



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA**

**SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
PADOVA**

DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA-
INDIRIZZO UNICO**

XXV CICLO

**STUDIO DELL'ATTIVITÀ BIOLOGICA DELLA
PROTEINA ORF-A DEL VIRUS
DELL'IMMUNODEFICIENZA FELINA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Supervisore: Ch.ma Prof.ssa Maria Cristina Parolin

Dottoranda: Anna D'Angelillo

INDICE

1. SOMMARIO	i
2. ABSTRACT	iii
3. INTRODUZIONE	1
3.1 Il Virus dell'Immunodeficienza Felina	1
3.2 FIV come modello per lo studio di HIV-1	1
3.3 Patogenesi dell'infezione	2
3.4 Morfologia del virione	3
3.5 Organizzazione genomica di FIV	5
3.6 Ciclo replicativo	7
3.7 I geni accessori di FIV	9
3.8 Proprietà biologiche di Orf-A	10
3.9 Caratteristiche strutturali di Orf-A ed analogie con la proteina Vpr di HIV-1	11
3.10 Significato biologico del blocco del ciclo cellulare indotto dai virus	13
4. SCOPO	15
5. MATERIALI E METODI	17
5.1 Materiali	
5.1.1 Linee cellulari	17
5.1.2 Plasmidi	17
5.1.3 Oligonucleotidi	21
5.2 Metodi	
5.2.1 Quantificazione degli acidi nucleici	22

5.2.2	Competenza e trasformazione batterica	23
5.2.3	Preparazione del DNA plasmidico	24
5.2.4	Restrizioni enzimatiche	25
5.2.5	Mutagenesi sito specifica	26
5.2.6	Appaiamento degli olicgonucleotidi (<i>Annealing</i>)	27
5.2.7	Sequenziamento dei plasmidi	27
5.2.8	Tecniche di clonaggio	28
5.2.9	Ricostruzione dei plasmidi iniziali p Δ env1/p Δ LTR/p Δ 00 contenenti le mutazioni di interesse	35
5.2.10	Tecniche di trasfezione	36
5.2.11	Trattamento con Nocodazolo	37
5.2.12	Sistema di espressione basato sul Virus della Foresta del Semliki: trascrizione <i>in vitro</i> e trasfezione	38
5.2.13	Produzione delle particelle virali SFV e trasduzione delle cellule 293T	39
5.2.14	Produzione di <i>Virus Like Particles</i> (VLP)	39
5.2.15	Purificazione delle VLP mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio (<i>Virion Pelleting</i>)	40
5.2.16	Preparazione dei lisati cellulari	40
5.2.17	Immunoprecipitazione	41
5.2.18	Elettroforesi di proteine (SDS-PAGE)	41
5.2.19	Western Blotting e Sviluppo	43
5.2.20	Tecniche citofluorimetriche: marcatura intracitoplasmatica ed analisi del ciclo cellulare	44
5.2.21	Immunofluorescenza indiretta	46
5.2.22	Produzione delle particelle virali	47
5.2.23	Saggio della Retrotrascrittasi (<i>RT assay</i>)	48
5.2.24	Infezione delle cellule feline CrFK	48

6. RISULTATI	50
6.1 Premessa	50
6.2 Analisi dell'espressione della proteina Orf-A e del ciclo cellulare in cellule umane (293T) con il sistema di espressione guidato dal promotore del Citomegalovirus umano (hCMV)	51
6.3 Valutazione dell'espressione della proteina Orf-A impiegando il vettore basato sul Virus della Foresta del Semliki (SFV) in cellule 293T	56
6.4 Valutazione dell'espressione della proteina Orf-A in cellule umane (293T) e feline (CrFK)	63
6.5 Valutazione dell'espressione delle proteine virali Orf-A e p24 ed analisi del ciclo cellulare in cellule umane e feline in citofluorimetria	68
6.6 Saggio di immunofluorescenza in cellule umane trasfettate con i plasmidi 3'HA Orf-A <i>plus</i> e <i>minus</i>	76
6.7 Valutazione dell'attività replicativa di FIV Orf-A <i>plus</i> e <i>minus</i>	80
6.8 Saggio di incorporazione della proteina Orf-A nei virioni	83
7. DISCUSSIONE	85
8. BIBLIOGRAFIA	93

1. SOMMARIO

Il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) è un *Lentivirus* dei non primati che causa nel gatto domestico una sindrome cronica progressiva molto simile alla Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS) generata dal Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 (HIV-1). Le analogie tra FIV ed HIV-1 coinvolgono numerosi aspetti, tra cui l'organizzazione genomica, il ciclo replicativo, i bersagli cellulari ed i meccanismi patogenetici. Per questi motivi FIV ed il suo ospite naturale rappresentano un interessante modello per la ricerca sull'AIDS. Similmente ad HIV-1, il genoma di FIV contiene i geni *gag*, *pol*, *env* che codificano le proteine strutturali ed enzimatiche del virione e i geni accessori e regolatori che giocano un ruolo chiave nella regolazione e nell'infettività virale. A differenza del genoma di HIV-1 caratterizzato dalla presenza di quattro geni accessori, il genoma di FIV ne presenta due: *vif* ed *orf-A*. Di questi, il primo codifica il fattore di infettività virale, molto simile a quello di HIV-1, mentre il secondo gene codifica la proteina Orf-A. Il ruolo biologico di Orf-A non è stato ancora chiarito, ma si ritiene rappresenti una proteina accessoria multifunzionale con caratteristiche simili alle proteine accessorie di HIV-1 quali Vpr, Tat e Nef.

Il presente lavoro di dottorato si inserisce in un progetto di ricerca più ampio, volto a chiarire la biologia di base di FIV, focalizzandosi sulle funzioni svolte dalla proteina Orf-A. Inizialmente è stata valutata l'espressione della proteina ed il suo coinvolgimento nel ciclo cellulare mediante diversi sistemi di over-espressione. Successivamente sono stati condotti gli stessi esperimenti in un contesto più simile a quello fisiologico. Pertanto, sono stati ottenuti plasmidi basati sul genoma provirale, Orf-A *plus* e *minus*, dove l'estremità Carbossi-terminale della proteina Orf-A è stata fusa al tag HA. I vettori sono stati testati sia in cellule umane che feline per valutarne l'espressione ed il coinvolgimento nella progressione del ciclo cellulare. Gli stessi plasmidi sono stati impiegati per valutare *i*) la localizzazione della proteina Orf-A e della Ciclina B1 target del blocco del ciclo cellulare in saggi di immunofluorescenza;

ii) la capacità replicativa del virus; *iii)* l'incorporazione della proteina Orf-A nelle particelle virali.

Nel complesso, i risultati suggeriscono che, laddove la proteina Orf-A è espressa, si verifica un arresto del ciclo cellulare in fase G2/M indicando un ruolo di Orf-A simile a quello descritto per la proteina Vpr di HIV-1. Inoltre, per la prima volta in letteratura, è stata dimostrata l'incorporazione della proteina Orf-A nelle particelle virali.

Questo studio contribuisce a dissezionare le funzioni della proteina Orf-A di FIV ed a chiarire i meccanismi alla base della biologia del Virus dell'Immunodeficienza Felina e, più in generale, di quella dei *lentivirus*.

2. ABSTRACT

Feline Immunodeficiency Virus (FIV), a non-primate lentivirus, causes an immunodeficiency syndrome in domestic cats that is strikingly similar to AIDS in humans. Although diverse in term of evolution, FIV is similar to Human Immunodeficiency Virus Type-1 (HIV-1) in many respects including genome organization, target cells infected *in vivo*, course of infection and disease state. Thus, for these reasons, FIV represents an attractive model for AIDS research. Similarly to HIV-1 and other lentivirus, the FIV genome encodes three large open reading frame *gag*, *pol*, *env* that encode for the structural and enzymatic proteins. HIV-1 encodes six additional small open reading frames that express regulatory and accessory proteins: *vif*, *rev*, *tat*, *vpr*, *vpu* and *nef*. However, the FIV genome contains only three additional open reading frames, two of which include *rev*, that encodes a viral post transcriptional regulatory protein and *vif* that encodes an accessory protein necessary for viral infectivity. The primary function of the third gene designated *orf-A* remains unclear but it is believed to represent a multifunctional accessory protein similar to HIV-1 Vpr, Tat and Nef accessory proteins.

This study is part of a research project aimed to clarify FIV biology, focusing on the functions performed by ORF-A. Firstly, we evaluated Orf-A expression and its involvement in the cell cycle progression using different systems of over-expression. Secondly, in order to explore Orf-A involvement in cell cycle progression in the context of more physiological conditions, we obtained Petaluma proviral constructs containing a tagged version of Orf-A. Moreover, we employed the same constructs in order to evaluate *i*) the intracellular localization of Orf-A and Cyclin B1 proteins with immunofluorescence assays; *ii*) the replicative capacity of Orf-A tagged *plus* and *minus* viruses; *iii*) the incorporation of the Orf-A protein in viral particles.

Taken together, the results suggest that Orf-A expression leads to a cell cycle arrest in G2/M phase, indicating a role of Orf-A similar to the one described for HIV-1 Vpr. Furthermore, for the first time we report the Orf-A incorporation into viral particles.

This study contributes to dissect FIV Orf-A functions and to clarify the mechanisms underlying Feline Immunodeficiency Virus and, generally, *lentiviruses* biology.

3. INTRODUZIONE

3.1 Il Virus dell' Immunodeficienza Felina

Il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV, *Feline Immunodeficiency Virus*), isolato per la prima volta in California nel 1987 (Pedersen *et al.*, 1987), appartiene alla famiglia *Retroviridae*, genere *Lentivirus* (Goff *et al.*, 2001). La famiglia dei retrovirus comprende un eterogeneo gruppo di virus identificati in diverse specie di vertebrati, caratterizzati da un genoma ad RNA diploide a polarità positiva e dotati di *envelope*. In base al tropismo ed alla patogenicità i retrovirus sono classificati in sette generi: gli *Alpharetrovirus*, i *Betaretrovirus* ed i *Gammaretrovirus*, considerati retrovirus semplici ed i *Deltaretrovirus*, gli *Epsilonretrovirus*, i *Lentivirus* e gli *Spumavirus*, considerati retrovirus complessi.

I lentivirus causano disordini di tipo degenerativo a carico del sistema immunitario e nervoso a lenta progressione. A questo genere appartengono virus in grado di infettare i primati: i Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 e 2 (HIV-1, HIV-2) ed il Virus dell'Immunodeficienza della Scimmia (SIV) e virus che infettano i non primati: il Virus dell'Immunodeficienza Bovina (BIV), il Virus dell'Artrite-Encefalite Caprina (CAEV), il Virus dell'Anemia Infettiva Equina (EIAV), il Virus Visna-Maedi che infetta la pecora e FIV che costituisce nel gatto domestico (*Felis catus*) l'agente eziologico di una sindrome cronica progressiva, simile all'AIDS (Sindrome da Immunodeficienza Acquisita).

3.2 FIV come modello per lo studio di HIV-1

La scoperta di FIV quale agente eziologico di una sindrome simile a quella causata da HIV-1 nell'uomo ha fin dall'inizio reso evidente le potenzialità di tale lentivirus come modello di studio per l'AIDS (Bendinelli *et al.*, 1995). Dal momento che HIV-1 non si replica in cellule non umane, si è reso necessario usare modelli lentivirus-animale-ospite per studiare sperimentalmente l'infezione *in vivo* e poter analizzare aspetti correlati alla biologia del virus quali la trasmissione, la patogenesi e la

risposta immunitaria dell'ospite, nonché per sviluppare possibili strategie terapeutiche e vaccinali. Sebbene nessuno dei modelli animali a disposizione rappresenti l'esatta controparte dell'infezione da HIV-1 nell'uomo, il sistema FIV/gatto domestico presenta numerosi vantaggi che lo rendono idoneo a questo tipo di studi. Nonostante FIV sia solo lontanamente correlato ad HIV-1 da un punto di vista filogenetico, i due lentivirus presentano un'analoga struttura morfologica ed una simile organizzazione genomica (figura 3.5). Altre caratteristiche di similarità di questo virus con quello umano sono il ciclo replicativo, l'effetto citopatico *in vitro* ed il tropismo per macrofagi e linfociti T. In virtù di tutti questi parallelismi, FIV è stato e continua ad essere studiato per indagare specifici aspetti relativi alla patogenesi lentivirale e per sviluppare farmaci e terapie antivirali. Ad esempio, per quanto riguarda quest'ultimo punto, FIV è stato impiegato con successo per lo sviluppo di inibitori della proteasi attivi *ex-vivo* contro FIV, HIV-1 e SIV (Elder *et al.*, 2008). Un altro fronte in cui l'impiego del modello FIV/gatto risulta particolarmente attraente è lo sviluppo di strategie vaccinali contro HIV-1. A tale riguardo, un particolare vantaggio del modello preso in considerazione, deriva dal fatto che FIV, come HIV-1, presenta diversi sottotipi virali, caratteristica che permette di testare l'efficacia dei vaccini nei confronti di *challenge* eterologhi (Dunham, 2006). FIV costituisce un buon modello per lo sviluppo di sistemi vettoriali sicuri per trasdurre specifiche cellule in differenti organi e tessuti (Sauter *and* Gasmi, 2001). Inoltre, rispetto ai modelli animali primati, i vantaggi riguardano anche i costi moderati di mantenimento degli animali e l'utilizzo di una specie non a rischio di estinzione. Infine, altri aspetti interessanti di FIV sono rappresentati dalla sua specie specificità, che riduce il rischio d'infezione per i laboratoristi che manipolano tale virus.

3.3 Patogenesi dell'infezione

Diversi studi individuano nel gatto domestico l'unico serbatoio di infezione di FIV, in virtù della diversità genomica riscontrata in virus simili identificati in altre specie di felini, come puma e pantere (Miller *et al.*, 2006). Il decorso clinico nel gatto causato dall'infezione di FIV è caratterizzato da un progressivo deficit del sistema

immunitario e può essere suddiviso in quattro fasi che riflettono il sistema di classificazione usato per la patologia indotta da HIV-1.

1. Fase acuta: rappresenta il periodo immediatamente successivo al contagio. Il virus in questa fase colpisce principalmente i linfociti T CD4-positivi e in minor percentuale i macrofagi, i quali, meno sensibili all'effetto citopatico di FIV, fungono da serbatoio per la persistenza dell'infezione nei tessuti (Beebe *et al.*, 1994). Molto spesso questa fase si presenta clinicamente silente o simile ad un'influenza.
2. Fase di latenza: periodo asintomatico della malattia di durata variabile.
3. Linfadenopatia generalizzata: caratterizzata da segnali clinici non specifici. In questo stadio, si riscontra un calo del numero di globuli bianchi ed un'inversione del rapporto CD4/CD8 dovuto al declino dei linfociti CD4-positivi.
4. Sindrome da immunodeficienza: in questa fase vi è un brusco calo dei linfociti CD4-positivi correlato ad un aumento nel plasma del numero di copie di RNA virale. A questo livello compaiono numerose infezioni opportunistiche, disordini neurologici e tumori di diversa eziologia che portano rapidamente alla morte dell'animale (Goto *et al.*, 2000).

In seguito all'esposizione a FIV, l'ospite reagisce a livello umorale con la produzione di anticorpi neutralizzanti e con un'elevata risposta di tipo citotossico (Song *et al.*, 1992, Beatty *et al.*, 1996), che determinano nel complesso un'iniziale riduzione della carica virale nel plasma (Musey *et al.*, 1997, Mooij and Heeney, 2001). Anche se la risposta cellulo-mediata è robusta e persistente durante il decorso della malattia, non è comunque sufficiente per arrestare la progressione né per impedire l'esito finale.

3.4 Morfologia del virione

Le particelle virali mature di FIV presentano la morfologia tipica dei retrovirus. I virioni hanno una forma sferica o ellissoidale del diametro di circa 100-125 nm (Bendinelli *et al.*, 1995) (figura 1.1). Esternamente è presente un involucro (*envelope* o pericapside) costituito da un doppio strato lipidico, acquisito in fase di gemmazione

dalla membrana plasmatica della cellula ospite, nel quale sono inserite le glicoproteine di superficie (SU) e transmembrana (TM), entrambe codificate dal genoma virale, coinvolte nel determinare il tropismo e l'infettività virale (Pancino *et al.*, 1993). L'*envelope* racchiude la componente capsidica che comprende una porzione esterna (matrice) ed una centrale (*core* o nucleocapside). Lo strato di matrice è formato dalla proteina di matrice (MA) che, associata all'*envelope*, nel lato interno del virione, è essenziale per l'integrità della particella virale e necessaria per la corretta incorporazione delle proteine virali di superficie nel virione maturo (Manrique *et al.*, 2001). Il nucleocapside presenta un rivestimento proteico (capside), costituito da numerose subunità della proteina capsidica (CA o p24), assemblate in una struttura di forma conica a simmetria icosaedrica, la quale racchiude il genoma e le proteine ad esso associate. Queste ultime comprendono la proteina nucleocapsidica (NC) e gli enzimi virali: proteasi (PR), retrotrascrittasi (RT), integrasi (IN) e deossiridina trifosfatasi (DU), assente nei lentivirus dei primati, essenziali per la maturazione del virione e per le fasi iniziali della replicazione virale (Payne *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003; Saenz and Poeschla., 2004).

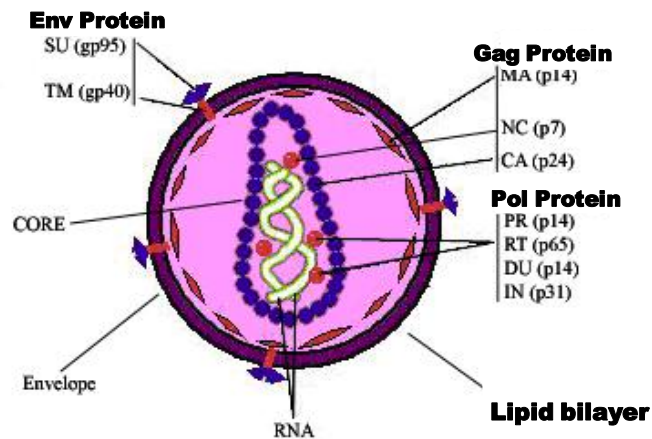


Figura 3.1: rappresentazione schematica del virione del Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV), (Dunham *et al.*, 2006).

3.5 Organizzazione genomica di FIV

Sebbene FIV ed HIV-1 siano distanti dal punto di vista evolutivo (Kirchhoff, 2010) nell'organizzazione genomica si presentano molto simili, infatti condividono un'omologia di sequenza del 51% ed amminoacidica del 21% (Yamamoto, 2010) (figura 3.2). I genomi di FIV e di HIV-1 codificano proteine strutturali, essenziali per la replicazione del virus, regolatorie ed accessorie che invece permettono al virus di avere una più complessa interazione con la cellula ospite. In particolare, come mostrato dalla Figura 3.3, all'estremità 5' e 3' del genoma sono presenti due regioni contenenti le sequenze ripetute invertite LTR, elementi contenenti sequenze regolatorie fondamentali per la replicazione, regolazione ed integrazione dell'espressione del genoma virale (Kenon *and* Lever, 2011). A partire dall'estremità 5' in direzione del 3' del genoma virale sono presenti tre schemi di lettura aperti (ORF, *Open Reading Frame*) maggiori, *gag*, *pol* ed *env*, la cui presenza e disposizione sono conservate in tutti i retrovirus. Il trascritto del gene *gag* codifica le proteine strutturali del *core* e viene tradotto inizialmente in una poliproteina di 50 kDa. In seguito alla gemmazione del virus dalla cellula ospite, la PR virale processa Gag, rispettivamente dall'estremità amminica a quella carbossilica, nelle proteine strutturali MA, CA e NC che formeranno il virione maturo. La sequenza di *pol* è sovrapposta al gene *gag* per circa 109 nucleotidi e in posizione -1 di *reading frame* rispetto a quest'ultimo. Il trascritto è tradotto come poliproteina di fusione Gag- Pol di circa 158 kDa prodotta grazie ad un evento di *frameshift*, che si verifica con una frequenza pari al 30% circa (Morikawa *et al.*, 1991, Morikawa *and* Bishop, 1992). Il precursore Gag-Pol viene convertito nella forma enzimatica attiva durante l'assemblaggio del virus originando, mediante auto-proteolisi, le proteine enzimatiche virali PR, RT, DU ed IN. Diversamente da FIV il gene *pol* di HIV-1 non presenta una regione codificante l'enzima deossiridina trifosfatasi, funzione assolta in quest'ultimo dalla proteina Vpr. Il trascritto del gene *env* è tradotto in una poliproteina di 130 kDa (gp130) che viene processata, grazie all'azione di proteasi presenti nel Golgi della cellula ospite, nelle proteine di superficie (SU o gp95) e transmembrana (TM o gp41). Entrambe queste proteine sono importanti per il

processo di infezione in quanto sono coinvolte nelle prime fasi di interazione tra il virus e la cellula ospite e mediano la fusione tra la membrana cellulare e quella virale, determinando il tropismo d'ospite del virus. Esse sono associate mediante legami non covalenti e formano complessi trimerici sulla superficie del virione. La proteina SU è una proteina altamente glicosilata di 95 kDa che favorisce il legame di FIV con il recettore cellulare CD134 (Shjmojima *et al.*, 2004). TM, di 41 kDa, è invece una proteina transmembrana che attraversa il doppio strato lipidico dell'*envelope*. Essa contiene il dominio di fusione e quindi è importante per la penetrazione del nucleocapside nella cellula ospite (Manrique *et al.*, 2004). Oltre alle tre ORF maggiori, FIV possiede, analogamente ad HIV-1 e agli altri lentivirus complessi, altre ORF minori codificanti proteine che intervengono nella regolazione dell'infettività e del ciclo replicativo virale. Le caratteristiche e le funzioni di ciascun gene accessorio e regolatore verranno trattate in dettaglio nel paragrafo 3.7.

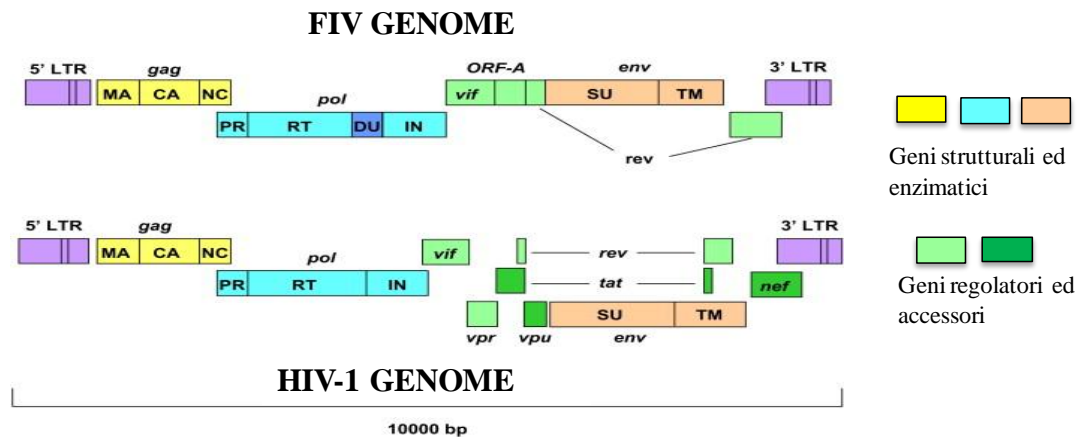


Figura 3.2: rappresentazione schematica del genoma di FIV e di HIV-1 modificata da Lecollinet *et al.*, 2008

3.6 Ciclo replicativo

Sebbene il ciclo replicativo di FIV non sia ancora stato dettagliatamente caratterizzato in tutte le sue fasi, esso sembra essere analogo a quello degli altri *lentivirus* ed in particolare a quello di HIV-1 (figura 3.3). FIV è in grado di infettare diversi tipi cellulari: linfociti T CD4+, linfociti T CD8+, linfociti B e macrofagi (Elder *et al.*, 2008). Il primo evento del ciclo replicativo è rappresentato dall'interazione tra le glicoproteine dell'*envelope* e le specifiche proteine recettoriali presenti sulla superficie della cellula bersaglio, evento che determina la patogenicità virale. In particolare, la glicoproteina di superficie (SU) si lega con il recettore CD134 (membro della famiglia dei recettori *tumor necrosis factor/ nerve growth factor* TNFR/NGFR) (Shimajima *et al.*, 2004) espresso principalmente sulla superficie cellulare dei linfociti T-CD4 positivi (Paterson *et al.*, 1987, De Parseval *et al.*, 2004), bersaglio primario del virus nelle fasi iniziali dell'infezione. Il legame di SU al suo recettore cellulare determina un cambiamento conformazionale della proteina stessa, che porta all'esposizione dei domini di fusione. Analogamente a quanto avviene nel caso di HIV-1, affinché FIV penetri all'interno della cellula bersaglio, deve inoltre verificarsi il legame di SU con il corecettore CXCR4, principalmente espresso su monociti, linfociti T e B attivati (Willett *et al.*, 2003). L'esposizione del dominio di fusione della proteina TM media la fusione tra la membrana dell'*envelope* virale e quella cellulare. Il *core* viene dunque rilasciato nel citoplasma della cellula ospite e va incontro ad un parziale disassemblaggio (*uncoating*). L'RNA genomico, associato alle proteine virali, viene liberato nel citoplasma e l'enzima retrotrascrittasi (RT) contenuto nel virione lo copia in una molecola di DNA a doppio filamento con una LTR (*Long Terminal Repeats*) a ciascuna estremità (provirus). Il DNA formato si associa ad alcune proteine virali, dando origine al complesso di pre-integrazione (PIC, *pre-integration complex*), che viene attivamente trasportato al nucleo attraverso i pori nucleari e integrato nel genoma cellulare, ad opera della proteina virale IN. Il DNA provirale diventa patrimonio genetico della cellula ospite e si comporta come un gene cellulare. L'espressione dei geni virali inizia con la trascrizione del provirus in un unico tipo di

messaggero (trascritto *full-length*) ad opera della RNA polimerasi II cellulare, che riconosce il promotore virale nella 5' LTR. Questo trascritto, sottoposto o meno ad eventi di *splicing* da parte di fattori cellulari, origina tutti i messaggeri virali. Inizialmente vengono esportati al citoplasma gli mRNA sottoposti ad eventi multipli di *splicing* che codificano i geni regolatori e, solo quando la proteina Rev raggiunge una certa concentrazione, anche gli mRNA sottoposti ad eventi singoli di *splicing* e quelli non processati vengono efficientemente trasportati al citoplasma. I trascritti *full length* sono impiegati sia come RNA genomico da incorporare nella progenie virale, sia come stampo per la traduzione delle proteine virali. Le prime di queste ad essere tradotte sono quelle strutturali del *core* e dell'*envelope*. In seguito alla traduzione le proteine virali si localizzano, insieme all'RNA genomico virale, in punti precisi della membrana plasmatica dove ha inizio il processo di assemblaggio. L'assemblaggio della particella virale avviene tipicamente a livello della membrana plasmatica e inizia con la formazione del complesso Gag-RNA genomico, mediato dalla regione NC della poliproteina Gag e dal segnale Ψ presente sull'RNA. Il precursore Gag dei retrovirus media il reclutamento delle proteine di superficie dei virioni al sito di assemblaggio, oltre che quello del precursore degli enzimi virali Pol, la poliproteina di fusione Gag-Pol. Le particelle virali assemblate vengono rilasciate per gemmazione dalla membrana della cellula ospite. In concomitanza al rilascio o immediatamente dopo questo evento, le particelle virali vanno incontro a maturazione mediante il processamento proteolitico dei precursori proteici.

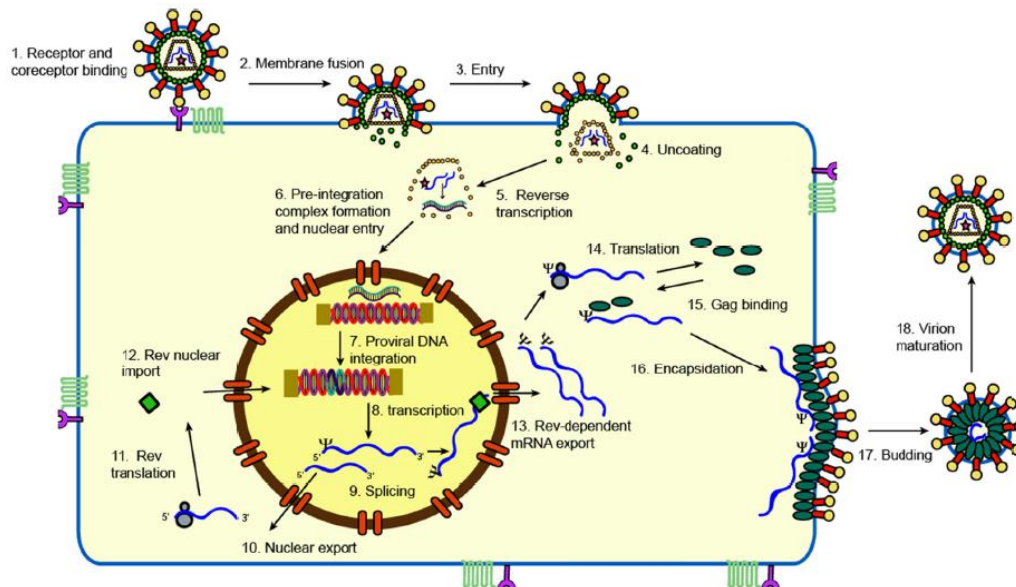


Figura 3.3: rappresentazione schematica del ciclo replicativo di FIV (Kenyon *and* Lever, 2011).

3.7 I geni accessori di FIV

I geni accessori costituiscono importanti elementi del genoma dei *lentivirus* che li distingue rispetto agli altri retrovirus. Si tratta di brevi sequenze che codificano fattori implicati nella regolazione dell'attività e dell'infettività virale, nella determinazione del tropismo, nella persistenza virale nei confronti del sistema immunitario dell'ospite e nell'induzione della patologia cronica (Tomenaga *and* Mikami, 1996). Il genoma di FIV contiene tre geni accessori e regolatori: *vif*, *orf-A* e *rev*. In particolare:

- il gene *vif* (*Viral Infectivity Factor*) codifica il fattore di infettività virale ed è localizzato tra i geni *pol* ed *env* (Phillips *et al.*, 1992; Talbott *et al.*, 1989). Si tratta di una proteina di 29 KDa che sembra essere coinvolta nel processo di trascrizione inversa e nella replicazione virale *in vivo* ed *in vitro* (Inoshima *et al.*, 1996; Lockridge *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2007; Simon *and* Malim, 1996). Inoltre, così come mostrato per HIV-1, la proteina Vif di FIV sembra essere coinvolta nei meccanismi virali di difesa contro le deamminasi cellulari mediante il legame e la conseguente induzione alla degradazione dell'enzima

della cellula ospite APOBEC3G, che è stato dimostrato causare mutazioni di tipo G- A nei genomi lentivirali generando un provirus difettivo (Marin et al., 2003; Sheehy et al., 2003).

- il gene *rev* di FIV è costituito da due esoni e viene trascritto in un mRNA successivamente processato mediante due o tre eventi di splicing. In HIV, la proteina Rev ha la funzione di aumentare la stabilità dei trascritti non processati o parzialmente processati, promuovendone l'esportazione nel citoplasma ed è quindi necessaria per consentire la produzione delle proteine strutturali del capsido, degli enzimi virali e di Vif. Tale attività viene esplicitata solo sui trascritti contenenti una sequenza di riconoscimento chiamata RRE, *Rev Responsive Element*, con la quale Rev è in grado di interagire. Per la proteina Rev di FIV, è stata dimostrata un'attività analoga a quella di Rev di HIV ed un equivalente sito RRE (Phillips et al., 1992).
- Il gene *orf-A* è localizzato tra i geni *vif* ed *env* e codifica una proteina di 77 amminoacidi che viene tradotta a partire da mRNA policistronici completamente processati. Questi trascritti originano da doppi e tripli eventi di *splicing* e sono espressi nella fase precoce dell'infezione (Tomenaga et al., 1993b). Tra i geni accessori di FIV, Orf-A è forse il meno caratterizzato.

Oltre ai geni *vif* e *rev*, il genoma di HIV-1 codifica il gene regolatorio *tat*, importante per la trascrizione del provirus integrato, e i tre geni accessori *vpu*, *vpr* e *nef*, importanti per la replicazione e l'infettività virale *in vivo* (Vincenzi and Poli, 2013).

3.8 Proprietà biologiche di Orf-A

Il gene accessorio *orf-A*, di circa 234 coppie di basi, codifica una proteina di 77 amminoacidi con un peso molecolare di circa 8-9 kDa (Gemeniano *et al.*, 2004). La funzione della proteina Orf-A è stata lungamente dibattuta e a tutt'oggi non è stata ancora chiarita. Studi iniziali suggerivano che potesse svolgere una funzione di transattivatore trascrizionale analoga a quella svolta dalla proteina Tat di HIV-1. Infatti, è stato dimostrato che Orf-A facilita un aumento netto della trascrizione e della traduzione del genoma virale (de Perseval *and* Elder 1999; Sparger *et al.*, 1992;

Water *et al.*, 1996) mediante un meccanismo diverso rispetto a quanto riportato per gli altri lentivirus (Chatterij *et al.*, 2002; Gemeniano *et al.*, 2003). Recentemente è stato dimostrato come Orf-A induca l'accumulo del recettore primario, CD134, a livello dell'apparato di Golgi, portando ad una riduzione dell'espressione sulla superficie cellulare del recettore stesso. In questo modo viene favorito il rilascio del virus dalle cellule infette, in modo da minimizzare le interazioni tra il recettore e le particelle virali in gemmazione (Hong *et al.*, 2010). La stessa funzione è svolta in HIV-1 dalle proteine Nef e Vpu (Hong *et al.*, 2010). ORF-A risulta critica per l'infezione produttiva *in vivo* e *in vitro* in cellule T (Waters *et al.*, 1996). Essa è in grado inoltre di *down*-regolare l'espressione di geni codificanti enzimi del *pathway* ubiquitina-proteasoma e fattori coinvolti nello *splicing* dell'mRNA, allo scopo di modulare l'ambiente cellulare per permettere la replicazione di FIV (Sundstrom *et al.*, 2008). Ulteriori evidenze hanno dimostrato che mutanti per delezione nel gene *orf-A* riducono l'espressione del genoma virale con la conseguente diminuzione della formazione delle particelle virali (Gemeniano *et al.*, 2003). Tutti questi risultati suggeriscono che Orf-A svolge molteplici funzioni in diverse fasi del ciclo replicativo del virus. Si tratta, quindi, di una proteina multi funzionale che risponde alla necessità di versatilità date le dimensioni ridotte del genoma.

