



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

SEDE AMMINISTRATIVA: UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
DIPARTIMENTO DI ISTOLOGIA, MICROBIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE MEDICHE

DOTTORATO DI RICERCA IN VIROLOGIA E BIOTECNOLOGIE
MICROBICHE XX CICLO

STUDIO DEI MECCANISMI MOLECOLARI ALLA BASE DEL COINVOLGIMENTO DELLA PROTEINA NEF DI HIV-1 NELLA DEMENZA ASSOCIATA AD HIV-1 (HAD).

Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Supervisore: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Dottorando : DOTT.SSA VALERIA BERGONZINI

31 gennaio 2008

INDICE

1. SOMMARIO	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUZIONE	5
3.1. HIV-1	5
3.2. HIV-1 E SISTEMA NERVOSO CENTRALE (SNC)	8
3.2.1. <i>Classificazione del SNC</i>	8
3.2.2. <i>Infezione del SNC da parte di HIV-1</i>	9
3.2.3. <i>Aspetti patologici della demenza associata ad HIV-1 (HAD)</i>	11
3.2.4. <i>Aspetti biologici della HAD</i>	13
3.3. PROTEINE DI INTERESSE	15
3.3.1. <i>La proteina Nef di HIV-1</i>	15
3.3.2. <i>La proteina cellulare Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)</i>	18
4. SCOPO DELLA TESI	21
5. MATERIALI E METODI	23
5.1. MATERIALI	23
5.1.1. <i>Linee Cellulari</i>	23
5.1.2. <i>Plasmidi</i>	23
5.1.3. <i>Oligonucleotidi innesco</i>	26
5.2. METODI	28
5.2.1. <i>Preparazione del DNA plasmidico</i>	28
5.2.2. <i>Restrizioni enzimatiche</i>	29
5.2.3. <i>Tecniche di clonaggio</i>	29
5.2.4. <i>Competenza e trasformazione batterica</i>	30
5.2.5. <i>Sequenziamento dei plasmidi</i>	31
5.2.6. <i>Reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR)</i>	32
5.2.7. <i>Estrazione dell'RNA e RT-PCR</i>	33
5.2.8. <i>Real-Time PCR</i>	34
5.2.9. <i>Tecniche di trasfezione</i>	35
5.2.10. <i>Produzione di virioni ricombinanti HIV-1</i>	36
5.2.11. <i>Trasduzione di cellule bersaglio con virioni ricombinanti HIV-1 mediante spin inoculation</i>	36
5.2.12. <i>SDS-gel elettroforesi</i>	36
5.2.13. <i>Immunoblotting</i>	38
5.2.14. <i>Immunoprecipitazione</i>	39
5.2.15. <i>Zimografia</i>	40
5.2.16. <i>Trattamento con glicosidasi</i>	40
5.2.17. <i>Immunocitofluorescenza indiretta</i>	41
6. RISULTATI	43
PREMESSA	43
6.1. NEF	43
6.1.1. <i>Analisi degli effetti di Nef sulla espressione di citochine e chemochine</i>	44
6.1.2. <i>Analisi degli effetti di Nef sulle MMP</i>	45
6.2. ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE (ALK)	46
6.3. POSSIBILI INTERAZIONI TRA NEF ED ALK	49
6.3.1. <i>Valutazione dell'effetto di Nef sul pattern di glicosilazione di ALK</i>	49
6.3.2. <i>Analisi della localizzazione intracellulare di Nef ed ALK in cellule overesprimenti entrambe le proteine</i>	49
6.3.3. <i>Analisi della interazione fisica diretta tra ALK e Nef</i>	51
6.3.4. <i>Valutazione dell'effetto di Nef ed ALK sulle vie di trasduzione del segnale MAP-Kinasi dipendente</i>	52
6.3.5. <i>Valutazione dell'effetto di Nef ed ALK sulla attivazione delle metallo-proteasi della matrice (MMP)</i>	53

6.3.6.	<i>Interferenza di Nef sull'mRNA di ALK</i>	53
6.3.7.	<i>Analisi della attività del promotore di ALK in presenza di Nef</i>	54
6.3.8.	<i>Analisi degli effetti di Nef ed ALK sulla espressione di citochine e chemochine</i>	55
7.	DISCUSSIONE	57
8.	ABBREVIAZIONI	63
9.	BIBLIOGRAFIA	67
10.	RINGRAZIAMENTI	77
11.	PUBBLICAZIONI ALLEGATE	79

1. SOMMARIO

Il virus della immunodeficienza umana-1 (HIV-1, *Human Immunodeficiency Virus-1*) si localizza nel cervello in una fase precoce della infezione sistemica e risiede principalmente in macrofagi/microglia ed astrociti. Nelle fasi tardive della malattia, HIV-1 determina nel 15-20% dei pazienti affetti da AIDS la insorgenza della demenza associata ad HIV (HAD). Sono state ad oggi descritte una ampia varietà di lesioni a carico del sistema nervoso centrale (SNC) durante la HAD, come il danneggiamento e la perdita di connessioni e funzionalità neuronale, ma si conosce poco sui meccanismi molecolari che determinano questi processi.

Tra le proteine di HIV-1, Nef è espressa negli astrociti infettati da HIV-1 sia *in vitro* che *in vivo* nei pazienti con demenza rapidamente progressiva. Inoltre, Nef interferisce sulle normali vie di trasduzione del segnale mediate da Stat3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) e dalle MAP-K (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) che sono importanti a livello del SNC per il differenziamento cellulare ed il mantenimento del fenotipo differenziato delle cellule neuronali. Inoltre, essendo Nef in grado di indurre la espressione di varie citochine, come IL-1 β (*InterLeukin-1 β*) e TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*), durante la infiammazione cronica presente nella HAD, tale proteina virale può determinare un *loop* autocrino di stimolazione e produzione di citochine e MMP (*Matrix MetalloProteinases*), che portano, alla fine, ad un danno continuato a carico della barriera emato-encefalica (BEE). Quindi, per questi motivi, Nef potrebbe contribuire a spiegare alcuni degli aspetti della HAD, in particolare se si tiene in considerazione la sua capacità di influenzare le vie di trasduzione del segnale regolate da proteine cellulari coinvolte nel differenziamento neuronale, come ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*). ALK è un recettore tirosin-chinasico espresso ad alti livelli durante lo sviluppo embrionale, principalmente nei neuroni del SNC e del sistema nervoso periferico (SNP), mentre la sua espressione risulta diminuita nell'adulto. In particolare, ALK determina la attivazione sia della via di trasduzione del segnale MAP-K dipendente, che controlla il differenziamento cellulare, sia Stat3 dipendente, che è invece importante nella rigenerazione neuronale in seguito a danno.

Nel presente lavoro di tesi si è dimostrato che Nef è in grado di alterare la espressione di ALK ed interferire con le vie di trasduzione del segnale mediate da quest'ultima, ed in particolare quelle che coinvolgono le MMP-9 (*Matrix MetalloProteinase-9*) e MMP-2 (*Matrix MetalloProteinase-2*). Inoltre, Nef ed ALK mostrano un effetto cumulativo sulla regolazione di citochine/chemochine (come IL-

1 β , TNF- α , Rantes) e su alcune proteine coinvolte nelle comuni vie di trasduzione del segnale, come le MAP-K. Quindi, tra le proteine alterate da Nef, ALK potrebbe svolgere un ruolo importante durante la HAD. In particolare, Nef potrebbe contribuire ai processi di perdita neuronale e di de-differenziamento, caratteristici della HAD, alterando la capacità di ALK di controllare il fenotipo neuronale differenziato. La capacità di ALK di controllare la attivazione delle MMP potrebbe risultare alterata dalla presenza di Nef, fino a determinare la perdita del bilancio fisiologico tra le MMP e gli TIMP (*Tissue Inhibitors of Matrix MetalloProteinases*).

2. ABSTRACT

HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus-1*) enters the brain at an early stage after systemic infection and resides primarily in macrophages/microglia and astrocytes. At a late stage of the disease, 15-20% of the patients develop the so-called HIV-1 Associated Dementia (HAD). A variety of HIV-1-induced lesions of the central nervous system (CNS) has been described, including neuronal loss, but very little is known about the mechanisms that lead to this process.

Among HIV-1 proteins, Nef is present in persistently HIV-1-infected astrocytes *in vitro* and *in vivo* in patients with rapidly progressive dementia. Nef interferes with Stat3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) and MAP-K (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) signaling pathways which are important in the CNS for the neuronal differentiation program and the maintenance of the differentiated phenotype. Furthermore, during chronic inflammation, as in HAD, the induction of cytokines (such as IL-1 β (*InterLeukin-1 β*) and TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*)) determines an autocrine loop of stimulation and production of MMPs and cytokines, leading at the end to a continuous damage to the blood brain barrier (BBB). Therefore, Nef, by altering signal transduction pathways related to cellular proteins involved in neuronal differentiation, such as ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*), could contribute to explain some of the HAD features. ALK is a tyrosine kinase receptor expressed preferentially in the neurons of the central and peripheral nervous system at embryonic stages and in a less extent in the adult. ALK induces the activation of the MAP-K pathway, thus controlling the differentiation pathways, and of the Stat3, which is important in the neuronal regeneration after injury.

Our data show that Nef alters ALK expression and interferes with the ALK signal transduction pathway, in particular by modifying the MMP-9 (*Matrix MetalloProteinase-9*) and MMP-2 (*Matrix MetalloProteinase-2*) pathways. Furthermore, Nef and ALK show a cumulative effect in the modulation of cytochines/chemokines (such as IL-1 β , TNF- α , Rantes) and of proteins involved in their common transduction pathways, such as MAP-K. Hence, these data show that Nef could contribute to the neuronal loss and dedifferentiation process, characteristic of HAD, altering the ability of ALK of controlling the differentiated neuronal phenotype. The ability of ALK of controlling the MMPs activation could be altered by the presence of Nef, leading to the loss of the physiological balance between MMPs and TIMPs (*Tissue Inhibitors of Matrix MetalloProteinases*).

