

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

**Dottorato di Ricerca in Biologia Funzionale dei Sistemi Cellulari e  
Molecolari**

**Ciclo XXI**

**Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO19**

**INTERAZIONI TRA GLICOPROTEINE CHE  
MEDIANO LA PENETRAZIONE DEL VIRUS  
HERPES SIMPLEX NELLA CELLULA E DISEGNO  
RAZIONALE DI PEPTIDI INIBITORI**

Presentata da: **Dott. Michele Amasio**

**Coordinatore del Dottorato**  
Chiar.mo  
Prof. Vincenzo Scarlato

**Relatore**  
Chiar.ma  
Prof.ssa Gabriella Campadelli-  
Fiume

---

---

Esame finale anno 2009

## Capitolo I

### Introduzione

1.1	La famiglia <i>Herpesviridae</i>	4
1.2	Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1)	7
1.2.1	Struttura del virione	9
1.2.2	Organizzazione strutturale e funzionale del genoma	9
1.2.3	Ciclo replicativo e geni virali coinvolti	11
1.2.4	Assemblaggio dei capsidi ed incapsidamento del DNA virale	16
1.2.5	Egresso	17
1.2.6	Alterazioni strutturali e metaboliche nella cellula infettata	19
1.2.7	Latenza	19
1.3	Attacco ed ingresso di HSV-1 nella cellula	21
1.3.1	La fusione virale: principi di base	21
1.3.2	Attacco di HSV-1 sulla superficie della cellula ospite e glicoproteina C	25
1.3.3	Il riconoscimento del recettore cellulare da parte di gD	26
1.3.4	Struttura cristallina di gD e siti di legame ai recettori cellulari	28
1.3.5	Il dominio pro-fusogenico di gD: l'innescò della fusione	30
1.3.6	I recettori che mediano l'ingresso di HSV nella cellula	32
1.3.6.1	HVEM (Herpes Virus Entry Mediator)	32
1.3.6.2	La famiglia delle nectine	33
1.3.6.3	Eparan solfato modificato	34
1.3.7	L'esecuzione della fusione: gB	35
1.3.8	L'esecuzione della fusione: gH/gL	39
1.3.9	gK e UL20	41
1.4	Farmaci antiherpetici e peptidi antivirali	41
1.4.1	Farmaci antiherpetici	42
1.4.2	Peptidi: farmaci ed antivirali	43

## **Capitolo II**

Rilevamento e caratterizzazione del complesso formato dal quartetto di glicoproteine gD, gB, gH e gL

2.1	Obiettivo	48
2.2	Materiali e metodi	50
2.3	Risultati	59
2.4	Discussione	77

## **Capitolo III**

Disegno razionale e ottimizzazione di peptidi inibenti l'infezione di HSV-1 *in vitro*

3.1	Obiettivo	82
3.2	Materiali e Metodi	83
3.3	Risultati	85
3.4	Discussione	101

<b>Bibliografia</b>	107
---------------------	-----

# **Capitolo I**

## **Introduzione**

## 1.1 La famiglia *Herpesviridae*

Gli Herpesvirus sono molto diffusi in natura e colonizzano la maggior parte delle specie animali, dai pesci ai mammiferi, per un totale di almeno 130 specie differenti. Dall'uomo sono stati isolati nove Herpesvirus: Herpes simplex 1 (HSV-1), Herpes simplex 2 (HSV-2), human citomegalovirus (HCMV), varicella zoster virus (VZV), Epstein-Barr Virus (EBV), Human Herpesvirus 6A, 6B, 7 e 8 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, HHV-8).

Dal punto di vista chimico-fisico, l'appartenenza alla famiglia degli *Herpesviridae* viene stabilita in base a specifiche caratteristiche del virione. Esso deve possedere un *core* contenente DNA lineare a doppio filamento, un capsido dotato di geometria icosadeltaedrica di circa 100-110 nm di diametro contenente 162 capsomeri prismatici e provvisto di un foro lungo l'asse principale, un materiale amorfo di natura proteica che ricopre il capsido denominato tegumento, e, infine, un'*envelope* recante glicoproteine di membrana.

Da un punto di vista biologico i membri della famiglia *Herpesviridae* sono accomunati da quattro caratteristiche:

- codificano per un vasto insieme di enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici (e.g. timidina chinasi, timidilato sintetasi, deossiuridinatrifosfatasi o dUTPasi, ribonucleotide reductasi) e nella processazione delle proteine (e.g. proteina chinasi (US3, UL13) e serina proteasi (UL26p));
- la sintesi del DNA virale e l'assemblaggio del nucleocapsido della progenie avvengono nel nucleo, mentre l'*envelope* viene ricostituita durante l'egresso tramite il passaggio attraverso le membrane cellulari, secondo modalità che hanno dato luogo a controversie. È infatti incerto se il virione vada incontro a maturazione dopo un singolo *envelopment*, in seguito a un *de-envelopment* nel passaggio tra la membrana nucleare esterna e l'apparato del Golgi, o passando attraverso i pori nucleari deformati;
- la produzione di progenie infettante è inevitabilmente accompagnata dalla distruzione per lisi della cellula infettata;
- gli Herpesvirus esaminati sono in grado di dar luogo a latenza all'interno dell'ospite animale. Il loro genoma è presente in forma circolarizzata ed episomale, è in grado di replicarsi ed esprime solo una piccola quota di geni virali. All'occorrenza il virus può riattivarsi, manifestandosi nelle sue forme cliniche.

All'interno della famiglia sono comunque numerose le differenze riguardo a diverse caratteristiche biologiche quali la specificità d'ospite, l'efficienza del ciclo replicativo durante l'infezione produttiva e la variabilità del tipo cellulare in cui possono dar luogo a latenza.

Queste caratteristiche hanno reso possibile un'ulteriore classificazione degli *Herpesviridae* nelle sottofamiglie *Alfaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae*.

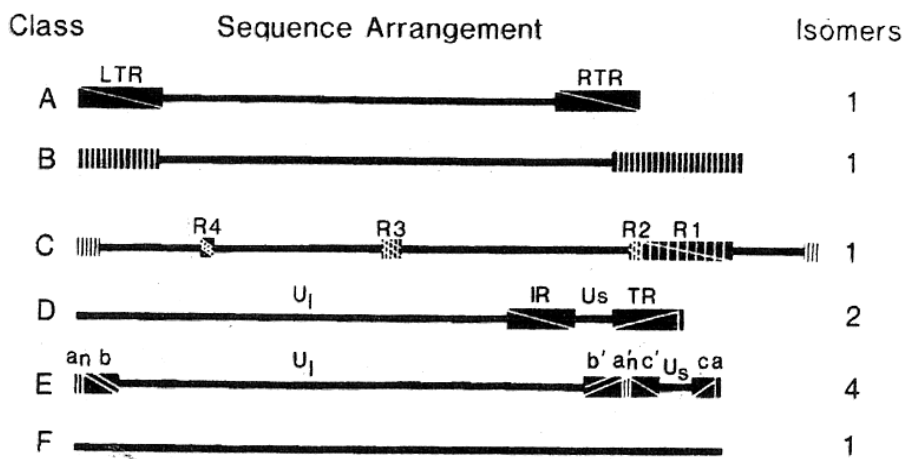
I membri della sottofamiglia degli *Alfaherpesvirinae* si caratterizzano per un ampio spettro d'ospite, per un ciclo replicativo relativamente breve, per una rapida diffusione in coltura, per un'efficiente lisi della cellula ospite e infine per la capacità di latentizzare principalmente ma non esclusivamente nei gangli sensitivi. Specie importanti dal punto di vista clinico nell'uomo sono HSV-1, HSV-2, agenti eziologici, rispettivamente, dell'herpes labiale e dell'herpes genitale e VZV, la cui infezione causa varicella e, in determinate condizioni, herpes zoster.

I membri della sottofamiglia dei *Betaherpesvirinae* mostrano un ristretto spettro d'ospite, un lungo ciclo replicativo ed una lenta progressione in coltura. Le cellule infettate danno luogo a soventi fenomeni di citomegalia, in cui si osserva un considerevole aumento delle dimensioni cellulari. Il virus può persistere in forma latente in cellule linfoidi, nelle ghiandole secretorie e nei reni. Le specie con tropismo umano appartenenti ai *Betaherpesvirinae* sono HCMV, causa di infezioni asintomatiche, e HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, individuati nei linfociti T.

I membri della sottofamiglia dei *Gammaherpesvirinae* sono caratterizzati da uno spettro d'ospite particolarmente ristretto, dando luogo, in vitro, ad infezioni quasi esclusivamente all'interno di cellule linfoblastoidi e a volte in cellule epitelioidi e in fibroblasti. In vivo tendono a infettare linfociti B e T, all'interno dei quali spesso latentizzano. Interessanti dal punto di vista clinico sono EBV, agente eziologico della mononucleosi, e HHV-8, associato al linfoma di Burkitt.

Il genoma degli Herpesvirus consiste in una singola molecola lineare di DNA a doppio filamento che, non appena rilasciata dal capsido nel nucleoplasma, è in grado di circularizzare, grazie a corte sequenze di basi che si ripetono ai suoi estremi.

Le dimensioni variano da 120 kbp (e.g. VZV), a 250 kbp (e.g. HCMV), ma la presenza di sequenze terminali lunghe fino a 100 bp che vengono ripetute può far aumentare il genoma anche di 10 kbp. Le diverse posizioni di queste sequenze presenti in forma ripetuta e invertita all'interno del genoma hanno portato ad una classificazione che prevede sei classi, nominate dalla A alla F (Fig 1.1).



**Fig 1.1.** Diagramma schematico delle sequenze delle sei classi di genomi dei virus appartenenti alla famiglia *Herpesviridae*. Herpes Simplex 1 appartiene alla classe E e le ripetizioni invertite *ab* e *ca* alle estremità dividono il genoma in due sequenze uniche, U<sub>L</sub> (*long unique*) e U<sub>S</sub> (*short unique*) (1).

Per quanto riguarda la classe E, cui appartengono HSV e HCMV, la posizione delle sequenze ripetute divide il genoma in due sequenze uniche (*Unique*), che differiscono tra loro in lunghezza, e vengono definite U<sub>L</sub> (*long*) e U<sub>S</sub> (*short*). Esse sono in grado di invertirsi l'una rispetto all'altra, o entrambe contemporaneamente, dando luogo a quattro isomeri presenti nella popolazione virale in uguali quantità.

Gli Herpesvirus codificano per un numero di geni variabile da 70 a 200. Sono presenti anche geni sovrapposti in cui è presente un'inizio di trascrizione interno. Si possono trovare anche ORF (*open reading frame*) antisenso, mentre sono rare le proteine che derivano da mRNA che hanno subito splicing. Inoltre vengono anche espressi RNA non codificanti, i cui casi più rappresentativi riguardano i trascritti coinvolti nel controllo della latenza.

## 1.2 Herpes Simplex Virus 1 (HSV-1)

I virus Herpes Simplex, appartenenti agli *Alfaherpesvirinae*, sono stati i primi herpesvirus umani ad essere scoperti, e sono tra i più studiati e i meglio caratterizzati.

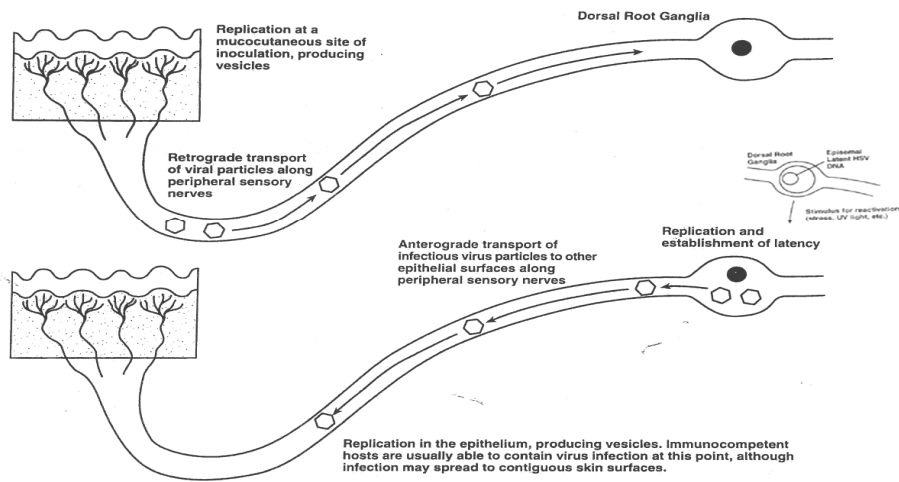
Questa grande attenzione è dovuta alle loro caratteristiche biologiche, come la capacità di causare molte e diverse infezioni, di rimanere latenti nell'ospite per periodi lunghissimi e di essere in grado, all'occorrenza, di riattivarsi. Inoltre possono essere impiegati come validi modelli di studio per la traslocazione delle proteine, della struttura delle membrane, delle connessioni sinaptiche (attraverso le quali sono in grado di migrare), della regolazione dell'espressione genica. Una particolare attenzione viene data al loro impiego nella terapia genica: come vettore virale Herpes Simplex è interessante per la possibilità di essere reindirizzato tramite la progettazione di costrutti sul suo *envelope*, di avere numerose regioni geniche che possono essere delete per poi introdurre geni terapeutici anche di notevoli dimensioni, e di latentizzare nelle cellule nervose, concentrando lo spettro d'azione su patologie a carico del sistema nervoso centrale.

Le infezioni da HSV-1 sono molto comuni nella popolazione umana, e le sue manifestazioni cliniche si hanno a livello della bocca, del viso, degli occhi, dei genitali come lesioni mucocutanee. In ospiti immunocompromessi si possono avere anche cheratocongiuntiviti ed encefaliti o herpes diffusi.

Le lesioni herpetiche sono caratterizzate da vescicole contenenti grandi quantità di virus in attiva proliferazione, che regrediscono spontaneamente (La Placa). Al termine di questa fase acuta il virus è in grado di entrare nelle terminazioni nervose sensitive che innervano l'epitelio mucoso infettato e di risalire in direzione centripeta lungo le fibre nervose fino a raggiungere i gangli nervosi sensitivi più prossimi, cioè quelli del trigemino. In questi distretti il virus dà luogo al fenomeno della latenza (Fig 1.2).

In seguito a specifici stimoli (raggi UV, stress, variazioni dei livelli ormonali, etc.), secondo meccanismi non del tutto compresi, HSV può riattivarsi, iniziando un migrazione anterograda verso il sito primario di entrata, manifestandosi con lesioni mucocutanee ricorrenti. Si viene comunque a creare una sorta di equilibrio dinamico tra la riattivazione del virus e il sistema immunitario dell'ospite, che in individui sani porta a riattivazioni rare e per lo più subcliniche.





**Fig. 1.2.** Rappresentazione dell'infezione di HSV nei neuroni sensitivi. Durante l'infezione primaria il virus si replica nel sito di entrata. In seguito infettano le estremità dei neuroni sensitivi che innervano i tessuti e viene trasportato in direzione retrograda a gangli dorsali, dove instaura la latenza. In seguito a diversi stimoli il virus si riattiva e si replica. La progenie viene trasportata in direzione anterograda al sito di entrata primario (1).

### 1.2.1 Struttura del virione

Il virione di HSV-1 possiede la tipica struttura dei virus erpetici precedentemente descritta. Sono state identificate più di trenta proteine strutturali, denominate polipeptidi virionici (VP) e numerate. Sulla superficie dell'*envelope* sono presenti almeno dodici proteine di cui circa dieci sono glicosilate (1). Le glicoproteine, con i rispettivi geni che le codificano, sono gB (UL27), gC (UL44), gD (US6), gE (US8), gG (US4), gH (UL22), gI (US7), gK (UL53), gL (UL1) e gM (UL11). Non è ancora stata dimostrata la presenza di gJ (US5) e gN (UL 49.5). Tra le proteine di membrana glicosilate gB, gD, gH e gL sono indispensabili per la replicazione del virus in cellule in coltura.

Sull'*envelope* sono anche presenti alcune proteine di membrana non glicosilate: UL20, UL24, UL34, UL45 e UL43. Quest'ultima è ritenuta localizzarsi in membrana in virtù dei numerosi segmenti transmembrana identificati nella sequenza primaria, ma i dati sperimentali non ne hanno ancora dato conferma. Anzi, in un recente lavoro condotto analizzando con lo spettrometro di massa virioni purificati, è stata notata l'assenza nelle particelle virali proprio della proteina UL43, ed anche, inaspettatamente di gJ, gK e gN. Sono invece state trovate decine di molecole cellulari, che vengono incorporate nel virione al momento dell'egresso, o vi si associano durante il ciclo replicativo (2).

Lo spazio presente tra l'*envelope* e la superficie del capsido è denominato tegumento (1), e contiene le rimanenti proteine virioniche. Tra queste le più interessanti per i ruoli che ricoprono durante il ciclo replicativo sono l' $\alpha$ -*trans-inducing-factor* ( $\alpha$ -TIF o VP-16), la proteina *virion host shutoff* (*vhs*), il prodotto del gene US11, e la VP1-2, che si associa al complesso che lega la sequenza terminale *a* del genoma.

### 1.2.2 Organizzazione strutturale e funzionale del genoma

Il genoma di HSV-1 è composto da circa 150 kbp ed ha un contenuto di G+C di circa il 68%. Come tutti gli altri Herpesvirus il DNA è bicatenario e lineare, e quando si trova all'interno del capsido si compatta in forma di toroide, con le estremità molto vicine tra loro. Non appena viene rilasciato nel nucleo della cellula infetta, circolarizza rapidamente, senza che sia stata avviata alcuna sintesi proteica.

Il genoma di HSV-1 consiste, come già accennato, di due componenti legate covalentemente, denominate L (*long*), e S (*short*). Esse sono sequenze uniche

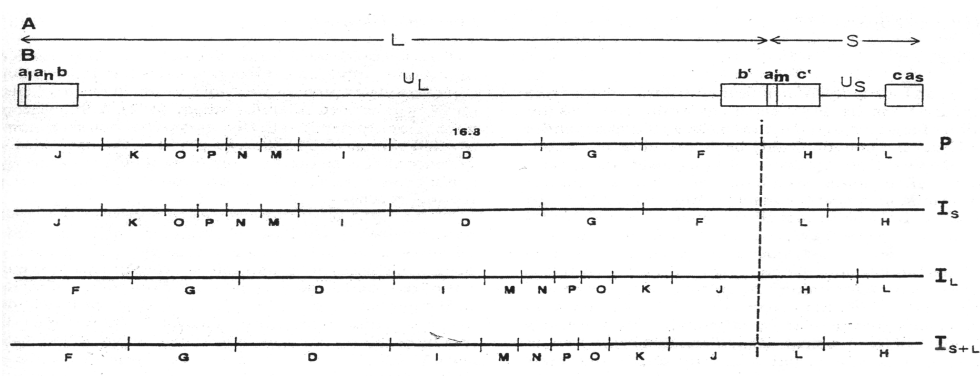
fiancheggiate da ripetizioni invertite, denominate  $ab$  e  $b'a'$  per la componente L, e  $a'c'$  e  $ca$  per la componente S. Il numero delle ripetizioni delle sequenze  $a$  può essere variabile, quindi il genoma di HSV-1 si può così schematizzare:

$$a_L a_n b - U_L - b' a_m c' - U_S - c a_s$$

La dimensione della sequenza  $a$ , e quindi il suo numero di ripetizioni, varia molto tra i vari ceppi di HSV-1, ma la sua struttura di base è altamente conservata.

Come già accennato precedentemente, le due regioni Unique ( $U_L$  e  $U_S$ ) si possono invertire generando quattro isomeri lineari designati come P (*Prototype*),  $I_L$  (inversione della componente L),  $I_S$  (inversione delle componenti S) e  $I_{L+S}$  (inversione sia della componente L che della componente S). I quattro isomeri sono presenti nella popolazione in quantità paragonabili (Fig 1.3).

Sono frequenti anche eventi di ricombinazione omologa tra le sequenze ripetute terminali e interne, in cui si possono avere mutazioni che rendono il genoma molto variabile. È stato inoltre osservato che mutanti sprovvisti delle sequenze ripetute interne, pur crescendo in coltura, rimangono “congelati” in un determinato riarrangiamento delle componenti L e S, sottolineando l'importanza delle sequenze  $a$  nella variabilità genomica, ma non nella proliferazione virale (3).



**Fig. 1.3.** (A) Rappresentazione schematica della sequenza del genoma di HSV. (B) Rappresentazione del genoma di HSV-1 con evidenziate le ripetizioni invertite. Mappa di restrizione dell'endonucleasi Hind III e rappresentazione dei quattro isomeri generati dall'inversione delle sequenze *unique*.

Il genoma di HSV-1 contiene circa 90 unità trascrizionali uniche, di cui almeno 84 codificano per proteine. Di queste, 65 ORFs mappano nella regione  $U_L$ , 14 nella  $U_S$ , quattro in ciascuna delle sequenze fiancheggianti  $U_L$  ( $\alpha 0$ ,  $\gamma_{134.5}$ , ORF P, ORF O) e una

nelle sequenze fiancheggianti US ( $\alpha 4$ ). I geni che mappano nelle sequenze ripetute sono quindi presenti in due copie.

I geni di HSV-1 sono suddivisi in tre classi in base alla loro cinetica di espressione dopo la fuoriuscita del DNA virale dal capsido: i geni precoci immediati (*immediate early genes*) detti anche geni  $\alpha$ , i geni precoci (*early genes*) o geni  $\beta$ , e i geni tardivi (*late genes*) o geni  $\gamma$ . I geni  $\alpha$  mappano vicino agli estremi delle sequenze uniche L e S, eccezion fatta per  $\alpha 0$  e  $\alpha 4$  che si situano all'interno delle ripetizioni invertite delle componenti L e S, rispettivamente; i geni  $\beta$  e  $\gamma$  sono sparsi nelle sequenze L e S, tranne  $\gamma 34.5$  e ORF P che sono situati nelle sequenze fiancheggianti la componente L tra l'estremità e il gene  $\alpha 0$ .

Ciascun trascritto virale codifica per una singola proteina, con poche eccezioni (per esempio le proteine ORF P e ORF O sono codificate da un singolo trascritto; i geni UL26 e UL26.5 sono parzialmente sovrapposti nella regione 3' e UL26 codifica per una proteasi auto-proteolitica, che tagliando sulla sua stessa sequenza genera le proteine capsidiche VP21 e VP24 (4). Similmente, vi sono mRNA la cui trascrizione ha inizio nel mezzo di una ORF e codificano per la parte terminale della proteina, come ICP22 e US1.5 di HSV-1, dove la seconda proteina altro non è che la parte C-terminale della prima. Alcune ORF sono antisenso l'una rispetto all'altra (e.g. ICP34.5 e ORF P, gB e UL 27.5), e vi sono rari trascritti che sono sottoposti a splicing. Peculiarità di HSV è la capacità di trascrivere RNA da ambedue i filamenti di DNA, spiegando così la presenza dei geni antisenso (5, 6).

Alcuni trascritti non sembrano dare nessun prodotto proteico e la loro precisa funzione nell'infezione produttiva non è ben definita; esempi sono i trascritti associati alla latenza (LATs) e l'RNA OriS che viene espresso tardivamente durante l'infezione.

### **1.2.3 Ciclo replicativo e geni virali coinvolti**

Dopo l'iniziale attacco del virus sulla superficie della cellula, l'*envelope* si fonde con la membrana plasmatica tramite un meccanismo pH-indipendente (7). In alternativa il virus può entrare per endocitosi (8): il virione intatto, ancora provvisto di *envelope*, viene internalizzato in un endosoma. Da qui è in grado di fondere la membrana vescicolare e di fare ingresso nel citoplasma infettando l'ospite.

I meccanismi di attacco, legame, fusione ed entrata verranno trattati approfonditamente nelle sezioni successive, vista la particolare importanza che ricoprono all'interno di questo studio.

Una volta nel citoplasma, vengono rilasciate alcune proteine del tegumento, come la proteina *vhs* (*virion host shut-off*) che è in grado di inibire la sintesi proteica dell'ospite bloccando la maturazione degli mRNA, virali e cellulari, indistintamente. Essendo gli mRNA virali molto più abbondanti di quelli cellulari, l'azione di *vhs* porta a una polarizzazione del macchinario metabolico cellulare verso un'espressione genica virale.

Il capsido, associato ad alcune proteine del tegumento, è trasportato lungo la rete microtubulare ai pori nucleari dove il DNA in esso contenuto viene riversato all'interno del nucleo, si localizza a livello dei ND10 (*nuclear domain 10*) cellulari e circolarizza immediatamente in assenza di sintesi proteica virale.

Ha quindi inizio la trascrizione dei geni immediati-precoci, che viene transattivata da VP16, un'altra proteina tegumentaria, altresì chiamata, in virtù della sua funzione,  $\alpha$ -TIF ( *$\alpha$  transactivating factor*). Essa agisce in concerto con proteine cellulari, quali HCF (*host cell factor*), che ha la funzione di traslocare VP16 nel nucleo; qui il complesso VP16-HCF lega il fattore nucleare Oct-1, per formare l'attivatore trascrizionale, in grado di legare il DNA virale. Questi non sono gli unici regolatori trascrizionali dei geni  $\alpha$ , infatti nei loro promotori sono stati identificati siti di legame per altri fattori cellulari (per esempio Sp1).

La trascrizione del genoma virale si ha ad opera della RNA polimerasi II (o B) della cellula ospite (9), ma sotto un costante controllo da parte di fattori virali. Così la sintesi dei prodotti genici del virus è strettamente regolata a cascata secondo una sequenza temporale.

Andiamo ad analizzare le principali funzioni dei geni  $\alpha$ :

ICP0 è un transattivatore non specifico, in grado di legare numerose proteine cellulari e di indurre l'espressione dei geni erpetici. Nelle prime fasi dell'infezione esso si localizza all'interno del nucleo, ma nelle 7-9 ore successive viene ritrovato nel citoplasma, probabilmente per una traslocazione dipendente da prodotti virali tardivi. Durante la fase nucleare agisce disorganizzando la struttura dei ND10 e portando alla degradazione di altre proteine cellulari per azione di proteasi ubiquitina-specifiche.

Inoltre è in grado di inibire il silenziamento del DNA virale dissociando HDAC 1 e 2 (*Histone Deacetylase*) dal complesso CoREST/REST, che fisiologicamente inibisce l'espressione genica, specialmente in cellule neuronali (10). In cellule in attiva proliferazione causa la degradazione della proteina centromerica C, inibendo la transizione in metafase e anafase. Può influenzare il ciclo cellulare anche legando e stabilizzando la ciclina D3 e altre cicline e chinasi ciclina-dipendenti, con il risultato di promuovere la sintesi di DNA virale, delle proteine virali tardive e la sua stessa traslocazione al citoplasma.

In conclusione ICP0 è una proteina multifunzionale in grado di modificare le funzioni cellulari per promuovere l'espressione dei geni virali e determinare un'infezione produttiva.

ICP4 è in grado di legare il DNA, e sono presenti sequenze consenso per il suo legame su tutti i promotori dei geni virali, benchè sia dimostrata la sua capacità di legare anche sequenze non-consenso. Possiede un'azione sia di attivazione della trascrizione, sia di soppressione. Si è speculato che questa attività bivalente di ICP4 sia dovuta a sue diverse modificazioni post-trascrizionali e ai diversi siti di interazione con il DNA (1). Probabilmente ICP4 esplica la sua azione di soppressore quando interagisce con sequenze consenso in prossimità di un sito di inizio della trascrizione, ma può anche agire da attivatore nel momento in cui lega fattori di trascrizione e, forse, sequenze non consenso sul DNA.

ICP22 e US1.5, come già accennato precedentemente, sono i prodotti di due geni parzialmente sovrapposti, in cui la sequenza della regione C-terminale del primo corrisponde alla intera sequenza del secondo, e sono indispensabili per avere un'efficiente infezione. Sono importanti per la regolazione sia dei geni precoci che per quelli tardivi, in particolare ICP22 è richiesta per un'espressione ottimale di ICP0 e alcuni geni  $\gamma$ .

ICP27 è una proteina multifunzionale ed essenziale che regola l'espressione di molti geni post- $\alpha$ , inibisce lo *splicing* dei trascritti virali e inibisce la trascrizione di diversi geni cellulari. Possiede una sequenza di localizzazione nucleare, infatti è richiesta nel nucleo per la replicazione del DNA virale e la regolazione dell'espressione dei geni tardivi e di alcuni geni  $\beta$ , in particolare di quelli codificanti per le proteine non

abbondanti coinvolte nella replicazione virale. ICP27 è anche provvisto di una sequenza *leucine-rich* con funzione di segnale di esporto citoplasmatico e di un box RGG (arginina-glicina-glicina) interno in grado di legare l'RNA. Queste strutture consentono il trasporto degli mRNA virali non *spliced* nel citoplasma dove maturano e vengono tradotti.

I prodotti proteici possono poi andare incontro a numerose modifiche post-traduzionali, quali tagli, glicosilazioni, miristilazioni, nucleotidilazioni, ADP-ribosilazioni.

I prodotti dei geni  $\alpha$  hanno un ruolo nella regolazione dell'espressione genica dei geni virali; fa eccezione ICP47, che entra in gioco nell'evasione della risposta immunitaria, andando ad inibire le proteine cellulari TAP1 e TAP2 (*Transporters 1 & 2 associated with antigen presentation*), responsabili della processazione dell'antigene e della sua esposizione sul'MHC (*Major Histocompatibility Complex*) di classe I.

L'espressione della classe successiva di geni, i geni precoci o  $\beta$ , richiede almeno la presenza di ICP4 ed ha inizio dalle 4 alle 8 ore successive all'infezione. Questi geni codificano per proteine implicate nella replicazione del DNA virale e nel metabolismo dei nucleotidi, oltre a stimolare l'espressione dei geni tardivi. I geni  $\beta$  possono essere suddivisi in due gruppi,  $\beta 1$  e  $\beta 2$ , in base ai loro tempi di espressione. I geni  $\beta 1$  sono espressi poco dopo o quasi contemporaneamente alla comparsa dei prodotti dei geni  $\alpha$ , i geni  $\beta 2$  con un maggiore ritardo. I prodotti genici di maggiore interesse del gruppo  $\beta$  sono coinvolti nella sintesi del DNA, per la quale sono necessarie sette proteine essenziali che agiscono in successione. La prima ad interagire con il DNA virale è la *Origin-Binding Protein*, codificata dal gene UL9, che, come dice il nome, si lega all'origine di replicazione in forma di omodimero. Il suo legame con il DNA crea una zona a singolo filamento in una regione di OriS ricca in AT. La creazione di una struttura a forcina rende possibile il legame di ICP8, o *Single-Stranded DNA Binding Protein*, codificata dal gene UL29. Essa possiede anche un'attività di destabilizzazione dell'elica che probabilmente porta ad un aumento della ricombinazione omologa dei filamenti, influenzando positivamente la variabilità genica del virus. È anche probabile che agisca da impalcatura nell'assemblaggio del virione e svolge un ruolo di controllo negativo sull'espressione dei geni immediati-precoci e precoci.

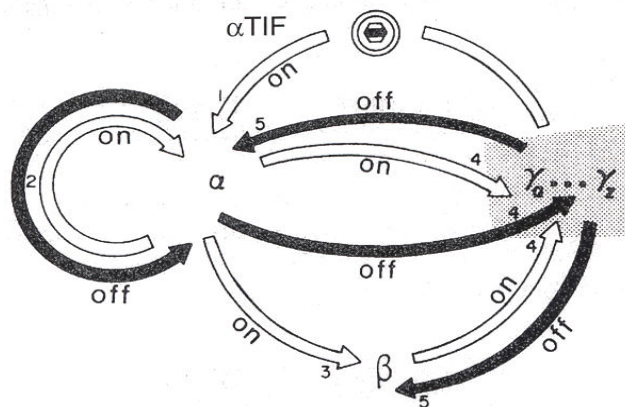
Una volta che la regione a singolo filamento è stabilizzata, viene reclutato il complesso eterotrimerico DNA elicasi-primasi, formato dai prodotti dei geni UL5, UL8 e UL52, che può svolgere brevi sequenze di oligonucleotidi appaiati e sintetizza una sequenza di 6-13 oligoribonucleotidi che consentono l'attacco della DNA polimerasi. Quest'ultima è un eterodimero formato dai prodotti dei geni UL30 e UL42. UL30 possiede attività polimerasica, in più è dotata di un'attività esonucleasica 3'-5', mentre UL42 conferisce all'oloenzima un'elevata processività.

A questo punto ha inizio la replicazione che procede in *theta-mode* origine-dipendente in siti intranucleari prossimi ai domini ND10, ma presto si converte in una replicazione in modalità *rolling circle* origine-indipendente con la formazione di lunghi concatameri in cui le diverse copie del genoma sono legate tra loro testa-coda. I concatameri si concentrano in regioni dette siti di replicazione e verranno successivamente clivati durante l'impacchettamento nel capsido in copie singole di genoma.

La produzione di DNA virale è il segnale che porta alla trascrizione dell'ultima classe di geni, i geni tardivi o  $\gamma$ . Anch'essi sono stati suddivisi in due gruppi in base ai tempi di espressione, nominate  $\gamma_1$ , o *early-late* e  $\gamma_2$  o *true-late*. Questa sotto-classificazione rispecchia come l'espressione di questi geni dipenda dall'inizio della sintesi di DNA virale, più marcata per i  $\gamma_2$ . I geni tardivi codificano principalmente per proteine strutturali, quali proteine del capsido (e.g. VP5, VP26, VP23), del tegumento (e.g. *vhs*, ICP1-2, VP16 o  $\alpha$ -TIF) e proteine che costituiscono l'*envelope* (e.g. gB, gD, gH, gL) (Fig1.4).

È interessante notare come andando avanti nelle classi dei geni di Herpes Simplex, dalla  $\alpha$  alla  $\gamma$ , si abbia una progressiva diminuzione della presenza di siti di legame per fattori di trascrizione e quindi della regolazione dell'espressione, mentre aumentano consistentemente i livelli di trascritto, per venire incontro al fabbisogno di proteine strutturali tipico delle fasi finali di un'infezione produttiva.



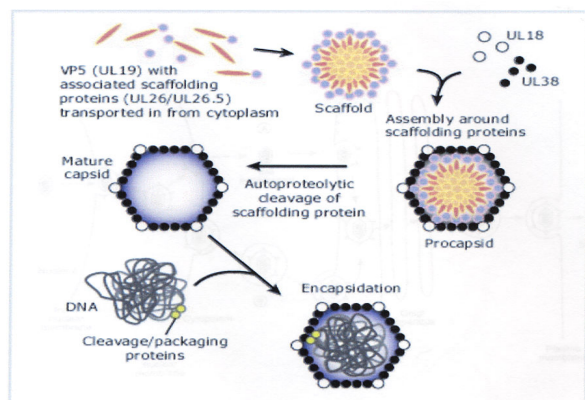


**Fig 1.4.** Rappresentazione schematica della regolazione dell'espressione genica di HSV. Le frecce bianche rappresentano la stimolazione dell'espressione genica, le frecce nere l'inibizione. (1) l'espressione dei geni  $\alpha$  è stimolata da  $\alpha$ -TIF, una proteina  $\gamma$  impacchettata nel virione. (2) le proteine  $\alpha$  bloccano la trascrizione dei geni  $\alpha$ . (3) Le proteine  $\alpha$  stimolano la trascrizione dei geni  $\beta$ . (4) Le proteine  $\alpha$  e  $\beta$  transattivano i geni  $\gamma$ . (5) Nelle fasi tardive dell'infezione le proteine  $\gamma$  bloccano l'espressione dei geni  $\alpha$  e  $\beta$ (1)..

#### 1.2.4 Assemblaggio dei capsidi ed incapsidamento del DNA virale

Il passaggio successivo consiste nell'assemblaggio dei capsidi (fig 1.5). Le prime fasi avvengono nel citoplasma, in cui VP5, la proteina maggiore del capside, VP26, l'estremità esterna degli esoni e VP23 trimerica si complessano con altre proteine, quali VP19C o pre-VP22a, in grado di indurne la traslocazione al nucleo, dove si completa l'assemblaggio.

Per un corretto assemblaggio dei costituenti del capside è indispensabile la presenza di proteine con funzione di impalcatura (*scaffold*). La più grande di queste è la pre-VP22a che media le interazioni tra le VP5 ad essa complessate. Altre proteine importanti per la formazione di un capside in grado di dare origine ad una progenie infettante sono i prodotti di UL26 e UL26.5. In particolare UL26 è una serin-proteasi che agisce o in modo autoproteolitico o in *trans* su due siti della propria sequenza, detti R e M. Il taglio nel sito R è essenziale per l'infettività virale, il taglio nel sito M è importante per la fuoriuscita delle proteine dello *scaffold* dal capside.



**Fig.1.5.** Rappresentazione dell'assemblaggio del capside. Ultimata la sintesi delle proteine strutturali  $\gamma$ , i procapsidi vengono assemblati nel nucleo senza il coinvolgimento di proteine cellulari. VP23 (UL18) e VP19 (UL38) si assemblano intorno alle proteine dello *scaffold* VP5 (UL19) e ICP35 (UL26.5) e la serina proteasi richiesta per l'assemblaggio del virus, prodotto del gene UL26. Il DNA in forma di concatamero viene tagliato in monomeri in corrispondenza delle sequenze *a* e impacchettato nei capsidi.

Una volta che i pro-capsidi sono assemblati, può venirvi introdotto il DNA. Questo processo, detto incapsidamento, prevede lo spiazzamento delle proteine dello *scaffold* e il taglio dei lunghi concatamero in filamenti codificanti per una singola copia del genoma virale. Il taglio avviene in corrispondenza delle sequenze *a* tra le regioni DR1, dopo che il DNA è stato inserito ed il capsido è pieno.

Il capsido neofornato acquisisce le proteine del tegumento durante le fasi di passaggio attraverso le membrane nucleari, secondo modalità non del tutto note, a causa di una difficile comprensione della loro localizzazione nei compartimenti cellulari. Alcune di queste proteine, come VP16, sono indispensabili per l'*envelopment* (11).

### 1.2.5 Egresso

Come già accennato precedentemente, vi sono controversie sulla modalità di egresso del virione, specialmente per ciò che riguarda il suo passaggio attraverso le membrane nucleari interna ed esterna. Sono stati proposti tre modelli (fig.1.6).

Il primo modello di egresso prevede una primaria acquisizione di *envelope* dei capsidi intranucleari a livello della membrana nucleare interna, ed il trasporto alla superficie cellulare attraverso il reticolo endoplasmatico ed l'apparato secretorio del Golgi. Attualmente non è più molto accreditato (1). Alcune osservazioni non combaciano con questo modello, ad esempio il fatto che la composizione fosfolipidica dell'*envelope* virale è differente da quella della membrana nucleare (12), ed è stato necessario proporre un altro modello, detto *envelopment-deeenvelopment-reenvelopment* (13). Questo prevede che i capsidi acquisiscano una prima *envelope* a livello della membrana

nucleare interna, che poi si fonde con la membrana nucleare esterna, trasferendo i capsidi nel citoplasma, dove acquisiscono proteine del tegumento ed *envelope* definitivi, probabilmente gemmando attraverso il compartimento del *trans*-Golgi.