3.9 Caratteristiche strutturali della proteina Orf-A ed analogie con la proteina Vpr di HIV-1

Le diverse funzioni attribuite alla proteina Orf-A sono riconducibili a quelle svolte da diversi geni accessori di HIV-1. In particolare, le maggiori analogie si riscontrano tra la proteina Orf-A e Vpr di HIV-1 (Gemeniano *et al.*, 2003, 2004), sebbene, dal punto di vista della sequenza nucleotidica ed amminoacidica, non vi siano omologie (figura 3.5, immagine modificata da Matsuda *et al.*, 2009). Come mostrato in figura 3.5 entrambe le proteine presentano una regione acida e una regione ricca di leucine. Nel caso di Vpr, la regione acida è responsabile dell'effetto citopatico, conseguente alla formazione di canali ionici sulla membrana plasmatica, e della morte cellulare (Piler *et al.* 1998), mentre, nel contesto di Orf-A, la stessa regione sembra importante

nella mediazione della transattivazione delle LTR, mediante un meccanismo ancora sconosciuto (Chatterji *et al.*, 2002). In Vpr la regione ricca di leucine, localizzata all'estremità carbossi-terminale, presenta un segnale di localizzazione e di esporto nucleare ed è coinvolta nell'induzione del blocco del ciclo cellulare in fase G2/M, nell'efficiente migrazione al nucleo del complesso di pre-integrazione (PIC) e nell'incorporazione nelle particelle virali (Romani *et al.*, 2009; Le Rouzic *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2009). Analogamente a Vpr, anche Orf-A ha lo stesso dominio ricco in leucine all'estremità carbossi-terminale e studi di mutagenesi hanno dimostrato la presenza di un segnale di localizzazione e di esporto nucleare, suggerendo che Orf-A si comporti da proteina *shuttling* nucleo-citoplasma (Gemeniano *et al.*, 2004).

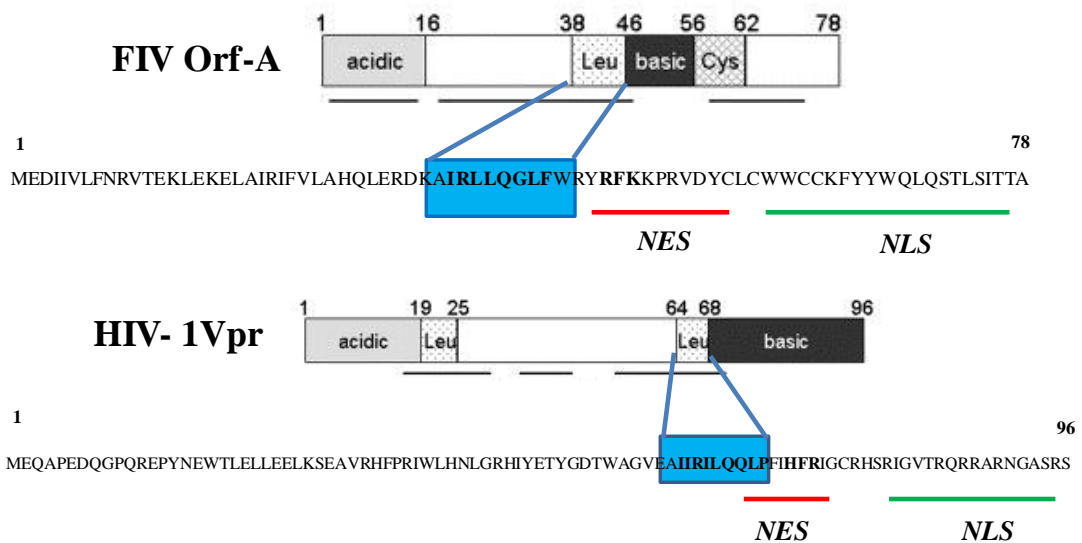


Figura 3.4: Rappresentazione schematica della proteina accessoria Orf-A e Vpr. *ACIDIC* indica una sequenza amminoacidica in cui sono presenti più del 25% di amminoacidi acidi e meno del 12,5% basici; *BASIC* indica una sequenza di amminoacidi in cui più del 25% e meno del 10% sono amminoacidi basici ed acidi, rispettivamente; *Leu* e *Cys* indicano regioni ricche in leucina ed in cisteina in quanto la sequenza amminoacidica contiene più del 50% di amminoacidi leucine e cisteine; le linee solide rappresentano domini ad alfa elica. Immagine modificata da Matsuda *et al.*, 2009.

3.10 Significato biologico del blocco del ciclo cellulare indotto dai virus

In generale i virus hanno evoluto diverse strategie per indurre il blocco della progressione del ciclo cellulare della cellula ospite in fase G2/M al fine di favorire la replicazione virale (Davy *and* Doorbar, 2007). In HIV-1 tale arresto è mediato dalla proteina Vpr, ma il meccanismo esatto rimane ancora oscuro. Sono, tuttavia, noti gli effetti che tale blocco causa su diverse fasi del ciclo replicativo, tra cui la stimolazione dell'*uncoating*, l'aumento della retrotrascrizione del genoma, e la diminuzione della degradazione degli intermedi della replicazione virale (Groschel *and* Bushman, 2005). Altri studi hanno sottolineato che tale arresto favorisce l'aumento del numero di provirus integrati e l'attività trascrizionale delle LTR (Davy *and* Doorbar, 2007).

La transizione nelle diverse fasi del ciclo cellulare è un processo finemente regolato da eventi di fosforilazione. Gli eventi principali di fosforilazione sono mediati da complessi ciclina-CDK (*cyclin-dependent kinase*), dove le cicline svolgono una funzione regolatrice che conferisce specificità di substrato alle chinasi, mentre queste ultime svolgono l'attività catalitica. Nelle cellule di mammifero esistono diverse cicline e CDK, che formano numerosi complessi, ognuno dei quali è caratteristico di una certa fase del ciclo cellulare con una propria specificità di substrato in grado di innescare eventi distinti. In particolare, la fase di transizione G2/M è regolata nella cellula eucariote dal complesso Cdc-2-Ciclina B1 (figura 3.5). La fosforilazione inibitoria delle Thr14/Tyr15 di Cdc2 da parte delle chinasi Wee1 e Myt1 previene l'ingresso in fase mitotica. Infatti, in presenza della fosfatasi Cdc25C si assiste alla defosforilazione del complesso e alla progressione del ciclo cellulare. In presenza della proteina Vpr, avviene l'arresto del ciclo cellulare e la mancata defosforilazione del complesso Cdc2-Ciclina B1, in quanto la proteina Vpr interagisce con la fosfatasi, inducendone la degradazione (Romani *et al.*, 2009). Inoltre, diversi autori suggeriscono che la proteina Vpr, mediante l'interazione con una Vpr BP (*Vpr Binding Protein*) (Zhang *et al.*, 2001), si associ al complesso CUL4- E3- ubiquitino ligasi per veicolare un partner, ancora sconosciuto, verso la degradazione (DeHart *et*

al., 2007). Tutti questi eventi favorirebbero l'attivazione del *pathway* ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated Protein*) e porterebbero al blocco del ciclo cellulare (Adersen *et al.*, 2008).

Per quanto riguarda FIV, un studio condotto da Gemeniano e collaboratori (Gemeniano *et al.*, 2004) dimostra che la proteina Orf-A è in grado di bloccare il ciclo cellulare in cellule di scimmia. Un altro lavoro riporta il coinvolgimento della proteina Orf-A nell'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M in cellule feline (Matsuda *et al.*, 2009).

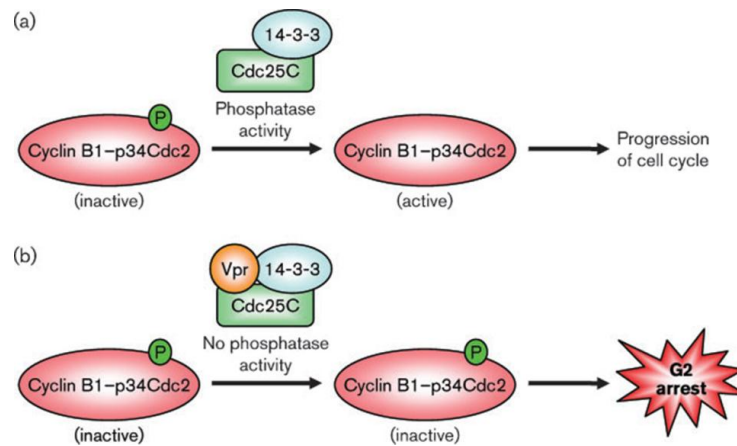


Figura 3.5: rappresentazione schematica del meccanismo di regolazione della fase di transizione da G2 a M del ciclo cellulare (immagine modificata da Romani *et al.*, 2009).

4. SCOPO

Il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) è simile al Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 (HIV-1) in molte caratteristiche sia molecolari che biochimiche e per questo rappresenta un interessante modello per la ricerca sull'AIDS considerando sia aspetti patogenetici che approcci terapeutici. Di particolare interesse sono le funzioni svolte dalle proteine accessorie del retrovirus in quanto studiarne la funzione ha permesso di chiarire molti aspetti riguardanti l'interazione virus cellula ospite ed ha portato alla luce nuovi meccanismi di interazione. Il gene accessorio di FIV *orf-A* sembra codificare una proteina multifunzionale con caratteristiche simili alle proteine accessorie di HIV-1. In particolare sembra condividere con la proteina Vpr il maggior numero di analogie. Questa tesi di dottorato si colloca all'interno di un progetto di ricerca che si pone come obiettivo l'analisi del ruolo biologico svolto da Orf-A nella transizione di fase G2/M del ciclo cellulare a partire da diversi sistemi di espressioni che mimano un contesto fisiologico.

5. MATERIALI e METODI

5.1 Materiali

5.1.1 Linee cellulari

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

293T: cellule embrionali renali umane, a morfologia stellata, che esprimono costitutivamente l'antigene proteico T del Virus Vacuolante della Scimmia (SV40) permettendo in questo modo un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici contenenti l'origine di replicazione di tale virus. La linea cellulare è stata gentilmente fornita dal Dott. D. Baltimore (Rockefeller University, New York).

CrFK (*Crandell Feline Kidney*): cellule fibroblastoidi derivanti dalla porzione corticale del rene di gatto di 10-12 settimane. La linea cellulare è stata gentilmente fornita dal Prof. M. Pistello (Università di Pisa).

BHK-21 (*Baby Hamster Kidney*): cellule fibroblastoidi derivanti da rene di criceto. La linea cellulare è stata acquistata presso *American Type Cell Collection* (ATCC, CLR 8544).

Le linee cellulari sono state coltivate in terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) addizionato con FBS (*Fetal Bovine Serum*) inattivato a 56°C per 30 minuti. Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore (Hereaus BDD 6220) alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5% (v/v) di CO₂ e sottoposte a periodici controlli per escludere eventuali contaminazioni.

5.1.2 Plasmidi

I costrutti plasmidici impiegati in questo lavoro di tesi, già presenti in laboratorio, sono:

pcDNA3.1(+): plasmide contenente il promotore del Cytomegalovirus umano (hCMV), i geni per la resistenza ad ampicillina e neomicina, il promotore e l'origine

di SV40 ed il segnale di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino (BGH) (Invitrogen®).

pcDNA3.1 (+) eGFP: costruito esprime la proteina *enhanced Green Fluorescent Protein* sotto il controllo del promotore hCMV.

pcDNA3.1 (+) 3'HA Orf-A: plasmide basato sul pcDNA3.1(+) esprime la forma *wild type* della proteina Orf-A di FIV coniugata all'estremità Carbossi-terminale all'epitopo dell'emagglutinina (HA) e sotto il controllo del promotore CMV.

pcDNA3.1 (+) 5'HA Orf-A: plasmide basato sul pcDNA3.1(+) esprime la forma *wild type* della proteina Orf-A di FIV coniugata all'estremità Ammino-terminale all'epitopo HA e sotto il controllo del promotore CMV.

pΔLTR: contiene i geni *gag, pol, vif, orf-A, rev, env*, la sequenza RRE di FIV, derivanti dal clone molecolare p34TF10 (codice di accesso NC_001482, ceppo Petaluma). La LTR al 5' è sostituita dal promotore hCMV e quella al 3' è costituita dal segnale di poli-adenilazione BgH.

pΔLTR è clonato all'interno del sito di policlonaggio del plasmide pUC119, mediante inserimento a livello dei siti di restrizione *EcoRI* e *SallI*. Sono, inoltre, presenti le origini di replicazione batterica, ColE1, e fagica, F1, e il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina. Questo vettore è stato gentilmente fornito dal Prof. M. Pistello (Università di Pisa).

pΔLTR Δenv1: contiene i geni *gag, pol, vif, orf-A, rev*, la sequenza RRE di FIV, derivanti dal clone molecolare p34TF10. Rispetto al genoma *wild type*, il plasmide presenta la LTR all'estremità 5' costituita dal promotore del hCMV e quella al 3' costituita dal segnale di poli-adenilazione BgH. Inoltre sono presenti una delezione di 1 kb nel gene *env* (Δenv) e la delezione del segnale di incapsidamento (ΔΨ).

pΔLTR Δenv1 è clonato all'interno del *multiple cloning site* del plasmide di clonaggio pUC119, mediante inserimento a livello dei siti di restrizione *EcoRI* e *SallI*. Sono, inoltre, presenti le origini di replicazione batterica, ColE1, e fagica, F1, e il gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina. Il plasmide è stato gentilmente fornito dal Prof. M. Pistello (Università di Pisa, Pistello *et al.*, 2007).

pΔ00: il plasmide contiene il DNA provirale del clone molecolare p34TF10 (codice di accesso NC_001482, ceppo Petaluma), (Pistello et al., 2002).

pΔ00 Orf-A 2 Stop: il plasmide contiene il DNA provirale completo del clone molecolare di p34TF10, sono presenti due codoni di stop nel gene *orf-A* inseriti subito dopo il codone di inizio traduzionale della proteina, in questo contesto la proteina non viene tradotta (gentilmente fornito dal Prof. Pistello, Università di Pisa, Italia).

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

pSFV4.2: contiene il cDNA del genoma del Virus della Foresta del Semliki (SFV) dove la regione codificante le proteine strutturali è stata sostituita con un sito di policlonaggio a livello del quale vengono inseriti i geni per le proteine eterologhe. È presente il promotore procariotico dell'RNA polimerasi SP6 che garantisce la sintesi *in vitro* degli mRNA.

pSFV/ Helper C: contiene la regione che codifica per le proteine del capsido virale (C).

pSFV/ Helper S: contiene la regione che codifica per le glicoproteine di superficie (p6, p62, E1) di SFV.

I plasmidi pSFV-HelperC, pSFV-HelperS e pSFV4.2 sono stati gentilmente concessi dal Prof. P. Liljeström (Karolinska Institutet, Huddinge).

pSFV4.2 3'HA Orf-A: derivato dal plasmide pSFV4.2 e contenente a livello del sito di policlonaggio la sequenza genica codificante la proteina Orf-A di FIV sotto il controllo trascrizionale di SFV;

In questo lavoro di tesi sono stati disegnati ed ottenuti i seguenti costrutti plasmidici:

pΔLTR Δenv1 3'HA Orf-A: il plasmide differisce dal pΔLTR Δenv1 per la presenza nel gene *orf-A* dell'epitopo dell'emagglutinina HA all'estremità Carbossi-terminale (3').

pΔLTR Δenv1 5'Stop 3'HA Orf-A: il plasmide differisce dal pΔLTR Δenv1 3'HA Orf-A per la presenza di un codone di stop all'estremità Ammino-terminale del gene subito dopo il codone d'inizio. In questo contesto la proteina non è tradotta.

pΔLTR 3'HA Orf-A: il plasmide differisce dal pΔLTR per la presenza nel gene *orf-A* dell'epitopo dell'emagglutinina HA all'estremità Carbossi-terminale.

pΔLTR 5'Stop 3'HA Orf-A: il plasmide differisce dal pΔLTR 3'HA Orf-A per la presenza di un codone di stop all'estremità Ammino-terminale del gene *orf-A*, subito dopo il codone d'inizio. In questo contesto la proteina non è tradotta.

pΔ00 3'HA Orf-A: il plasmide differisce dal pΔ00 per la presenza nel gene *orf-A* dell'epitopo dell'emagglutinina HA all'estremità Carbossi-terminale.

pΔ00 5'Stop 3'HA Orf-A: il plasmide differisce dal pΔ00 3'HA Orf-A per la presenza di un codone di stop all'estremità Ammino-terminale del gene *orf-A*, subito dopo il codone d'inizio. In questo contesto la proteina non è tradotta.

Per l'amplificazione dei diversi plasmidi in cellule procariotiche sono stati utilizzati i ceppi

- ✓ DH5α di *E. coli* [F'/endA1 hsdR17 (rk-mk+) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (NaIr) relA1 (lacIZYA-argF) U169 deoR (_80dlac_(lacZ)M15)] (Biolabs Inc.);
- ✓ STBL3 di *E. coli* [F- mcrB mrr hsdS20(rB-, mB-) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(StrR) xyl-5 λ- leu mtl-1];

I batteri sono stati coltivati in forma liquida in terreno Luria-Bertani [L.B.: Bactotriptonne 1% (p/v), Estratto di lievito 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v)] in agitazione a 37°C per il ceppo DH5α e 30°C per il ceppo STBL3. Quando necessario, il terreno è stato solidificato mediante aggiunta di agar 1.5% (p/v).

5.1.3 Oligonucleotidi

Nelle reazioni di mutagenesi, di annealing del linker HA e di sequenziamento sono stati utilizzati oligonucleotidi innesco (*primer*) opportunamente disegnati e riportati in tabella 5.1.1. Gli oligonucleotidi contrassegnati dalla sigla M sono stati impiegati nelle reazioni di mutagenesi; gli oligonucleotidi contrassegnati dalla sigla A sono stati utilizzati per l'annealing; mentre gli oligonucleotidi contrassegnati dalla sigla S sono stati utilizzati per il sequenziamento dei diversi plasmidi.

Sigla	Primer	Sequenza nucleotidica	Temperatura di appaiamento
M	NheI Orf- AF	5'ATTGTTGCAAATGAAATATTAATCTAAATA TTTGCTAGCAGTAGTTATTGATAATGTAGAT TGCAACTG 3'	77,4°C
M	NheI Orf- AR	5'CAGTTGCAATCTACATTATCAATAACTACT GCTAGCAAATATTTAGATTAATATTTTCATTT GCAACAAT 3'	77,4°C
A	LINKER HAF	5'CTAGCTACCCATACGACGTCCCAGATTACG CTTGAG3'	77,7°C
A	LINKER HAR	5'GATCGTCAAGCGTAATCTGGGACGTCGTAT GGGTAC3'	77,7°C
S	T7	5'TAATACGACTCACTATAGGG3'	48°C
S	FIV2F	5'GCATGGTATCTCGAGGCATT3'	50°C
S	FIVseqF	5'ATGTGGAAAACCTGGTCATGT3'	67°C
S	FIV11F	5'TGGCAGGATCCACTACATCA3'	50°C
S	3'HA Orf- AF	5'GCCACCATGGAAGACATAATAGTATTATTC AATAGGGTCA3'	74°C
S	BGH	5'TAGAAGGCACAGTCGAGGC3'	50°C

Tabella 5.1.1: oligonucleotidi utilizzati e loro principali caratteristiche.

5.2 Metodi

5.2.1 Quantificazione degli acidi nucleici

Quando necessario, la quantità di DNA plasmidico è stata determinata allo spettrofotometro mediante il *NanoDrop® ND-1000* (Thermo Scientific). Questo strumento è uno spettrofotometro UV- Visibile a spettro totale (220-750 nm) in grado di effettuare analisi di volumi estremamente ridotti di campione (1 µl) con accuratezza e riproducibilità elevate. Il sistema brevettato di ritenzione del campione sfrutta unicamente la tensione superficiale dei liquidi. Il cammino ottico è molto ridotto (1 mm) e permette di misurare concentrazioni 50 volte più elevate rispetto ad uno spettrofotometro tradizionale. All'estremità di un cavo a fibre ottiche viene caricato 1 µl di DNA estratto; un secondo cavo viene posto in contatto con la soluzione in modo che il liquido funga da ponte tra le due estremità. La sorgente luminosa è costituita da una lampada allo xenon e la luce che ha attraversato il campione viene analizzata da uno spettrofotometro. Lo strumento viene controllato da un software la cui interfaccia grafica restituisce per ciascun campione la curva di assorbimento e la concentrazione espressa in ng/µl. Lo strumento permette di misurare l'assorbanza (A) a 260 nm, lunghezza d'onda di assorbimento caratteristica degli anelli eterociclici aromatici degli acidi nucleici. Inoltre l'assorbanza viene misurata anche alle seguenti lunghezze d'onda:

- $\lambda = 230$ nm: lunghezza d'onda di assorbimento di carboidrati complessi e fenoli;
- $\lambda = 280$ nm: lunghezza d'onda di assorbimento di proteine;
- $\lambda = 320$ nm: rumore di fondo dovuto ad un assorbimento aspecifico.

Noti questi valori è possibile:

- ✓ determinare la concentrazione di DNA (o RNA) mediante le seguente formula:

$$\text{concentrazione [ng/ } \mu\text{l]} = (A_{260} - A_{320}) \times f_c \times f_d$$

dove f_d è il fattore di diluizione e f_c è il coefficiente di estinzione molare medio, che dipende dalla natura dell'acido nucleico:

Acido nucleico f_c [ng/ μ l]:

- DNA ds 50
 - DNA ss 33
 - RNA ss 40;
- ✓ stimare il grado di purezza dell'DNA (o RNA) in funzione di contaminazioni da carboidrati complessi e da proteine. Sono state considerate pure le preparazioni in cui il rapporto A260/A280 era compreso tra i valori 1.8 e 2.0.

5.2.2 Competenza e trasformazione batterica

I plasmidi e i prodotti delle reazioni di ligazione sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule batteriche *E. coli*, a seconda dei casi ceppo DH5 α oppure STBL3, rese artificialmente competenti mediante la tecnica del cloruro di calcio. La competenza batterica per il ceppo DH5 α è stata ottenuta facendo crescere la colonia batterica a 37°C in 3 ml di terreno liquido LB in assenza di antibiotico per circa 16 ore. Per il ceppo STBL3, la colonia batterica di partenza è stata fatta crescere a 30°C in 3 ml di terreno liquido LB, anche in questo caso in assenza di antibiotico. In seguito gli inoculi sono stati trasferiti in 200 ml dello stesso terreno privo di antibiotico e contenente MgCl₂ 15 mM. Il monitoraggio della crescita batterica è stata effettuata mediante l'uso dello spettrofotometro (Eppendorf); una volta raggiunta la densità ottica di 0.4 alla lunghezza d'onda di 600 nm, la coltura è stata raffreddata in modo rapido in ghiaccio al fine di interrompere la crescita batterica; i batteri sono stati quindi sedimentati per centrifugazione a 3500 rpm a 4°C per 15 minuti e risospesi in una soluzione fredda contenente MnCl₂-4H₂O 10 mM, CaCl₂ 50 mM, MES [2-(*N*morpholino) ethanesulfonic acid] 10 mM pH 6.3. I batteri sono stati poi ricentrifugati a 3500 rpm a 4°C per 15 minuti, delicatamente risospesi in 5 ml della medesima soluzione fredda addizionata di glicerolo al 15% (v/v) e quindi aliquotati e conservati a -80°C. La trasformazione batterica è stata effettuata aggiungendo il DNA plasmidico (100-300 ng) oppure i prodotti delle reazioni di

ligazione a 50 µl di batteri competenti, incubando poi in ghiaccio per 30 minuti. In seguito i batteri sono stati sottoposti a shock termico mediante esposizione a 37°C per 2 minuti, raffreddati in ghiaccio e incubati a 37°C per un'ora in 200 µl di LB, consentendo così l'espressione e la sintesi della proteina che conferisce la resistenza all'antibiotico di selezione. Infine, tutta la sospensione è stata seminata in piastre Petri contenenti LB- Agar addizionato con l'antibiotico ampicillina 100 µg/ml e incubati 16 ore a 37°C oppure a 30°C al fine di selezionare i batteri trasformati.

5.2.3 Preparazione di DNA plasmidico

Il DNA plasmidico in grande scala ("Maxi prep") è stato estratto, a seconda dei casi dal ceppo DH5α oppure STBL3 di *E. coli*, con il metodo della lisi alcalina e purificato con QIAGEN Plasmid Kit, un sistema QIAGEN® basato sull'utilizzo di colonne a scambio anionico. Con questo procedimento il DNA plasmidico si lega alla resina della colonna e viene purificato da RNA, proteine ed impurità ad alto peso molecolare mediante eluizione con tamponi a bassa concentrazione salina. Il DNA plasmidico viene eluito dalla colonna utilizzando un tampone ad elevata concentrazione salina. Il plasmide, una volta eluito, viene concentrato e pulito dai sali mediante precipitazione con isopropanolo e lavaggio con etanolo al 70% (v/v). La concentrazione e la presenza di eventuali contaminazioni del DNA ottenuto è stata valutata tramite tecniche spettrofotometriche (si veda paragrafo 5.2.1). Con questa tecnica si ottengono preparazioni plasmidiche ad elevato grado di purezza adatte agli esperimenti di trasfezione delle cellule eucariotiche.

Nel caso di preparazioni plasmidiche in piccola scala ("Mini prep"), il DNA plasmidico è stato estratto, a seconda dei casi dal ceppo DH5α oppure STBL3 di *E. coli*, con il metodo della lisi alcalina applicato a preparazioni per piccoli volumi di coltura batterica (2-4 ml). Il metodo prevede, dopo indebolimento della parete batterica, di trattare le cellule con una soluzione di NaOH 0.2 M e sodio dodecil solfato (SDS) all'1% (p/v), quest'ultimo in grado di solubilizzare i fosfolipidi e le proteine di membrana con conseguente rottura cellulare e rilascio del suo contenuto. L'ambiente alcalino denatura le proteine, il DNA cromosomico e quello plasmidico.

Il lisato cellulare viene in seguito rapidamente neutralizzato mediante aggiunta di potassio acetato ad elevata molarità (5 M) a pH acido. L'elevata concentrazione salina favorisce la formazione di complessi sale- detergente che, precipitando, intrappolano il DNA cromosomico, le proteine denaturate ed i detriti cellulari; il DNA plasmidico invece rinatura e rimane in soluzione. Il DNA così ottenuto è stato precipitato con alcol etilico e successivamente risospeso in TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM pH 8) contenente RNasi pancreatica 20 µg/ml. Il DNA ottenuto è stato controllato mediante restrizione enzimatica.

5.2.4 Restrizioni enzimatiche

In questo lavoro sperimentale, le diverse reazioni di restrizione del DNA sono state condotte utilizzando gli enzimi appropriati negli specifici tamponi di reazione (Biolabs). Le reazioni sono state condotte alla temperatura ottimale dell'enzima (in genere 37°C) per il tempo richiesto, a seconda del tipo di enzima e della quantità di DNA da digerire. Al termine della digestione, secondo necessità, un'aliquota oppure l'intero prodotto della reazione è stato sottoposto ad elettroforesi in gel d'agarosio all'1% (p/v) (Seakem). Al gel d'agarosio è stato aggiunto bromuro di etidio (0.5 µg/ml), molecola fluorescente che si intercala tra le basi di DNA, rendendolo visibile quando irradiato con luce UV. Per la corsa elettroforetica è stato utilizzato il tampone TBE 1X [Tris Borato EDTA: Tris-borato 0.009 M, EDTA 1 mM pH8]. Ad ogni campione è stato aggiunto *loading dye* 6X [glicerolo 5% (p/v), blu di bromofenolo 0.15% (p/v), xilene cianolo 0.02% (p/v) ed EDTA 0.002 M] al fine di visualizzare il fronte di migrazione e facilitare l'ingresso dei campioni nei pozzetti del gel. In ogni corsa elettroforetica, per verificare la corretta dimensione dei frammenti, sono stati impiegati opportuni marcatori di peso molecolare noto, tra cui il *Marker VII* (0.25 µg/ml; bande 8576/ 7427 /6106/ 4899/ 3639/ 2799/ 1953/ 1882/ 1515/ 1482/1164/992/710/492/359) e il *Marker II* (0.25 µg/ml; bande 23130/9416/6557/4361/2322/2027/564 pb) (Roche/Boehringer).

5.2.5 Mutagenesi sito specifica

Per modificare la sequenza amminoacidica dell'Orf-A di FIV nella regione ammino-terminale al fine di inserire il *tag* HA oppure per inserire un codone di stop, la sequenza nucleotidica *wild type* di interesse è stata mutagenizzata facendo uso del kit *QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene). Il protocollo prevede tre fasi successive: sintesi del filamento mutante a partire dal templatato di interesse mediante reazione di PCR (Fase 1), digestione del DNA parentale (Fase 2) e infine la trasformazione della molecola mutante in cellule di *E. coli* competenti (DH5 α) (Fase 3).

- Fase 1:

Per la reazione di PCR è stata allestita una miscela in un volume finale di 50 μ l contenente: 50 ng di DNA stampo, *buffer* di reazione [KCl 100 mM, solfato d'ammonio 100 mM, Tris-Cl 200 mM pH 8.9, Mg₂ SO₄ 20 mM, Triton X-100 1%, *nuclease-free bovine serum albumin* 1 mg/ml], 0.25 μ M di ciascuno degli oligonucleotidi innesco (senso ed antisenso) contenenti la sostituzione nucleotidica desiderata (si veda Tabella 5.1), dNTP 1 mM. Successivamente sono state aggiunte 2.5 U della DNA polimerasi *PfuUltra™ High-Fidelity* (Stratagene®). Sono stati effettuati 12 cicli di amplificazione in termociclatore (Eppendorf Mastercycler Personal), ognuno dei quali ha previsto una fase di denaturazione a 95°C per 30 secondi, una fase di appaiamento degli oligonucleotidi a 55°C per 1 minuto ed una fase di elongazione a 68°C per 11 minuti. Allo scopo di denaturare il DNA stampo ed attivare la polimerasi, i cicli di amplificazione sono stati preceduti da un'incubazione della miscela di reazione a 95°C per 1 minuto. Al termine della reazione di amplificazione la miscela è stata raffreddata in ghiaccio per 2 minuti.

- Fase 2-

La miscela è stata incubata con 10 U dell'enzima *DpnI* per 1 ora a 37°C allo scopo di digerire il DNA parentale metilato o emimetilato.

- Fase 3-

Successivamente 5 µl della miscela di DNA trattato con *DpnI* sono stati trasformati in 50 µl di batteri *E. coli* competenti (DH5α) (si veda paragrafo 5.2.2) per acconsentire la riparazione delle interruzioni a singolo filamento e l'amplificazione del DNA mutagenizzato.

Le colonie batteriche ottenute sono state incubate in 3 ml di terreno liquido LB contenente ampicillina 100 µg/ml, in agitazione per circa 16 ore alla temperatura di 37°C. Successivamente il DNA plasmidico è stato estratto e purificato (si veda paragrafo 5.2.3) ed infine sequenziato per valutare il corretto inserimento della mutazione di interesse (si veda paragrafo 5.2.7).

5.2.6 Appaiamento degli oligonucleotidi (*Annealing*)

Al fine di inserire l'epitopo dell'emagglutinina (HA) nella regione carbossi-terminale della sequenza genica dell'*orf-A* sono stati disegnati opportuni oligonucleotidi senso ed antisenso (si veda tabella 5.1.1) ed appaiati tra loro. Per la reazione di *annealing* è stata preparata una miscela di reazione contenente gli oligonucleotidi alla concentrazione di 10 mM ciascuno in un volume finale di 20 µl. La miscela è stata incubata a 97°C per 20 minuti in thermoblock (Eppendorf) e lasciata raffreddare lentamente. Gli oligonucleotidi sono stati disegnati con estremità protudenti contenenti la sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione *NheI* di modo da favorirne il legame all'estremità 3' del gene *orf-A* precedentemente mutagenizzato. Quando la temperatura del thermoblock ha raggiunto i 25°C, gli oligonucleotidi appaiati sono stati ligati con l'enzima T4 DNA ligasi (si veda paragrafo 5.2.8) ad opportuni vettori.