3. INTRODUZIONE

3.1. HIV-1

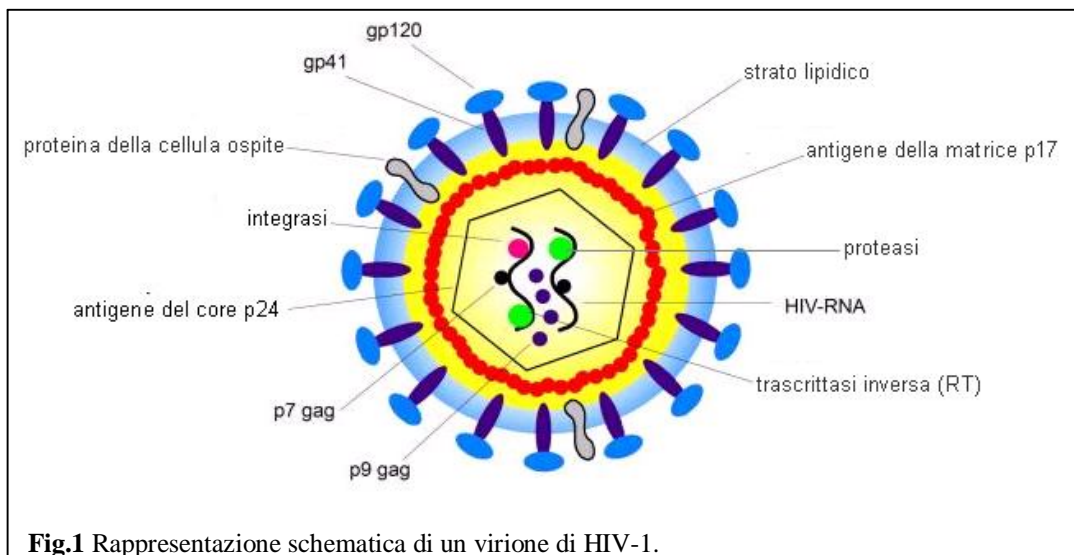
Il virus della immunodeficienza umana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus-1*) è l'agente eziologico della sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS, *Acquired Immunodeficiency Syndrome*) [Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984; Blattner et al., 1988], una malattia cronica a carico del sistema immunitario, che colpisce le cellule immunocompetenti CD4-positive, appartenenti sia alla linea dei linfociti che a quella monocito/macrofagica [Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984]. Esistono due sottotipi di HIV: HIV di tipo 1 (HIV-1) e HIV di tipo 2 (HIV-2) distinti in base a differenze sieroepidemiologiche ed ad analisi di sequenza [Clavel et al., 1985; Guyader et al., 1987]. Entrambi i sottotipi appartengono alla sottofamiglia dei *Lentivirinae* della famiglia dei *Retroviridae*.

HIV instaura una infezione persistente determinando malattie cronicodegenerative a lenta progressione, poiché la infezione *in vivo* segue alla integrazione del DNA provirale nel genoma della cellula ospite.

Il tropismo cellulare può essere definito in base alla capacità di HIV-1 di crescere in diversi tipi cellulari *in vitro*. In particolare, gli isolati di HIV-1 che possono infettare i macrofagi e le cellule mononucleate di sangue periferico (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cell*), ma in modo meno efficiente le cellule T, sono definiti Macrofago-tropici. Al contrario, gli isolati di HIV-1 che possono infettare le linee cellulari T e i PBMC ma non i macrofagi sono classificati come T-tropici. Gli isolati di HIV-1 che infettano sia le cellule T che i macrofagi sono definiti a doppio tropismo. La maggior parte dei virus Macrofago-tropici usa come co-recettore il recettore CCR5 per le chemochine, mentre la maggior parte dei T-tropici usa il CXCR4.

HIV è caratterizzato da un genoma diploide, costituito da due molecole identiche di RNA a polarità positiva strettamente associate con la trascrittasi inversa (RT, *Reverse Transcriptase*), una DNA polimerasi RNA dipendente. Il virione di HIV-1 ha una forma sferica, con un diametro di circa 110 nm. L'involucro esterno (*envelope* o pericapside) racchiude un doppio componente capsidico costituito da una porzione esterna (matrice, MA) e da una porzione centrale (*core* o nucleocapside) ad organizzazione elicoidale. Le glicoproteine dell'*envelope* sono sia di origine virale che contenenti antigeni specie-specifici che derivano per la maggior parte dalla membrana plasmatica della cellula ospite da cui il virione maturo fuoriesce per

gemmazione. In particolare, nella glicoproteina virale la subunità transmembrana di 41 kDa (gp41) si lega in maniera non covalente alla subunità esterna altamente glicosilata di 120 kDa (gp120) (Fig.1).



Il genoma di HIV-1 contiene tre principali geni strutturali ed almeno sei geni accessori. I geni strutturali corrispondono a *gag*, *pol* ed *env*, che codificano rispettivamente le proteine della matrice e del nucleocapside, gli enzimi virali e le glicoproteine dell'*envelope* esterno. I geni accessori sono *tat*, *nef*, *rev*, *vif*, *vpr* e *vpu* e codificano proteine che agiscono *in trans*, regolando la espressione degli altri geni virali. Alla estremità del genoma si trovano, inoltre, sequenze ripetute chiamate LTR (*Long Terminal Repeats*) coinvolte in alcune fasi del ciclo di replicazione, quali la integrazione e la trascrizione.

Per entrare nelle cellule, HIV-1 deve legarsi a recettori cellulari specifici localizzati sulla superficie delle cellule. La glicoproteina gp120 dell'*envelope* si lega con alta affinità alla proteina cellulare CD4 presente sulla superficie cellulare. La interazione con il CD4 determina un cambiamento conformazionale che permette a gp120 di legare i co-recettori per l'ingresso del virus, appartenenti alla famiglia dei recettori per le chemochine [Choe et al., 1998]. Un secondo cambiamento conformazionale induce la esposizione del dominio idrofobico di fusione della subunità transmembrana gp41 che media la fusione tra l'*envelope* virale e la membrana cellulare.

In seguito all'ingresso nella cellula, il virus va incontro alla retrotrascrizione del suo genoma ad RNA per formare un DNA a doppio filamento; questo processo viene mediato dall'enzima virale RT e da una molecola di tRNA₃^{lys} che funge da innesco. Durante il processo di retrotrascrizione, gli acidi nucleici rimangono associati in un

complesso formato dal DNA virale e da proteine ad alto peso molecolare, tra cui le integrasi ed altre proteine virali che comprendono la proteina virale (Vpr, *Viral protein r*), la proteina della matrice (MA), la integrasi (IN) ed altre proteine cellulari. Questo complesso nucleoproteico è chiamato complesso di pre-integrazione (PIC, *Pre-Integration Complex*) e viene successivamente trasportato al nucleo grazie ad un segnale di localizzazione nucleare (Fig.2). Il PIC facilita la integrazione del DNA genomico di HIV-1 nella cromatina dell'ospite grazie alla IN. In seguito alla integrazione del DNA virale nel genoma della cellula ospite si può instaurare una infezione latente (se il genoma virale rimane completamente silente) oppure una infezione produttiva (quando si osserva espressione attiva dei geni e trascrizione del DNA provirale da parte della polimerasi cellulare). Durante la infezione produttiva, vengono prodotti prima i fattori virali di regolazione come Nef, Tat e Rev, mentre solo successivamente le proteine virali strutturali ed il genoma ad RNA. Nella fase di assemblaggio, Gag e la poliproteina Gag-Pol, le proteine dell'*envelope* ed il genoma virale ad RNA vengono assemblati nel virione immaturo localizzato sulla superficie cellulare e successivamente rilasciate dalla cellula ospite. Il taglio di Gag e delle poliproteine Gag-Pol da parte della proteasi di HIV-1 determina la produzione del virus maturo, capace di infettare le cellule vicine, iniziando così un nuovo ciclo di infezione.

