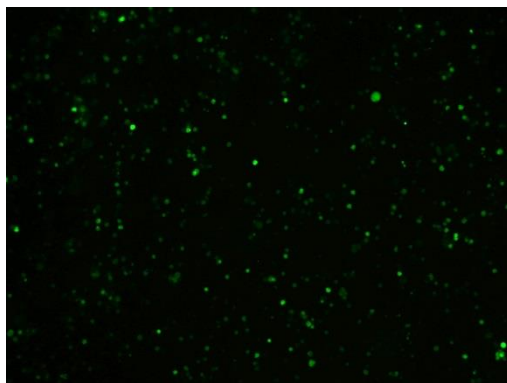
Le cellule Jurkat T-REx (Tetracycline-Regulated Expression) (Life Technologies) esprimono stabilmente il repressore della tetraciclina in quanto contengono il plasmide pcDNA™6/TR in cui il repressore della tetraciclina (Te-tR) è sotto il controllo dell'immediata early-promoter del citomegalovirus (CMV), il plasmide contiene la resistenza alla blasticidina e le cellule devono essere coltivate in presenza di blasticidina affinché mantengano il plasmide.

Le cellule sono state scongelate e successivamente espanse in terreno RPMI contenete: 10% di FBS, 2mM L-glutamina, 1% Pen-Strep, 500µg/ml G418 e 10µg/ml blasticidina.

Successivamente sono state trasfettate con il plasmide pT-REx-PrP mediante nucleofezione con il sistema Amaxa® e il kit Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V (Lonza), che garantisce un'elevatissima efficienza di trasfezione. (Allegato 3)

Assieme al vettore per il precursore della proteasi di HIV-1 (pT-REx-PrP) sono stati trasfettati parallelamente un controllo con il vettore pT-REx-GW-31/LacZ che esprime il LacZ (nello stesso vettore di espressione in cui è stato clonato il precursore) e il vettore pmaxGFP® che esprime la GFP come controllo dell'efficienza di trasfezione.

L'efficienza di trasfezione è stata verificata sulle cellule trasfettate con il vettore pmaxGFP® mediante microscopio invertito a fluorescenza ed è risultata essere maggiore del 90%. (Figura 56)



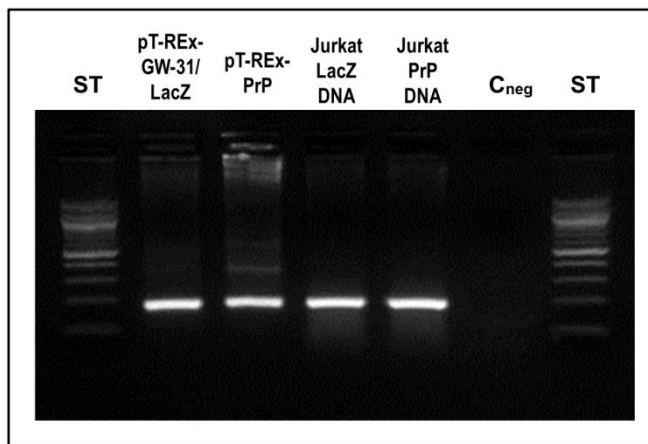
**Figura 56:** Immagine al microscopio invertito a fluorescenza di cellule Jurkat T-REx (Tetracycline-Regulated Expression) trasfettate con il vettore pmaxGFP® che esprime la GFP.

Le cellule trasfettate con vettore pT-REx-PrP e con il vettore pT-REx-GW-31/LacZ sono state coltivate in terreno RPMI completo in presenza sia di Geneticina (G418) che di Blastidina.

Il vettore pT-REx contiene la resistenza alla Geneticina quindi, al fine di ottenere una linea stabile, le cellule sono state coltivate in presenza di G418 per selezionare solo i cloni contenenti il plasmide con la proteina d'interesse. Inoltre le cellule Jurkat T-Rex devono essere coltivate sempre in presenza di Blastidina per assicurare il mantenimento del plasmide esprime il repressore della tetraciclina. I cloni stabili per entrambi i costrutti, precursore della proteasi di HIV-1 e controllo (LacZ), sono stati selezionati e utilizzati per l'espressione delle proteine ricombinanti.

#### 4.4 Espressione

Prima di procedere all'espressione delle proteine ricombinanti la corretta integrazione del plasmide nel DNA genomico delle cellule è stata verificata mediante PCR sul DNA cellulare utilizzando dei primers che si legano ad una sequenza presente nel vettore. (Figura 57)



**Figura 57:** PCR sui vettori utilizzati per la trasfezione e sul DNA nucleare estratto dalle cellule trasfettate

Dato che l'espressione del precursore della proteasi di HIV-1 potrebbe risultare tossica per le cellule Jurkat si è preferito mettere a punto dapprima il sistema di espressione utilizzando il controllo esprime la  $\beta$ -galattosidasi (lacZ).

L'espressione è stata indotta mediante l'aggiunta di tetraciclina (Tet, 1µg/ml) e le cellule sono state coltivate per tempi diversi (24h – 48h – 72h).

L'espressione della β-galattosidasi è stata analizzata prima con un test colorimetrico che ne rileva l'attività enzimatica e in seguito verificata mediante WB con anticorpo anti-His.

#### **4.4.1 B-galattosidasi assay**

L'espressione della β-galattosidasi è stata saggiata mediante il kit β-galactosidase reporter gene activity detection kit (Sigma).

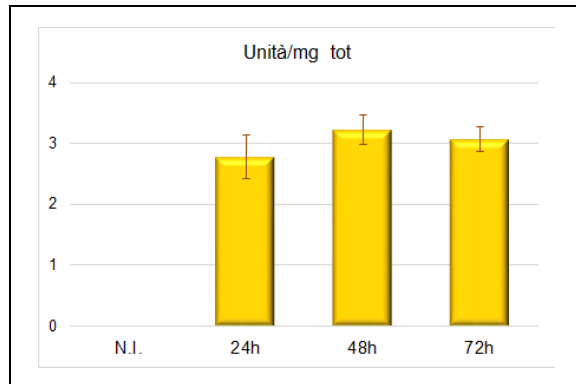
Quest'ultimo è un test colorimetrico per determinare l'attività dell'enzima β-galattosidasi in cellule trasfettate che sfrutta il substrato cromogenico o-Nitrofenil-β-D-Galactopiranoside (ONPG). L'ONPG è un substrato incolore che viene idrolizzato dalla β-galattosidasi producendo l'o-Nitrofenolo che è di colore giallo e assorbe la luce a 420 nm. L'intensità di colore è quindi una misura dell'attività enzimatica e indirettamente dell'espressione della proteina ricombinante.

Le cellule Jurkat trasfettate con il vettore pT-REx-GW-31/LacZ indotte per 24h – 48h – 72h con Tet e non indotte (controllo) sono state lisate con il buffer di lisi (50 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM CHAPS) ed incubate 15 min. a  $T_{amb}$ . Al termine dell'incubazione il lisato è stato centrifugato a 15000 rpm per 5 min. e il surnatante contenente le proteine in soluzione è stato recuperato e mantenuto in ghiaccio. La concentrazione delle proteine totali nei lisati è stata determinata mediante un saggio Bradford.

Per effettuare il test è stato aggiunto al lisato il 2X assay buffer (200 mM buffer sodio fosfato, pH 7.3, 2 mM  $MgCl_2$ , 100 mM β-mercapto-etanolo 1.33 g/ml ONPG), contenente il substrato della β-galattosidasi, e i campioni sono stati incubati a 37°C per 30 min. o fino allo sviluppo della colorazione gialla. La reazione è stata bloccata aggiungendo la soluzione di stop (1 M sodio carbonato) ed è stata effettuata la lettura spettrofotometrica a 420 nm.