5.2.7 Sequenziamento dei plasmidi

I costrutti ottenuti, oltre ad essere analizzati mediante restrizione enzimatica, sono stati controllati mediante sequenziamento. La reazione di sequenziamento è stata allestita impiegando il kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystem), basato sul metodo di Sanger modificato (Sanger *et al.*, 1977). Tale kit contiene i 4 dideossinucleotidi trifosfato (ddNTP) coniugati specificamente

con un cromoforo, i deossinucleosidi-trifosfati, l'enzima AmpliTaq® Gold e il tampone di reazione. La reazione è stata portata a termine in un volume finale di 10 µl in presenza di 3.2 pmol di primer innesco, 1 µl della miscela del kit, 1 µl di tampone specifico 5X (Tris-HCl 200 mM, pH 9.0, MgCl₂ 5 mM) e 200 ng di DNA plasmidico. La reazione di sequenziamento è stata condotta in un termociclatore (Mastercycler personal, Eppendorf) mediante 30 cicli di amplificazione, dove ogni ciclo è composto dalle seguenti temperature: 95°C per 30 secondi, 50°C per 10 secondi, 60°C per 4 minuti. Il prodotto della reazione è stato precipitato in presenza di 1/10 del volume di sodio acetato 3M pH 4.6 e 2 volumi di etanolo e risospeso in acqua per essere caricato nel sequenziatore automatico (ABI PRISMA 3100, Applied Biosystem). Tale strumento utilizza il metodo di separazione su gel capillare ed i frammenti di DNA vengono analizzati da un rivelatore, che converte la diversa fluorescenza emessa dai cromofori eccitati (corrispondente ai diversi ddNTP terminatori) in un picco di colore diverso. Il risultato di un sequenziamento automatico, quindi, corrisponde ad un profilo densitometrico di picchi fluorescenti. innesco alla concentrazione 0.1 µM, 1 µl della miscela fornita dal kit e acqua bidistillata trattata con dietilpirocarbonato (DEPC) per arrivare a volume.

5.2.8 Tecniche di clonaggio

La strategia di clonaggio, impiegata in questo lavoro sperimentale, ha previsto l'ottenimento del frammento da clonare (*orf-A*) mediante due restrizione enzimatiche sequenziali a partire dal plasmide pΔLTR. È stata allestita una prima reazione di digestione (enzima di restrizione *EcoRV*; New England, Biolabs), al termine della quale l'intera miscela è stata sottoposta a migrazione elettroforetica in gel d'agarosio; l'impiego di marcatori di peso molecolare noto, durante la corsa, ha permesso di verificare la corretta dimensione dei frammenti di interesse. La porzione di gel contenente la banda a basso peso molecolare, frammento *pol* di 2169 bp, e l'altra ad alto peso molecolare, frammento *pALTR Δpol* di 11900 bp, sono state incise con bisturi e si è proceduto alla purificazione del DNA attraverso l'uso del kit *QIAquick*

gel extraction kit (QIAGEN®). Tale sistema si basa sulla solubilizzazione dell'agarosio e sul successivo legame degli acidi nucleici alla resina di silice- gel delle colonne a scambio anionico in presenza di un agente caotropico. La purificazione del DNA da sali ed enzimi è resa possibile attraverso una serie di lavaggi della colonna ed eluizione in condizioni di pH basico e ridotta concentrazione salina. Entrambi i frammenti sono stati purificati su colonna e il frammento *pALTR Δpol* ha subito un'ulteriore reazione di digestione enzimatica (enzima di restrizione *KpnI*; New England, Biolabs). Anche in questo caso sono stati ottenuti due frammenti, uno ad alto peso molecolare, 7500 bp contenente il gene *gag* di FIV all'interno del vettore pUC119, e l'altro a basso peso molecolare, 2187 contenete i geni *vif* ed *orf-A*. I frammenti sono stati separati su gel d'agarosio ed estratti mediante l'uso del Kit *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN®). Il frammento contenente i geni *vif* ed *orf-A* è stato inserito nel vettore di clonaggio pSP73 precedentemente sottoposto a restrizione enzimatica (enzimi di restrizione *EcoRV* e *KpnI*; New England, Biolabs). La reazione di ligazione è stata condotta usando l'enzima DNA ligasi del batteriofago T4 (4×10^5 U/ml) (New England, Biolabs), enzima in grado di catalizzare *in vitro* la formazione di legami fosfodiesterici tra il residuo fosfato in 5' ed il gruppo idrossilico in 3' delle estremità adiacenti. La quantità di vettore ed inserto da impiegare nella reazione di ligazione è stata determinata utilizzando la seguente formula:

$$X \text{ (ng)} = [Y \text{ pb} \times 300 \text{ ng}] / V \text{ pb}$$

dove: X = ng inserto; Y pb = paia di basi dell'inserto; 300 ng = 300 ng di vettore; V pb = paia di basi del vettore plasmidico.

La miscela di reazione è stata allestita in un volume finale di 20 µl contenente: vettore ed inserto in quantità determinate come sopra riportato, tampone di reazione [Tris HCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM] e 400 U della DNA ligasi del batteriofago T4 (New England, Biolabs). La mix di reazione è stata in seguito incubata alla temperatura di 16°C per 16 ore. I prodotti della reazione di ligazione sono stati poi impiegati per la trasformazione dei batteri (si veda paragrafo

5.2.2). Le colonie resistenti all'ampicillina sono state incubate in 3 ml di terreno LB, in presenza di ampicillina alla concentrazione di 100 µg/ml e fatte crescere per 16 ore circa alla temperatura di 37°C in agitazione. La presenza del DNA plasmidico è stata verificata usando il protocollo delle *mini-prep* (si veda paragrafo 5.2.3). Successivamente il DNA plasmidico è stato controllato mediante restrizione enzimatica (si veda paragrafo 5.2.4), gel elettroforesi e sequenziamento (si veda paragrafo 5.2.7). Una volta ottenuto il costrutto pSP73 Vif Orf-A si è proceduto con due reazioni di mutagenesi sito specifica:

- ✓ il 3' del gene *orf-A* in corrispondenza del codone di stop della traduzione è stato sostituito con la sequenza AGC che insieme alla tripletta adiacente al 5', GCT, costituisce la sequenza di riconoscimento per l'enzima di restrizione *NheI* questa reazione di mutagenesi ha permesso di inserire il *tag* HA al 3' del gene;
- ✓ il 5' del gene *orf-A* in corrispondenza del primo codone subito dopo quello di inizio della traduzione è stato mutagenizzato con una sequenza di stop, TAA, in questo modo la proteina non è tradotta.

I prodotti delle reazioni di mutagenesi sono stati impiegati per la trasformazione dei batteri (si veda paragrafo 5.2.2). Le colonie resistenti all'ampicillina sono state incubate in 3 ml di terreno LB in presenza di antibiotico e fatte crescere per 16 ore circa alla temperatura di 37°C in agitazione. La presenza del DNA plasmidico è stata verificata usando il protocollo delle *mini-prep*, controllata mediante reazione enzimatica, gel elettroforesi e sequenziamento (si vedano i paragrafi 5.2.3/4/7). Una volta ottenuti i mutanti si è proceduto con l'inserimento del *tag* HA, precedentemente ottenuto (si veda paragrafo 5.2.6), al 3' del gene *orf-A*. Quindi si sono linearizzati i costrutti con l'enzima di restrizione *NheI* (New England, Biolabs), purificati mediante l'impiego del Kit *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN®) e per evitare la circolarizzazione intramolecolare del vettore è stato utilizzato l'enzima fosfatasi alcalina (*CIP Calf Intestinal Phosphatase*) (Roche) che rimuove i gruppi fosfato alle estremità 5'. I vettori mutanti hanno subito un ulteriore ciclo di purificazione su colonna Qiagen [*QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN®)] e successivamente sono

stati ligati con il *tag* HA. I prodotti della reazione di ligazione sono stati impiegati per la trasformazione dei batteri (si veda paragrafo 5.2.2). Le colonie resistenti all'ampicillina sono state fatte crescere in terreno LB in presenza di antibiotico 37°C per 16 ore in agitazione. I cloni corretti sono stati identificati mediante estrazione del DNA secondo il protocollo delle *mini-prep*, digestione con opportuni enzimi di restrizione e corsa elettroforetica ed infine sequenziamento.

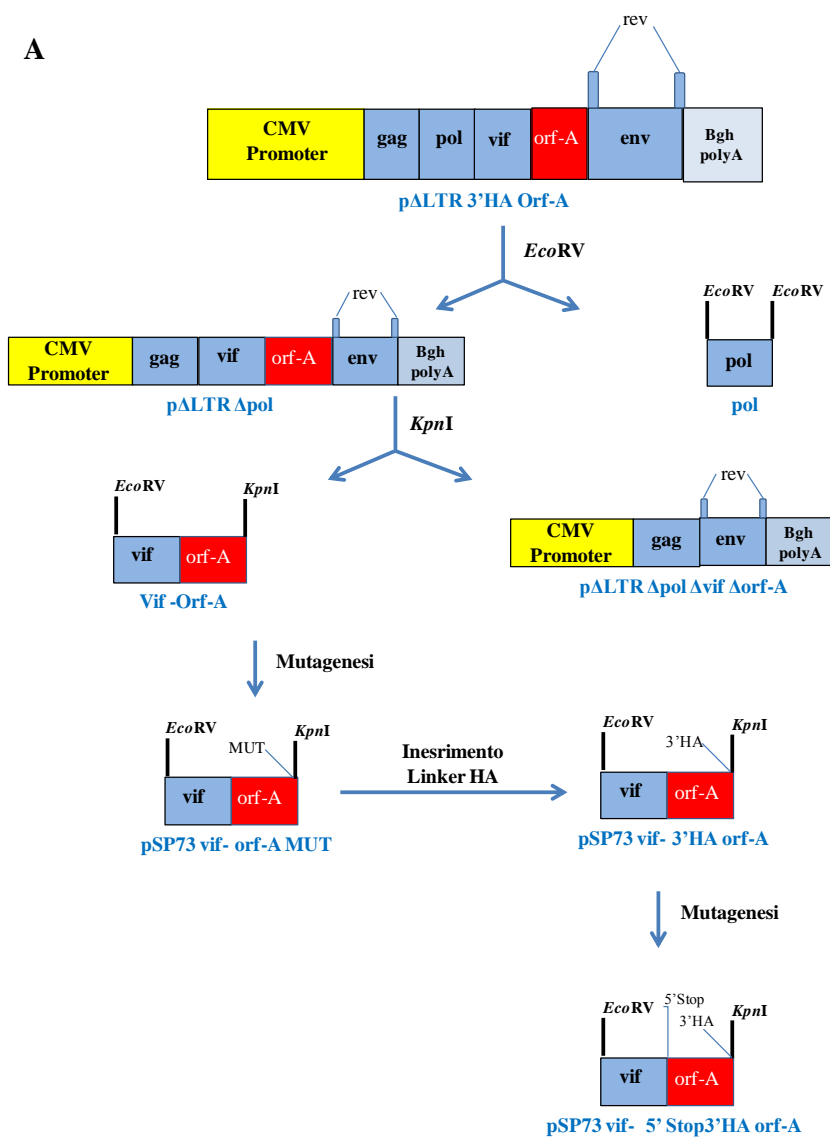


Figura 5.2.1 A) Rappresentazione schematica della strategia di clonaggio adottata. Nello schema qui riportato il vettore di partenza p Δ LTR è stato digerito con l'enzima di restrizione *EcoRV* da cui sono stati ottenuti due frammenti *p Δ LTR Δ pol* e *pol*. Il frammento *p Δ LTR Δ pol* è stato digerito con l'enzima *KpnI* e sono stati ottenuti i frammenti *p Δ LTR Δ pol Δ vif Δ orf-A* e *vif- orf-A*. Il frammento *vif-orf-A* è stato inserito nel vettore di clonaggio *pSP73* ed è stato mutagenizzato al 3' del gene *orf-A* dove la tripletta TAG è stata sostituita con la sequenza AGC al fine di creare la sequenza di riconoscimento per l'enzima di restrizione *NheI*. Ottenuto il clone mutante, il vettore è stato linearizzato con l'enzima *NheI* ed è stato aggiunto il linker HA. Il mutante codifica per la proteina Orf-A ed al 3'esprime il tag HA. Inoltre è stata ottenuta anche la controparte negativa ovvero il mutante che non esprime la proteina Orf-A con il tag. Il costrutto *pSP73 vif 3'HA orf-A* è stato mutagenizzato sostituendo al 5' del gene *orf-A* la tripletta GAA con il codone di stop TAA subito dopo il codone di inizio della traduzione, il clone mutante ottenuto è stato denominato *pSP73 vif 5'Stop 3'HA Orf-A*.

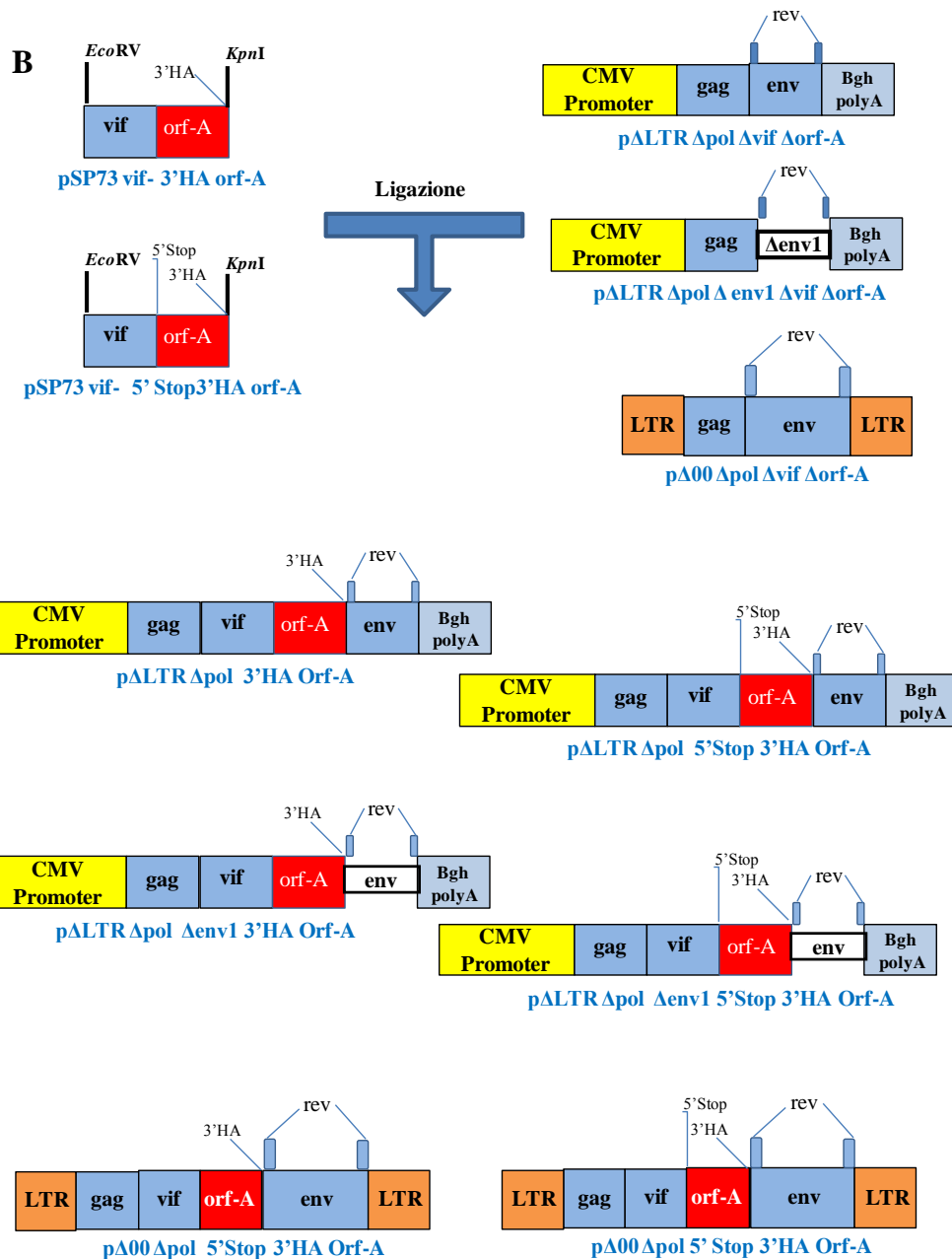


Figura 5.2.1 B) Rappresentazione schematica della strategia di clonaggio adottata. Nello schema qui riportato il mutanti ottenuti *pSP73 vif 3'HA orf-A* e *pSP73 vif 5'Stop 3'HA Orf-A* sono stati estratti dal vettore di clonaggio pSP73 in seguito a digestione con gli enzimi *EcoRV* e *KpnI* ed inseriti in opportuni vettori pΔLTR, pΔLTR Δenv1 e pΔ00 anche questi precedentemente digeriti con gli enzimi *EcoRV* e *KpnI*. In seguito alla ligazione degli inserti *vif 3'HA Orf-A* e *vif 5'Stop 3'HA Orf-A* con i vettori pΔLTR Δpol Δvif Δorf-A, pΔLTR Δenv1 Δpol Δvif Δorf-A e pΔ00 Δpol Δvif Δorf-A si sono ottenuti i costrutti: pΔLTR Δpol 3'HA Orf-A, pΔLTR Δenv1 Δpol 3'HA Orf-A e pΔ00 Δpol 3'HA Orf-A e le rispettive controparti Orf-A minus pΔLTR Δpol 5'Stop 3'HA Orf-A, pΔLTR Δenv1 Δpol 5'Stop 3'HA Orf-A e pΔ00 Δpol 5' Stop 3'HA Orf-A.

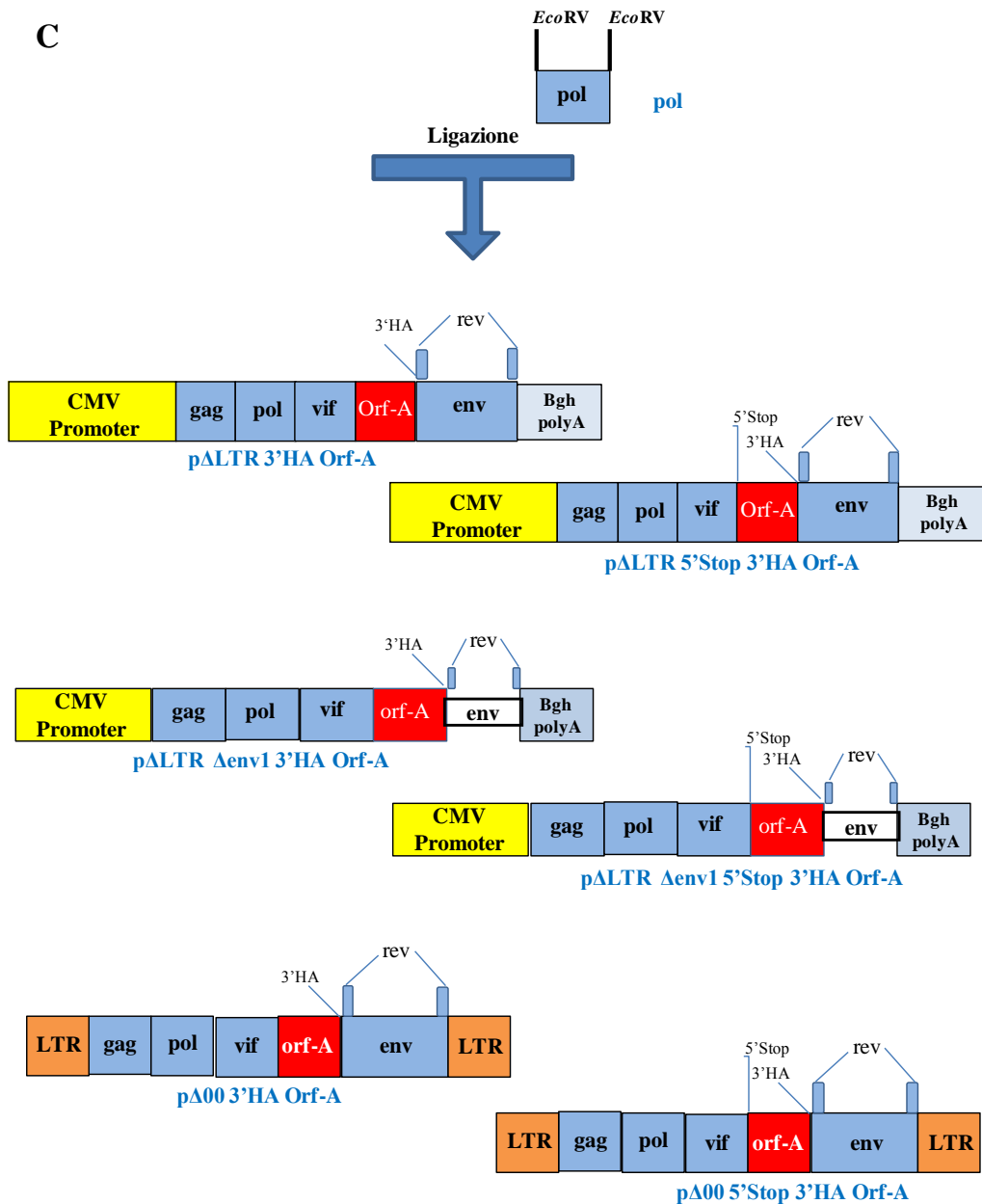


Figura 5.2.1 C) Rappresentazione schematica della strategia di clonaggio adottata. Nello schema qui riportato il mutanti ottenuti pΔLTR Δpol 3'HA Orf-A, pΔLTR Δenv1 Δpol 3'HA Orf-A e pΔ00 Δpol 3'HA Orf-A e le rispettive controparti Orf-A *minus* pΔLTR Δpol 5'Stop 3'HA Orf-A, pΔLTR Δenv1 Δpol 5'Stop 3'HA Orf-A e pΔ00 Δpol 5' Stop 3'HA Orf-A sono state linearizzate con l'enzima *EcoRV* e ligate con il frammento *pol*. I plasmidi finali ottenuti Orf-A *plus* sono pΔLTR 3'HA Orf-A, pΔLTR Δenv1 3'HA Orf-A e pΔ00 3'HA Orf-A mentre i plasmidi ottenuti Orf-A *minus* sono pΔLTR 5'Stop 3'HA Orf-A, pΔLTR Δenv1 5'Stop 3'HA Orf-A e pΔ00 5' Stop 3'HA Orf-A.

5.2.9 Ricostruzione dei plasmidi iniziali p Δ env1/p Δ LTR/p Δ 00 contenenti le mutazioni di interesse

Le sequenze mutanti sono state inserite in diversi plasmidi disponibili in laboratorio p Δ LTR Δ env1, p Δ LTR e p Δ 00, i quali possiedono gli elementi necessari per l'espressione del genoma virale in cellule eucariotiche. Inizialmente sono stati preparati i vettori mediante: digestione enzimatica con gli enzimi *EcoRV* e *KpnI* (New England, Biolabs) corsa su gel di elettroforesi e purificazione con kit *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN®). In contemporanea gli inserti *vif-3'HA orf-A* e *vif-5'stop 3'HA orf-A* sono stati estratti dal vettore di clonaggio pSP73 mediante restrizione enzimatica e purificati con il kit *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN®). I vettori e gli inserti sono stati ligati, i prodotti sono stati trasformati in cellule competenti *E.Coli* ed il DNA estratto e controllato in seguito a restrizioni enzimatiche. I primi intermedi di questo sub clonaggio sono stati: p Δ LTR Δ env1 Δ pol 3'HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 Δ pol 5'Stop 3'HA Orf-A; p Δ LTR Δ pol 3'HA Orf-A e p Δ LTR Δ pol 5'Stop 3'HA Orf-A; p Δ 00 Δ pol 3'HA Orf-A e p Δ 00 Δ pol 5'Stop 3'HA Orf-A. Infine si è proceduto con l'ultimo sub clonaggio dove è stato inserito il frammento *pol* in tutti i costrutti sopra citati mediante linearizzazione dei vettori mediante l'enzima *EcoRV* (New England, Biolabs), purificazione con il Kit *QIAquick gel extraction kit* (QIAGEN®) e linearizzazione mediante l'enzima fosfatasi alcalina (*CIP Calf Intestinal Phosphatase*) (Roche). In seguito ad un ulteriore passaggio di purificazione con il kit QIAGEN i vettori sono stati ligati con il frammento *pol*. Anche in questo caso i prodotti della reazione di ligazione sono stati impiegati per la trasformazione dei batteri, in seguito estrazione del DNA secondo il protocollo delle *mini-prep* digeriti con opportuni enzimi di restrizione e corsa su gel elettroforesi ed infine sequenziato. Infine sono stati ottenuti i seguenti costrutti: p Δ LTR Δ env1 3'HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 5'Stop 3'HA Orf-A; p Δ LTR 3'HA Orf-A e p Δ LTR 5'Stop 3'HA Orf-A; p Δ 00 3'HA Orf-A e p Δ 00 5'Stop 3'HA Orf-A.

5.2.10 Tecniche di trasfezione

Nel presente lavoro sperimentale sono state impiegate diverse metodiche per introdurre DNA esogeno all'interno delle cellule, in particolare la tecnica dell'elettroporazione, del calcio fosfato e la lipofezione.

- **Elettroporazione:** tecnica di trasfezione che consiste nell'applicazione di un breve impulso elettrico ad alto voltaggio alle cellule. A tale scopo, 10^7 cellule BHK-21 sono state sottoposte a due lavaggi in PBS 1X (NaCl 137 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2.7 mM, pH 7.4), risospese in PBS 1X, aliquotate in una cuvetta da 0.2 cm di spessore (Eppendorf) e addizionate dell'mRNA ottenuto dalla trascrizione in vitro di opportuni plasmidi (si veda paragrafo 5.2.12). Successivamente le cellule sono state sottoposte a due impulsi elettrici di voltaggio pari a 1.5 V, regolando l'elettroporatore (Gene Pulser Transfection Apparatus; BioRad) ad una capacitanza di 25 μF e a resistenza infinita. Le cellule sono state quindi risospese in terreno DMEM completo e trasferite in fiasche da 25 cm^2 (Falcon).
- **Trasfezione con Calcio Fosfato:** le cellule 293T sono state seminate alla densità di 4.5×10^6 , in fiasche da 75 cm^2 di superficie (Falcon), in 11 ml di terreno DMEM completo, 24 ore prima della trasfezione. Il giorno successivo le cellule 293T sono state trasfettate con 15 μg del costrutto p $\Delta\text{env}1$ 3'HA Orf-A e p $\Delta\text{env}1$ 3'HA Orf-A. Per ogni campione è stata allestita una miscela, in un volume di 950 μl costituita dal DNA risospeso in TE 1/10 [diluizione 1:10 a partire da TE: Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8] (volume finale 450 μl) e CaCl_2 250 mM (50 μl), alla quale è stato successivamente aggiunto goccia a goccia del tampone HPB 2X pH 7.1 [NaCl 280 mM, HEPES 50 mM, pH 7.1, Na_2HPO_4 1.5 mM] (500 μl). In seguito ad un'incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente per permettere la formazione dei precipitati di DNA e fosfato di calcio, la sospensione è stata trasferita goccia a goccia sul mezzo di coltura delle cellule da trasfettare. Circa 16 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state sottoposte a 2 lavaggi con 8 ml di terreno DMEM completo ed infine sono stati aggiunti 12 ml di terreno DMEM completo.

- **Trasfezione con liposomi:** le cellule 293T ($1,2 \times 10^6$ cellule) e CrFK ($1,0 \times 10^6$ cellule) sono state seminate in fiasche da 25 cm^2 di superficie (Falcon), in 5 ml di terreno DMEM completo, 24 ore prima della trasfezione in modo da raggiungere una confluenza ottimale tra il 50 ed il 70%. Il giorno seguente le cellule sono state trasfettate con opportuni costrutti, a seconda del tipo di esperimento, utilizzando 20 μl di Lipofectamina (Life Technologies, INVITROGEN) secondo le indicazioni fornite dalla ditta. In dettaglio, per ogni campione sono state allestite due miscele, in un volume finale di 500 μl di DMEM privo di siero, dove sono stati risospesi in una il DNA ed in un'altra i liposomi. Successivamente, la sospensione di DNA è stata aggiunta goccia a goccia alla miscela di liposomi. Dopo un'incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente per permettere la formazione dei complessi DNA- liposomi, la sospensione è stata trasferita goccia a goccia sul mezzo di coltura delle cellule. Dopo 6 ore dall'aggiunta della miscela alle cellule, si è proceduto con 2 lavaggi delle stesse con 3 ml di DMEM con siero ed infine sono stati aggiunti 5 ml di terreno con siero. La raccolta dei campioni cellulari è stata effettuata 24 oppure 48 ore dopo la trasfezione a seconda della linea cellulare.

5.2.11 Trattamento con Nocodazolo

Il Nocodazolo è un inibitore del fuso mitotico e pertanto impedisce alle cellule di dividersi, bloccandole nella fase G2/M del ciclo cellulare. È stato impiegato in questo progetto sperimentale come controllo del blocco del ciclo cellulare in fase G2/M. Il giorno precedente alla stimolazione, sono state seminate $1,2 \times 10^6$ cellule per la linea 293T oppure $1,0 \times 10^6$ nel caso di cellule CrFK. Dopo 36 ore le cellule sono state stimulate con Nocodazolo alla concentrazione di 100ng/ml nel caso delle cellule umane e 300 ng/ml invece nel caso delle cellule feline. La stimolazione è avvenuta per 16 ore a 37°C al termine dei quali le cellule sono state raccolte e processate per la lisi cellulare oppure per essere acquisite al citofluorimetro dopo marcatura con ioduro di propidio (Sigma-Aldrich).

5.2.12 Sistema di espressione basato sul Virus della Foresta del Semliki: trascrizione *in vitro* e trasfezione

I plasmidi pSFV4.2 e pSFV4.2 3'HA Orf-A linearizzati per digestione enzimatica mediante l'enzima *NruI* (si veda paragrafo 5.2.4), sono stati trascritti *in vitro* mediante l'utilizzo dell'RNA polimerasi del fago SP6, sfruttando la presenza del promotore corrispondente nel plasmide pSFV4.2. La reazione è stata condotta in un volume finale di 50 µl: 2.5 µg di plasmide linearizzato sono stati incubati nel tampone di trascrizione (Tris- HCl 40 mM pH 7.5, MgCl₂ 6 mM, spermidina 2 mM; Roche) in presenza di DTT 8 mM (Promega), ATP 1 mM, CTP 1 mM, UTP 1 mM, GTP 0.5 mM (Amersham), CAP 1 mM (Promega), 60 U di RNAsin (inibitore dell'RNasi; Promega) e 100 U di SP6 RNA polimerasi (Roche). Il raggiungimento del volume finale è stato ottenuto con acqua bidistillata trattata con dietilpirocarbonato (DEPC). Dopo una incubazione a 37°C per 90 minuti, i trascritti sono stati controllati mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1% (p/v), utilizzando il marcatore di peso molecolare Marker II (Roche), e impiegati in esperimenti di trasfezione mediante elettroporazione (si veda paragrafo 5.2.10). Nel caso in cui l'mRNA trascritto *in vitro* dovesse essere impiegato per effettuare esperimenti di trasfezione mediante lipofezione, si è proceduto al trattamento con 30 U di DNAsi RNAsi *free* (Roche) nel rispettivo tampone contenente MgCl₂ 7 mM a 37 °C per circa 45 minuti, al fine di eliminare i residui di DNA plasmidico stampo presente nei trascritti. Per purificare l'mRNA dai componenti della reazione enzimatica, sono state utilizzate colonne cromatografiche ad esclusione molecolare costituite da una matrice di Sephadex G- 50 con un limite di esclusione inferiore a 72µm (Quick Spin Columns G-50 Sephadex; Roche). La colonna, equilibrata a temperatura ambiente, è stata sottoposta a centrifugazione a 2500 rpm per 2 minuti per eliminare il tampone in cui è conservato il Sephadex. Successivamente la reazione di trascrizione è stata applicata alla colonna e, dopo centrifugazione a 2500 rpm per 4 minuti, è stato ottenuto l'mRNA purificato.

5.2.13 Produzione delle particelle virali SFV e trasduzione delle cellule 293T

E' stato dimostrato in letteratura che le cellule BHK-21 rappresentano il sistema cellulare di elezione per la produzione di particelle ricombinanti SFV (Liljeström *and* Garoff, 1992). Pertanto le particelle virali chimeriche SFV- 3'HA Orf-A costituite dal punto di vista strutturale da proteine di SFV e contenenti il genoma chimerico SFV-3'HA Orf-A sono state prodotte mediante co- elettroporazione di cellule BHK-21 (si veda paragrafo 5.2.10), con gli mRNA corrispondenti a ciascun replicone SFV- 3'HA Orf-A e gli mRNA delle due componenti helper (SFV-Helper C, SFV-Helper S). I virioni rilasciati nel sovrinatante della coltura cellulare sono stati raccolti 24 ore dopo la co-elettroporazione e sottoposti a centrifugazione a 1200 rpm a 4 °C per 10 minuti allo scopo di sedimentare i residui cellulari presenti. Il sovrinatante è stato quindi filtrato (0.45 µm; Millipore) per essere poi aliquotato e conservato a -20 °C.

Il giorno precedente l'infezione, le cellule 293T sono state piastrate alla concentrazione di 1.2×10^6 in fiasche da 25 cm². Il giorno successivo alla semina, le cellule sono state messe a contatto con le particelle virali chimeriche SFV- 3' HA Orf-A. Il volume di infezione addizionato alle cellule è stato di 0.5 ml. Dopo una incubazione di 4 ore, la sospensione virale è stata rimossa le cellule sono state lavate 3 volte con PBS 1X e sono stati aggiunti 5 ml di DMEM con siero. Dopo 24 ore dalla trasduzione le cellule sono state raccolte e processate per essere analizzate al citofluorimetro in seguito allo staining con anticorpi diretti contro la proteina Orf-A e marcati poi con ioduro di propidio per valutare il ciclo cellulare (si veda paragrafo 5.2.17).