Più recentemente è stato proposto un modello alternativo che si basa sull'osservazione della deformazione dei pori nucleari, attraverso cui è stato suggerito che passino i virioni fuoriuscendo dal nucleo (14), per poi raggiungere la superficie cellulare attraverso il compartimento del Golgi. La progenie virale gemma quindi dalla cellula.

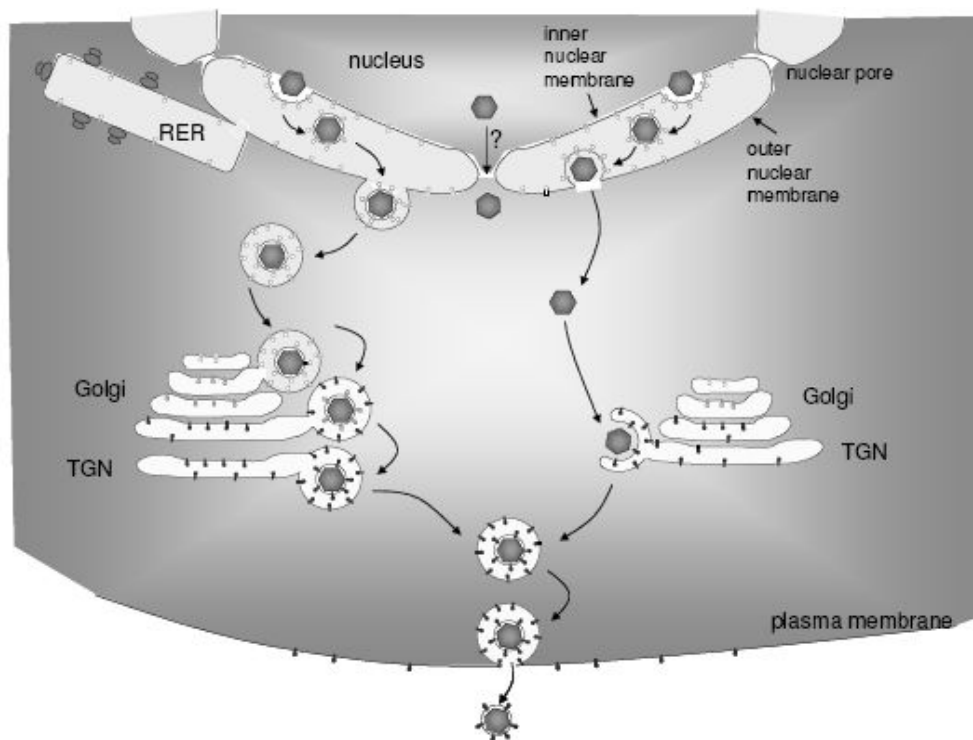


Fig.1.6. Modelli di egresso di HSV-1 dalla cellula infetta. A sinistra: il modello a singolo *envelopment*. A destra: il modello detto *envelopment-deenvelopment-reenvelopment*. Al centro, segnato da ( ), il passaggio attraverso i pori nucleari.

### **1.2.6 Alterazioni strutturali e metaboliche nella cellula infettata**

Abbiamo appena visto come l'infezione produttiva porti inevitabilmente la cellula ospite alla lisi. Questa però è solo la manifestazione più evidente della proliferazione virale, nonché il punto di arrivo di una serie di modificazioni che il virus induce nell'ospite per potersi replicare.

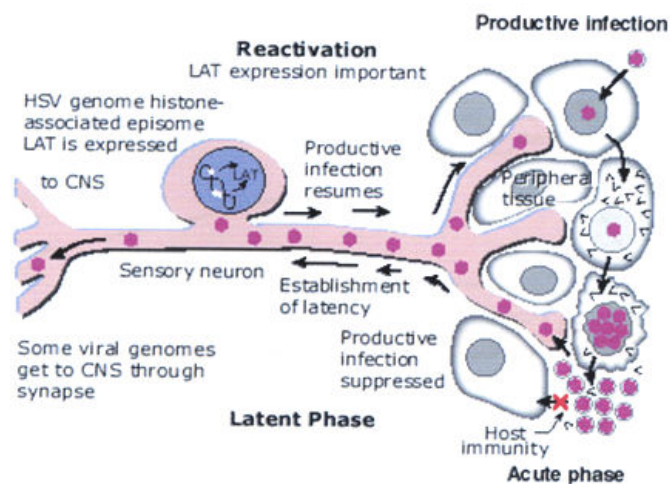
Una delle prime alterazioni in ordine temporale si ha nel nucleolo. Esso inizia ad ingrandirsi, a spostarsi verso il margine del nucleo ed in seguito a frammentarsi. Un'altra modificazione che insorge nelle prime fasi dell'infezione si ha a carico del *network* microtubulare che mostra una disorganizzazione principalmente nelle sue giunzioni con la membrana plasmatica. Solo nelle fasi tardive i microtubuli si organizzano in fasci paralleli intorno al nucleo. In alcune cellule l'apparato del Golgi può frammentarsi, originando migliaia di piccole vescicole che diffondono in tutto il citoplasma. In questi casi il trasporto dei virioni alla membrana plasmatica richiede la presenza del prodotto del gene UL20, mentre non è indispensabile nelle cellule che mantengono l'apparato del Golgi integro. Per quel che riguarda il metabolismo cellulare, HSV è in grado di inibire la sintesi di RNA, DNA e proteine cellulari, con quattro azioni diverse: promuove la degradazione del mRNA cellulare, inibisce la trascrizione dei geni cellulari, degrada o stabilizza le proteine cellulari, o in alternativa le redireziona verso altre funzioni.

### **1.2.7 Latenza**

Durante l'infezione primaria HSV penetra nelle terminazioni nervose e risale lungo i microtubuli ai nuclei dei neuroni che innervano gli epiteli mucosali infettati. Qui è in grado di instaurare la latenza, uno stato in cui il virus permane nella cellula senza manifestazioni cliniche, che può perdurare per tutta la durata della vita dell'ospite (Fig. 1.7).

Il DNA virale circolarizza e rimane in forma episomale, mentre non si ha alcuna replicazione. Il virus è in grado di riattivarsi periodicamente in seguito a stimoli di varia natura, quali stress o danno fisico delle cellule innervate dai neuroni ospiti, o scompensi ormonali. Sotto l'effetto di questi stimoli i virioni infettanti migrano in direzione anterograda al sito di infezione primaria, dove possono proliferare causando lesioni mucocutanee.

Nessuna funzione virale è assolutamente indispensabile per l'instaurarsi della latenza, infatti nessun virus mutante per delezione ha manifestato la totale incapacità a latentizzare (1). Diverse evidenze fanno supporre che la latenza sia indotta dall'assenza di un'espressione ad alti livelli dei geni  $\alpha$ . Gli unici trascritti identificati durante la latenza sono gli RNA di LAT (*latency associated transcript*). Il trascritto LAT più grande è lungo circa 8.3 kb, e contiene un introne di 2 kb, che può andare incontro a *splicing* e originare un RNA di 1.5 kb. I trascritti LAT sono in grado di promuovere l'instaurarsi della latenza inducendo la *down-regulation* dei geni litici. Questo è possibile visto il LAT di 8.3 kb possiede una sequenza che è antisenso ai geni  $\alpha 0$  e  $\gamma 134.5$ , mentre i LAT da 1.5 kb e 2 kb sono antisenso per  $\alpha 0$ .



**Fig. 1.7.** Instaurazione della latenza di HSV. Nell'infezione produttiva HSV entra attraverso le superfici mucosali, si replica nelle cellule epiteliali in corrispondenza del sito di ingresso e diffonde attraverso il tessuto. Il virus si introduce all'estremità del nervo sensitivo e migra al ganglio, dove può sia replicarsi sia instaurare la latenza. Il DNA circolarizza nel nucleo delle cellule neuronali e vengono espressi i trascritti associati alla latenza (geni LAT). In seguito a stimoli diversi il virus si può riattivare, replicando il DNA e dando luogo ad una progenie virale che viene trasportata in direzione anterograda alle superfici mucosali dove il virus causa lesioni ricorrenti.

E' anche stato osservato che un microRNA codificato dai geni LAT conferisce resistenza all'apoptosi, inibendo l'espressione di TGF- $\beta 1$  e SMAD3 e contribuendo così alla persistenza di HSV-1 in stato latente nelle cellule neuronali (15).

### **1.3 Attacco ed ingresso di HSV-1 nella cellula**

La seguente sezione si occupa delle prime fasi del ciclo replicativo del virus, che precedentemente non è stata trattata, in quanto costituisce l'argomento centrale di questo studio.

#### **1.3.1 La fusione virale: principi di base**

Per poter far penetrare il capsido all'interno della cellula, permettendo al materiale genetico in esso contenuto di essere replicato e ad alla progenie virale di essere prodotta, i virus provvisti di *envelope* devono fondere la propria membrana fosfolipidica con quella citoplasmatica o con le vescicole endocitiche, dopo che esse siano state internalizzate.

La fusione di membrana si verifica quando due diverse membrane lipidiche si uniscono a formare un unico doppio strato lipidico.

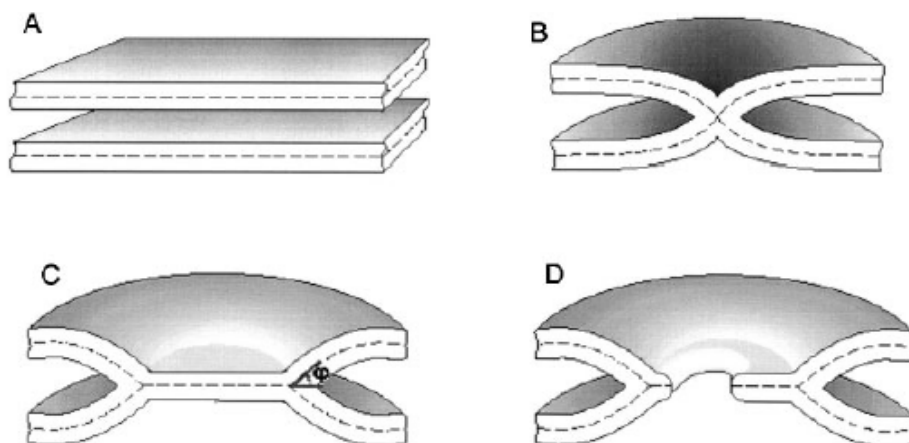
Gli eventi di fusione sono catalizzati da proteine che mediano il riconoscimento delle membrane destinate a fondersi e le giustappongono per destabilizzare l'interfaccia acqua-lipidi, contrastando le repulsioni elettrostatiche presenti e consentendo il rimescolamento delle due superfici. Queste funzioni possono essere svolte da una singola proteina o da più proteine con diverse funzioni, come nel caso di HSV-1.

Anche se i meccanismi effettori possono essere molto diversi, l'evento di fusione si riassume in tre passaggi: il contatto tra le membrane, il rimescolamento degli strati lipidici e l'apertura di un poro di fusione .

Il meccanismo più accreditato viene descritto come *stalk* (gambo, stelo) *hypothesis* e prevede il rimescolamento dei singoli strati lipidici prossimali, la formazione di uno *stalk*, la stabilizzazione di un intermedio di emifusione in cui si forma un diaframma costituito da un doppio strato lipidico e la successiva apertura di un poro di fusione (16, 17) (Fig.1.8).

Il processo di fusione è sempre mediato da proteine virali che agiscono di concerto con i relativi recettori cellulari, è può essere suddiviso a sua volta in tre passaggi fondamentali: il riconoscimento di un recettore cellulare ad opera di una glicoproteina virale, l'innescamento della fusione e l'esecuzione della fusione (18). Tale schematizzazione è valida per ogni modello di infezione virale, avendo come principale obiettivo quello di

prevenire una fusione prematura, e di consentirla solo in presenza dell'appropriato recettore.



**Fig.1.8** Stadi della fusione di membrana; (a) membrane all'inizio del processo, (b) stelo (*stalk*) di fusione, (c) diaframma circolare di emifusione e (d) poro di fusione. Adattato da Kozlovsky et al. (2002).

La fusione virale è condotta per lo più da proteine che agiscono singolarmente e mediano il processo in tutte le sue fasi, con un meccanismo definito “*single shot*”. Le proteine meglio caratterizzate sono le glicoproteine di classe I, proteine di membrana di tipo I che nella maggior parte dei casi vengono sintetizzate da un singolo precursore che va incontro a taglio proteolitico prima che il virione gemmi dalla membrana dell'ospite (19, 20). A seguito del taglio si formano due polipeptidi: il primo, detto in alcuni casi di superficie, è provvisto di un dominio globulare ammino-terminale ed un dominio carbossi-terminale, collegati da una regione ricca di proline; il secondo, un polipeptide metastabile contenente un peptide di fusione e la regione transmembrana. Il peptide di fusione è una sequenza di 15-30 aminoacidi generalmente lipofilo e ricco in glicina, immerso all'interno della proteina nella sua forma inattiva. A seguito dell'attivazione mediata dalla variazione del pH o dal contatto con il recettore della membrana cellulare, il dominio di riconoscimento recettoriale del polipeptide di superficie trasmette, attraverso il segmento ricco di proline, il segnale al dominio carbossiterminale. Quest'ultimo causa nel polipeptide transmembrana riarrangiamenti che espongono il peptide di fusione in superficie, consentendogli di insinuarsi nella membrana bersaglio causando il rimescolamento dei foglietti esterni e favorendo la fusione (19-22).

Dalle strutture cristalline di diverse proteine di fusione di tipo I si è evidenziata la presenza di fasci *coiled-coil* trimerici di  $\alpha$ -eliche subito a valle dei peptidi di fusione presenti alle estremità N-terminali. Altri *heptad repeats* in grado di formare *bundle* di tre eliche sono stati trovati verso l'estremità C-terminale in una regione adiacente alla membrana. Dopo che i peptidi di fusione hanno preso contatto con la membrana bersaglio, la proteina va incontro ad una modificazione conformazionale che avvicina i due *bundles* di tre eliche, che si dispongono in modo antiparallelo a formare un trimero di *hairpins* (forcine), detto anche *bundle* di sei eliche.

Questa nuova conformazione stabile avvicina meccanicamente le due membrane, favorendo la formazione del poro di fusione. Come avvenga esattamente il cambio conformazionale è ancora ignoto, ma esistono diverse teorie. È possibile che i peptidi di fusione si insinuino tutti nella membrana dell'ospite e che successivamente la proteina si ripieghi come un "coltello a serramanico" (*jackknife*) (23), oppure che i peptidi di fusione entrino nella membrana dell'*envelope* (17) e che la proteina piegandosi spinga la membrana virale verso quella della cellula. Un terzo modello prevede che i peptidi di fusione entrino in ambedue le membrane (24) che vengono poi giustapposte in seguito alla formazione del *bundle* a sei eliche.

Questi sono, ad esempio, i processi di attivazione e di fusione osservati per Env-gp160 di HIV-1 ed EMOAGGLUTININA di Influenza Virus (23, 25-27). In altri virus, ad esempio nei paramyxovirus, il legame al recettore e l'esecuzione della fusione sono mediati da due diverse proteine, emoagglutinina/neuraminidasi e glicoproteina di fusione F (28).

Per quanto riguarda HSV-1, sull'*envelope* del virus sono presenti almeno 12 glicoproteine, e di queste almeno quattro, gD, gB e l'eterodimero gH/gL, sono richieste per l'ingresso del virus nella cellula ospite.

Un numero così alto di glicoproteine coinvolte nel processo di ingresso e fusione del virus è giustificato dall'ampio spettro d'ospite, e pone interrogativi sulle specifiche funzioni ricoperte da ognuna di esse. La caratterizzazione delle quattro glicoproteine di HSV-1 ha evidenziato come esse ricapitolino lo schema base della fusione virale, ricoprendo le funzioni di riconoscimento del recettore ed innesco della fusione (gD) ed esecuzione della fusione (gB e gH/gL), attraverso meccanismi non ancora compresi appieno.



Numerose sono le evidenze sperimentali che dimostrano che la presenza delle quattro glicoproteine è indispensabile per l'infettività del virus. Si è visto che mutanti deleti in ciascuna delle glicoproteine del quartetto dimostrano incapacità ad entrare nelle cellule (29-32). In presenza di agenti fusogenici per le membrane biologiche, come il PEG (polietilenglicole), detti mutanti possono infettare le cellule, a dimostrazione che le mutazioni affliggono l'apparato fusogenico del virus. L'infettività è anche bloccata da anticorpi monoclonali diretti contro ciascun membro del quartetto (33, 34, 35, 36).

Importante per lo studio dei fenomeni in cui sono coinvolte le glicoproteine durante il processo di fusione mediato da HSV è stata la messa a punto di un semplice saggio *virus-free*, cioè senza l'utilizzo di virioni. Esso è detto "Saggio di fusione cellula-cellula" e prevede che le proteine virali vengano espresse transientemente in cellule tramite vettori d'espressione. Dopo due giorni sulle cellule trasfettate viene aggiunto un altro strato di cellule e dopo altre 24 ore si analizza al microscopio la presenza di cellule multinucleate. Con questa tecnica si è data dimostrazione che gB, gD e gH-gL sono sufficienti a mediare la fusione (37), devono essere presenti in *cis* sulla stessa membrana per cooperare tra loro nel processo fusogenico ed è indispensabile la presenza sulle cellule bersaglio del recettore per gD (38).

In seguito sono stati apportati miglioramenti del saggio, volti a quantificare con maggiore precisione la formazione di sincizi. Le cellule effettrici vengono trasfettate con vettori esprimenti le glicoproteine virali e con vettori esprimenti il gene della luciferasi o della  $\beta$ -galattosidasi come geni *reporter*, sotto il controllo del promotore T7. Le cellule bersaglio vengono trasfettate con un plasmide esprimente la T7 RNA-polimerasi, che agisce sul promotore T7. Le due popolazioni cellulari vengono coltivate e solamente in seguito alla formazione dei sincizi, e quindi proporzionalmente all'attività fusogenica delle glicoproteine trasfettate, la T7 RNA-polimerasi può promuovere l'espressione del gene *reporter*, che viene quantificata con precisione con mezzi spettrofotometrici (39).

Il saggio di fusione presenta però un paradosso: le cellule infettate dal virus *wildtype* non danno luogo a sincizi ma si arrotondano e si aggregano mantenendo integra la membrana fino alla liberazione della progenie per lisi cellulare, anche se sulla superficie della cellula ospite vengono esposte le glicoproteine virali. I sincizi si formano solo in infezioni con virus che portano determinate mutazioni dette *syn*, che mappano nei geni

codificanti per gB, gL, gK, UL24 e UL20. È quindi probabile che dette proteine esercitino un ruolo di controllo negativo sulla fusione, come è già stato dimostrato per gB, gK e UL20 (40-42). La ridondanza dei meccanismi di controllo della fusione potrebbe sottolineare il fatto che il virus evita accuratamente una fusione incontrollata, pericolosa per la sorte della sua replicazione e della sua diffusione.

### **1.3.2 Attacco di HSV-1 sulla superficie della cellula ospite e glicoproteina C**

Il primo contatto del virus con la cellula è detto attacco e coinvolge gC, glicoproteina dell'*envelope* prodotta dal gene UL44, che lega i residui di eparan solfato e di condroitin solfato presenti sui proteoglicani della membrana (43). È anche coinvolta gB, che interagisce con la cellula tramite una regione ricca di lisine (44). Questa interazione non è indispensabile per l'infettività del virus, infatti cellule defettive nella biosintesi dell'eparan solfato, ma in grado di produrre condroitin solfato, possono essere infettate, seppure con un'efficienza minore (45); inoltre, virus deleti di gC possono dar luogo al ciclo infettivo e replicarsi, almeno in cellule in coltura, seppure manifestando una cinetica di replicazione più lenta (46). La principale funzione dell'attacco dovrebbe quindi essere quella di aumentare la concentrazione di particelle virali sulla superficie cellulare, consentendo interazioni più stabili con gD, la glicoproteina di riconoscimento recettoriale.

L'evidenza che la molecola cellulare responsabile dell'attacco sia l'eparan solfato deriva dall'osservazione che l'eparina, un'analogo solubile dell'eparan solfato, inibisce il legame del virus alle cellule (43). Lo stesso effetto è indotto dal trattamento delle cellule con eparinasi, enzima che idrolizza i residui di eparan solfato (47).

L'identificazione di gC come maggiore responsabile dell'attacco è stata possibile sulla base di diverse evidenze sperimentali. In primo luogo si è osservato che in presenza di policationi, quali la neomicina e la polilisina, viene inibito l'attacco in HSV-1, ma non in HSV-2. Questa differenza di risposta tra i due tipi di HSV è da imputare, alla luce dei mappaggi dei due genomi, proprio al prodotto di UL44, cioè gC (48). Inoltre gC e gB sono in grado di interagire con l'eparina legata all'interno delle colonne di eparin-Sepharose e possono essere eluite con l'eparina solubile (46). In particolare, gC è composta da una sequenza segnale di 25 aminoacidi all'estremità amino-terminale, un lungo ectodominio di 453 aminoacidi, un dominio transmembrana di 23 aminoacidi, ed una corta coda citoplasmatica carbossi-terminale di 10 aminoacidi. La conformazione

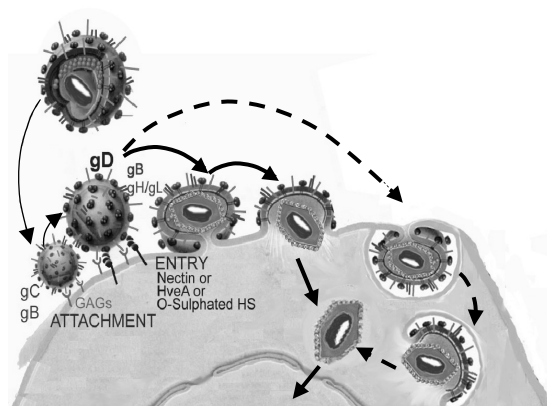
dell'ectodominio è stabilizzata da ponti disolfuro intramolecolari (49), ed al suo interno sono state identificate due regioni antigeniche distinte, corrispondenti con la porzione più carbossi-terminale (regione antigenica I) e amino-terminale (regione antigenica II) (50). Il dominio d'interazione con l'eparan solfato è localizzato sulla regione aminotermiale di gC (51). Un'altra funzione di gC è quella di inattivare il complemento, legandosi al fattore C3b (52), facilitando così l'evasione alla risposta immunitaria dell'ospite da parte di HSV-1 (53).

### 1.3.3 Il riconoscimento del recettore cellulare da parte di gD

L'evento chiave che porta all'ingresso di HSV-1 nella cellula ospite è rappresentato dall'interazione della glicoproteina di membrana gD con uno dei suoi specifici recettori cellulari (Fig 1.8).

Il virus può penetrare nella cellula ospite per fusione pH-indipendente con la membrana plasmatica. Infatti i livelli di infettività non sono influenzati da sostanze in grado di alterare il pH degli endosomi e quindi di perturbare il processo endocitico (7).

Negli ultimi anni è stata messa in evidenza una via d'ingresso endocitica in grado di dar luogo ad un'infezione produttiva. Le due diverse modalità di ingresso si alternano a seconda del tipo cellulare e delle caratteristiche recettoriali. Infatti in cellule HeLa e CHO esprimenti i recettori per gD, l'ingresso del virus avviene per endocitosi, ed è inibito da cloruro di ammonio e bafalomicina, responsabili di alterare il pH, bloccando il processo endocitico. In altri tipi cellulari, come le cellule Vero, ciò non si verifica (54).



**Fig. 1.9.** Attacco ed ingresso di HSV nella cellula. Il primo stadio consiste nell'attacco del virione ai glicosaminoglicani alla superficie cellulare. Il secondo stadio prevede che la glicoproteina D interagisca con uno dei suoi recettori. gD, insieme alle altre glicoproteine gB, gH e gL, porta alla fusione dell'*envolope* virale con la membrana plasmatica o con le vescicole di endocitosi (in cellule HeLa e CHO). In seguito il virione perde l'*envolope* ed il capsido viene trasportato al nucleo, dove viene rilasciato il DNA .

E' stata anche identificata una terza via di ingresso in cui l'internalizzazione è dipendente dal legame di gD con il recettore, e l'endocitosi è indipendente dall'acidificazione degli endosomi, osservata in cellule murine C10 (55).

Non sono solo le caratteristiche cellulari a determinare la via di ingresso: in uno studio condotto in questo laboratorio (56) si è osservato che l'ingresso per via endocitica dipende anche da caratteristiche recettoriali. Uno dei recettori di gD (nectina-1) è stato reindirizzato alle vescicole endosomiali creando una chimera con le regioni transmembrana e citoplasmatica del recettore per EGF (*Epidermal Growth Factor*), ed espresso in cellule J. Parallelamente è stato creato un costrutto in cui la nectina-1 è stata ancorata al GPI (glicosilinositolo fosfato), reindirizzando il recettore ai *lipid rafts*, elementi della membrana in corrispondenza dei quali vi è un attivo traffico vescicolare. In presenza dei due costrutti l'entrata del virus è sensibile a molecole che perturbano la via endocitica, rendendo plausibile che la scelta tra i due meccanismi di ingresso dipenda anche dal tipo di recettore a cui si lega HSV-1, e confermando che le glicoproteine dell'*envelope* possiedono caratteristiche che consentono loro di mediare l'ingresso tra la via endocitica dipendente dal pH e la fusione della membrana citoplasmatica.

gD è una glicoproteina di membrana di tipo I composta da 369 aminoacidi, più una sequenza segnale di 25 residui, rimossa nella forma matura. E' costituita da un ectodominio amino-terminale di 316 aminoacidi, una regione transmembrana localizzata tra gli aminoacidi 317 e 339, ed un dominio citosolico carbossi-terminale. Prima dell'identificazione dei suoi recettori cellulari, gD era già indicata come responsabile del legame alla cellula ospite. Forme solubili della glicoproteina sono in grado di inibire l'ingresso del virus legandosi a saturazione sulla cellula, suggerendo che la glicoproteina interagisca con un numero limitato di recettori specifici sulla superficie cellulare (57). In cellule costitutivamente esprimenti gD si osserva l'assenza di penetrazione del virus, probabilmente per interferenza della glicoproteina esogena con i recettori cellulari, e in questa popolazione cellulare il virus viene endocitato e degradato (58). Questo fenomeno è detto resistenza all'infezione o interferenza gD-mediata. Quanto descritto è valido solamente per gD, indicando che essa è la glicoproteina esclusiva di interazione con il recettore. Infatti il fenomeno della restrizione non si osserva in cellule in cui è gB ad essere espressa costitutivamente (59),

e l'infezione non può essere bloccata da forme solubili di gC (51) o dell'eterodimero gH-gL (60).

Per quanto riguarda l'interferenza gD-mediata, esistono virus mutanti in gD chiamati *rid1*, *rid2* e *ANG*, o “*unrestricted*”, U10 e U21 che riescono a infettare ugualmente una cellula esprimente gD *wild-type*. In essi sono presenti singole mutazioni nella regione amino-terminale di gD (L25P, A185T, Q27P, Q27R) (48, 61, 62).

I mutanti *rid*, U10 e U21 sono in grado di superare la restrizione mediata da gD perché le gD mutate sono in grado di legare un recettore “secondario”, quando quello “primario” è impegnato dalla gD *wildtype* presente sulla membrana cellulare (61). Questi esperimenti portarono un'evidenza indiretta dell'esistenza di diversi recettori per gD, che sono stati successivamente identificati essere HVEM (*Herpes Virus Entry Mediator*), nectina1 e siti modificati dell'eparansolfato (63-67). Le loro caratteristiche e funzioni saranno discusse successivamente. Tali recettori interagiscono con gD in corrispondenza con la sua regione amino-terminale, sui primi 260 aminoacidi (68). Il sito di interazione con HVEM è stato identificato con precisione nei primi 37 aminoacidi poiché è stato ottenuto il cristallo di gD complessata ad esso (69). Le regioni di interazione con la nectina1 sono invece più diffuse e si situano anche in regioni non caratterizzate dal cristallo (70).

#### **1.3.4 Struttura cristallina di gD e siti di legame ai recettori cellulari**

La prima struttura cristallina di gD è stata risolta su una forma solubile troncata al residuo 259, da sola o co-cristallizzata con una forma solubile di HVEM (Fig 1.10A) (69). La porzione più amino-terminale della glicoproteina non è strutturata nel cristallo contenente la sola gD, mentre forma una struttura ad *hairpin* in presenza di HVEM. In questo caso la regione in questione si ripiega verso la parte centrale della molecola, costituita da un dominio immunoglobulinico (residui 56-184) ed un' $\alpha$ -elica ( $\alpha$ -elica 3) di 17 aminoacidi che si estende fino al residuo 240. A valle dell' $\alpha$ -elica 3 si trova una lunga regione flessibile ricca in proline (aminoacidi 244-312), la cui struttura è stata definita in una cristallizzazione successiva (71).

Data la disponibilità del co-cristallo di gD legata ad HVEM, da un punto di vista strutturale si conosce molto di più di questa interazione che dell'interazione di gD la Nectina-1. I residui di gD critici per il legame con HVEM si situano tra gli aminoacidi 1

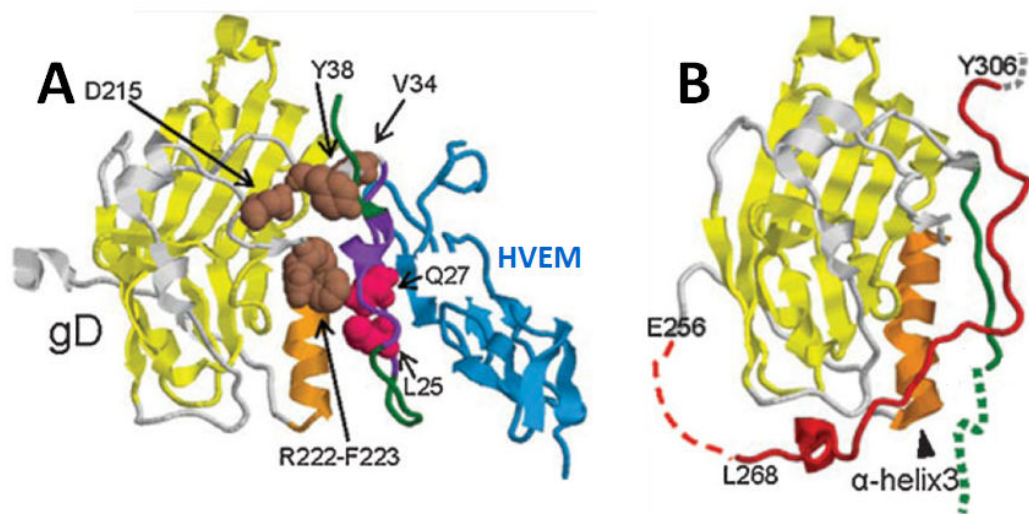


Fig. 1.10.(A) Rappresentazione della struttura del co-cristallo gD-HVEM, la porzione ammino-terminale di gD forma un *hairpin* e prende contatto con HVEM. In verde è rappresentata la regione ammino-terminale, in giallo il dominio immunoglobulinico. Sono evidenziati L25 e Q27, critici per l'interazione gD-HVEM, e V34, Y38, D215, R222, F233, critici per l'interazione con Nectina-1. (B) Singolo monomero tratto dalla struttura cristallina del dimero di gD. In rosso è rappresentato il dominio pro-fusogenico carbossi-terminale. Tratto da Campadelli *et al.* Rev. Med. Virol., 2007.

e 32, di cui i segmenti 7-15 e 24-32 instaurano contatti con il recettore cellulare. In particolare, sono importanti per l'interazione i residui 25 e 27, le cui catene laterali, nella conformazione legata ad HVEM, si introducono in una tasca presente sull' $\alpha$ -elica 3. Mutazioni in corrispondenza di questi aminoacidi aboliscono l'interazione con HVEM, aumentando invece l'affinità con Nectina-1 e, nello stesso tempo, conferendo a gD la capacità di legare Nectina-2 (70, 72). Numerose mutazioni che inibiscono l'interazione tra gD con HVEM e inibiscono anche il legame con 3-O-S HS suggerendo che i siti di legame per i due recettori cellulari risiedano nella stessa regione, almeno parzialmente (70). Al contrario, le superfici di legame di HVEM e di Nectina-1 non sembrano sovrapporsi. Infatti, delezioni a livello dei primi 32 aminoacidi, che annullano il legame con HVEM, non alterano la capacità di gD di legare Nectina-1 (70). I residui critici per il legame con Nectina-1 fino ad ora identificati sono: Val<sup>34</sup>, Tyr<sup>38</sup> ed il gruppo Asp<sup>215</sup>, Arg<sup>222</sup> e Phe<sup>223</sup>, tutti orientati sulla stessa superficie della molecola (Fig. 1.10A) (73, 74).

Nel secondo cristallo risolto, è stato studiato un dimero artificiale di gD, troncata in corrispondenza del residuo 306, ed aggiunta di una cisteina in posizione 307 per stabilizzare la regione flessibile compresa tra i residui 260 e 306. Il dimero rispecchia la

conformazione di gD in assenza di recettore, in cui la regione carbossi-terminale (aminoacidi 268-306) si lega al dominio immunoglobulinico. I residui 282-300 si affiancano al segmento ammino-terminale 23-30, impedendo la formazione dell'*hairpin* indotto dal legame con HVEM e coprendo i residui coinvolti nel legame con Nectina-1 (Fig. 1.10B). I 22 residui ammino-terminali sono assenti a causa di un taglio proteolitico spontaneo (71).

### **1.3.5 Il dominio pro-fusogenico di gD: l'innescamento della fusione**

In seguito all'interazione con i recettori cellulari gD innesca la fusione virale, mediata dalle altre glicoproteine fondamentali gB, gH e gL. Un dominio presente nella regione più carbossi-terminale della molecola, detto dominio pro-fusogenico (*pro-fusion domain, PFD*) è fondamentale per l'innescamento della fusione, ma non per il legame con i recettori (75). A tal riguardo, è stato osservato che la forma solubile di gD ripristina l'infettività di un virus debole della glicoproteina, a condizione che sia troncata al massimo in corrispondenza del residuo 285 (75). Sostituzioni all'interno della regione 250-310 o specifiche mutazioni compromettono la fusione o l'infettività, anche se non alterano il legame con Nectina-1 o HVEM. Queste osservazioni evidenziano come nella porzione carbossi-terminale di gD risieda un dominio funzionale (75-77).

Quando gD non interagisce con alcun recettore, la regione carbossi-terminale dell'ectodominio interagisce con la porzione ammino-terminale della glicoproteina, ma viene spiazzata dal sito di interazione quando gD interagisce con HVEM o Nectina-1 (77).

Il modello di attivazione di gD mediata da HVEM o Nectina-1 prevede che in gD non legata il dominio carbossi-terminale si ripieghi ed avvolga la regione ammino-terminale, determinando una conformazione chiusa auto-inibita. In seguito al legame con uno dei recettori cellulari questa interazione viene a meno, gD adotta una conformazione aperta, dove il dominio carbossi-terminale, liberato dai vincoli dell'interazione, si allontana dalla regione ammino-terminale. Questo cambio conformazionale attiva gD. Resta da comprendere come i recettori possano interagire con gD nella conformazione chiusa, se le superfici di interazione sulla regione ammino-terminale sono mascherate dal dominio carbossi-terminale. È stato proposto che il flessibile dominio carbossi-terminale stia in un equilibrio tra l'interazione con la regione ammino-terminale e la forma aperta di gD.

Il legame con il recettore sposterebbe l'equilibrio verso la forma aperta e attiva di gD. E' stato stimato che, al momento della delocalizzazione del dominio carbossi-terminale e dell'assunzione della forma aperta di gD, il dominio ammino-terminale possa essere allontanato dalla regione transmembrana di più 100 Å (71).

Riguardo alle funzioni dei diversi domini di gD è importante menzionare un'osservazione molto interessante, riportata in uno studio che si prefiggeva come obiettivo quello di ottenere un herpes virus ricombinante dotato di una proteina chimerica gD-uPA (urochinasasi attivatore del plasminogeno) (78). In questo studio è stato ottenuto un virus infettante in cui, per inserzione di un codone di stop, gD è stata divisa in due frammenti: il primo costituito dai residui 33-60 della glicoproteina matura, fusi con il dominio *kringle* di uPa, ed il secondo formato da tutta la parte carbossi-terminale di gD, fino al dominio citosolico (aminoacidi 219-369), inclusi l' $\alpha$ -elica3 ed il dominio pro-fusogenico. E' stato dimostrato che i due frammenti interagivano fisicamente, e che il dominio *kringle* era indispensabile per la stabilità della proteina chimerica. Queste osservazioni suggeriscono che il dominio immunoglobulinico, localizzato tra i residui 62-218 ricopra un ruolo strutturale, di unione tra i domini ammino-terminale, deputato all'interazione con i recettori, ed il dominio pro-fusogenico, deputato all'innescamento della fusione.

E' ancora da chiarire quale sia il meccanismo attraverso cui l'attivazione di gD in seguito al legame con il recettore determini l'attivazione delle altre glicoproteine, attraverso i cambiamenti conformazionali del dominio pro-fusogenico. E' possibile che il dominio pro-fusogenico interagisca con gB e gH/gL attivandole e, probabilmente formando un complesso attivo. Infatti, uno studio risalente a diversi anni fa ha evidenziato come, utilizzando il *cross-linking*, si possano identificare in virioni di HSV-1 complessi formati dalle glicoproteine in questione, che poi scompaiono al momento dell'ingresso del virione nella cellula. In questo modo sono stati identificati complessi contenenti omo ed etero- oligomeri, quali gD-gD, gB-gB, gD-gB, gB-gC e gH e gL. L'assenza di una delle glicoproteine non altera la formazione del complesso tra le altre (79). Successivamente, tramite co-immunoprecipitazione, si è osservato come il recettore cellulare HVEM, gD e gH formassero un complesso in cellule infettate da HSV-1 (80). Inoltre, sono stati identificati complessi tra le quattro glicoproteine in cellule trasfettate utilizzando saggi di complementazione bi-molecolare o GFP *split*,



dimostrando con approcci diversi la formazione di tali complessi (81, 82). La determinazione biochimica e stechiometrica della formazione di tali complessi, e la caratterizzazione delle condizioni in cui essi si formano, a livello temporale e molecolare, potrà fare luce sul meccanismo di attivazione del macchinario fusogenico di HSV-1, e della sua regolazione.

Una possibile ipotesi sul meccanismo di attivazione della fusione è stata suggerita dall'osservazione che gH e gL, in presenza di gD, mediano l'emifusione tra membrane fosfolipidiche (83). Per ottenere la completa fusione è invece necessaria la presenza di gB, suggerendo un modello sequenziale di esecuzione della fusione che passa, come per le glicoproteine di fusione di tipo I e II, attraverso uno stato intermedio di emifusione.