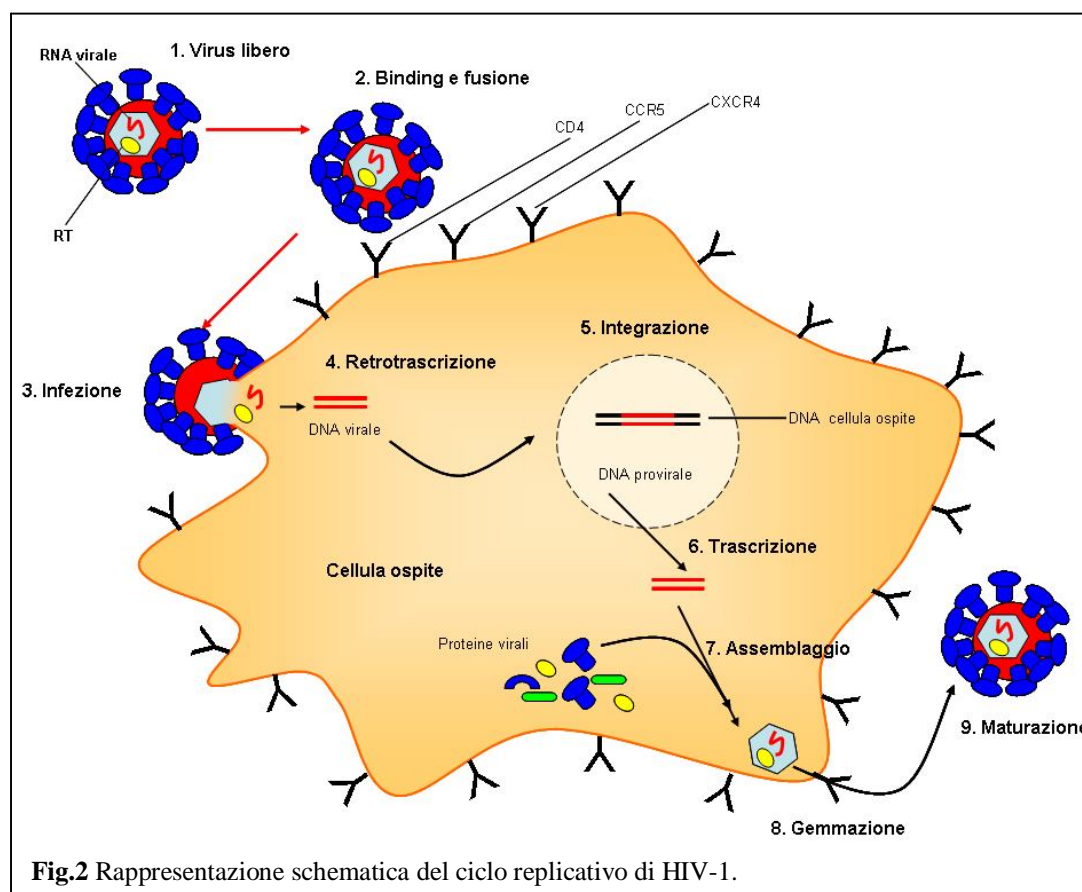


Fig.2 Rappresentazione schematica del ciclo replicativo di HIV-1.

3.2. HIV-1 e sistema nervoso centrale (SNC)

3.2.1. Classificazione del SNC

Il sistema nervoso è caratterizzato dalla presenza di due tipi cellulari distinti, neuroni e cellule gliali. Nel sistema nervoso centrale (SNC) dei vertebrati, il numero delle cellule gliali è largamente superiore rispetto a quello dei neuroni.

I neuroni trasmettono le informazioni tramite la conduzione di impulsi elettrici e comunicano tramite spazi intracellulari specializzati, chiamati sinapsi. Sono però caratterizzati da una ampia varietà di tipologie morfologiche, presentando una funzionalità cellulare correlata con la morfologia. I neuroni sono caratterizzati da un corpo cellulare (soma), che contiene il nucleo e l'apparato di sintesi proteica, dai dendriti, che raccolgono le informazioni che arrivano dalle altre cellule, e da un assone, che trasmette le informazioni in uscita nelle sinapsi.

La glia esplica diversi ruoli sia nella funzione, che nel mantenimento e sviluppo del SNC e del sistema nervoso periferico (SNP). Queste funzioni della glia includono, ma non sono limitate, alle funzioni di supporto per lo sviluppo dei neuroni e delle loro sinapsi, controllo della migrazione dei neuroni e crescita degli assoni, regolazione della composizione chimica e nutrimento disponibile per i neuroni, rimozione fagocitica di detriti cellulari a seguito di trauma ed atrofia neuronale, formazione della barriera emato-encefalica (BEE), integrazione del *signaling* neuronale e della attività sinaptica, ed isolamento degli assoni attraverso la mielinizzazione per facilitare una efficiente conduzione del segnale tra i neuroni. L'azione della glia è influenzata da varie molecole del *signaling* intracellulare prodotte dai neuroni come neurotrasmettitori, ioni, e molecole di adesione cellulare. Le cellule gliali possono essere classificate in cinque sottotipi principali: oligodendroglia o oligodendrociti, cellule di Schwann, astrociti, microglia e cellule endodiali. Gli oligodendrociti estendono processi che avvolgono i segmenti degli assoni neuronali nel SNC e producono il foglio di mielina che isola i neuroni, formando così la materia bianca. Le cellule di Schwann rappresentano invece la glia che produce mielina nel SNP e sono localizzate sui singoli assoni sensoriali periferici per formare una mielinizzazione compatta (Fig.3).

Il sottotipo gliale più abbondante è rappresentato dagli astrociti che svolgono le loro funzioni a livello neuronale sia nel cervello che nel midollo spinale e non sono di per sé produttori di mielina. Gli astrociti svolgono un ruolo fondamentale nella omeostasi del cervello, poiché stabiliscono i contatti con le cellule endoteliali e regolano la permeabilità della BEE attraverso il rilascio di fattori solubili. Quindi, gli astrociti concorrono a formare la BEE e svolgono come ruoli principali quelli di

supporto, nutrimento dei neuroni, regolazione dell'ambiente extracellulare, formazione delle cicatrici nelle lesioni croniche, immagazzinamento di sostanze neurotossiche, determinando così un effetto neuroprotettivo, e stimolazione della formazione di giunzioni strette nelle cellule endoteliali per formare la BEE. Dal punto di vista istologico, queste cellule sono positive per la proteina gliale fibrillare acida (GFAP, *Glial Fibrillar Acidic Protein*).

La microglia rappresenta la categoria di cellule più piccole e rare della glia. Alcune cellule della microglia possono far parte del sistema fagocitico mononucleare e presentano, quindi, capacità fagocitiche che permettono di proteggere il SNC dai microrganismi. Queste cellule derivano dal mesoderma, mentre neuroni, astrociti ed oligodendrociti derivano dall'ectoderma. Infatti, la microglia e i macrofagi perivascolari derivano da cellule del midollo osseo che si localizzano nel SNC a diversi tempi dello sviluppo embrionale e durante la vita adulta. I macrofagi perivascolari sono localizzati attorno ai vasi sanguigni e vengono sostituiti dalla migrazione di monociti circolanti. Al contrario, la microglia è localizzata nel parenchima del cervello e presenta un ricambio molto più lento rispetto ai macrofagi. Le cellule ependimali delimitano le cavità del cervello e favoriscono la circolazione del liquido cerebrospinale nel canale centrale del midollo spinale. Grazie ai loro prolungamenti, stabiliscono connessioni con gli astrociti. È stata ipotizzata una loro possibile funzione di cellule staminali del tessuto nervoso e comunque sembra siano coinvolte nella rigenerazione dello stesso.

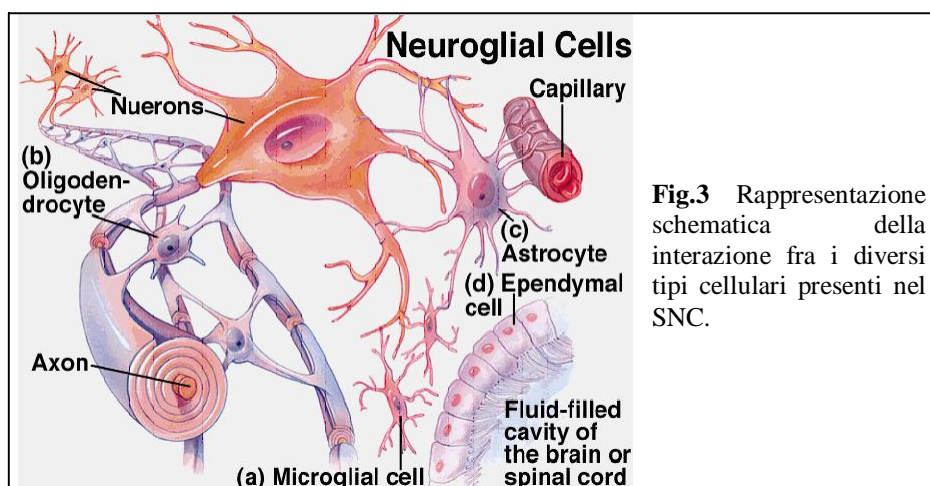


Fig.3 Rappresentazione schematica della interazione fra i diversi tipi cellulari presenti nel SNC.

3.2.2. Infezione del SNC da parte di HIV-1

HIV-1 entra nel cervello in una fase precoce della infezione sistemica e risiede principalmente in macrofagi/microglia ed astrociti [Kaul et al., 2001]. Per entrare nel SNC, HIV-1 deve attraversare la BEE che è rappresentata da uno strato cellulare

continuo selettivamente permeabile, formato dalla parete endoteliale dei capillari cerebrali e dai processi perivascolari degli astrociti, collegati tra loro da giunzioni strette. Per spiegare l'ingresso di HIV-1 nel cervello sono state proposte diverse ipotesi. La *Trojan Horse Hypothesis* sembra ad oggi la ipotesi più sostenuta da evidenze sperimentali, e suggerisce che HIV-1 entri nel SNC come "passeggero" di cellule che si dirigono al cervello, come linfociti T e monociti, che possono essere infettati da HIV-1, poiché esprimono il CD4 [Lane et al., 1996; Williams KC et al., 2001; Kim et al., 2003; Fischer-Smith et al., 2005]. Le altre ipotesi derivano principalmente da modelli *in vitro* e suggeriscono che HIV-1 liberi attraverso la BEE tramite meccanismi quali la transitosi o la migrazione attraverso le cellule endoteliali [Bomsel et al., 1997; Banks et al., 2001; Liu et al., 2002]. Una ipotesi alternativa per la invasione del SNC prevede l'ingresso di HIV-1 libero nel cervello grazie al rilascio da parte di cellule endoteliali infette [Edinger et al., 1997; Argyris et al., 2003; Bobardt et al., 2004] (Fig.4). Nonostante HIV-1 sia in grado di indurre alterazioni a carico della BEE, i meccanismi di infezione delle cellule endoteliali e l'espressione in queste cellule di recettori e co-recettori convenzionali per HIV-1, come CD4, CCR5 e CXCR4, rimangono ancora argomenti controversi (Fig.5).