5.2.14 Produzione di *Virus Like Particles* (VLP)

La poliproteina Gag di FIV (Pr50Gag) ha la capacità di assemblarsi in *Virus Like Particles* (VLP) non infettive poiché prive di *envelope*, ma morfologicamente simili ai virioni FIV maturi. Nel presente lavoro di tesi, l'ottenimento di questo tipo di particelle simil- virali è stato possibile trasfettando cellule della linea 293T mediante la tecnica del calcio fosfato con i costrutti pΔLTR Δenv1 3' HA Orf-A o pΔLTR

Δenv1 5' Stop 3' HA Orf-A. La raccolta del mezzo di coltura, a livello del quale sono presenti le VLP, è stata effettuata 36 ore dopo la trasfezione. Il terreno è stato raccolto in tubi da centrifuga (Falcon) da 50 ml e sottoposto a centrifugazione a 1200 rpm a 4°C per 10 minuti, per sedimentare i detriti cellulari presenti nel terreno. Il sovrinatante è stato successivamente filtrato (0.45 µm, Millipore) e conservato alla temperatura di -20°C.

5.2.15 Purificazione delle VLP mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio (*Virion Pelleting*)

Le VLP ottenute, come descritto al paragrafo 5.2.14, sono state purificate mediante centrifugazione su cuscino di saccarosio. In particolare l'intero volume del sovrinatante è stato stratificato su 6 ml di una soluzione di saccarosio al 20% (p/v) in tubi da centrifuga (*Polyallomer Centrifuge Tubes* 14 x 95 mm, Beckman) e sottoposto a successiva centrifugazione a 27000 rpm a 4°C per 2 ore. Dopo eliminazione, mediante aspirazione, del terreno e dello strato di saccarosio, il sedimento virale è stato risospeso in 100 µl di RIPA 1X [NaCl 150 mM, IGEPAL CA-630 1% (v/v) (Sigma), Acido deossicolico 0.5% (p/v), SDS 1% (p/v) (Bio- Rad), Tris-HCl 50 mM, pH 8.0] sottoposto a SDS-PAGE, come descritto al paragrafo 5.2.15

5.2.16 Preparazione dei lisati cellulari

Le cellule trasfettate sono state staccate dal piatto di coltura con tripsina e lavate per 3 volte con tampone fosfato (PBS) [NaCl 137 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄KCl 2.7 mM, pH 7.4] freddo, mediante centrifugazione a 1200 rpm 4°C per 6 minuti. Successivamente le cellule sono state lisate utilizzando la soluzione di lisi [RIPA 1X con l'aggiunta di una miscela di inibitori delle proteasi, *Complete* (Estratto di pancreas, Pronasi, Termolisina, Chimotripsina, Tripsina, Papaina) (Roche/Boehringer)] ed incubate in ghiaccio per 30 minuti. In questo modo si favorisce la lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine, bloccando l'attività delle proteasi intracellulari che, una volta rilasciate, potrebbero degradare le proteine

di interesse. I campioni sono stati successivamente centrifugati a 13000 rpm 4°C per 30 minuti per separare le proteine in soluzione dai detriti cellulari. Il sovranatante ottenuto è stato sottoposto a corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) (si veda paragrafo 5.15).

5.2.17 Immunoprecipitazione

La tecnica dell'immunoprecipitazione è stata utilizzata per purificare da lisati di cellule la proteina oggetto d'analisi, arricchendone la concentrazione. Tale tecnica sfrutta il riconoscimento specifico tra un anticorpo, coniugato ad una matrice solida di sefarosio (*Protein G Sepharose™ 4 Fast Flow*, GE Healthcare), e il corrispondente epitopo antigenico fuso alla proteina da immunoprecipitare. Al fine di garantire la formazione del complesso biglia-anticorpo, 50 µl di biglie per campione di cellule trasfettate sono state lavate col tampone di lisi (RIPA 1X) ed incubate a temperatura ambiente per tre ore in agitazione con 0.4 µg/ml dell'anticorpo specifico per l'epitopo fuso alla proteina di interesse (HA). Successivamente, i complessi biglia- anticorpo sono stati nuovamente lavati nel tampone di lisi per eliminare l'anticorpo in eccesso e, quindi, incubati in agitazione con i lisati cellulari per 16 ore a 4°C. Generalmente 30 µl di lisati cellulari sono stati conservati per verificare l'espressione della proteina d'interesse. Al termine di questa seconda incubazione i complessi definitivi biglia- anticorpo- proteina sono stati ulteriormente lavati col tampone di lisi e risospesi in 40 µl del tampone di caricamento *Loading Buffer* (LB) [Tris-HCl 100 mM, pH 6.8, SDS 4% (p/v), Glicerolo 20% (p/v), Blu di bromo fenolo 0.2% (p/v), DTT 200 mM, -mercaptoetanolo 5%]. I campioni così ottenuti sono stati bolliti per 10 minuti per separare i complessi formati, sottoposti a SDS- PAGE (paragrafo 5.2.18) ed analizzati mediante Immunoblot (paragrafo 5.2.19).

5.2.18 Elettroforesi di proteine (SDS-PAGE)

I lisati cellulari (si veda paragrafo 5.2.16), le VLP (si veda paragrafo 5.2.14) ed i campioni sottoposti ad immunoprecipitazione (si veda paragrafo 5.2.17), sono state separate ed analizzate, mediante corsa elettroforetica, in gel di poliacrilammide e

successivo Western Blotting. I campioni sono stati diluiti nel tampone di caricamento LB 2X e, prima di essere caricati in gel, sono stati incubati a 100°C per 5 minuti. Per verificare la corretta dimensione delle proteine di interesse sono stati impiegati opportuni marcatori di peso molecolare, *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas) proteine 170/130/95/72/55/43/34/26/17 kDa. Le proteine sono state analizzate in gel di poliacrilammide delle dimensioni di 200 x 200 mm e dello spessore di 1 mm o minigel dello spessore di 1.5 mm preparati come da ricetta:

- Gel di concentrazione al 4.5% (p/v) di acrilammide costituito da 4 ml di Tris-HCl 0.5 M, pH 6.8, 2.4 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v) (Bio-Rad), 160 µl di SDS 10% (p/v) (Bio-Rad), 20 µl di N,N,N,N',N'-tetrametiletilenediammina, TEMED (Bio-Rad) e 80 µl di ammonio persolfato, APS 10% (p/v) (Bio-Rad) e portato al volume finale di 16.06 ml con acqua deionizzata;
- Gel di separazione al 10% (p/v) di acrilammide costituito da 12.5 ml di Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 16.6 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v) (Bio-Rad), 500 µl di SDS 10% (p/v) (Bio-Rad), 40 µl di TEMED (Bio-Rad) e 200 µl di APS 10% (p/v) (Bio-Rad) e portato al volume finale di 50 ml con acqua deionizzata.
- Gel di separazione al 12% (p/v) di acrilammide costituito da 12.5 ml di Tris-HCl 1.5 M, pH 8.8, 20.0 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v) (Bio-Rad), 500 µl di SDS 10% (p/v) (Bio-Rad), 40 µl di TEMED (Bio-Rad) e 200 µl di APS 10% (p/v) (Bio-Rad) e portato al volume finale di 50 ml con acqua deionizzata.

La migrazione elettroforetica è stata effettuata con un'intensità di corrente costante (80 V, per un tempo di 16 ore circa o 90 V per circa 2 ore e 30 minuti nel caso dei minigel) in presenza di un tampone di corsa costituito da: Tris 0.25 M (Bio-Rad), Glicina 1.9 M (Bio-Rad), SDS 0.1% (p/v) (Bio-Rad), pH 9.2.

5.2.19 Western Blotting e sviluppo

Le proteine separate in gel di poliacrilammide, come descritto al paragrafo 5.2.16, sono state trasferite elettricamente su una membrana di nitrocellulosa (*PROTRAN® pure nitrocellulose transfer and immobilization membrane*, Whatman - PerkinElmer), utilizzando l'apparato per il trasferimento *Trans-Blot Cell* (Bio- Rad). Prima del trasferimento, la membrana ed il gel sono stati equilibrati per 15 minuti nell'appropriato tampone di trasferimento [Tris 0,25 M (Bio-Rad), glicina 1.9 M (Bio-Rad), metanolo 20% (v/v)]. Il trasferimento è stato condotto per 2 ore a temperatura ambiente, al voltaggio costante di 50 V. Successivamente, allo scopo di saturare i siti di legame aspecifici, la membrana è stata incubata per un tempo minimo di 45 minuti in agitazione con una soluzione bloccante [latte scremato in polvere al 5% (p/v) (Bio-Rad) in tampone fosfato PBS + 0.1% (v/v) Tween 20 (Sigma) oppure Albumina di siero bovino (BSA) in polvere al 5% (p/v) (Sigma) in tampone fosfato 0,1% (v/v) Tween 20]. In seguito la membrana è stata immersa in una soluzione contenente l'anticorpo primario specifico per le proteine oggetto di analisi ed incubata a 4°C per 16 ore circa in agitazione. Di seguito è riportata la Tabella 5.2 che riassume gli anticorpi impiegati e le loro modalità di utilizzo:

Nome Anticorpo	Diluizione di utilizzo	Soluzione Saturante
Monolconale di topo anti- p24- Gag (FIV) (AbD Serotec)	1:1000	Latte scremato 1% (p/v)
Monolconale di topo anti- HA (FIV) (Covance)	1:1000	Albumina di siero bovino 1% (p/v)
Monoclonale di topo anti- Ciclina B1 (Abcam)	1:2000	Latte scremato 1% (p/v)
Monoclonale di topo anti- Tubulina (Sigma- Aldirch)	1:5000	Latte scremato 1% (p/v)

Tabella 5.2.1: anticorpi primari utilizzati e loro principali caratteristiche.

Dopo trattamento con l'anticorpo primario, la membrana è stata sottoposta a 3 lavaggi per 10 minuti in PBS addizionato dello 0.1% (v/v) di Tween 20, e quindi incubata per 1 ora con l'anticorpo secondario, immunoglobuline di pecora anti- topo coniugate all'enzima perossidasi di rafano (HRP, *horseradish peroxidase*, GE), diluito 1:2000 in latte scremato in polvere allo 0.5% (p/v) nel caso in cui l'anticorpo primario fosse anti- p24 (Gag) di FIV, al 1% (p/v) per gli anticorpi primari anti- Ciclina B1 ed anti- Tubulina in tampone fosfato PBS + 0.1% (v/v) Tween 20; mentre per ciò che concerne l'anticorpo anti- HA BSA in polvere allo 1% (p/v). Dopo 3 ulteriori lavaggi in presenza di PBS 1X e Tween 20, la membrana è stata lavata per un'ultima volta con in PBS 1X. Successivamente si è proceduto ad un'incubazione per 1 minuto con una soluzione contenente il substrato per la reazione chemiluminescente della perossidasi (*ECL Detection system*, GE) con cui sono state impressionate le lastre fotografiche (*Biomax light film*, Kodak) sovrapponendole alla membrana. Le lastre sono state esposte alla membrana per un tempo variabile tra 30 secondi e 30 minuti e successivamente sviluppate.

5.2.20 Tecniche citofluorimetriche: marcatura intracitoplasmatica ed analisi del ciclo cellulare

Al fine di valutare l'espressione di proteine virali (Orf- A e p24 di FIV) e non (GFP), e per valutare la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare è stato eseguito un saggio di marcatura intracitoplasmatica ed analisi citofluorimetrica. Le cellule 293T e CrFK sono state piastrate ($1,2 \times 10^6$ e $1,0 \times 10^6$ rispettivamente) e trasfettate dopo 24 ore con la tecnica dei liposomi (si veda paragrafo 5.2.10). Dopo 24 o 48 ore dalla trasfezione, a seconda della linea cellulare, le cellule sono state raccolte dal piatto di coltura con tripsina e lavate per 2 volte con PBS 1X freddo, mediante centrifugazione a 1800 rpm 4°C per 5 minuti. Per valutare l'espressione della GFP i campioni sono stati acquisiti al FACs Calibur in scala logaritmica ed analizzate con il software CellQuest (BD). Per valutare invece l'espressione delle proteine virali, i campioni sono stati fissati con Paraformaldehyde al 2% a 4°C per 30 minuti, lavati con PBS 1X freddo a 1800 rpm 4°C per 5 minuti e permeabilizzati con

soluzione Netgel (Lunati *et al.*, 2002) [NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NP40 0,05 %, NaN₃ 0,02 %, Tris- HCl 50 mM pH7,4, λ- caragean 0,25 %] a 4°C per 20 minuti. Al termine le cellule sono state sottoposte a due lavaggi e successivamente marcate con anticorpi specifici (vedi tabella 5.2.2) per 20 minuti a temperatura ambiente.

Nome Anticorpo	Diluizione di utilizzo
Monoclonale di topo anti- p24- Gag (FIV) (AbD Serotec)	1:250
Policlonale di capra α-IgG di topo coniugato direttamente a fluoroforo FITC (Santa Cruz Biotechnology)	1:500
Monoclonale di topo anti- HA coniugato direttamente a fluoroforo FITC (Miltenyi Biotec)	1:10
Monoclonale di topo anti- IgG (FIV) coniugato direttamente a fluoroforo FITC (Miltenyi Biotec)	1:10

Tabella 5.2.2: Anticorpi primari utilizzati e loro principali caratteristiche.

Al termine dell'incubazione i campioni sono stati opportunamente lavati in PBS 1X freddo ed acquisiti al FACs LsRII mediante il software DIVA. Per lo studio del ciclo cellulare è stata condotta la marcatura del nucleo con lo Ioduro di Propidio. Quindi sono stati aggiunti ai campioni precedentemente marcati con gli anticorpi fluorescenti una miscela contenente RNasi 1mg/ml, PI 50µg/ml e buffer citrato ed incubato per 30 minuti a 37°C. Successivamente, i campioni sono stati acquisiti al FACs LsR II (BD) con il software DIVA. La fluorescenza è stata registrata su scala logaritmica ed è stata valutata l'espressione di ciascuna proteina mediante il software FLOWJo. Invece, il contenuto di DNA è stato registrato su scala lineare ed è stata calcolata la percentuale di elementi nelle diverse fasi del ciclo cellulare (G1; S; G2) mediante il software FlowJo.

5.2.21 Immunofluorescenza indiretta

Il giorno precedente la trasfezione, sono state seminate 2×10^5 cellule 293T su una piastra da sei pozzetti (Costar) sul cui fondo sono stati depositi vetrini portaoggetti sterili, in DMEM con 10% (v/v) di FBS in un volume finale 2 ml. Tali vetrini sono stati pretrattati con una soluzione di Poli-Lisina (0.1 mg/ml, Sigma) per favorire l'adesione delle cellule. Trascorse 24 ore, quando le cellule presentavano una confluenza del 50- 80%, si è proceduto alla trasfezione. Dopo 24 ore i vetrini sono stati lavati con PBS 1X e le cellule sono state fissate in una soluzione di paraformaldeide al 2% per 30 minuti a 4°C. Successivamente i vetrini sono stati opportunamente lavati e le cellule permeabilizzate con una soluzione di Triton X 100 0,1% per 30 minuti a 4°C. Dopo ulteriori lavaggi con PBS 1X, si è proceduto alla marcatura con anticorpi primari diluiti in PBS 1X per 2 ore in una cameretta umidificata a 37°C. Dopo 3 lavaggi in PBS 1X, i vetrini sono stati incubati al buio con l'anticorpo secondario diluito in PBS 1X per 1 ora, in cameretta umidificata a 37°C. Infine, i vetrini sono stati lavati in PBS 1X e prima di essere montati sui vetrini porta oggetto le cellule sono state marcate con l'agente intercalante DRAQ5 (Cell Signaling Technology) per 15 minuti a temperatura ambiente. Infine, i vetrini sono stati lavati prima in PBS 1X e poi in acqua, coperti con una goccia di soluzione di montaggio [glicerolo 90% (v/v) in PBS, N- propilgallato 0.2% (p/v)] (Vectashield H-1000, Vector Laboratories) ed analizzati al microscopio confocale con obiettivo 40X oppure 63X ad immersione (LEICA DM IRBE). Di seguito è riportata la tabella (tabella 5.2.3) che riassume gli anticorpi impiegati e le modalità di utilizzo:

Anticorpo primario	Diluizione	Anticorpo secondario coniugato a fluoroforo	Diluizione
Monoclonale di topo anti- p24- Gag (FIV) (AbD Serotec)	1: 100	Policlonale di capra α -IgG di topo FITC (Santa Cruz Biotechnology)	1: 250
Monoclonale di coniglio anti- HA (Santa Cruz Biotechnology)	1: 250	Policlonale di capra α -IgG di coniglio Alexa Fluor 468 (Life technologies- Invitrogen)	1:500
Monoclonale di topo anti- Ciclina B1 (Abcam)	1:50	Policlonale di capra α -IgG di topo FITC (Santa Cruz Biotechnology)	1:250
DRAQ5 (Cell Signaling Technology)	1:1000		

Tabella 5.2.3: anticorpi utilizzati e loro principali caratteristiche.

5.2.22 Produzione delle particelle virali

I virus sono stati preparati in cellule CrFK per trasfezione dei plasmidi p Δ 00 3'HA Orf-A e p Δ 00 Orf-A 2 Stop. Le cellule sono state piastrate $3,5 \times 10^6$ in piatti da 10 cm² (Falcon). Le cellule sono state trasfettate con 15 μ g di DNA con la tecnica del calcio fosfato. Dopo 6 ore dall'aggiunta della miscela alle cellule si è proceduto con i lavaggi in terreno di coltura DMEM con siero ed aggiunti 12 ml di terreno come volume finale. Ogni 24 ore per 8 giorni, il surnatante è stato raccolto, chiarificato dai detriti cellulari per centrifugazione a 1200 rpm 4°C per 8 minuti e filtrato con filtri da 0,45 μ m (Millipore). Due aliquote da 500 μ l ciascuna sono state impiegate per il

saggio RT (si veda paragrafo 5.2.23), mentre il restante campione è stato aliquotato in tubi a vite e conservato a -80°C.

5.2.23 Saggio della Retrotrascrittasi (*RT assay*)

L'attività DNA polimerasica/RNA dipendente dell'enzima trascrittasi inversa contenuto nei virioni è stata valutata in termini di incorporazione di ³H-dTTP, desossitimidina 5'-trifosfato marcata radioattivamente con atomi di trizio (3H), in uno stampo sintetico costituito da una sequenza omopolimerica di adenine (poly-A), fornendo come innesco per la reazione un oligonucleotide formato da timidine (oligo-dT). Due aliquote da 500 µl di ciascuna sospensione virale sono state centrifugate a 15000 rpm a 4°C per 2 ore. Il precipitato è stato risospeso in 10 µl di tampone di sospensione [Tris-HCl 50 mM pH 7.5, DTT (ditiotreitolo) 1 mM, glicerolo 20% (v/v), KCl 250 mM e Triton X-100 0.25% (v/v)]. Per la lisi i virioni sono stati sottoposti a tre cicli di gelo-scongelo e successivamente sono stati aggiunti 40 µl di miscela di reazione contenente: poli A 100 µg/ml, 2 µCi di ³H-dTTP (37 Ci/mmol), Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl₂ 7.5 mM, Triton X-100 0.05% (v/v) e DTT 5 mM e portato il tutto a volume con acqua bidistillata. La miscela è stata incubata per un'ora a 37°C, al termine della quale il prodotto di reazione è stato trasferito su filtri DE81 (Whatman). In seguito a 3 lavaggi da 10 minuti ognuno con il tampone SSC 2X [NaCl 3 M, sodio citrato 0.3 M, pH 7.2] ed uno con etanolo 96% (v/v) per 10 secondi, i filtri sono stati seccati ed analizzati al beta-counter (Rackbeta 1214 Wallac).

5.2.24 Infezione delle cellule feline CrFK

L'infezione delle cellule feline (CrFK) è stata effettuata con i virioni FIV considerando di 4 cpm per cellula. Brevemente, le cellule CrFK sono state seminate 1x10⁵ cellule CrFK su una piastra da sei pozzetti, dopo 24 ore sono state infettate con particelle con virioni esprimenti o meno la proteina Orf-A. Il virus è stato a contatto con le cellule per 2 ore a 37°C al termine delle quali sono stati effettuati 3 lavaggi con PBS 1X e successivamente aggiunti 2 ml di terreno con siero. L'infezione è stata

monitorata ogni 72 ore per 20 giorni mediante analisi del surnatante con saggio RT. Inoltre ad ogni *time point* anche le cellule sono state raccolte e lisate (si veda paragrafo 5.2.16) per essere analizzate mediante corsa elettroforetica su gel di poliacrilammide e Western Blot (si vedano paragrafo 5.2.18 e 19).

6. RISULTATI

6.1 Premessa

Con questo progetto di ricerca ci si è proposti di analizzare il ruolo biologico della proteina accessoria Orf-A del Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV). È noto, infatti, che le proteine accessorie dei *Lentivirus* giocano un ruolo chiave nella regolazione della replicazione virale. Il genoma di FIV è caratterizzato dalla presenza di due geni accessori, *vif* ed *orf-a*. Il primo è analogo al gene accessorio *vif* di HIV-1 e codifica un fattore di infettività virale rilevante nel contrastare i meccanismi di restrizione messi in atto dalle cellule target dell'infezione, è importante nel processo di maturazione delle particelle virali ed è necessario per una efficiente replicazione *in vivo* ed *in vitro* (Inoshima *et al.*, 1996; Lockridge *et al.*, 2000). Al contrario la funzione biologica della proteina Orf-A non è stata ancora chiarita. Inizialmente si riteneva che la proteina svolgesse una funzione analoga alla proteina Tat di HIV-1, come transattivatore dell'espressione genica presumibilmente attraverso un meccanismo di interazione indiretta con le LTR virali (de Perseval *and* Elder, 1999; Phillips *et al.*, 1992). Successivamente, altre evidenze suggerivano un coinvolgimento di Orf-A in diverse fasi del ciclo replicativo tra cui la formazione delle particelle virali e l'infettività (Gemeniano *et al.*, 2003). Inoltre la proteina accessoria sembrava essere coinvolta nella regolazione dello splicing degli mRNA così come nell'induzione dell'arresto del ciclo cellulare, suggerendo diverse similitudini con la proteina accessoria Vpr di HIV-1 (Gemeniano *et al.*, 2004; Sundstrom *et al.*, 2007). È noto infatti che quest'ultima svolge molteplici funzioni tra cui il trasporto nel nucleo del complesso di pre-integrazione di HIV-1, l'induzione dell'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M (Plannells *et al.*, 1996; Connor *et al.*, 1995).

Alla base di quanto riportato in letteratura e avvalendoci di diversi sistemi di espressione abbiamo chiarito il potenziale ruolo di Orf-A: nell'arresto del ciclo cellulare in fase G2/M; nella localizzazione cellulare e co-localizzazione con la proteina Ciclina B1, importante per la transizione dalla fase G2-M ed infine

nell'incorporazione nelle particelle virali. In particolare, sono stati impiegati plasmidi di espressione codificanti la proteina Orf-A sotto il controllo trascrizionale del promotore del Citomegalovirus Umano e sotto il controllo della replicasi del Virus della Foresta del Semliki. Successivamente sono stati ottenuti plasmidi provirali per validare il sistema di espressione e studiarne gli effetti biologici dovuti alla presenza o meno della proteina Orf-A. Gli esperimenti sono stati condotti su due linee cellulari ed in particolare su cellule CrFK e cellule 293T. Le prime infatti, fibroblasti della porzione corticale di gatto, derivano dall'ospite fisiologico di FIV e quindi rappresentano le cellule d'elezione per lo studio di questo virus. Le seconde, cellule embrionali di rene umano, sono state scelte in quanto vengono normalmente utilizzate per lo studio di HIV-1 e per la produzione dei vettori *lentivirali*.

6.2 Analisi dell'espressione della proteina Orf-A e del ciclo cellulare in cellule umane (293T) con il sistema di espressione guidato dal promotore del Citomegalovirus umano (hCMV)

È noto che la proteina Orf-A è espressa a bassi livelli nella cellula durante tutto il ciclo replicativo (Pistello *et al.*, 2008) e questo è stato attribuito ad un rapido turnover oppure ad un'instabilità del trascritto (Chatterji *et al.*, 2002). Allo scopo di valutare il ruolo della proteina Orf-A nella progressione del ciclo cellulare è stato dapprima testato il sistema di espressione utilizzando i plasmidi pcDNA 3.1 5' HA Orf-A e pcDNA 3.1 3' HA Orf-A. In questo contesto, l'espressione della proteina Orf-A è guidata dal promotore del Citomegalovirus Umano (hCMV); inoltre, la proteina è stata fusa all'epitopo dell'emagglutinina (HA) all'estremità ammino o carbossi-terminale, pcDNA 3.1 5'HA Orf-A e pcDNA 3.1 3'HA Orf-A rispettivamente, in quanto non è disponibile in commercio un anticorpo diretto specificamente contro di essa.

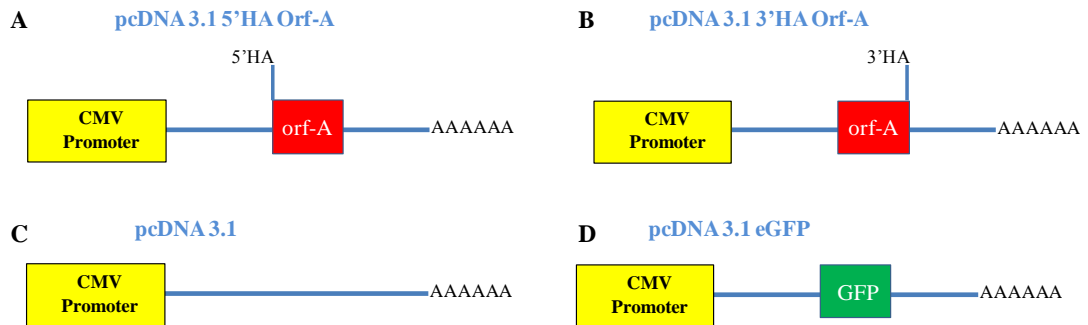


Figura 6.1: rappresentazione schematica dei costrutti impiegati. Il gene Orf-A deriva dal genoma del ceppo virale FIV Petaluma, l'espressione è guidata dal promotore CMV Umano; il gene è stato fuso con il tag HA al 5' (pannello A, pcDNA3.1 5'HA Orf-A) ed al 3' (pannello B, pcDNA3.1 3'HA Orf-A). Nel pannello C e D sono schematizzati il vettore che non esprime alcun transgene e quello che invece esprime la GFP, rispettivamente.

I plasmidi sono stati trasfettati nelle cellule 293T e i campioni processati dopo 24 ore. I controlli dell'esperimento sono rappresentati da cellule trasfettate con il plasmide pcDNA3.1 (controllo negativo) e dello stesso esprime il transgene eGFP (controllo positivo). I campioni proteici ottenuti, lisati cellulari ed immunoprecipitati, sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica e Western Blot. Invece, le cellule trasfettate e quelle di controllo (C-) sono state processate ed analizzate al citofluorimetro. Come è possibile osservare dalla figura 6.2 (pannello A), la proteina Orf-A non è presente nei lisati cellulari ma solo dopo immunoprecipitazione (pannello B), sebbene l'espressione della eGFP sia del 90% (pannello C). Inoltre, non è stato possibile rilevare la proteina Orf-A neppure dopo immunoprecipitazione con il plasmide pcDNA 3.1 5' HA Orf-A (figura 6.2, pannello A e B, corsia 3) probabilmente a causa di un'instabilità del plasmide. Per questo motivo gli esperimenti successivi sono stati condotti impiegando plasmidi esprimenti la proteina Orf-A fusi con il *tag* nella porzione carbossi-terminale.

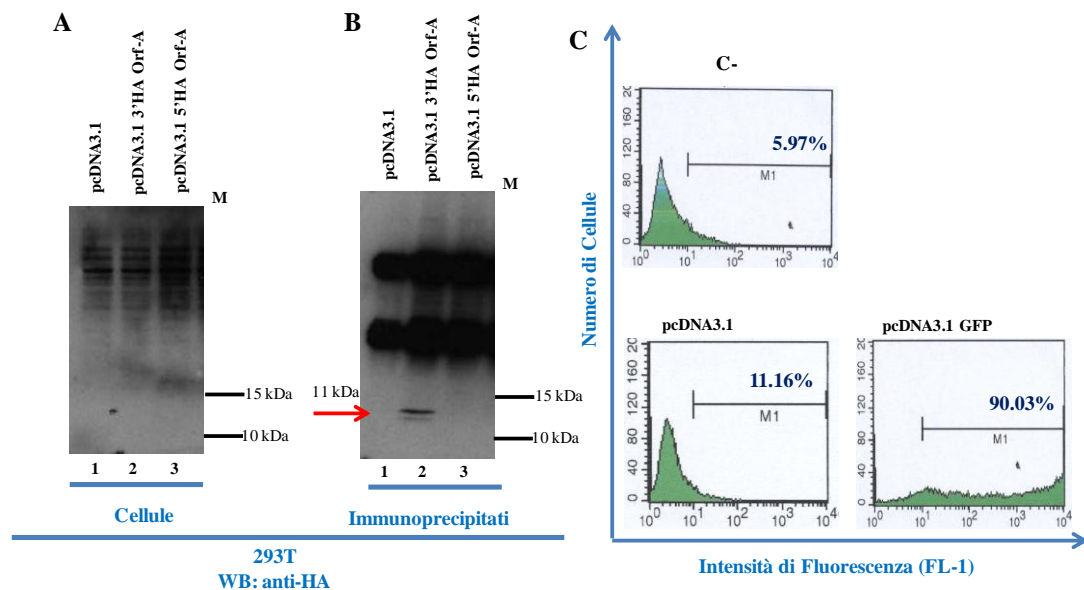


Figura 6.2: analisi dell'espressione della proteina Orf-A guidato dal promotore hCMV. **A)** Western Blotting dei lisati cellulari **B)** e degli immunoprecipitati derivati da cellule 293T trasfettate con i plasmidi: pcDNA3.1 (corsia 1), pcDNA3.1 3'HA Orf-A (corsia 2), pcDNA3.1 5'HA Orf-A (corsia 3). **M:** Marker di peso molecolare proteine 170/130/70/55/40/35/25/15/10 kDa. **Anticorpo anti-HA.** **C)** analisi citofluorimetrica dell'espressione della GFP in cellule 293T trasfettate (plasmidi pcDNA3.1 e pcDNA3.1 GFP) e non (C-), acquisizione ed analisi condotte in scala logaritmica con il software CellQuest (BD).

Il risultato ottenuto dall'analisi del Western Blot sui lisati proteici e sugli immunoprecipitati è in linea con quanto riportato in letteratura (Chattareji *et al.*, 2002; Gemeniano *et al.*, 2004), ovvero la proteina Orf-A è espressa a bassi livelli. In seguito, è stata valutata l'espressione della proteina Orf-A al FACs e sugli stessi campioni è stato valutato una eventuale alterazione nella progressione del ciclo cellulare. A tal fine, sono state trasfettate le cellule 293T con i plasmidi pcDNA 3.1 3'HA Orf-A e pcDNA3.1. Dopo 24 ore dalla trasfezione, i campioni sono stati raccolti e processati per essere acquisiti al FACs LSRII (BD). Inizialmente, i campioni sono stati marcati con l'anticorpo anti-HA direttamente coniugato al fluoroforo FITC (emissione di fluorescenza nel canale del verde a 520- 530 nm) ed il suo isotipo di controllo, IgG-FITC. Come mostrato dalla figura 6.3 (pannello A), l'espressione della proteina Orf-A è molto bassa e non distinguibile da quella del

plasmide di controllo. Inoltre analizzando la progressione del ciclo cellulare, in seguito a marcatura con Ioduro di Propidio, (agente intercalante del DNA, emissione di fluorescenza nel rosso a 610 nm), non è rilevabile alcuna modificazione sulla distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare (figura 6.3, pannello B).

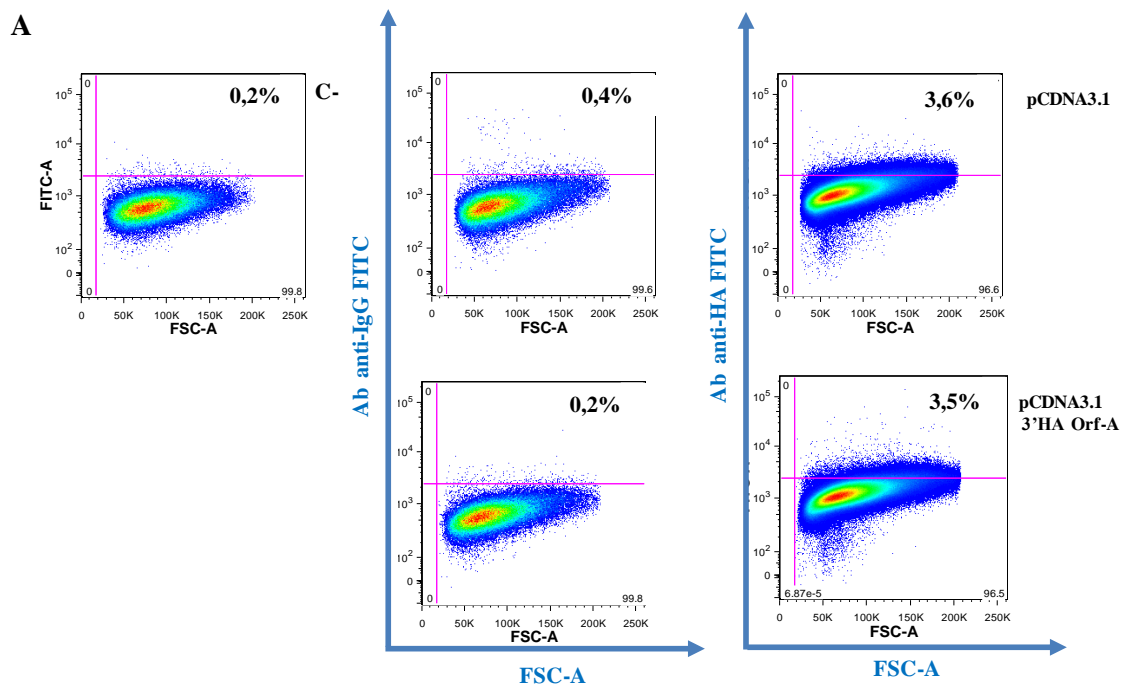


Figura 6.3: analisi citofluorimetrica dell'espressione della proteina Orf-A guidato dal promotore CMV ed analisi del ciclo cellulare. **A)** Le cellule 293T sono state trasfettate con i plasmidi pcDNA 3.1 pcDNA 3.1 3'HA Orf-A, dopo 24 ore sono state raccolte e processate per essere acquisite al FACS LSR II (BD). Le cellule trasfettate con i plasmidi prima indicati sono state colorate con anticorpo anti-HA direttamente coniugati a fluoroforo FITC (Milteny Biotec) oppure con l'isotipo di controllo IgG-FITC (Milteny Biotec). La fluorescenza emessa è stata valutata su scala logaritmica con il software Diva (BD) e successivamente analizzata con il software FlowJO.