L'attività della β-galattosidasi è stata calcolata rispetto alle proteine totali ottenendo il rapporto tra unità di enzima e mg di proteine totali.





**Figura 58:** Attività dell'enzima  $\beta$ -galattosidasi calcolato come rapporto tra unità di enzima e mg di proteine totali.

Il risultato ottenuto su tre esperimenti mostra come all'aumentare del tempo l'espressione della proteina non aumenti significativamente ad indicare che già dopo 24h i livelli di espressione sono elevati (Figura 58).

In considerazione del fatto che l'espressione della proteasi matura potrebbe risultare tossica per le cellule, si sta attualmente procedendo a valutare i livelli di espressione della proteina a tempi di induzione inferiori in cui ci si aspetta di avere di avere una percentuale di precursore superiore rispetto alla proteasi.

Verosimilmente, come fatto per i batteri, sarà necessario valutare l'espressione del precursore della proteasi sia in presenza che in assenza di inibitori.

## 5. CONCLUSIONI

Questo lavoro di tesi aveva un duplice obiettivo: clonare il precursore della proteasi di HIV-1 allo scopo di studiarne il processo di maturazione e mettere a punto dei test di screening di nuova concezione per l'identificazione di inibitori del folding. In quest'ultimo caso, si voleva arrivare a disporre di un saggio che permettesse di discriminare tra inibitori classici dell'attività enzimatica ed una nuova potenziale classe di molecole, capaci di inibire specificamente il folding della proteasi.

Il clonaggio del precursore della proteasi di HIV-1 è stato condotto su due tipi diversi di ospiti batterici, con differenti finalità: la produzione del precursore da utilizzare in test in vitro e lo sviluppo di un test in vivo.

Il precursore è stato clonato e purificato con lo scopo di sviluppare test di screening per studiarne il folding in vitro. A tal fine è stato necessario utilizzare una cellula ospite capace di sopravvivere all'induzione dell'espressione del precursore, sono quindi state utilizzate cellule T7-express che risultano resistenti all'espressione di proteine tossiche. È stato inoltre scelto un vettore di espressione contenente tag specifici in grado di facilitare la purificazione della proteina dal citoplasma batterico e/o dai corpi d'inclusione.

Il precursore della proteasi di HIV-1 è effettivamente stato ottenuto in forma pura e stabile, e sono in corso studi per la messa a punto delle condizioni ottimali di auto-processamento e della maturazione in vitro a proteasi matura. Questo si è rivelato un problema di difficile e non immediata soluzione: il precursore è una proteina altamente idrofobica, che rende necessario l'uso di un forte agente caotropico come l'urea per mantenerlo in soluzione. Tuttavia è emerso che il trattamento con urea provoca la perdita della capacità di folding del precursore; pertanto si dovranno identificare metodi alternativi a quelli finora utilizzati per la sua purificazione e concentrazione.

Si prevede in futuro di utilizzare il precursore in saggi immunoenzimatici sfruttando lo streptag presente in posizione C-terminale per legarlo ad una fase solida; in seguito al processamento viene liberato un neo-epitopo riconosciuto dall'anticorpo anti-proteasi che rende possibile il rilevamento della proteasi matura come aumento dell'intensità di segnale. Viceversa, in presenza di possibili candidati inibitori del folding non si dovrebbe osservare alcun aumento del segnale nel tempo. Inoltre, una volta ottenuto un precursore stabile, sarà possibile sviluppare

test high-throughput per lo screening di inibitori del folding quale l'alpha-screen assay: si tratta di una tecnica spettroscopica che prevede l'utilizzo di beads, dette donatore e accettore. In questo saggio il donatore può essere eccitato ad una specifica lunghezza d'onda, emettendo energia che viene trasmessa all'accettore, a sua volta in grado di emettere fluorescenza visualizzabile dall'operatore. Tale processo avviene in modo ottimale solo se le due molecole sono a distanza ragionevolmente ristretta; quindi se il precursore, legato alle beads mediante i tag posti a C e N terminale, risultasse integro si osserverebbe un'emissione a 520-620 nm, mentre se avvenisse l'auto-processamento si osserverebbe una riduzione della fluorescenza. Qualora poi il test venisse condotto in presenza di inibitori del folding e questi dovessero risultare in grado di inibire l'auto-processamento dell'enzima, non si osserverebbe decadimento della fluorescenza. Inoltre questa tecnica presenta ulteriori vantaggi tra cui la possibilità di screenare più composti contemporaneamente (test in micropiastre) nonché elevata sensibilità (amplificazione del segnale, basso background) elevata riproducibilità, riduzione dei tempi di analisi (mix and measure al T0) e facilità di utilizzo.

È stato prodotto anche un clone che esprime il precursore con un tag di istidine al C-terminale che può essere utilizzato per screenare potenziali inibitori del folding in quanto consente di rilevare in WB con anticorpo anti-His sia il precursore che la proteasi matura. Un aumento della banda del precursore rispetto a quella della proteasi indicherebbe un effetto inibitorio della maturazione.

E' stato messo a punto un saggio *in vivo* per lo screening di nuovi inibitori del folding e dell'attività della proteasi di HIV-1. In questo caso il precursore è stato clonato in cellule di *E. coli* BL21 in cui la maturazione dell'enzima a partire dal precursore determina un effetto citostatico o citotossico. Questo effetto citostatico, di cui non è nota la causa, può essere sfruttato per valutare la capacità di eventuali inibitori della maturazione (o dell'attività dell'enzima) di salvare i batteri, permettendone la crescita.

Gli inibitori dell'attività della proteasi saggiati in questo test hanno dato risultati positivi: batteri sensibili alla proteasi che esprimono il precursore sopravvivono e crescono in presenza di diversi inibitori della proteasi di HIV-1, in maniera dose-dipendente. In parte ciò si deve al fatto che, sebbene con un certo ritardo rispetto ai batteri nei quali è stata clonata la proteasi matura, la maturazione del precursore produce una quantità di proteasi sufficiente a determinare l'effetto citostatico, e

questo viene inibito dagli inibitori classici. È possibile, come suggerito da altri lavori [132] che il precursore sia capace di autoprocessarsi assemblando un sito catalitico primordiale sensibile in parte agli inibitori classici, ma a tutt'oggi non sono stati identificati dei "veri e propri" inibitori del folding. In ogni caso, il sistema proposto è in grado di identificare eventuali farmaci che ritardino o inibiscano completamente il folding di questo precursore.

Il fatto che i batteri vadano incontro ad un arresto della crescita non è dovuto al semplice accumulo della proteina ricombinante, ma dipende strettamente dall'attività della proteasi prodotta in seguito a maturazione del precursore, infatti batteri cresciuti in presenza di inibitori producono la proteina ricombinante ma non si osserva effetto citostatico.

La causa di questo effetto citostatico non è ancora nota ma è plausibile che la proteasi di HIV-1 agisca su qualche proteina batterica essenziale, sarà quindi interessante effettuare ulteriori studi al fine di identificare i possibili target cellulari.

Il test messo a punto è suscettibile di ulteriori modifiche per applicazioni su vasta scala, verrà realizzato anche in micropiastre a 96 pozzetti che permettono di effettuare uno screening in parallelo di un elevato numero di possibili inibitori.

Infine la messa a punto del test in batteri è servito da spunto per lo sviluppo di un test analogo in cellule di una linea linfoblastoide umana (Jurkat), questo saggio è tuttora in via di sviluppo. Il sistema in cellule eucariotiche presenta diversi vantaggi in quanto utilizza cellule che presentano comportamento analogo rispetto ai linfociti (target di HIV-1) per quanto riguarda tossicità e permeabilità, ma risulta comunque un test molto più rapido, più sicuro (assenza del virus) e meno costoso rispetto al classico test d'infezione. Il precursore è stato clonato e sono stati ottenuti i cloni stabili esprimenti il precursore di HIV-1. Trattandosi però di una proteina potenzialmente tossica il sistema di induzione ed espressione è stato messo a punto dapprima utilizzando il controllo esprimente la  $\beta$ -galattosidasi (lacZ), clonata nello stesso vettore, al fine di avere un'idea dei tempi e dei livelli di espressione.