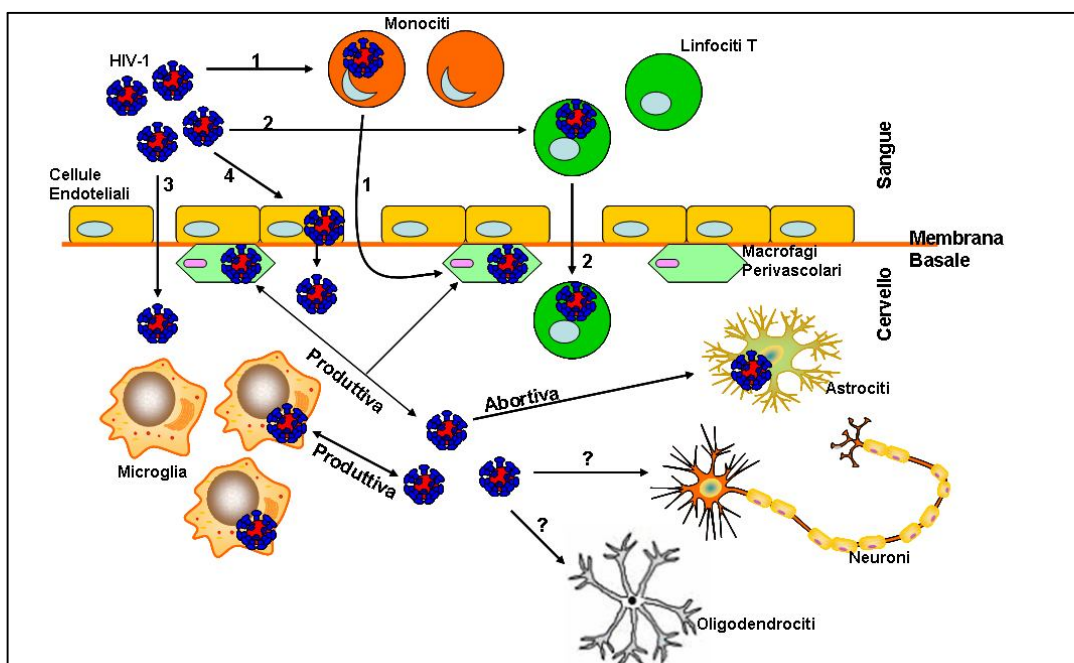


Fig.4 Invasione del SNC da parte di HIV-1. 1,2) Secondo la ipotesi del "Trojan Horse", l'ingresso di HIV-1 nel cervello avviene sfruttando la migrazione di monociti infettati attraverso la BEE che differenziano nel cervello a macrofagi perivascolari. Anche il passaggio di linfociti T CD4 infetti può rappresentare una fonte di infezione del cervello. Altre possibili cause di infezione del SNC possono essere: 3) il diretto ingresso del virus o 4) l'ingresso di HIV-1 tramite transitosi delle cellule endoteliali microvascolari del cervello. Una volta che il virus si è localizzato nel cervello, determina una infezione produttiva in macrofagi e microglia; al contrario la infezione negli astrociti è abortiva. La infezione degli oligodendrociti e dei neuroni è ancora in corso di dibattito.

La demenza associata ad HIV (HAD) è una complicanza neurologica severa della infezione da HIV-1 che colpisce circa il 15-20% dei pazienti negli ultimi stadi dell'AIDS. Prima della introduzione della terapia basata su associazioni di farmaci diretti contro la RT e la proteasi di HIV-1 (HAART, *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), la incidenza annuale di HAD rappresentava circa il 7% e il rischio cumulativo di sviluppare HAD durante la vita di un paziente HIV-1 positivo era circa il 5-20% [McArthur et al., 1993; McArthur et al., 1999; Gray et al., 2003]. Queste percentuali sono inizialmente diminuite significativamente dopo la introduzione dell'HAART. Nel 2003 però la incidenza ha iniziato a crescere nuovamente, suggerendo la esistenza di sistemi di evasione dal controllo della terapia HAART. Inoltre, a causa dell'aumento del numero dei pazienti che, grazie al trattamento con HAART, sopravvivono con l'AIDS, la prevalenza della HAD sta attualmente crescendo [McArthur, 2004].

Inoltre, la HAD rappresenta la principale causa di perdita di funzionalità neuronale nei bambini e nei giovani adulti [McArthur et al., 1999]. Infatti, il SNC dei bambini sembra più vulnerabile agli effetti della infezione da HIV-1 piuttosto che quello degli adulti, forse perché il SNC pediatrico è ancora in sviluppo e contiene tipi cellulari meno differenziati.

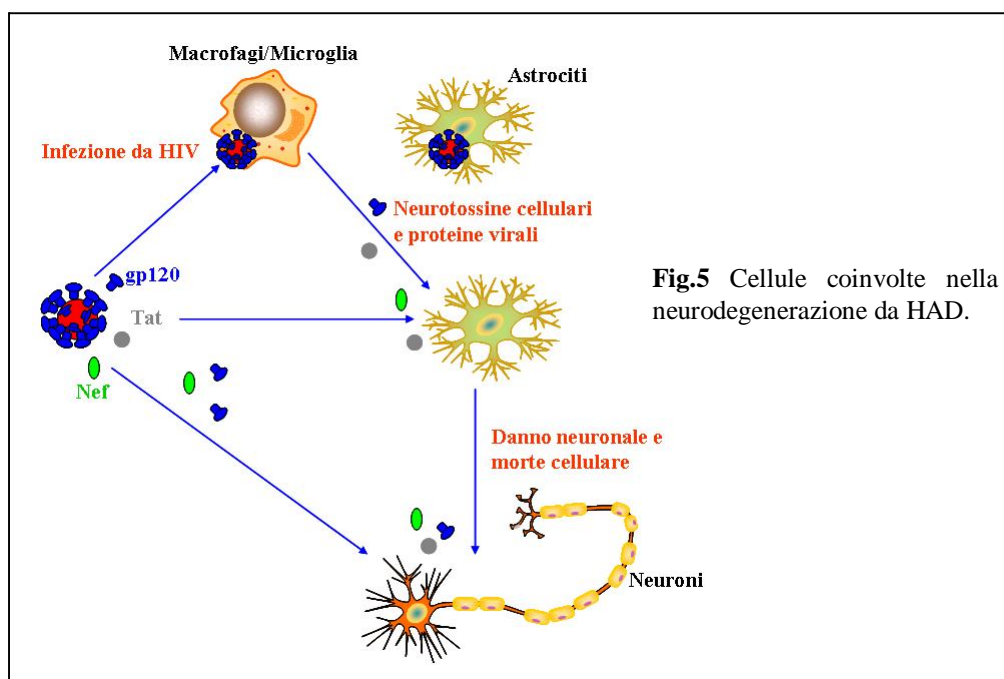


Fig.5 Cellule coinvolte nella neurodegenerazione da HAD.

3.2.3. Aspetti patologici della demenza associata ad HIV-1 (HAD)

Nei pazienti infettati con HIV-1, il virus entra nel SNC in uno stadio precoce della patologia, probabilmente tramite la infiltrazione di monociti/linfociti infettati con

HIV-1 (*Trojan Horse Hypothesis*). Questo induce una risposta immunitaria locale, ma i sintomi neurologici sono spesso assenti. Inoltre, quando durante la sierconversione, la disfunzione neuronale si presenta è generalmente transiente e non fatale.

Tipicamente, la HAD si presenta quando la conta dei CD4 scende al di sotto delle 200 cellule/mm³, ma anomalie classificabili da lievi a moderate, sia neuropsicologiche che neuroanatomiche, compaiono già in stadi più precoci della infezione da HIV-1. Il termine MCMD (*Minor Cognitive Motor Disorder*) è usato per descrivere gli stadi iniziali del declino cognitivo nei pazienti HIV-1 positivi. I sintomi comuni di questo stadio includono difficoltà nella concentrazione, perdita di memoria, lentezza nel pensiero, apatia, depressione, allontanamento dalla vita sociale, e cambi di personalità. Almeno il 50% dei pazienti presentano, inoltre, associati sintomi di disfunzione motoria, compresi debolezza alle gambe, difficoltà nell'equilibrio, atassia, tremore, o segni del tratto piramidale.

Dal punto di vista istologico, i maggiori cambiamenti sono riscontrabili nelle aree subcorticali del cervello, di modo che la HAD rientra nella categoria della demenza subcorticale. Tra i cambiamenti istopatologici sono presenti pallore, gliosi, mielopatia vacuolare e cellule giganti multinucleate (MNGC, *MultiNucleated Giant Cells*). La presenza di MNGC nel tessuto cerebrale di pazienti HIV-1 positivi rappresenta il principale segnale neuropatologico della HAD ed è considerato un segno contraddistintivo della encefalopatia da HIV-1. Le MNGC sono conglomerati di cellule che si formano attraverso la fusione di macrofagi e microglia infettate. La fusione è mediata dalle glicoproteine dell'*envelope* di HIV-1 presenti sulla superficie di cellule infettate e CD4 e recettori per le chemochine presenti sulla superficie di cellule non infettate. Più raramente, si osservano cambiamenti spongiformi diffusi o focali nella materia bianca. La encefalopatia da HIV-1 è simile alla demenza presente nei pazienti con Parkinson e Corea di Huntington, e distinta da quella presente nei pazienti con Alzheimer. Infatti, a differenza della demenza corticale presente nell'Alzheimer, nella HAD sono infrequenti sintomi come afasia, aprassia e agnosia. HAD colpisce sia le funzioni cognitive, che motorie e comportamentali (diminuita produttività lavorativa, scarsa concentrazione, lentezza nei processi mentali, diminuita libido, mancanza di memoria, apatia, squilibrio e debolezza), come dimostrato anche nel modello animale [Griffin et al., 2004]. Successivamente i sintomi evolvono in una demenza globale con perdita della memoria e alterazioni del linguaggio. Dopo la progressione per vari mesi, lo stadio terminale della HAD include diversi ritardi psicomotori, demenza, aprassia, paraparesi e mutismo acinetico, fino ad arrivare ad uno stato vegetativo. La malattia progredisce

lentamente per mesi, ma la sopravvivenza media dalla insorgenza dei sintomi di una demenza severa raramente supera i sei mesi.