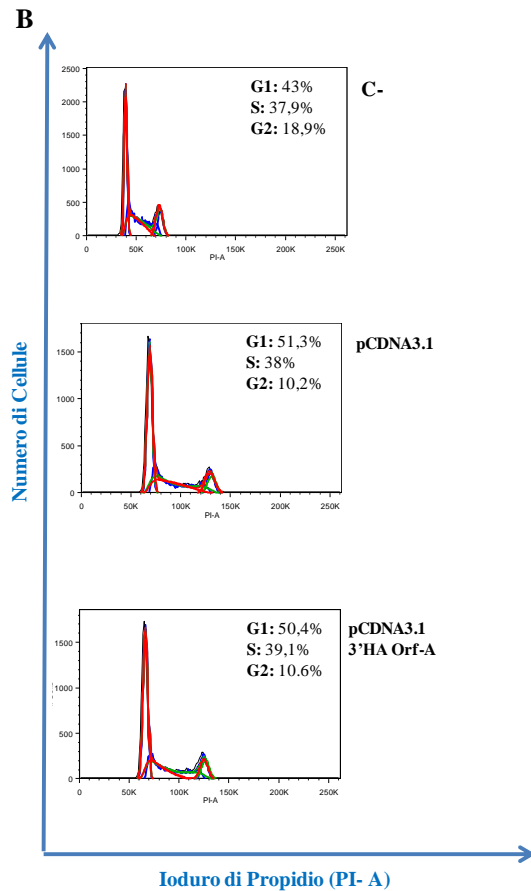


Figura 6.3: B) Le cellule 293T trasfettate e di controllo (C-) sono state marcate con Ioduro di Propidio (1 mg/ml) ed in seguito ad un incubazione di 30 minuti a 37°C sono state acquisite al FACs LSRII (BD) in scala lineare con il software DIVA (BD) e successivamente analizzate con il software FlowJO.

Dai risultati ottenuti con il sistema di espressione della proteina Orf-A guidato dal promotore hCMV è stato possibile rilevare la proteina in Western blotting solo dopo immunoprecipitazione. Prima di escludere un eventuale coinvolgimento della proteina Orf-A nella progressione del ciclo cellulare è stato utilizzato un altro sistema di espressione guidato dalla replicasi del Virus della Foresta del Semliki (SFV). Proprio per la biologia dell'Alphavirus, il sistema garantisce elevati livelli di espressione del transgene.

6.3 Valutazione dell'espressione della proteina Orf-A impiegando il vettore basato sul Virus della Foresta del Semliki (SFV) in cellule 293T

Il vettore basato sul Virus della Foresta del Semliki (SFV) è un sistema di espressione di proteine ad alta efficienza. SFV viene largamente impiegato come vettore di espressione e di trasferimento genico grazie alla sua organizzazione genomica e alla sua strategia replicativa (Lundstrom *et al.*, 2001).

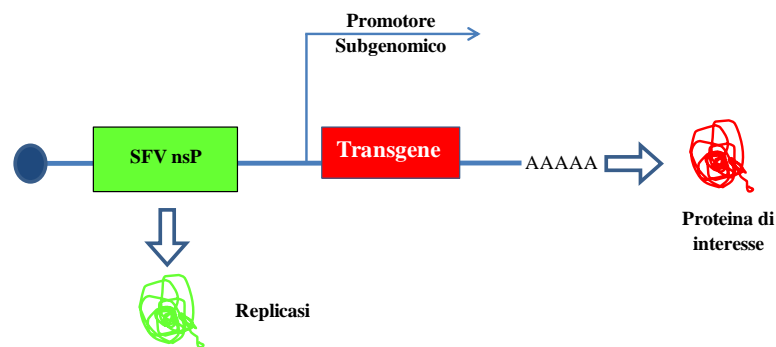


Figura 6.4: rappresentazione schematica di un sistema di espressione basato su SFV.

In particolare, le caratteristiche che rendono SFV un interessante ed efficiente strumento per lo sviluppo di un sistema di espressione genica sono:

- 1) l'RNA genomico a polarità positiva, in grado di agire direttamente da RNA messaggero. Infatti una volta presente nelle cellule induce subito un'infezione produttiva;
- 2) il complesso della replicasi, che permette una efficiente replicazione dell'RNA. In una singola cellula, poche ore dopo l'infezione, vengono prodotte più di 200.000 copie di RNA a polarità positiva (Liljeström & Garoff, 1992);
- 3) la possibilità di ottenere produzioni virali ad alto titolo, conseguenza dell'attiva replicazione dell'RNA virale ad opera della replicasi;
- 4) l'elevata efficienza di traduzione dell'RNA subgenomico, che dipende dalla sua struttura secondaria. E' stata infatti dimostrata la presenza di una particolare struttura a forcina all'estremità 5' dei messengeri subgenomici che

funziona da *enhancer* traduzionale perché è riconosciuta con grande affinità dalle proteine *CAP binding* e ha la capacità di competere con gli RNA messaggeri cellulari per il legame ai ribosomi (Lundstrom, 1997; Sjöberg *et al.*, 1994). Di conseguenza, tutti i ribosomi della cellula infettata sono reclutati per la sintesi delle proteine virali che prevale su quella delle proteine dell'ospite (Liljeström and Garoff, 1991). In questo modo, è presente un periodo di tempo dalle 4 alle 24 ore dopo l'infezione durante il quale il virus sfrutta l'elevato livello di espressione delle proprie proteine strutturali per la produzione massiva di progenie virale;

- 5) la replicazione esclusivamente citoplasmatica, che permette di superare i problemi di riduzione dell'espressione genica legati alla disponibilità di fattori di trascrizione nucleari, ai fenomeni di splicing e di trasporto dei trascritti dal nucleo al citoplasma;
- 6) le dimensioni relativamente ridotte del genoma, che ne permettono una facile manipolazione *in vitro* (Smerdou & Liljeström, 1999).

Il sistema di espressione basato su SFV è stato sfruttato principalmente per l'espressione ad alti livelli in cellule eucariotiche di proteine ricombinanti nucleari, citoplasmatiche, di membrana e proteine secrete (Liljeström and Garoff, 1991; Lundstrom, 1997; Wahlfors *et al.*, 2000). Il sistema di espressione maggiormente utilizzato prevede il mantenimento dell'intera regione non strutturale nel vettore e la sostituzione della regione genica codificante le proteine strutturali di SFV con la sequenza del transgene, che viene così a trovarsi sotto il controllo trascrizionale del promotore subgenomico (Liljeström and Garoff, 1991) (figura 6.5). Questo costrutto di espressione, chiamato replicone, è competente per la replicazione, ma data l'assenza delle proteine strutturali non è in grado di formare una particella virale, quindi di propagarsi da una cellula all'altra e pertanto viene definito vettore suicida (Lundstrom, 1997). Inoltre il vettore di espressione basato su SFV è stato in seguito ottimizzato includendo nel replicone la sequenza che funziona da *enhancer* traduzionale, presente a valle del promotore subgenomico, per ottenere livelli ancora più elevati di espressione del transgene.

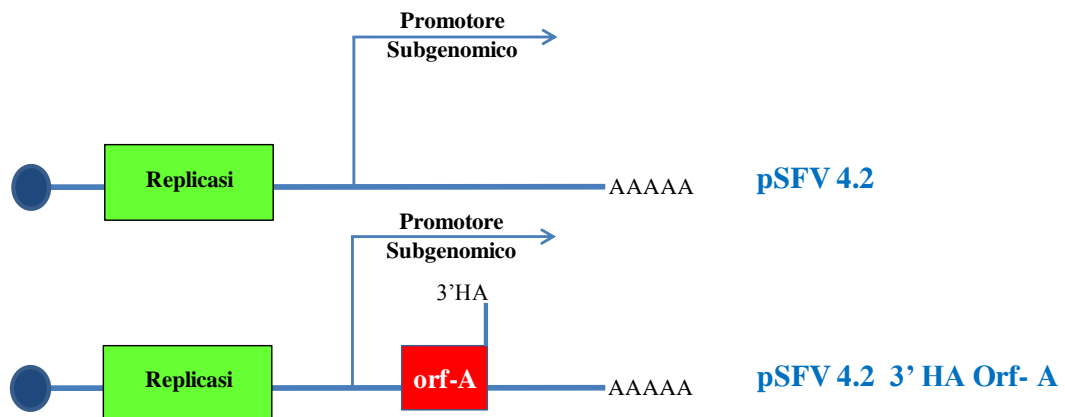


Figura 6.5: rappresentazione schematica dei plasmidi impiegati, basati sul sistema di espressione SFV.

I plasmidi pSFV4.2 e pSFV4.2 3'HA Orf-A (figura 6.5) sono stati linearizzati mediante digestione enzimatica ed usati come stampo per la sintesi *in vitro* di mRNA impiegando la RNA polimerasi SP6. Successivamente i trascritti sono stati purificati su specifiche colonne (si veda paragrafo 5.2.12, Materiali e metodi) e trasfettati in cellule 293T. I campioni sono stati raccolti dopo 6, 12 e 24 ore dalla trasfezione, i lisati proteici ottenuti sono stati caricati su mini-gel di poliacrilammide e sottoposti successivamente a Western Blot mediante l'impiego dell'anticorpo anti-HA. Come mostrato dalla figura 6.6, con questo sistema di espressione è stato possibile rilevare la proteina Orf-A già dopo 6 ore dalla trasfezione ed è stato riscontrato un accumulo della proteina dopo 12 e 24 ore.

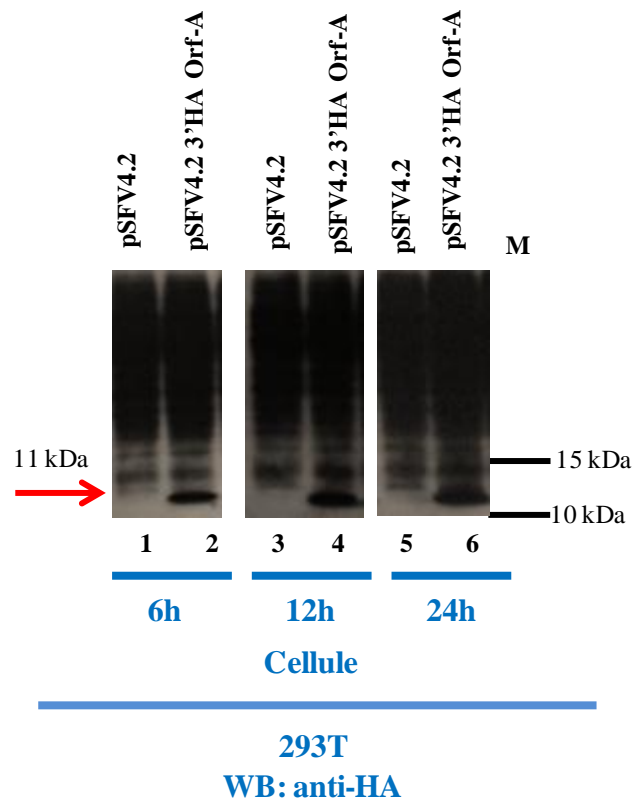


Figura 6.6: analisi dell'espressione della proteina Orf-A mediata dalla replicasi SFV. Western Blotting su lisati proteici derivati da cellule 293T trasfettate con l'mRNA trascritto *in vitro* a partire dai plasmidi pSFV 4.2 (corsia 1-3-5) e pSFV4.2 3'HA Orf-A (corsia 2-4-6) e raccolte dopo 6, 12 e 24 ore dopo la trasfezione. **M:** Marker di peso molecolare proteine 170/130/70/55/40/35/25/15/10 kDa. **Anticorpo anti-HA.**

In seguito, è stata esaminata l'espressione della proteina Orf-A in citofluorimetria. A tal fine le cellule 293T sono state trasfettate con i trascritti ottenuti a partire dai plasmidi pSFV4.2 3'HA Orf-A ed pSFV4.2, opportunamente linearizzati. Dopo 24 ore dalla trasfezione i campioni sono stati marcati con l'anticorpo anti-HA direttamente coniugato al fluoroforo ficoeritrina (PE, emissione della fluorescenza a 575 nm) ed il suo isotipo di controllo, IgG- PE ed acquisiti al FACs. Come mostrato dalla figura 6.7, il 20% delle cellule trasfettate con l'RNA messaggero Orf-A *plus* era positiva alla marcatura con l'anticorpo HA.

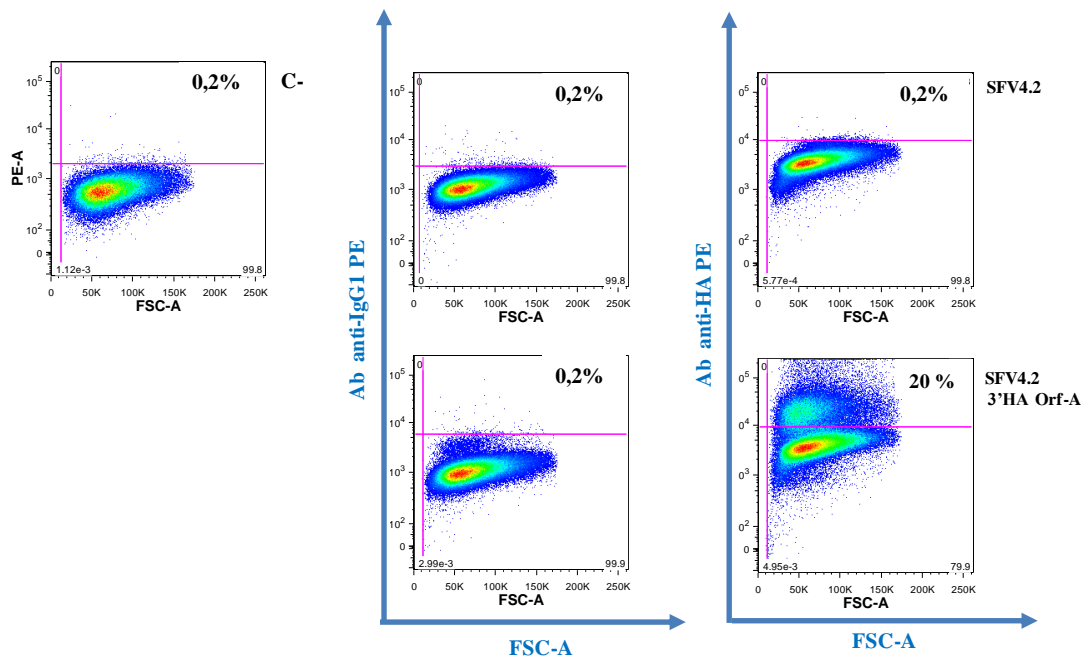


Figura 6.7: analisi citofluorimetrica dell'espressione della proteina Orf-A guidato dalla replicasi SFV. Le cellule 293T sono state trasfettate con i trascritti SFV 4.2 e SFV4.2 3'HA Orf-A, dopo 24 ore i campioni sono stati raccolti e processati per essere acquisiti al FACs LSRII (BD). Le cellule trasfettate sono state colorate con anticorpo anti-HA direttamente coniugati a fluoroforo PE (Milteny Biotec) e con il suo isotipo di controllo IgG- PE (Milteny Biotec). La fluorescenza emessa è stata valutata su scala logaritmica con il software DIVA (BD) e successivamente analizzata con il software FlowJO.

Dai risultati ottenuti è stato possibile rilevare la proteina Orf-A in Western blotting negli estratti proteici ed in citofluorimetria.

Al fine di valutare il coinvolgimento della proteina Orf-A nella progressione del ciclo cellulare in un contesto simile a quello dell'infezione e per massimizzare l'effetto è stato adottato il sistema di espressione basato sulla produzione delle particelle *Alphavirali*. Brevemente, le particelle Alphavirali sono state prodotte in cellule fibroblastoidi derivanti dal rene di criceto, BHK-21 (figura 6.8, *co-elettroporazione*), ed impiegate per trasdurre cellule bersaglio 293T (figura 6.8, *trasduzione*). Al fine di ottenere le particelle virali ricombinanti SFV, è stato necessario co-trasfettare le cellule con due diversi elementi. Il primo è rappresentato dal replicone vettore, nel quale sono contenuti: il gene del complesso della replicasi,

il transgene sotto il controllo del promotore subgenomico, il segnale di incapsidazione e le estremità 5' e 3' necessarie per la replicazione del genoma. Il secondo è rappresentato dal sistema *helper* che fornisce in *trans* le proteine strutturali alphavirali. Il sistema prevede due componenti *helper* indipendenti, una codificante la proteina C del capside (Helper C), l'altra le spicole dell'*envelope* (p62, p6, E1; Helper S) (Smerdou and Liljeström, 1999) (figura 6.8, *Trascrizione in vitro*). Per generare particelle virali ricombinanti SFV mediante tale sistema, è stato necessario co-trasfettare il vettore, contenente il transgene, e i due costrutti *helper* nelle cellule BHK-21. Le particelle che si ottengono risultano infettive ma non sono in grado di dare origine a progenie virale, poiché sono dotate di un genoma difettivo per le componenti strutturali (figura 6.8).

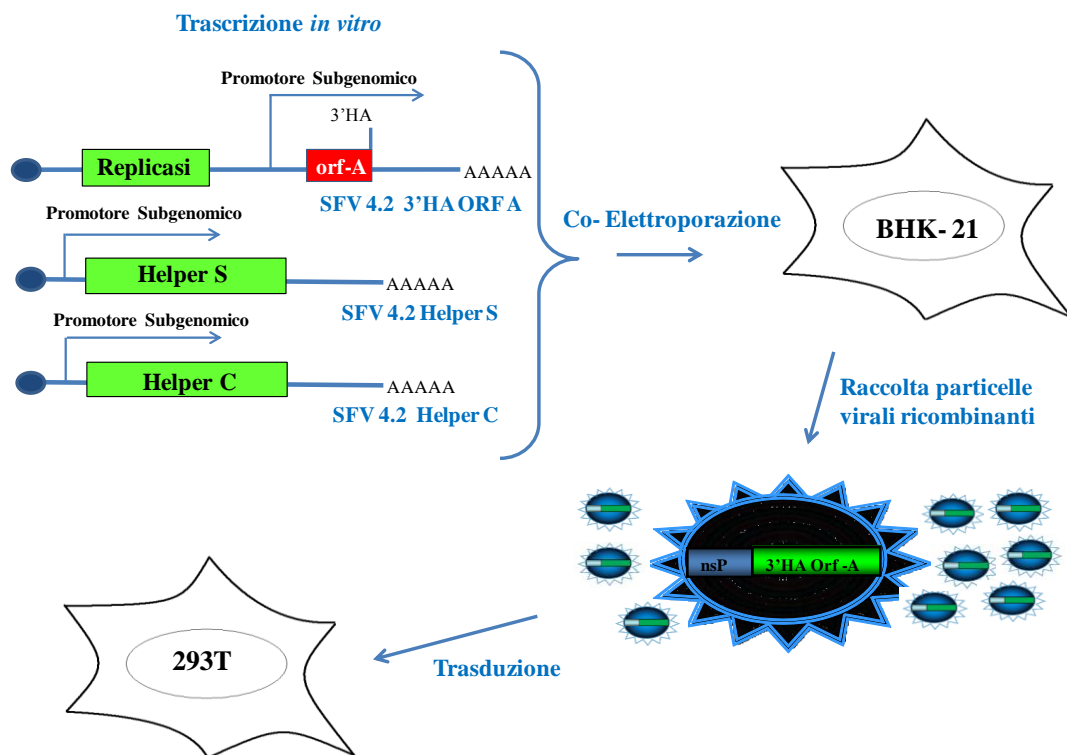


Figura 6.8: rappresentazione schematica del sistema di *packaging alphavirale* per la produzione di particelle virali ricombinanti.

Le particelle SFV sono state prodotte nella linea BHK21 co-elettroporando i trascritti, precedentemente ottenuti con la trascrizione *in vitro*, SFV4.2- 3'HA Orf-A, SFV4.2- Helper C, SFV4.2- Helper S. Le particelle virali ricombinanti sono state impiegate per la trasduzione delle cellule bersaglio, 293T, e dopo 24 ore i campioni sono stati processati per essere acquisiti al FACs. Le cellule sono state marcate con anticorpo anti-HA coniugato direttamente al fluoroforo FITC e Ioduro di Propidio. I campioni sono stati acquisiti su scala lineare con il software DIVA (BD) ed analizzati con il software FlowJO. Come mostrato dalla figura 6.9, il 34% delle cellule trasdotte esprimevano la proteina Orf-A. La popolazione di cellule positive alla fluorescenza verde sono state analizzate, mediante marcatura con ioduro di propidio per valutare la distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Come mostrato in figura 6.9, le maggior parte delle cellule Orf-A positive erano distribuite nella fase G2/M rispetto alle stesse cellule trasdotte con il vettore di controllo. Il risultato ottenuto in seguito all'esperimento di trasduzione indicava chiaramente un blocco del ciclo cellulare in fase G2/M nelle cellule trasdotte ed esprimenti la proteina Orf-A.

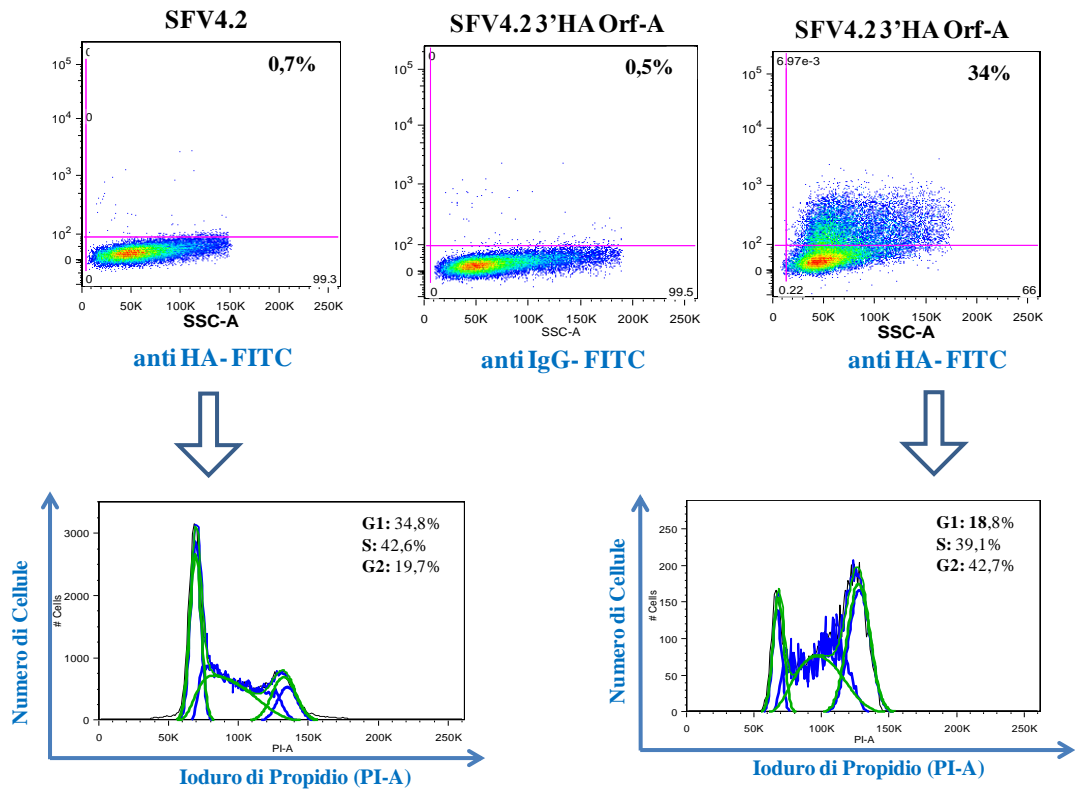


Figura 6.9: analisi citofluorimetrica dell'espressione della proteina Orf-A e del ciclo cellulare con particelle virali di SFV. Le cellule 293T sono state trasdotte con le particelle SFV 4.2 e SFV4.2 3'HA Orf-A, dopo 24 ore i campioni sono stati raccolti e processati per essere acquisiti al FACs LSRII (BD). Le cellule trasdotte sono state colorate con anticorpo anti-HA direttamente coniugato a fluoroforo FITC (Milteny Biotec) e con il suo isotipo di controllo IgG-FITC (Milteny Biotec). La fluorescenza emessa è stata valutata su scala logaritmica con il software DIVA (BD) e successivamente analizzata con il software FlowJO. Per ciascun campione è stata valutata la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare mediante marcatura con Ioduro di Propidio. I campioni sono stati acquisiti su scala lineare al FACs LSRII (BD) con il software DIVA (BD) ed analizzati con software FlowJO.

6.4 Valutazione dell'espressione della proteina Orf-A in cellule umane (293T) e feline (CrFK)

Il passo successivo è stato quello di studiare il coinvolgimento della proteina Orf-A nel blocco del ciclo cellulare in un contesto più fisiologico ovvero dove la proteina venisse espressa nel contesto del provirus. A tal fine, sono stati disegnati ed ottenuti i plasmidi provirali a partire dal ceppo Petaluma (p34TF10) caratterizzata dalla

sostituzione del codone di stop con il codone per il triptofano (Pistello *et al.*, 2002) e dove l'estremità 3' del gene *orf-A* è stata fusa con l'epitopo dell'emagglutinina (HA). Inoltre, sono stati ottenuti anche la controparte "negativa" ovvero plasmidi in cui è stata inserita una sequenza di stop in posizione 5' del gene, subito dopo il codone d'inizio della traduzione, in questo contesto la proteina non è tradotta (si vedano paragrafi 5.2.8-9, Materiali e metodi).

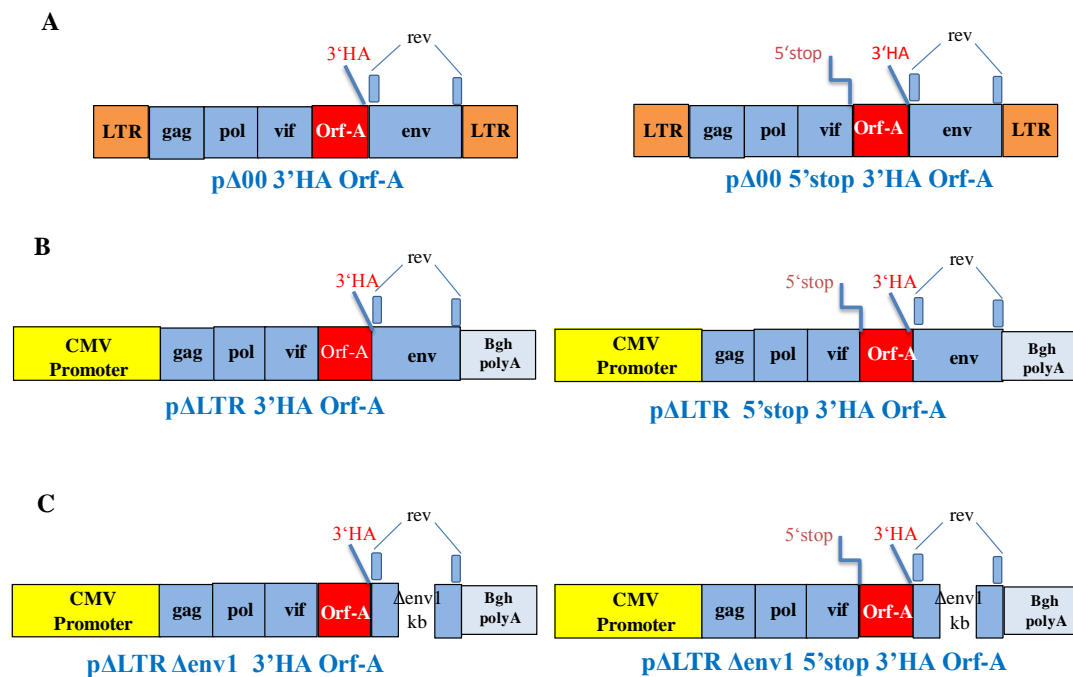


Figura 6.10: rappresentazione schematica dei plasmidi ingegnerizzati. **A)** sul lato sinistro dello schema è rappresentato il plasmide esprimente l'intero genoma di FIV del ceppo Petaluma (clone molecolare 34TF10), il plasmide è stato modificato inserendo il tag HA all'estremità 3' del gene *orf-A* (pΔ00 3'HA Orf-A); la sua controparte Orf-A minus è rappresentata dal costrutto pΔ00 5'Stop 3'HA Orf-A (lato destro), in cui è stato inserito un codone di stop subito dopo il codone di inizio della traduzione, in questo contesto la proteina non è tradotta. La LTR felina è funzionale esclusivamente nel contesto di cellule feline. **B)** il plasmide contiene i geni strutturali di FIV *gag*, *pol*, ed *env* ed accessori/regolatori *vif*, *orf-A* e *rev* del ceppo Petaluma; le LTR virali sono state sostituite con il promotore CMV umano all'estremità 5' del genoma mentre al 3' è stato introdotto il sito di poliadenilazione del BgH; il plasmide è stato modificato inserendo il tag HA all'estremità 3' del gene *orf-A* (pΔLTR 3'HA Orf-A); la sua controparte Orf-A minus è rappresentata dal costrutto pΔLTR 5'Stop 3'HA Orf-A (lato destro) dove è stato inserito un codone di stop al 5' del gene *orf-A*, la proteina non è tradotta. **C)** il plasmide deriva dal pΔLTR e differisce da questo per l'introduzione di una delezione di 1 kilobase nel gene *env*; anche in questo plasmide è stato ingegnerizzato il gene *orf-A* inserendo il tag HA all'estremità 3' (pΔLTR Δenv1 3'HA Orf-A); la sua controparte Orf-A minus è

rappresentata dal costrutto p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3' HA Orf-A (lato destro) dove al 5' del gene Orf-A è stato inserito un codone di stop.

Inizialmente, sono stati testati i plasmidi ottenuti in cellule 293T. I plasmidi Orf-A *plus*, p Δ LTR 3' HA Orf-A e la rispettiva controparte Orf-A *minus*, p Δ LTR 5' Stop 3' HA Orf-A (figura 6.10, pannello B) esprimevano l'intero genoma provirale sotto il controllo del promotore CMV umano ed in sostituzione della LTR al 3', era presente il segnale di poliadenilazione del BgH. I plasmidi p Δ LTR Δ env1 3' HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3' HA Orf-A differiscono dai plasmidi p Δ LTR per la presenza di una delezione di 1 Kb nel gene *env*. Tale delezione elimina l'effetto citopatico nelle cellule umane causata proprio dall'espressione delle glicoproteina dell'envelope (Poeschla *and* Looney, 1998). Le cellule 293T sono state trasfettate con i plasmidi prima indicati, raccolte dopo 24 ore e processate per l'estrazione delle proteine cellulari ed immunoprecipitazione con anticorpo anti-HA. I campioni ottenuti sono stati sottoposti a SDS- PAGE in condizioni denaturanti e successivo Western Blot.

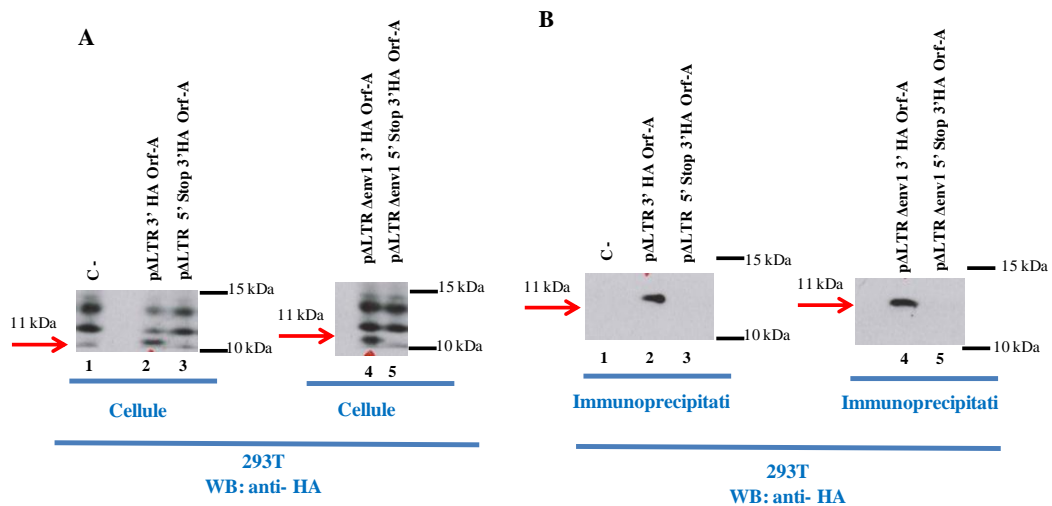


Figura 6.11: analisi dell'espressione della proteina Orf-A con i plasmidi la cui espressione è guidata dal promotore CMV in cellule 293T. **A)** Western Blotting dei lisati cellulari (**B)** ed immunoprecipitazione per HA, in cellule 293T (corsia 1) trasfettate con i plasmidi p Δ LTR 3' HA Orf-A (corsia 2), p Δ LTR 5' Stop 3' HA Orf-A (corsia 3), p Δ LTR Δ env1 3' HA Orf-A (corsia 4), p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3' HA Orf-A (corsia 5) **M:** Marker di peso molecolare proteine 170/130/70/55/40/35/25/15/10 kDa. **Anticorpo anti-HA.**

Come si osserva dalla figura 6.11 (pannello A), dall'analisi del Western Blot sui lisati cellulari si rileva la presenza della proteina Orf-A nelle cellule trasfettate con i plasmidi p Δ LTR 3'HA Orf-A (corsia 2) e p Δ LTR Δ env1 3'HA Orf-A (corsia 4) in corrispondenza del peso molecolare di circa 11 kDa. Al contrario nelle cellule trasfettate con le controparti Orf-A *minus* non è presente la banda d'interesse (corsia 3, p Δ LTR 5' Stop 3'HA Orf-A; corsia 5, p Δ LTR Δ env1 5'Stop 3'HA Orf-A), così come nell'appropriato in cui le cellule non sono state trasfettate (corsia 1, C-). Inoltre, è stata valutata la presenza della proteina Orf-A in seguito a immunoprecipitazione con l'anticorpo anti- HA per selezionare la proteina Orf-A. Come è possibile osservare dalla figura 6.11 (pannello B), solo in corrispondenza delle cellule trasfettate con il plasmide Orf-A *plus* (corsia 2, p Δ LTR 3'HA Orf-A; corsia 5, p Δ LTR Δ env1 3'HA Orf-A), si rileva la presenza della proteina dopo immunoprecipitazione.