Un ulteriore sviluppo del test sarà quello di trasfettare le cellule eucariotiche anche con il costrutto esprimente la p55, reale target della proteasi, al fine verificare l'attività enzimatica.

Dati i risultati ottenuti si può concludere che i test messi a punto, o in fase di sviluppo, potranno essere utilizzati come valido ausilio ai classici test di infezione.

La loro applicazione consentirà di effettuare un primo step di screening in condizioni più sicure e con minor dispendio di tempo e di risorse.

Infine non è da escludere in futuro l'applicazione di questi test, oggi utilizzati per saggiare potenziali inibitori della proteasi di HIV-1, per lo studio di inibitori delle proteasi di altri virus.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Levy J.A. , "HIV pathogenesis: 25 years of progress and persistent challenges", *AIDS (London, England)*, Vol. 23, no. 2, 2009, pp. 147–160.
2. Paintsil E., and Andiman W.A. , "Update on successes and challenges regarding mother-to-child transmission of HIV", *Current opinion in pediatrics*, Vol. 21, no. 1, 2009, pp. 94–101.
3. Coovadia H. , "Antiretroviral agents--how best to protect infants from HIV and save their mothers from AIDS", *The New England journal of medicine*, Vol. 351, no. 3, 2004, pp. 289–292.
4. Varghese B., Maher J.E., Peterman T.A., Branson B.M., and Steketee R.W. , "Reducing the risk of sexual HIV transmission: quantifying the per-act risk for HIV on the basis of choice of partner, sex act, and condom use", *Sexually transmitted diseases*, Vol. 29, no. 1, 2002, pp. 38–43.
5. Fauci A.S. , "HIV and AIDS: 20 years of science", *Nature medicine*, Vol. 9, no. 7, 2003, pp. 839–843.
6. Weiss R.A. , "HIV and AIDS: looking ahead", *Nature medicine*, Vol. 9, no. 7, 2003, pp. 887–891.
7. Pope M., and Haase A.T. , "Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection", *Nature medicine*, Vol. 9, no. 7, 2003, pp. 847–852.
8. Daar E.S., Moudgil T., Meyer R.D., and Ho D.D. , "Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection", *The New England journal of medicine*, Vol. 324, no. 14, 1991, pp. 961–964.
9. Teleshova N., Frank I., and Pope M. , "Immunodeficiency virus exploitation of dendritic cells in the early steps of infection", *Journal of leukocyte biology*, Vol. 74, no. 5, 2003, pp. 683–690.
10. "IPPF/WHR service statistics for 1987", *Forum Fam. Plan. West Hemisph.*, Vol. 3, no. 10, 1987.
11. Biscone M.J., Pierson T.C., and Doms R.W. , "Opportunities and challenges in targeting HIV entry", *Current opinion in pharmacology*, Vol. 2, no. 5, 2002, pp. 529–533.
12. Perelson A.S., Neumann A.U., Markowitz M., Leonard J.M., and Ho D.D. , "HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 271, no. 5255, 1996, pp. 1582–1586.
13. Siliciano R.F. , "Latency and reservoirs for HIV-1", *AIDS (London, England)*, Vol. 13 Suppl A, 1999, pp. S49–58.

14. Stevenson M. , "HIV-1 pathogenesis", *Nature medicine*, Vol. 9, no. 7, 2003, pp. 853–860.
15. Thacker T.C., Zhou X., Estes J.D., Jiang Y., Keele B.F., Elton T.S., and Burton G.F. , "Follicular dendritic cells and human immunodeficiency virus type 1 transcription in CD4+ T cells", *Journal of virology*, Vol. 83, no. 1, 2009, pp. 150–158.
16. Schnittman S.M., Lane H.C., Greenhouse J., Justement J.S., Baseler M., and Fauci A.S. , "Preferential infection of CD4+ memory T cells by human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in the selective T-cell functional defects observed in infected individuals", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 87, no. 16, 1990, pp. 6058–6062.
17. Centlivre M., Sala M., Wain-Hobson S., and Berkhout B. , "In HIV-1 pathogenesis the die is cast during primary infection", *AIDS (London, England)*, Vol. 21, no. 1, 2007, pp. 1–11.
18. Centers for Disease Control (CDC). , "Pneumocystis pneumonia--Los Angeles", *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, Vol. 30, no. 21, 1981, pp. 250–252.
19. Centers for Disease Control (CDC). , "Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California", *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, Vol. 30, no. 25, 1981, pp. 305–308.
20. Masur H., Michelis M.A., Greene J.B., Onorato I., Stouwe R.A., Holzman R.S., et al. , "An outbreak of community-acquired Pneumocystis carinii pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction", *The New England journal of medicine*, Vol. 305, no. 24, 1981, pp. 1431–1438.
21. Centers for Disease Control (CDC). , "Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS)--United States", *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, Vol. 31, no. 37, 1982, pp. 507–508, 513–514.
22. Sonnabend J., Witkin S.S., and Purtilo D.T. , "Acquired immunodeficiency syndrome, opportunistic infections, and malignancies in male homosexuals. A hypothesis of etiologic factors in pathogenesis", *JAMA: the journal of the American Medical Association*, Vol. 249, no. 17, 1983, pp. 2370–2374.
23. Barré-Sinoussi F., Chermann J.C., Rey F., Nugeyre M.T., Chamaret S., Gruest J., et al. , "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 220, no. 4599, 1983, pp. 868–871.
24. Gallo R.C., Salahuddin S.Z., Popovic M., Shearer G.M., Kaplan M., Haynes B.F., Palker T.J., Redfield R., Oleske J., and Safai B. , "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 224, no. 4648, 1984, pp. 500–503.

25. Guyader M., Emerman M., Sonigo P., Clavel F., Montagnier L., and Alizon M. , "Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2", *Nature*, Vol. 326, no. 6114, 1987, pp. 662–669.
26. Muesing M.A., Smith D.H., Cabradilla C.D., Benton C.V., Lasky L.A., and Capon D.J. , "Nucleic acid structure and expression of the human AIDS/lymphadenopathy retrovirus", *Nature*, Vol. 313, no. 6002, 1985, pp. 450–458.
27. Gallo R., Wong-Staal F., Montagnier L., Haseltine W.A., and Yoshida M. , "HIV/HTLV gene nomenclature", *Nature*, Vol. 333, no. 6173, 1988, pp. 504.
28. Göttinger H.G., Sodroski J.G., and Haseltine W.A. , "Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 86, no. 15, 1989, pp. 5781–5785.
29. Gallay P., Swingle S., Song J., Bushman F., and Trono D. , "HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase", *Cell*, Vol. 83, no. 4, 1995, pp. 569–576.
30. Lewis P., Hensel M., and Emerman M. , "Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle", *The EMBO journal*, Vol. 11, no. 8, 1992, pp. 3053–3058.
31. Franke E.K., Yuan H.E., and Luban J. , "Specific incorporation of cyclophilin A into HIV-1 virions", *Nature*, Vol. 372, no. 6504, 1994, pp. 359–362.
32. Harrison G.P., and Lever A.M. , "The human immunodeficiency virus type 1 packaging signal and major splice donor region have a conserved stable secondary structure", *Journal of virology*, Vol. 66, no. 7, 1992, pp. 4144–4153.
33. Lapadat-Tapolsky M., De Rocquigny H., Van Gent D., Roques B., Plasterk R., and Darlix J.L. , "Interactions between HIV-1 nucleocapsid protein and viral DNA may have important functions in the viral life cycle", *Nucleic acids research*, Vol. 21, no. 4, 1993, pp. 831–839.
34. Paxton W., Connor R.I., and Landau N.R. , "Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis", *Journal of virology*, Vol. 67, no. 12, 1993, pp. 7229–7237.
35. Parkin N.T., Chamorro M., and Varmus H.E. , "Human immunodeficiency virus type 1 gag-pol frameshifting is dependent on downstream mRNA secondary structure: demonstration by expression in vivo", *Journal of virology*, Vol. 66, no. 8, 1992, pp. 5147–5151.
36. Brik A., and Wong C.-H. , "HIV-1 protease: mechanism and drug discovery", *Organic & biomolecular chemistry*, Vol. 1, no. 1, 2003, pp. 5–14.