### **1.3.6 I recettori che mediano l'ingresso di HSV nella cellula**

#### **1.3.6.1 HVEM (Herpes Virus Entry Mediator)**

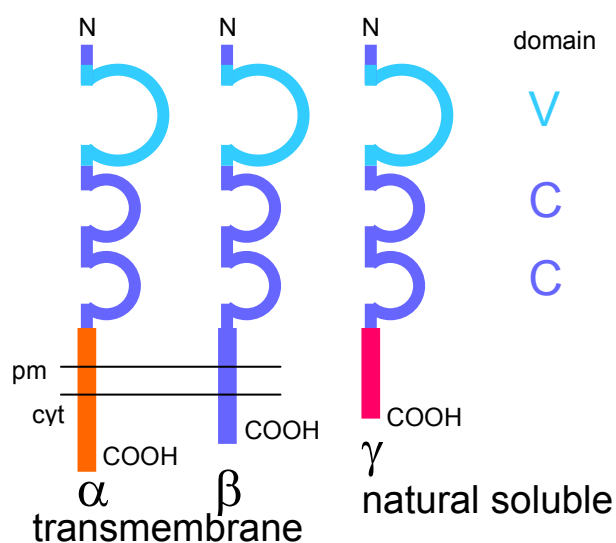
L'identificazione del recettore di HSV è stata condotta tramite uno screening in cui cellule resistenti all'infezione venivano trasfettate con librerie di cDNA umane (65). Ciò ha portato alla scoperta che HVEM, detto anche HveA, è in grado di mediare la penetrazione del virus, recuperando l'infettività, ed è in grado di legare gD (68). HVEM appartiene alla famiglia dei recettori per il TNF (*Tumor Necrosis Factor*), e come tale è coinvolto nella regolazione della proliferazione cellulare e nel differenziamento. L'interazione con il ligando naturale induce la trimerizzazione del recettore, i cui domini citoplasmatici vengono a contatto determinando la risposta biologica. Il dominio citoplasmatico di HVEM possiede dei motivi di interazione con TRAF (*TNFR associated factor*), detti TIM, in grado di innescare diverse cascate di trasduzione del segnale. Può essere attivato il fattore nucleare kB (NF-kB), la chinasi Jun N-terminale (JNK), p38, la chinasi relata al segnale extracellulare (ERK) e la fosfoinositolo 3-chinasi (PI3K).

HVEM è espresso prevalentemente in cellule linfoidi, in disaccordo con il tropismo epiteliale di HSV. In realtà si è scoperto successivamente che è anche presente in altri tessuti, coespresso con un altro recettore per gD, la nectina1 (65, 84). Inoltre HVEM ha dimostrato di non poter mediare l'ingresso nella cellula di virus mutanti *gD U10*, *U21*, *rid1* e *rid2*. Queste evidenze hanno indotto a supporre l'esistenza di altri recettori, stimolando la ricerca volta ad identificarli.

### 1.3.6.2 La famiglia delle nectine

Le nectine costituiscono la famiglia di recettori per HSV più diffusa nella cellule umane e svolgono un ruolo chiave, insieme alle caderine, nella formazione delle giunzioni aderenti (85, 86).

Sono proteine transmembrana omologhe al recettore per il poliovirus umano (PrV), di cui mediano l'ingresso (64). Tale recettore, detto PVR (o CD155, o HveD) è stato il primo membro della famiglia ad essere identificato. Della famiglia delle nectine fanno quindi parte: i) il PVR, di cui sono conosciute quattro isoforme derivate da splicing alternativo, due transmembrana (PVR $\alpha$  e PVR $\delta$ ) e due solubili (PVR $\beta$  e PVR $\gamma$ ) (87, 88); ii) la nectina 1 $\alpha$ , o PRR1 (poliovirus receptor related 1); iii) la nectina 2 $\alpha$  e la nectina 2 $\delta$ , due varianti con il medesimo ectodominio, dette anche HveB/PRR2 $\alpha$  e PRR2 $\delta$ , rispettivamente.



**Fig 1.11.** Rappresentazione delle strutture di tre isoforme della nectina 1.

Tutte queste nectine appartengono alla superfamiglia delle immunoglobuline. L'ectodominio è formato da tre domini di tipo immunoglobulinico (*IgG-like*), uno V (*variable*) e due C (*constant*), stabilizzati da sei cisteine conservate. Il grado di omologia per gli ectodomini è tra il 30 e il 50%, mentre i domini transmembrana e citoplasmatico hanno una maggiore variabilità.

### **La nectina1**

La nectina1 è il recettore di HSV più diffuso nei tessuti umani e animali. Se ne conoscono tre isoforme, di cui due,  $\alpha$  e  $\beta$ , legate alla membrana ed una,  $\gamma$ , solubile e meno diffusa. (63, 64, 68, 89-91)

Come già detto, è diffusa in molti tessuti, compresi quelli coinvolti nell'infezione da HSV, quali il sistema nervoso centrale, i gangli, le mucose e gli epiteli (63, 92-95). In alcuni di questi tessuti è coespressa a HVEM (84).

L'interazione con gD coinvolge i primi 250 aminoacidi della glicoproteina e il dominio V della nectina1 o, più precisamente, la *ridge* (cresta) C-C'-C'' (96-98). Mutazioni in gD possono coinvolgere siti critici che riducono le interazioni ligando-recettore, ma mutazioni in siti che diminuiscono l'affinità di legame, anche di alcuni ordini di grandezza, non impediscono al virus di entrare nella cellula. Ciò implica che la funzionalità di gD non sia affinità-dipendente, ma sia sufficiente una sola interazione con un recettore funzionante per determinare l'ingresso del virus (99, 100).

### **La nectina2**

Una singola sostituzione aminoacidica conferisce a gD la capacità di utilizzare nectina2 come recettore alternativo, senza precludere la possibilità di legare nectina1, ma abolendo le interazioni con HVEM, e causando una variazione dello spettro d'ospite (70, 101). Queste mutazioni sono L25P, Q27P e Q27R, come già accennato riguardo al fenomeno della restrizione gD-mediata. La nectina2 rappresenta anche un recettore a bassa affinità per HSV-2, ma non interagisce con il ceppo HSV-1 *wt* (67, 72, 84).

#### **1.3.6.3 Eparan solfato modificato**

Una forma modificata dell'eparan solfato, il 3-O-solfato eparan solfato, è candidato ad essere il terzo recettore identificato per HSV-1, ma non per HSV-2 o per i mutanti *unrestricted*. La modificazione avviene solamente in cellule in cui è presente la D-glucosaminil 3-O-solfotransferasi, che catalizza la sintesi di siti di interazione con gD (66). Una chiara localizzazione delle diverse isoforme di detto enzima nei diversi tessuti è un passo importante per capire il ruolo dell'eparan solfato nell'ingresso del virus.

### 1.3.7 L'esecuzione della fusione: gB

Il ruolo della glicoproteina B nel processo di ingresso di HSV-1 non è ancora compreso appieno, pur essendo la glicoproteina dell'*envelope* più conservata all'interno della famiglia degli *Herpesviridae* (102). Essa è composta da 904 aminoacidi, ed è suddivisa in un ectodominio di 773 residui, un dominio transmembrana di 22 residui ed una coda citoplasmatica di 109 residui (103).

gB ricopre un ruolo nella fase di attacco alla superficie della cellula, il primo ma non indispensabile stadio dell'infezione virale. Tra gli aminoacidi 68 e 76 della glicoproteina è situato un sito di legame per l'eparan-solfato che media questa fase dell'infezione (104, 105).

Più importante è il ruolo indispensabile ricoperto nella fusione, quando la glicoproteina si trova sulla membrana cellulare o sull'*envelope* virale in presenza degli altri membri del quartetto di glicoproteine che mediano la fusione. D'altra parte, quando nella cellula infettata la fusione deve essere controllata negativamente, gB va incontro ad endocitosi, sottraendosi al complesso delle quattro glicoproteine. I due comportamenti sono supportati da diverse evidenze: in virioni deleti in gB o in presenza di anticorpi neutralizzanti anti-gB si osserva l'assenza di infettività. Inoltre sul gene di gB, UL27, mappa un locus *syn*, e la presenza della glicoproteina è indispensabile per il saggio di fusione cellula-cellula (37, 106, 107). Le attività profusogena ed antifusogena sono esercitate da domini differenti all'interno della sua struttura, che consiste in un'estremità ammino-terminale sul versante extracellulare, due o tre segmenti transmembrana e una lunga coda citoplasmatica carbossiterminale, caratteristiche tipiche delle glicoproteine virali di tipo I (103, 108).

L'ectodominio è funzionale alla fusione, e in esso sono stati identificati siti che, se mutati, danno ceppi con crescita temperatura-sensibile, ingresso ridotto (108) e resistenza alla neutralizzazione da parte di anticorpi (34).

Diversi studi evidenziano come gB svolga la sua funzione organizzata in un oligomero, ad esempio gB matura sedimenta in gradiente di saccarosio a 200kD, a differenza del monomero che ha un peso apparente di 110 kDa (109) e mostra una minore mobilità elettroforetica di gB monomerica (110).

E' stato anche osservato che gB interagisce con la superficie cellulare, anche indipendentemente dalla presenza di eparan solfato (111), e successivamente una

proteina di membrana, PILR $\alpha$  (*paired immunoglobulin-like type 2 receptor*), è stata caratterizzata come co-recettore cellulare (112). Recentemente è stato osservato che la presenza di PILR $\alpha$  sulla superficie di cellule CHO induce l'ingresso di HSV-1 attraverso la fusione sulla membrana plasmatica (113), diversamente da quanto osservato in cellule CHO trasfettate con i recettori per gD, dove l'ingresso avviene per endocitosi mediata da acidificazione delle vescicole endocitiche (54). Quest'osservazione suggerisce che gB ricopra un ruolo importante nelle interazioni con la cellula ospite e nella determinazione del meccanismo di ingresso.

La risoluzione della struttura cristallina della forma post-fusione di gB (114) ha definitivamente confermato che la proteina si organizza in un trimero (Fig. 1.12) e mostra un alto grado di conservazione strutturale, benché non di sequenza, con la proteina G del Virus delle Stomatite Vescicolare (VSV), un Rabdhovirus che utilizza G sia per l'interazione con il recettore, sia per mediare la fusione(115), fornendo un'ulteriore conferma del ruolo di esecutore della fusione di gB nell'infezione di HSV-1.

Non è presente un dominio di trimerizzazione unico, piuttosto la stabilità del trimero è determinata da numerosi contatti tra i protomeri (114).

Ciascun monomero contiene 10 cisteine che formano 5 ponti disolfuro intramolecolari, di cui diversi sono fondamentali per la corretta conformazione della glicoproteina (114). Ogni monomero è suddiviso in 5 domini differenti: dominio I, detto "*base*" formato da una catena polipeptidica continua, ha il ripiegamento caratteristico di un dominio con omologia alle plestrine, un *sandwich* formato da due foglietti  $\beta$  quasi perpendicolari. Nelle cellule queste proteine con tali strutture mediano le interazioni tra fosfatidilinositolo e peptidi (116, 117); il dominio II, detto "*middle*" è composto da due segmenti discontinui al cui centro si posiziona un barile  $\beta$  a sei fasci simile ad un dominio ad omologia con le plestrine; il dominio III, detto "*core*" è costituito da tre segmenti discontinui e contiene al suo interno una lunga  $\alpha$  elica di 44 aminoacidi che forma, con le corrispondenti eliche degli altri protomeri, un *coiled-coil* centrale. Questa regione instaura all'interno del trimero contatti essenziali per l'oligomerizzazione. Seguono poi il dominio IV detto "*crown*" si localizza all'apice del trimero, ed il dominio V, detto "*arm*" è composto da due segmenti polipeptidici discontinui, che non prendono contatto con parti dello stesso protomero, ma piuttosto con regioni degli altri protomeri, probabilmente stabilizzando la struttura oligomerica (Fig 1.12) (114).

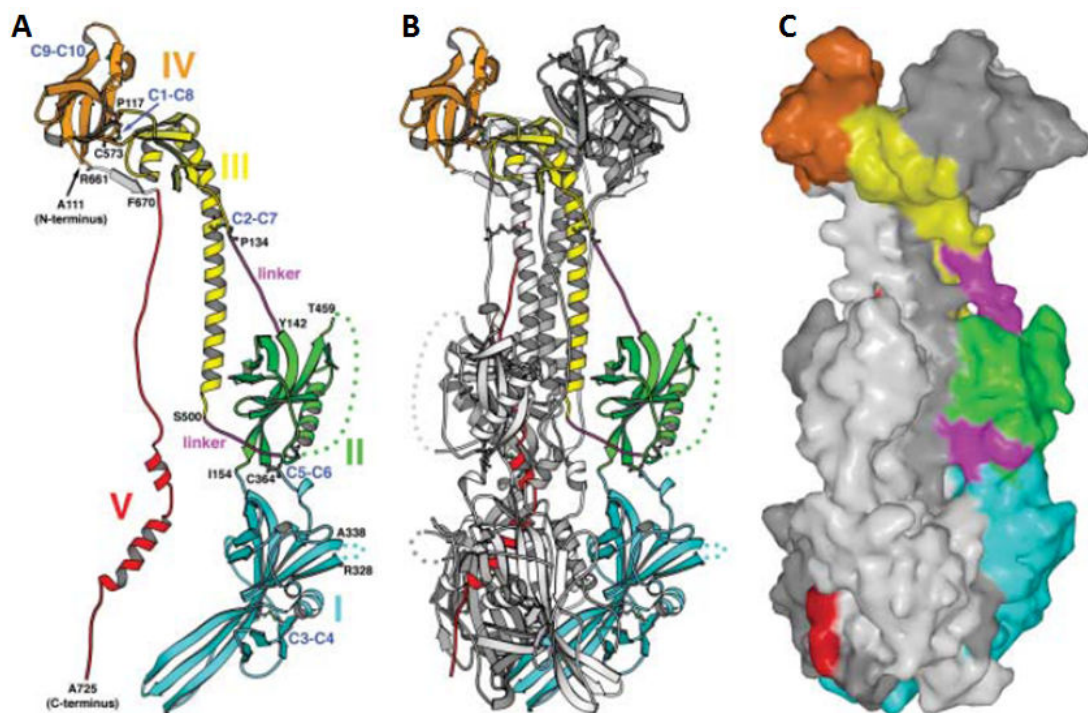


Fig 1.12. Struttura cristallina di gB. (A) Rappresentazione di un singolo protomero. I residui indicati delimitano le diverse regioni. Le porzioni disordinate sono rappresentate con puntini. I ponti disolfuro sono rappresentati in nero. (B) Rappresentazione del trimero. (C) Rappresentazione della superficie del trimero. L'immagine è tratta da Heldwein *et al.*, Science 2006.

Studi condotti con anticorpi monoclonali hanno identificato alcune regioni funzionali all'interno dell'ectodominio di gB che sono fondamentali per l'infezione (118).

Singole sostituzioni aminocidiche all'interno del dominio I, analogo al *fusion loop* della proteina G di VSV bloccano la fusione cellula-cellula in cellule suscettibili trasfettate con la gB mutata, più gD, gH e gL, indicando che tali residui sono indispensabili per la fusione. Quindi questa regione viene considerata il *fusion loop* putativo di gB (119).

Nelle cellule infette, gB si associa con i *lipid raft*, (120) microdomini di membrana ricchi in colesterolo e sfingolipidi dove si suppone che si localizzino molecole che ricoprono un ruolo importante nella trasduzione del segnale e nell'ingresso di diversi virus (121-123).

Introdurre mutazioni per identificare regioni funzionalmente importanti si è rivelato essere un approccio sfavorevole, a causa delle modificazioni conformazionali mostrati dalla maggioranza dei mutanti (106, 124, 125). Ad esempio, inserzioni in  $\alpha$ -eliche o foglietti  $\beta$  hanno mostrato impedire la corretta processazione di gB (126).

Inoltre, uno studio condotto con una mutagenesi casuale di 5 aminoacidi ha ottenuto solamente 27 mutanti in grado di assumere una corretta conformazione, dagli 81 ingegnerizzati (127). E' probabile che l'approccio mutagenico manifesti queste difficoltà perché la formazione del trimero coinvolge ampie aree di contatto dei monomeri (114).

La coda citoplasmatica è provvista di due  $\alpha$ -eliche, ed è importante per il controllo negativo dei processi fusogenici, dal momento che contiene sia domini di endocitosi, sia un *locus* per la mutazione sinciziale *syn3*.

Un motivo, o forse due, di endocitosi, detti YTQV 889-892, e LL871 sono presenti in corrispondenza dell' $\alpha$ -elica carbossi-terminale (40, 42, 128). La delezione di questa  $\alpha$ -elica, dal momento che impedisce l'internalizzazione di gB, è in grado di aumentare l'efficienza del saggio di fusione e determina l'insorgere del fenotipo sinciziale in cellule infettate (42, 129). Sembra evidente che l'attività di controllo di questa regione sia esercitata tramite endocitosi che sequestra gB dalla superficie della membrana e fa sì che gB diventi il fattore limitante del processo.

La mutazione *syn3* è invece situata nelle vicinanze dell' $\alpha$ -elica amino-terminale, nella regione prossima alla membrana, e una sua delezione abolisce l'infettività. I meccanismi molecolari tramite cui si manifesta il fenotipo sinciziale rimangono per il momento ignoti.

E' stato anche evidenziato come gB ricopra un ruolo chiave nell'egresso di HSV-1, in virtù dell'ubiquitinazione che è stata identificata sulla porzione citoplasmatica della glicoproteina. La presenza di ubiquitina fa sì che gB sia smistata ai *multivesicular bodies* (MVB), membrane modificate che intervengono nell'acquisizione dell'*envelope* da parte della progenie virale. Una delezione parziale della coda citoplasmatica di gB porta ad una consistente riduzione dell'ubiquitinazione (indicando che i siti di ubiquitinazione di gB risiedono nella coda citoplasmatica) ed in una diminuzione nella maturazione della progenie virale e del suo rilascio nel compartimento extracellulare (130).

### 1.3.8 L'esecuzione della fusione: gH/gL

gH è una glicoproteina di 110 kDa di tipo I, codificata dal gene UL22, e presenta epitopi per l'anticorpo LP11 (33), 52S e 53S, tutti in grado di neutralizzare l'infettività virale, dimostrando l'importanza del ruolo che essa ricopre nel processo fusogenico. Essa è costituita da 839 aminoacidi, che si dispongono in un esteso ectodominio provvisto di due  $\alpha$ -eliche, di cui una con caratteristiche di peptide di fusione, e due motivi a *heptad repeat*, una regione transmembrana ed una corta coda citoplasmatica di 14 residui.

gH forma un eterodimero con gL, glicoproteina solubile di 40 kDa prodotta dal gene UL1, che si comporta da *chaperone*. In mutanti in cui la sequenza UL1 è sostituita con sequenze non correlate si evidenzia non solo l'abbattimento dell'infettività virale, ma anche la mancata esposizione in membrana di gH, dimostrando l'importanza di gL nella maturazione e nella processazione del complesso (32, 131). Le regioni minime di interazione tra le due glicoproteine sono state identificate nei primi 323 residui di gH e nei primi 161 residui di gL, provando il coinvolgimento delle regioni amino-terminali delle due glicoproteine nella formazione di un complesso funzionale. La conformazione corretta di gH si ha invece con i primi 648 residui di gH e con gL intera, come confermato dalla reattività della gH solubile descritta nei confronti degli anticorpi conformazionali LP11 e 53S (132). Si ricordi anche che gL possiede un *locus* per la mutazione sinciziale *syn*, e quindi certamente svolge un ruolo nel controllo della fusione.

gH è una glicoproteina indispensabile per l'infettività virale in quanto la sua delezione produce una progenie non infettante e abolisce la fusione cellula-cellula (30). Inoltre, anticorpi neutralizzanti inibiscono l'ingresso del virus, ma non ne impediscono l'attacco sulla membrana, suggerendo che gH ricopra il suo ruolo nella fase di ingresso vero e proprio e non nelle sue fasi preliminari (133).

La glicoproteina contiene all'interno della sequenza 8 cisteine, di cui due, per analogia con quanto osservato per gH di HSV-2, dovrebbero formare un ponte disolfuro critico per l'attività fusogena (134).

Studi condotti mutagenizzando l'ectodominio hanno cercato di individuare le regioni critiche per la fusione e l'infettività, per capire il preciso ruolo della glicoproteina nella fusione. Diverse inserzioni hanno evidenziato l'importanza della regione C-terminale dell'ectodominio per l'esecuzione della fusione e per l'ingresso, mentre inserzioni nella



regione N-terminale inducono modificazioni conformazionali (135). La mutazione di un motivo RGD (arginina-glicina-aspartato), che poteva dimostrare un'eventuale interazione con le integrine durante il processo di fusione, non ha ridotto l'efficienza di ingresso nella cellula, invalidando quest'ipotesi (135), anche se è stata dimostrata l'interazione tra gH e le integrine (136). È quindi probabile che gH interagisca con i membri della famiglia di molecole di adesione, ma queste interazioni non siano indispensabili, ma piuttosto ne aumentino l'efficienza.

Inoltre, mutazioni introdotte nella regione transmembrana e nella coda citoplasmatica influiscono negativamente sull'infettività del virus, al contrario di quanto si verifica per gD. In particolare la sostituzione della glicina conservata in posizione 812 abbassa sensibilmente o annulla la capacità infettante del virus (137). Altre mutazioni nei 14 residui sul versante citoplasmatico aboliscono la capacità di formare sincizi in ceppi *syn3* nella fusione cellula-cellula, ma praticamente non influiscono sulla fusione tra *envelope* e membrana citoplasmatica, suggerendo che i due meccanismi di fusione differiscano leggermente (138).

Alcune osservazioni suggeriscono che gH sia una glicoproteina fusogena. È stata dimostrata la presenza di due  $\alpha$ -eliche all'interno dell'ectodominio, in corrispondenza dei residui 377-397 ( $\alpha$ -H1) (139) e dei residui 531-521 ( $\alpha$ -H2) (140) di cui la prima mostra proprietà di peptide interno di fusione. Infatti peptidi sintetici che mimano le due eliche  $\alpha$ -H1 e  $\alpha$ -H2 interagiscono con liposomi, in assenza di altre proteine o di porzioni di esse, inducendo la fusione tra le membrane lipidiche. Inoltre, aumentano l'infettività virale e la fusione mediata dalle quattro glicoproteine di HSV-1 (140). Riguardo alla sequenza  $\alpha$ -H1, una sua rimozione o sostituzione in gH comporta l'abolizione della fusione. Se però essa è sostituita con altri peptidi di fusione conosciuti, come quelli appartenenti a gp41 di HIV (*human immunodeficiency virus*) o alla glicoproteina G di VSV (*vesicular stomatitis virus*), l'infettività viene in parte recuperata (139).

Sono anche state identificate due regioni con caratteristiche di *heptad repeat*, in corrispondenza dei residui 443-471 e 556-585. Sequenze ad *heptad repeat* all'interno di proteine di fusione possono interagire fra loro, adottando una conformazione a *coiled coil*. In particolare sostituzioni volte a diminuire tale caratteristica compromettono la funzionalità della glicoproteina in saggi di fusione e complementazione, dimostrando come la presenza di *coiled coil* sia critica per la glicoproteina (141, 142). È stato anche

dimostrato che i due *heptad repeat*, detti HR-N e HR-C interagiscono tra loro, come evidenziato da tre osservazioni. In primo luogo, tramite corsa elettroforetica in gel di acrilammide non denaturante, si è osservato come i peptidi sintetici che mimano le sequenze di HR-N e HR-C si complessino, e la loro interazione mostra, attraverso analisi di dicroismo circolare, un incremento del contenuto di  $\alpha$ -elica. Per finire, mentre i singoli peptidi esercitano un'azione inibente sull'infettività virale, la miscela dei due perde l'attività inibitoria. E' quindi evidente come le due sequenze HR-N e HR-C interagiscano tra loro, indipendentemente dalla presenza delle regioni circostanti di gH (142).

Qualche tempo fa è stato suggerito che gH potesse interagire con B5, una glicoproteina di membrana di tipo II in grado di rendere suscettibili all'infezione di HSV-1 cellule altrimenti resistenti (143), ma questa osservazione non è stata confermata da evidenze sperimentali.

### **1.3.9 gK e UL20**

gK e UL20 sono proteine che condividono caratteristiche strutturali e funzionali. Entrambe hanno un carattere molto idrofobico e sono immerse nella membrana, che attraversano diverse volte: due o tre gK (144), quattro UL20 (145, 146).

gK, la sola delle due proteine ad essere glicosilata, possiede un *locus* per la mutazione *syn1*, e virus deleti nel gene di UL20 manifestano un fenotipo sinciziale (147), evidenziando come ambedue le proteine siano coinvolte nella regolazione negativa della fusione.

Quando espresse singolarmente in una cellula, gK e UL20 si localizzano nel reticolo endoplasmatico (41, 144, 148-150). Quando invece vengono coespresse le due proteine sono in grado di migrare e si localizzano nell'apparato del Golgi e nel TGN (*trans Golgi network*), ma non sono individuabili in membrana (42).

Le due proteine sono state espresse nel saggio di fusione cellula-cellula con il quartetto gB, gD e gH-gL, e si è osservata un'inibizione della fusione, più accentuata quando gK e UL20 sono coespresse (41, 42), suggerendo che il loro meccanismo di azione richieda la formazione di un complesso.

In mutanti deleti in gK e UL20 sono difettivi nell'egresso dei virioni, che si accumulano nello spazio perinucleare (147, 151), o, privi di *envelope*, nel citoplasma

(152, 153). Probabilmente le due proteine svolgono un ruolo di inibizione della fusione non solo quando esposte sulla membrana della cellula infettata, ma anche durante la processazione delle altre glicoproteine nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato del Golgi, dove si potrebbero verificare eventi di fusione indesiderati.

## **1.4 Farmaci antiherpetici e peptidi antivirali**

### **1.4.1 Farmaci antiherpetici**

L'aciclovir, un analogo sintetico aciclico della guanosina, rappresenta il farmaco d'elezione per il trattamento dell'infezione da HSV-1 e 2 ed ha un'ottima efficacia nel controllo dei suoi sintomi. L'azione antivirale si esplica nel momento in cui il nucleoside modificato viene utilizzato dalla DNA polimerasi di HSV per sintetizzare un nuovo filamento di DNA. Le caratteristiche strutturali del farmaco impediscono l'allungamento della catena fosforibosilica, determinando l'arresto della sintesi del genoma e quindi della creazione della progenie virale. Sono anche in uso il valaciclovir (che viene convertito a aciclovir) ed il famciclovir (convertito a penciclovir), profarmaci che manifestano una migliore biodisponibilità orale rispetto al relativo principio attivo. L'infezione iniziale, a livello delle mucose orali o genitali, può essere trattata con aciclovir, somministrato topicamente, per via orale, o intravenosa, ma nessun tipo di somministrazione ha effetto sul ripresentarsi delle infezioni ricorrenti. L'assunzione giornaliera di aciclovir riduce invece la frequenza delle infezioni ricorrenti fino ad un massimo del 80%, e le previene completamente nel 25-30% dei pazienti.

La somministrazione per via endovenosa od orale ha buoni effetti nei soggetti immunocompromessi, per i quali sono particolarmente efficaci trattamenti profilattici che riducono l'insorgere di eventi sintomatici dal 70% al 5-20%. Tra i pazienti trapiantati di midollo osseo e affetti da AIDS si verifica la maggiore incidenza di isolati di HSV resistenti all'aciclovir, sovente resistenti anche a famciclovir e penciclovir. L'insorgere della resistenza è dovuta al selezionarsi di virus privi di timidina chinasi, enzima fondamentale per l'attivazione del farmaco, o provvisti di timidina chinasi incapace di fosforilare l'aciclovir. Numerosi isolati resistenti presentano mutazioni a carico della DNA polimerasi. I virus resistenti all'aciclovir sono causa di polmoniti, encefaliti ed infezioni mucocutanee, in soggetti immunocompromessi.

Numerosi sforzi sono stati fatti per sviluppare un vaccino contro HSV, ma date le infezioni ricorrenti anche in individui già dotati dell'immunità umorale e cellulo-mediata, la vaccinazione profilattica sarà difficile da ottenere. Sono stati studiati due vaccini a subunità, uno in cui le subunità sono rappresentate da gD e gB, un altro composto dalla sola gD, ma con scarsi risultati (154).

#### **1.4.2 Peptidi: farmaci ed antivirali**

I peptidi sono catene peptidiche formate da un massimo di una cinquantina di aminoacidi legati tra loro da legami peptidici. Tali legami possono essere catalizzati sia dall'attività dei ribosomi durante il normale processo di biosintesi, oppure sintetizzati *in vitro*. In tal caso è possibile incorporare nelle catene nascenti D-aminocidi, che, grazie alla maggiore resistenza al taglio delle proteasi, conferiscono al peptide una maggiore stabilità.

*In vivo*, i peptidi assolvono a numerose importanti funzioni biologiche, basti pensare all'insulina, che è stato il primo peptide clonato ed espresso *in vitro*, ed utilizzato in clinica (155).

Oltre agli ormoni, come appunto l'insulina, anche neurotrasmettitori, citochine e chemochine sono peptidi secreti dalle cellule che hanno importanti ruoli nella comunicazione cellula-cellula e possono così controllare funzioni vitali quali il metabolismo, la risposta immunitaria, la crescita, la trasmissione del segnale nervoso, etc.

Grazie al ruolo che ricoprono nella regolazione di processi biologici e alla loro alta specificità verso il bersaglio biologico, i peptidi possono essere potenziali farmaci molto allettanti, e stanno acquisendo sempre maggiore importanza in ambito clinico e terapeutico.

Al giorno d'oggi, più di 140 peptidi sono regolarmente utilizzati in terapia e più di 400 sono in avanzata fase di studi preclinici. La maggior parte di questi sono agonisti di recettori e derivano da peptidi naturali.

Le patologie per cui esistono peptidi terapeutici sono molto differenti, dall'AIDS a patologie cardiovascolari, al cancro, all'artrite reumatoide, alla sclerosi multipla ed al diabete di tipo I.

Proprio nella cura e nella prevenzione del diabete di tipo I lo sviluppo di peptidi ha introdotto importanti progressi. Il diabete mellito di tipo I è una delle patologie autoimmuni più diffuse, causato da una reazione immunitaria che finisce per distruggere le cellule  $\beta$  del pancreas, produttrici di insulina. I pazienti vengono trattati cronicamente con iniezioni giornaliere di insulina, che rendono la terapia impegnativa e poco compatibile con le esigenze quotidiane.

Qualche tempo fa è stato sviluppato dalla DeveloGen AG DiaPep277 (156), un peptide non-insulinico che può sostituire l'insulina ricombinante o sintetica, riuscendo a prevenire l'insorgere del diabete in soggetti geneticamente predisposti, e a rallentare il progredire della patologia in soggetti in cui la morte delle cellule  $\beta$  è già in atto. Il peptide DiaPep277, mimando un autoantigene bersagliato durante l'insorgere del diabete mellito, causa una drastica diminuzione dell'infiammazione del pancreas e consente la prosecuzione della produzione di insulina.

Nell'ambito terapeutico, i peptidi mostrano numerosi vantaggi, quali ad esempio le elevate attività e specificità, la bassa immunogenicità (in diversi casi) e la bassa tossicità, in quanto composti da aminoacidi, molecole naturali dell'organismo. In particolare, i peptidi sono molto indicati ad essere utilizzati per inibire le interazioni tra superfici proteiche, che difficilmente possono essere inibite da piccole molecole. La scoperta e lo sviluppo di nuovi peptidi può essere supportata da approcci combinatoriali quali lo *screening* di librerie fagiche o aptameri.

Sono però numerosi anche gli svantaggi, quali ad esempio una breve emivita all'interno dell'organismo, una bassa biodisponibilità quando somministrati *per os*, che porta l'iniezione ad essere il metodo di somministrazione per eccellenza, ed una scarsa propensione a diffondere all'interno delle cellule.

Nel corso dell'ultima ventina d'anni sono stati disegnati numerosi peptidi che mimano diversi elementi coinvolti nel ciclo infettivo di HIV-1. I più rilevanti per il nostro studio sono quelli disegnati sulla glicoproteina dell'*envelope* gp41, in grado di inibire la fusione del virus con la membrana cellulare. Dai primi anni '90 sono stati identificati peptidi sintetizzati sulla sequenza aminoacidica degli *heptad repeat* HR1 e HR2 di gp41 che evidenziavano un'attività antivirale. Le due sequenze HR1 e HR2 devono associarsi durante il processo di ingresso del virus, a formare una struttura a 6 eliche (*six-helix bundle*) determinante per l'esecuzione della fusione (157-159).

Il primo peptide anti-HIV descritto è stato il DP-106, che mima la sequenza aminoacidica di una parte della regione HR1 di gp41 (157). In seguito un altro peptide, chiamato DP-178, disegnato su parte della sequenza della regione HR2, ha mostrato un aumento dell'attività *in vitro*, rispetto al DP-107 (158). Questo peptide, rinominato T-20, è successivamente passato alla fase clinica con il nome di *enfuvirtide*.

T-20 (enfuvirtide o Fuzeon®) è stato il primo inibitore dell'ingresso virale a base peptidica approvato dalla *Food and Drug Administration* nel marzo del 2003, indicato nel trattamento dell'infezione di HIV-1 (160). T-20 è composto da 36 aminoacidi che mimano la sequenza HR-2 di gp41, e manifesta una potente attività antivirale contro diversi isolati di HIV-1, interferendo con la formazione del *six-helix bundle* indispensabile per la fusione delle membrane cellulare e virale (161). L'*Enfuvirtide* è stato sviluppato dalla Trimeris Pharmaceutical ed affidato alla Roche per lo sviluppo commerciale. E' utilizzato per la terapia di soggetti sieropositivi che abbiano già manifestato resistenza ad almeno uno dei farmaci appartenenti alle altre classi di antiretrovirali (inibitori della trascrittasi inversa e delle proteasi), oppure che abbiano manifestato forme di intolleranza verso altri trattamenti antiretrovirali. Tali restrizioni sono dovute al tipo di somministrazione, dato che le due iniezioni giornaliere provocano spesso infiammazioni nel sito di iniezione, oltre al rischio dell'insorgere di resistenza.

Per quanto riguarda il virus Herpes Simplex 1 (HSV-1) e le glicoproteine che ne ricoprono l'*envelope*, il primo studio che ha utilizzato peptidi risale al 1994 (162). In questo lavoro si è utilizzata una libreria di peptidi sintetici per dimostrare che due regioni della glicoproteina C erano coinvolte nel legame con l'eparan solfato.

Numerosi laboratori hanno evidenziato come peptidi omologhi a regioni ad *heptad repeat* delle glicoproteine gB e gH di HSV-1 (142, 163) e della glicoproteina B dell'herpes virus bovino (BHV-1) (164) e di Citomegalovirus (hCMV) (165) inibiscono l'infezione, suggerendo che tali peptidi vadano ad interferire con riarrangiamenti conformazionali. Tali riarrangiamenti portano alla formazione di strutture a forcina (*hairpin*) energeticamente stabilizzate da *coiled coil*, e l'energia rilasciata contribuirebbe alla fusione dell'*envelope* virale con la membrana cellulare. Peptidi che mimano determinate porzioni di glicoproteine inibiscono la formazione di contatti intra- ed inter-molecolari che portano alla conformazione attiva.

Peptidi disegnati con approccio razionale che mimano le regioni ad *heptad repeat* di gB di Citomegalovirus hanno dimostrato di essere efficaci inibitori dell'infezione virale (166). Più recentemente, peptidi disegnati su regioni di gB e gH ad alta idrofobicità hanno mostrato un'inibizione dell'infettività. La caratteristica idrofobica di tali regioni suggerisce che queste, nella conformazione delle glicoproteine, vengano a trovarsi sull'interfaccia di interazione con altre proteine, ricoprendo ruoli essenziali per l'esecuzione della fusione (167).

I peptidi possono quindi rappresentare inibitori dell'ingresso di HSV-1 nella cellula ospite, e sicuramente ottimi strumenti di studio delle glicoproteine che mediano i primi stadi dell'infezione.

# **Capitolo II**

**Rilevamento e caratterizzazione del complesso formato dal quartetto di glicoproteine gD, gB, gH e gL**



## 2.1 Obiettivo

Un importante obiettivo di ricerca è la comprensione delle interazioni che intercorrono tra le glicoproteine fondamentali che mediano la fusione e l'ingresso di HSV-1 nella cellula ospite, gD, gB, gH e gL. A questo riguardo, allo scopo di comprendere come le quattro glicoproteine si coordinino tra loro è indispensabile riconoscere i complessi che vengono formati nelle loro conformazioni pre-fusogenica ed attiva e, la catena di interazioni che segnala l'incontro di gD con il recettore cellulare che culmina nell'attivazione di gB e gH/gL.

L'attuale modello di ingresso e fusione mediati dall'attivazione di gD prevede che: (i) L'ectodominio di gD sia organizzato in due regioni distinte sia dal punto di vista funzionale che topologico. La regione amino-terminale, che ricopre gli aminoacidi dal 1 al 240/260 circa, in cui risiedono i siti di legame ai recettori cellulari, e la regione carbossi-terminale in cui risiede il dominio pro-fusogenico, ma non i siti di legame ai recettori. (ii) gD non legata adotti una conformazione auto-inibita, in cui la regione carbossi-terminale si ripiega intorno alla porzione amino-terminale, occupando i siti di legame ai recettori; (iii) al momento del legame del recettore, gD si riorganizza passando da una conformazione chiusa ad una aperta, il dominio carbossi-terminale si rimuove dal suo sito di legame ed espone il dominio pro-fusogenico. Per finire, la forma attiva di gD causa l'attivazione di gB e gH/gL (22, 168).

E' stato ipotizzato che gB e gH/gL vengano attivate dal reclutamento di gD, e che il dominio pro-fusogenico contenga i siti di legame per gB e gH/gL (71, 75). Una possibile alternativa è che il dominio carbossi-terminale di gD renda possibili i cambiamenti conformazionali di gD, ma non contiene siti di legame per gB o gH/gL.

Per validare questo modello le interazioni all'interno del quartetto sono state studiate approfonditamente. E' stato così osservato che cellule infettate da HSV contengono un complesso che co-immunoprecipita formato da HVEM, gD e gH (80).