I plasmidi, p Δ 00 3'HA Orf-A e p Δ 00 5'Stop 3'HA Orf-A (figura 6.10, pannello A), sono stati impiegati per trasfettare le cellule CrFK. Il plasmide p Δ 00 3' HA Orf-A esprime l'intero genoma provirale di FIV (ceppo Petaluma, clone molecolare p34TF10) e l'espressione è guidata dalle LTR virali. Inoltre, all'estremità 3' del gene Orf-A è stato introdotto il *tag* HA per poter rilevarne l'espressione. Il plasmide p Δ 00 5'Stop 3' HA Orf-A differisce dal p Δ 00 3' HA Orf-A in quanto è stato introdotto all'estremità 5' del gene *orf-A* un codone di stop, subito dopo il codone di inizio della traduzione.

I plasmidi esprimenti la proteina Orf-A e quelli di controllo, sono stati trasfettati in cellule feline CrFK. Dopo 48 ore, i campioni sono stati processati per l'estrazione delle proteine cellulari ed analizzati mediante corsa di separazione elettroforetica su gel di poliacrilammide e successivo Western Blot. Come è possibile osservare dalla figura 6.12, dall'analisi del Western Blot sui lisati cellulari si rileva la presenza della proteina Orf-A nelle cellule trasfettate con il costrutto p Δ 00 3'HA Orf-A (corsia 2) in corrispondenza del peso molecolare di circa 11 kDa. Al contrario nelle cellule trasfettate con la controparte Orf-A *minus* non è rilevabile alcun segnale (corsia 3), così come nel campione di controllo (corsia 1). Inoltre, a partire dagli stessi estratti

proteici è stato valutata la presenza della proteina Orf-A dopo immunoprecipitazione con l'anticorpo anti-HA, corsa elettroforetica SDS-PAGE e successiva analisi per Western Blot. Come è possibile osservare dalla figura 6.11 (pannello B), solo in corrispondenza delle cellule trasfettate con il costrutto Orf-A *plus* (corsia 2), si evidenzia la proteina dopo immunoprecipitazione.

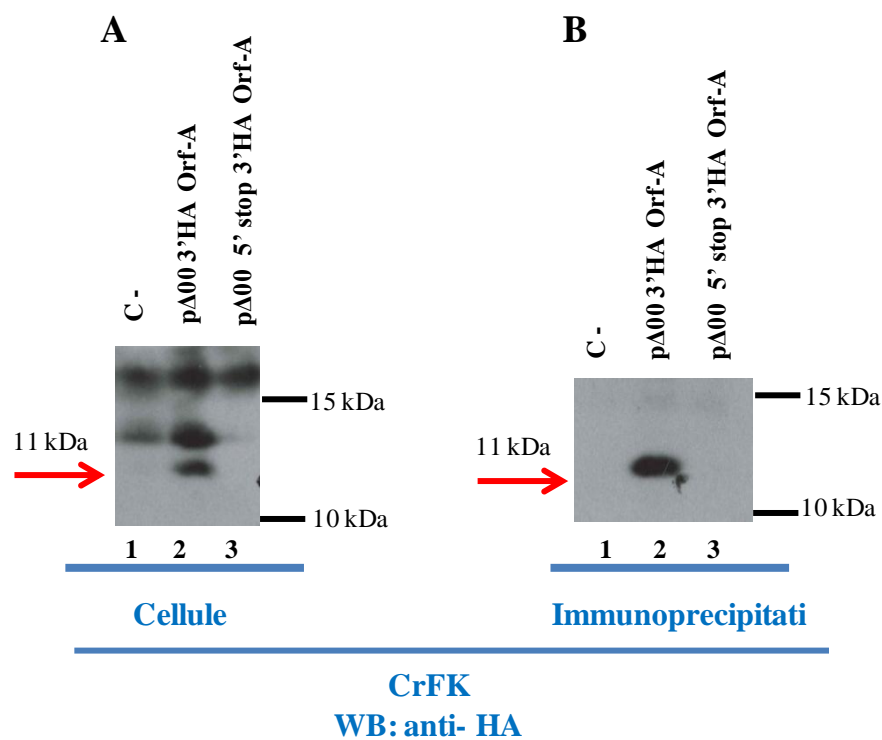


Figura 6.11: analisi dell'espressione della proteina Orf-A con i plasmidi la cui espressione è guidata dalle LTR feline in cellule CrFK. Western Blotting dei lisati cellulari (A) ed immunoprecipitazione (B) per HA derivate da cellule CrFK trasfettate e di controllo (corsia 1) con i plasmidi pΔ00 3' HA Orf-A (corsia 2) e pΔ00 5' Stop 3' HA Orf-A (corsia 3). M: Marker di peso molecolare proteine 170/130/70/55/40/35/25/15/10 kDa. **Anticorpo anti-HA.**

Dai risultati ottenuti si evince che è possibile rilevare la proteina Orf-A in seguito ad immunoprecipitazione e Western Blot con tutti i plasmidi ingegnerizzati sia in cellule feline che umane. Inoltre, i plasmidi di espressione denominanti Orf- A *minus*

rappresentano un buon sistema di controllo per valutare gli effetti biologici in un contesto in cui viene espresso l'intero genoma provirale di FIV in assenza della proteina Orf-A e quindi l'effetto è da considerarsi specifico e legato all'espressione della proteina Orf-A.

6.5 Valutazione dell'espressione delle proteine virali ed analisi del ciclo cellulare in cellule umane e feline in citofluorimetria

Una importante funzione attribuita alla proteina Vpr di HIV-1 è quella di mediare il blocco del ciclo cellulare in fase G2/M. Nel contesto naturale dell'infezione da HIV-1 il virus trae diversi vantaggi da tale arresto:

- ➔ impedisce la proliferazione cellulare e probabilmente ne contrasta la risposta immunitaria anti-virale (Davy *and* Doorbar *et al.*, 2007);
- ➔ aumenta il numero di provirus integrati (Groschel *and* Bushman, 2005);
- ➔ favorisce la replicazione, la sintesi delle proteine e lo spread virale (Davy *and* Doorbar *et al.*, 2007).

Per determinare un eventuale coinvolgimento della proteina Orf-A nel blocco del ciclo cellulare nella fase G2/M è stato dapprima valutata l'espressione della proteina virale Orf-A e p24 in cellule umane e feline utilizzando i plasmidi ingegnerizzati (si veda figura 6.10) e successivamente sugli stessi campioni è stato analizzata la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare in citofluorimetria.

Inizialmente sono state trasfettate le cellule 293T con i plasmidi p Δ LTR Δ env1 3'HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3' HA Orf-A. La scelta di questi vettori è stata guidata dall'evidenza che l'impiego dei plasmidi Orf-A *plus* e *minus* privi della delezione di 1Kb nel gene *env* determinava un importante effetto citopatico nelle cellule 293T, già noto in letteratura (Poeschla *and* Looney, 1998). Tale effetto, non ha consentito di condurre alcun tipo di analisi citofluorimetrica per valutare l'espressione delle proteine virali e neppure per analizzare il blocco del ciclo cellulare. Il controllo positivo, di questo esperimento è rappresentato da cellule 293T stimulate per 16 ore con Nocodazolo 100 ng/ml. Questa sostanza inibisce la

formazione del fuso mitotico bloccando le cellule nella fase G2/M (Lee J *et al.*, 1980). Inoltre la specificità della fluorescenza emessa dagli anticorpi è stata valutata impiegando i rispettivi isotipi di controllo. Le cellule 293T sono state raccolte dopo 24 ore dalla trasfezione, quelle stimolate 16 ore dopo. I campioni sono stati fissati in paraformaldeide al 2% e permeabilizzati con la soluzione Netgel (Lunati *et al.*, 2002). In seguito le cellule trasfettate con i costrutti p Δ LTR Δ env1 3' HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3' HA Orf-A sono state marcate con anticorpo anti-HA direttamente coniugato al fluoroforo FITC oppure con l'isotipo di controllo IgG1-FITC ed acquisite al FACs in scala logaritmica con il software DIVA (BD) ed infine analizzate con il software FlowJO. Come si può osservare dalla figura 6.13, nelle cellule trasfettate con il costrutto p Δ LTR Δ env1 3' HA Orf-A si rileva una fluorescenza verde pari al 27%.

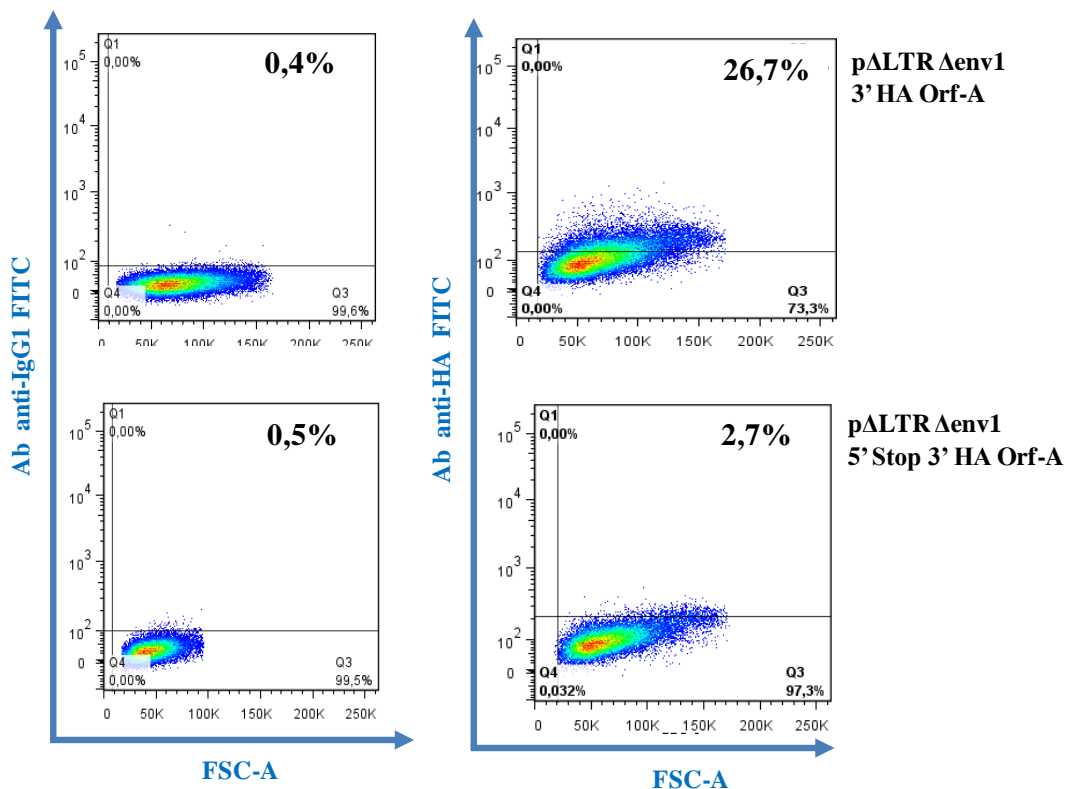


Figura 6.13: analisi citofluorimetrica dell'espressione della proteina Orf-A mediante marcatura con anticorpo anti-HA FITC. Le cellule 293T trasfettate con i plasmidi p Δ LTR Δ env1 3' HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3' HA Orf-A, sono state raccolte dopo 24 ore e colorate con anticorpi HA-FITC (Milteny Biotec) ed il suo isotipo di controllo IgG1-FITC (Milteny Biotec). Le acquisizioni dei

campioni sono state eseguite con il FACs LSRII (BD) in scala logaritmica e l'analisi è stata condotta mediante l'utilizzo del software FlowJO.

Dopo l'acquisizione le cellule sono state colorate con una soluzione contenente ioduro di propidio (1mg/ml) e dopo un'incubazione di 30 minuti a 37°C (si veda paragrafo 5.2.20, Materiali e metodi) i campioni sono stati riacquisiti al FACs con il software DIVA in scala lineare. Nella figura 6.14 (pannello B), è possibile osservare come la popolazione di cellule HA positive sia nella fase G2/M mentre la popolazione di cellule che non esprime Orf-A, quindi HA negative, è distribuita nelle diverse fasi come nel controllo di cellule non trasfettate (figura 6.14, pannello A, C-) o trasfettate con il costrutto Orf-A *minus* (figura 6.14, pannello A, pΔLTR Δenv1 5' Stop 3'HA Orf-A).

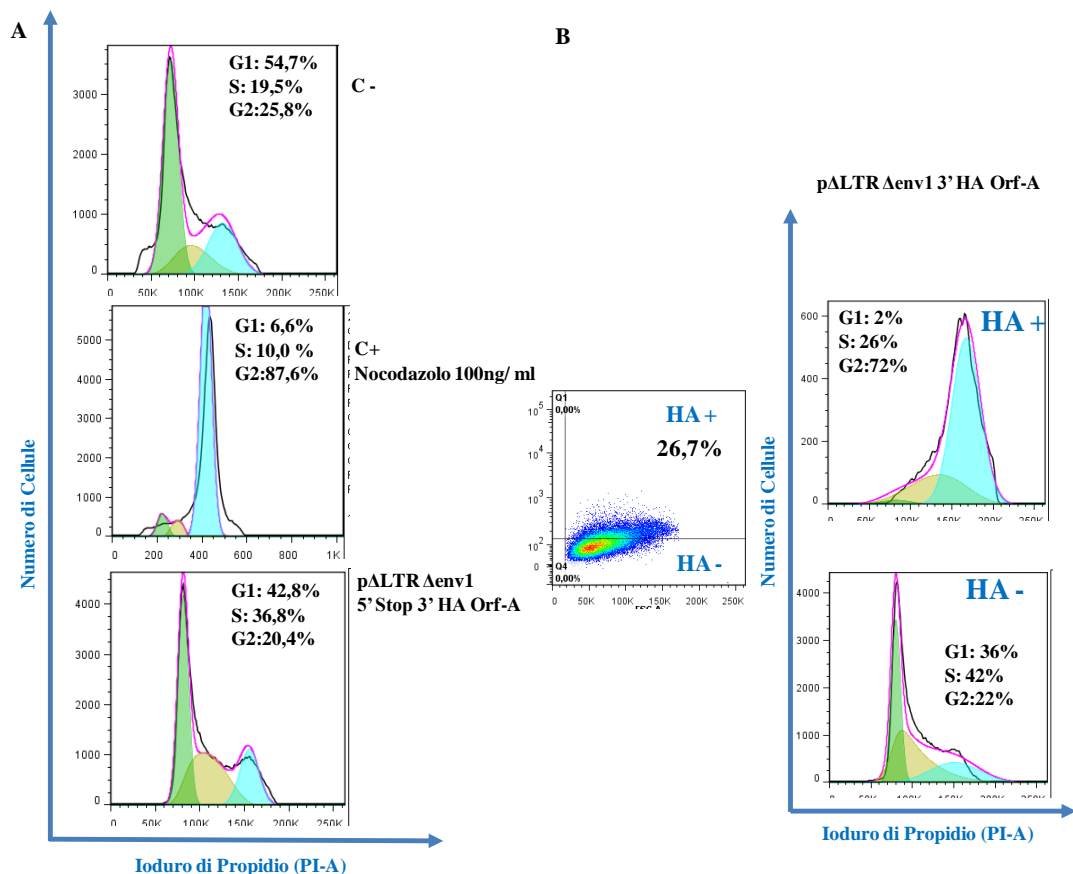


Figura 6.14: analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare. **A)** Le cellule 293T di controllo (C-), stimulate con Nocodazolo 100 ng/ml (C+) e trasfettate con il plasmide pΔLTR Δenv1 5' Stop 3'HA Orf-A sono state marcate con Ioduro di Propidio (1 mg/ml) ed analizzate per valutare la distribuzione

delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. **B)** Le cellule 293T trasfettate con il plasmide e p Δ LTR Δ env1 3'HA Orf-A, dopo 24 ore sono state raccolte e processate per essere acquisiti al FACs LSRII (BD). Le cellule sono state colorate con anticorpo anti-HA direttamente coniugato a fluoroforo FITC (Milteny Biotec) e con l'isotipo di controllo IgG- FITC (Milteny Biotec). La fluorescenza emessa è stata valutata su scala logaritmica con il software DIVA (BD) e successivamente analizzata con il software FlowJO. Successivamente è stata valutata la distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare in seguito a marcatura con Ioduro di Propidio (1mg/ml). I campioni sono stati acquisiti su scala lineare al FACs LSRII con il software DIVA (BD) ed analizzati con il software FlowJO.

In seguito è stata valutata l'espressione di un'altra proteina virale, la proteina in seguito alla marcatura con l'anticorpo anti-p24 di FIV e successiva marcatura con anticorpo fluorescente FITC (goat anti-mouse IgG FITC). Da quest'analisi è stato possibile rilevare che nel contesto delle cellule trasfettate con il costrutto Orf-A *plus* circa il 49% della popolazione era positiva alla fluorescenza verde della proteina p24 di FIV (figura 6.15, pannello A) mentre nel contesto delle cellule trasfettate con il costrutto Orf-A *minus* era del 45% circa. Per ciascun campione è stato analizzato il ciclo cellulare in seguito a marcatura con lo Ioduro di Propidio. Come mostrato in figura 6.15 (pannello B), le cellule trasfettate con il costrutto p Δ LTR Δ env1 3' HA Orf-A e positive all'espressione della p24 hanno una distribuzione nelle diverse fasi come segue: G0/G1 21,6%; S 43,2% ; G2/M 35,2%; nella stessa popolazione dove però la proteina p24 non è espressa la distribuzione è G1 37,6%; S 41,4%; G2/M 21%. Per ciò che concerne i campioni trasfettati con il plasmide p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3' HA Orf-A non si evince una differenza significativa nei valori percentuali tra la popolazione di cellule p24 positive e quelle p24 negative. È da considerare che nella popolazione di cellule trasfettate con il costrutto Orf-A *plus* (p Δ LTR Δ env1 3' HA Orf-A) non possiamo discriminare tra le cellule che esprimono sia la proteina p24 ed Orf-A e quelle che esprimono solo la proteina p24. Quindi, nella popolazione di cellule p24 positive alcune di esse esprimono anche la proteina Orf-A.

I risultati mostrati suggeriscono che le cellule esprimenti la proteina Orf-A sono bloccate nella fase G2/M. Inoltre, la differenza nei valori percentuali osservati tra la popolazione di cellule Orf-A *plus* p24 positive e le popolazioni di cellule p24 negative oppure p24 positive Orf-A *minus* è specificamente legata all'espressione

della proteina Orf-A e quindi all'effetto che essa esercita sulla progressione del ciclo cellulare.

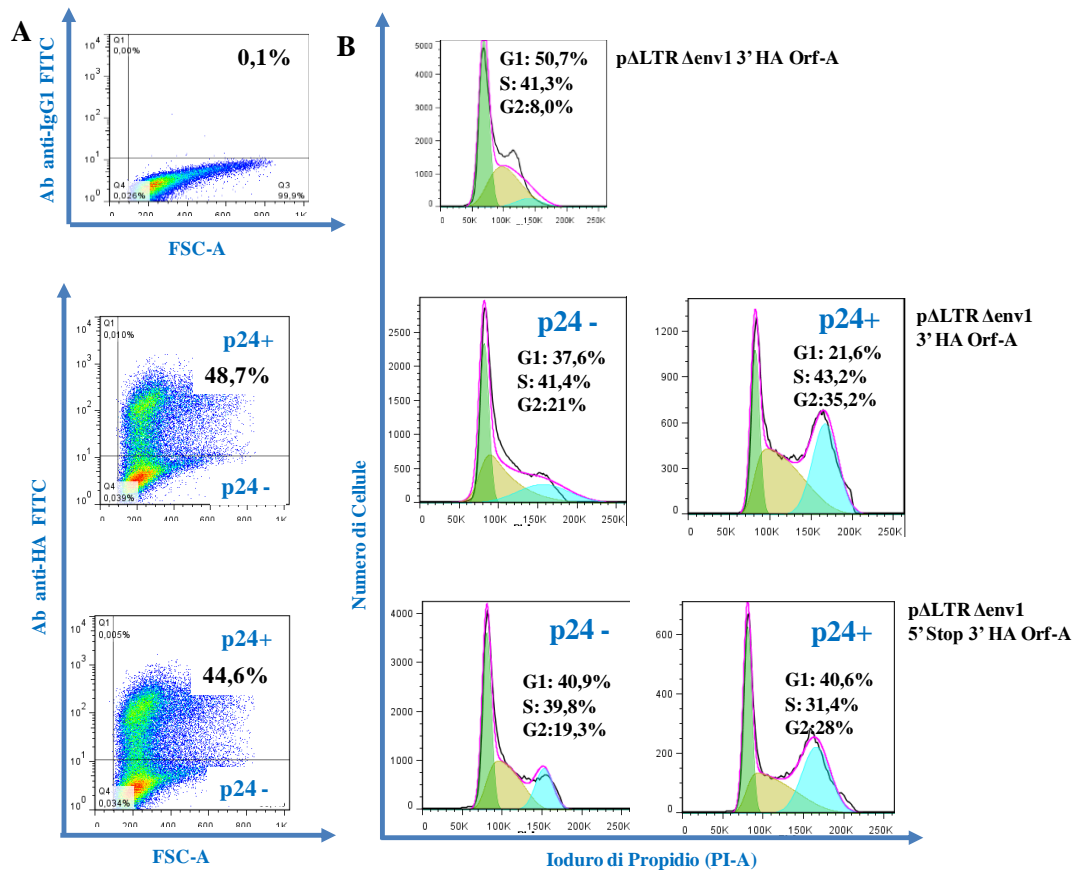


Figura 6.15: analisi citofluorimetrica dell'espressione della proteina p24 e del ciclo cellulare. **A)** Le cellule 293T sono state trasfettate con i plasmidi pΔLTR Δenv1 3' HA Orf-A e pΔLTR Δenv1 5' Stop 3' HA Orf-A, dopo 24 ore i campioni sono stati raccolti e processati per essere acquisiti al FACs LSR II (BD). Le cellule sono state colorate con anticorpo anti-p24 di FIV e successivamente marcate con anticorpo secondario coniugato al fluoroforo FITC (Santa Cruz Biotechnology) oppure con l'isotipo di controllo IgG- FITC (Santa Cruz Biotechnology). La fluorescenza emessa è stata valutata su scala logaritmica con il software DIVA (BD) e successivamente analizzata con il software FlowJO. **B)** Gli stessi campioni sono stati marcati con Ioduro di Propidio (1mg/ml) ed acquisiti su scala lineare al FACs LSR II con il software DIVA (BD) ed analizzati con il software FlowJO.

Lo stesso tipo di esperimento è stato condotto anche in cellule feline CrFK, impiegando i costrutti pΔ00 3' HA Orf-A e pΔ00 5' Stop 3' HA Orf-A. Come precedentemente descritto per le cellule umane, le cellule sono state trasfettate con i

plasmidi indicati e dopo 48 ore sono state processate per essere acquisite al FACs. Inizialmente è stata valutata l'espressione della proteina Orf-A e come mostrato dalla figura 6.16 è pari al 20% delle cellule trasfettate.

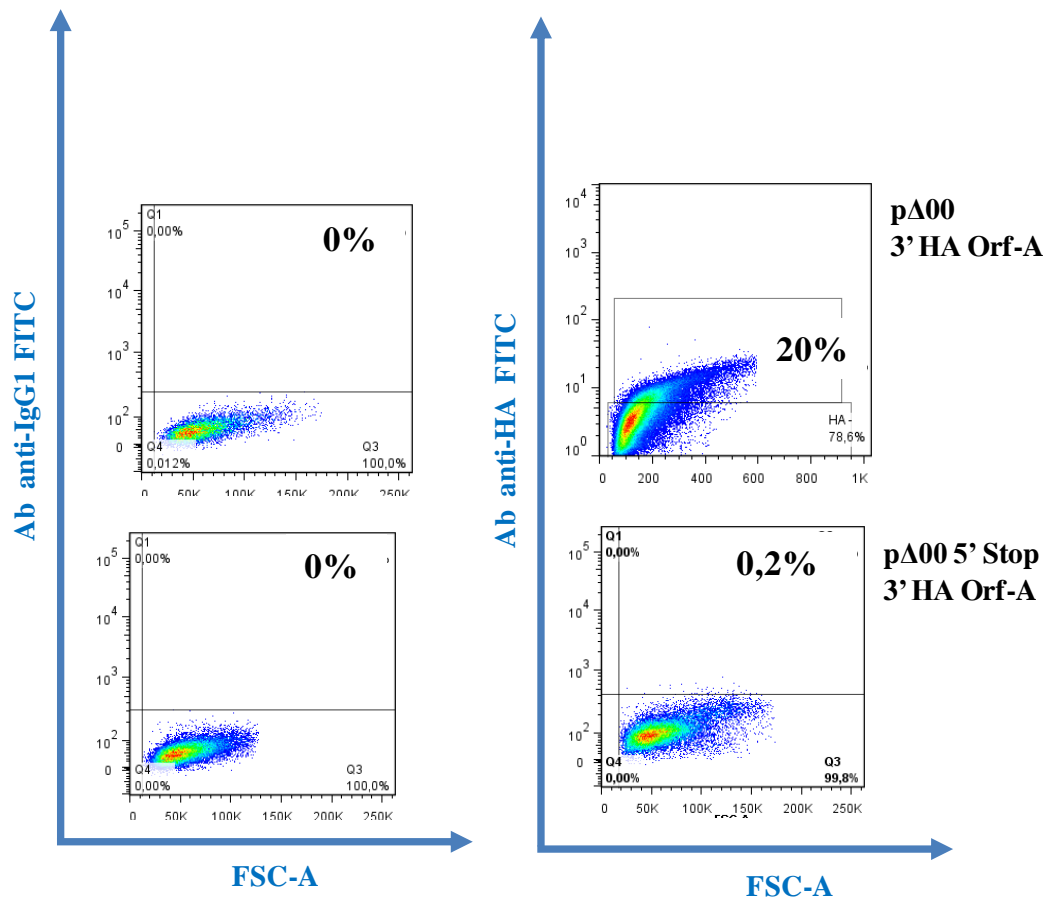


Figura 6.16: analisi citofluorimetrica dell'espressione della proteina Orf-A. Le cellule CrFK sono state trasfettate e pΔ00 3' HA Orf-A e pΔ00 5' Stop 3' HA Orf-A, dopo 48 ore sono state raccolte e processate per essere acquisite al FACs LSR II (BD). Le cellule trasfettate sono state colorate con anticorpo anti-HA direttamente coniugato a fluoroforo FITC (Milteny Biotec) e con l'isotipo di controllo IgG-FITC (Milteny Biotec). La fluorescenza emessa è stata valutata su scala logaritmica con il software DIVA e successivamente analizzata con il software FlowJO.

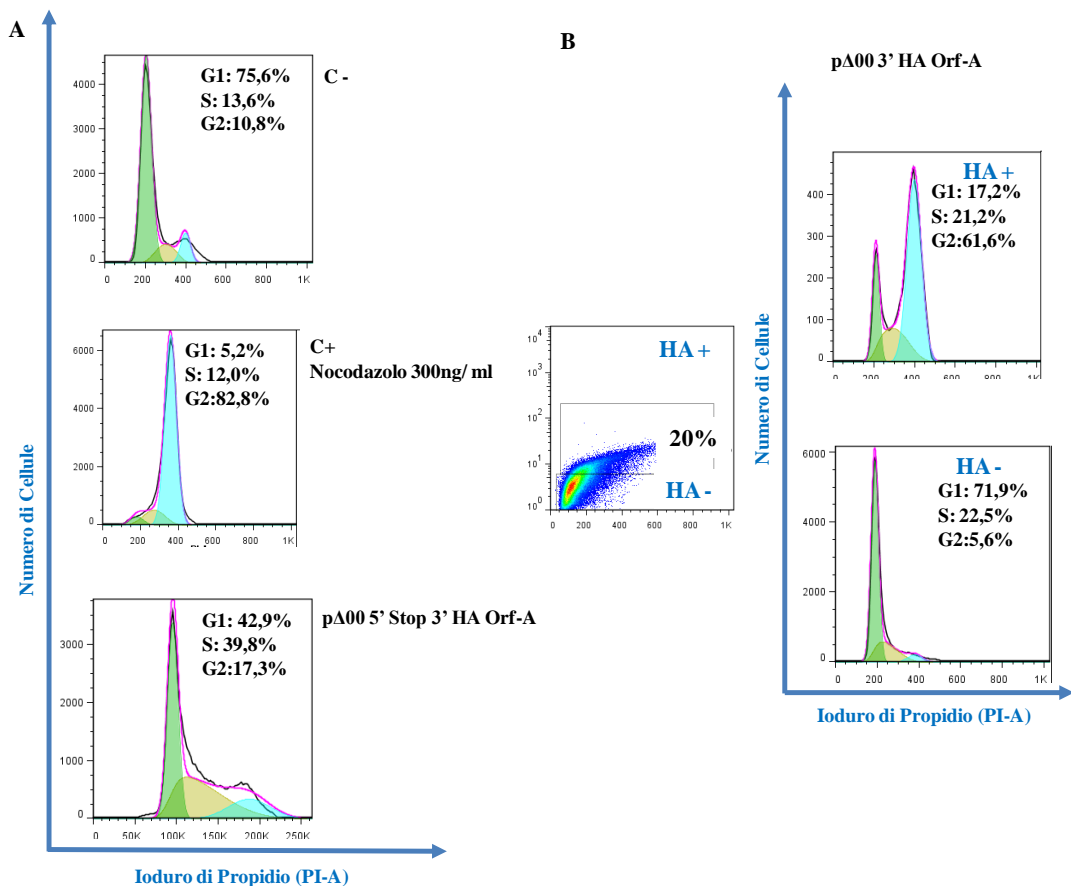


Figura 6.17: analisi citofluorimetrica del ciclo cellulare. **A)** Le cellule CrFK, (C-), stimulate con Nocodazolo 300 ng/ml (C+) e trasfettate con il plasmide pΔ00 5' Stop 3' HA Orf-A sono state marcate con Ioduro di Propidio (1 mg/ml) ed analizzate per valutare nelle diverse fasi del ciclo cellulare. **B)** Le cellule CrFK sono state trasfettate con il plasmide pΔ00 3' HA Orf-A e dopo 24 ore è stato raccolto e processato per essere acquisiti al FACs LSRII (BD). Le cellule sono state colorate con anticorpo anti-HA- FITC (Milteny Biotec) e con l'isotipo di controllo IgG- FITC (Milteny Biotec). La fluorescenza emessa è stata valutata su scala logaritmica con il software DIVA (BD) e successivamente analizzata con il software FlowJO. I campioni sono stati marcati con Ioduro di Propidio (1mg/ml) per valutare la distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare. I campioni sono stati acquisiti su scala lineare al FACs LSRII con il software DIVA (BD) ed analizzati con il software FlowJO.

In seguito, gli stessi campioni sono stati marcati con ioduro di propidio per valutare la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Come mostrato dalla figura 6.17, le cellule HA positive sono nella fase G2/M. I risultati ottenuti confermano quanto già osservato per le cellule 293T. Anche in questo contesto, è stata valutata l'espressione della proteina p24 in cellule feline trasfettate con i plasmidi pΔ00 3' HA Orf-A e pΔ00 5' Stop 3' HA Orf-A e successivamente gli

stessi campioni sono stati marcati con Ioduro di Propidio per l'analisi del ciclo cellulare. I controlli sono rappresentati da cellule CrFK, (C-), oppure da cellule CrFK stimulate con Nocodazolo 300 ng/ml, controllo positivo (rispetto alle cellule embrionali 293T, le cellule fibroblastoidi risultano meno sensibili alla stimolazione con Nocodazolo a basse concentrazioni per questo motivo è stata utilizzata una dose più alta) (figura 6.18, pannello A).