37. Harrich D., Ulich C., and Gaynor R.B. , "A critical role for the TAR element in promoting efficient human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription", *Journal of virology*, Vol. 70, no. 6, 1996, pp. 4017–4027.
38. Pruss D., Bushman F.D., and Wolffe A.P. , "Human immunodeficiency virus integrase directs integration to sites of severe DNA distortion within the nucleosome core", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 91, no. 13, 1994, pp. 5913–5917.
39. Bernstein H.B., Tucker S.P., Kar S.R., McPherson S.A., McPherson D.T., Dubay J.W., Lebowitz J., Compans R.W., and Hunter E. , "Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41", *Journal of virology*, Vol. 69, no. 5, 1995, pp. 2745–2750.
40. Kwong P.D., Wyatt R., Robinson J., Sweet R.W., Sodroski J., and Hendrickson W.A. , "Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody", *Nature*, Vol. 393, no. 6686, 1998, pp. 648–659.
41. Hwang S.S., Boyle T.J., Lyerly H.K., and Cullen B.R. , "Identification of the envelope V3 loop as the primary determinant of cell tropism in HIV-1", *Science (New York, N.Y.)*, Vol. 253, no. 5015, 1991, pp. 71–74.
42. Geijtenbeek T.B., Kwon D.S., Torensma R., van Vliet S.J., van Duijnhoven G.C., Middel J., et al. , "DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells", *Cell*, Vol. 100, no. 5, 2000, pp. 587–597.
43. Ruben S., Perkins A., Purcell R., Joung K., Sia R., Burghoff R., Haseltine W.A., and Rosen C.A. , "Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein", *Journal of virology*, Vol. 63, no. 1, 1989, pp. 1–8.
44. Feng S., and Holland E.C. , "HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar", *Nature*, Vol. 334, no. 6178, 1988, pp. 165–167.
45. Feinberg M.B., Baltimore D., and Frankel A.D. , "The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88, no. 9, 1991, pp. 4045–4049.
46. Wei P., Garber M.E., Fang S.M., Fischer W.H., and Jones K.A. , "A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA", *Cell*, Vol. 92, no. 4, 1998, pp. 451–462.
47. Brother M.B., Chang H.K., Lisziewicz J., Su D., Murty L.C., and Ensoli B. , "Block of Tat-mediated transactivation of tumor necrosis factor beta gene expression by polymeric-TAR decoys", *Virology*, Vol. 222, no. 1, 1996, pp. 252–256.
48. Rasty S., Thatikunta P., Gordon J., Khalili K., Amini S., and Glorioso J.C. , "Human immunodeficiency virus tat gene transfer to the murine central

- nervous system using a replication-defective herpes simplex virus vector stimulates transforming growth factor beta 1 gene expression", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 93, no. 12, 1996, pp. 6073–6078.
49. Sastry K.J., Marin M.C., Nehete P.N., McConnell K., el-Naggar A.K., and McDonnell T.J. , "Expression of human immunodeficiency virus type I tat results in down-regulation of bcl-2 and induction of apoptosis in hematopoietic cells", *Oncogene*, Vol. 13, no. 3, 1996, pp. 487–493.
  50. Sharma V., Xu M., Ritter L.M., and Wilkie N.M. , "HIV-1 tat induces the expression of a new hematopoietic cell-specific transcription factor and downregulates MIP-1 alpha gene expression in activated T-cells", *Biochemical and biophysical research communications*, Vol. 223, no. 3, 1996, pp. 526–533.
  51. Zapp M.L., and Green M.R. , "Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein", *Nature*, Vol. 342, no. 6250, 1989, pp. 714–716.
  52. Malim M.H., Hauber J., Le S.Y., Maizel J.V., and Cullen B.R. , "The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA", *Nature*, Vol. 338, no. 6212, 1989, pp. 254–257.
  53. Felber B.K., Drysdale C.M., and Pavlakis G.N. , "Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein", *Journal of virology*, Vol. 64, no. 8, 1990, pp. 3734–3741.
  54. Zapp M.L., Hope T.J., Parslow T.G., and Green M.R. , "Oligomerization and RNA binding domains of the type 1 human immunodeficiency virus Rev protein: a dual function for an arginine-rich binding motif", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88, no. 17, 1991, pp. 7734–7738.
  55. Fischer U., Huber J., Boelens W.C., Mattaj I.W., and Lührmann R. , "The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs", *Cell*, Vol. 82, no. 3, 1995, pp. 475–483.
  56. Garcia J.V., and Miller A.D. , "Downregulation of cell surface CD4 by nef", *Research in virology*, Vol. 143, no. 1, 1992, pp. 52–55.
  57. Lama J., Mangasarian A., and Trono D. , "Cell-surface expression of CD4 reduces HIV-1 infectivity by blocking Env incorporation in a Nef- and Vpu-inhibitable manner", *Current biology: CB*, Vol. 9, no. 12, 1999, pp. 622–631.
  58. Schwartz O., Maréchal V., Le Gall S., Lemonnier F., and Heard J.M. , "Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein", *Nature medicine*, Vol. 2, no. 3, 1996, pp. 338–342.
  59. Luria S., Chambers I., and Berg P. , "Expression of the type 1 human immunodeficiency virus Nef protein in T cells prevents antigen receptor-

- mediated induction of interleukin 2 mRNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88, no. 12, 1991, pp. 5326–5330.
60. Skowronski J., Parks D., and Mariani R. , "Altered T cell activation and development in transgenic mice expressing the HIV-1 nef gene", *The EMBO journal*, Vol. 12, no. 2, 1993, pp. 703–713.
  61. Cohen E.A., Dehni G., Sodroski J.G., and Haseltine W.A. , "Human immunodeficiency virus vpr product is a virion-associated regulatory protein", *Journal of virology*, Vol. 64, no. 6, 1990, pp. 3097–3099.
  62. Heinzinger N.K., Bukinsky M.I., Haggerty S.A., Ragland A.M., Kewalramani V., Lee M.A., Gendelman H.E., Ratner L., Stevenson M., and Emerman M. , "The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 91, no. 15, 1994, pp. 7311–7315.
  63. Re F., Braaten D., Franke E.K., and Luban J. , "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B", *Journal of virology*, Vol. 69, no. 11, 1995, pp. 6859–6864.
  64. Bouhamdan M., Benichou S., Rey F., Navarro J.M., Agostini I., Spire B., et al. , "Human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein binds to the uracil DNA glycosylase DNA repair enzyme", *Journal of virology*, Vol. 70, no. 2, 1996, pp. 697–704.
  65. Sato A., Igarashi H., Adachi A., and Hayami M. , "Identification and localization of vpr gene product of human immunodeficiency virus type 1", *Virus genes*, Vol. 4, no. 4, 1990, pp. 303–312.
  66. Schubert U., Bour S., Ferrer-Montiel A.V., Montal M., Maldarell F., and Strebel K. , "The two biological activities of human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein involve two separable structural domains", *Journal of virology*, Vol. 70, no. 2, 1996, pp. 809–819.
  67. Willey R.L., Maldarelli F., Martin M.A., and Strebel K. , "Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4", *Journal of virology*, Vol. 66, no. 12, 1992, pp. 7193–7200.
  68. Von Schwedler U., Song J., Aiken C., and Trono D. , "Vif is crucial for human immunodeficiency virus type 1 proviral DNA synthesis in infected cells", *Journal of virology*, Vol. 67, no. 8, 1993, pp. 4945–4955.
  69. Liu H., Wu X., Newman M., Shaw G.M., Hahn B.H., and Kappes J.C. , "The Vif protein of human and simian immunodeficiency viruses is packaged into virions and associates with viral core structures", *Journal of virology*, Vol. 69, no. 12, 1995, pp. 7630–7638.
  70. Camaur D., and Trono D. , "Characterization of human immunodeficiency virus type 1 Vif particle incorporation", *Journal of virology*, Vol. 70, no. 9, 1996, pp. 6106–6111.

