

Espressione e assemblaggio delle proteine di AAV: localizzazione ed incapsidazione del DNA in *Saccharomyces cerevisiae*

Il punto di partenza di questo progetto di tesi si basa sugli studi effettuati sul lievito *S. cerevisiae* come modello per la produzione di vettori derivati dal virus Adeno Associato (AAV) per la terapia genica. AAV è un virus difettivo, non patogeno della famiglia dei parvovirus che dipende dalla co-infezione di un virus Helper (come adenovirus o Herpes simplex) per una sua replicazione produttiva. Il genoma di AAV consiste di un DNA a singolo filamento contenente due open reading frames (ORF) fiancheggiate da due sequenze invertite ripetute dette ITR. Le due ORF codificano per le proteine Rep, Rep40, 52, 68 e 78, necessarie per la replicazione e le proteine Cap, VP1, 2 e 3, necessarie per la formazione del capsido. In laboratorio, è stato dimostrato che il lievito è in grado sostenere la replicazione di vettori AAV ricombinanti (rAAV) e la formazione di capsidi.

Lo scopo di questa tesi è pertanto quello di caratterizzare ulteriormente la formazione dei capsidi sia andando a studiare la localizzazione delle proteine del capsido VP1, VP2 e VP3, sia sviluppando una nuova metodica di investigazione che riveli con più facilità la produzione di vettori virali in *S. cerevisiae*. Un altro aspetto che abbiamo studiato è stata l'incapsidazione del DNA.

Il lavoro di tesi è stato eseguito sul ceppo di lievito aploide, RSY12, e sul ceppo diploide, BY4743. In laboratorio era stato costruito in precedenza il ceppo RSY12 contenente il gene che codifica per la proteina di replicazione di AAV REP68 integrato nel genoma, che è stato trasformato con il plasmide pESCVP2,3VP1KM, per l'espressione di VP1, VP2, VP3. Il ceppo diploide, ingegnerizzato allo stesso modo dell'aploide, è stato costruito durante questo lavoro di tesi al fine di avere un ceppo di lievito in grado di crescere più velocemente dell'aploide. Analisi mediante Western blot ha mostrato che l'espressione di VP1, 2 e 3 avviene nella giusta proporzione come avviene nell'aploide.

Per determinare la localizzazione intracellulare di VP1, 2 e 3 nel ceppo RSY12, è stato messo a punto uno specifico protocollo di frazionamento che permette di caratterizzare la ripartizione delle proteine investigate nei vari compartimenti subcellulari. Analisi mediante Western blot delle proteine dei compartimenti subcellulari ha evidenziato una presenza omogenea di VP1, VP2, VP3 all'interno del lievito. Per verificare l'effettiva formazione di capsidi virali *in vivo*, smentendo ogni possibile dubbio sul fatto che questi si potessero formare durante le procedure di estrazione proteiche, è stato ideato e sviluppato un sistema Immuno blot che consente lo studio di una cinetica che mette in rapporto la produzione delle proteine virali con la formazione dei capsidi interi attraverso ibridazioni con anticorpi che riconoscono discriminatamente epitopi delle proteine libere ed epitopi delle proteine incapsidate. I risultati finora ottenuti su entrambi i ceppi indicano che con questo sistema è possibile capire se le cellule esprimono VP1,2 e 3 e se le tre proteine si assemblano correttamente.

I due ceppi di lievito saranno trasformati con il plasmide pAAVpokURA contenente il marker di selezione URA3 fiancheggiato dalle ITR del virus al fine di determinare se il ssDNA che viene formato viene incapsidato e se la localizzazione di VP1, VP2 e VP3 varia in presenza di DNA. A tal proposito sono in corso esperimenti di Southern blot per verificare la presenza del ssDNA e successivamente sarà determinata l'incapsidazione e localizzazione di VP1, 2 e 3 in presenza del DNA.

Filippo Cipriani