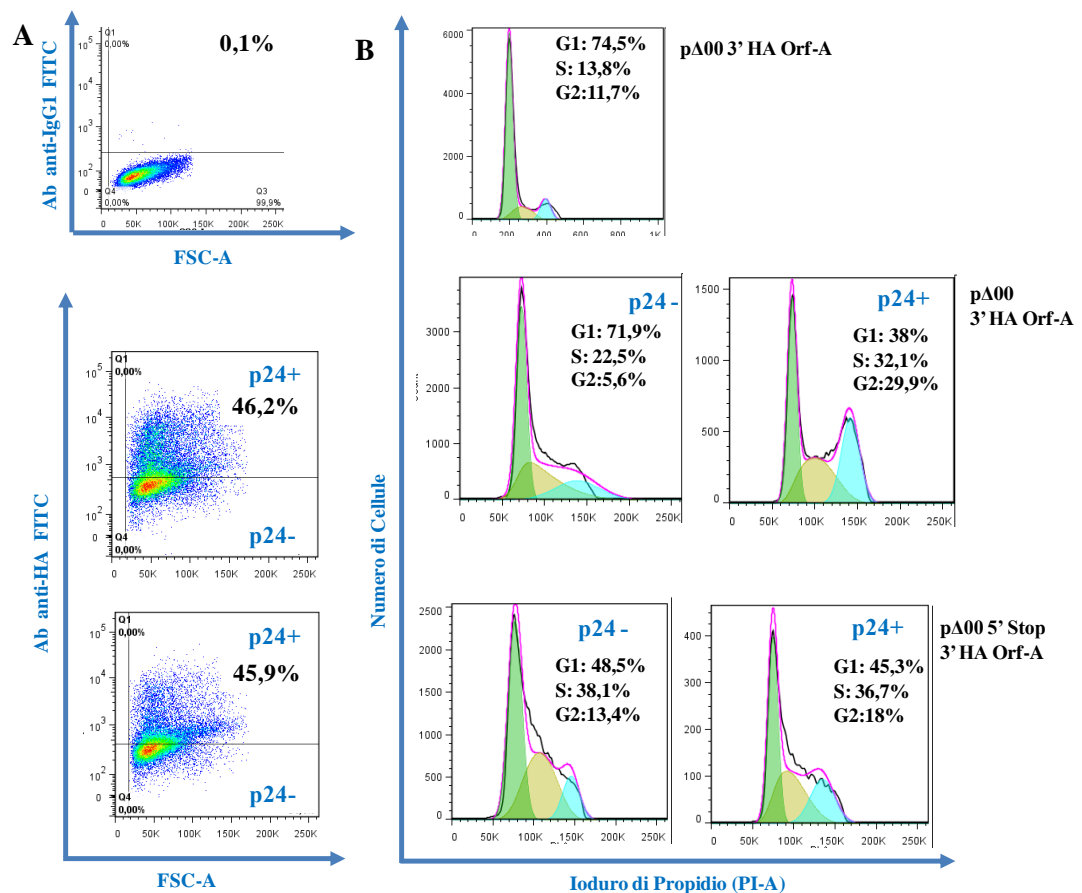


Figura 6.18: analisi dell'espressione della proteina p24 di FIV e del ciclo cellulare in citofluorimetria. **A)** Le cellule CrFK sono state trasfettate con i plasmidi pΔ00 3' HA Orf-A e pΔ00 5' Stop 3' HA Orf-A, dopo 48 ore sono state raccolte e processate per essere acquisite al FACs LSRII (BD). Le cellule sono state colorate con anticorpo anti-p24 di FIV e successivamente marcate con anticorpo secondario coniugato al fluoroforo FITC (Santa Cruz Biotechnology) oppure con l'isotipo di controllo IgG- FITC (Santa Cruz Biotechnology). La fluorescenza emessa è stata valutata su scala logaritmica con il software DIVA (BD) e successivamente analizzata con il software FlowJO. **B)** Gli stessi campioni sono stati marcati con Ioduro di Propidio (1mg/ml) ed acquisiti su scala lineare al FACs LSRII con il software DIVA (BD) ed analizzati con il software FlowJO.

L'espressione della proteina p24 di FIV sia nelle cellule trasfettate con i plasmidi Orf-A *plus* che con il plasmide Orf-A *minus* risulta essere del 45% circa. Per ciò che concerne la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare, anche in questo contesto, è possibile riscontrare un leggero aumento della percentuale di cellule nella fase G2 rispetto alla G1 nel campione trasfettato con il plasmide esprime la proteina Orf-A p24 positivo rispetto ai campioni Orf-A *minus* p24 positivo e negativo (figura 6.18).

I risultati di citofluorimetria ottenuti in cellule modello umane e feline mostrano chiaramente un effetto della proteina Orf-A sul ciclo cellulare, bloccato nella fase G2/M.

6.6 Saggio di immunofluorescenza in cellule umane trasfettate con i plasmidi 3'HA Orf-A *plus* e *minus*

La transizione dalla fase G2 a M è regolata nella cellula dal complesso Cdc-2-Ciclina-B1. In particolare, la fosforilazione inibitoria in Thr14/Tyr 15 di Cdc2 da parte delle chinasi Wee1 e Myt1 prevengono l'ingresso in fase mitotica (Romani and Engelbrecht , 2009.). Mediante un saggio di immunofluorescenza è stata valutata la localizzazione della proteina Orf-A e della Ciclina-B1 nelle cellule trasfettate con i costrutti Orf-A *plus* e *minus*. Le cellule 293T sono state seminate su vetrini precedentemente polilisinati e trasfettate con i plasmidi p Δ LTR Δ env1 3'HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 5'stop 3'HA Orf-A. Dopo 24 ore le cellule sono state fissate con paraformaldeide al 2%, permeabilizzate con Triton X-100 e marcate con specifici anticorpi (si veda paragrafo 5.2.18; Materiali e Metodi). Il controllo positivo è rappresentato da cellule 293T stimulate per 16 ore con Nocodazolo 100 ng/ml. In figura 6.19, pannello A, sono mostrate le immagini ottenute dalle cellule 293T stimulate con Nocodazolo 100ng/m in seguito ad analisi al microscopio confocale; la fluorescenza verde, ottenuta in seguito a marcatura con fluoroforo FITC, rilevava la presenza della Ciclina-B1 mentre quella blu della porzione nucleare, ottenuta in seguito a marcatura con DRAQ5. Dalla figura 6.19 (pannello A), è possibile

osservare che la localizzazione della Ciclina-B1 nelle cellule arrestate in fase G2/ M sembra essere perinucleare rispetto alle cellule che non sono trattate con il Nocodazolo. Inoltre, è possibile osservare una differenza nella morfologia tra le cellule stimulate, che assumono una forma tondeggianti, e quelle non stimulate con la caratteristica forma stellata. In figura 6.19 (pannello B), è possibile osservare i campioni di cellule 293T trasfettate con i plasmidi esprimenti o meno la proteina Orf-A; la fluorescenza verde, ottenuta mediante marcatura con anticorpo FITC, indica la presenza della proteina Ciclina-B1, la fluorescenza rossa rileva il *tag* HA, ottenuta mediante marcatura con anticorpo anti- AlexaFlour 468 e la fluorescenza blu indica il nucleo delle cellule ed è stata ottenuta mediante l'impiego dell'agente intercalante DRAQ5. Dalla figura 6.19 (pannello B), è possibile osservare che nelle cellule in cui è espressa la proteina Orf-A questa si localizza principalmente nell'area nucleare insieme alla Ciclina-B1. Mentre nel contesto di cellule trasfettate con il plasmide Orf-A *minus*, la localizzazione della Ciclina-B1 è principalmente nucleare, similmente a quanto osservato per il controllo di cellule non trasfettate.

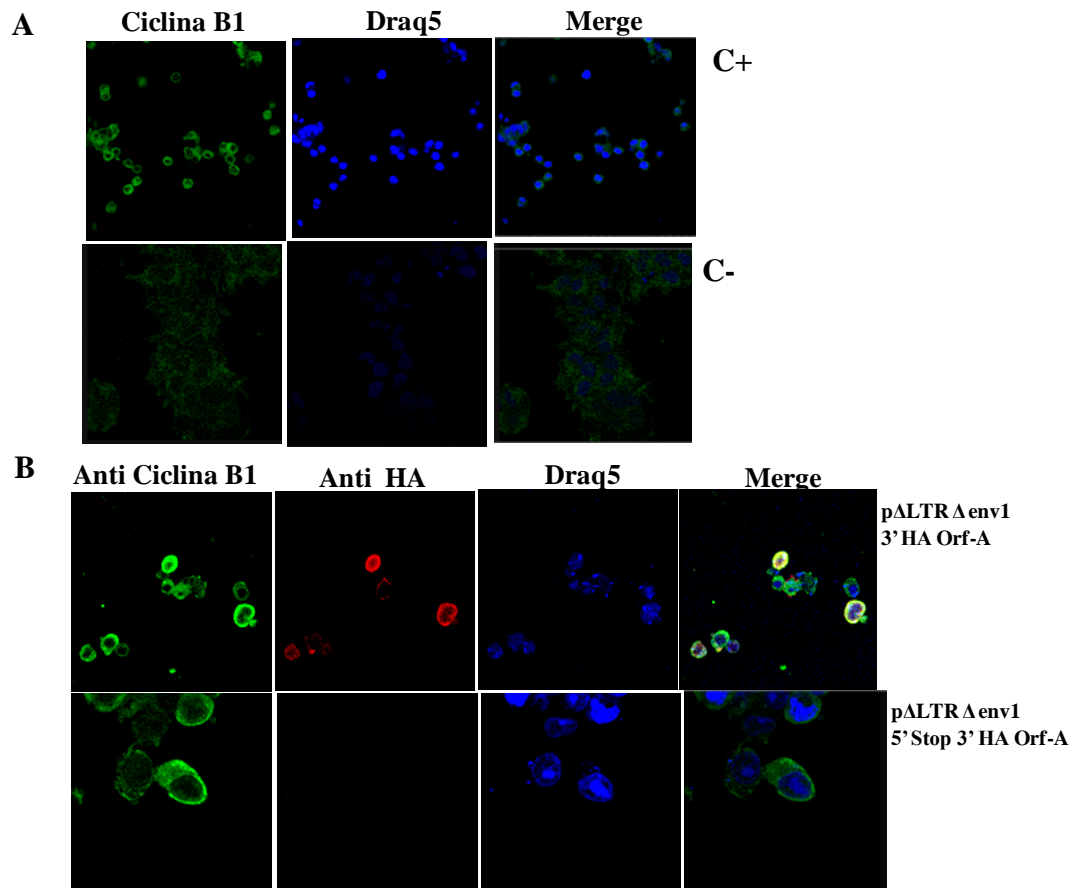


Figura 6.19: saggio di immunofluorescenza indiretta in cellule 293T. **A)** I controlli, C+, sono rappresentati da cellule stimulate per 16 ore con Nocodazolo 100 ng/ml e C- cellule 293T non trasfettate. I campioni sono stati fissati in PFA 2% e permeabilizzati con Triton X-100 0,1%. I campioni sono stati colorati con anticorpo anti Ciclina B1 coniugato a fluoroforo FITC (Santa Cruz) e con il marcatore nucleare DRAQ5 (Cell Signaling). **B)** cellule 293T trasfettate con i plasmidi pΔLTR Δenv1 3' HA Orf-A e pΔLTR Δenv1 5' Stop 3' HA Orf-A. I campioni sono stati fissati in PFA 2%, permeabilizzati con Triton X-100 0,1%, colorati con Ciclina B1 successivamente ibridato con fluoroforo FITC (Santa Cruz Biotechnology), anticorpo anti HA (Santa- Cruz Biotechnologies) successivamente ibridato con fluoroforo Alexa 468 (Life Technologies, Invitrogen) e con il marcatore nucleare DRAQ5 (Cell Signaling). Il MERGE rappresenta la sovrapposizione di entrambi i colori.

In seguito è stata valutata l'efficienza di trasfezione marcando le cellule trasfettate con l'anticorpo anti-p24 di FIV. Come mostrato dalla figura 6.20, nell'area selezionata non tutte le cellule esprimevano la proteina p24, fluorescenza verde ottenuta mediante marcatura con anticorpo FITC; inoltre la localizzazione della proteina Orf-A nelle cellule trasfettate con il plasmide pΔLTR Δenv1 3' HA Orf-A era principalmente nucleare. La sovrapposizione dei colori (*merge*) mostra che nel

campo selezionato solo una parte delle cellule era trasfettatae (fluorescenza blu indicativa dei nuclei) e tra quelle trasfettate la localizzazione della proteina p24 era principalmente citoplasmatica mentre quella della proteina Orf-A (fluorescenza rossa), era nucleare. La localizzazione citoplasmatica della proteina p24 e la presenza solo in alcune cellule è confermata anche nel campione di cellule trasfettate con il plasmide p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3' HA Orf-A.

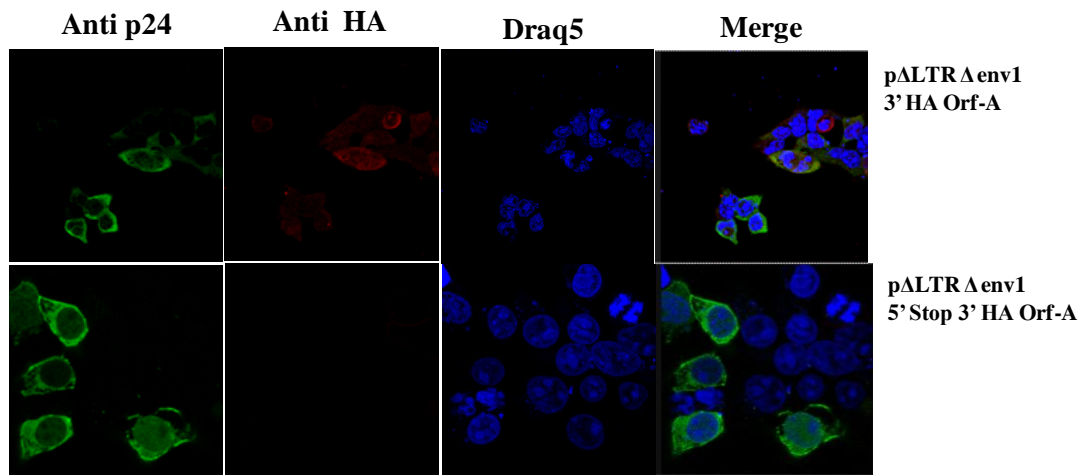


Figura 6.20 saggio di immunofluorescenza indiretta in cellule 293T. Cellule 293T trasfettate con i plasmidi p Δ LTR Δ env1 3' HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3' HA Orf-A. I campioni sono stati fissati in PFA 2%, permeabilizzati con Triton X-100 0,1%, colorati con p24 (AbD- Serotec) successivamente ibridati con fluoroforo FITC (Santa Cruz Biotechnology), anticorpo anti HA (Santa-Cruz Biotechnologies) successivamente ibridati con fluoroforo Alexa 468 (Life Technologies, Invitrogen) e con il marcatore nucleare DRAQ5 (Cell Signaling). Il MERGE rappresenta la sovrapposizione di entrambi i colori. I campioni sono stati analizzati con microscopi confocale Leica (DM IRBE) con obiettivo 40X.

Dai risultati ottenuti in seguito al saggio di immunofluorescenza sembra che la proteina Orf-A nelle cellule in cui viene espressa, si localizzi, insieme alla Ciclina-B1, nell'area nucleare. I risultati ottenuti sono a supporto del coinvolgimento della proteina Orf-A nel blocco del ciclo cellulare.

6.7 Valutazione dell'attività replicativa di FIV Orf-A *plus* e *minus*

Successivamente è stata investigata l'attività di Orf-A sulla replicazione del virus. È noto che la proteina Orf-A è necessaria per una efficiente replicazione virale in cellule target dell'infezione, linfociti T CD 4+ ma non nella linea fibroblastoide modello, CrFK (Pistello *et al.*, 2002; Pistello, 2008). Pertanto, è stata investigata la capacità replicativa impiegando i plasmidi ingegnerizzati ad esprimere Orf-A (si veda paragrafo 5.1.8, Materiali e Metodi) producendo inizialmente le particelle virali di FIV e, successivamente, infettando le cellule feline CrFK.

Il virus è stato prodotto in cellule CrFK trasfettate con i plasmidi Orf-A *plus* e *minus*, p Δ 00 3'HA Orf-A e p Δ 00 Orf-A 2 Stop. La produzione virale è stata monitorata a partire dal primo giorno dopo la trasfezione, ogni 24 ore, per 6 giorni successivi mediante saggio di attività retrotrascrittasi (si vedano paragrafi 5.2.22-24, Materiali e Metodi). Come mostrato dalla figura 6.20, il picco massimo di rilascio di attività RT è stata ottenuta dopo il quarto giorno dalla trasfezione nel caso del virus Δ 00 3' HA Orf-A, mentre la crescita del virus Δ 00 Orf-A 2 Stop era più lenta con un picco massimo di attività RT, circa 200'000 cpm/500 μ l, ottenuto dopo 6 giorni dalla trasfezione.

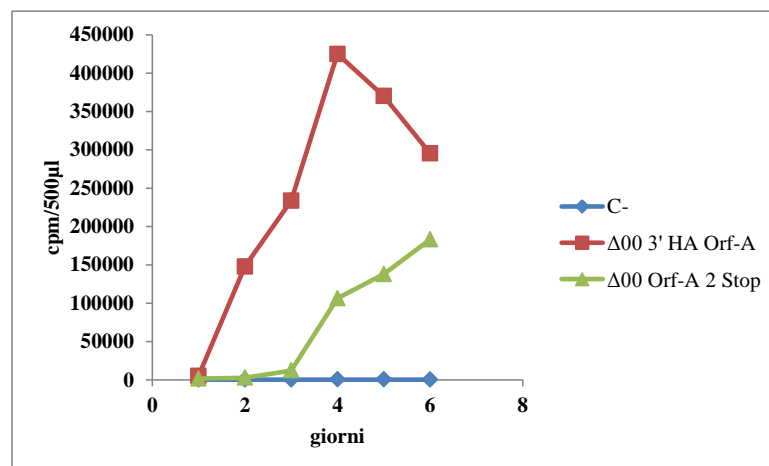


Figura 6.20: saggio di attività retrotrascrittasi in cellule feline per la produzione delle particelle virali impiegando i plasmidi p Δ 00 3'HA Orf-A e p Δ 00 Orf-A 2 Stop. Nel grafico sono riportati in ascissa i valori cpm (conte per minuto) su microlitri di surnatante analizzati. L'asse delle ordinate

indica i giorni dopo la trasfezione in cui è stato raccolto il surnatante. Il saggio è stato condotto per ogni campione in duplicato e nel grafico è riportato il valore medio.

A partire dagli stock virali ottenuti, le cellule CrFK sono state infettate (4cpm/cellula) e l'infezione è stata monitorata ogni 3 giorni, per 18 giorni mediante saggio di attività retrotrascrittasi nel surnatante.

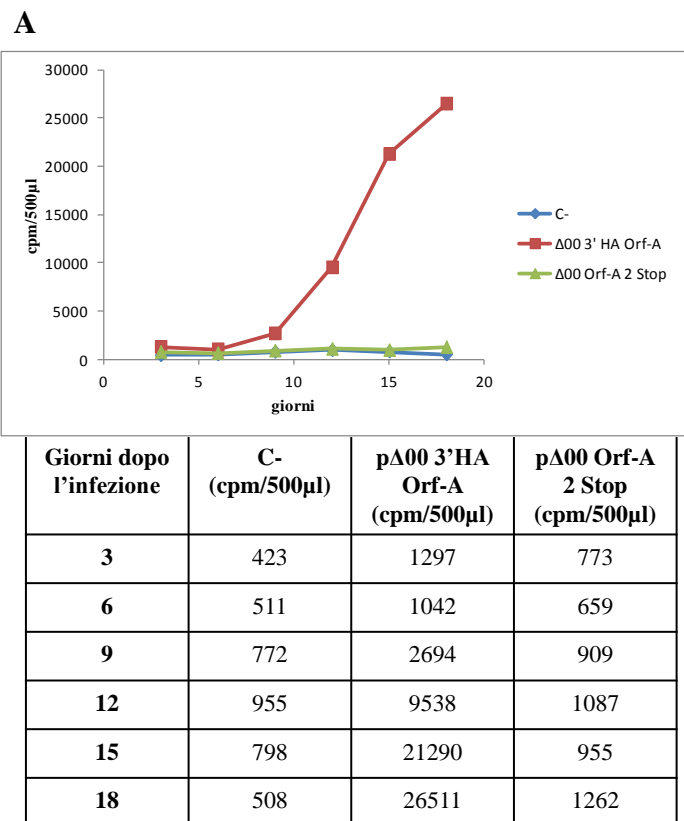


Figura 6.21: analisi dell'attività replicativa di FIV Orf-A *plus* e *minus* in cellule CrFK. **A)** Saggio RT su cellule CrFK infette con 4 cpm per cellula impiegando i virus Δ00 3'HA Orf-A e Δ00 Orf-A 2 Stop; nel grafico sono riportati in ascissa i valori cpm (conte per minuto) su 500 µl di campione analizzati. L'asse delle ordinate indica i giorni dopo l'infezione ovvero i punti di raccolta dopo l'infezione. Nella tabella sono riportati i valori (cpm) ottenuti per ogni campione ad ogni *time point*

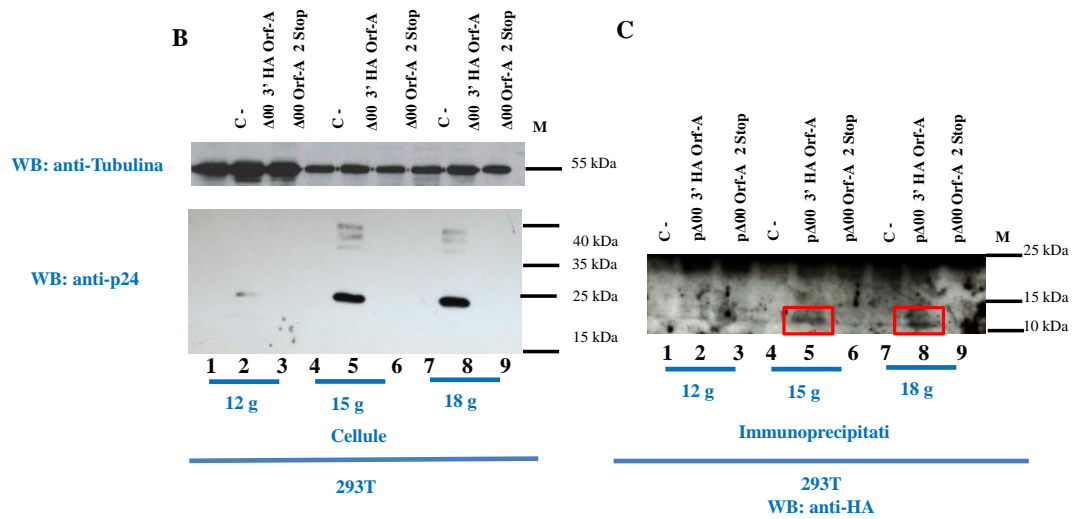


Figura 6.21. B) Western Blotting sugli estratti proteici di cellule CrFK infettate e raccolte nei *time point* 12-15-18 giorni dopo l'infezione. **Anticorpo anti-tubulina e Anticorpo anti-p24.** **C)** Western Blotting sugli immunoprecipitati di cellule CrFK infettate e raccolte nei *time point* 12-15-18 giorni dopo l'infezione. **Anticorpo anti-HA.** **M:** Marker di peso molecolare, proteine 170/130/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Come mostrato dalla figura 6.21 (pannello A), si osserva che l'attività retrotrascrittivica del virus Orf-A *plus* aumenta ad ogni *time point* rispetto a quella del virus Orf-A *minus*. L'attività replicativa del virus Orf-A *minus* rimane limitata e costante nel tempo. Inoltre è stata valutata la presenza della proteina p24 a partire dagli estratti proteici ottenuti dai campioni di cellule infettate 12, 15 e 18 giorni dopo l'infezione. Come mostrato dalla figura 6.21 (pannelli B e C), è possibile rilevare la presenza della proteina p24 in cellule CrFK infettate a partire dal quindicesimo giorno dopo l'infezione. Inoltre, è stata valutata la presenza della proteina Orf-A in seguito ad immunoprecipitazione mediante l'anticorpo anti-HA. Come mostrato dalla figura 6.21, pannello D, anche in questo caso è possibile rilevare la proteina Orf-A a partire dal quindicesimo giorno di infezione. Ulteriori studi nel contesto dell'infezione di cellule feline target naturale dell'infezione, quali i linfociti, contribuiranno a chiarire l'importanza di questa proteina come determinate dell'attività replicativa.

6.8 Saggio di incorporazione della proteina Orf-A nei virioni

Come riportato in letteratura, la proteina Vpr di HIV-1 viene incorporata nelle particelle virali (Paxton *et al.*, 1993). La presenza nel virione è alla base del coinvolgimento di Vpr nelle fasi precoci del ciclo replicativo di HIV-1, come quello di promuovere la migrazione al nucleo del complesso di preintegrazione (PIC) e la trascrizione del genoma provirale. Ci siamo quindi chiesti se la proteina Orf-A di FIV venisse incorporata nelle particelle virali. A tal fine sono state trasfettate le cellule 293T con i costrutti p Δ LTR Δ env1 3' HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3'HA Orf-A. Trentasei ore dopo la trasfezione, i surnatanti sono stati processati e purificati su cuscino di saccarosio. I lisati cellulari ottenuti sono stati immunoprecipitati con l'anticorpo anti-HA per valutare l'espressione della proteina Orf-A ed analizzati in Western Blotting. Dalla figura 6.22 pannello A, è stato possibile rilevare la presenza della proteina p24 sia nella frazione intracellulare che extracellulare suggerendo che la proteina Gag era correttamente processata e rilasciata come VLP nel surnatante. Inoltre è possibile osservare dalla figura 6.21 (pannello B), la presenza della proteina Orf-A nella frazione intracellulare (immunoprecipitati) ed extracellulare (VLP) suggerendo quindi che Orf-A è stata correttamente incorporata nelle particelle virali. Al fine di escludere il rilascio costitutivo della proteina Orf-A, cellule 293T sono state trasfettate con i trascritti SFV4.2 e SFV4.2 3' HA Orf-A. Dopo 24 ore dalla trasfezione, le cellule sono state processate per ottenere i lisati proteici ed i surnatanti sono stati raccolti e purificati su cuscino di saccarosio. Come mostrato dalla figura 6.22 (pannello C), l'espressione della proteina Orf-A è evidenziabile solo nel campione di cellule esprimenti la proteina Orf-A (cellule) e non nei surnatanti (VLP).

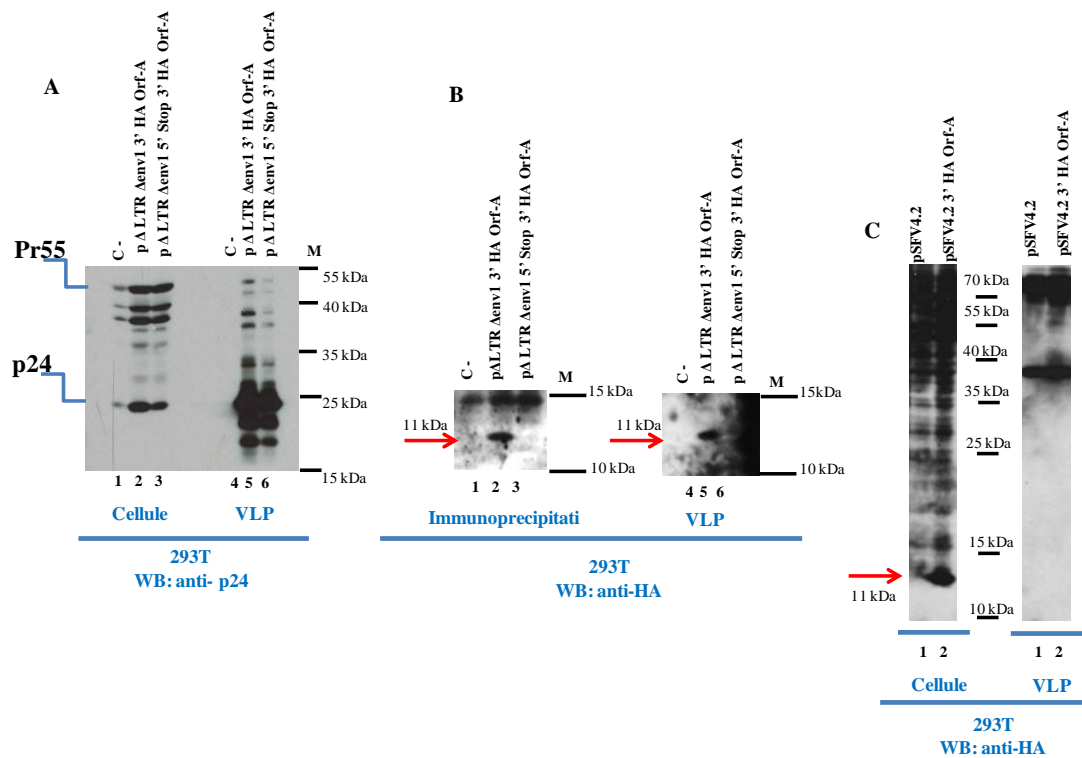


Figura 6.22: valutazione della proteina Orf-A nelle particelle virali. **A)** Western Blotting sugli estratti proteici (Cellule) e surnatanti (VLP) di cellule 293T trasfettate con i plasmidi pΔLTR Δenv1 3'HA Orf-A e pΔLTR Δenv1 5'Stop 3'HA Orf-A. **Anticorpo anti- p24.** **B)** Western Blotting sugli estratti proteici immunoprecipitati (Immunoprecipitati) e surnatanti (VLP) di cellule 293T trasfettate con i plasmidi pΔLTR Δenv1 3'HA Orf-A e pΔLTR Δenv1 5'Stop 3'HA Orf-A. **Anticorpo anti- HA.** **C)** Western Blotting sugli estratti proteici (Cellule) e surnatanti (VLP) di cellule 293T trasfettate con i trascritti SFV4.2 e SFV4.2 3' HA Orf-A. **Anticorpo anti-HA.** **M:** Marker di peso molecolare, proteine 170/130/70/55/40/35/25/15/10 kDa.

Questo risultato mostra per la prima volta in letteratura che la proteina Orf-A viene incorporata nelle particelle virali. Ulteriori studi sono necessari per stabilire i meccanismi alla base di tale incorporazione

7. DISCUSSIONE

Il Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV) costituisce nel suo ospite naturale, il gatto domestico, l'agente eziologico di una sindrome analoga a quella causata dal Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 (HIV-1) nell'uomo. Tale proprietà insieme ad una serie di caratteristiche molecolari simili tra i due virus, rende FIV un attraente modello per la ricerca sull'AIDS (Sindrome da Immunodeficienza Acquisita). FIV viene studiato per analizzare aspetti relativi alla biologia dei *lentivirus*, ed inoltre, insieme al suo ospite naturale hanno già fornito importanti delucidazioni riguardo ad aspetti rilevanti nella patogenesi dell'infezione da HIV-1 (Burkhard *and* Dean, 2003; Power *et al.*, 2004). In aggiunta, questo modello è stato proposto per testare nuovi farmaci specifici contro HIV, per l'analisi di meccanismi di resistenza e per il disegno di strategie terapeutiche e vaccinali da impiegare nel controllo dell'infezione da HIV-1 (Phillips *et al.*, 2000). Il fatto che efficaci approcci terapeutici anti-FIV possano trovare vantaggi anche nell'ambito della medicina veterinaria, aumenta il valore di questo sistema. Infine, lo sviluppo di sicuri sistemi vettoriali basati su FIV per il trasferimento genico costituisce un'altra interessante applicazione di questo *lentivirus* dei non primati.

Date le significative potenzialità e la rilevanza di FIV per la ricerca sull'AIDS, in questi anni sono stati compiuti numerosi progressi atti ad identificare i meccanismi molecolari alla base dell'infezione, in parte basati su studi comparativi condotti su HIV-1 e su altri *Retrovirus*. In questo contesto, studi sulla caratterizzazione delle proteine accessorie dei *lentivirus* che giocano un ruolo chiave nella regolazione della replicazione virale e sui meccanismi alla base dell'interazione con la cellula ospite sono stati di fondamentale importanza per l'identificazione di nuove molecole che giocano un ruolo chiave nella patogenesi del virus e che possono indirizzare lo sviluppo di nuovi farmaci, vaccini e saggi diagnostici. In questo contesto, resta ancora da caratterizzare la struttura e la/e funzione/i del gene accessorio *orf-A* di FIV.

Il progetto di ricerca svolto durante questo dottorato si è proposto di analizzare il ruolo biologico della proteina accessoria Orf-A. Il genoma di FIV è caratterizzato dalla presenza di due geni accessori, *vif* ed *orf-A*; il primo è analogo al gene accessorio *vif* di HIV-1 e codifica un fattore di infettività virale di cui sono state studiate e caratterizzate le funzioni. Al contrario la funzione biologica della proteina Orf-A non è stata ancora chiarita. Studi iniziali attribuivano alla proteina Orf-A una funzione analoga alla proteina Tat di HIV-1, come transattivatore dell'espressione genica (de Perseval and Elder, 1999; Phillips *et al.*, 1992). Altre evidenze suggerivano un coinvolgimento della proteina nelle diverse fasi del ciclo replicativo del virus come nella formazione delle particelle virali e nell'infettività, analogamente alla proteina accessoria Vif e Nef di HIV-1 (Gemeniano *et al.*, 2003). Altri studi hanno evidenziato che la proteina Orf-A era coinvolta nella regolazione dello splicing degli mRNA così come nell'induzione dell'arresto del ciclo cellulare, come Vpr di HIV-1 (Gemeniano *et al.*, 2004; Sundstrom *et al.*, 2007). La proteina Orf-A sembra quindi una proteina multifunzionale con caratteristiche in comune con più proteine accessorie di HIV-1.