71. Simon J.H., Gaddis N.C., Fouchier R.A., and Malim M.H. , "Evidence for a newly discovered cellular anti-HIV-1 phenotype", *Nature medicine*, Vol. 4, no. 12, 1998, pp. 1397–1400.
72. Simon J.H., Miller D.L., Fouchier R.A., Soares M.A., Peden K.W., and Malim M.H. , "The regulation of primate immunodeficiency virus infectivity by Vif is cell species restricted: a role for Vif in determining virus host range and cross-species transmission", *The EMBO journal*, Vol. 17, no. 5, 1998, pp. 1259–1267.
73. Doms R.W., and Trono D. , "The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield", *Genes & development*, Vol. 14, no. 21, 2000, pp. 2677–2688.
74. Scarlatti G., Tresoldi E., Björndal A., Fredriksson R., Colognesi C., Deng H.K., et al. , "In vivo evolution of HIV-1 co-receptor usage and sensitivity to chemokine-mediated suppression", *Nature medicine*, Vol. 3, no. 11, 1997, pp. 1259–1265.
75. Liu R., Paxton W.A., Choe S., Ceradini D., Martin S.R., Horuk R., MacDonald M.E., Stuhlmann H., Koup R.A., and Landau N.R. , "Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection", *Cell*, Vol. 86, no. 3, 1996, pp. 367–377.
76. Liao Z., Cimasky L.M., Hampton R., Nguyen D.H., and Hildreth J.E. , "Lipid rafts and HIV pathogenesis: host membrane cholesterol is required for infection by HIV type 1", *AIDS research and human retroviruses*, Vol. 17, no. 11, 2001, pp. 1009–1019.
77. Chan D.C., and Kim P.S. , "HIV entry and its inhibition", *Cell*, Vol. 93, no. 5, 1998, pp. 681–684.
78. Dhami H., Fritz C.E., Gankin B., Pak S.H., Yi W., Seya M.-J., Raffa R.B., and Nagar S. , "The chemokine system and CCR5 antagonists: potential in HIV treatment and other novel therapies", *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, Vol. 34, no. 2, 2009, pp. 147–160.
79. Cartier C., Sivard P., Tranchat C., Decimo D., Desgranges C., and Boyer V. , "Identification of three major phosphorylation sites within HIV-1 capsid. Role of phosphorylation during the early steps of infection", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 274, no. 27, 1999, pp. 19434–19440.
80. Lu X., Yu H., Liu S.H., Brodsky F.M., and Peterlin B.M. , "Interactions between HIV1 Nef and vacuolar ATPase facilitate the internalization of CD4", *Immunity*, Vol. 8, no. 5, 1998, pp. 647–656.
81. Karageorgos L., Li P., and Burrell C. , "Characterization of HIV replication complexes early after cell-to-cell infection", *AIDS research and human retroviruses*, Vol. 9, no. 9, 1993, pp. 817–823.
82. Bukrinskaya A., Brichacek B., Mann A., and Stevenson M. , "Establishment of a functional human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse

- transcription complex involves the cytoskeleton", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 188, no. 11, 1998, pp. 2113–2125.
83. Miller M.D., Farnet C.M., and Bushman F.D. , "Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition", *Journal of virology*, Vol. 71, no. 7, 1997, pp. 5382–5390.
  84. Turelli P., Doucas V., Craig E., Mangeat B., Klages N., Evans R., Kalpana G., and Trono D. , "Cytoplasmic recruitment of INI1 and PML on incoming HIV preintegration complexes: interference with early steps of viral replication", *Molecular cell*, Vol. 7, no. 6, 2001, pp. 1245–1254.
  85. Pemberton L.F., Blobel G., and Rosenblum J.S. , "Transport routes through the nuclear pore complex", *Current opinion in cell biology*, Vol. 10, no. 3, 1998, pp. 392–399.
  86. Zennou V., Petit C., Guetard D., Nerhbass U., Montagnier L., and Charneau P. , "HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap", *Cell*, Vol. 101, no. 2, 2000, pp. 173–185.
  87. Eckstein D.A., Sherman M.P., Penn M.L., Chin P.S., De Noronha C.M., Greene W.C., and Goldsmith M.A. , "HIV-1 Vpr enhances viral burden by facilitating infection of tissue macrophages but not nondividing CD4+ T cells", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 194, no. 10, 2001, pp. 1407–1419.
  88. Chen H., and Engelman A. , "The barrier-to-autointegration protein is a host factor for HIV type 1 integration", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 95, no. 26, 1998, pp. 15270–15274.
  89. Wu Y., and Marsh J.W. , "Selective transcription and modulation of resting T cell activity by preintegrated HIV DNA", *Science (New York, N. Y.)*, Vol. 293, no. 5534, 2001, pp. 1503–1506.
  90. Li L., Olvera J.M., Yoder K.E., Mitchell R.S., Butler S.L., Lieber M., Martin S.L., and Bushman F.D. , "Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection", *The EMBO journal*, Vol. 20, no. 12, 2001, pp. 3272–3281.
  91. Jordan A., Defechereux P., and Verdin E. , "The site of HIV-1 integration in the human genome determines basal transcriptional activity and response to Tat transactivation", *The EMBO journal*, Vol. 20, no. 7, 2001, pp. 1726–1738.
  92. Jones K.A., and Peterlin B.M. , "Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter", *Annual review of biochemistry*, Vol. 63, 1994, pp. 717–743.
  93. Karin M., and Ben-Neriah Y. , "Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity", *Annual review of immunology*, Vol. 18, 2000, pp. 621–663.
  94. Crabtree G.R. , "Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT", *Cell*, Vol. 96, no. 5, 1999, pp. 611–614.