Tramite il saggio di complementazione *split GFP* (81, 82), in cellule trasfettate sono state caratterizzate le interazioni gD-gB, gD-gH/gL e gB-gH/gL. Le prime due sono state identificate in cellule trasfettate con due o tre glicoproteine e si può pensare che rispecchino interazioni che hanno luogo prima dell'attivazione di gD. Al contrario l'interazione gB-gH/gL è stata osservata al momento della fusione. Non è ancora stato approfondito se tali interazioni avvengano solamente in cellule trasfettate in condizioni

di iper-espressione, e se portino alla formazione un complesso biochimicamente definito. Inoltre, dal momento che la complementazione del saggio *split GFP* stabilizza irreversibilmente anche interazioni deboli o transienti, rischiando di fornire falsi positivi.

L'obiettivo di questo lavoro è stato fornire la prova biochimica della formazione di complessi tra le glicoproteine del quartetto e di verificare se tali complessi siano presenti nelle cellule infette e nei virioni, e se essi siano formati al momento dell'ingresso del virus nella cellula. Abbiamo analizzato la composizione dei complessi con due approcci, la co-immunoprecipitazione ed il saggio di *pull-down*, che sfrutta la peculiarità di proteine dotate di *One-Strep Tag* di essere legate da una resina *Strep-Tactin*.

Sono stati identificati complessi con la stessa composizione sia in cellule infette che trasfettate, ed in virioni prima dell'ingresso nella cellula. Utilizzando un pannello di mutanti di gD, è stata condotta una localizzazione preliminare delle regioni della glicoproteina critiche per il legame di gB e gH/gL.

## 2.2 Materiali e metodi

*Virus e cellule.* Le cellule sono state fatte crescere in terreno DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) contenente siero FCS (*Fetal Calf Serum*) al 5-20%. Il virus herpes simplex-1 (F) è descritto in (169). I virus mutanti F-gD $\beta$  (31),  $\Delta$ gB-K $\Delta$ T (106),  $\Delta$ gH SCgHZ (30), e  $\Delta$ gL (32) sono stati cresciuti e titolati nelle rispettive cellule complementanti. Tali virus esprimono fenotipicamente tutte le glicoproteine, ma geneticamente sono privi della glicoproteina indicata. Sono quindi in grado di eseguire un singolo ciclo di infezione, e la progenie prodotta può esprimere la proteina mancante, nella forma *wildtype* o mutata, solo se trasfettata nelle cellule infettate.

*Anticorpi.* L'anticorpo policlonale (PAb) R8, diretto contro gD, e l'anticorpo monoclonale (MAb) BD80, diretto contro l'epitopo localizzato tra i residui 264-275 di gD, matura sono stati forniti dal Dott. G.H. Cohen e dalla Dott.ssa R. Eisenberg; i MAbs HD1, HC1, H233 sono stati donati dalla Dott.ssa L Pereira. I PAb diretti contro gH e gL sono stati donati dalla Dott.ssa H. Browne e dal Dott. D. Johnson. I MAb H170 (reattivo contro l'epitopo localizzato ai residui 1-23 di gD matura), H1817 ed H633 sono stati acquistati dal Goodwin Institute. I MAb 52S, 53S, 30 e 5E1 sono descritti in (170), (171) e (61). Il MAb 52S reagisce verso un epitopo conformazionale di gH, il MAb 53S reagisce verso un epitopo conformazionale di gH dipendente dalla presenza di gL. Il MAb V5 è stato acquistato da Invitrogen.

*Saggi di resa virale.* Cellule Vero sono state cresciute in piastre da 12 pozzetti ed infettate con i virus indicati ad una molteplicità di infezione (*m.o.i.*) di 0.1 per 90 min a 37°C. L'inoculo è stato rimosso ed inattivato con lavaggio acido (acido citrico 40 mM, KCl 10 mM, NaCl 135 mM, pH 3). I replicati sono stati congelati ai tempi indicati, ad esempio a 3, 24 e 40 ore dopo l'infezione. La progenie virale è stata titolata in cellule Vero.

*Plasmidi.* I vettori di espressione in cellule di mammifero codificanti per gH, gL e gB in vettore MTS, e gD in vettore pcDNA3.1(-), tutti sotto il controllo del promotore di CMV sono descritti in (41). I plasmidi codificanti per HVEM (pBEC), HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*) sono descritti in (65) e (172), gD $\Delta$ PFD (rinominato gD $\Sigma$ 260-310), gD<sub>TP</sub>, gD<sub>PP</sub> sono descritti in (75, 77).

*Introduzione di epitopi (tag) in gH, gL e gC.* Per rendere possibile il rilevamento ed il legame alla resina, gH, gL e gC sono state dotate di epitopi eterologhi. L'epitopo 5E1 è

costituito da una sequenza di 27 residui aminoacidici riconosciuti dall'anticorpo monoclonale 5E1, derivata dall'herpes virus umano 7 (HHV-7) (170). L'epitopo *One-STrEP-tag (Strep)* è stato messo a punto e commercializzato dalla IBA GmbH, ed è una sequenza di 30 aminoacidi (SAWSHPQFEK(GGGS)2GGSAWSHPQFEK), in grado di legarsi alla Streptavidina, nella tasca in cui si lega la D-Biotina (173).

In gH è stato inserito l'epitopo 5E1(gH<sub>5E1</sub>), in gL il sito di taglio per la trombina e gli epitopi 5E1 e poli-istidina (*poly-Histidine*) (gL<sub>5E1.His</sub>), immediatamente a monte del codone di stop.

Per generare gH<sub>5E1</sub> è stato introdotto un sito di taglio per l'enzima di restrizione SphI nella coda citoplasmatica di gH in luogo del codone di stop, tramite mutagenesi sito specifica utilizzando gli oligonucleotidi 5'-CCG TTT TTT TGG AGA CGC ATG CAA AGT GGG CGT GAA TTC GGC CGT TTC TCC GCC C-3' e 5'-GGG CGG AGA AAC GGC CGA ATT CAC GCC CAC TTT GCA TGC GTC TCC AAA AAA ACG G-3'. Gli oligonucleotidi contengono un sito di restrizione EcoRI per lo *screening* ed introducono la mutazione E838M. Due oligonucleotidi in grado di appaiarsi hanno generato la sequenza dell'epitopo 5E1 5'- ACA TGC ATG CAT GTT TCC AGA CCA AGC ACT ACA CCC TCT GGG AAC TCT GCA AGA TAT GGG-3' e 5'-GGA AGA TCT GGT ACC TTA CGG AGT TAT ACT TCT AGG TGT GTT ATT CCC ATA TCT TGC AGA GTT CCC-3', e sono stati introdotti nella sequenza di gH digerita SphI/BglII. Gli oligonucleotidi contengono il sito di restrizione Asp718 in modo da consentire lo *screening*. La sequenza aminoacidica della coda citoplasmatica di gH<sub>5E1</sub> è stata così modificata in ILKVLRTSVP FWRMHVSR PGSTTPSGNS ARYGNTPRS ITP.

Per generare gH<sub>ST.V5</sub>, indicato anche come gH<sub>ST</sub>, abbiamo adottato un strategia simile; sono stati utilizzati gli oligonucleotidi 5'-GGA GAC GCA TGC TAA TCG AAG GGC GAG GTA AGC CTA TCC CTA ACC CTC TCC TAG GCC TCG ATT CTA CGA GCG CTT GGA AGC-3' e 5'-GGT AGT AGA TCT CAT TTT TCG AAC TGC GGG TGG CTC CAC GAT CCA CCT CCC GAT CCA CCT CCG GAA CCT CCA CCT TTC TC-3' in grado di appaiarsi tra loro, codificanti per il sito di taglio della proteasi Fattore Xa e gli epitopi V5 e One-STrEP Tag. Sono stati inseriti nella sequenza di gH digerita con SphI/BglII. In questo modo la sequenza aminoacidica della coda

citoplasmatica di gH è divenuta ILKVLRTSVP FFWRMLIEG RGLPIPPLL GLDSTSAWSHP QFELGGGSGG GSGGGSWSHP QFEK.

Per generare gL<sub>5E1.His</sub> abbiamo essenzialmente adottato una strategia simile, inserendo il sito di taglio NheI per mezzo di mutagenesi sito-specifica in luogo del codone di stop, utilizzando gli oligonucleotidi 5'-CCC CAC TCC CGG CGC CTG CTA GCA TGA ATT CAC GGA AAC CCG TCC GGG TTC GGG-3' e 5'-CCC GAA CCC GGA CGG GTT TCC GTG AAT TCA TGC TAG CAG GCG CCG GGA GTG GTG GGG-3'. Gli oligonucleotidi, in grado di appaiarsi, 5'-CTA TAG CTA GCC CTG GTT CCG CGT GGA TCC TCC AGA CCA GGA AGC ACT ACA CCC TCT GGG AAC TCT GCA AGA TAT GGG AA-3' e 5'-GGA AGA TCT TCA ATG GTG ATG GTG ATG ATG CGG AGT TAT ACT TCT AGG TGT GTT ATT CCC ATA TCT TGC AGA GTT CCC-3' codificano per gli epitopi trombina-5E1-His, e sono stati inseriti nella sequenza di gL digerita NheI/BglII. La sequenza aminoacidica della porzione C-terminale di gL è stata così modificata da SRRL a SRLLALVPR GSSRPGSTTP SGNSARYGNNT PRSITPHHHHHH.

Per generare gL<sub>V5-His</sub> sono stati utilizzati gli oligonucleotidi in grado di appaiarsi 5'-ATG CTC GCT AGC TGG TAA GCC TAT CCC TAA CCC TCT CCT CGG TCT CGA TTC TAC GC-3' e 5'-TTA GCG AGA TCT CAA TGG TGA TGA TGG TGA TGA TGA ACG GTA CGC GTA GAA TCG AGA C-3'. Tali oligonucleotidi formano la sequenza codificante per gli epitopi V5 e His, che è stata ligata all'interno della sequenza di gL digerita NheI/BglII. La sequenza aminoacidica della porzione C-terminale di gL è stata così modificata da SRRL a SRLLAGLPI PNLLGLDST RTVHHHHHHH.

Per ottenere gC<sub>V5</sub>, l'ORF di gC è stata amplificata per PCR dal DNA di HSV-1 (F) utilizzando oligonucleotidi che generassero al 3' del prodotto di PCR la sequenza per l'epitopo V5: 5'AGA TCT AGG CCT ATG GCC CCG GGG CGG GTG GGC CTT GCC G TG GTC CTG TGG AGC CTG e 5'-GCA CGG GGC GGC CGC TTA CGT AGA ATC GAG ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT AGG GAT AGG CTT ACC GGC TAG CCG CCG ATG ACG CTG CCG CGA CTG TGA TGT GCG G-3'. La sequenza, digerita StuI/NotI è stata ligata all'interno del vettore MTS.

Per tutti i plasmidi, l'intera ORF è stata sequenziata.

*Ingegnerizzazione genetica di HSV1(BAC)-gD<sub>ST</sub>*. HSV1(BAC)-gD<sub>ST</sub> è stato generato per “ricombinazione *galK*” utilizzando la tecnologia del cromosoma artificiale di batterio (BAC), utilizzando il ceppo di *E.coli* SW102 e *galK* (galattochinasi) come *marker* di selezione, gentilmente fornito dal Dott. N.G. Copeland (174). pYEBac102 HSV-BAC è stato fornito dal Dott. Y. Kawaguchi, e contiene le sequenze BAC inserite tra i geni UL3 ed UL4. La cassetta *galK* è stata inserita per ricombinazione in HSV-1(BAC) in modo da prendere il posto del codone di stop di gD. Per ottenere ciò, la cassetta è stata amplificata per PCR utilizzando come stampo il plasmide pGalK utilizzando degli oligonucleotidi che si appaiassero con il 5' alle sequenze a monte e a valle del codone di stop di gD. Gli oligonucleotidi utilizzati per l'amplificazione sono 5'- CCC ACA TCC GGG AAG ACG ACC AGC CGT CCT CGC ACC AGC CCT TGT TTT ACC CTG TTG ACA ATT AAT CAT CGGCA-3' e 5'CAT CCC AAC CCC GCA GAC CTG ACC CCC CCG CAC CCA TTA AGG GGG GGT ATT CAG CAC TGT CCT GCT CCTT-3. Il prodotto di PCR è stato introdotto per ricombinazione in HSV-1 BAC ed i batteri ricombinanti sono stati selezionati utilizzando terreni essenziali, che contengono galattosio come unica fonte di carbonio. Successivamente, la cassetta *galK* è stata sostituita con la sequenza codificante per il One-StrEP-Tag, utilizzando un oligonucleotide a doppio filamento, recante le sequenze fiancheggianti omologhe alle sequenze di gD a monte e a valle del codone di stop. L'oligonucleotide a doppio filamento è stato ottenuto per appaiamento ed estensione due oligonucleotidi sintetici: 5'-CCC ACA TCC GGG AAG ACG ACC AGC CGT CCT CGC ACC AGC CCT TGT TTT ACA GCG CTT GGA GCC ACC CGC AGT TCG AGA AAG GTG GAG GTT CCG GAG GTG GAT CGG GA-3' e 5'CAT CCC AAC CCC GCA GAC CTG ACC CCC CCG CAC CCA TTA AGG GGG GGT ATT CAT TTT TCG AAC TGC GGG TGG CTC CAG GAT CCA CCT CCC GAT CCA CCT CCG GAA CC-3'. La ricombinazione omologa dell'oligonucleotide a doppio filamento all'interno di HSV-BAC è stata selezionata in base all'assenza della cassetta *galK*, utilizzando la resistenza al 2-deossalgalattosio in piastre con terreno minimo contenente glicerolo come fonte di carbonio. Per mantenere le sequenze HSV-BAC si è operata la selezione per mezzo di cloramfenicolo. Per ricostituire il virus, il DNA ricombinante HSV1(BAC)gD<sub>ST</sub> è stato estratto dai batteri e trasfettato in cellule 293T. La porzione al 3' del gene di gD è stato sequenziata dal DNA estratto dai batteri e dallo stock virale.

*Costrutti di gD.* La mappa lineare che riassume i costrutti di gD utilizzati in questo studio è rappresentata in Fig 2.6. Per generare gD<sub>Σ240-260</sub>, il plasmide di partenza conteneva già un sito di restrizione Asp718 in corrispondenza dell'aminoacido 260 (175). Un ulteriore sito Asp718 è stato inserito in corrispondenza dell'aminoacido 240 per mezzo di mutagenesi sito-specifica, utilizzando gli oligonucleotidi 5'- CAG CTT GAA GAT CGC GGT ACC GAA GCT TCC CAA GGC CCC ATA CAC GAG CAC CC-3' e 5'- GGG TGC TCG TGT ATG GGG CCT TGG GAA GCT TCG GTA CCG CGA TCT TCA AGC TG-3'. Un *linker* serina-glicina di 18 residui è stato ottenuto con due oligonucleotidi sintetici in grado di appaiarsi, 5'-PHO-GTA CCC AGT AGT GGC GGT GGC TCT GGA TCC GGC TCG AGC GGA GGC GGT AGC GGG-3' e 5'-PHO-GGT CAT CAC CGC CAC CGA GAC CTA GGC CGA GCT CGC CTC CTC CAT CGC CCC ATG-3', che sono stati ligati nella sequenza di gD digerita Aps718. L'orientamento è stato definito per *colony PCR*, e confermato per sequenziamento.

Per generare gD<sub>Σ218-240</sub> si è adottata una strategia simile. Sono stati inseriti due siti di restrizione Asp718 all'interno del plasmide di gD in corrispondenza degli aminoacidi 218 e 240, tramite mutagenesi sito-specifica. Il sito Asp718 in corrispondenza del residuo 218 è stato introdotto utilizzando gli oligonucleotidi 5'-TGA CGG TGG ACA GCA TGG TAC CGC TGC CCC GCT TCA TCC-3' e 5'-GGA TGA AGC GGG GCA GCG GTA CAA TGC TGT CCA CCG TCA-3'; il sito Aps718 in corrispondenza del residuo 240 è stato inserito utilizzando gli oligonucleotidi descritti precedentemente riguardo all'ingegnerizzazione di gD<sub>Σ240-260</sub>. Il DNA codificante per il *linker* serina-glicina di 18 aminoacidi è stato ottenuto come descritto in precedenza, e ligato nella sequenza di gD digerita Asp718. L'orientamento è stato definito per *colony PCR*, e confermato per sequenziamento.

Il materiale di partenza per la generazione di gD<sub>Δ61-218</sub> è stato prodotto dalla Dott.ssa L. Menotti nel corso di uno studio precedente (176).

Brevemente, l'ORF di gD, clonata in un vettore disegnato per eseguire la ricombinazione omologa di gD mutante in HSV-BAC, è stato mutagenizzato inserendo il sito di restrizione NdeI in corrispondenza degli aminoacidi 60 e 218. Due oligonucleotidi sintetici parzialmente complementari codificanti per un *linker* serina-glicina di 18 residui (5'-PHO-TAG TAG TGG CGG TGG CTC TGG ATC CGG CTC GAG CGG AGG CGG TAG CGG GAG TGG-3' e 5'-PHO-TAC CAC TCC CGC TAC

CGC CTC CGC TCG AGC CGG ATC CAG AGC CAC CGC CAC TAC-3'') sono stati ligati all'interno della sequenza di gD digerita NdeI. In seguito, il frammento contenente la ORF parzialmente deleta è stato escisso utilizzando gli enzimi SacII e HindIII e clonato nella ORF di gD in pcDNA3.1.

Per generare gD<sub>Σ240-310</sub>, tramite mutagenesi sito-specifica sono stati introdotti i siti di restrizione Asp718 in corrispondenza degli aminoacidi 240 e 310 della gD *wildtype*, utilizzando gli oligonucleotidi 5'-CAG CTT GAA GAT CGC GGT ACC GAA GCT TCC CAA GGC CCC ATA CAC GAG CAC CC-3' e 5'-CAT CCC CCG GCG GTA CCG AAC AAC ATG GGC CTG-3'. La porzione di CD8 corrispondente alla porzione di gD compresa tra i residui 240 e 310 è stata ottenuta per PCR utilizzando gli oligonucleotidi 5'-CGG GGT ACC CAG TGG CGG TAG TTC GGC CCT GAG CAA CTC CATC-3' e 5'-GCGC CCA GAT GTA GAT AGG TAC CGC GAA GTC CAG CCC CCT CGT GTGC-3', digerita con Asp718, e ligata all'interno della sequenza di gD digerita con Asp718. L'orientamento corretto è stato determinato per *colony PCR* e confermato per sequenziamento.

Per generare gD<sub>Δ6-60</sub>, sono stati introdotti due siti di restrizione EcoRI all'interno della sequenza di gD in pcDNA3.1(-) per mutagenesi sito-specifica, in seguito all'eliminazione di un sito EcoRI presente nel vettore. Il sito EcoRI in corrispondenza del residuo 6 di gD è stato introdotto utilizzando gli oligonucleotidi 5'-CAA ATA TGC CTT GGC GGA GAA TTC TCT CAA GAT GGC CG-3' e 5'-CGG CCA TCT TGA GAG AAT TCT CCG CCA AGG CAT ATT TG-3', il sito EcoRI in corrispondenza del residuo 59 di gD è stato introdotto utilizzando gli oligonucleotidi 5'-CAC GGT TTA CTA CGC GAA TTC GGA GCG CGC CTG CCG-3' e 5'-GGC AG GC GCG CTC CGA ATT CGC GTA GTA AAC CGTG-3'. gD, digerita con EcoRI, è stata rilegata, perdendo il frammento tra i due siti EcoRI. Per tutti i plasmidi, la ORF è stata sequenziata.

*Co-immunoprecipitazioni e pull-down.* Le co-immunoprecipitazioni sono state condotte sia su cellule infette che trasfettate. Cellule 293T sono state infettate con 5 PFU per cellula con i seguenti virus: HSV-1(F), ΔgD, ΔgB, ΔgH, ΔgL HSV, titolati in cellule Vero o nelle opportune cellule complementanti. Per consentire il rilevamento di gH e gL, le cellule sono state trasfettate con gH<sub>5E1</sub> e gL<sub>5E1.His</sub> (5 e 3 μg di DNA per fiasca T<sub>25</sub>, rispettivamente), 6 ore prima dell'infezione con i virus HSV-1(F), ΔgD e ΔgB. Le



cellule infette sono state raccolte 18 ore dopo l'infezione. Cellule U251, SK-N-SK, HEL and HFF sono state infettate con i virus HSV-1(F) o  $\Delta$ gD (5 PFU/cell). E' stata utilizzata una quantità di cellule tre volte superiore a quella utilizzata in con le cellule 293T. Per consentire il rilevamento di gH e gL, le cellule sono state trasfettate con gH<sub>5E1</sub> and gL<sub>5E1.His</sub>(15 e 9  $\mu$ g DNA per fiasca T<sub>75</sub>, rispettivamente) 6 ore prima dell'infezione. Le cellule infette sono state raccolte 18 ore dopo l'infezione.

Le cellule 293T sono state trasfettate in fiasche T<sub>25</sub> con l'appropriata miscela di plasmidi (1,5  $\mu$ g di DNA per ogni plasmide) e di agente trasfettante Arrest-in (Celbio, Milano). Quando indicato, pBEC è stato trasfettato in quantità di 3  $\mu$ g DNA per fiasca T<sub>25</sub> (2X). Nelle miscele di trasfezione in cui è stato escluso uno dei plasmidi, l'assenza è stata compensata con il plasmide codificante per HER-2, in modo da non variare la quantità totale di DNA trasfettato. Le cellule sono state raccolte 18 ore dopo la trasfezione, prima della comparsa di sincizi, senza venire congelate.

Per la co-immunoprecipitazione, in un esperimento tipico, le cellule da due repliche T<sub>25</sub> (o da una T<sub>75</sub>) sono state solubilizzate in 200 (o 300)  $\mu$ l di soluzione EA1 (acido 4-2-idrossietil-1-piperazinil-etansolfonico (HEPES) 50 mM, NaCl 250 mM, Igepal 0.1 %) contenente gli inibitori delle proteasi N <sub>$\alpha$</sub> -p-Tosil-L-lisina clorometilchetone idrocloruro ed N <sub>$\alpha$</sub> -p-Tosil-L-fenilalanina clorometil chetone alla concentrazione finale 0.3 mM, come descritto in (80), a 4°C per 20 minuti. I lisati sono stati centrifugati a 14.000 rpm per 30 minuti. I surnatanti sono stati incubati per 1 ora a 4°C con siero preimmune di coniglio (2  $\mu$ l di siero per 200  $\mu$ l di surnatante) ed adsorbiti a Proteina-A coniugata a Sepharose (Sigma-Fluka, Milano), per rimuovere le molecole che interagiscono in modo aspecifico con gli anticorpi. Le frazioni non legate sono in seguito state incubate con il PAb R8 diretto contro gD (2  $\mu$ l/200  $\mu$ l) *overnight* a 4°C e poi con 10 mg di Proteina A coniugata a Sepharose per 1 ora a 4°C. La resina è stata lavata 3 volte con la soluzione EA1 contenente inibitori delle proteasi, ed una volta con Tris-HCl 50 mM a pH 7.5 e NaCl 15 mM.

Gli esperimenti di *pull-down* di gH<sub>ST</sub> sono stati condotti in cellule 293T trasfettate (2 fiasche T<sub>25</sub> per campione), gli esperimenti di *pull-down* di gD<sub>ST</sub> sono stati condotti su virioni HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub> da soli, od adsorbiti alle cellule. Negli esperimenti di *pull-down* da cellule 2 fiasche T<sub>25</sub> in duplicato (o i virioni nella quantità indicata) sono state solubilizzate con 200  $\mu$ l di soluzione EA1-plus (HEPES 50 mM, NaCl 250 mM, Igepal

0.5%, pH 8), contenente gli inibitori delle proteasi N<sub>α</sub>-p-Tosil-L-lisina clorometilchetone idrocloruro ed N<sub>α</sub>-p-Tosil-L-fenilalanina clorometil chetone, a 4°C per 20 minuti. I lisati sono stati centrifugati a 14000 rpm per 60 minuti. I surnatanti sono stati pre-incubati per 1 ora a 4°C con Proteina A coniugata a Sepharose (Sigma-Fluka, Milano). La frazione non legata è stata poi incubata con Strep-Tactin Sepharose (IBA GmbH, Gottingen, Germania) nella quantità di 30μl per 200 μl di lisato per 1 ora a 4°C e lavata 5 volte con la soluzione di lavaggio della resina (Tris-HCl 100mM pH8,, NaCl 150 mM e acido etilendiamminicotetracetico (EDTA) 1mM, secondo le istruzioni del produttore).

Sia per gli esperimenti di co-immunoprecipitazione che di *pull-down*, il materiale derivante da 2 fiasche è stato solubilizzato con 120μl di soluzione per i campioni (sodio dodecilsolfato 2%, β-mercaptoetanololo 50 mM, Tris-HCl 50 mM, pH7 e saccarosio 2.5%), bollito e caricato in due diversi gel, uno per il rilevamento tramite *western blot*, per gD e gB, ed uno per il rilevamento dello STREP-Tag, per gH e gL.

*Western-blot (WB)*. Le proteine sono state separate per elettroforesi in gel contenenti l'8,5% di poliacrilammide (PAGE), trasferite su membrane di nitrocellulosa Hybond ECL GE Healthcare (Milano) e sviluppate utilizzando l'Amersham ECL Advance Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare).

*Espressione sulla superficie cellulare*. Sono stati condotti saggi immunoenzimatici sulla superficie cellulare (C-ELISA- *cell enzyme linked immunosorbent assay*) come descritto in (98) e (177). Cellule 293T seminate in piastre da 48 *well* sono state trasfettate con i plasmidi codificanti per gD *wildtype* o mutante (nella quantità di 125 o 375 ng a pozzetto, corrispondente alle quantità 1X o 3X). 16 ore dopo, le cellule sono state incubate con MAb H170 o BD80, fissate con paraformaldeide ed incubate con anticorpo anti-mouse coniugato a alla perossidasi. Per misurare l'espressione di superficie di gH, cellule 293T sono state con miscele di plasmidi codificanti per gHwt/gLwt, gH<sub>5E1</sub>/gL<sub>5E1.His</sub>, o gH<sub>st</sub>/gL<sub>V5.His</sub>. Dopo 16 ore le cellule sono state incubate con MAb 53S, fissate con paraformaldeide ed incubate con anticorpo anti-mouse coniugato alla perossidasi. Tutte le misure sono state condotte in triplicato.

*Saggio di fusione cellula-cellula*. Il saggio di fusione cellula-cellula con luciferasi è stato condotto secondo quanto descritto in (99, 177) utilizzando il *Luciferase Assay System* Promega (Firenze, Italia) in cellule 293T. La quantità totale di DNA è mantenuta

costante con l'aggiunta di plasmide codificante per Her2. Tutte le misure sono state prese in triplicato.

*Complementazione dell'infettività.* Il saggio è stato condotto come descritto in (75). Cellule 293T in fiasche T<sub>75</sub> sono state trasfettate con l'appropriata quantità di plasmide codificante per gD. Dopo 4 ore, le cellule sono state infettate con un virus gD<sup>-/+</sup> di FgDβ (3 PFU per cellula). I virioni non penetrati sono stati rimossi con due lavaggi di soluzione salina fosfata (PBS), ed inattivati con un lavaggio di un minuto di acido citrico 40 mM, KCl 10 mM, NaCl 135 mM a pH3. I monostrati sono stati successivamente lavati due volte con PBS ed incubati con mezzo di coltura contenente siero fetale di vitello (FCS) all'1%. Le cellule sono state incubate *overnight* a 37 °C. La progenie virale extracellulare è stata ultracentrifugata, analizzata in *western blot* e titolata in cellule R6 complementanti gD.

## 2.3 Risultati

*Ingegnerizzazione di tag alle glicoproteine di HSV-1.* La dimostrazione biochimica della formazione di complessi tra le quattro glicoproteine di HSV-1 mediante tecniche di co-immunoprecipitazione o *pull-down* richiede la disponibilità di anticorpi specifici da utilizzare in *western blot* per identificare le glicoproteine complessate alla glicoproteina esca. Il rilevamento di gH e gL è stato il principale fattore limitante in questo studio, determinante sulla sensibilità dei saggi. Per superare questo limite, gH e gL sono state dotate dei seguenti epitopi eterologhi: 5E1 (170), poli-istidina, V5-poli-istidina e One-STrEP Tag. Tutti gli epitopi sono stati introdotti subito a monte del codone di stop. In gC è stato ingegnerizzato l'epitopo V5, in maniera simile. Come mostrato in Fig.1 le glicoproteine dotate di epitopo, chiamate gH<sub>5E1</sub>, gL<sub>5E1.His</sub>, gH<sub>st.V5</sub>, gL<sub>V5.His</sub> e gC<sub>V5</sub> mantengono, nei saggi di immunofluorescenza, la reattività agli anticorpi monoclonali conformazione-dipendenti 52S, 53S e HC1, reattivi verso gH, gH/gL e gC, rispettivamente. Le glicoproteine ingegnerizzate vengono trasportate alla superficie cellulare, come dimostrato dal saggio C-ELISA (Fig.2.1A). Quando gH e gL ingegnerizzate vengono cotrasfettate in presenza di gD e gB, il quartetto di glicoproteine è ancora in grado di indurre la fusione tra cellula e cellula, sebbene con efficienza ridotta, se comparata alla fusione in presenza di gH e gL *wildtype* (Fig 2.1C).

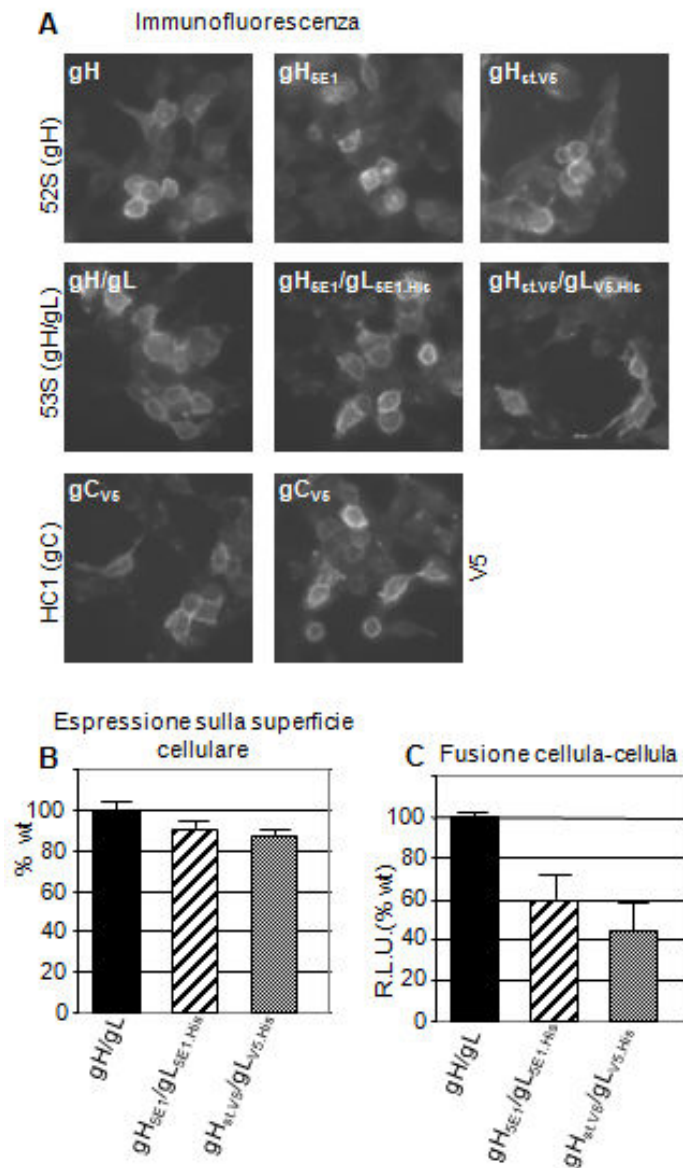


Fig. 2.1 Caratterizzazione delle glicoproteine gH, gL e gC dotate di tag: gH<sub>5E1</sub>, gH<sub>ctLV5</sub>, gL<sub>5E1.His</sub>, gL<sub>V5.His</sub>, gC<sub>V5</sub>. (A) Immunofluorescenza di cellule 293T trasfettate con gH, gL o gC dotate dei tag indicati reagiscono con gli anticorpi monoclonali conformazione dipendenti 52S, verso gH, 53S verso gH/gL; HC1 verso gC, 5E1. (B) Espressione sulla superficie cellulare delle combinazioni indicate di gH/gL, misurate in C-ELISA in cellule 293T trasfettate, espresse in percentuali relative a cellule trasfettate con gH/gL *wildtype*. (C) Fusione cellula-cellula di cellule 293T trasfettate con le combinazioni indicate di gH/gL, in aggiunta di gD e gB, misurate con il saggio di attività luciferasica. R.L.F., Unità Relative di Luciferasi, espresse in percentuali relative a cellule trasfettate con gH/gL *wildtype*. In (B) e (C) ciascun valore rispecchia la media di esperimenti in triplicato. Le barre d'errore rappresentano la Deviazione Standard.

*Il quartetto delle glicoproteine forma complessi co-immunoprecipitati con gD in cellule infettate da HSV wild type o da mutanti virali di delezione.* L'obiettivo di questa serie di esperimenti è consistito nell'identificazione in cellule infette di complessi formati dal quartetto di glicoproteine attraverso co-immunoprecipitazione di gD. Prima dell'infezione, le cellule 293T sono state trasfettate con gH<sub>5E1</sub> and gL<sub>5E1.His</sub>, per facilitare il rilevamento di tali glicoproteine. Dopo 6 ore le cellule sono state infettate con HSV-1(F) o ΔgD-HSV, e lisate 18 ore dopo l'infezione. gD è stata immunoprecipitata con l'anticorpo policlonale R8; le proteine, separate mediante elettroforesi in gel di poliacrilammide in condizioni denaturanti, sono state identificate in *western blot*. I risultati riportati in fig. 2 mostrano come, da cellule infettate con HSV-1 *wildtype*, gD co-immunoprecipita non solo con gH, come ci si aspetterebbe (80), ma anche con gB (pannello B) e gL (pannello C). La co-immunoprecipitazione di gB, gH e gL è specifica in base a due considerazioni. In primo luogo, gC è assente dal co-immunoprecipitato (pannello D), ed è presente solo nel campione di lisato non co-immunoprecipitato. gC possiede la stessa localizzazione subcellulare delle altre glicoproteine, ma, dato che il suo ruolo non è fondamentale per la fusione di HSV-1, non ci si aspetterebbe che co-immunoprecipiti con il quartetto di glicoproteine gD, gB e gH/gL.

In secondo luogo, gB, gH e gL non vengono rilevate nel co-immunoprecipitato in cellule infettate con ΔgD-HSV, ma solo in cellule infettate da HSV-1 *wildtype*.

Per definire i requisiti per la formazione del complesso, le cellule sono state infettate con HSV-1 ΔgB, ΔgH, o ΔgL. gD è stata immunoprecipitata con l'anticorpo policlonale R8 e le proteine co-immunoprecipitate sono state identificate come precedentemente descritto. Come già riferito in Materiali e Metodi, questi mutanti di HSV-1 sono deleti geneticamente della glicoproteina indicata, ma essendo prodotti in cellule che complementano per tale glicoproteina, la esprimono sull'*envelope*. In questo modo sono in grado di eseguire un singolo ciclo di infezione, ma senza produrre né la glicoproteina del cui gene sono deleti, né una progenie virale infettante.

In Fig. 2.2 si osserva come gD co-immunoprecipiti gB in assenza di gH e gL, in cellule infettate con virus ΔgH o ΔgL (pannello B). Analogamente, gD co-immunoprecipita gH e gL in assenza di gB, in cellule infettate con virus ΔgB (pannello C).

In tutti gli esperimenti sopra riportati HVEM è stato iperespresso (Fig. 2.2 A-D). Al fine di valutare se l'iperpressione di HVEM fosse necessaria o se in qualche modo

aumentasse la quantità di complesso identificato, cellule 293T sono state infettate con i virus HSV-1 *wildtype* o HSV- $\Delta$ gD, in assenza o in presenza di HVEM precedentemente trasfettato. Tutte le cellule sono state trasfettate con gH<sub>5E1</sub> e gL<sub>5E1.His</sub>. gD è stata immunoprecipitata con l'anticorpo policlonale R8, e le proteine co-immunoprecipitate sono state rilevate in *western blot*, come precedentemente descritto. I risultati in Fig.2.2 E, F evidenziano come l'iperespressione di HVEM non altera la capacità di gD di co-immunoprecipitare gB, gH e gL, e varia solo in piccola misura le quantità di glicoproteine co-immunoprecipitate.

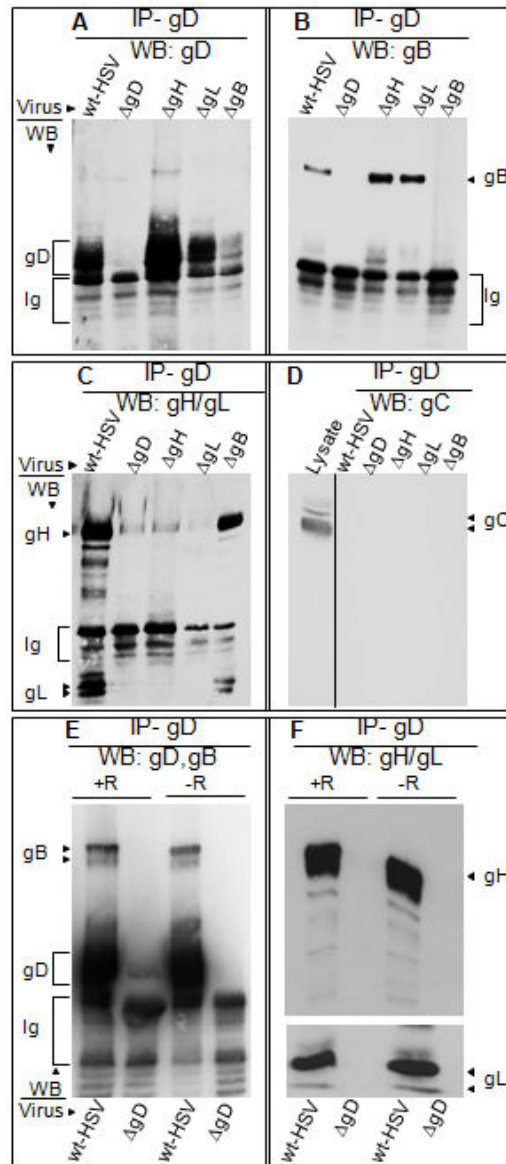


Fig.2.2 gD co-immunoprecipita gB e gH/gL, ma non gC, in cellule infette. (A-D) cellule 293T sono state infettate con HSV-1(F) *wildtype* o virus mutanti di delezione  $\Delta$ gD,  $\Delta$ gB,  $\Delta$ gH, o  $\Delta$ gL (5 PFU per cellula). Per rendere possibile il rilevamento di gH e gL, 4-6 ore prima dell'infezione, le cellule sono state trasfettate con gH<sub>SE1</sub> and gL<sub>SE1.His</sub>. (E,F) Cellule 293T sono state trasfettate in presenza o assenza del plasmide codificante per HVEM (+R e -R rispettivamente) contestualmente alla trasfezione di gH<sub>SE1</sub> e gL<sub>SE1.His</sub>. Tutte le cellule sono state raccolte 18 ore dopo la trasfezione, ed immediatamente lisate con la soluzione EA1. gD è stata immunoprecipitata con l'anticorpo policlonale R8 (IP-gD) e raccolta con resina Proteina A-Sepharose. La resina di ciascun campione è stata divisa in due aliquote e separate per elettroforesi in due gel diversi, uno per il rilevamento di gB e gD, l'altro per il rilevamento gH e gL; gC è stata rilevata nello stesso *blot* di gH e gL, dopo avere sottoposto la membrana a *stripping*. Le glicoproteine co-immunoprecipitate con gD sono state rilevate per mezzo di *western blotting* con l'anticorpo monoclonale H170 diretto verso gD (pannelli A, E), l'anticorpo monoclonale (MAb) H1817 diretto verso gB (pannelli B, E), il MAb 5E1 diretto verso gH e gL (pannelli C, F) e il MAb H633 diretto verso gC (pannello D). Nel pannello D la sola corsia positiva è quella caricata con un'aliquota di lisato di cellule infette. L'anticorpo secondario utilizzato in *western blot* ha rilevato le immunoglobuline dell'anticorpo policlonale R8 (Ig), la cui mobilità elettroforetica è maggiore di gD.