In particolare Vpr ed Orf-A sembrano condividere diverse analogie tra cui un segnale di localizzazione nucleare ed uno di esporto che in Vpr è stato dimostrato essere importante per la migrazione al nucleo del complesso di pre-integrazione (Le Rouzic *et al.*, 2002), ed anche un dominio ricco in leucine responsabile del blocco del ciclo cellulare in fase G2/ M (Romani *et al.*, 2009). I segnali di esporto e di localizzazione nucleare così come il dominio ricco in leucine sono stati identificati anche nella proteina Orf-A (Gemeniano *et al.*, 2003).

Inizialmente il nostro studio si è concentrato sulla messa a punto di un sistema di espressione per la rilevazione della proteina Orf-A. È noto infatti che la proteina sebbene sia espressa durante tutto il ciclo replicativo del virus è prodotta comunque a bassi livelli sia in infezione che in trasfezione (Pistello *et al.*, 2008). Questo è probabilmente dovuto ad un elevato turnover oppure ad una bassa stabilità della proteina nella cellula (Chatterji *et al.*, 2002). Gli esperimenti sono stati condotti su due linee cellulari ed in particolare in cellule 293T, cellule embrionali di rene umano,

scelte perché normalmente utilizzate per lo studio di HIV-1 e per la produzione dei vettori lentivirali ed in cellule CrFK, fibroblasti della porzione corticale di gatto che rappresentano le cellule d'elezione per lo studio di questo virus. Il primo sistema di espressione ha previsto l'impiego di un vettore eucariotico ed il promotore del Citomegalovirus umano per la regolazione dell'espressione di Orf-A ed era caratterizzato dalla fusione di Orf-A sia all'estremità 3' che 5' con l'epitopo dell'emagglutinina (HA). I risultati ottenuti con questo sistema di espressione hanno mostrato che la proteina era rilevabile solo dopo immunoprecipitazione in Western Blot. Per questo motivo è stato deciso di impiegare un altro sistema di espressione già dimostrato come altamente efficiente per l'espressione di proteine, basato sulla replicasi del Virus della Foresta del Semliki (SFV). Il sistema si basa sulla replicazione esclusivamente citoplasmatica di SFV che consente di superare i problemi di riduzione dell'espressione genica legati alla disponibilità di fattori di trascrizione nucleari ed ai fenomeni di *splicing*, svincolando l'espressione dei trascritti lentivirali dal trasporto nucleo-citoplasma. Allo scopo di ottimizzare l'efficienza di espressione e di valutare un coinvolgimento della proteina Orf-A nel blocco del ciclo cellulare sono stati sviluppati vettori chimerici tra FIV e SFV. In particolare, le chimere SFV-FIV sono state disegnate in modo tale da garantire l'espressione di Orf-A sotto il controllo trascrizionale di SFV. Inizialmente è stata analizzata la capacità replicativa della chimera SFV-FIV in cellule embrionali renali umane. La ricerca della proteina Orf-A mediante Western Blotting dei lisati cellulari ed anche in seguito a marcatura con il fluoroforo Ficoeritina al FACs ha permesso di verificare l'avvenuta espressione della proteina. I risultati ottenuti indicano che la replicasi di SFV è in grado di regolare la replicazione della chimera virale secondo le stesse modalità di un genoma SFV *wild type*. Successivamente al fine di ottimizzare il sistema di espressione sono state prodotte particelle virali chimeriche SFV-FIV, costituite dal punto di vista strutturale da elementi propri di SFV e contenenti come genoma la chimera SFV-Orf-A. Le particelle ricombinanti sono state prodotte associando al replicone le componenti *helper* esprimenti le proteine strutturali di SFV ed utilizzando cellule fibroblastoidi di rene di criceto BHK-21 (Perri *et*

al., 2000) che rappresentano il sistema cellulare di elezione, per la produzione di particelle ricombinanti SFV (Liljeström *and* Garoff, 1992). Questo sistema ha consentito la produzione di particelle chimeriche SFV-FIV. In seguito, utilizzando le particelle ricombinanti SFV-Orf-A è stato possibile trasferire il replicone chimerico in cellule 293T mediante un normale processo di trasduzione. In seguito alla marcatura della proteina Orf-A, con anticorpo fluoresceinato, e alla marcatura del nucleo, con ioduro di propidio, al FACs, è stato possibile rilevare la e valutare la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Dai risultati ottenuti è stato possibile rilevare che le cellule HA-positive, e quindi esprimenti la proteina Orf-A, erano bloccate in fase G2/M. Nel complesso i risultati ottenuti indicano che il sistema basato sulla replicasi di SFV permette una efficiente espressione della proteina Orf-A. Inoltre il sistema utilizzato ci ha permesso di valutare il coinvolgimento della proteina Orf-A nel blocco del ciclo cellulare.

Nella seconda parte di questo progetto abbiamo investigato il ruolo della proteina Orf-A nel blocco del ciclo cellulare in un contesto più “fisiologico” ovvero impiegando vettori di espressione che esprimevano il genoma provirale. Sono stati quindi ottenuti plasmidi caratterizzati dalla presenza del *tag* HA all'estremità 3' del gene, Orf-A *plus*, ed anche una versione in cui la proteina non veniva tradotta in cui è stato inserito un codone di Stop al 5' subito dopo il codone di inizio della traduzione, Orf-A *minus*.

I plasmidi ottenuti, Orf-A *plus* e *minus*, sono stati p Δ LTR 3' HA Orf-A e p Δ LTR 5' Stop 3' HA Orf-A, rispettivamente, esprimevano l'intero genoma provirale sotto il controllo trascrizionale del promotore hCMV al 5' ed il segnale di poliadenilazione del BgH all'estremità 3' della LTR. Il vantaggio ottenuto dall'impiego di questi costrutti derivava dalla possibilità di poterli impiegare in cellule modello umane poichè le LTR feline in cellule 293T non sono attive (Poeschla *and* Looney, 1998). Infine un'altra coppia di vettori Orf-A *plus* e *minus* è stata ottenuta impiegando come plasmide il p Δ LTR Δ env1 che differisce dal p Δ LTR per la presenza di una delezione di una kilobase nel gene *env* (p Δ LTR Δ env1 3' HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 5' Stop 3' HA Orf-A). Il vantaggio di quest'ultima coppia di plasmidi è rappresentata dalla

rimozione dell'effetto citopatico causato dal gene *env* nelle cellule umane (Poeschla *and* Looney, 1998). La funzionalità di tutti i plasmidi è stata testata in cellule embrionali di rene umane, su estratti proteici e dopo immunoprecipitazione, mediante Western Blotting. I risultati ottenuti confermavano la presenza della proteina Orf-A sia nei lisati cellulari che dopo immunoprecipitazione. Inoltre l'espressione è stata valutata anche in seguito a saggi citofluorimetrici. In questo contesto sono stati però impiegati solo i plasmidi contenenti la delzione di una kb nel gene *env*, in quanto l'effetto citopatico per la formazione dei sincizi causato dalle glicoproteine dell'envelope (Poeschla *and* Looney, 1998) non consentiva l'analisi del ciclo cellulare. Successivamente, è stata valutata la distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo cellulare nella popolazione di cellule trasfettate in seguito a marcatura con Ioduro di Propidio, ed i risultati ottenuti mostrano un arresto in fase G2/M nelle cellule esprimenti la proteina Orf-A. Per circoscrivere alla sola proteina Orf-A l'effetto osservato è stata valutata anche l'espressione e la relativa distribuzione delle cellule nel ciclo cellulare analizzando la proteina Gag p24 di FIV. In seguito alla marcatura con anticorpi specifici e colorazione del nucleo per valutare il ciclo cellulare, è stato riscontrato che nella popolazione di cellule positive alla proteina p24 nel contesto del plasmide Orf-A *minus* non si osservano variazioni nella distribuzione delle cellule nelle diverse fasi del ciclo. Al contrario, nel contesto del plasmide Orf-A *plus*, nella popolazione positiva alla p24 la percentuale di cellule in fase G2/M era significativamente più alta rispetto ai controlli oppure rispetto alle cellule trasfettate con il plasmide Orf-A *minus*. Il risultato ottenuto si può spiegare considerando che nel contesto di cellule trasfettate con il plasmide Orf-A *plus* nella popolazione p24 positiva è da includere quella popolazione di cellule (27%, si veda paragrafo 4.4 e figura 6.14) che esprime la proteina Orf-A. Inoltre nella popolazione di cellule p24 positive non era possibile discriminare tra le cellule che esprimevano sia la proteina p24 che Orf-A in quanto non tutte le cellule p24 positive, quindi trasfettate, esprimevano anche la proteina Orf-A poiché questa è soggetta ad un rapido turnover oppure viene degradata molto velocemente (Chatterji *et al.*, 2002; Gemeniano *et al.*, 2003). Quindi le differenze osservate tra il campione di cellule p24

positive ed Orf-A *plus* rispetto al campione di cellule p24 positive Orf-A *minus* sono da attribuire all'espressione della proteina Orf-A.

La funzionalità dei plasmidi provirali p Δ 00 3' HA Orf-A e p Δ 00 5' Stop 3' HA Orf-A è stata testata in cellule feline CrFK. I risultati ottenuti per valutare l'espressione della proteina Orf-A confermano l'effettiva espressione della proteina. Inoltre gli esperimenti condotti in citofluorimetria per valutare l'espressione della proteina Orf-A e p24 e successiva analisi del ciclo cellulare hanno confermato i risultati ottenuti nelle cellule 293T. Mediante saggi di immunofluorescenza è stata investigata la localizzazione della proteina Orf-A e della Ciclina B1. I risultati ottenuti, come mostrato dalle immagini di immunofluorescenza, evidenziano che la proteina Orf-A ha una localizzazione nucleare, in linea con quanto riportato nelle cellule di scimmia dallo studio condotto da Gemeniano nel 2004. Inoltre la localizzazione della Ciclina-B1 nel contesto di cellule trasfettate ed esperimenti la proteina Orf-A sembra essere nucleare. La co-localizzazione delle proteine Ciclina-B1 ed Orf-A nel nucleo supporta i dati ottenuti in citofluorimetria e suggerisce che la proteina Orf-A blocca il ciclo cellulare in fase G2/M. Sebbene sia già stato riportato, nei lavori condotti da Gemeniano nel 2004 e confermati da Sundstrom nel 2009, che la proteina Orf-A influenza il ciclo cellulare arrestandolo in fase G2/M, il nostro studio dimostra per la prima volta che tale blocco si verifica nel contesto in cui viene espresso l'intero genoma provirale, sia in cellule umane che feline.

È noto che la proteina Orf-A è necessaria per una efficiente replicazione virale in cellule target dell'infezione, linfociti T CD4-positivi ma non nella linea modello CrFK (Pistello *et al.*, 2002; Pistello, 2008). Pertanto, è stata investigata la capacità replicativa impiegando i plasmidi ingegnerizzati p Δ 00 3' HA Orf-A e p Δ 00 Orf-A 2Stop producendo inizialmente le particelle virali FIV e successivamente infettando le cellule feline CrFK. I risultati ottenuti hanno evidenziato che i virus Orf-A *plus* e *minus*, prodotti nelle cellule CrFK hanno diversa cinetica di crescita, in linea con quanto riportato dalla letteratura (Pistello *et al.*, 2002) e che le particelle virali sono infettive. Ulteriori studi nel contesto dell'infezione di cellule feline che rappresentano il target naturale dell'infezione, quali i linfociti, sono necessari per

chiarire l'importanza della proteina Orf-A come determinante dell'attività replicativa di FIV.

Infine è stata valutata l'incorporazione della proteina Orf-A nelle particelle virali come riportato dalla letteratura per la proteina Vpr di HIV-1 (Paxton *et al.*, 1993). Infatti, nel contesto di HIV-1, la presenza di Vpr nel virione è alla base del suo coinvolgimento nelle fasi precoci del ciclo replicativo, come quello di promuovere la migrazione al nucleo del PIC e la trascrizione del genoma provirale (Jenkins *et al.*, 1998). I risultati ottenuti con i vettori p Δ LTR Δ env1 3'HA Orf-A e p Δ LTR Δ env1 5'Stop 3'HA Orf-A rilevano la presenza della proteina Orf-A nella particelle virali. Saranno necessari studi per identificare e mappare i domini d'interazione tra le regioni Gag-Pol ed Orf-A. Infatti, nel contesto di HIV-1, l'analisi mutazionale a carico di Gag ha portato all'identificazione di brevi sequenze amminoacidiche essenziali per un efficiente rilascio delle particelle virali (Göttlinger *et al.*, 1991; Wills *et al.*, 1994, Huang *et al.*, 1995). Tali motivi sono stati denominati *Late assembly domains* (*L- domains*) per indicare la loro funzione nelle fasi tardive del ciclo replicativo virale (Freed, 2002; Bieniasz, 2006). Nel contesto di HIV-1, l'*L-domain* identificato è il motivo P-T/S-A-P localizzato nella regione carbossi-terminale del dominio p6 di Gag. Inoltre, a valle di questa sequenza, la regione L-X-S-L è stata dimostrata essere responsabile dell'interazione tra la poliproteina Gag e la proteina Vpr di HIV-1. La sequenza L-X-S-L non è necessaria per il rilascio ma è essenziale per l'incorporazione di Vpr nelle particelle virali (Kondo *et al.*, 1995). Nel contesto di FIV la regione p2, situata all'estremità carbossi-terminale del precursore Gag rappresenta la controparte p6 di HIV-1. Studi condotti sugli *L-domain* di FIV hanno dimostrato che anche in questo *lentivirus* il motivo PSAP è essenziale per il rilascio dei virioni assemblati dalle cellule infettate mediante l'interazione con fattori dell'ospite (Luttge *et al.*, 2008; Calistri *et al.*, 2009). La seconda sequenza della regione p2 identificata è il motivo LLDL che come dimostrato per il Gag di HIV-1, potrebbe essere importante per l'interazione con la proteina Orf-A e la sua conseguente incorporazione. Sono già disponibili in laboratorio mutanti *gag* a livello del motivo LLDL in vettori provirali Orf-A *plus* e *minus* con l'epitopo

dell'emagglutinina, che verranno utilizzati al fine di determinare la loro funzionalità ed identificare i domini responsabili per l'incorporazione.

Dai risultati ottenuti si evince che la proteina Orf-A di FIV riveste molteplici ruoli, rilevandosi una proteina multifunzionale. Nel complesso i nostri risultati suggeriscono che l'espressione della proteina Orf-A è in grado di bloccare il ciclo cellulare nella fase G2/M indicando un ruolo di Orf-A simile a quello descritto per la proteina Vpr di HIV-1. Inoltre riportiamo per la prima volta l'incorporazione della proteina Orf-A nelle particelle virali. I risultati ottenuti contribuiscono a chiarire le funzioni svolte dalla proteina Orf-A ed ulteriori studi sono mirati a stabilire i determinanti cellulari e/o virali di interazione con questa proteina sia nel contesto del blocco del ciclo cellulare sia nel contesto dell'incorporazione.

Le analogie con le proteine accessorie di HIV-1 ed in particolare con Vpr rendono Orf-A un target interessante di studio per la comprensione della biologia di base del virus, per l'identificazione di nuovi target terapeutici e per lo sviluppo di vettori retrovirali per il trasferimento di geni o proteine a scopo vaccinale e terapeutico.

8. BIBLIOGRAFIA

- Andersen J.L., Le Rouzic E., Planelles V.,** 2008.HIV-1 Vpr: mechanisms of G2 arrest and apoptosis. *Exp Mol Pathol.* 85: 2-10.
- Aiken C., Konner J., Landau N. R., Lenburg M. E., Trono D.,** 1994. Nef induces CD4 endocytosis: requirement for a critical dileucine motif in the membrane-proximal CD4 cytoplasmic domain. *Cell* 76 (5):853-64.
- Andrew A., Strebel K.,** 2010. HIV-1 Vpu targets cell surface markers CD4 and BST-2 through distinct mechanisms. *Mol Aspects Med.* 31:407-17.
- Beatty J.A., Willett B.J., Gault E.A., Jarrett O.,** 1996. A longitudinal study of Feline Immunodeficiency Virus-specific cytotoxic T lymphocytes in experimentally infected cats, using antigen-specific induction. *J. Virol.* 70: 6199-6206.
- Beebe A.M., Dua N., Faith T.G., Moore P.F., Pedersen N.C., Dandekar S.,** 1994. Primary stage of Feline Immunodeficiency Virus infection: viral dissemination and cellular targets. *J. Virol.* 68: 3080-3091.
- Bendinelli, M., Pistello, M., Lombardi, S., Poli, A., Garzelli, C., Matteucci, D., Ceccherini-Nelli, L., Malvaldi, G., Tozzini, F.,** 1995. Feline immunodeficiency virus: an interesting model for AIDS studies and an important cat pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 8: 87-112.
- Berkhout B., Gatignol A., Rabson A.B., Jeang K.T.,** 1990. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter. *Cell* 62: 757-67.
- Bouer S., Strebel K.,** 1995. The Human Immunodeficiency Virus (HIV) type 2 envelope protein is functional complement to HIV type 1 Vpu that enhances particle release of heterologous retroviruses. *J.Virol.* 70: 8285-8300.
- Calistri A., Del Vecchio C., Salata C., Celestino M., Celegato M., Göttlinger H., Palù G., Parolin C.,** 2009.Role of the feline immunodeficiency virus L-domain in the presence or absence of Gag processing: involvement of ubiquitin and Nedd4-2s ligase in viral egress. *J Cell Physiol.* 218:175-82.
- Chatterji U., de Parseval A., Elder J.H.,** 2002. Feline Immunodeficiency Virus Orf-A is distinct from other lentivirus transactivators. *J.Virol.*76: 9624-9634.
- Cohen E.A., Subbramanian R.A., Gottlinger H.G.** 1996. Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 214: 219-235,.

- Connor R.I., Chen B.K., Choe S. and Landau N.R.,** 1995. Vpr is required for efficient replication of the human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes. *Virology*, 206(2):935-44.
- Cullen B. R.,** 1994. The role of Nef in the replication cycle of the human and simian immunodeficiency viruses. *Virology* 205: 1-6.
- De Hart J.L., Zimmerman E.S., Ardon O., Monteiro-Filho C.M., Argañaraz E.R., Planelles V.,** 2007. HIV-1 Vpr activates the G2 checkpoint through manipulation of the ubiquitin proteasome system. *Virol J.* ;4:57.
- De Hart J.L., Planelles V.,** 2008. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr links proteasomal degradation and checkpoint activation. *J Virol.*82:1066-72.
- Doy C., Doorbar J.,** 2007. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology* 368: 219-226.
- De Parseval A., Elder J.H.,** 1999. Demonstration that orf2 encodes the feline immunodeficiency virus transactivating (Tat) protein and characterization of a unique gene product with partial rev activity. *J Virol.* 73:608-17.
- De Parseval A., Chatterji U., Sun P., Elder J.H.,** 2004. Feline Immunodeficiency Virus targets activated CD4+ T cells by using CD134 as a binding receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 13044-13049.
- Dubé M., Bego M. G., Paquay C., Cohen E. A.,** 2010. Modulation of HIV-1-host interaction: role of the Vpu accessory protein. *Retrovirology* 7: 114.
- Dunham S.,** 2006. Lesson from the cat: Development of vaccines against lentivirus. *J. Vet. Imm.* 112: 67-77.
- Elder J. H., Sundstrom M., de Rozieres S., de Parseval A., Grant C. H., Lin Y. C.,** 2008. Molecular mechanisms of FIV infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123:3-13.
- Gemeniano M. C., Saway E. T., Leutenegger C. M., Sparger E. E.,** 2003. Feline Immunodeficiency Virus Orf-A Is Required for Virus Particle Formation and Virus Infectivity. *J.Virol.* 77: 88119-8830.
- Gemeniano M. C., Saway E. T., Sparger E. E.,** 2004. Feline Immunodeficiency Virus Orf-A localizes to the nucleus and induces cell cycle arrest. *Virology* 325:167-174.

- Goff S.P.**, 2001. In: Knipe D.M, Howley P.M. *et al.* (Eds), Fields Virology, Fourth Edition, Volume 2, Chapter 57, Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia, pp.1871-1939.
- Goto Y., Nishimura Y., Mizuno T., Endo Y., Baba K., Momoi Y.**, 2000. Quantification of viral ribonucleic acid in plasma of cats naturally infected with feline immunodeficiency virus. *Am. J. Vet. Res.* 61: 1609-1613.
- Greenway A.L., McPhee D.A., Grgacic E., Hewish D., Lucantoni A., Macreadie I., Azad A.**, 1994. Nef 27, but not the Nef 25 isoform of human immunodeficiency virus-type 1 pNL4.3 down-regulates surface CD4 and IL-2R expression in peripheral blood mononuclear cells and transformed T cells. *Virology.* 198: 245-56.
- Groschel B., Bushman F.**, 2005. Cell cycle arrest in G2/M promotes early steps of infection by human immunodeficiency virus. *J Virol.* 79:5695-704.
- Hong Y., Fink E., Hu Q.Y., Kiosses W. B., Elder J.H.**, 2010. Orf-A Downregulates Feline Immunodeficiency Virus Primary Receptor CD134 on the Host Cell Surface and Is Important in Viral Infection. *J.Virol.* 84: 7225-7232.
- Inoshima Y., Ikeda Y., Kohmoto M., Pecoraro M.R., Shimojima M., Shimojima Y., Inada G., Kawaguchi Y., Tomonaga K., Miyazawa T., Mikami T.**, 1996. Persistence of high virus neutralizing antibody titers in cats experimentally infected with feline immunodeficiency virus. *J Vet Med Sci.* 58 :925-7.
- Kenyon J.C., Lever A.M.**, 2011. The molecular biology of feline immunodeficiency virus (FIV). *Viruses* 3: 2192-213.
- Kirchhoff F.**, 2010. Immune Evasion and Counteraction of Restriction Factors. *Cell Host & Microbe* 8.
- Lanuti P, Marchisio M, Cantilena S, Paludi M, Bascelli A, Gaspari AR, Grifone G, Centurione MA, Papa S, Di Pietro R, Cataldi A, Miscia S, Bertagnolo V. ,** 2006. A flow cytometry procedure for simultaneous characterization of cell DNA content and expression of intracellular protein kinase C-zeta. *J Immunol Methods.* 315:37-48.
- Le Rouzic E., Mousnier A., Rustum C., Stutz F., Hallberg E., Dargemont C., Benichou S.**, 2002. Docking of HIV-1 Vpr to the nuclear envelope is mediated by the interaction with the nucleoporin hCG1. *J Biol Chem.* 277:45091-8.
- Lecollinet S., Richardson J.**, 2008. Vaccination against the feline immunodeficiency virus: the road not taken. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 31:167-90.

- Lecossier D., Bouchonnet F., Clavel F., Hance A. J.,** 2003. Hypermutation of HIV-1 DNA in the absence of the Vif protein. *Science*, 300: 1112.
- Lee S.H., Laltoo M., Crocker J.F., Rozee K.R.,** 1980. Emulsifiers that enhance susceptibility to virus infection: increased virus penetration and reduced interferon response *Appl Environ Microbiol.* 40:787-93.
- Li L., Liang D., Li J. Y., Zhao R. Y.,** 2008. APOBEC3G-UBA2 fusion as a potential strategy for stable expression of APOBEC3G and inhibition of HIV-1 replication. *Retrovirology* 4: 5-72.
- Liljeström P., Garoff H.,** 1992. *Technical Manual of SFV Expression Systems*, 1st ed. Life Technologies.
- Lin YC, Beck Z, Morris GM, Olson AJ, Elder JH.** 2003. Structural basis for distinctions between substrate and inhibitor specificities for Feline Immunodeficiency Virus and Human Immunodeficiency Virus proteases. *J. Virol.* 77: 6589-6600.
- Lockridge K. M. , Chien M., Dean G. A., Stefano Cole K., Montelaro R. C., Luciw P. A., Sparger E. E.,** 2000. Protective immunity against feline immunodeficiency virus induced by inoculation with vif-deleted proviral DNA. *Virology.* 273(1):67-79.
- Lundstrom K.,** 1997. Alphaviruses as expression vectors. *Curr Opin Biotech* 8: 578-582.
- Lundstrom K., Schweitzer C., Rotmann D., Hermann D., Schneider E.M., Ehrenguber M.U.,** 2001. Semliki forest vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery. *FEBS Lett* 504: 99-103.
- Luttge B.G., Freed E.O.,** 2010. FIV Gag: virus assembly and host-cell interactions. *Vet Immunol Immunopathol.* 134:3-13
- Maekawa T., Itoh F., Okamoto T., Kurimoto M., Imamoto F., Ishii S.,** 1989. Identification and purification of the enhancer-binding factor of human immunodeficiency virus-1. Multiple proteins and binding to other enhancers. *J Biol Chem.* 264:2826-31.
- Matsuda M., Arai A., Nakamura Y., Fujisawa R., Masuda M.,** 2009. Host cell-specific effects of lentiviral accessory proteins on the eukaryotic cell cycle progression. *Microbest. Infec.* 2009 11:646-53

- Morikawa S., Booth T.F., Bishop D.H.**, 1991. Analyses of the requirements for the synthesis of virus-like particles by Feline Immunodeficiency Virus gag using baculovirus vectors. *Virology* 183: 288-297.
- Morikawa S and Bishop DHL.** 1992. Identification and analysis of the gag-pol ribosomal frameshift site of feline immunodeficiency virus. *Virology* 186: 389-397.
- Manrique M.L, Celma C.C., Gonzàles S.A., Affranchino L.**, 2001. Mutational analysis of feline immunodeficiency virus matrix protein. *Virus Res.* 76: 103-113.
- Manrique ML, Gonzalez SA, Affranchino JL.** 2004. Functional relationship between the matrix proteins of feline and simian immunodeficiency viruses. *Virology* 329: 157-167.
- Miller D.L., Taylor S.K., Rotstein D.S., Pough M.B., Barr M.C., Baldwin C.A., Cunningham M., Roelke M., Ingram D.**, 2006. Feline Immunodeficiency Virus and Puma Lentivirus in Florida panthers (*Puma concolor coryi*): epidemiology and diagnostic issues. *Vet. Res. Commun.* 30: 307-317.
- Mooij P. and Heeney J.L.**, 2001. Rational development of prophylactic HIV vaccines based on structural and regulatory proteins. *Vaccine* 20: 304-321.
- Musey L., Hughes J., Schacker T., Shea T., Corey L., McElrath M.J.**, 1997. Cytotoxic- T-cell responses, viral load, and disease progression in early Human Immunodeficiency Virus type 1 infection. *New Engl. J. Med.* 337: 1267-1274.
- Muthumani K., Choo A. Y., Hwang D. S., Chattergoon M. A., Dayes N. N., Zhang D., Lee M. D., Duvvuri U., Weiner D. B.**, 2003. Mechanism of HIV- 1 viral protein R-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 304(3):583-92.
- Pancino G, Fossati I, Chappey C, Castelot S, Hurtrel B.** 1993. Structure and variations of feline immunodeficiency virus envelope glycoproteins. *Virology* 192: 659-662.
- Parada C.A., Roeder R.G.**, 1996. Enhanced processivity of RNA polymerase II triggered by Tat-induced phosphorylation of its carboxy-terminal domain. *Nature.* 384:375-8.
- Payne SL and Elder JH.** 2001. The role of retroviral dUTPases in replication and virulence. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2: 381-388.

- Paxton W., Connor R.I., Landau N.R.**, 1993. Incorporation of Vpr into human immunodeficiency virus type 1 virions: requirement for the p6 region of gag and mutational analysis. *J Virol.* 7 :7229-37.
- Paterson D.J., Jefferies W.A., Green J.R., Brandon M.R., Corthesy P., Puklavec M., Williams A.F.**, 1987. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol. Immunol.* 24: 1281-1290.
- Pedersen N.C., Ho E.W., Brown M.L., Yamamoto J.K.**,1987. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. *Science.* 235:790-793.
- Piller S.C., Jans P., Gage P.W., Jans D.A.**, 1993. Extracellular HIV-1 virus protein R causes a large inward current and cell death in cultured hippocampal neurons: implications for AIDS pathology. *Proc Natl Acad Sci* 95: 4595-600.
- Phillips T.R., Lamont C., Konings D.A., Shacklett B.L., Hamson C.A., Luciw P.A., Elder J.H.**, 1992. Identification of the Rev transactivation and Rev-responsive elements of feline immunodeficiency virus. *J Virol.* 66: 5464-71.
- Phillips T.R., Billaud J.N., Henriksen S.J.**, 2000. Methamphetamine and HIV-1: potential interactions and the use of the FIV/cat model. *J Psychopharmacol.* 14: 244-50.
- Pistello M., Moscardini M., Mazzetti P., Bonci F., Zaccaro L., Isola P., Freer G., Specter S., Matteucci D., Bendinelli M.**, 2002. Development of feline immunodeficiency virus ORF-A (tat) mutants: in vitro and in vivo characterization. *Virology* 298:84-95.
- Pistello M.** 2008. Should accessory proteins be structural components of lentiviral vaccines? Lessons learned from the accessory ORF-A protein of FIV. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 123: 144-149.
- Planelles V., Jowett J.B., Li Q.X., Xie Y., Hahn B., Chen I. S.**, 1996. Vpr-induced cell cycle arrest is conserved among primate lentiviruses. *J Virol.* 70(4):2516-24.
- Poeschla E.M., Looney D.J.**, 1998. CXCR4 Is Required by a Nonprimate Lentivirus: Heterologous Expression of Feline Immunodeficiency Virus in Human, Rodent, and Feline Cells. *J. Virol.* 72: 6858-6866.
- Romani B., Engelbrecht S.**, 2009. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr: functions and molecular interactions. *J Gen Virol.*8:1795-805.

- Sauter S.L. and Gasmi M.** 2001. FIV vector systems. *Somat. Cell. Mol. Genet.* 26: 99-129.
- Saenz D.T. and Poeshla E.M.,** 2004. FIV: from lentivirus to lentivector. *J. Gene Med.* 6: 95-104
- Sheehy A.M., Gaddis N.C., Choi J.D., Malim M.H.,** 2002. Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature.* 418: 646-650.
- Shimajima M., Miyazawa T., Ikeda Y., McMonagle E.L., Haining H., Akashi H., Takeuchi Y., Hosie M.J., Willett B.J.,** 2004. Use of CD134 as a primary receptor by the Feline Immunodeficiency Virus. *Science* 303: 1192-1195.
- Schwartz O., Maréchal V., Le Gall S., Lemonnier F., Heard J.M.,** 1996. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med.*; 2: 338-42.
- Song W., Collisson E.W., Billingsley P.M., Brown W.C.,** 1992. Induction of Feline Immunodeficiency Virus-specific cytolytic T-cell responses from experimentally infected cats. *J. Virol.* 66: 5409-5417.
- Sparger EE, Shacklett BL, Renshaw-Gegg L, Barry PA, Pedersen NC, Elder JH, Luciw PA.** 1992. Regulation of gene expression directed by the long terminal repeat of the Feline Immunodeficiency Virus. *Virology* 187: 165-177.
- Sundstrom M., Chatterji U., Schaffer L., de Rozières S., Elder J.H.,** 2007. Feline Immunodeficiency Virus Orf-A alters gene expression and proteasome-ubiquitination proteins. *Virology* 371: 394-404.
- Suzuki T, Yamamoto N, Nonaka M, Hashimoto Y, Matsuda G, Takeshima SN, Matsuyama M, Igarashi T, Miura T, Tanaka R, Kato S, Aida Y.,** 2009. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) nuclear import via Vpr-Importin alpha interactions as a novel HIV-1 therapy *Biochem Biophys Res Commun.* 380:838-43.
- Talbott R.L., Sparger E.E., Lovelace K.M., Fitch W.M., Pedersen N.C., Luciw P.A.,** 1989. Nucleotide sequence and genomic organization of Feline Immunodeficiency Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 56: 5743-5747.
- Tomonaga K., Miyazawa T., Sakuragi J., Mori T., Adachi A., Mikami T.,** 1993. The feline immunodeficiency virus ORF-A gene facilitates efficient viral

replication in established T-cell lines and peripheral blood lymphocytes. *J Virol.* 67 :5889-95.

Tomonaga K., Shin Y.S., Fukasawa M., Miyazawa T., Adachi A., Mikami T., 1993. Feline immunodeficiency virus gene expression: analysis of the RNA splicing pattern and the monocistronic rev mRNA. *J Gen Virol.* 74: 2409-17

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

Yamamoto J.K., Sanou M.P., Abbott J.R., Coleman J.K., 2010. Feline Immunodeficiency Virus Model for Designing HIV/AIDS Vaccines. *Current HIV Research*, 8: 14-25.

Waters AK, De Parseval AP, Lerner DL, Neil JC, Thompson FJ, Elder HH. 1996. Influence of ORF2 on host cell tropism of Feline Immunodeficiency Virus. *Virology.* 215: 10-16.

Willett B.J., Cannon C.A., Hosie M.J., 2003. Expression of CXCR4 on feline peripheral blood mononuclear cells: effect of Feline Immunodeficiency Virus infection. *J. Virol.* 77: 709-712. 165.

Sjöberg M., Suomalainen M., Garoff H., 1994. A significantly improved semliki forest virus expression system based on translation enhancer segments from the viral capsid gene. *Biotechnology (NY)* 12: 1127-1131.

Smerdou C., Liljeström P., 1999. Two-helper RNA system for production of recombinant semliki forest virus particles. *J Virol* 73: 1092-1098.

Wahlfors J.J., Zullo S.A., Loimas S., Nelson D.M., Morgan R.A., 2000. Evaluation of recombinant alphaviruses as vectors in gene therapy. *Gene Ther* 7: 472-480.

Zhang S., Feng Y., Narayan O., Zhao L.J., 2001. Cytoplasmic retention of HIV-1 regulatory protein Vpr by protein-protein interaction with a novel human cytoplasmic protein VprBP. *Gene* 263:131-40.