95. Kao S.Y., Calman A.F., Luciw P.A., and Peterlin B.M. , "Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product", *Nature*, Vol. 330, no. 6147, 1987, pp. 489–493.
96. Price D.H. , "P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II", *Molecular and cellular biology*, Vol. 20, no. 8, 2000, pp. 2629–2634.
97. Garber M.E., Mayall T.P., Suess E.M., Meisenhelder J., Thompson N.E., and Jones K.A. , "CDK9 autophosphorylation regulates high-affinity binding of the human immunodeficiency virus type 1 tat-P-TEFb complex to TAR RNA", *Molecular and cellular biology*, Vol. 20, no. 18, 2000, pp. 6958–6969.
98. Yang Z., Zhu Q., Luo K., and Zhou Q. , "The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription", *Nature*, Vol. 414, no. 6861, 2001, pp. 317–322.
99. Cullen B.R. , "Retroviruses as model systems for the study of nuclear RNA export pathways", *Virology*, Vol. 249, no. 2, 1998, pp. 203–210.
100. Powell D.M., Amaral M.C., Wu J.Y., Maniatis T., and Greene W.C. , "HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 94, no. 3, 1997, pp. 973–978.
101. Malim M.H., and Cullen B.R. , "Rev and the fate of pre-mRNA in the nucleus: implications for the regulation of RNA processing in eukaryotes", *Molecular and cellular biology*, Vol. 13, no. 10, 1993, pp. 6180–6189.
102. Geyer M., Fackler O.T., and Peterlin B.M. , "Structure--function relationships in HIV-1 Nef", *EMBO reports*, Vol. 2, no. 7, 2001, pp. 580–585.
103. Zheng Y.H., Plemenitas A., Linnemann T., Fackler O.T., and Peterlin B.M. , "Nef increases infectivity of HIV via lipid rafts", *Current biology: CB*, Vol. 11, no. 11, 2001, pp. 875–879.
104. Chen B.K., Gandhi R.T., and Baltimore D. , "CD4 down-modulation during infection of human T cells with human immunodeficiency virus type 1 involves independent activities of vpu, env, and nef", *Journal of virology*, Vol. 70, no. 9, 1996, pp. 6044–6053.
105. Crise B., Buonocore L., and Rose J.K. , "CD4 is retained in the endoplasmic reticulum by the human immunodeficiency virus type 1 glycoprotein precursor", *Journal of virology*, Vol. 64, no. 11, 1990, pp. 5585–5593.
106. Xu X.N., Laffert B., Screaton G.R., Kraft M., Wolf D., Kolanus W., Mongkolsapay J., McMichael A.J., and Baur A.S. , "Induction of Fas ligand expression by HIV involves the interaction of Nef with the T cell receptor zeta chain", *The Journal of experimental medicine*, Vol. 189, no. 9, 1999, pp. 1489–1496.

107. Le Gall S., Erdtmann L., Benichou S., Berlioz-Torrent C., Liu L., Benarous R., Heard J.M., and Schwartz O. , "Nef interacts with the mu subunit of clathrin adaptor complexes and reveals a cryptic sorting signal in MHC I molecules", *Immunity*, Vol. 8, no. 4, 1998, pp. 483–495.
108. Geleziunas R., Xu W., Takeda K., Ichijo H., and Greene W.C. , "HIV-1 Nef inhibits ASK1-dependent death signalling providing a potential mechanism for protecting the infected host cell", *Nature*, Vol. 410, no. 6830, 2001, pp. 834–838.
109. Wolf D., Witte V., Laffert B., Blume K., Stromer E., Trapp S., d' Aloja P., Schürmann A., and Baur A.S. , "HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals", *Nature medicine*, Vol. 7, no. 11, 2001, pp. 1217–1224.
110. Greenway A.L., McPhee D.A., Allen K., Johnstone R., Holloway G., Mills J., Azad A., Sankovich S., and Lambert P. , "Human immunodeficiency virus type 1 Nef binds to tumor suppressor p53 and protects cells against p53-mediated apoptosis", *Journal of virology*, Vol. 76, no. 6, 2002, pp. 2692–2702.
111. Goh W.C., Rogel M.E., Kinsey C.M., Michael S.F., Fultz P.N., Nowak M.A., Hahn B.H., and Emerman M. , "HIV-1 Vpr increases viral expression by manipulation of the cell cycle: a mechanism for selection of Vpr in vivo", *Nature medicine*, Vol. 4, no. 1, 1998, pp. 65–71.
112. Wilk T., Gross I., Gowen B.E., Rutten T., de Haas F., Welker R., Kräusslich H.G., Boulanger P., and Fuller S.D. , "Organization of immature human immunodeficiency virus type 1", *Journal of virology*, Vol. 75, no. 2, 2001, pp. 759–771.
113. Zimmerman C., Klein K.C., Kiser P.K., Singh A.R., Firestein B.L., Riba S.C., and Lingappa J.R. , "Identification of a host protein essential for assembly of immature HIV-1 capsids", *Nature*, Vol. 415, no. 6867, 2002, pp. 88–92.
114. Sheehy A.M., Gaddis N.C., Choi J.D., and Malim M.H. , "Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein", *Nature*, Vol. 418, no. 6898, 2002, pp. 646–650.
115. Ono A., and Freed E.O. , "Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 98, no. 24, 2001, pp. 13925–13930.
116. Garrus J.E., von Schwedler U.K., Pornillos O.W., Morham S.G., Zavitz K.H., Wang H.E., et al. , "Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding", *Cell*, Vol. 107, no. 1, 2001, pp. 55–65.
117. Letvin N.L., and Walker B.D. , "Immunopathogenesis and immunotherapy in AIDS virus infections", *Nature medicine*, Vol. 9, no. 7, 2003, pp. 861–866.
118. Vigouroux C., Maachi M., Nguyễn T.-H., Coussieu C., Gharakhanian S., Funahashi T., et al. , "Serum adipocytokines are related to lipodystrophy and

- metabolic disorders in HIV-infected men under antiretroviral therapy", *AIDS (London, England)*, Vol. 17, no. 10, 2003, pp. 1503–1511.
119. Ruiz L., Carcelain G., Martínez-Picado J., Frost S., Marfil S., Paredes R., et al. , "HIV dynamics and T-cell immunity after three structured treatment interruptions in chronic HIV-1 infection", *AIDS (London, England)*, Vol. 15, no. 9, 2001, pp. F19–27.
  120. Ortiz G.M., Nixon D.F., Trkola A., Binley J., Jin X., Bonhoeffer S., et al. , "HIV-1-specific immune responses in subjects who temporarily contain virus replication after discontinuation of highly active antiretroviral therapy", *The Journal of clinical investigation*, Vol. 104, no. 6, 1999, pp. R13–18.
  121. Wondrak E.M., and Louis J.M. , "Influence of flanking sequences on the dimer stability of human immunodeficiency virus type 1 protease", *Biochemistry*, Vol. 35, no. 39, 1996, pp. 12957–12962.
  122. Louis J.M., Clore G.M., and Gronenborn A.M. , "Autoprocessing of HIV-1 protease is tightly coupled to protein folding", *Nature structural biology*, Vol. 6, no. 9, 1999, pp. 868–875.
  123. Candotti D., Chappey C., Rosenheim M., M'Pelé P., Huraux J.M., and Agut H. , "High variability of the gag/pol transframe region among HIV-1 isolates", *Comptes rendus de l'Académie des sciences. Série III, Sciences de la vie*, Vol. 317, no. 2, 1994, pp. 183–189.
  124. Louis J.M., Dyda F., Nashed N.T., Kimmel A.R., and Davies D.R. , "Hydrophilic peptides derived from the transframe region of Gag-Pol inhibit the HIV-1 protease", *Biochemistry*, Vol. 37, no. 8, 1998, pp. 2105–2110.
  125. Partin K., Zybarth G., Ehrlich L., DeCrombrugge M., Wimmer E., and Carter C. , "Deletion of sequences upstream of the proteinase improves the proteolytic processing of human immunodeficiency virus type 1", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 88, no. 11, 1991, pp. 4776–4780.
  126. Zybarth G., and Carter C. , "Domains upstream of the protease (PR) in human immunodeficiency virus type 1 Gag-Pol influence PR autoprocessing", *Journal of virology*, Vol. 69, no. 6, 1995, pp. 3878–3884.
  127. Rosé J.R., Salto R., and Craik C.S. , "Regulation of autoproteolysis of the HIV-1 and HIV-2 proteases with engineered amino acid substitutions", *The Journal of biological chemistry*, Vol. 268, no. 16, 1993, pp. 11939–11945.
  128. Mildner A.M., Rothrock D.J., Leone J.W., Bannow C.A., Lull J.M., Reardon I.M., Sarcich J.L., Howe W.J., Tomich C.S., and Smith C.W. , "The HIV-1 protease as enzyme and substrate: mutagenesis of autolysis sites and generation of a stable mutant with retained kinetic properties", *Biochemistry*, Vol. 33, no. 32, 1994, pp. 9405–9413.
  129. Davis D.A., Dorsey K., Wingfield P.T., Stahl S.J., Kaufman J., Fales H.M., and Levine R.L. , "Regulation of HIV-1 protease activity through cysteine modification", *Biochemistry*, Vol. 35, no. 7, 1996, pp. 2482–2488.