*La formazione del complesso tra il quartetto delle glicoproteine di HSV avviene in linee cellulari suscettibili all'infezione del virus.* Il virus herpes simplex manifesta un ampio tropismo di infezione, sia *in vivo*, sia nelle colture cellulari. Negli esseri umani, HSV-1 infetta principalmente gli epitelii e le cellule del sistema nervoso centrale; in certe condizioni, come ad esempio in soggetti immunocompromessi, il virus infetta numerosi organi, mostrando un tropismo molto ampio. A questo riguardo ci siamo chiesti se il complesso di glicoproteine è identificabile in diverse linee cellulari suscettibili all'infezione di HSV-1. Sono state analizzate cellule di glioblastoma, SK-N-SH e U251, e fibroblasti umani. Il glioblastoma è bersaglio di HSV nella terapia virale oncolitica (178). In questi esperimenti, un fattore limitante è stata l'efficienza di trasfezione, che varia molto da una linea cellulare all'altra, ed è particolarmente bassa nei fibroblasti umani. In Fig. 2.3A viene mostrato come gD co-immunoprecipiti gB in tutte le linee cellulari. In cellule UL251 gH co-immunoprecitata è stata facilmente rilevata, mentre è stata appena rilevata in cellule SK-N-SH (Fig. 2.3B) e non è stato possibile rilevarla nei fibroblasti. Dal momento che nel corso di questo studio la co-immunoprecipitazione di gB attraverso gD è sempre avvenuta di concerto alla co-immunoprecipitazione di gH e gL, riteniamo che il mancato rilevamento di gH/gL nei fibroblasti umani e di gL in cellule U251 sia dovuta alla scarsa efficienza di trasfezione di tali glicoproteine. Possiamo così concludere che la formazione del complesso ha luogo in ogni linea cellulare analizzata.

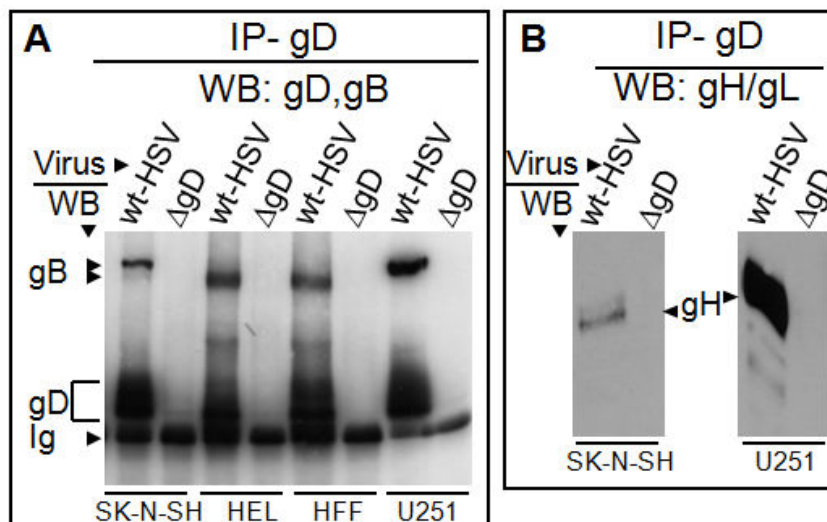


Fig.2.3 gD co-immunoprecipita gB e gH da cellule SK-N-SH, HEL, HFF e U251 infette. Le cellule indicate sono state infette con HSV-1 *wildtype*, oppure con virus mutanti di delezione HSV-ΔgD. Per consentire il rilevamento di gH e gL, 6 ore prima dell'infezione le cellule sono state trasfettate con gH<sub>SE1</sub> and gL<sub>SE1.His</sub>. Per dettagli sperimentali, v. Fig.2.2. Il *western blot* per gH è stato condotto utilizzando l'anticorpo monoclonale 5E1. gL<sub>SE1</sub> non è stata rilevata.

*Il quartetto di glicoproteine forma complessi co-immunoprecipitati da gD in cellule trasfettate.* Si è voluto in seguito verificare se il complesso osservato in cellule infette si forma anche in cellule trasfettate. Cellule 293T sono state co-trasfettate con miscele di plasmidi codificanti per il quartetto di glicoproteine in aggiunta di HVEM (per aumentare la quantità di gD legata al recettore), e gC<sub>V5</sub>, come controllo negativo. Dove indicato, dalle miscele di trasfezione sono assenti gD, gB, gH o gL (qui designate come miscele  $\Delta$ gD,  $\Delta$ gB,  $\Delta$ gH/gL). gD è stata immunoprecipitata utilizzando l'anticorpo policlonale R8; le proteine co-immunoprecipitate sono state identificate in *western blot*. I risultati mostrati in Fig. 2. 4 evidenziano come gB (pannello B), gH e gL (pannello C) siano state co-immunoprecipitate da lisati di cellule trasfettate con le quattro glicoproteine. In cellule trasfettate con la miscela di trasfezione  $\Delta$ gB, gD era ancora in grado di co-immunoprecipitare gH/gL. Analogamente, in cellule trasfettate con la miscela di trasfezione  $\Delta$ gH/gL, gD era ancora in grado di co-immunoprecipitare gB. La specificità delle co-immunoprecipitazioni descritte è stata dimostrata dall'assenza di gC all'interno dei complessi immunoprecipitati (pannelli D). Questi risultati indicano come i complessi che si osservano in cellule trasfettate rispecchino esattamente quelli che si formano in cellule infette, suggerendo come nessuna altra proteina virale, oltre a quelle reclutate nel complesso, sia indispensabile perché tali complessi si assemblino. Dal momento che i complessi formati nelle cellule trasfettate non si differenziano da quelli identificati nelle cellule infette, la maggior parte degli esperimenti successivi è stata condotta in cellule trasfettate.

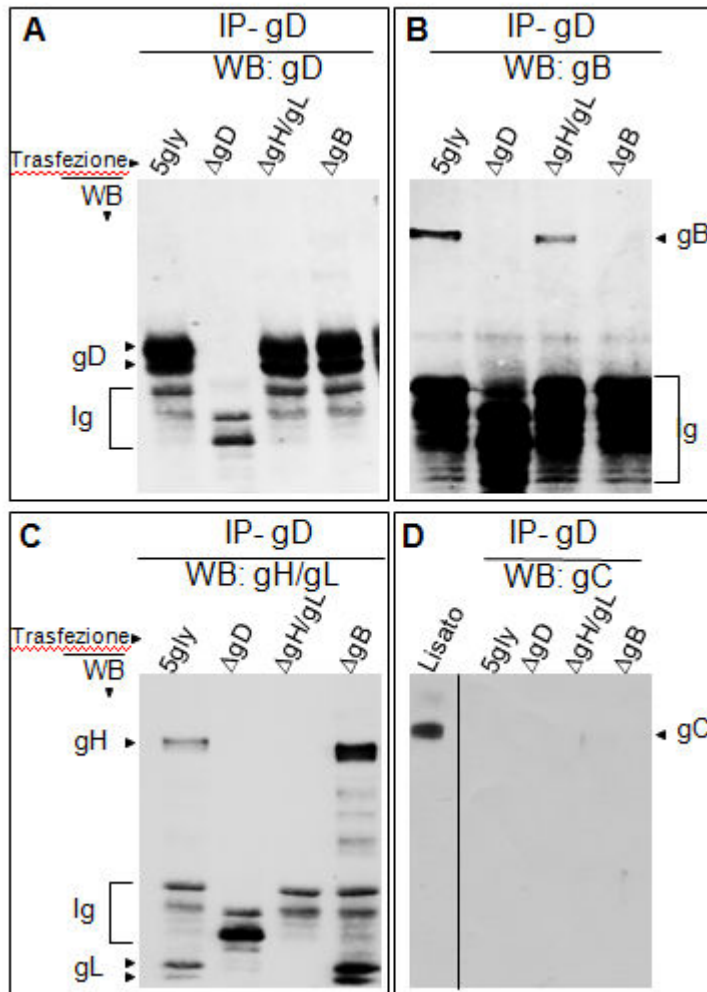


Fig 2.4 gD co-immunoprecipita gB e gH/gL ma non gC, in cellule trasfettate. Cellule 293T sono state cotrasfettate con miscele di trasfezione contenenti i plasmidi codificanti per gD, gB, gH<sub>SEI</sub>, gL<sub>SEI.HIS</sub>, gC<sub>V5</sub> unitamente ad HVEM (5 gly), o privati di una o due delle glicoproteine, nominate come miscele ΔgD, ΔgB e ΔgH/gL. Le cellule sono state raccolte 18 ore dopo la trasfezione. Per gli altri dettagli, v. i Fig.2.2.

*Ingegnerizzazione genetica di HSV-1 codificante di gD dotata di epitopo One-STrEP-Tag (HSV-1(BAC)-gD<sub>ST</sub>). I complessi identificati in questo ed altri studi (81, 82) sono stati identificati in cellule infette o trasfettate. Come è già stato precedentemente considerato, un fattore limitante nei nostri saggi è stata il rilevamento di gH e gL. Allo scopo di studiare i complessi all'interno dei virioni, e per aumentare l'efficienza di isolamento del complesso, è stato ingegnerizzato un virus herpes simplex codificante per gD dotata di epitopo One- STrEP-Tag (gD<sub>ST</sub>). Le proteine provviste di questo epitopo si adsorbono in maniera specifica alla resina Strep-Tactin (IBA GmbH, Goettingen, Germania), mantenendo le interazioni con le proteine ad esse complessate. Il virus è stato ingegnerizzato utilizzando la tecnologia BAC, come descritto in Materiali e Metodi, e nominato HSV1(BAC)-gD<sub>ST</sub>. La resa virale di HSV1(BAC)-gD<sub>ST</sub> è analoga a quella di HSV-1 (F) *wildtype*. (Fig. 2.5A). gD<sub>st</sub>, gB, gH/gL e gC mantengono la reattività ad anticorpi conformazionali (Fig. 2.5B).*

*I complessi di glicoproteine sono presenti nei virioni.* Per comprendere se le glicoproteine del quartetto interagiscono tra loro già sulla superficie dei virioni, indipendentemente dall'ingresso nella cellule ospite, o se il complesso si formi al momento dell'ingresso nella cellula, è stato utilizzato il virus HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub>. Virioni HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub> parzialmente purificati da frazioni extracellulari sono stati lisati, e gD<sub>st</sub> è stata adsorbita alla resina Strep-Tactin; le glicoproteine complessate sono state analizzate per mezzo di *western blot*. I risultati mostrati in Fig.2.5C evidenziano come sia identificabile una piccola quantità di gB, gH e gL complessate a gD in virioni HSV(BAC)-gD<sub>st</sub> non attivati dall'interazione con i recettori cellulari. Le quantità di gB e gH/gL isolate per *pull-down* sono state minime, e per visualizzarle sono state caricate in gel di acrilammide  $2.8 \times 10^8$  PFU di virione lisato per gB e gD e  $1.4 \times 10^9$  PFU per gH/gL.

Per analizzare il destino di complessi pre-esistenti, e per comprendere se si formassero nuovi complessi durante la fusione del virus con la membrana cellulare, virioni HSV(BAC)-gD<sub>st</sub> sono stati adsorbiti su cellule 293T per 2 ore a 4°C (~140 PFU per cellula), il virus non adsorbito è stato rimosso, le cellule sono state portate a 37°C per 0, 15 o 30 minuti e lisate. Il lisato è stato adsorbito su resina Strep-Tactin. Le proteine immobilizzate sono state analizzate in *western blot*. In Fig. 2.5D è mostrato come, nell'arco di 30 minuti, la quantità di gD associata ai virioni gD<sub>st</sub> sia diminuita; la

quantità di gB diminuisce in maniera analoga. Non è stato possibile rilevare gH/gL per via dei limiti di avidità degli anticorpi. Complessivamente i risultati indicano come gD<sub>st</sub> presente sul virione e gB ad essa complessata tendano a diminuire durante la fusione con le membrane di cellule 293T.

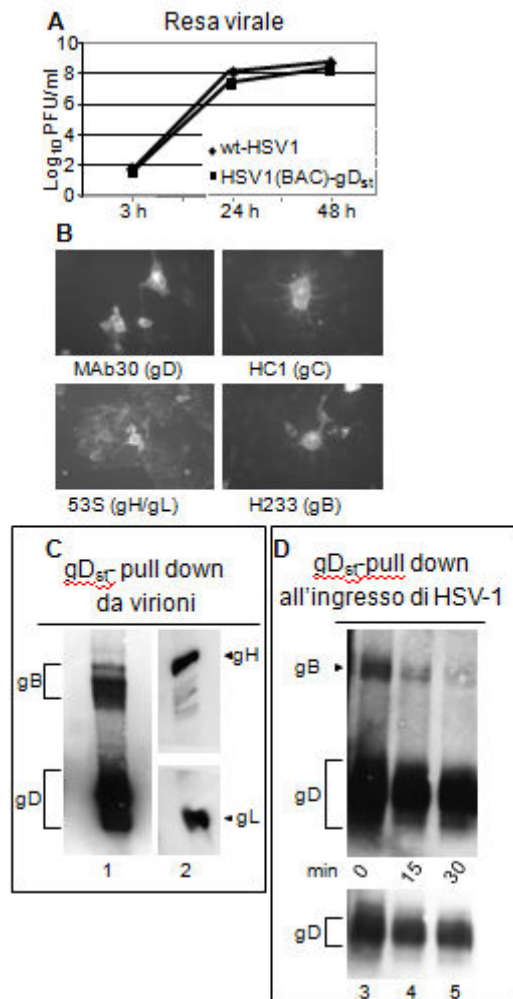


Fig.2.5 Caratterizzazione di HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub> ed analisi dei complessi di glicoproteine nei virioni e durante l'ingresso del virus. (A) Cinetiche di replicazione di HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub>. Cellule Vero sono state infettate con HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub> o HSV-1(F), 0.1 PFU per cellula. I campioni in replicato sono stati congelati ai tempi di infezione indicati, e la progenie virale è stata titolata in cellule Vero. Non è stata osservata una differenza significativa nella resa virale tra HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub> e HSV-1 *wildtype*. (B) Campioni in replicato di cellule 293T infettate con HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub> (0.1 PFU per cellula) sono state caratterizzate per la loro reattività in immunofluorescenza. Le cellule infette sono state incubate con gli anticorpi monoclonali indicati, reattivi verso epitopi conformazione-dipendenti localizzati sulle glicoproteine indicate tra parentesi. (C) Rilevamento dei complessi di glicoproteine in virioni HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub>. Virioni extracellulari di HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub> parzialmente purificati sono stati lisati, e gD<sub>st</sub> è stata adsorbita su resina Strep-Tactin; gD<sub>st</sub> e le glicoproteine ad essa complessate sono state rilevate per mezzo di *western blot* diretto verso gD (MAb H170), gB (MAb H1817), gH (PAb verso gH) e gL (PAb verso gL). La corsia gD-gB (#1) è stata caricata con lisato di virione contenente  $2.8 \times 10^8$  PFU. La corsia gH/gL (#2) è stata caricata con lisato di virione contenente  $1.4 \times 10^9$  PFU. (D) Virioni extracellulari di HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub> parzialmente purificati sono stati adsorbiti su cellule 293T in fiasche T<sub>25</sub> ( $4 \times 10^8$  PFU per fiasca, ~ 140 PFU per cellula), a 4°C per 2 ore. Il virus non adsorbito è stato rimosso e titolato, mostrando un valore del 75% del virus fornito in partenza. Le cellule sono state lavate due volte con mezzo di coltura a 4°C, ricoperte di mezzo di coltura 37°C, mantenute a 37°C per 0, 15 e 30 minuti e lisate. I lisati sono stati adsorbiti su resina Strep-Tactin. La corsia relativa ad ogni intervallo temporale contiene il materiale derivato da una fiasca T<sub>25</sub>. gD<sub>st</sub> e gB ad essa complessata sono state rilevate per mezzo di *western blot*. I pannelli in basso mostrano una esposizione più chiara di gD, per evidenziare la diminuzione della quantità di gD<sub>st</sub> associata ai virioni nel corso dell'intervallo di tempo analizzato.

*Caratterizzazione di mutanti gD recanti sostituzioni, delezioni o mutazioni all'interno dell'ectodominio.* L'obiettivo degli esperimenti seguenti è stato definire preliminarmente le regioni di gD coinvolte nella formazione del complesso con gB e gH/gL. Abbiamo utilizzato un pannello di mutanti contenenti sostituzioni, delezioni e mutazioni lungo l'intero ectodominio di gD (le mappe lineari dei mutanti sono mostrate in Fig. 2.6A). Alcuni costrutti sono già stati descritti in altri lavori, altri sono stati messi a punto appositamente per questo studio. Come è stato trattato nell'introduzione, l'ectodominio di gD può essere suddiviso schematicamente in due regioni; la porzione amino-terminale, che si estende fino ai residui 240/260 e che contiene i siti di legame con dei recettori cellulari; la porzione carbossi-terminale, che si estende dai residui 240/260 fino al residuo 310 e che contiene il dominio profusogenico. Nei costrutti gD<sub>Σ260-310</sub> (chiamato gD<sub>ΔPFD</sub> in (77)) e gD<sub>Σ240-310</sub> le sequenze indicate sono state sostituite con le corrispondenti sequenze pre-transmembrana di CD8. E' stato scelto CD8 in quanto proteina transmembrana del tutto estranea al processo di adsorbimento ed ingresso di HSV-1 nella cellula (75, 179). gD<sub>Σ240-260</sub> contiene un *linker* di serina-glicina di 18 residui in luogo della sequenza compresa tra i residui 240 e 260. I mutanti gD<sub>P291L-P292A</sub> and gD<sub>T304A-P305L</sub>, chiamati rispettivamente gD<sub>PP</sub> e gD<sub>TP</sub>, recano delle sostituzioni all'interno del dominio profusogenico. Entrambi risultano essere parzialmente compromessi nella capacità di mediare la fusione (75). Nel costrutto gD<sub>Σ218-240</sub> il segmento compreso tra i residui 218 e 240, composto dall' $\alpha$ -elica 3, è stato sostituito da un *linker* di serina e glicina di 18 aminoacidi. Il costrutto gD<sub>Δ61-218</sub> è stato generato seguendo l'indicazione di uno studio in cui una forma molto particolare di gD divisa in due frammenti distinti, uno dei quali reca il dominio *kringle* dell'urocinasi attivatore del plasminogeno, è in grado di mediare la fusione, dimostrando come la regione compresa tra i residui 61 e 218 non sia indispensabile (78). Studi condotti nel nostro laboratorio evidenziano come tale sequenza possa essere sostituita con sequenze eterologhe (176). Il costrutto gD<sub>Δ6-60</sub> è stato realizzato nel corso di questo studio, a questo riguardo è importante ricordare come la porzione amino-terminale di gD possa essere deleta fino al residuo 38 (180), ottenendo un costrutto di gD ancora funzionale ma incapace di interagire con HVEM (181).

In primo luogo, il pannello dei mutanti di gD è stato caratterizzato in base alla capacità di ciascun costrutto di essere trasportato alla membrana cellulare e di mediare la fusione



tra cellula e cellula e l'infezione virale. L'espressione sulla superficie cellulare è stata misurata in cellule 293T trasfettate, ed espressa in percentuale relativa alla trasfezione e processazione di gD *wildtype*. In figura 6B è mostrato come i costrutti gD<sub>Σ260-310</sub>, gD<sub>Σ240-260</sub>, gD<sub>TP</sub>, gD<sub>TP</sub> vengano espressi sulla superficie cellulare in un intervallo che va tra il 50 e l'80% rispetto a gD *wildtype*. L'espressione in superficie degli altri costrutti è drasticamente compromessa. Aumentando di 3 volte la quantità di plasmide trasfettato non si è osservato un aumento significativo l'espressione di superficie (dati non mostrati). In seguito è stata misurata la capacità dei mutanti di indurre la fusione tra cellula e cellula quando co-trasfettati con gB, gH e gL. I risultati mostrati in Fig.6 evidenziano come tutti i mutanti siano compromessi nella mediazione della fusione, indipendentemente dall'espressione di superficie. Infine, la capacità dei mutanti di promuovere l'infezione virale è stata misurata nel saggio di complementazione dell'infettività, dove il virus FgDβ, delecto del gene di gD, è stato cresciuto in cellule trasfettate transientemente con gD *wildtype* o con ciascuno dei costrutti di gD mutata. La progenie virale complementata è stata titolata in cellule R6, che esprimendo gD *wildtype* consentono la formazione di placche, una volta che il virus dotato di gD complementante ha infettato una cellula. (Fig. 2.6D). In seguito è stato verificato se i virioni complementanti portano sulla superficie dell'*envelope* i diversi mutanti di gD e, per confronto, gB. I virioni sono stati ultracentrifugati ed analizzati per la presenza di gD e gB in *western blot*. Come evidenziato dalla Fig. 2.6E ogni mutante di gD è stato incorporato nei virioni, fatta eccezione per gD<sub>Δ61-218</sub>. Nel complesso questi risultati mostrano come i mutanti di gD siano compromessi nella complementazione dell'infettività, seppure, con una eccezione, siano tutti incorporati nei virioni.

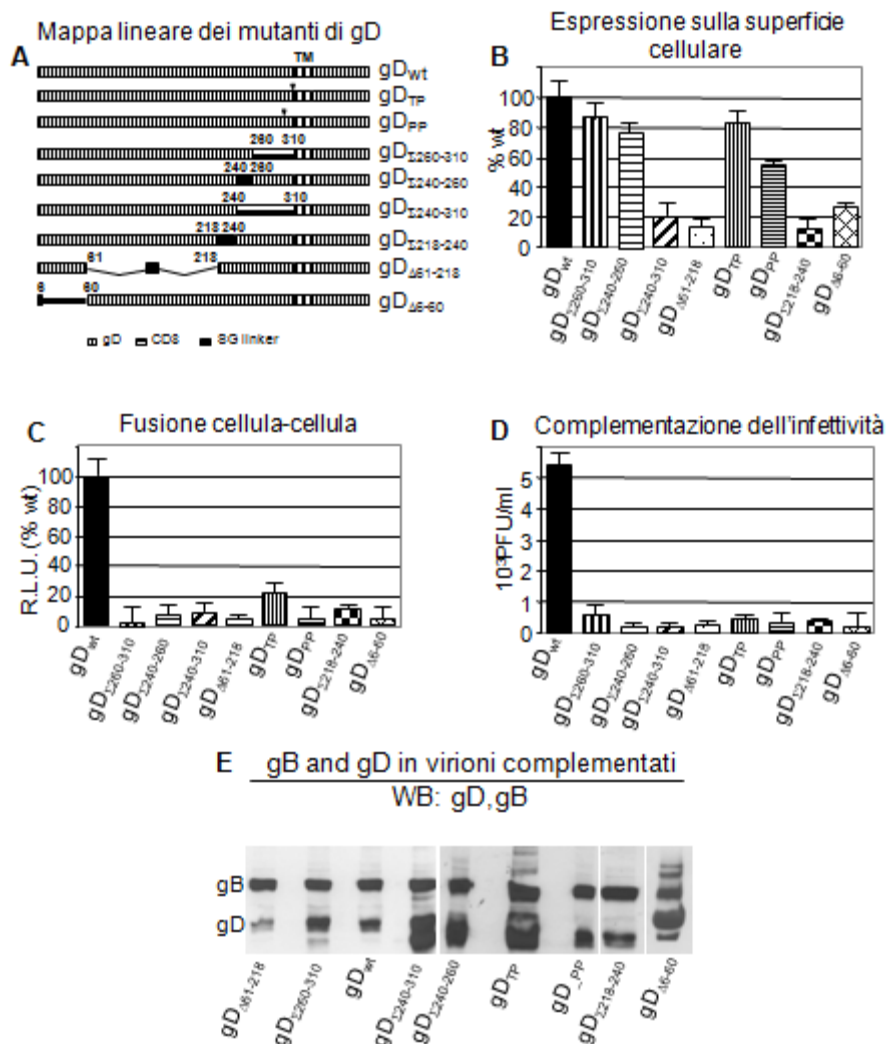


Fig.2.6 Caratterizzazione del pannello di mutanti di gD. (A) Mappa lineare dei mutanti di gD. gD<sup>TP</sup> e gD<sup>PP</sup> recano le sostituzioni gD<sup>P291L-P292A</sup> or gD<sup>T304A-P305L</sup> (75). In gD<sub>Δ260-310</sub> (precedentemente nominato gD<sub>ΔPPD</sub>) (77) e gD<sub>Δ240-310</sub>, le sequenze indicate sono state sostituite con la sequenza corrispondente di CD8, localizzate nella regione pre-transmembrana. gD<sub>Δ240-260</sub> contiene un *linker* serina-glicina di 18 residui al posto della sequenza aminoacidica 240-260. In gD<sub>Δ218-240</sub>, il segmento 218-240, costituito dall' $\alpha$ -elica3, è stato sostituito da un *linker* serina-glicina di 18 residui. In gD<sub>Δ61-218</sub> la regione deleta è stata sostituita da un *linker* serina-glicina di 18 residui. gD<sub>Δ6-60</sub> è stata deleta della porzione tra gli aminoacidi 6 e 60. (B) L'espressione sulla superficie cellulare dei mutanti di gD è stata misurata in cellule 293T trasfettate per mezzo di C-ELISA, utilizzando MAb H170 (oppure MAb BD80 per gD<sub>Δ6-60</sub>). La misura dell'espressione è riportata in relazione all'espressione di gD *wildtype* (considerata il 100%). (C) Fusione cellula-cellula in cellule 293T trasfettate con gD (*wildtype* o mutanti), con l'aggiunta di gB, gH e gL. Per tutti gli altri dettagli v. Fig.2.1C. (D) Complementazione di infettività dei mutanti di gD. Cellule 293T in fiasche T<sub>75</sub> sono state trasfettate con uno dei mutanti di gD e, 4 ore dopo, infettate con  $\Delta$ gD-HSV (FgD $\beta$ ). In questo saggio, la progenie virale, raccolta 18 ore dopo l'infezione, è complementata da gD transgenica espressa transientemente; la progenie è stata titolata in cellule R6 (che esprimono gD *wildtype* consentendo la formazione di placche); il titolo è espresso in PFU/ml. I risultati sono espressi come percentuale relativa alle cellule trasfettate con gD *wildtype*. Si può osservare come tutti i mutanti sono seriamente compromessi dal punto di vista dell'infettività, se paragonati a gD *wildtype*. In tutti gli istogrammi, ogni colonna rappresenta la media di esperimenti condotti in triplicato. Le barre rappresentano l'errore standard. (E) I virioni extracellulari del precedente esperimento sono stati ultracentrifugati ed analizzati per mezzo di *western blot* per verificare la presenza di gD e, per confronto, di gB. Si può osservare come, ad eccezione di gD<sub>Δ61-218</sub>, tutti i mutanti di gD vengono incorporati nei virioni.

*Proprietà dei mutanti di gD di formare complessi con gH/gL, determinata per mezzo di pull-down di gH<sub>st</sub>.* Nelle seguenti due serie di esperimenti il pannello di mutanti di gD è stato utilizzato per definire le regioni di gD critiche per l'instaurarsi delle interazioni con gH/gL e gB. Per rilevare il complesso gD-gH è stato messo a punto un saggio di *pull down* di gH<sub>st</sub>. Cellule 293T sono state trasfettate con gH<sub>st</sub>, gLV5.His (Fig. 2.1), gD *wildtype* o mutata, in presenza o assenza di gB. I lisati sono stati adsorbiti alla resina Strep-Tactin. Le proteine immobilizzate sono state analizzate in *western blot*. In Fig. 2.7A si mostra come gH<sub>st</sub> legghi wt-gD, gD<sub>Σ240-260</sub>, gD<sub>TP</sub>, gD<sub>Σ218-240</sub>, gD<sub>Δ61-218</sub>, e gD<sub>Δ6-60</sub>. E' importante notare come gD<sub>Σ240-310</sub> e gD<sub>Σ260-310</sub> si separino in elettroforesi in tre bande (v. anche Fig.2.8) con peso molecolare apparente di 56 o superiore, 50 e 38 KDa. Le specie che si localizzano a 56 KDa o più (segnate con ♦) rappresentano le forme mature di gD. Le specie a 50 kDa (●) sono state osservate in tutte le forme di gD, e rappresentano il precursore della glicoproteina. Le specie a 38 KDa (★) verosimilmente rappresentano un prodotto di degradazione della porzione amino-terminale. Tali forme sono infatti reattive all'anticorpo monoclonale H170, che riconosce un epitopo lineare localizzato tra i residui 1 e 23.

E' interessante notare come, relativamente a gD<sub>Σ240-310</sub> e gD<sub>Σ260-310</sub>, gH<sub>st</sub> abbia interagito solamente con le specie amino-terminali da 38 KDa, e non con le specie a maggiore peso molecolare. E' stata osservata una differenza notevole tra i mutanti gD<sub>PP</sub> e gD<sub>TP</sub>, in cui sono state introdotte le mutazioni degli aminoacidi P<sub>291</sub>P<sub>292</sub> e T<sub>304</sub>P<sub>305</sub>, rispettivamente. gH<sub>st</sub> non precipita in *pull-down* gD<sub>PP</sub> ma precipita gD<sub>TP</sub>. In assenza di gB (pannello D), la capacità dei mutanti gD di legarsi a gH<sub>st</sub> in saggi di *pull-down* in cellule trasfettate con gD, gH e gL è essenzialmente analoga a quanto rappresentato nel pannello A.

I risultati relativi a gD<sub>Σ240-310</sub> e gD<sub>Σ260-310</sub> suggeriscono che gD possieda una superficie di contatto composita. Una parte è costituita dalla regione amino-terminale, e consente a gH<sub>st</sub> di legarsi e precipitare nel saggio di *pull-down* i prodotti di degradazione amino-terminali da 38 KDa. L'altra parte è localizzata in corrispondenza della porzione a valle del residuo 240, è assente nei mutanti gD<sub>Σ240-310</sub> e gD<sub>Σ260-310</sub> per via delle sostituzioni, ed è responsabile del mancato legame di gH<sub>st</sub> alle forme mature di queste chimere. La doppia mutazione P<sub>291</sub>P<sub>292</sub> è critica per le interazioni mediate da quest'ultima superficie di contatto carbossi-terminale.

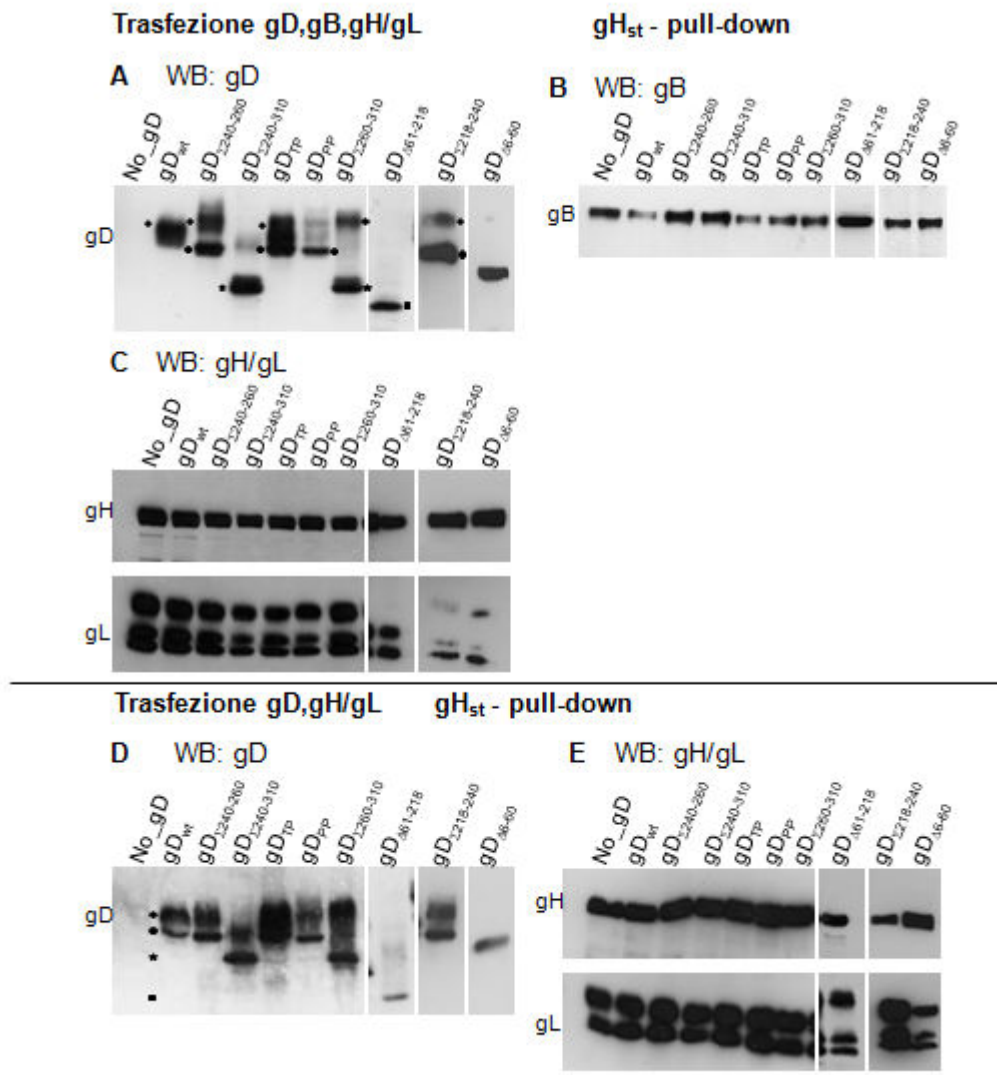


Fig. 2.7 Proprietà di  $gH_{st}$  di interagire per *pull-down* con  $gD$  *wildtype*, mutanti di  $gD$  o  $gB$ . Cellule 293T sono state co-trasfettate con miscele di trasfezione contenenti  $gH_{st}$ ,  $gD$  *wildtype* o mutanti,  $gB$ ,  $gL_{V5-His}$  e HVEM (pannelli A-C). Nei pannelli D ed E, le miscele di trasfezione erano composte da  $gH_{st}$ ,  $gD$  *wildtype* o mutante, e sono prive di  $gB$ . Le cellule sono state raccolte 18 ore dopo la trasfezione. Dopo la lisi delle cellule,  $gH_{st}$  è stata adsorbita alla resina Strep-Tactin. Le proteine complessate con  $gH_{st}$  sono state trattate dalla resina, separate per elettroforesi in gel di acrilammide ed identificate per mezzo di *western blot*. La corsia segnata con “no  $gD$ ” contiene tutte le glicoproteine fatta eccezione per  $gD$ , e funge da controllo per verificare che le proteine esaminate siano legate per *pull-down* da  $gH_{st}$  in modo specifico. Negli altri pannelli, le corsie segnate come  $gD_{\Delta 61-218}$ ,  $gD_{\Delta 218-240}$ , e  $gD_{\Delta 6-60}$  derivano da differenti *blot*. Per tutti gli altri dettagli v. Fig. 2.2. Nei pannelli C e D, si può osservare come le diverse forme di  $gD$  migrino con differente mobilità elettroforica e differente peso molecolare apparente  $M_r$ . ♦ si riferisce alla forma matura, a 56 kDa; ● si riferisce al precursore, a 50 kDa; ★ si riferisce ad un prodotto di degradazione, a 38 kDa; ■ si riferisce alla forma deleta  $gD_{\Delta 6-60}$  a basso  $M_r$ .

*Proprietà dei mutanti di gD di formare complessi con gB.* In quest'ultima serie di esperimenti cellule 293T sono state trasfettate con gD *wildtype* o mutanti e gB. gD è stata immunoprecipitata con l'anticorpo policlonale R8. I risultati mostrati in Fig. 2.8 evidenziano come gD $_{\Sigma 240-260}$ , ed in misura minore gD $_{\Sigma 260-310}$  e gD $_{TP}$ , abbiano una ridotta capacità di co-immunoprecipitare gB. Questi risultati suggeriscono come tra i residui 240 e 260 di gD si trovi una regione critica per l'interazione di gD con gB. T<sub>306</sub>P<sub>307</sub> sono residui critici.

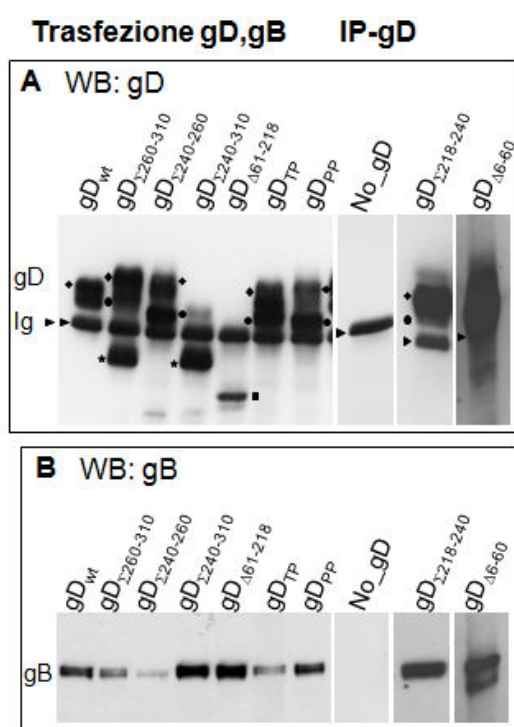


Fig. 2.8. Proprietà dei mutanti di gD di co-immunoprecipitare gB. Cellule 293 T sono state co-trasfettate con miscele di plasmidi contenenti i plasmidi codificanti per gD, *wildtype* o mutante, in aggiunta di gB e HVEM. La corsia segnata come “no gD” indica la miscela di trasfezione sprovvista di gD, come controllo che le proteine analizzate siano co-immunoprecipitate da gD in modo specifico. Le cellule sono state raccolte 18 ore dopo la trafezione. Per tutti gli altri dettagli v. Fig.2.2 e 2.7. Sostanzialmente, gD è stata immunoprecipitata con l'anticorpo policlonale R8 (IP-gD); le proteine co-immunoprecipitate sono state identificate per mezzo di *western blot*. Nel pannello A si può osservare come le diverse forme di gD migrino con differente mobilità elettroforetica e peso molecolare apparente  $M_r$ . I simboli sono analoghi a quelli di Fig.2.7. ► indica la banda della catena pesante delle immunoglobuline (IgG).