È stata descritta una ampia varietà di lesioni del SNC indotte da HIV-1, inclusa la encefalite da HIV-1, la leucoencefalopatia, il danno assonale e la perdita di neuroni caratterizzata da varia estensione che risulta, almeno in parte, da un processo apoptotico. Nonostante la infezione da HIV-1 nel SNC determini una consistente perdita di neuroni, poco è conosciuto sui meccanismi molecolari che portano al danno e alla perdita neuronale.

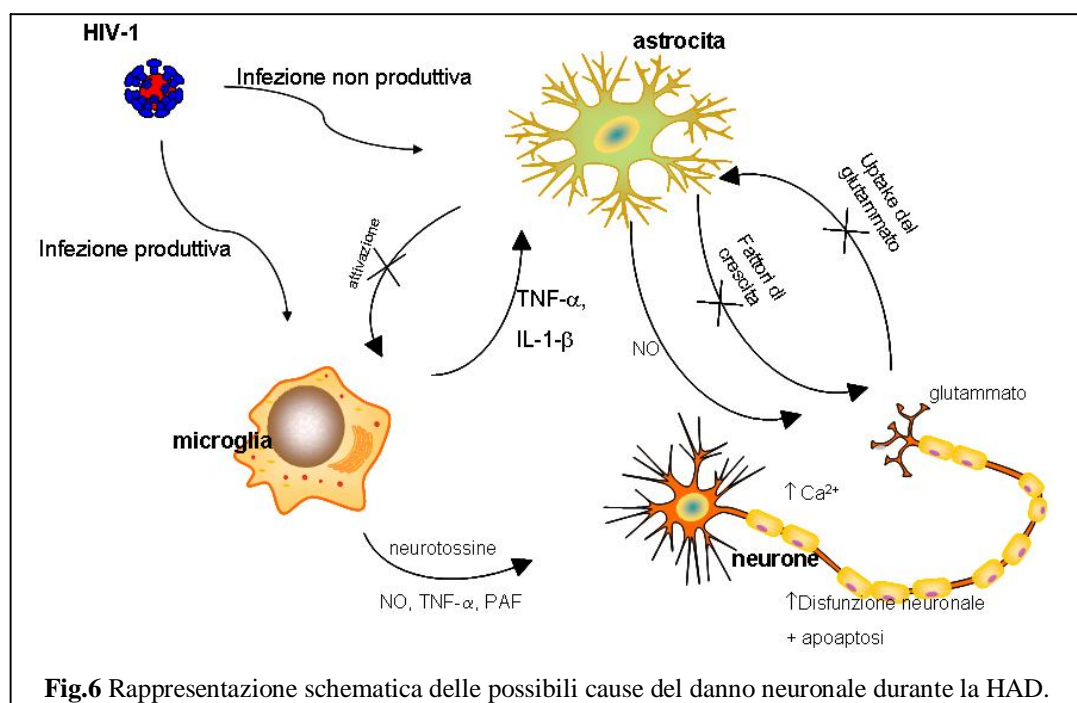
3.2.4. Aspetti biologici della HAD

Considerando le diverse popolazioni cellulari presenti nel SNC, i macrofagi perivascolari e la microglia rappresentano le cellule immunocompetenti del cervello e, quindi, costituiscono le popolazioni cellulari più infettate da HIV-1, sia *in vivo* che *in vitro*. L'utilizzo di tecniche sensibili ha però permesso di rilevare anche la infezione in astrociti, dove sembra ristretta alla espressione di geni precoci, come *nef* e *rev*, che sono, infatti, evidenziabili tramite immunistochemica [Tornatore et al., 1994; Ranki et al., 1995; Bagasra et al., 1996; Overholser et al., 2003]. Per quanto riguarda gli oligodendrociti, esistono evidenze contrastanti sulla infezione di HIV-1 *in vivo* e solo suscettibilità alla infezione *in vitro* [Bagasra et al., 1996; Takahashi et al., 1996; Albright et al., 1996].

A differenza di altre encefalopatie, la HAD si presenta in assenza di infezione diretta dei neuroni, quindi, altri meccanismi devono essere implicati nel danno neuropatologico da HAD. Tutti i membri della famiglia dei recettori per le α -chemochine (CXCR) sono espressi nel cervello, e principalmente dai neuroni, che però non esprimono CD4. Al contrario, i recettori per le β -chemochine (CCR) sono debolmente o non espressi nel cervello in condizioni normali [Albright et al., 1999].

Quindi, per spiegare il danno neuronale sono state formulate due ipotesi identificate rispettivamente con il termine di “*Direct Injury Hypothesis*” (ossia danno diretto dovuto a produzione e rilascio di proteine virali) e “*Bystander Effect Hypothesis*” (danno dovuto ai processi infiammatori) (Fig.6) [Gonzales-Scarano et al., 2005]. Secondo la prima ipotesi, la infezione di macrofagi perivascolari e microglia (e possibilmente astrociti) può determinare la distruzione delle normali funzioni neurologiche tramite un meccanismo diretto (cioè tramite la produzione e il rilascio di proteine virali come gp120, Tat e/o Vpr da parte di cellule infettate) [van de Bovenkamp et al., 2002; Bergonzini et al., 2004]. Nella seconda ipotesi, i neuroni vengono danneggiati principalmente da un meccanismo indiretto come conseguenza dei processi infiammatori attivati nel SNC [van Marle et al., 2004; Peruzzi et al.,

2005]. Nonostante questi due meccanismi non siano mutuamente esclusivi e possano coesistere, la teoria del *Bystander Effect* sembra essere quella più accreditata dalle evidenze sperimentali. Inoltre, è stato proposto che in seguito all'instaurarsi dei processi infiammatori, la infezione virale di per sé possa avere un ruolo più limitato nei processi degenerativi, avendo ormai stabilito una reazione a catena che si auto-mantiene.



Durante la HAD si assiste, inoltre, alla alterazione dei livelli di espressione delle metallo-proteasi della matrice (MMP, *Matrix MetalloProteinases*) e degli inibitori tessutali delle MMP (TIMP, *Tissue Inhibitor of MetalloProteinases*). Le MMP sono endopeptidasi zinco-dipendente che possiedono la capacità di tagliare una o più componenti della matrice extracellulare (ECM, *ExtraCellular Matrix*), regolandone così la composizione. Le MMP sono secrete in forma di proenzimi solubili e la loro attivazione ed interazione con TIMP determina la attività finale dei proenzimi secreti. Le MMP svolgono un ruolo importante sia nei processi fisiologici che patologici. In particolare, nei pazienti con la HAD i livelli delle MMP nel *liquor* sono elevati [Conant et al., 1999]. Inoltre, è stato dimostrato che Tat aumenta la attivazione della MMP-2 in due modi: da un lato, determina la attivazione di TIMP-2, che si trova legato alla membrana cellulare ed è costitutivamente espresso, mentre dall'altro inibisce TIMP-1 che è invece inducibile ed è implicato in processi infiammatori e di carcinogenesi [Toschi et al., 2001]. Inoltre, è importate sottolineare come, in presenza di processi infiammatori di natura diversa, si possa avere una attivazione diversa delle stesse vie. Ad esempio, infatti, gli astrociti attivati in modo

acuto aumentano la produzione di TIMP-1, ma durante i processi cronici, come in corso di HAD, i livelli di TIMP-1 risultano diminuiti mentre i livelli della MMP-1 aumentati [Suryadevara et al., 2003], determinando così come bilancio complessivo la diminuzione della capacità degli astrociti di controllare gli effetti distruttivi delle MMP attraverso la attivazione di TIMP-1.

Inoltre, la attivazione della MMP-9 è presente in circa il 50% dei *liquor* di pazienti HIV-1 positivi con sintomi neurologici e questa attività è associata con il danneggiamento della BEE [Sporer et al., 1998]. Infatti, la microglia attivata induce il rilascio della MMP-9. Inoltre, il promotore della MMP-9 presenta siti multipli putativi di legame con Stat3, il cui stato di attivazione è alterato da proteine virali come Nef.

3.3. Proteine di interesse

3.3.1. La proteina Nef di HIV-1

La proteina Nef (*Negative Factor*) [Ahmad et al., 1988] è una proteina accessoria (non necessaria per la replicazione di HIV-1 *in vitro*) N-miristolata di 27 kDa (206 aminoacidi). La N-miristolazione è necessaria per la associazione con la membrana cellulare (Fig.7). Infatti, la sequenza *consensus* per la N-miristol-trasferasi è altamente conservata, sottolineando la importanza della localizzazione di Nef sulla membrana cellulare per svolgere il suo ruolo nella replicazione virale [Hanna et al., 2004]. La proteina Nef viene espressa precocemente ed abbondantemente durante la infezione da HIV-1 e si localizza sulla membrana plasmatica cellulare ed all'interno del virione. Nef può diminuire la espressione sulla superficie cellulare di alcune molecole coinvolte nel *signaling* intracellulare, tra cui CD4, CD28, MHC-1 e MHC-2 [Williams et al., 2002; Greenway et al., 2003; Schindler et al., 2003; Das et al., 2005; Roeth and Collins, 2006], influenzando così le vie di trasduzione. Questa sua capacità è dovuta anche alla omologia con i domini SH3 delle proteine cellulari che sono presenti nelle tirosin-chinasi ed in altri enzimi cellulari, fattori di trascrizione e molecole adattatrici. Questi effetti promuovono sia la replicazione virale che la evasione del virus dal sistema immunitario, aumentando così la emivita delle cellule infettate da HIV-1 attraverso il controllo dell'apoptosi, regolando la espressione dei fattori cellulari fondamentali per la replicazione virale e aumentando la infettività del virione. Nef risulta, infatti, necessario e sufficiente per la progressione clinica della patologia da HIV-1 [Cheng-Mayer et al., 1989; Harris, 1999].