130. Cheng Y.-S.E., Lo K.-H., Hsu H.-H., Shao Y.-M., Yang W.-B., Lin C.-H., and Wong C.-H. , "Screening for HIV protease inhibitors by protection against activity-mediated cytotoxicity in *Escherichia coli*", *Journal of virological methods*, Vol. 137, no. 1, 2006, pp. 82–87.
131. Paliy O., and Gunasekera T.S. , "Growth of *E. coli* BL21 in minimal media with different gluconeogenic carbon sources and salt contents", *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 73, no. 5, 2007, pp. 1169–1172.
132. Louis J.M., Aniana A., Weber I.T., and Sayer J.M. , "Inhibition of autoprocessing of natural variants and multidrug resistant mutant precursors of HIV-1 protease by clinical inhibitors", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 108, no. 22, 2011, pp. 9072–9077.

## 7. APPENDICI

### Allegato 1

#### Protocollo di lisi dei batteri con biglie di vetro e UREA

- ☞ pellettare i batteri in falcon da 50ml centrifugando per 12min. a 4°C 4500xg
- ☞ eliminare il surnatante mantenendone circa 1ml e risospendere il pellet con il vortex
- ☞ trasferire il pellet risospeso in una eppendorf da 2ml (precedentemente pesata)
- ☞ centrifugare a 5000xg a 4°C per 1min. per ripellettere i batteri
- ☞ eliminare completamente il surnatante e pesare il pellet (se necessario congelare i pellet secchi a -80°C)
- ☞ **Lisare i batteri con le biglie:**
  - aggiungere 800µl di **BufferW-Triton0,1%** e le biglie 0,3gr/0,1gr di pellet
  - eseguire 3 cicli: congelamento/scongelo + vortex come segue:
    - congelamento in EtOH/ghiaccio secco e scongelamento rapido a 50°C
    - 1 minuto su vortex alla massima velocità
  - eseguire 3 cicli da 1 minuto su vortex intervallati da 1 min in ghiaccio
  - lasciar sedimentare le biglie e trasferire l'omogenato in una nuova provetta
  - centrifugare a 16000xg 4°C per 15min.
  - raccogliere il surnatante e riunirlo in una eppendorf da 1,5ml (**Lisato-1**)
  - lavare il pellet con 800µl di **Buffer W**
  - centrifugare a 16000xg 4°C per 10min.
  - eliminare completamente il surnatante rimasto della provetta
- ☞ Solubilizzare il pellet con "UREA 8M":
  - aggiungere 500µl di **Pellet Buffer (8M Urea)** al pellet insolubile
  - risospendere molto bene il pellet spipettando e vortexando
  - centrifugare a 21000xg per 10 minuti a 4°C
  - trasferire il surnatante (contenete le proteine dai corpi di inclusione) in una eppendorf da 1,5ml (**Pellet**)

<b>Buffer W</b>
Tris-HCl 100mM (pH8)
NaCl 150mM
EDTA 1mM

<b>Pellet Buffer (8M Urea)</b>
Tris-HCl 50mM (pH8)
Urea 8M

## Allegato 2

### Protocolli di Purificazione della proteina con Tag di istidine (Condizioni ibride, denaturanti e native)

#### Buffer utilizzati per le purificazioni su colonna

- Denaturing Binding Buffer
  - 8 M Urea
  - 20 mM Sodio Fosfato pH 7.8
  - 500 mM NaCl
- 5X Native Purification Buffer
  - 2.5 M NaCl
  - 250 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8.0
- 1X Native Purification Buffer
  - 80 ml di acqua MilliQ
  - 20 ml di 5X Native Purification Buffer, pH 8.0
- Denaturing Wash Buffer
  - 8 M Urea
  - 20 mM di Sodio Fosfato, pH 6.0 o pH 5.3
  - 500 mM NaCl
- Native Wash Buffer
  - 1X Native Purification Buffer
  - 20 mM imidazolo, pH 6.0
- Denaturing Elution Buffer
  - 8 M Urea
  - 20 mM Sodio Fosfato, pH 4.0
  - 500 mM NaCl
- Native Elution Buffer
  - 1X Native Purification Buffer
  - 250 mM imidazolo, pH 6.0

#### **Preparazione della Colonna Ni-IDA per la purificazione in condizioni ibride e denaturanti**

1. Risospingere la resina di Ni-IDA-Agarosio invertendo e picchiettando delicatamente la bottiglia
2. Pipettare 2ml di resina nella Colonna da 10 ml fornita con il kit , far sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (1 min a 800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante.

3. Aggiungere 6 ml di acqua mQ e risospendere la resina invertendo la colonna delicatamente più volte
4. Far sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (1 min a 800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante.
5. Aggiungere 6 ml of Denaturing Binding Buffer e risospendere la resina invertendo delicatamente la colonna
6. Far sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (1 min a 800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante.
7. Ripetere gli step 5-6

### **Preparazione della Colonna Ni-IDA per la purificazione in condizioni native**

1. Risospendere la resina di Ni-IDA-Agarosio invertendo e picchiando delicatamente la bottiglia
2. Pipettare 2ml di resina nella Colonna da 10 ml fornita con il kit far sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (1 min a 800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante.
3. Aggiungere 6 ml di acqua mQ e risospendere la resina invertendo la colonna delicatamente più volte
4. Far sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (1 min a 800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante.
5. Aggiungere 6 ml di Native Binding Buffer e risospendere la resina invertendo delicatamente la colonna
6. Far sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (1 min a 800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante.
7. Ripetere gli step 5-6

### **Purificazione in condizioni ibride**

Per la purificazione in condizione ibride vengono utilizzati inizialmente il Denaturing buffer, la colonna preparata in condizioni denaturanti e il lisato cellulare ottenuto in condizioni denaturanti (Urea 8M). La proteina viene successivamente eluita usando in Native Buffer.

Procedimento:

1. Aggiungere 8 ml di lisato alla colonna
2. Al fine di favorire il legame della proteina ricombinante alla colonna incubare a temperatura ambiente in leggera agitazione per 15-30min. in modo che la resina sia risospesa nel lisato. Lasciar sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (800 x g) e aspirare delicatamente il surnatante.

3. Lavare la colonna con 4 ml di Denaturing Binding Buffer risospesando la resina e invertendo la colonna per 2 min. Lasciar sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante. Conservare il surnatante a 4°C per l'analisi in SDS-PAGE. Ripetere una volta il punto 3.
4. Lavare la Colonna con 4ml di Denaturing Wash Buffer (pH 6.0) risospesando la resina e invertendo la colonna per 2 min. Lasciar sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante. Conservare il surnatante a 4°C per l'analisi in SDS-PAGE. Ripetere una volta il punto 4.
5. Lavare la Colonna con 8ml di Native Wash Buffer (pH 6.0) risospesando la resina e invertendo la colonna per 2 min. Lasciar sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante. Conservare il surnatante a 4°C per l'analisi in SDS-PAGE. Ripetere questo step tre volte per un totale di 4 lavaggi in Native Wash Buffer.
6. Posizionare la colonna in posizione verticale, ed eluire la proteina con 8–12 ml Native Elution Buffer raccogliendo frazioni da 1 ml da analizzare in SDS-PAGE.

### **Purificazione in condizioni Denaturanti**

Per la purificazione in condizione ibride vengono utilizzati la colonna preparata in condizioni denaturanti e il lisato cellulare ottenuto in condizioni denaturanti (Urea 8M). La proteina viene eluita sempre in condizioni denaturanti.