## 2.4 Discussione

L'ingresso di HSV-1 nella cellula ospite, che vede come passaggio fondamentale la fusione dell'*envelope* virale con la membrana cellulare, è mediata dalle glicoproteine gD, gB, gH e gL, come è documentato da un'ampia letteratura (168, 182). Le quattro glicoproteine sono necessarie e sufficienti a mediare il processo (37). La scoperta che gD serva come innesco per la fusione (75) presuppone che intercorra uno scambio di informazioni tra gD ed almeno una delle glicoproteine a valle, ed ha stimolato la ricerca di interazioni all'interno del quartetto di glicoproteine. Sono state identificate interazioni tra gD e gH/gL attraverso saggi di co-immunoprecipitazione (80), tra gD e gB e tra gD e gH/gL attraverso saggi di complementazione *GFP split* (81, 82). In quest'ultimo saggio le interazioni transienti vengono stabilizzate e rese irreversibili, aumentando la quantità di complesso rilevato. In questo studio ci siamo preposti di fornire un'evidenza biochimica della formazione del complesso tra le quattro glicoproteine, di verificare se il complesso si formi nelle cellule infette e nei virioni, e non solo in cellule trasfettate, e di identificare, almeno preliminarmente, le regioni di gD critiche per l'assemblaggio del complesso con gB e gH/gL. I due saggi utilizzati sono stati la co-immunoprecipitazione ed il *pull-down*, utilizzando gD o gH dotate di One-StrEP-Tag. I principali risultati ottenuti sono i seguenti:

*Le quattro glicoproteine formano complessi in cellule infette, che non si differenziano da quelli che si formano in cellule trasfettate con i plasmidi codificanti per le quattro glicoproteine.* Complessi formati da gD, gB e gH/gL sono stati identificati sia in cellule infettate con HSV-1, sia in cellule trasfettate con i plasmidi codificanti per le quattro glicoproteine. Un limite dei saggi è consistito nell'impossibilità di determinare l'esatta composizione dei complessi, e cioè se (i) una stessa molecola di gD interagisse contemporaneamente con gB e gH/gL, oppure (ii) se diverse molecole di gD interagissero con gB, in un complesso bipartito, e con gH/gL, in un complesso tripartito, oppure se (iii) gD interagisse con una sola delle altre glicoproteine, ad esempio gH, che a sua volta reclutasse gB in maniera sequenziale. Per far luce sulla composizione dei complessi, abbiamo infettato le cellule con virus deleti in una delle glicoproteine, o, in alternativa, abbiamo trasfettato le cellule con miscele di plasmidi sprovviste del plasmide codificante per una delle glicoproteine. I successivi saggi di co-immunoprecipitazione e *pull-down* hanno evidenziato come gD si complessi con gH/gL

in assenza di gB, e analogamente si complessi con gB in assenza di gH/gL. Complessi con le stesse caratteristiche sono stati identificati linee cellulari neuronali e di fibroblasti, verso cui HSV-1 ha un naturale tropismo *in vivo*. La conclusione è quindi duplice. In primo luogo, i complessi si formano anche in cellule infette e non differiscono da quelli formati in cellule trasfettate. Questa evidenza legittima l'utilizzo di cellule trasfettate in questi studi, oltre a dimostrare che per la formazione del complesso non sono necessarie proteine virali diverse dalle quattro sopra citate. Inoltre, le interazioni descritte in precedenza (81, 82), sono veritiere, e non riflettono artefatti dovuti all'iperespressione o alla stabilizzazione irreversibile di interazioni transienti.

In secondo luogo, gD è in grado di formare più di un tipo di complesso e contiene siti indipendenti di legame sia per gB che per gH/gL. Questa caratteristica suggerisce che non si verifichi un reclutamento sequenziale delle altre glicoproteine a gD, contrastando il modello di emifusione (83).

*Regioni di gD critiche per il legame a gB e gH/gL.* Un obiettivo di questo studio è stato quello di identificare le regioni di gD critiche per la formazione del complesso con gB e gH/gL. L'ectodominio di gD può essere suddiviso in due regioni ben distinte dal punto di vista funzionale e topologico. La porzione amino-terminale, che si estende fino ai residui 240/260, contiene i siti di legame per HVEM (aminoacidi 1-32) e per nectina 1 (aminoacidi 30-240 circa); è anche composta di un dominio dotato di struttura analoga alle immunoglobuline (aminoacidi 56-184). La porzione carbossi-terminale detiene l'attività pro-fusogena, richiesta per l'innescò della fusione ma non per il legame al recettore cellulare. Abbiamo utilizzato un pannello di mutanti di gD, contenenti sostituzioni, delezioni e mutazioni localizzate in tutto l'ectodominio. I risultati chiave sono stati: (i) nessuno dei mutanti è completamente compromesso nel reclutare gB o gH/gL, suggerendo che i siti di legame di gD per gB e gH/gL siano ridondanti, o comunque costituiti da una superficie di contatto composita. Quindi, l'alterazione di uno qualsiasi dei residui coinvolti nell'interazione non è seguito dalla completa inibizione del legame, ma di una sua parziale compromissione. (ii) Il reclutamento di gH/gL e gB da parte di gD è differentemente compromesso nei vari mutanti, quindi avviene attraverso regioni distinte. (iii) La regione di gD critica per l'interazione di gH/gL si situa in parte nella porzione amino-terminale ed in parte in quella carbossi-terminale, residui critici sono P<sub>291</sub>P<sub>292</sub> (iv) La regione di gD critica per l'interazione con gB

include gli aminoacidi 240-260, e si estende verso la porzione carbossi-terminale; residui critici sono T<sub>306</sub>P<sub>307</sub>. Insieme, questi esperimenti forniscono una prima evidenza che nella porzione carbossi-terminale dell'ectodominio di gD risiedano regioni critiche per la formazione del complesso con gB e gH/gL.

*Complessi di glicoproteine sono presenti in virioni non attivati dal legame con il recettore cellulare, anche se in piccole quantità.* Un interrogativo importante riguarda la presenza o meno di complessi delle quattro glicoproteine in virioni non attivati, o se essi si formino nel momento dell'ingresso del virus nella cellula e della fusione dell'*envelope* virale con la membrana cellulare. Per dare una risposta si è ingegnerizzato un virus HSV la cui gD è dotata di STrEP-tag, nominato (BAC)-gD<sub>st</sub>. gD<sub>st</sub> è stata trovata complessata con gB e gH/gL in virioni inattivi, anche se la quantità delle glicoproteine complessate era molto bassa. Quando i virioni HSV1(BAC)-gD<sub>st</sub> sono stati adsorbiti sulle cellule, per una finestra di tempo fino a 30 minuti, non si è osservato alcun incremento della quantità di complessi rilevati. Al contrario, si è osservata una diminuzione nella formazione del complesso gD-gB. Questo è in accordo con un'osservazione precedente in cui gE, in virioni al momento dell'infezione, in un primo momento si associa alla superficie cellulare, per poi scomparire (183).

*Il significato dei complessi e delle interazioni identificate in questo ed i precedenti studi.* I risultati ottenuti in questo e precedenti studi (81, 82) pone degli interrogativi sul significato biologico dei complessi tra le glicoproteine di HSV-1. Ci sono due possibili interpretazioni. In primo luogo, è stato evidenziato come in virioni non attivati siano presenti piccole quantità di complessi preformati; questi non aumentano durante l'ingresso del virus, anzi tendono a diminuire.

In linea di principio la fusione mediata da HSV-1 deve essere preceduta dall'attivazione di gB e/o gH/gL, tramite un cambio conformazionale dalla forma inattiva alla forma attiva. Un modello compatibile con i risultati illustrati prevederebbe che i cambi conformazionali di gD vengano trasmessi a gH/gL e gB, già riunite nel complesso, determinando cambiamenti conformazionali negli esecutori della fusione e determinandone l'attivazione.

Un'altra possibilità prevederebbe che i complessi formati dalle glicoproteine siano disassemblati o innescati per divenire fusogenici, una volta che gli esecutori della



fusione abbiano interagito con proteine cellulari (per esempio recettori), senza andare incontro a particolari modificazioni biochimiche.

In secondo luogo, esiste la possibilità che i membri del quartetto di glicoproteine, come la maggior parte delle proteine di HSV fin ad ora studiate, ricoprano diverse funzioni. Concordemente a questa possibilità vi è l'osservazione che gB viene indirizzata ai corpi multivescicolari (*multivesicular bodies*) dove ricopre un ruolo nell'acquisizione dell'*envelope* dei virioni nascenti e nella loro fuoriuscita dalla cellula infetta (184). Inoltre, gD e gB si localizzano sulla membrana nucleare interna dove mediano la prima acquisizione dell'*envelope* dei virioni che fuoriescono dal nucleo (185), e gD ricopre una funzione anti-apoptotica (186). E' plausibile che la formazione di tali complessi richieda il coinvolgimento di proteine cellulari (ad esempio legame diretto, modificazioni post-trascrizionali) per rendere possibile il compimento di queste funzioni. Ne conseguirebbe che il complesso fusogenico, se esiste, sia solo uno dei complessi formati dalle quattro glicoproteine. La comprensione della funzione dei vari complessi richiederà l'identificazione e la caratterizzazione di tutti i partner cellulari con cui le glicoproteine interagiscono.

# **Capitolo III**

**Disegno razionale e ottimizzazione di  
peptidi inibenti l'infezione di HSV-1 *in  
vitro***

### 3.1 Obiettivo

I peptidi sono utilizzati in virologia come inibitori dell'infezione virale da diversi anni. Il più noto è il T-20 Enfuvirtide, peptide che mima una porzione di gp41 di HIV-1, (157-159), utilizzato in clinica.

Sulle glicoproteine di HSV-1 sono stati condotti numerosi studi che utilizzano peptidi per inibire l'infezione virale o per determinare regioni funzionali coinvolte nell'attività fusogena.

Il nostro obiettivo è stato quello di identificare nuove sequenze peptidiche mimetiche delle quattro glicoproteine fondamentali per la fusione e l'ingresso di HSV-1, in grado di inibire l'infezione del virus. Una volta identificati i peptidi candidati i nostri sforzi si sono rivolti alla determinazione dei residui fondamentali per l'attività inibitoria, con uno scopo duplice. Da un lato determinare i residui fondamentali ha consentito di ridurre la lunghezza di tali peptidi, rendendo in futuro più semplice un approccio computazionale di *modelling* molecolare volto alla progettazione di possibili *lead* da utilizzare in fase pre-clinica. Dall'altro ci ha consentito di comprendere quali possano essere le regioni di interazione tra peptide e glicoproteina, suggerendo un meccanismo di azione e ottenendo un incremento dell'attività dei peptidi stessi. I peptidi sono stati anche saggiati in un saggio di fusione cellula-cellula, simile a quello descritto nella sezione 1.3.1 in assenza di virus, per comprendere se essi esercitino l'attività antivirale bloccando la fusione.

### 3.2 Materiali e Metodi

*Virus e cellule.* In tutti gli esperimenti di infezione è stato utilizzato il virus transgenico R8102, derivato da HSV-1(F). R8102 è stato ingegnerizzato da N. Markowitz e B. Roizman (Università di Chicago) inserendo il gene *lacZ* sotto controllo del promotore di ICP-27, tra i geni UL3 e UL4 (187). Il gene *lacZ* consente il rilevamento dell'infezione per mezzo di saggi colorimetrici.

L'effetto dei vari peptidi è stato osservato su diverse linee cellulari, quali HeLa, Cos, MRC, cellule J1.1-2, derivanti da BHKtk<sup>-</sup> esperimenti Nectina1 (63) e HVEM (65), Vero, RS e CHO esperimenti HVEM e Nectina1 (63), ma principalmente su I143tk<sup>-</sup>. Tutte queste linee cellulari sono permissive per l'infezione e la replicazione virale di HSV-1.

*Peptidi.* Tutti i peptidi sono stati sintetizzati dalla PRIMM (Milano) per sintesi su fase solida, utilizzando aminoacidi protetti dal gruppo Fmoc (9H-fluoren-9-ilmetossicarbonile). Dopo la sintesi il peptide viene rimosso dalla resina e purificato per HPLC. I peptidi liofilizzati sono stati risospesi in mezzo di coltura cellulare *Dulbecco modified Eagle Medium* privo di siero, e le soluzioni sono state tamponate a pH 7.4 con Tris-HCl pH 10.

La concentrazione degli *stock* dei vari peptidi è stata misurata in base all'assorbanza ai raggi ultravioletti della tirosina, utilizzando  $\epsilon_{275}=1390 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

*Plasmidi.* Negli esperimenti di fusione cellula-cellula, sono stati utilizzati i plasmidi codificanti per le glicoproteine gD (188), gB $\Delta$ 867 (42), gH e gL, (100), pcDNA3.1(-) Myc-His/Lac Vector (Invitrogen). E' stata utilizzata gB $\Delta$ 867 in luogo di gB *wildtype* in quanto questa glicoproteina, troncata nel dominio citoplasmatico, non va incontro ad endocitosi come gB *wildtype*, incrementando la fusione delle membrane ed il numero di sincizi osservati. Il plasmide EGFR2 $\Delta$  codificante per le sequenze dell'ectodominio e transmembrana di HER-2/neu di ratto (nucleotidi dal 25 al 2096) e delecto del dominio tirosina chinasi (172), è stato utilizzato in miscele di trasfezione mancanti di gD per mantenere costante la quantità di DNA trasfettato.

*Saggio di inibizione dell'infezione.* I peptidi sono stati diluiti a concentrazioni scalari in un *range* compreso tra 500  $\mu\text{M}$  e 150 nM, a seconda dell'indicazione. Tutti gli esperimenti sono stati condotti con campioni senza peptide e con peptidi analoghi non attivi come controlli. Le diverse concentrazioni sono state incubate per 30 minuti a

37°C con R8102,  $2 \times 10^5$  PFU, in mezzo di coltura DMEM (*Dulbecco modified Eagle's Medium*) addizionato di 1% FBS (*Fetal Bovine Serum*). In seguito la miscela peptide-virus è stata adsorbita per 90 minuti a 37°C al monostrato di cellule in vassoi da 96 pozzetti, seminate il giorno precedente  $1 \times 10^4$  cellule per pozzetto. In seguito all'adsorbimento, il virus non penetrato è stato inattivato con soluzione di acido citrico a pH 3 (acido citrico 40 mM, KCl 10 mM, NaCl 135 mM, pH 3) per 1 minuto, le cellule sono poi state lavate in PBS ed incubate in mezzo di coltura DMEM (*Dulbecco modified Eagle's Medium*) addizionato di 1% FBS (*Fetal Bovine Serum*). Dopo 8 ore l'infettività di R8102 in presenza dei vari peptidi alle diverse concentrazioni è stata quantificata con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galattopiranoside (X-gal), per una misura semi-quantitativa e indicativa, oppure con orto-Nitrofenil- $\beta$ -galattoside (ONPG), per una misura quantitativa. I pozzetti in cui l'infezione è stata quantificata con ONPG sono stati trattati in triplicato e l'assorbanza è stata misurata a  $\lambda=405$  nm con un lettore Bio-Rad Microplate Reader.

La media dei valori ottenuti è espressa in percentuale relativa all'infezione in assenza di peptide (100%) e rappresentata in grafico con Microsoft Excel o Synergy Software Kaleidagraph 4.0.

*Saggio di inibizione della fusione cellula-cellula.* L'effetto dei peptidi è stato osservato in cellule BHK trasfettate con i plasmidi codificanti per gD, gB, gH, gL e LacZ. Quando cellule permissive per l'infezione di HSV-1 vengono trasfettate con il quartetto di glicoproteine fondono tra di loro (37), formando sincizi, facilmente identificabili se, in presenza di LacZ esogeno, vengono colorati con X-gal. Come controllo negativo sono state utilizzate cellule trasfettate con una miscela di trasfezione privata del plasmide codificante per gD, la cui quantità totale di DNA è stata bilanciata con il plasmide codificante per Her-2. Brevemente, cellule BHK sono state seminate in un vassoio da 24 pozzetti. Il giorno successivo le cellule sono state trasfettate con 400ng di ogni plasmide, utilizzando l'agente trasfettante Fugene (Roche), secondo le istruzioni del fornitore. Dopo 16 ore le cellule sono state tripsinizzate e seminate in un vassoio da 96 pozzetti, ed immediatamente co-incubate con i peptidi alla concentrazione indicata (200 $\mu$ M), oppure in assenza di peptide, in DMEM 1% FBS (*Foetal Bovine Serum*). Dopo 48 ore le culture sono state fissate in paraformaldeide e colorate con X-gal, per rilevare chiaramente i sincizi.

### 3.3 Risultati

*Disegno razionale di peptidi che mimano la porzione carbossi-terminale di gD.* Come ampiamente trattato nelle sezioni precedenti e studiato in alcuni lavori condotti in questo laboratorio, (75, 77), la regione carbossi-terminale di gD ricopre un ruolo fondamentale nell'innescò della fusione. Questo dominio, detto pro-fusogenico, è localizzato tra gli aminoacidi 240/260 e 310 della proteina matura e, nella forma inattiva chiusa è ripiegato sulla regione amino-terminale della glicoproteina. Quando gD si lega ad uno dei recettori cellulari adotta una conformazione aperta, in cui il dominio pro-fusogenico viene spiazzato dalla sua posizione precedente. Questo cambiamento conformazionale determina l'innescò della fusione, vale a dire l'attivazione delle glicoproteine gB e gH/gL, che eseguono la fusione. E' possibile che l'attivazione delle glicoproteine sia dovuta ad interazioni mediate dal dominio pro-fusogenico. Il nostro primo approccio è stato quello di disegnare peptidi che mimassero porzioni di questo dominio, con l'intento di interferire con le interazioni che innescano la fusione. Sono così stati disegnati e sintetizzati i seguenti peptidi. D1, mima i residui 224-240, che costituiscono l' $\alpha$ -elica 3 (IPENQRTVAVYSLKIAG), poi esteso a mimare la sequenza 219-245 (MLPRFIPENQRTVAVYSLKIAGWHGPK). All'estremità amino-terminale di questa sequenza è anche stata aggiunta una coppia di lisine per aumentarne la solubilità (KKMLPRFIPENQRTVAVYSLKIAGWHGPK). D2, mima i residui 239-253 subito a valle dell' $\alpha$ -elica 3, che formano una regione *linker* (AGWHGPKAPYTSTLL). D3, mima i residui 256-268 (ELSETPNATQPEL). Tale sequenza di gD non è risolta nella struttura cristallina, probabilmente a causa di una marcata flessibilità. Questa è una caratteristica tipica di porzioni coinvolte nell'interazione proteina-proteina o di regioni che governano cambiamenti conformazionali. Questa possibile proprietà della regione ci ha suggerito che essa potesse intervenire nell'innescò della fusione. Per finire, sono stati disegnati 3 peptidi sovrapposti che ricoprono tutta la regione prossima alla membrana, dal residuo 280 al 307, D4a 285-303 (TVAPQIPPNWHIPSIQDAA), D4b 280-296 (EDPVGTVAPQIPPNWHI) e D4c 292-307 (PPNWHIPSIQDAATPYH). Tutti questi peptidi sono stati saggiati per testare l'inibizione dell'infezione di HSV-1 su cellule I14tk<sup>-</sup>, ma non hanno avuto effetto, neanche alle concentrazioni più alte testate, 500  $\mu$ M.

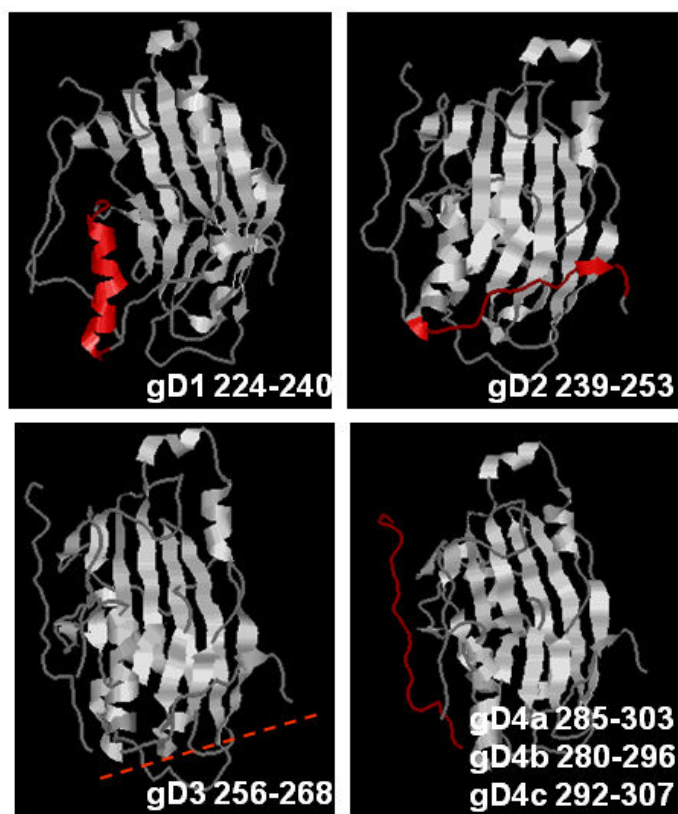


Fig 3.1. Rappresentazione delle regioni di gD mimate dai peptidi gD1, gD2, gD3 e gD 4 (a,b,c). Le immagini sono tratte dal file Protein Data Bank 2C36 utilizzando il programma RasMol. La porzione tratteggiata non è risolta nella struttura cristallina.

*Disegno razionale di peptidi che interagiscono con la superficie di gD.* Con la collaborazione del Professore Vincenzo Pavone del dipartimento di Chimica dell'Università Federico II di Napoli abbiamo analizzato approfonditamente la struttura di gD, con particolare attenzione alle superfici di interazione della molecola. Si è evidenziata la presenza di una tasca localizzata sul dominio immunoglobulinico con possibili implicazioni nell'innescò della fusione. Si è quindi proceduto a disegnare una libreria di brevi peptidi (7-8 residui) con caratteristiche fisico-chimiche ben definite, quali un giro-elica e residui carichi o idrofobici studiati in modo da ottenere una massima complementarità con i residui della tasca, nell'intento di bloccare le possibili interazioni (Fig. 3.2) I peptidi disegnati, sintetizzati e saggiati nel saggio di inibizione dell'infettività sono elencati in tabella 3.1 .

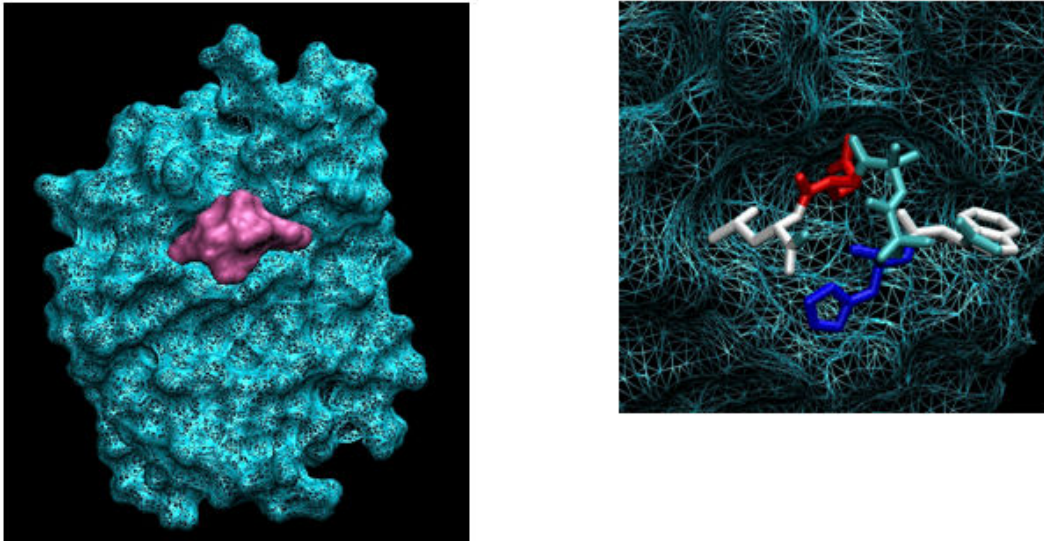


Fig. 3.2. *A sinistra*: rappresentazione della superficie di gD (2C36) su cui è stato disegnato un peptide (in porpora) in grado di bloccare la cavità presente in corrispondenza del dominio immuno-globulinico. *A destra*. Struttura del peptide CAVVP1 e suo possibile alloggiamento nella cavità di gD.

COOH Trp His Aib Aib Glu Leu NH2	CAVVP1
COOH Trp His Aib Ala Glu Leu NH2	CAVVP2
COOH Trp His Ala Aib Glu Leu NH2	CAVVP3
COOH Phe His Aib Aib Glu Leu NH2	CAVVP4
COOH Phe His Aib Ala Glu Leu NH2	CAVVP5
COOH Phe His Ala Aib Glu Leu NH2	CAVVP6
COOH Trp His Aib Aib Glu Leu D-His NH2	CAVVP7
COOH Trp His Aib Ala Glu Leu D-His NH2	CAVVP8
COOH Trp His Ala Aib Glu Leu D-His NH2	CAVVP9
COOH Phe His Aib Aib Glu Leu D-His NH2	CAVVP10
COOH Phe His Aib Ala Glu Leu D-His NH2	CAVVP11
COOH Phe His Ala Aib Glu Leu D-His NH2	CAVVP12

Tab. 3.1 Peptidi disegnati per interagire con la cavità di gD. I residui amminoacidici sono elencati utilizzando il codice a tra lettere; Aib: acido isobutirrico.

Purtroppo nessuno di questi peptidi ha inibito l'infezione e l'ingresso di HSV-1, anche alla concentrazione più elevata di 500 $\mu$ M.



*Disegno razionale di peptidi che mimano la porzione di Nectina-1 che interagisce con gD.* Con l'obiettivo di inibire l'interazione di gD con il recettore cellulare Nectina-1, inibendo così le modificazioni conformazionali della glicoproteina che determinano l'innescamento della fusione, sono stati disegnati dei peptidi che ne mimano una precisa sequenza. In precedenza era stata identificata una regione di Nectina-1 responsabile dell'ingresso di HSV-1, corrispondente ai *loop C* e *C'* del dominio V della porzione amino-terminale (97, 98), delimitata tra i residui 91 e 104 della proteina matura. Questa sequenza è stata riprodotta nel peptide Nectin 91-104 (APYRERVEFLRPSF), mentre in contemporanea sono stati sintetizzati peptidi più corti, fino a quattro residui NECVP 93-96 (YRER). Nei saggi di inibizione dell'infezione di HSV-1 questi peptidi non hanno però sortito l'effetto desiderato, neanche alla concentrazione maggiore (500)  $\mu$ M.

*Disegno razionale di peptidi che mimano sequenze di gH.* Peptidi sono stati disegnati anche sulla sequenza di gH, proteina deputata, con gB, a eseguire la fusione. Sulla sequenza di gH sono già stati realizzati peptidi inibitori, disegnati mimando la regione ad *heptad repeat* HR1 (residui 444-468) (141) e HR2 (residui 556-580) (142, 163). gH è una glicoproteina molto conservata tra gli Herpesvirus, ed in particolare alcune regioni della sequenza, che possono essere candidate ad essere siti di interazione fondamentali per l'esecuzione della fusione. Si sono analizzate per grado di conservazione le sequenze di gH di 4 membri della famiglia *Herpesviridae* (*Herpes Simplex-1*, *Herpes Simplex-2*, *Citomegalovirus* e *Pseudorabies Virus*) utilizzando il programma Multalin fornito dal sito [www.bioinfo.genotoul.fr](http://www.bioinfo.genotoul.fr) (189). Abbiamo scelto le sequenze comprese tra gli aminoacidi 577-600 e 732-739, disegnando e sintetizzando i seguenti peptidi:

<b>gH_577-600</b>	<b>KTLFWLPDHFSPSAASLRFDLDES</b>
<b>gH_585-598</b>	<b>HFSPSAASLRFDLD</b>
<b>gH_732-739</b>	<b>AVFMRYTP</b>

Purtroppo, nessuno dei peptidi ha dimostrato attività inibitoria sull'ingresso e infezione di HSV-1, neppure alla concentrazione più elevata (500  $\mu$ M).

*Disegno di una libreria peptidica che mima gL.* gL è una glicoproteina solubile (190) e ricopre la funzione di *chaperone* di gH (131). I primi 323 residui della porzione amino-terminale di gH interagiscono con i primi 161 residui della porzione amino-terminale di

gL, e questa interazione è sufficiente a stabilizzare il complesso e a consentirne la corretta processazione in membrana (132). Inoltre, la cisteina in posizione 160 è un residuo critico per il trasporto di gH in membrana (134). Supponendo quindi che, se la porzione amino-terminale di gL ricopre un ruolo fondamentale per la corretta maturazione di gH, la porzione carbossi-terminale possa essere coinvolta in interazioni determinanti per l'esecuzione della fusione, si è provveduto a far sintetizzare e a testare una libreria di peptidi disegnati sulla regione compresa tra i residui 94 e 224. La libreria è composta da otto peptidi di 25 residui che riproducono nel complesso tutta la metà carbossi-terminale della molecola, sovrapponendosi uno con l'altro di 10 residui. Nel periodo in cui questi peptidi venivano saggiati è stato osservato da Klyachkin *et al.* che nella regione compresa tra i residui 155 e 161 sono presenti almeno 2 arginine che, per via della carica positiva, sono critiche per l'esecuzione della fusione (191). Purtroppo però la libreria di peptidi disegnati sulla sequenza di gL non ha inibito l'infezione di HSV-1 *in vitro*, neppure alla contrazione più alta (500 µM).

94  
 VNPFLVAGFLEDLSYPAFPANTQE  
 YPAFPANTQETETRLALYKEIRQALDS  
 ALYKEIRQALDSRKQAASHTPVKAG  
 AASHTPVKAGCVNFDYSRTRRCVGR  
 YSRTRRCVGRQDLGPTNGTSGRTFVL  
 TNGTSGRTFVLPDDEAGLQPKPLTT  
 EAGLQPKPLTTPPPIIATSDPTPRR  
 IATSDPTPRRDAATKSRRRRPHSRRL  
 224

Tab.3.2. Sequenze dei peptidi disegnati sulla sequenza di gL. I peptidi ricoprono la porzione carbossi-terminale della glicoproteina, dal residuo 94 al 224, sovrapponendosi l'uno con l'altro di 10 residui.

*Disegno razionale di peptidi che mimano sequenze di gB: regione II e regione III.* Nel progettare peptidi che potessero inibire l'infezione di HSV-1 ci siamo concentrati su gB. Di gB è nota dal 2006 la struttura cristallina della conformazione post-fusogena (114). Per questo motivo il disegno di possibili peptidi inibitori si è basato sui dati strutturali provenienti dagli studi cristallografici. Da questi si evince che gB si organizza in un trimero, e ciascun protomero può essere suddiviso in cinque regioni. Di queste, la

regione II ha caratteristiche analoghe ad un dominio omologo alle pleckstrine, molecole cellulari coinvolte nell'interazione tra proteine e membrane (116, 117), quindi potrebbe ricoprire un ruolo centrale nelle interazioni di gB con la membrana della cellula ospite durante l'esecuzione della fusione. Inoltre questo dominio non è completamente risolto nella struttura cristallina, suggerendo che sia molto flessibile, e quindi propenso a riarrangiamenti, forse coinvolti nell'attività fusogena di gB. Per finire, in questa regione è presente l'epitopo dell'anticorpo monoclonale neutralizzante mAb H1838, tra i residui Ala<sup>390</sup> e Gly<sup>410</sup>. Sono quindi stati disegnati, sintetizzati e saggiati i seguenti peptidi:

gB pep\_2.a.1, residui 460-480 (*NH*<sub>2</sub>-LAELYVREHLREQSRKPPNPT-COOH);

gB pep\_2.a.2, residui 485-500 (*NH*<sub>2</sub>-GASANASVERIKTTSS-COOH);

gB pep\_2.b, residui 380-410 (*NH*<sub>2</sub>-YGGSFRRFSSDAISTTFTTNLTEYPLSRVDLG-COOH).

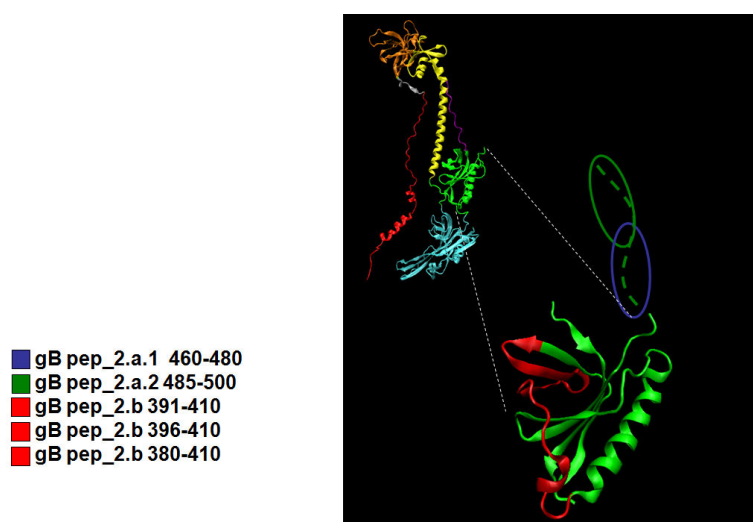


Fig.3.3. Rappresentazione della regione II del cristallo di gB, tratta dal file PDB 2gum, e delle sequenze mimate dai peptidi gB pep\_2.a.1, gB pep\_2.a.2 e gB pep\_2.b.

I primi due peptidi (gB pep\_2.a.1 e gB pep\_2.a.2) sono stati disegnati sulle sequenze non risolte della struttura cristallina, gB pep\_2.b mima l'epitopo per l'anticorpo neutralizzante H1838 (Fig. 3.3).

Purtroppo, nessuno di questi peptidi ha mostrato di inibire l'infezione di HSV-1, nemmeno alla concentrazione più alta testata (500  $\mu$ M).

La regione III è invece costituita da una lunga  $\alpha$ -elica di 53 residui (aa 503-555) che, sempre basandosi sull'osservazione della struttura cristallina di gB, stabilizza il trimero formando un *coiled-coil* centrale con le corrispondenti  $\alpha$ -eliche degli altri due protomeri (114). Su questa regione è stata disegnata una libreria di peptidi di 25 residui che si sovrappongono l'un l'altro per dieci aminoacidi, dal residuo 490 al 570:

<b>gB3-490-515</b>	<b><i>NH<sub>2</sub></i>-ASVERIKTTSSIEFARLQFTYNHIQR-COOH</b>
<b>gB3-505-529</b>	<b><i>NH<sub>2</sub></i>-RLQFTYNHIQRHVNDMLGRVIAIWC-COOH</b>
<b>gB-520-544</b>	<b><i>NH<sub>2</sub></i>-MLGRVIAIWCCELQNHELTSWNEARK-COOH</b>
<b>gB-533-557</b>	<b><i>NH<sub>2</sub></i>-QNHELTSWNEARKLNPNIAIASVTVGR-COOH</b>
<b>gB-545-570</b>	<b><i>NH<sub>2</sub></i>-LNPNAIASVTVGRRVSARMLGDVMAVS-COOH</b>

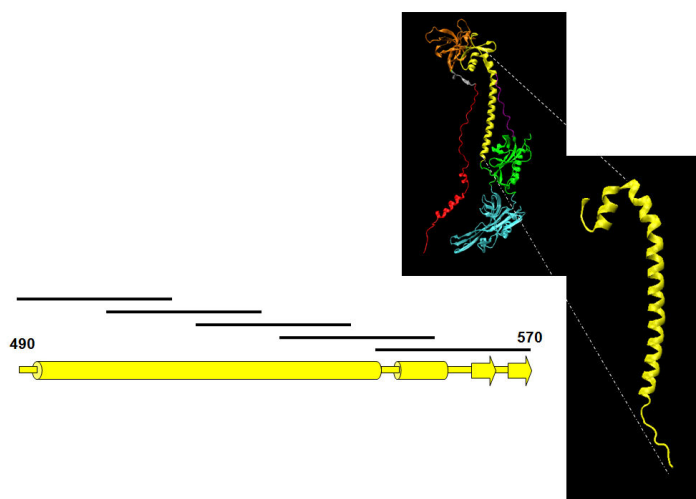


Fig.3.4. Rappresentazione della regione III di gB, rielaborata dal file PDB 2gum.. *Asinistra*: rappresentazione schematica della regione III e dei peptidi su di essa disegnati, in scala. I cilindri rappresentano le  $\alpha$ -eliche,, le frecce i foglietti  $\beta$ .

Nessuno di questi peptidi ha manifestato attività inibitoria verso l'infezione di HSV-1, anche alle concentrazioni più elevate (500  $\mu$ M). Stranamente, nello stesso periodo in cui questi peptidi venivano saggiati, un altro gruppo di ricerca ha identificato nel peptide che mima la sequenza tra i residui 491-514 un inibitore dell'infettività virale, in saggi di inibizione analoghi quelli condotti in questo lavoro (167).

*Disegno razionale di peptidi che mimano sequenze di gB: regione V.* I risultati più interessanti si sono ottenuti con i peptidi che mimano la regione V di gB. Questa regione, detta “braccio” (*arm*), è composta da circa 60 aminoacidi, in cui si identificano 2  $\alpha$ -eliche (aa 690-697 e aa 701-715) tra residui non organizzati in strutture secondarie (Fig. 3.5). Il lungo “braccio” percorre nella sua lunghezza tutta la glicoproteina, dalla regione IV apicale detta “corona” (*crown*) alla regione I, detta “base” (*base*). Nell’organizzazione trimerica di gB, la regione V di ciascun protomero si insinua nella cavità antistante formata dagli altri due protomeri. Ricordando che la struttura cristallizzata rappresenta la conformazione di gB dopo aver eseguito la fusione, è lecito pensare che il ruolo della regione V sia quello di stabilizzare la conformazione post-fusogonica, oppure di guidare le modificazioni conformazionali che avvengono durante l’esecuzione della fusione.