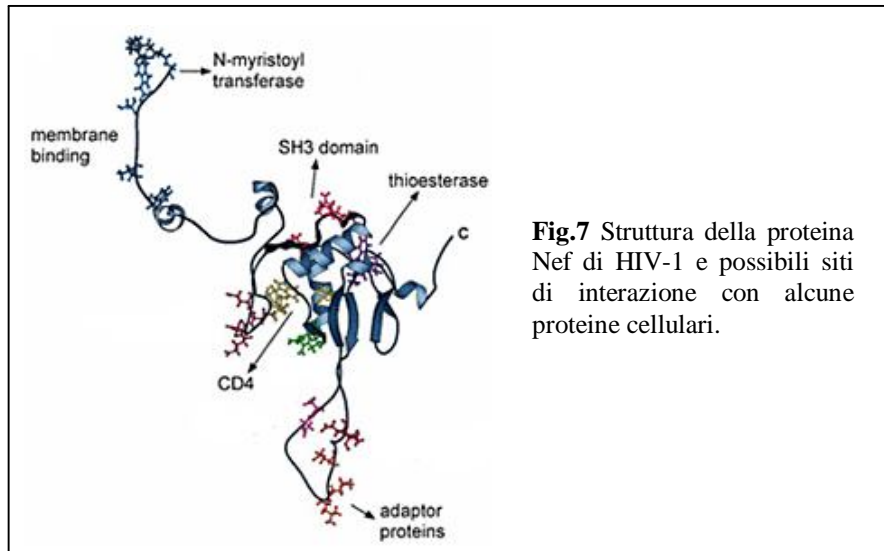


Fig.7 Struttura della proteina Nef di HIV-1 e possibili siti di interazione con alcune proteine cellulari.

Nef può agire sui diversi stadi della HAD che presentano una durata sconosciuta, e che comprendono l'ingresso di HIV-1 nel cervello, la colonizzazione delle cellule del SNC, le alterazioni delle funzionalità intracellulari mediate dalle proteine di HIV-1, ed infine il danno neuronale. In particolare, in modelli animali, Nef promuove il richiamo di leucociti nel cervello [Koedel et al., 1999], e, quindi, contribuisce così potenzialmente all'ingresso di HIV-1 nel SNC. Nef, inoltre, attiva la trascrizione di HIV-1 nelle cellule infettate in modo latente [Fujinaga et al., 1995] ed aumenta la infezione degli astrociti primari umani [Bencheikh et al., 1999], probabilmente favorendo così una ulteriore colonizzazione delle cellule del cervello da parte di HIV-1 e la creazione di un *reservoir*. Nef poi è stato dimostrato essere coinvolto nella progressione della malattia sistemica da HIV-1 [Harris, 1999] e può avere un ruolo simile nel cervello contribuendo alla alterazione delle vie di attivazione intracellulari. Nef, inoltre, risulta tossico a livello extracellulare per neuroni e glia [Trillo-Pazos et al., 2000], potendo così contribuire al danno neuronale riscontrato nella HAD.

Astrociti infettati in modo persistente con HIV-1 esprimono sia *in vivo* che *in vitro* le proteine Nef e Rev, mentre le proteine strutturali sono espresse a livelli inferiori [Brack-Werner et al., 1992; Ranki et al., 1995]. Nef sembra direttamente citotossico per gli astrociti, mentre influenza in modo indiretto la sopravvivenza neuronale attraverso il rilascio di neurotossine [van Marle et al., 2004]. Inoltre, la espressione di Nef negli astrociti *in vivo* può rappresentare un ulteriore *reservoir* nella demenza rapidamente progressiva [Ranki et al., 1995; Trillo-Pazos et al., 2000].

La neuropatogenicità di Nef è stata dimostrata in modelli *in vivo* dove diversi ceppi di Nef, anche mutati [Saksena et al., 1997; Churchill et al., 2004], possono penetrare nel SNC e provocare danni neuronali, in particolare astrocitosi [Singh et al., 2002], suggerendo una evoluzione compartimentalizzata delle sequenze di HIV-1 nel SNC

[Churchill et al., 2004]. Inoltre, è stato dimostrato che Nef è in grado di indurre la distruzione della BEE in un modello animale di ratto attraverso la attivazione delle MMP [Sporer et al., 2004]. È importante sottolineare come questo modello rispecchi ciò che avviene nei pazienti in associazione con la HAD, dove nel *liquor* si riscontrano livelli aumentati delle MMP [Conant et al., 1999].

Nef, inoltre, è in grado di stimolare la proliferazione dei podociti glomerulari attraverso la attivazione delle vie di trasduzione del segnale mediate da Stat-3 e MAP-K (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) [He et al., 2004; Lu et al., 2007] durante la nefropatia associata ad HIV-1 (HIVAN, *HIV Associated Nephropathy*), che rappresenta la causa più comune di perdita di funzionalità renale cronica nei pazienti HIV-1 positivi. In questi pazienti, i podociti vanno incontro ad un elevato tasso di proliferazione, causando ipertrofia, e perdita dei *marker* di differenziamento terminale, poiché Nef altera la regolazione delle cicline A ed E, e contemporaneamente sopprime p21 e p27 [Sunamoto et al., 2003]. I processi presenti sui podociti condividono con i dendriti neuronali molte caratteristiche, come la espressione della sinaptopodina, una proteina associata alla actina, sia nei processi dei podociti che nelle *spines* dendritiche, presente in correlazione alle diverse fasi dello sviluppo [Kobayashi, 2002; Kobayashi et al., 2004]. Viste queste caratteristiche comuni nella organizzazione citoscheletrica e nella formazione dei processi cellulari, e data la importanza della perdita del differenziamento neuronale terminale durante la HAD, possiamo ipotizzare un ulteriore ruolo di Nef nella HAD che permetta di spiegare alcune caratteristiche di questo processo degenerativo.

Dalla regione aminoterminale della sequenza di Nef si può dedurre che possieda capacità fusogene di membrana che possono permettere il passaggio della proteina attraverso la membrana cellulare [Curtain et al., 1994]. Quindi, si potrebbe ipotizzarne la presenza a livello extracellulare nel cervello nei pazienti HIV-1 positivi. Infatti, anticorpi diretti contro Nef sono stati dimostrati circolanti nel plasma di due terzi dei pazienti infettati con HIV-1, suggerendo così che Nef, *in vivo*, sia rilasciato a livello extracellulare [Cheingsong-Popov et al., 1990]. Nef, inoltre, viene rilasciato dalle cellule *in vitro* sia trasfettate [Guy et al., 1990] che infettate con HIV-1 [Freund et al., 1994].

In più, Nef interagisce direttamente con p53 diminuendone la emivita ed il legame col DNA, e conseguentemente determina la protezione della cellula infettata dalla apoptosi mediata da p53. Nef interagisce, inoltre, con PI-3K (*Phosphoinositide-3 Kinase*) determinandone la attivazione tramite fosforilazione e, quindi, inattivando la proteina proapoptotica Bad. Nef si associa anche alle serina-treonina chinasi, incluse le MAP-K e la PKC ϕ (*Protein Kinase C theta*).

3.3.2. La proteina cellulare *Anaplastic Lymphoma Kinase* (ALK)

La proteina ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) è un recettore tirosin-chinasino espresso principalmente nei neuroni del SNC e SNP negli ultimi stadi della embriogenesi. Quindi, ALK gioca un ruolo fondamentale nello sviluppo neuronale attraverso il controllo di proliferazione, differenziamento, sopravvivenza cellulare e formazione delle sinapsi. Dopo la nascita, la espressione di ALK diminuisce, ma rimane presente in alcune regioni del cervello quali talamo, bulbo olfattorio e mesencefalo [Iwara et al., 1997].

ALK è espressa, oltre che in condizioni fisiologiche, anche in diverse linee cellulari tumorali [Lamant et al., 2000; Dirks et al., 2002]. Infatti, la proteina ALK è stata originariamente identificata come un oncogene attivato nel linfoma anaplastico a cellule larghe (ALCL, *Anaplastic Large Cell Lymphoma*) all'interno della traslocazione cromosomiale t(2;5) [Shiota et al., 1994 and 1995]. In un terzo dei casi di questo tipo di linfoma non-Hodgkin, il dominio citoplasmatico di ALK è fuso con la metà aminotermine della proteina nucleofosmina (NPM, *nucleophosmin*) per generare come prodotto del gene di fusione la proteina p80^{NPM-ALK} [Morris et al., 1995]. NPM è una proteina multifunzionale, costitutivamente espressa, che gioca un ruolo nel traffico delle proteine tra il citoplasma ed il nucleo [Borer et al., 1989] e nella duplicazione del centrosoma dipendente dal ciclo cellulare [Okuda et al., 2000]. La porzione di NPM della proteina p80^{NPM-ALK} media la oligomerizzazione, portando alla attivazione costitutiva di ALK e delle molecole effettrici a valle, inducendo così trasformazione cellulare [Bischof et al., 1997]. Studi successivi hanno dimostrato, tramite il subclonaggio del c-DNA di ALK, che questa proteina codifica per un nuovo putativo recettore tirosin-chinasico (RTK, *Receptor-type protein Tyrosin Kinase*) della famiglia dei recettori per l'insulina [Iwara et al., 1997; Morris et al., 1997]. In particolare, la chinasi più strettamente correlata ad ALK è la tirosin-chinasi leucocitaria (LTK, *Leukocyte Tyrosin Kinase*) che manca però della sequenza corrispondente alla metà aminotermine del dominio extracellulare di ALK.