Procedimento:

1. Aggiungere 8 ml di lisato alla colonna
2. Al fine di favorire il legame della proteina ricombinante alla colonna incubare a temperatura ambiente in leggera agitazione per 15-30min. in modo che la resina sia risospesa nel lisato. Lasciar sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (800 x g) e aspirare delicatamente il surnatante.
3. Lavare la colonna con 4 ml di Denaturing Binding Buffer risospesando la resina e invertendo la colonna per 2 min. Lasciar sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante. Conservare il surnatante a 4°C per l'analisi in SDS-PAGE. Ripetere una volta il punto 3.
4. Lavare la Colonna con 4 ml Denaturing Wash Buffer 1 (pH 6.0) risospesando la resina e invertendo la colonna per 2 min. Lasciar sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità(800 x g) e aspirare delicatamente il surnatante. Conservare il surnatante a 4°C per l'analisi in SDS-PAGE. Ripetere il lavaggio una seconda volta.

5. Lavare la Colonna con 4 ml Denaturing Wash Buffer 2 (pH 5.3) risospesando la resina e invertendo la colonna per 2 min. Lasciar sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (800 x g) e aspirare delicatamente il surnatante. Conservare il surnatante a 4°C per l'analisi in SDS-PAGE. Ripetere il lavaggio una seconda volta.
6. Posizionare la colonna in posizione verticale, ed eluire la proteina con 5 ml Denaturing Elution Buffer raccogliendo frazioni da 1 ml da analizzare in SDS-PAGE.

### **Purificazione in condizioni Native**

Per la purificazione in condizione native vengono utilizzati la colonna preparata in condizioni native e il lisato cellulare ottenuto in condizioni native. La proteina viene eluita in condizioni native.

Procedimento:

1. Aggiungere 8 ml di lisato alla colonna
2. Al fine di favorire il legame della proteina ricombinante alla colonna incubare a temperatura ambiente in leggera agitazione per 3-60min. mantenendo la resina risospesa nel lisato.
3. Lasciar sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (800 x g) e aspirare delicatamente il surnatante. Conservare il surnatante a 4°C per l'analisi in SDS-PAGE.
4. Lavare la colonna con 8ml di Native Wash Buffer. Lasciar sedimentare la resina centrifugando a bassa velocità (800 xg) e aspirare delicatamente il surnatante. Conservare il surnatante a 4°C per l'analisi in SDS-PAGE
5. Ripetere lo step 4 altre tre volte.
6. Posizionare la colonna in posizione verticale, ed eluire la proteina con 8-12 ml di Native Elution Buffer raccogliendo frazioni da 1 ml da analizzare in SDS-PAGE.

## Allegato 3

### **Protocollo per la trasfezione con Amaxa cell line nucleofector kit V**

#### 1. Prima della Nucleofezione

- Coltivare le cellule in terreno completo (RPMI 1640, 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 1% Pen-Strep, 10 µg/mL blasticidina) e passarle 2/3 volte alla settimana mantenendo la coltura tra  $0.5 - 1.5 \times 10^6$  cellule/ml.
- 2-3 giorni prima della nucleofezione splittare le cellule con un rapporto 1:5 – 1:6

#### 2. Nucleofezione

- Per ogni nucleofezione utilizzare:
  - \*  $1 \times 10^6$  cellule
  - \* 2 µg di DNA plasmidico (in 1-5 µl H<sub>2</sub>O o TE) o 2 µg pmaxGFP<sup>®</sup> Vector
  - \* 100 µl di Cell Line Nucleofector<sup>®</sup> Solution V
- preparare una piastra da 12 pozzetti mettendo nei pozzetti necessari 1ml di terreno di coltura completo ed incubare a 37°C-5% CO<sub>2</sub>.
- contare le cellule e determinare la densità cellulare.
- centrifugare il numero di cellule richiesto ( $1 \times 10^6$  per campione) a 90xg per 10 min. a T<sub>amb</sub> e rimuovere il surnatante
- risospendere delicatamente il pellet cellulare nella Nucleofector<sup>®</sup> Solution V a T<sub>amb</sub> (100 µl per campione)

*Nota:* Evitare di lasciare le cellule in Nucleofector<sup>®</sup> Solution per un periodo superiore ai 15min in quanto questo potrebbe ridurre la vitalità cellulare l'efficienza di trasfezione.

- aggiungere ai 100 µl di sospensione cellulare 2 µg DNA plasmidico o di pmaxGFP<sup>®</sup> Vector
- trasferire la sospensione di cellule/DNA nella cuvetta per nucleofezione, assicurandosi che non ci siano bolle d'aria, e chiudere con il tappo
- selezionare il programma: Nucleofector<sup>®</sup> Program X-001
- inserire la cuvetta nell'apposito supporto del Nucleofector<sup>®</sup> ed avviare lo strumento
- finito il programma riprendere la cuvetta dal supporto e incubare il campione a T<sub>amb</sub> per 10 min
- aggiungere ~500 µl di terreno completo alla cuvetta e trasferire delicatamente il campione nella piastra a 12 pozzetti preparata precedentemente (il volume finale deve essere 1,5 ml per pozzetto), utilizzando la pipetta fornita. Evitare di aspirare il campione più volte per non danneggiare le cellule.
- incubare le cellule a 37°C-5% CO<sub>2</sub> e procedere con l'esperimento.

## *Ringraziamenti*



*A Silvia...*

*...un ringraziamento speciale.*

*Ti ringrazio per essermi stata sempre vicina,  
grazie a te ho acquisito molte nozioni che mi hanno consentito di  
portare a compimento questo progetto di dottorato.*

*Da te ho imparato che in questo lavoro sono fondamentali  
passione e determinazione ma anche un pizzico di ironia.*

*Per questo ti ringrazio per tutti i bei momenti lavorativi passati  
insieme sorridendo sempre, nonostante le difficoltà incontrate.*

*Come ti ho sempre detto sei una persona davvero unica e speciale  
e mi ritengo fortunata ad averti accanto  
sia in veste di collega ma soprattutto come amica.*

*Non esagero nel dire che, per raggiungere questo importante  
obbiettivo, senza di te non ce l'avrei mai fatta. Spero un giorno di  
poterti ricambiare in qualche modo.*

*Grazie anche per l'immenso aiuto ricevuto nella stesura della tesi  
e di tutto il tempo che mi hai dedicato.*

*Grazie di tutto cuore*

*Debora*

*Ringrazio Alberto per avermi dato l'opportunità di svolgere questo progetto di dottorato presso il suo laboratorio, per avermi sempre sostenuta ed incoraggiata ad andare avanti nonostante le molteplici difficoltà che ogni giorno si presentavano. Lo ingrazio inoltre per avermi insegnato che nella vita "sia più produttivo considerare il bicchiere solo mezzo pieno".*

*Ringrazio anche tutte le ragazze che hanno fatto parte del gruppo di ricerca, Emanuela, Valentina, Roberta e Carolina per la loro disponibilità ed il loro sostegno.*

*Un ringraziamento speciale va a tutta la mia famiglia;*

*Ringrazio Isa e Marino che si sono presi cura di Alessio con amore. Il loro supporto è stato fondamentale nella fase conclusiva del progetto che ha richiesto grande dispendio di tempo ed energie.*

*Ringrazio Alessio per tutti i sorrisi che mi ha regalato anche nei momenti di maggior difficoltà; seppur piccolo è riuscito a comprendere ed adattarsi alla situazione dimostrando di essere un grande ometto.*

*Ringrazio Mauro che mi ha sempre sostenuta credendo in me e nelle mie capacità, incoraggiandomi a lottare sempre al fine di raggiungere i miei obiettivi.*

*Ringrazio la mia mamma per la sua vicinanza e le sue parole di conforto sempre utili e preziose.*

*Ringrazio anche il mio papà, le bisnonne e tutti i miei cari per il sostegno dimostrato in questi anni di dottorato.*

*Debora*