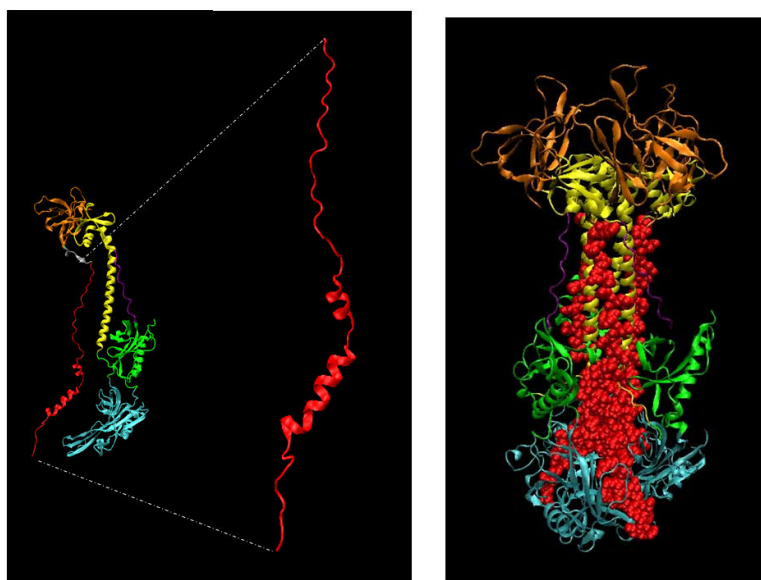


Fig.3.5. Rappresentazione della regione V di gB, rielaborata dal *file* PDB 2gum tramite il programma VMD dell’Università dell’Illinois.. *Asinistra*: rappresentazione schematica della regione V. *A destra*. Rappresentazione del trimero di gB, in cui la regione V è evidenziata con rappresentazione *spacefill*.

Sulla sequenza di questa regione sono stati disegnati in principio tre peptidi, denominati gBpep\_5a, corrispondente ai residui 687-717 ( $NH_2$ -EVYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLRFA-COOH), gBpep\_5b, corrispondente

ai residui 701-720 ( $NH_2$ -DYTEVQRRNQLHDLRFADID-COOH) e gBpep\_5c, corrispondente ai residui 673-697 ( $NH_2$ -LNITMLEDFEVPLEVYTRHEIKDSG-COOH).

I peptidi sono stati saggiati nel saggio di inibizione della fusione e due di questi, 5a e 5c, hanno manifestato attività inibitoria, su cellule I143tk<sup>-</sup>.

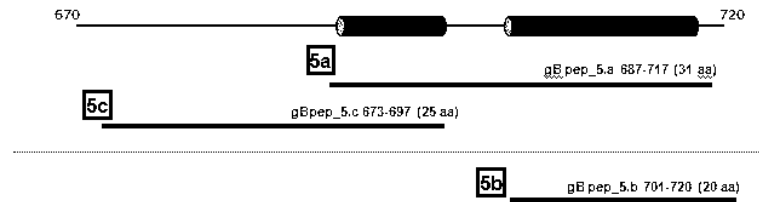


Fig. 3.6. Rappresentazione schematica dei peptidi disegnati sulla regione V di gB. I cilindri rappresentano le  $\alpha$ -eliche. Le barre rappresentano i peptidi gBpep\_5a, gBpep\_5b, gBpep\_5c, in scala con la schematizzazione della sequenza.

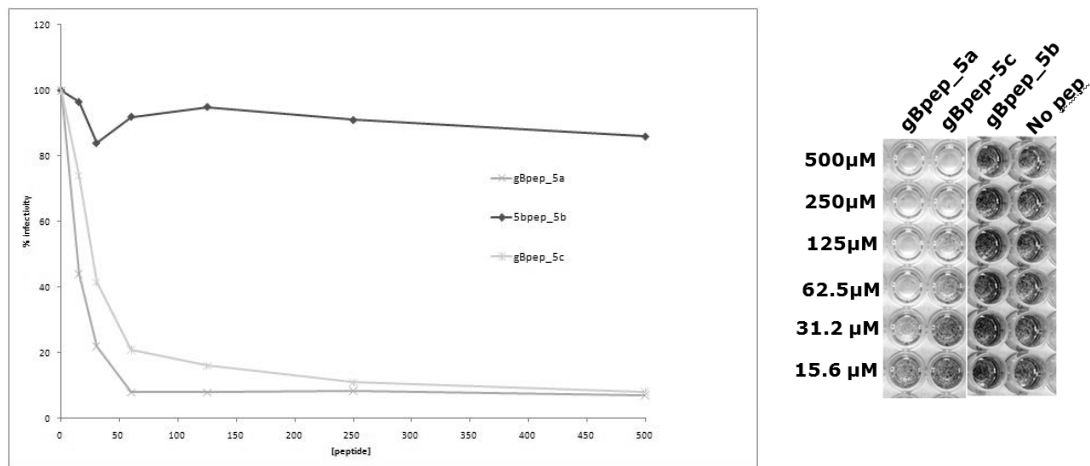


Fig. 3.7. *A sinistra*: attività inibitoria dei peptidi gB5a e 5c. I peptidi sono stati incubati a dosi scalari (da 500  $\mu$ M a 15  $\mu$ M) per 30 minuti a 37°C in presenza di HSV-1 R8102  $2 \times 10^5$  PFU. In seguito la miscela peptide-virus è stata adsorbita per 90 minuti a 37°C al monostrato di cellule I143tk<sup>-</sup> in vassoi da 96 pozzetti. In seguito all'adsorbimento il virus non penetrato è stato inattivato con soluzione di acido citrico a pH 3 per 1 minuto, le cellule sono poi state lavate in PBS ed incubate in mezzo di coltura DMEM (*Dulbecco modified Eagle's Medium*) addizionato di 1% FBS (*Fetal Bovine Serum*). Dopo 8 ore l'infettività di R8102 in presenza dei vari peptidi alle diverse concentrazioni è stata quantificata con orto-Nitrofenil- $\beta$ -galattoside (ONPG). I pozzetti sono stati trattati in triplicato e l'assorbanza è stata misurata a  $\lambda=405$  nm con un lettore Bio-Rad Microplate Reader. *A destra*: saggio di inibizione dell'infettività di HSV-1 condotto come il precedente. L'infezione è stata rilevata con colorazione X-gal *in situ*.

*Ottimizzazione dei peptidi attivi sulla regione V: riduzione della lunghezza delle sequenze.* Al fine di identificare la sequenza minima fondamentale per l'attività inibitoria dei due peptidi attivi gBpep\_5a e gBpep\_5c, sono stati sintetizzati peptidi abbreviati alle estremità. Comprendere quali siano i residui fondamentali per l'attività dei peptidi ha lo scopo di ottenere sequenze più brevi, che possano essere analizzate da programmi di *modelling* molecolare per lo sviluppo di altre molecole attive. Inoltre, comprendere quali siano i residui critici può far luce sul meccanismo di azione dei peptidi.

Si è quindi provveduto a sintetizzare gB-V-VP2, peptide derivante da gBpep5a, testato nel saggio di inibizione dell'infezione virale. gB-V-VP2 non ha mantenuto l'attività inibitoria, forse a causa di una riduzione troppo radicale della sequenza. In futuro sarà necessario tornare su questa sequenza per individuare i residui fondamentali

<b>E</b> VYTRHEIKDSGLLDYTEVQRRNQLHDLRFA	<b>gBpep_5a</b>	<b>+</b>
<b>E</b> IKDSGLLDYTEVQRR	<b>gB-V-VP2</b>	<b>-</b>

Tab. 3.3. Sequenza del peptide gB-V-VP2, ricavato dalla riduzione del peptide gBpep\_5a.

La nostra analisi si è focalizzata sul peptide gBpep\_5c, dalla cui sequenza si sono derivati numerosi peptidi più brevi, le cui attività ci hanno consentito di individuare la sequenza minima che mantiene l'attività inibitoria. In Tab. 3.4. sono mostrate le sequenze e in Fig. 3.8 le attività dei peptidi saggiati nel saggio di inibizione dell'infezione di HSV-1.

<b>LNIT</b> MLEDHEFVPLEVYTRHEIKDSG	<b>gBpep_5c</b>	<b>+</b>
<b>M</b> LEDHEFVPLEVYTRH	<b>gB-V-VP1</b>	<b>+</b>
<b>D</b> HEFVPLEVYTRH	<b>gB-V-VP1.2</b>	<b>-</b>
<b>M</b> LEDHEFVPLEVY	<b>gB-V-VP1.3</b>	<b>+</b>
<u><b>L</b></u> EDHEFVPLEVY	<b>gB-V-VP1.4</b> ◀	<b>+</b>
<b>E</b> DHEFVPLEVY	<b>gB-V-VP1.5</b>	<b>-</b>
<b>L</b> ADHEFVPLEV	<b>gB-V-VP-11mer</b>	<b>-</b>
<b>L</b> ADHEFVPLE	<b>gB-V-VP-10mer</b>	<b>-</b>
<b>L</b> ADHEFVPL	<b>gB-V-VP-9mer</b>	<b>-</b>

Tab.3.4. Sequenze dei peptidi derivanti dalla riduzione del peptide gBpep\_5c. (◀) indica la sequenza minima per l'inibizione dell'infezione. Il segno (+) indica che l'attività inibitoria è mantenuta, il segno(-) che l'attività inibitoria è diminuita o persa.

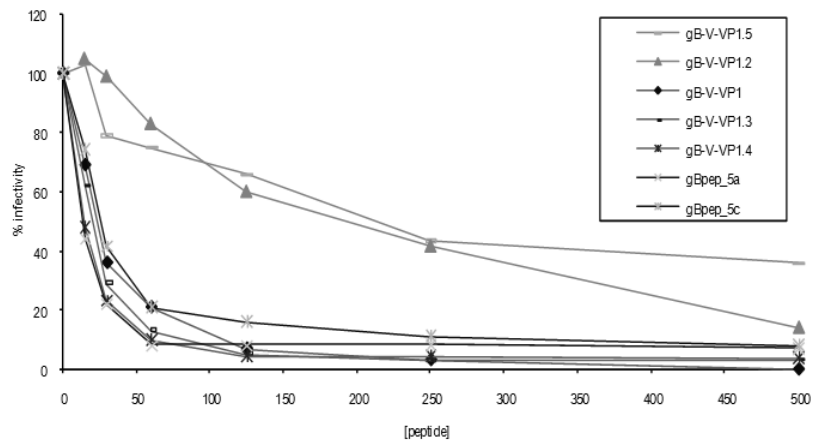


Fig. 3.8. Attività inibitoria dei peptidi gBpep\_5a e gBpep\_5c, comparata con le inibizioni mediate da peptidi più corti, derivati dalla sequenza del peptide gBpep5c. Per i dettagli v. Fig. 3.7.

Siamo così stati in grado di identificare gB-V-VP1.4, un peptide composto da 12 residui ( $NH_2$ -LEDHEFVPLEVY-COOH) che inibisce l'infezione di HSV-1 a concentrazioni analoghe a gBpep\_5c, composto da 25 residui.

*Ottimizzazione dei peptidi attivi sulla regione V: identificazione dei residui fondamentali per l'attività inibitoria ed incremento dell'attività.* Per identificare i residui critici per l'attività dei peptidi disegnati sulla sequenza in analisi, compresa gli aminoacidi 677 e 689, si sono sostituiti i residui della sequenza con l'alanina, eseguendo una scansione mutazionale (*Alanine Scanning*). In tabella 3.5 sono elencati i peptidi sintetizzati e saggianti per la capacità di inibire l'infezione di HSV-1.

<u>LNIT</u> MLEDHEFVPLEVYTRHEIKDSG	gBpep_5c	+
M <u>LE</u> DHEFV <u>D</u> LEVYTRH	gB-V-VP1.1	+
MLEDHEFV <u>P</u> A <u>E</u> VY	gB-V-VP1.9	-
MLEDHEF <u>A</u> P <u>L</u> EVY	gB-V-VP1.11	+
M <u>L</u> A <u>D</u> HEFVPLEVY	gB-V-VP1.16	+
<u>L</u> A <u>D</u> HE <u>A</u> VPLEVY	gB-V-VP1.16.10	-
<u>L</u> A <u>D</u> H <u>A</u> FVPLEVY	gB-V-VP1.16.11	◀ +
<u>L</u> A <u>D</u> A <u>E</u> FVPLEVY	gB-V-VP1.16.12	-
<u>L</u> A <u>A</u> HEFVPLEVY	gB-V-VP1.16.13	◀ +

Tab. 3.5. Sequenze dei peptidi analizzati nel *mutational scanning*. I residui sostituiti rispetto a quelli presenti nella sequenza *wildtype* sono sottolineati. Il segno (+) indica che l'attività inibitoria è mantenuta o incrementata, il segno (-) che l'attività inibitoria è diminuita o persa. (◀) indica i peptidi più attivi. Dal peptide gB-V-VP1.16 la mutazione E679A è mantenuta, perché il peptide mostrava un incremento di attività (v. Fig. 3.9).



Numerosi residui sostituiti si sono rivelati non essere essenziali per l'attività inibitoria: Glu<sup>679</sup>, Asp<sup>680</sup>, Glu<sup>682</sup>, Val<sup>684</sup>, Pro<sup>685</sup>. Altri invece hanno dimostrato di essere fondamentali per l'attività dei peptidi, e la loro sostituzione provoca la perdita di attività da parte dei peptidi: Leu<sup>678</sup>, His<sup>681</sup>, Phe<sup>683</sup> e Leu<sup>686</sup>. Sorprendentemente, alcuni peptidi hanno mostrato un incremento dell'attività, rispetto a gBpep5c, inibendo l'infezione di HSV-1 a concentrazioni più basse (Fig. 3.9).

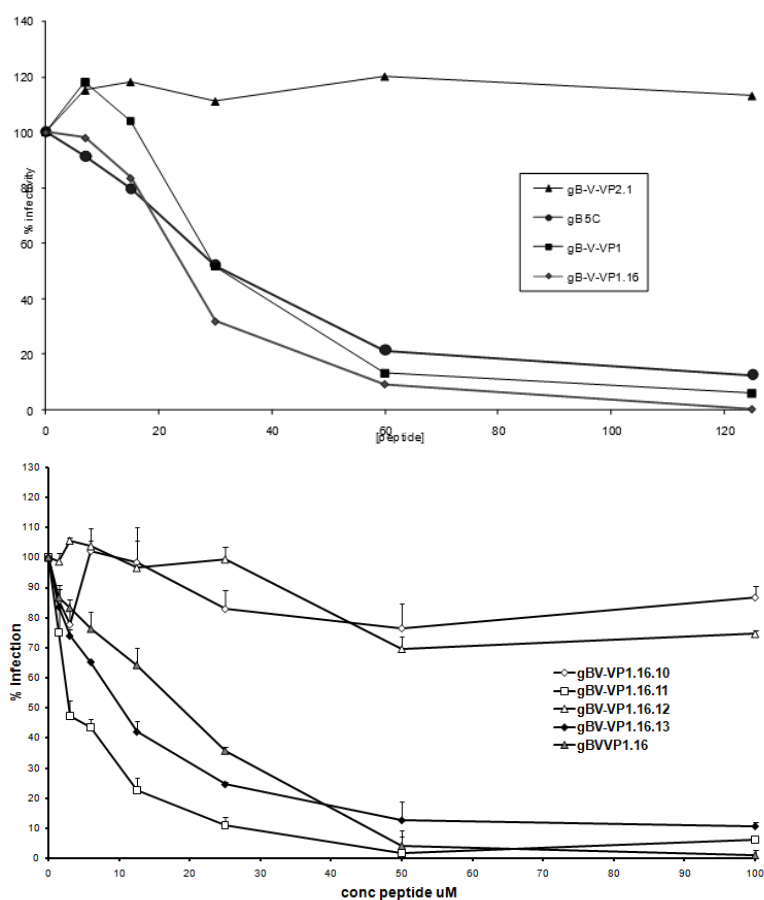


Fig.3.9. Attività inibitoria dei peptidi indicati nel saggio di inibizione dell'infettività di HSV-1. Per dettagli v. Fig. 3.7.

Dato che i peptidi gBV-VP1.16.11 e gBV-VP1.16.13 mostravano un significativo incremento di attività dovuto alla sostituzione di Glu<sup>679</sup>, Asp<sup>680</sup> o Glu<sup>682</sup> con residui di alanina, si è voluto osservare l'attività di un peptide che portasse tutte e tre le alanine contemporaneamente, per verificare se le sostituzioni migliorassero sinergicamente l'attività. Quindi, il peptide gBtripleAla ( $NH_2$ -LAAHAFVPLEVY-COOH) è stato sintetizzato e testato nel saggio di inibizione della fusione, in cui ha mostrato una

radicale perdita di attività. Si è giunti alla conclusione che, se la presenza di una o due alanine ha un effetto positivo sull'attività, forse rendendo il peptide più flessibile e quindi favorito ad interagire con il bersaglio, l'introduzione di tre alanine potrebbe sortire l'effetto opposto, facendo perdere al peptide caratteristiche di rigidità importanti. Il passo successivo è stato introdurre una prolina nelle posizioni precedentemente sostituite dall'alanina; la prolina notoriamente introduce rigidità nella struttura della catene polipeptidiche. Si è quindi provveduto alla sintesi e alla caratterizzazione di due serie di peptidi (Serie Pro-scan 1 e Serie Pro-scan 2) con sostituzioni in prolina, una derivante da gB-V-VP1.4, la sequenza minima *wildtype*, e una da gB-V-VP1.16.11 peptide che già contiene le due sostituzioni E679A ed E682A, che fino a questo momento si è dimostrato il più attivo. Le due serie sono rappresentate in Tab.3.6e, come si può osservare in Fig. i peptidi gBVVP5.1.1 e gBVVP5.2.1 hanno mostrato nel saggio di inibizione dell'infettività un'attività ulteriormente incrementata rispetto a gBVVP1.16.11.

<b>Serie Pro-Scan-1</b>			
<b>LEDHEFVPLEVY</b>		<b>gBVVP1.4</b>	<b>+</b>
<b>LPDHEFVPLEVY</b>		<b>gBVVP 5.1.1 ◀</b>	<b>+</b>
<b>LEPHEFVPLEVY</b>		<b>gBVVP 5.1.2</b>	<b>-</b>
<b>LEDHPFVPLEVY</b>		<b>gBVVP 5.1.3</b>	<b>-</b>
<b>Serie Pro-Scan-2</b>			
<b>LADHAFVPLEVY</b>		<b>gBVVP.1.16.11</b>	<b>+</b>
<b>LPDHAFVPLEVY</b>		<b>gBVVP 5.2.1 ◀</b>	<b>+</b>
<b>LAPHAFVPLEVY</b>		<b>gBVVP 5.2.2</b>	<b>-</b>
<b>LADHPFVPLEVY</b>		<b>gBVVP 5.2.3</b>	<b>-</b>

Tab.3.6. Peptidi con sostituzioni in prolina, derivati da gBVVP1.4 (Serie Pro-Scan-1) e da gBVVP1.16.11 (Serie Pro-Scan-2). (+) indica i peptidi con attività maggiore o uguale a quella fino ad ora osservata. (-) indica i peptidi in cui si è osservata perdita di attività. (◀) indica i peptidi più attivi.

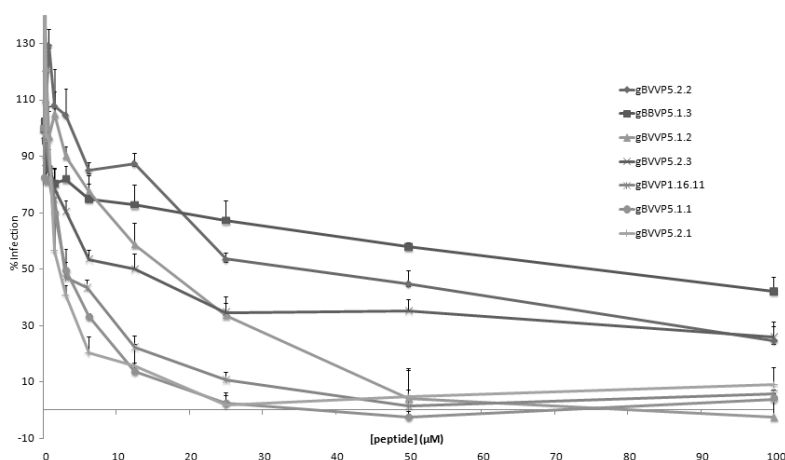


Fig.3.10. Attività dei peptidi appartenenti alle serie Pro-Scan1 e Pro-Scan2, nel saggio di inibizione di infettività di HSV-1. I peptidi gBVVP5.1.1 e gBVVP5.2.1 mostrano un incremento dell'attività inibitoria rispetto a gBVVP1.16.11. Per i dettagli v.Fig.3.7.

Inserendo in grafico semilogaritmico (Fig.3.11) i dati ottenuti dai migliori peptidi fino ad ora saggiati, possiamo osservare l'aumento di attività che le diverse sostituzioni hanno determinato, che è stato quantificato in termini di  $IC_{50}$  (concentrazione inibente al 50% di infezione, rispetto al campione non trattato con peptide). Le  $IC_{50}$  sono riassunte in tabella 3.7.

$IC_{50} = 2 \cdot 10^{-6}$	Ac-LPDHAFVPLEVY-NH <sub>2</sub>	gB-V-VP5.2.1
$IC_{50} = 3 \cdot 10^{-6}$	Ac-LPDHEFVPLEVY-NH <sub>2</sub>	gB-V-VP5.1.1
$IC_{50} = 4 \cdot 10^{-6}$	Ac-LADHAFVPLEVY-NH <sub>2</sub>	gB-V-VP1.16.11
$IC_{50} = 9 \cdot 10^{-6}$	Ac-LAAHEFVPLEVY-NH <sub>2</sub>	gB-V-VP1.16.13
$IC_{50} = 14 \cdot 10^{-6}$	Ac-LEPHEFVPLEVY-NH <sub>2</sub>	gB-V-VP5.1.2
$IC_{50} = 16 \cdot 10^{-6}$	Ac-LADHEFLPLEVY-NH <sub>2</sub>	gB-V-VP1.16

Tab. 3.7. Concentrazioni inibenti 50 dei peptidi più attivi saggiati nel test di inibizione dell'infezione.

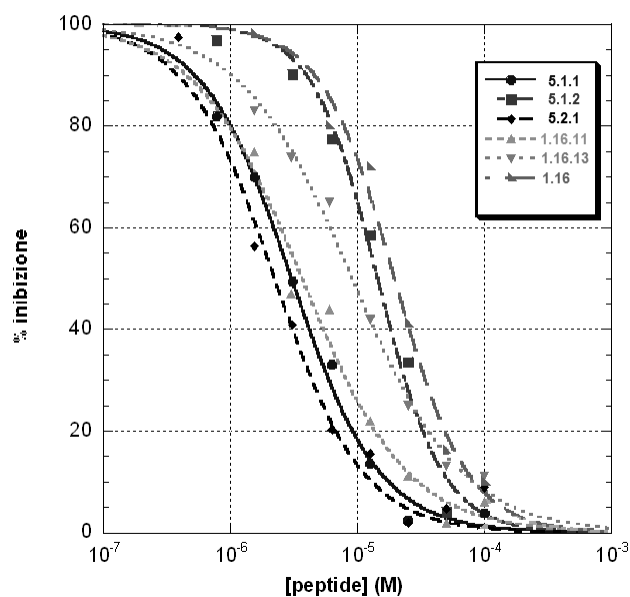


Fig.3.11. Rappresentazione semilogaritmica delle inibizioni mediate dai peptidi più attivi. Il grafico è stato realizzato con il programma Synergy Kaleidagraph, interpolando i dati ottenuti nei diversi saggi di inibizione dell'infettività secondo la funzione  $Y=(100+m0/m1)/(1+m0/m1)$ .

*I peptidi disegnati sulla regione V di gB inibiscono l'infezione di HSV-1 in vitro su numerose linee cellulari. L'attività dei peptidi presi in considerazione in questo studio, in particolare di gBpep\_5c e gBpep\_5a, è stata testata su diverse linee cellulari, principalmente I143tk<sup>-</sup>, ma anche HeLa, Cos, MRC, cellule J derivanti da BHKtk<sup>-</sup> esprimenti HVEM o Nectina-1, Vero, RS e CHO esprimenti HVEM o Nectina-1. Queste linee sono tutte suscettibili all'ingresso e alla proliferazione di HSV-1. I peptidi saggiati mostrano attività inibitoria in tutte le linee cellulari.*

*I peptidi gB.VP1.16 e gB.V.VP1.16.11 sono attivi nel saggio di fusione cellula-cellula. I peptidi gB.VP1.16 e gB.V.VP1.16.11 sono stati utilizzati nel saggio di fusione cellula-cellula. In questo saggio, cellule BHK sono state trasfettate con i plasmidi codificanti per il quartetto di glicoproteine necessarie e sufficienti alla fusione, in aggiunta del plasmide codificante per *LacZ*. Le quattro glicoproteine, espresse transientemente in cellule suscettibili all'infezione, mediano la fusione formando sincizi, che in questo saggio vengono facilmente identificati per mezzo della colorazione con X-gal. Dopo 16 ore le cellule sono state tripsinizzate e seminate in un vassoio da 96 pozzetti, ed immediatamente co-incubate con i peptidi a concentrazione 200µM, oppure in assenza di peptide. Si osserva chiaramente (Fig. 3.12) come in presenza del peptide gBVVP1.16 le cellule non formano sincizi, ed hanno un fenotipo analogo al controllo negativo, trasfettato con tre glicoproteine in assenza di gD. In presenza di un peptide inattivo (gBVVP2) le cellule trasfettate con il quartetto di glicoproteine fondono tra loro formando sincizi, analogamente al campione non trattato con alcune peptide.*

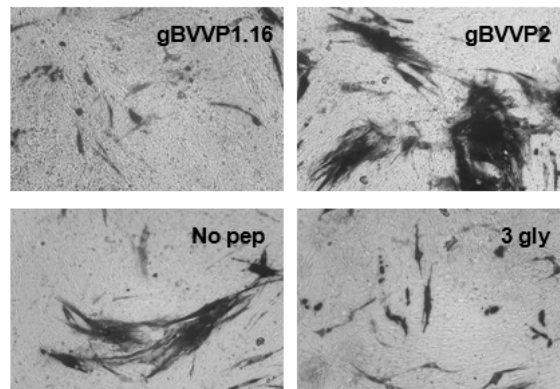


Fig.3.12. Saggio di fusione cellula-cellula. Il peptide gBVVP1.16 inibisce la formazione di sincizi a concentrazione 200  $\mu$ M. Cellule BHK, suscettibili all'infezione di HSV-1, sono state trasfettate in piastre da 24 pozzetti con i plasmidi codificanti per le quattro glicoproteine gD, gB, gH, gL e lacZ, oppure con il plasmide codificante per Her-2, in luogo di gD., come controllo negativo *3gly*. 16 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state tripsinizzate, seminate in piastre da 96 pozzetti ed immediatamente co-incubate con i peptidi indicati a concentrazione 200  $\mu$ M. ). Dopo 48 ore le culture sono state fissate in paraformaldeide e colorate con X-gal, per rilevare chiaramente i sincizi.

### 3.4 Discussione

L'individuazione di peptidi in grado di inibire l'infezione virale è un obiettivo molto importante nello studio dei virus. I peptidi possono essere dei candidati per lo sviluppo di farmaci antiherpetici e sono ottimi strumenti per comprendere il funzionamento delle glicoproteine che mediano la fusione dell'*envelope* del virus con la membrana cellulare. Come è stato approfonditamente trattato nel capitolo precedente, le quattro glicoproteine fondamentali di HSV-1 formano un complesso tramite interazioni specifiche tra di loro. Secondo il modello più accreditato, in seguito al legame con il recettore cellulare, gD innesca la fusione tramite il dominio profusogenico (75, 77), presumibilmente tramite interazioni con le altre glicoproteine gB e gH/gL. Interferire in questi meccanismi tramite peptidi che mimano piccole porzioni delle macromolecole coinvolte può essere molto utile per comprendere gli eventi che si verificano nel complesso meccanismo di attivazione. Alternativamente, i peptidi possono interferire inibendo, o bloccando in stadi intermedi, i processi di riarrangiamento intramolecolare. Caratteristica delle glicoproteine fusogeniche virali sono le notevoli modificazioni conformazionali a cui vanno incontro per mediare la fusione tra le membrane. Tali modificazioni sono guidate e stabilizzate da interazioni interne alle glicoproteine o tra i diversi protomeri che prendono parte al multimerico della glicoproteina, come ad esempio la formazione di un *six-helix bundle* in gp41 di HIV-1, durante la fusione del virus alla membrana cellulare. Con questo processo interferisce il peptide T-20 (161), l'unico peptide antivirale utilizzato in clinica.

In questo studio abbiamo adottato diversi approcci al fine di identificare regioni delle quattro glicoproteine fondamentali per la fusione di HSV-1 che, riprodotte in peptidi, interferissero con il meccanismo fusogenico.

Per quanto riguarda gD, il primo approccio è stato quello di disegnare peptidi che, mimando la sequenza del dominio pro-fusogenico, impedissero l'innescamento della fusione, occupando i siti in cui il dominio interagisce in seguito all'attivazione di gD, verosimilmente su gB o gH/gL.

Altri peptidi sono stati disegnati per interferire con il legame con il recettore Nectina-1, con l'obiettivo di occupare il sito di legame del recettore sulla glicoproteina virale. Analizzando poi la struttura cristallina di gD, abbiamo identificato sulla sua superficie

una cavità che poteva sembrare un possibile sito di legame con le glicoproteine a valle del processo fusogenico. Purtroppo nessuno di questi approcci ha dato risultati.

Per gH abbiamo cercato le regioni più conservate tra quattro membri della famiglia *herpesviridae*, in quanto su questa glicoproteina sono già stati identificati numerosi peptidi di interesse biologico, che riproducono regioni idrofobiche (192), o regioni ad *heptad repeat* (141, 163).

Mimando la sequenza di gL è stata disegnata una libreria che ricopre tutta la porzione carbossi-terminale della glicoproteina, dal residuo 94 a 224. Dei 224 residui di cui è composta, i 161 amino-terminali sono necessari per l'interazione con gH (132), ma il ruolo della porzione carbossiterminale è ignoto. In questa regione sono presenti alcuni residui critici per la funzionalità della glicoproteina, in particolare, Arg<sup>158</sup> e Cys<sup>160</sup>. Se questi residui vengono sostituiti con alanine, gL perde la capacità di processare in membrana gH e si osserva una diminuzione della fusione in saggi di complementazione. Se Arg<sup>158</sup> viene sostituita con un altro aminoacido carico, la lisina, le funzioni vengono recuperate. La carica positiva è quindi importante, probabilmente per qualche interazione, forse con gH. In ogni caso, nessuno dei peptidi disegnati sulla sequenza di gL ha avuto attività inibitoria *in vitro*.

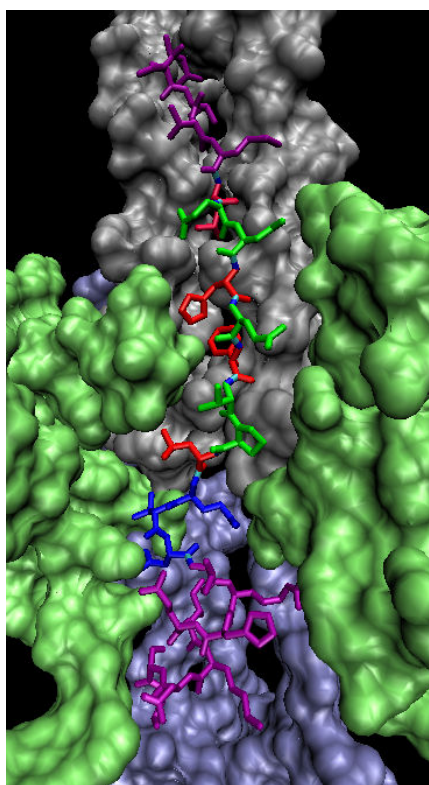
Molto è noto di gB, da una fine mappatura di anticorpi neutralizzanti (103, 193, 194) alla struttura cristallina (114), fino all'identificazione e alla localizzazione dei *loop* fusogenici, situati sull'estremità della molecola, nella regione I (119). Questi dati ci hanno fornito un *rationale* per disegnare e misurare l'attività inibitoria di peptidi disegnati su diverse regioni della glicoproteina. Solo due peptidi gBpep\_5a e gBpep\_5c, disegnati sulla regione V, hanno mostrato di avere un'attività inibente sull'infezione del virus. Come è già stato trattato precedentemente, la risoluzione del cristallo di gB trimerica mostra cinque regioni, topologicamente distinte. La regione I, dove sono stati individuati aminoacidi idrofobici critici per la fusione (119), detta "base"; la regione II, costituita da foglietti  $\beta$  ed una  $\alpha$ -elica, formanti un dominio omologo alle pleckstrine, molecole deputate a mediare l'interazione tra proteine e membrane; la regione III costituita da una lunga  $\alpha$ -elica che, formando un *coiled coil* con le corrispettive regioni degli altri protomeri, forma un *core* per la formazione del trimero; la regione IV, detta "corona", ricca di foglietti  $\beta$  e di epitopi su cui mappano anticorpi neutralizzanti; la regione V, un lungo braccio che prende contatti su tutta la lunghezza degli altri due

protomeri antistanti, dalla regione III-IV fino alla regione I, per poi terminare con la regione prossima alla membrana dell'*envelope* virale. La funzione della regione V è probabilmente quella di stabilizzare il trimero, interagendo con gli altri protomeri, e prendendo contatti nei solchi che si formano tra uno e l'altro, a formare una struttura trimerica molto compatta. A causa delle numerose interazioni intermolecolari, delezioni ed inserzioni nella sequenza della molecola sono risultate nella mancata o scorretta maturazione della glicoproteina, rendendo difficile la caratterizzazione funzionale dei diversi domini (106, 125).

E' sulla regione V che abbiamo identificato peptidi mimetici attivi, complessivamente tra i residui 673 e 720. In questa porzione della molecola è stato osservato in un lavoro precedente che un'inserzione a livello della Thr<sup>690</sup> altera l'attività fusogenica della glicoproteina (127).

In particolare, il nostro studio si è concentrato sul peptide gBpep\_5c (673-697). Si è provveduto ad abbreviare la sequenza, rimuovendo uno ad uno i residui da ambo le estremità, ottenendo un peptide composto da 14 aminoacidi (gBVVP1.4), senza perdita di attività confronto al peptide di partenza, composto da 25 aminoacidi. Questo risultato ci ha consentito di analizzare una regione più piccola, in cui abbiamo potuto effettuare un *Alanine Scanning*, ovvero sostituire i vari residui con alanina, al fine di comprendere quali fossero fondamentali per l'attività inibitoria. Questo ci ha portati ad osservare che vi è un'alternanza quasi perfetta tra residui che possono essere sostituiti e non, lungo la sequenza del peptide: la sostituzione di Leu<sup>678</sup>, His<sup>681</sup>, Phe<sup>683</sup> e Leu<sup>686</sup> provoca la perdita di attività, la sostituzione di Glu<sup>679</sup>, Asp<sup>680</sup>, Glu<sup>682</sup>, Val<sup>684</sup>, Pro<sup>685</sup> non inficia l'attività del peptide, anzi la incrementa. Analizzando sulla struttura cristallina come la regione in analisi si localizza all'interno del trimero, abbiamo osservato che i residui critici Leu<sup>678</sup>, His<sup>681</sup>, Phe<sup>683</sup> e Leu<sup>686</sup> sono orientati verso il solco formato dalle regioni I, II, e III degli altri protomeri, come rappresentato in Fig. 3.13, in cui i residui del peptide che possono essere sostituiti sono rappresentati in verde, e quelli critici in rosso. Questa osservazione ci fornisce un suggerimento sul reale sito di interazione dei peptidi studiati, che probabilmente alloggiato nella cavità formata dagli altri protomeri. Il fatto che diverse sostituzioni in alanina di residui non critici abbiano portato ad un incremento dell'attività, da una IC<sub>50</sub>~20 µM fino a 4 µM, potrebbe essere dovuto al conferimento da parte delle alanine di una maggiore flessibilità ai peptidi





gBVVP1.16.11 e gBVVP1.16.13, che ne migliorerebbe la capacità di alloggiare nella tasca. D'altra parte la presenza di tre alanine diminuisce l'attività, forse causando un'eccessiva flessibilità, nel peptide  $NH_2$ -LAAHAFVPLEVY-COOH. Quando è stata introdotta la sostituzione E679P (peptidi gBVVP5.1.1 e gBVVP5.2.1), si è osservato invece un'ulteriore incremento di attività, per arrivare ad una  $IC_{50} \sim 2 \mu M$ . E' possibile che la prolina induca una struttura nella parte amino-terminale del peptide che provoca una maggiore affinità del peptide per il bersaglio.

Fig. 3.13.. Rappresentazione della regione mimata dai peptidi in studio e delle superfici ad essi prossimali. In rosso i residui critici, in verde i residui che possono essere sostituiti, in porpora in residui che sono stati rimossi senza perdita di attività, in blu residui che non possono essere rimossi, ma ancora non mutati. L'immagine è stata ottenuta con il software VMD dell'Università dell'Illinois, analizzando il file 2gum.pdb.

L'interazione dei peptidi studiati con questa regione dovrà essere dimostrata in maniera diretta.

I peptidi analizzati hanno mostrato attività inibitoria su varie linee cellulari suscettibili all'infezione di HSV-1 (I143tk<sup>-</sup>, RS, COS, MRC, Vero, HeLa,, J e CHO esprimenti Nectin1 o HVEM). Alcuni peptidi sono anche stati saggiati nel saggio di fusione cellula-cellula, dove hanno inibito la formazione di sincizi. Queste osservazioni dimostrano che l'azione dei peptidi derivati da gBpep\_5c viene esercitata solamente sul quartetto di glicoproteine essenziali, indipendentemente da altre glicoproteine virali e dal tipo di cellula su cui avviene l'infezione.

In contemporanea con la pubblicazione della risoluzione del cristallo di gB di HSV-1, è stata pubblicata la struttura della glicoproteina G del Virus della Stomatite Vescicolare (VSV) (115), nella conformazione post-fusogenica a basso pH. Benchè le sequenze delle due glicoproteine non siano conservate, le due strutture quaternarie sono molto simili, ed anche in questa glicoproteina è possibile individuare 5 regioni analoghe a quelle identificate in gB. Circa un anno dopo è stata risolta la struttura anche della

forma pre-fusogenica della stessa glicoproteina (195). Analizzando le modificazioni a cui va incontro la glicoproteina G, è possibile osservare che il dominio analogo alla regione V ruota di circa 180° dalla forma pre-fusogenica alla forma post-fusogenica. Dopo che l'estremità che porta i *fusion loop* ha interagito con la membrana bersaglio, la regione in questione si richiude sulla glicoproteina, probabilmente a stabilizzare la conformazione che avvicina le due membrane fosfolipidiche, virale e cellulare, consentendone la fusione. E' verosimile che la serie di peptidi attivi mimetici della regione V interferisca con questo processo, impedendo a gB di raggiungere una conformazione stabilizzata che ponga le membrane ad una distanza sufficiente per la fusione.