Nonostante la potenziale importanza di ALK nello sviluppo del sistema nervoso, si conosce poco sui suoi ligandi. Recenti studi propongono la pleiotropina (PTN, *pleiotrophin*) e la midkine (MK, *midkine*) come ligandi putativi [Stoica et al., 2001 and 2002; Bowden et al., 2002]. In particolare, PTN è un fattore di crescita che viene secreto e lega la eparina; è altamente espresso nel sistema nervoso durante lo sviluppo ed invece diminuisce nell'adulto. La PTN attiva sia la via di trasduzione del segnale di Ras/MAP-K che PI-3K/Akt. La MK presenta una omologia del 50% con la PTN a livello aminoacidico e condivide con la PTN la localizzazione genomica e la struttura proteica predetta. La MK è espressa ad alti livelli durante lo sviluppo

embrionale nel cervello e in numerosi altri organi, mentre la sua espressione diminuisce alla nascita. Nell'adulto, infatti, la MK presenta una distribuzione della espressione molto ristretta con i maggiori livelli di trascrizione nell'intestino e bassi nel cervelletto, tiroide, rene, vescica, alveoli polmonari, colon, stomaco e milza. La MK dirige la creazione delle interconnessioni neuronali durante le fasi precoci dello sviluppo neuronale e nelle fasi successive può svolgere il ruolo di mantenimento del fenotipo differenziato.

ALK trasmette sia segnali mitogenici che di differenziamento (crescita dei neuriti) tramite la via di trasduzione del segnale mediato dalle MAP-K, come dimostrato nel modello cellulare di neuroblastoma SK-N-SH [Souttou et al., 2001; Motegi et al., 2004] e di feocromocitoma PC12 [Gouzi et al., 2005]. La attivazione di ALK risulta nella associazione di IRS-1 (*Insulin Receptor Substrate-1*), Shc (*Src homology 2 domain containing*), PLC γ (*PhosphoLipase C gamma*) e PI-3K con ALK, e successiva fosforilazione sui residui di tirosina di IRS-1 e Shc.

Inoltre, ALK induce la fosforilazione costitutiva di Stat3 sia in cellule trasfettate con ALK che in cellule primarie umane di ALCL [Zamo et al., 2002]. Poiché Stat3 è in grado di indurre la espressione delle MMP e dei TIMP in diverse linee tumorali [Lai et al., 2004], Stat3 sembra giocare un ruolo importante nella invasione tumorale. In più, Stat3 è altamente espresso nel SNC durante lo sviluppo e nell'adulto per dirigere il differenziamento neuronale e promuovere la sopravvivenza e la rigenerazione neuronale nei siti di danno. Stat3 può, quindi, giocare un ruolo fondamentale nel danno alla BEE durante la HAD. Infatti, come riportato nel Paragrafo 3.3.1, in un modello di ratto, Nef induce la distruzione della BEE attraverso la attivazione delle MMP [Sporer et al., 2004].

4. SCOPO della TESI

La teoria ad oggi più accreditata sull'ingresso del virus della immunodeficienza umana-1 (HIV-1, *Human Immunodeficiency Virus-1*) nel sistema nervoso centrale (SNC) prevede che il virus raggiunga il cervello nelle fasi precoci della infezione sistemica, con localizzazione principalmente a livello dei macrofagi/microglia ed astrociti. HIV-1 causa nel 15-20% dei pazienti affetti da AIDS la insorgenza della demenza associata ad HIV-1 (HAD) che porta ad alterazioni a carico del SNC, come danneggiamento e perdita di connessioni e funzionalità neuronale. I meccanismi alla base di questa perdita restano però per lo più sconosciuti. Quindi, studiare i meccanismi alla base del differenziamento cellulare e del mantenimento di tale fenotipo ha un impatto importante nella comprensione dei meccanismi che risultano alterati in questa patologia. In particolare, tra le proteine di HIV-1, la sequenza codificante Nef è stata rilevata in biopsie cerebrali di pazienti con HAD. Inoltre, tale proteina virale è in grado di alterare a livello molecolare vie di trasduzione del segnale come quelle mediate da Stat3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) e MAP-K (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), che risultano importanti a livello del SNC per il differenziamento cellulare e il mantenimento del fenotipo differenziato delle cellule neuronali.

Il presente progetto di tesi è stato volto alla valutazione del possibile ruolo di Nef nella evoluzione della HAD. In particolare, la attenzione è stata rivolta alla analisi delle vie di trasduzione del segnale coinvolte nel differenziamento e mantenimento del fenotipo neuronale, che potrebbero risultare alterate dall'espressione della proteina virale. In questo contesto, ci si è concentrati sulla proteina ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*) come possibile proteina cellulare bersaglio dell'azione di Nef. La fosforilazione di ALK, infatti, determina una attivazione della via di trasduzione del segnale MAP-K dipendente, che controlla il differenziamento cellulare, e Stat3 dipendente, che è importante nella rigenerazione neuronale in seguito a danno. Quindi, utilizzando come modello sperimentale diverse linee cellulari, neuronali e non, si è voluto verificare se e in quale misura Nef e ALK potessero modulare le stesse vie di segnalazione intracellulare.

5. MATERIALI e METODI

5.1. *Materiali*

5.1.1. Linee Cellulari

Per questo lavoro sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

293T: la linea cellulare 293T deriva dalla linea cellulare 293, ed è una linea embrionale renale umana di origine epiteliale, a morfologia stellata, trasformata dalla proteina E1A di Adenovirus, che esprime, inoltre, l'antigene T del virus vacuolante della scimmia (SV40, *Simian Virus 40*) che permette la replicazione episomale di plasmidi contenenti l'origine di replicazione di SV40. Le cellule 293T sono state gentilmente fornite dal Dott. Baltimore (Rockefeller University, New York, NY, USA) (ATCC Number CRL-11268).

U87MG: linea cellulare umana adesa di glioblastoma, derivata da un glioma maligno di grado III, con morfologia epiteliale (ATCC Number HTB-14).

SK-N-SH: linea cellulare umana di neuroblastoma, a morfologia epiteliale, ottenuta da una metastasi di neuroblastoma a livello del midollo osseo (ATCC Number HTB-11).

Le linee cellulari 293T e U87MG venivano coltivate in terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), e la linea cellulare SK-N-SH in MEM α (*Minimum Essential Medium Alpha*) (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA). Entrambi i terreni sono stati addizionati con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS, *Foetal Bovine Serum*) (Gibco, Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), inattivato a 56°C per 30 minuti, e con l'1% di penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 μ g/ml) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

Le cellule venivano mantenute alla temperatura costante di 37°C in condizioni di umidità al 5% di CO₂ e sottoposte a periodici controlli di routine per escludere contaminazioni.

5.1.2. Plasmidi

Il vettore pBluescript II KS (+) phagemid (Stratagene, La Jolla, CA, USA), da qui in avanti indicato come pBKS, è un vettore di clonaggio dotato di una origine fagica. Accanto al sito di clonaggio (MCS), che possiede orientamento positivo (+), si

trovano i promotori per le RNA polimerasi del fago T3 e del fago T7, posti rispettivamente in 5' e in 3' rispetto al sito di clonaggio.

Il plasmide pBluescript II KS (+)/ALK (da qui in avanti indicato come pBKS/ALK) è stato ottenuto inserendo nel plasmide pBKS la sequenza del clone RMS17-2 di 6226bp del gene umano di ALK, che comprende la intera sequenza codificante del recettore tirosin-chinasico ALK e le sequenze in 5' e in 3' non tradotte. pBKS/ALK è stato gentilmente fornito dal Dott. Morris (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA) [Morris et al., 1997].

Il plasmide pcDNA3.1(+): (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) è un vettore commerciale di 5.4kb derivato dal vettore pcDNA3 che contiene il promotore precocissimo (*Immediate Early*, IE) del Citomegalovirus umano (HCMV, *Human CytoMegalovirus*) che permette la espressione dell'inserto ad alti livelli in un ampio numero di linee cellulari di mammifero, il MCS nell'orientamento positivo (+), la resistenza alla neomicina, che permette di selezionare linee cellulari stabilizzate, e la origine di replicazione di SV40, che permette la replicazione episomale in linee cellulari che sono infettate latentemente con SV40 o che esprimono l'antigene T di SV40.

Il plasmide pcDNA3.1(+)/ALK è stato ottenuto inserendo la intera sequenza codificante per la proteina ALK umana nei siti EcoRV-NotI del vettore pcDNA3.1(+). La sequenza di ALK utilizzata era stata precedentemente amplificata dal vettore pBKS/ALK mediante PCR e successivamente sottoposta a restrizione enzimatica con Sall-NotI.

I plasmidi pcDNA3.1(+)/ALK-FlagN₁ e pcDNA3.1(+)/ALK-FlagC₁ sono stati ottenuti inserendo la sequenza codificante per ALK amplificata tramite PCR dal vettore pBKS+/ALK, usando gli oligonucleotidi appropriati riportati in Tabella 1, contenenti o meno la sequenza epitopo Flag. La sequenza Flag è stata inserita *in frame* tra i siti XhoI ed EcoRI di pcDNA3.1(+), in modo da essere presente in posizione N-terminale o C-terminale di ALK, ottenendo così rispettivamente i costrutti pcDNA3.1(+)/ALK-FlagN₁ e pcDNA3.1(+)/ALK-FlagC₁.