# **Bibliografia**

1. Roizman B & Knipe DM (2001) Herpes simplex viruses and their replication. *Fields Virology*, eds Knipe DM, Howley P, Griffin D, Lamb R, Martin M, Roizman B, & S. S (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia), 4th Ed Vol 2, pp 2399-2459.
2. Loret S, Guay G, & Lippe R (2008) Comprehensive Characterization of Extracellular Herpes Simplex Virus Type 1 Virions *Journal of Virology* 82(17):8605-8618.
3. Jenkins FJ & Roizman B (1986) Herpes simplex virus 1 recombinants with noninverting genomes frozen in different isomeric arrangements are capable of independent replication. *J Virol* 59(2):494-499.
4. Thomsen D, Newcomb W, Brown J, & Homa F (1995) Assembly of the herpes simplex virus capsid: requirement for the carboxyl-terminal twenty-five amino acids of the proteins encoded by the UL26 and UL26. 5 genes. *The Journal of Virology* 69(6):3690.
5. Jacquemont B & Roizman B (1975) RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. X. Properties of viral symmetric transcripts and of double-stranded RNA prepared from them. *J Virol* 15(4):707-713.
6. Kozak M & Roizman B (1975) RNA synthesis in cells infected with herpes simplex virus. IX. Evidence for accumulation of abundant symmetric transcripts in nuclei. *J Virol* 15(1):36-40.
7. Wittels M & Spear PG (1991) Penetration of cells by herpes simplex virus does not require a low pH-dependent endocytic pathway. *Virus Res* 18(2-3):271-290.
8. Nicola AV & Straus SE (2004) Cellular and viral requirements for rapid endocytic entry of herpes simplex virus. *J Virol* 78(14):7508-7517.
9. Costanzo F, Campadelli-Fiume G, Foà-Tomasi L, & Cassai E (1977) Evidence that herpes simplex virus DNA is transcribed by cellular RNA polymerase B. *J Virol* 21(3):996-1001.
10. Gu H, Liang Y, Mandel G, & Roizman B (2005) Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(21):7571-7576.
11. Weinheimer SP, Boyd BA, Durham SK, Resnick JL, & O'Boyle DR, 2nd (1992) Deletion of the VP16 open reading frame of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 66(1):258-269.
12. van Genderen IL, Brandimarti R, Torrisi MR, Campadelli G, & van Meer G (1994) The phospholipid composition of extracellular herpes simplex virions differs from that of host cell nuclei. *Virology* 200(2):831-836.
13. Skepper JN, Whiteley A, Browne H, & Minson A (2001) Herpes simplex virus nucleocapsids mature to progeny virions by an envelopment --> deenvelopment --> reenvelopment pathway. *J Virol* 75(12):5697-5702.
14. Wild P, *et al.* (2005) Impairment of nuclear pores in bovine herpesvirus 1-infected MDBK cells. *Journal of Virology* 79(2):1071-1083.
15. Gupta A, Gartner J, Sethupathy P, Hatzigeorgiou A, & Fraser N (2006) Anti-apoptotic function of a microRNA encoded by the HSV-1 latency-associated transcript. *Nature* 442(7098):82-85.
16. Kozlovsky Y CL, Kozlov MM (2002) Lipid intermediates in membrane fusion: formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys. J.* 83:2634-2651.
17. Kozlov MM, and Chernomordik, L.V. (1998) A mechanism of protein-mediated fusion-coupling between refolding of the influenza hemagglutinin and lipid rearrangements. *Biophys. J.* 75:1384-1396.
18. Kielian M & Rey F (2006) Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nature Reviews Microbiology* 4(1):67-76.
19. Skehel JJ & Wiley DC (2000) Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* 69:531-569.
20. Eckert DM & Kim PS (2001) Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem* 70:777-810.
21. Barnard R, Elleder D, & Young J (2006) Avian sarcoma and leukosis virus-receptor interactions: From classical genetics to novel insights into virus-cell membrane fusion. *Virology* 344(1):25-29.

22. Rey F (2006) Molecular gymnastics at the herpesvirus surface. *EMBO Reports* 7(10):1000.
23. Weissenhorn W, Dessen A, Harrison SC, Skehel JJ, & Wiley DC (1997) Atomic structure of the ectodomain from HIV-1 gp41. *Nature* 387(6631):426-430.
24. Stegmann T, Doms RW, & Helenius A (1989) Protein-mediated membrane fusion. *Annu Rev Biophys Chem* 18:187-211.
25. McCune J, *et al.* (1988) Endoproteolytic cleavage of gp160 is required for the activation of human immunodeficiency virus. *Cell* 53(1):55-67.
26. Klenk H & Rott R (1973) Formation of influenza virus proteins. *Journal of Virology* 11(6):823-831.
27. Bullough PA, *et al.* (1994) Crystals of a fragment of influenza haemagglutinin in the low pH induced conformation. *J Mol Biol* 236(4):1262-1265.
28. Lamb R, Paterson R, & Jardetzky T (2006) Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *Virology* 344(1):30-37.
29. Cai WH, Gu B, & Person S (1988) Role of glycoprotein B of herpes simplex virus type 1 in viral entry and cell fusion [published erratum appears in J Virol 1988 Nov;62(11):4438]. *J Virol* 62(8):2596-2604.
30. Forrester A, *et al.* (1992) Construction and properties of a mutant of herpes simplex virus type 1 with glycoprotein H coding sequences deleted. *J Virol* 66(1):341-348.
31. Ligas MW & Johnson DC (1988) A herpes simplex virus mutant in which glycoprotein D sequences are replaced by beta-galactosidase sequences binds to but is unable to penetrate into cells. *J Virol* 62(5):1486-1494.
32. Roop C, Hutchinson L, & Johnson DC (1993) A mutant herpes simplex virus type 1 unable to express glycoprotein L cannot enter cells, and its particles lack glycoprotein H. *J Virol* 67(4):2285-2297.
33. Gompels U & Minson A (1986) The properties and sequence of glycoprotein H of herpes simplex virus type 1. *Virology* 153(2):230-247.
34. Navarro D, Paz P, & Pereira L (1992) Domains of herpes simplex virus I glycoprotein B that function in virus penetration, cell-to-cell spread, and cell fusion. *Virology* 186(1):99-112.
35. Para MF, Parish ML, Noble AG, & Spear PG (1985) Potent neutralizing activity associated with anti-glycoprotein D specificity among monoclonal antibodies selected for binding to herpes simplex virions. *J Virol* 55(2):483-488.
36. Pereira L, Klassen T, & Baringer JR (1980) Type-common and type-specific monoclonal antibody to herpes simplex virus type 1. *Infect Immun* 29(2):724-732.
37. Turner A, Bruun B, Minson T, & Browne H (1998) Glycoproteins gB, gD, and gH/gL of herpes simplex virus type 1 are necessary and sufficient to mediate membrane fusion in a Cos cell transfection system. *J Virol* 72(1):873-875.
38. Browne H, Bruun B, & Minson T (2001) Plasma membrane requirements for cell fusion induced by herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gD, gH and gL. *J Gen Virol* 82(Pt 6):1419-1422.
39. Pertel PE (2002) Human herpesvirus 8 glycoprotein B (gB), gH, and gL can mediate cell fusion. *J Virol* 76(9):4390-4400.
40. Fan Z, *et al.* (2002) Truncation of herpes simplex virus type 2 glycoprotein B increases its cell surface expression and activity in cell-cell fusion, but these properties are unrelated. *J Virol* 76(18):9271-9283.
41. Avitabile E, Lombardi G, & Campadelli-Fiume G (2003) Herpes Simplex Virus Glycoprotein K, but Not Its Syncytial Allele, Inhibits Cell-Cell Fusion Mediated by the Four Fusogenic Glycoproteins, gD, gB, gH and gL. *Journal of Virology* 77(12):6836-6844.
42. Avitabile E, Lombardi G, Gianni T, Capri M, & Campadelli-Fiume G (2004) Coexpression of UL20p and gK inhibits cell-cell fusion mediated by herpes simplex virus glycoproteins gD, gH-gL, and wt- gB or an endocytosis-defective gB mutant, and downmodulates their cell surface expression. *J Virol* 78(15):8015-8025.

43. Spear PG, Shieh MT, Herold BC, WuDunn D, & Koshy TI (1992) Heparan sulfate glycosaminoglycans as primary cell surface receptors for herpes simplex virus. *Adv Exp Med Biol* 313:341-353.
44. Laquerre S, *et al.* (1998) Heparan sulfate proteoglycan binding by herpes simplex virus type 1 glycoproteins B and C, which differ in their contributions to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. *J Virol* 72(7):6119-6130.
45. Gruenheid S, Gatzke L, Meadows H, & Tufaro F (1993) Herpes simplex virus infection and propagation in a mouse L cell mutant lacking heparan sulfate proteoglycans. *J Virol* 67(1):93-100.
46. Herold BC, WuDunn D, Soltys N, & Spear PG (1991) Glycoprotein C of herpes simplex virus type 1 plays a principal role in the adsorption of virus to cells and in infectivity. *J Virol* 65(3):1090-1098.
47. WuDunn D & Spear PG (1989) Initial interaction of herpes simplex virus with cells is binding to heparan sulfate. *J Virol* 63(1):52-58.
48. Campadelli-Fiume G, *et al.* (1990) Glycoprotein D of herpes simplex virus encodes a domain which precludes penetration of cells expressing the glycoprotein by superinfecting herpes simplex virus. *J Virol* 64(12):6070-6079.
49. Rux A, *et al.* (1996) Disulfide bond structure determination and biochemical analysis of glycoprotein C from herpes simplex virus. *Journal of Virology* 70(8):5455-5465.
50. Marlin S, Holland T, Levine M, & Glorioso J (1985) Epitopes of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC are clustered in two distinct antigenic sites. *Journal of Virology* 53(1):128-136.
51. Tal-Singer R, *et al.* (1995) Interaction of herpes simplex virus glycoprotein gC with mammalian cell surface molecules. *J Virol* 69(7):4471-4483.
52. Eisenberg R, *et al.* (1987) Complement component C3b binds directly to purified glycoprotein C of herpes simplex virus types I and 2. *Microb. Pathog* 3:423.
53. Lubinski J, *et al.* (1998) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein gC mediates immune evasion in vivo. *Journal of Virology* 72(10):8257-8263.
54. Nicola AV, McEvoy AM, & Straus SE (2003) Roles for endocytosis and low pH in herpes simplex virus entry into HeLa and Chinese hamster ovary cells. *J Virol* 77(9):5324-5332.
55. Milne R, Nicola A, Whitbeck J, Eisenberg R, & Cohen G (2005) Glycoprotein D receptor-dependent, low-pH-independent endocytic entry of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 79(11):6655-6663.
56. Gianni T, Campadelli-Fiume G, & Menotti L (2004) Entry of Herpes Simplex Virus Mediated by Chimeric Forms of Nectin1 Retargeted to Endosomes or to Lipid Rafts Occurs through Acidic Endosomes. *J Virol* 78(22):12268-12276.
57. Johnson DC, Burke RL, & Gregory T (1990) Soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D bind to a limited number of cell surface receptors and inhibit virus entry into cells. *J Virol* 64(6):2569-2576.
58. Campadelli-Fiume G, Arsenakis M, Farabegoli F, & Roizman B (1988) Entry of herpes simplex virus 1 in BJ cells that constitutively express viral glycoprotein D is by endocytosis and results in degradation of the virus. *J Virol* 62(1):159-167.
59. Arsenakis M, Hubenthal-Voss J, Campadelli-Fiume G, Pereira L, & Roizman B (1986) Construction and properties of a cell line constitutively expressing the herpes simplex virus glycoprotein B dependent on functional alpha 4 protein synthesis. *J Virol* 60(2):674-682.
60. Peng T, *et al.* (1998) The gH-gL complex of herpes simplex virus (HSV) stimulates neutralizing antibody and protects mice against HSV type 1 challenge. *J Virol* 72(1):65-72.
61. Brandimarti R, Huang T, Roizman B, & Campadelli Fiume G (1994) Mapping of herpes simplex virus 1 genes with mutations which overcome host restrictions to infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(12):5406-5410.
62. Dean HJ, Terhune SS, Shieh MT, Susmarski N, & Spear PG (1994) Single amino acid substitutions in gD of herpes simplex virus 1 confer resistance to gD-mediated interference and cause cell-type-dependent alterations in infectivity. *Virology* 199(1):67-80.

63. Cocchi F, Menotti L, Mirandola P, Lopez M, & Campadelli-Fiume G (1998) The ectodomain of a novel member of the immunoglobulin superfamily related to the poliovirus receptor has the attributes of a *bonafide* receptor for herpes simplex viruses 1 and 2 in human cells. *J Virol* 72:9992-10002.
64. Geraghty RJ, Krummenacher C, Cohen GH, Eisenberg RJ, & Spear PG (1998) Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280(5369):1618-1620.
65. Montgomery RI, Warner MS, Lum BJ, & Spear PG (1996) Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* 87(3):427-436.
66. Shukla D, *et al.* (1999) A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99(1):13-22.
67. Warner MS, *et al.* (1998) A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* 246(1):179-189.
68. Krummenacher C, *et al.* (1998) Herpes simplex virus glycoprotein D can bind to poliovirus receptor-related protein 1 or herpesvirus entry mediator, two structurally unrelated mediators of virus entry. *J Virol* 72(9):7064-7074.
69. Carfi A, *et al.* (2001) Herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor HveA. *Mol Cell* 8(1):169-179.
70. Yoon M, Zago A, Shukla D, & Spear PG (2003) Mutations in the N termini of herpes simplex virus type 1 and 2 gDs alter functional interactions with the entry/fusion receptors HVEM, nectin-2, and 3-O-sulfated heparan sulfate but not with nectin-1. *J Virol* 77(17):9221-9231.
71. Krummenacher C, *et al.* (2005) Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *The EMBO Journal* 24:4144-4153.
72. Lopez M, *et al.* (2000) Nectin2 $\alpha$  (PRR2 $\alpha$  or HveB) and nectin2 $\delta$  are low-efficiency mediators for entry of herpes simplex virus mutants carrying the Leu25Pro substitution in glycoprotein D. *J Virol* 74(3):1267-1274.
73. Connolly SA, *et al.* (2005) Potential nectin-1 binding site on herpes simplex virus glycoprotein D. *J Virol* 79(2):1282-1295.
74. Manoj S, Jogger CR, Myscofski D, Yoon M, & Spear PG (2004) Mutations in herpes simplex virus glycoprotein D that prevent cell entry via nectins and alter cell tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(34):12414-12421.
75. Cocchi F, *et al.* (2004) The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(19):7445-7450.
76. Zago A, Jogger CR, & Spear PG (2004) Use of herpes simplex virus and pseudorabies virus chimeric glycoprotein D molecules to identify regions critical for membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(50):17498-17503.
77. Fusco D, Forghieri C, & Campadelli-Fiume G (2005) The pro-fusion domain of herpes simplex virus glycoprotein D (gD) interacts with the gD N terminus and is displaced by soluble forms of viral receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(26):9323-9328.
78. Zhou G & Roizman B (2007) Separation of receptor-binding and profusogenic domains of glycoprotein D of herpes simplex virus 1 into distinct interacting proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(10):4142.
79. Handler C, Cohen G, & Eisenberg R (1996) Cross-linking of glycoprotein oligomers during herpes simplex virus type 1 entry. *The Journal of Virology* 70(9):6076.
80. Perez-Romero P, Perez A, Capul A, Montgomery R, & Fuller A (2005) Herpes Simplex Virus Entry Mediator Associates in Infected Cells in a Complex with Viral Proteins gD and at Least gH. (*Am Soc Microbiol*), pp 4540-4544.
81. Atanasiu D, *et al.* (2007) Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(47):18718.

82. Avitabile E, Forghieri C, & Campadelli-Fiume G (2007) Complexes between Herpes Simplex Virus Glycoproteins gD, gB, and gH Detected in Cells by Complementation of Split Enhanced Green Fluorescent Protein *Journal of Virology* 81(20):11532-11537.
83. Subramanian R & Geraghty R (2007) Herpes simplex virus type 1 mediates fusion through a hemifusion intermediate by sequential activity of glycoproteins D, H, L, and B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(8):2903.
84. Krummenacher C, *et al.* (2004) Comparative usage of herpesvirus entry mediator A and nectin-1 by laboratory strains and clinical isolates of herpes simplex virus. *Virology* 322(2):286-299.
85. Reymond N, *et al.* (2000) Human nectin3/PRR3: a novel member of the PVR/PRR/nectin family that interacts with afadin. *Gene* 255(2):347-355.
86. Takai Y, Shimizu K, & Ohtsuka T (2003) The roles of cadherins and nectins in interneuronal synapse formation. *Curr Opin Neurobiol* 13(5):520-526.
87. Koike S, *et al.* (1990) The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *Embo J* 9(10):3217-3224.
88. Mendelsohn CL, Wimmer E, & Racaniello VR (1989) Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56(5):855-865.
89. Cocchi F, *et al.* (1998) The V domain of herpesvirus Ig-like receptor (HIgR) contains a major functional region in herpes simplex virus-1 entry into cells and interacts physically with the viral glycoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26):15700-15705.
90. Krummenacher C, *et al.* (1999) The first immunoglobulin-like domain of HveC is sufficient to bind herpes simplex virus gD with full affinity, while the third domain is involved in oligomerization of HveC. *J Virol* 73(10):8127-8137.
91. Campadelli-Fiume G, Cocchi F, Menotti L, & Lopez M (2000) The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. *Rev Med Virol* 10(5):305-319.
92. Haarr L, Shukla D, Rodahl E, Dal Canto MC, & Spear PG (2001) Transcription from the gene encoding the herpesvirus entry receptor nectin-1 (HveC) in nervous tissue of adult mouse. *Virology* 287(2):301-309.
93. Matsushima H, *et al.* (2003) The expression of nectin-1alpha in normal human skin and various skin tumours. *Br J Dermatol* 148(4):755-762.
94. Richart S, *et al.* (2003) Entry of herpes simplex virus type 1 into primary sensory neurons in vitro is mediated by Nectin-1/HveC. *J. Virol.* 77(5):3307-3311.
95. Linehan MM, *et al.* (2004) In vivo role of nectin-1 in entry of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) and HSV-2 through the vaginal mucosa. *J Virol* 78(5):2530-2536.
96. Krummenacher C, *et al.* (2000) Localization of a binding site for herpes simplex virus glycoprotein D on herpesvirus entry mediator C by using antireceptor monoclonal antibodies. *J Virol* 74(23):10863-10872.
97. Cocchi F, Lopez M, Dubreuil P, Campadelli-Fiume G, & Menotti L (2001) Chimeric nectin1-poliovirus receptor molecules identify a nectin1 region functional in herpes simplex virus entry. *J Virol* 75(17):7987-7994.
98. Menotti L, Cocchi F, & Campadelli-Fiume G (2002) Critical residues in the CC' ridge of the human nectin1 receptor V domain enable herpes simplex virus entry into the cell and act synergistically with the downstream region. *Virology* 301(1):6-12.
99. Milne RS, *et al.* (2003) Function of herpes simplex virus type 1 gD mutants with different receptor-binding affinities in virus entry and fusion. *J Virol* 77(16):8962-8972.
100. Zhou G, Avitabile E, Campadelli-Fiume G, & Roizman B (2003) The domains of glycoprotein D required to block apoptosis induced by herpes simplex virus 1 are largely distinct from those involved in cell-cell fusion and binding to nectin1. *J Virol* 77(6):3759-3767.
101. Connolly SA, *et al.* (2003) Structure-based mutagenesis of herpes simplex virus glycoprotein D defines three critical regions at the gD-HveA/HVEM binding interface. *J Virol* 77(14):8127-8140.
102. Pereira L (1994) Function of glycoprotein B homologues of the family herpesviridae. *Infect Agents Dis* 3(1):9-28.



103. Pellett PE, Kousoulas KG, Pereira L, & Roizman B (1985) Anatomy of the herpes simplex virus 1 strain F glycoprotein B gene: primary sequence and predicted protein structure of the wild type and of monoclonal antibody-resistant mutants. *J Virol* 53(1):243-253.
104. Herold B, Visalli R, Susmarski N, Brandt C, & Spear P (1994) Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *Journal of General Virology* 75(6):1211-1222.
105. Laquerre S, *et al.* (1998) Heparan Sulfate Proteoglycan Binding by Herpes Simplex Virus Type 1 Glycoproteins B and C, Which Differ in Their Contributions to Virus Attachment, Penetration, and Cell-to-Cell Spread. *Journal of Virology* 72(7):6119-6130.
106. Cai WZ, Person S, Warner SC, Zhou JH, & DeLuca NA (1987) Linker-insertion nonsense and restriction-site deletion mutations of the gB glycoprotein gene of herpes simplex virus type 1. *J Virol* 61(3):714-721.
107. Manservigi R, Spear PG, & Buchan A (1977) Cell fusion induced by herpes simplex virus is promoted and suppressed by different viral glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(9):3913-3917.
108. Bzik DJ, Fox BA, DeLuca NA, & Person S (1984) Nucleotide sequence of a region of the herpes simplex virus type 1 gB glycoprotein gene: mutations affecting rate of virus entry and cell fusion. *Virology* 137(1):185-190.
109. Highlander S, *et al.* (1991) Oligomer formation of the gB glycoprotein of herpes simplex virus type 1. *Journal of Virology* 65(8):4275-4283.
110. Claesson-Welsh L & Spear P (1986) Oligomerization of herpes simplex virus glycoprotein B. *Journal of Virology* 60(2):803-806.
111. Bender F, Whitbeck J, Lou H, Cohen G, & Eisenberg R (2005) Herpes Simplex Virus Glycoprotein B Binds to Cell Surfaces Independently of Heparan Sulfate and Blocks Virus Entry. *Journal of Virology* 79(18):11588-11597.
112. Satoh T, *et al.* (2008) PILRa Is a Herpes Simplex Virus-1 Entry Coreceptor That Associates with Glycoprotein B. *Cell* 132(6):935-944.
113. Arii J, *et al.* (2009) Entry of herpes simplex virus 1 and other alphaherpesviruses via the paired immunoglobulin-like type 2 receptor {alpha}. *Journal of Virology*.
114. Heldwein E, *et al.* (2006) Crystal Structure of Glycoprotein B from Herpes Simplex Virus 1. (American Association for the Advancement of Science), pp 217-220.
115. Roche S, Bressanelli S, Rey F, & Gaudin Y (2006) Crystal Structure of the Low-pH Form of the Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein G. *Science* 313(5784):187-191.
116. Lemmon M, Ferguson K, & Schlessinger J (1996) PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* 85(5):621-624.
117. Shaw G (1996) The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays* 18(1).
118. Bender F, *et al.* (2007) Antigenic and Mutational Analyses of Herpes Simplex Virus Glycoprotein B Reveal Four Functional Regions. *Journal of Virology* 81(8):3827-3841.
119. Hannah B, Heldwein E, Bender F, Cohen G, & Eisenberg R (2007) Mutational Evidence of Internal Fusion Loops in Herpes Simplex Virus Glycoprotein B. *Journal of Virology* 81(9):4858-4865.
120. Bender FC, *et al.* (2003) Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *J Virol* 77(17):9542-9552.
121. Anderson H, Chen Y, & Norkin L (1996) Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae. *Molecular Biology of the Cell* 7(11):1825-1834.
122. Mañes S, *et al.* (2000) Membrane raft microdomains mediate lateral assemblies required for HIV-1 infection. *EMBO Reports* 1(2):190.
123. Stuart A, Eustace H, McKee T, & Brown T (2002) A Novel Cell Entry Pathway for a DAF-Using Human Enterovirus Is Dependent on Lipid Rafts. *Journal of Virology* 76(18):9307-9322.
124. Cai WZ, Person S, DebRoy C, & Gu BH (1988) Functional regions and structural features of the gB glycoprotein of herpes simplex virus type 1. An analysis of linker insertion mutants. *J Mol Biol* 201(3):575-588.

125. Qadri I, Gimeno C, Navarro D, & Pereira L (1991) Mutations in conformation-dependent domains of herpes simplex virus 1 glycoprotein B affect the antigenic properties, dimerization, and transport of the molecule. *Virology* 180(1):135-152.
126. Norton D, Dwyer D, & Muggeridge M (1998) Use of a neural network secondary structure prediction to define targets for mutagenesis of herpes simplex virus glycoprotein B. *Virus Research* 55(1):37-48.
127. Lin E & Spear P (2007) Random linker-insertion mutagenesis to identify functional domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(32):13140.
128. Beitia Ortiz de Zarate I, Kaelin K, & Rozenberg F (2004) Effects of mutations in the cytoplasmic domain of herpes simplex virus type 1 glycoprotein B on intracellular transport and infectivity. *J Virol* 78(3):1540-1551.
129. Foster T, Melancon J, & Kousoulas K (2001) An alpha-helical domain within the carboxyl terminus of herpes simplex virus type 1 (HSV-1) glycoprotein B (gB) is associated with cell fusion and resistance to heparin inhibition of cell fusion. *Virology* 287(1):18-29.
130. Calistri A, *et al.* (2007) Intracellular Trafficking and Maturation of Herpes Simplex Virus Type 1 gB and Virus Egress Require Functional Biogenesis of Multivesicular Bodies *Journal of Virology* 81(20):11468-11478.
131. Hutchinson L, *et al.* (1992) A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects normal folding and surface expression of gH. *J Virol* 66(4):2240-2250.
132. Peng T, *et al.* (1998) Structural and antigenic analysis of a truncated form of the herpes simplex virus glycoprotein gH-gL complex. *J Virol* 72(7):6092-6103.
133. Fuller AO, Santos RE, & Spear PG (1989) Neutralizing antibodies specific for glycoprotein H of herpes simplex virus permit viral attachment to cells but prevent penetration. *J Virol* 63(8):3435-3443.
134. Cairns T, Landsburg D, Charles Whitbeck J, Eisenberg R, & Cohen G (2005) Contribution of cysteine residues to the structure and function of herpes simplex virus gH/gL. *Virology* 332(2):550-562.
135. Galdiero M, *et al.* (1997) Site-directed and linker insertion mutagenesis of herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *J Virol* 71(3):2163-2170.
136. Parry C, Bell S, Minson T, & Browne H (2005) Herpes simplex virus type 1 glycoprotein H binds to alphavbeta3 integrins. *J Gen Virol* 86(Pt 1):7-10.
137. Harman A, Browne H, & Minson T (2002) The transmembrane domain and cytoplasmic tail of herpes simplex virus type 1 glycoprotein H play a role in membrane fusion. *J Virol* 76(21):10708-10716.
138. Wilson DW, Davis-Poynter N, & Minson AC (1994) Mutations in the cytoplasmic tail of herpes simplex virus glycoprotein H suppress cell fusion by a syncytial strain. *J Virol* 68(11):6985-6993.
139. Gianni T, Martelli P, Casadio R, & Campadelli-Fiume G (2005) The ectodomain of herpes simplex virus glycoprotein H contains a membrane  $\alpha$ -helix with attributes of an internal fusion peptide, positionally conserved in the Herpesviridae family. *Journal of Virology* 79(5):2931-2940.
140. Gianni T, Fato R, Bergamini C, Lenaz G, & Campadelli-Fiume G (2006) Hydrophobic  $\alpha$ -helices 1 and 2 of herpes simplex virus gH interact with lipids, and their mimetic peptides enhance virus infection and fusion. *Journal of Virology* 80(16):8190-8198.
141. Gianni T, Menotti L, & Campadelli-Fiume G (2005) A heptad repeat in herpes simplex virus 1 gH, located downstream of the  $\alpha$ -helix with attributes of a fusion peptide, is critical for virus entry and fusion. *Journal of Virology* 79(11):7042-7049.
142. Gianni T, Piccoli A, Bertucci C, & Campadelli-Fiume G (2006) Heptad Repeat 2 in Herpes Simplex Virus 1 gH Interacts with Heptad Repeat 1 and Is Critical for Virus Entry and Fusion. *Journal of Virology* 80(5):2216-2224.
143. Perez-Romero P & Fuller A (2005) The C terminus of the B5 receptor for herpes simplex virus contains a functional region important for infection. *Journal of Virology* 79(12):7431-7437.

144. Foster TP, Alvarez X, & Kousoulas KG (2003) Plasma membrane topology of syncytial domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K (gK): the UL20 protein enables cell surface localization of gK but not gK-mediated cell-to-cell fusion. *J Virol* 77(1):499-510.
145. McGeoch DJ, *et al.* (1988) The complete DNA sequence of the long unique region in the genome of herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 69(Pt 7):1531-1574.
146. Melancon JM, Foster TP, & Kousoulas KG (2004) Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL20 protein domains involved in cytoplasmic virion envelopment and virus-induced cell fusion. *J Virol* 78(14):7329-7343.
147. Baines JD, Ward PL, Campadelli-Fiume G, & Roizman B (1991) The UL20 gene of herpes simplex virus 1 encodes a function necessary for viral egress. *J Virol* 65(12):6414-6424.
148. Foster TP, Rybachuk GV, Alvarez X, Borkhsenius O, & Kousoulas KG (2003) Overexpression of gK in gK-transformed cells collapses the Golgi apparatus into the endoplasmic reticulum inhibiting virion egress, glycoprotein transport, and virus-induced cell fusion. *Virology* 317(2):237-252.
149. Hutchinson L, *et al.* (1992) Identification and characterization of a novel herpes simplex virus glycoprotein, gK, involved in cell fusion. *J Virol* 66(9):5603-5609.
150. Ward PL, Campadelli-Fiume G, Avitabile E, & Roizman B (1994) Localization and Putative Function of the UL20 Membrane Protein in Cells Infected with Herpes Simplex Virus 1. *Journal of Virology* 68(11):7406-7417.
151. Hutchinson L & Johnson DC (1995) Herpes simplex virus glycoprotein K promotes egress of virus particles. *J Virol* 69(9):5401-5413.
152. Foster TP & Kousoulas KG (1999) Genetic analysis of the role of herpes simplex virus type 1 glycoprotein K in infectious virus production and egress. *J Virol* 73(10):8457-8468.
153. Foster TP, Melancon JM, Baines JD, & Kousoulas KG (2004) The herpes simplex virus type 1 UL20 protein modulates membrane fusion events during cytoplasmic virion morphogenesis and virus-induced cell fusion. *J Virol* 78(10):5347-5357.
154. Whitley R & Roizman B (2001) Herpes simplex virus infections. *The Lancet* 357(9267):1513-1518.
155. Villa-Komaroff L, *et al.* (1978) A Bacterial Clone Synthesizing Proinsulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75(8):3727-3731.
156. Raz I, *et al.* (2001)  $\beta$ -cell function in new-onset type 1 diabetes and immunomodulation with a heat-shock protein peptide (DiaPep277): a randomised, double-blind, phase II trial. *The Lancet* 358(9295):1749-1753.
157. Wild C, Oas T, McDanal C, Bolognesi D, & Matthews T (1992) A Synthetic Peptide Inhibitor of Human Immunodeficiency Virus Replication: Correlation between Solution Structure and Viral Inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89(21):10537-10541.
158. Jiang S, Lin K, Strick N, & Neurath A (1993) HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature* 365(6442):113-113.
159. WILD C, GREENWELL T, & MATTHEWS T (1993) A SYNTHETIC PEPTIDE FROM HIV-1 GP 41 IS A POTENT INHIBITOR OF VIRUS-MEDIATED CELL-CELL FUSION. *AIDS research and human retroviruses* 9(11):1051-1053.
160. Matthews T, *et al.* (2004) Case history: Enfuvirtide: the first therapy to inhibit the entry of HIV-1 into host CD4 lymphocytes. *Nature Reviews Drug Discovery* 3:215-225.
161. Kilby J, *et al.* (1998) Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nature Medicine* 4(11):1302-1307.
162. Trybala E, *et al.* (1994) Localization of a functional site on herpes simplex virus type 1 glycoprotein C involved in binding to cell surface heparan sulphate. *Journal of General Virology* 75(4):743-752.
163. Galdiero S, *et al.* (2006) Analysis of synthetic peptides from heptad-repeat domains of herpes simplex virus type 1 glycoproteins H and B. (Soc General Microbiol), pp 1085-1097.
164. Okazaki K & Kida H (2004) A synthetic peptide from a heptad repeat region of herpesvirus glycoprotein B inhibits virus replication. *J Gen Virol* 85(Pt 8):2131-2137.

165. Lopper M & Compton T (2004) Coiled-coil domains in glycoproteins B and H are involved in human cytomegalovirus membrane fusion. *J Virol* 78(15):8333-8341.
166. English E, Chumanov R, Gellman S, & Compton T (2006) Rational Development of beta-Peptide Inhibitors of Human Cytomegalovirus Entry. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 281(5):2661.
167. Galdiero S, *et al.* (2008) The Identification and Characterization of Fusogenic Domains in Herpes Virus Glycoprotein B Molecules. *Chembiochem: a European journal of chemical biology* 9(5):758.
168. Campadelli-Fiume G, *et al.* (2007) The multipartite system that mediates entry of herpes simplex virus into the cell. *REVIEWS IN MEDICAL VIROLOGY* 17(5):313.
169. Ejercito PM, Kieff ED, & Roizman B (1968) Characterization of herpes simplex virus strains differing in their effects on social behaviour of infected cells. *J Gen Virol* 2(3):357-364.
170. Stefan A, Secchiero P, Baechi T, Kempf W, & Campadelli-Fiume G (1997) The 85-kilodalton phosphoprotein (pp85) of human herpesvirus 7 is encoded by open reading frame U14 and localizes to a tegument substructure in virion particles. *Journal of Virology* 71(8):5758-5763.
171. Showalter S, Zweig M, & Hampar B (1981) Monoclonal antibodies to herpes simplex virus type 1 proteins, including the immediate-early protein ICP 4. *Infection and Immunity* 34(3):684-692.
172. Rovero S, *et al.* (2000) DNA vaccination against rat her-2/Neu p185 more effectively inhibits carcinogenesis than transplantable carcinomas in transgenic BALB/c mice. *J Immunol* 165(9):5133-5142.
173. Skerra A & Schmidt T (1999) Applications of a peptide ligand for streptavidin: the Strep-tag. *Biomolecular Engineering* 16(1-4):79-86.
174. Warming S, Costantino N, Jenkins N, & Copeland N (2005) Simple and highly efficient BAC recombineering using galK selection. *Nucleic Acids Research* 33(4):e36.
175. Cocchi F, Menotti L, Di Ninni V, Lopez M, & Campadelli-Fiume G (2004) The herpes simplex virus JMP mutant enters receptor-negative J cells through a novel pathway independent of the known receptors nectin1, HveA, and nectin2. *J Virol* 78(9):4720-4729.
176. Menotti L, Nicoletti, G., Gatta, V., Croci, S., Landuzzi, L., De Giovanni, C., Nanni, P., Lollini, P. L., and Campadelli-Fiume, G. *Proc Natl Acad Sci USA* (2009 Submitted) *Proc Natl Acad Sci USA*.
177. Pertel PE, Fridberg A, Parish ML, & Spear PG (2001) Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. *Virology* 279(1):313-324.
178. Markert JM, Gillespie GY, Weichselbaum RR, Roizman B, & Whitley RJ (2000) Genetically engineered HSV in the treatment of glioma: a review. *Rev Med Virol* 10(1):17-30.
179. Browne H, Bruun B, Whiteley A, & Minson T (2003) Analysis of the role of the membrane-spanning and cytoplasmic tail domains of herpes simplex virus type 1 glycoprotein D in membrane fusion. *J Gen Virol* 84(Pt 5):1085-1089.
180. Menotti L, Cerretani A, Hengel H, & Campadelli-Fiume G (2008) Construction of a fully retargeted herpes simplex virus 1 capable to enter cells solely via the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2). *Journal of Virology*.
181. Carfi A, *et al.* (2002) Crystallization and preliminary diffraction studies of the ectodomain of the envelope glycoprotein D from herpes simplex virus 1 alone and in complex with the ectodomain of the human receptor HveA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 58:836-838.
182. Spear PG (2004) Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol* 6(5):401-410.
183. Para M, Baucke R, & Spear P (1980) Immunoglobulin G (Fc)-binding receptors on virions of herpes simplex virus type 1 and transfer of these receptors to the cell surface by infection. *Journal of Virology* 34(2):512-520.

184. Calistri A, *et al.* (2007) Intracellular Trafficking and Maturation of Herpes Simplex Virus Type 1 gB and Virus Egress Require Functional Biogenesis of Multivesicular Bodies *Journal of Virology* 81(20):11468-11478.
185. Torrisi M, Di Lazzaro C, Pavan A, Pereira L, & Campadelli-Fiume G (1992) Herpes simplex virus envelopment and maturation studied by fracture label. *Journal of Virology* 66(1):554-561.
186. Zhou G, Galvan V, Campadelli-Fiume G, & Roizman B (2000) Glycoprotein D or J Delivered in trans Blocks Apoptosis in SK-N-SH Cells Induced by a Herpes Simplex Virus 1 Mutant Lacking Intact Genes Expressing Both Glycoproteins. *Journal of Virology* 74(24):11782-11791.
187. Baines J & Roizman B (1991) The open reading frames UL3, UL4, UL10, and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *Journal of Virology* 65(2):938-944.
188. Menotti L, *et al.* (2000) The murine homolog of human-Nectin1 $\delta$  serves as a species non-specific mediator for entry of human and animal  $\alpha$ herpesviruses in a pathway independent of a detectable binding to gD. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9):4867-4872.
189. Corpet F (Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research* 16(22):10881-10890.
190. Dubin G & Jiang H (1995) Expression of herpes simplex virus type 1 glycoprotein L (gL) in transfected mammalian cells: evidence that gL is not independently anchored to cell membranes. *Journal of Virology* 69(7):4564-4568.
191. Klyachkin Y & Geraghty R (2008) Mutagenic analysis of herpes simplex virus type 1 glycoprotein L reveals the importance of an arginine-rich region for function. *Virology* 374(1):23-32.
192. Galdiero S, *et al.* (2005) Fusogenic domains in herpes simplex virus type 1 glycoprotein H. *JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 280(31):28632.
193. Kousoulas K, Huo B, & Pereira L (1988) Antibody-resistant mutations in cross-reactive and type-specific epitopes of herpes simplex virus 1 glycoprotein B map in separate domains. *Virology* 166(2):423-431.
194. Pereira L, ALI M, Kousoulas K, HUO B, & Banks T (1989) Domain structure of herpes simplex virus 1 glycoprotein B: neutralizing epitopes map in regions of continuous and discontinuous residues. *Virology(New York, NY)* 172(1):11-24.
195. Roche S, Rey F, Gaudin Y, & Bressanelli S (2007) Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science* 315(5813):843.