Il plasmide commerciale pEGFP-C₁: (BD Biosciences, Clontech, Mountain View, CA, USA) codifica la proteina EGFP, una variante della proteina fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*) isolata da *Aequorea victoria*, ottimizzata per fornire una fluorescenza brillante ed alti livelli di espressione. Questa variante della GFP presenta un singolo e forte picco di eccitazione a 488 nm. Il promotore IE dell'HCMV guida la espressione della proteina EGFP. I geni clonati nel MCS, che è posizionato tra la sequenza codificante per la EGFP e il segnale di polyA di SV40, vengono espressi come proteine di fusione al C-terminale di EGFP. Il polyA di SV40 a valle del gene EGFP dirige il processamento corretto della estremità 3'

dell'mRNA. Il *backbone* del vettore contiene una origine per la replicazione di SV40 in cellule di mammifero che esprimono l'antigene T di SV40, una origine pUC di replicazione per la propagazione in *E. coli*, e una origine f1 per la produzione di DNA a singolo filamento. La cassetta di resistenza per la neomicina permette la selezione di cellule eucariotiche stabilmente trasfettate. Un promotore batterico a monte della cassetta conferisce la resistenza alla kanamicina in *E. coli*.

Nel vettore pSR α /Nef-HA è contenuto il gene Nef di HIV-1 LAI (sottotipo B) con la sequenza HA fusa *in frame* al C-terminale. Il *backbone* del vettore è rappresentato dal plasmide pBJ5 che contiene il promotore SR α e la resistenza per la ampicillina [Dorfman et al., 2002].

Il plasmide commerciale pd2EGFP-N1 (BD Biosciences, Clontech, Mountain View, CA, USA) codifica per la proteina EGFP, una variante della GFP isolata da *Aequorea victoria*, ottimizzata per fornire una fluorescenza brillante ed ad alti livelli di espressione. La EGFP presenta un singolo e forte picco di eccitazione a 488 nm. Questo vettore è privo della sequenza promotrice, quindi, può essere utilizzato per verificare la attività di sequenze promotrici putative, inserendo la sequenza di interesse nel sito di clonaggio presente a monte della sequenza codificante per la EGFP. Il vettore possiede la origine di replicazione di SV40 ed il gene per la resistenza alla neomicina che permette la selezione in linee eucariotiche. A monte di questa resistenza è presente il gene per la resistenza alla kanamicina per *E. coli*. Il vettore possiede, inoltre, una origine di replicazione pUC19 per la propagazione in *E. coli* e una origine f1 per la produzione di DNA a singolo filamento.

Il plasmide pd2EGFP-N1/ALK-Pr è stato ottenuto inserendo nel sito di clonaggio del vettore pd2EGFPN-1 il putativo promotore del gene ALK, ottenuto tramite PCR dal plasmide pBKS/ALK.

Il plasmide cPPT.hCMV.GFP contiene il vettore basato su HIV-1 di terza generazione *Self-Inactivating* (SIN), che presenta la regione U3 della LTR alla estremità 5' sostituita con il promotore del Virus del Sarcoma di Rous (RSV, *Rous Sarcoma Virus*) e la regione U3 della LTR alla estremità 3' deleta. Nel plasmide sono presenti le sequenze PBS (*Primer Binding Site*) e cPPT (*central Poly-Purine Tract*), che rappresentano i siti di inizio della retrotrascrizione da parte della trascrittasi inversa virale, una regione del gene *gag*, la sequenza RRE (*Rev Responsive Element*), la sequenza WPRE (*Woodchuck Hepatitis C Virus Post-transcriptional Regulatory Element*), che conferisce stabilità al trascritto virale, e la delezione del gene *env*. Il plasmide permette la espressione del gene della GFP, che avviene sotto il controllo trascrizionale del promotore IE di HCMV. La presenza della origine di replicazione di SV40 permette una efficiente replicazione del plasmide in cellule che esprimono costitutivamente l'antigene T di SV40.

Il plasmide pMDL contiene i geni *gag* e *pol* di HIV-1 posti sotto il controllo del promotore IE di HCMV. Sono presenti la sequenza RRE e la sequenza di polyA del gene della β -globina umana.

Il plasmide pVSV_G contiene il gene della glicoproteina G di VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) sotto il controllo del promotore IE di HCMV.

Il plasmide pRev contiene il gene *rev* di HIV-1 sotto il controllo del promotore del RSV.

I plasmidi cPPT.hCMV.GFP, pMDL, pVSV_G e pRev sono stati gentilmente concessi dal Prof. Naldini (Ospedale San Raffaele, Milano). Tutti questi plasmidi contengono la origine di replicazione batterica (ColE1) e il gene che conferisce la resistenza alla ampicillina.

Il plasmide cPPT.hCMV.Nef-HA è stato ottenuto inserendo nel vettore cPPT.hCMV.GFP la sequenza codificante per la proteina Nef al posto di quella per la GFP. La sequenza Nef, fusa all'epitopo HA, è stata amplificata tramite PCR dal plasmide *sra*/Nef-HA ed inserita nei siti BamHI/SaII del vettore cPPT.hCMV.

I plasmidi sono stati amplificati usando il ceppo DH5 α di *E. coli*. Il ceppo batterico veniva coltivato in forma liquida in terreno Luria-Bertani (LB: Bacto-triptone 1% (p/v), estratto di lievito 0.5% (p/v), NaCl 1% (p/v)) in condizioni di agitazione a 37°C, o a 30°C in base al plasmide da amplificare, per 12-16 ore. I batteri contenenti plasmidi a basso numero di copie venivano coltivati in presenza di cloramfenicolo (170 μ g/ml), che veniva aggiunto 6 ore dopo l'inoculo iniziale. Il terreno solido LB agar è stato ottenuto aggiungendo l'1.5% (p/v) di agar al terreno LB. In caso di necessità di selezione tramite antibiotico, gli agenti di selezione appropriati venivano aggiunti al terreno. La ampicillina è stata usata alla concentrazione finale di 100 μ g/ml e la kanamicina a quella di 30 μ g/ml.

5.1.3. Oligonucleotidi innesco

Nelle reazioni di amplificazione a catena della polimerasi (PCR), di sequenziamento e/o di *Real-Time* PCR, sono stati utilizzati oligonucleotidi innesco opportunamente disegnati e riportati in Tabella 1.

	Nome del primer	Sequenza nucleotidica 5'-3'	Temperatura di appaiamento	Sequenza amplificata
1	BAC F	5' TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CT 3'	60°C	β -actina umana

2	BAC R	5' CGA AGC ATT GCG GTG GAC GAT GGA GC 3'	60°C	β -actina umana
3	ALK RT Fw	5' CCA GAC AAC CCA TTT CGA GT 3'	62°C	ALK umano
4	ALK RT Rev	5' ACT GAG GAG TGT GGG GTG AC 3'	62°C	ALK umano
5	ALK-Flag Fw	5' GCA GCA GAA TTC GCC ACC ATG GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG GGA GCC ATC GGG CTC 3'	64°C	ALK umano
6	ALK-Flag Rev	5' ACG ACG CTC GAG TCA CTT ATC GTC GTC ATC CTT GTA ATC GGG CCC AGG CTG GTT 3'	64°C	ALK umano
7	ALK Fw	5' GCA GCA GAA TTC GCC ACC ATG GGA GCC ATC GGG CTC 3'	62°C	ALK umano
8	ALK Rev	5' CGA CGC TCG AGT CAG GGC CCA GGC TGG TT 3'	62°C	ALK umano
9	prALK Fw	5' GCA GCA GTC GAC AAG CGG GGG 3'	68°C	Promotore ALK
10	prALK Rev	5' ACG ACG GGA TCC CCC GCC GGA 3'	68°C	Promotore ALK
11	pNald-Nef-HA Fw	5' GCA GCA GGA TCC GCC ACC ATG GGT GGG AAG TGG TCA 3'	62°C	HIV-1 Nef-HA
12	pNald-Nef- HA Rev	5' ACG ACG GTC GAC TCA AGC GTA ATC TGG GAC 3'	62°C	HIV-1 Nef-HA
13	GFP Rev	5' CTA CAA CGG CAG GAG GAA CTT 3'	55°C	EGFP
14	RP Fw	5' GAA ACG GTG GAC GTG CTT AT 3'	63°C	RNA Polimerasi II <i>largest subunit</i>
15	RP Rev	5' GGT GTC ATG GCA GGA GAG AT 3'	63°C	RNA Polimerasi II <i>largest subunit</i>
16	Oligonucleotidi universali	Corti oligodesossiribonucleotidi a sequenza <i>random</i> [d(N) ₆]	50°C	
17	TNF- α Fw TaqMan	5' CCC AGG GAC CTC TCT CTA ATC 3'	60°C	TNF- α
18	TNF- α Rev TaqMan	5' ATG GGC TAC AGG CTT GTC ACT 3'	60°C	TNF- α
19	TNF- α sonda TaqMan	5' 6FAM-TGG CCC CAG GCA GTC AGA TCA TC-TAMRA 3'	60°C	TNF- α
20	IL-1 β Fw TaqMan	5' ACA GAT GAA GTG CTC CTT CCA 3'	60°C	IL-1 β
21	IL-1 β Rev TaqMan	5' GTC GGA GAT TCG TAG CTG GAT 3'	60°C	IL-1 β

22	IL-1 β sonda TaqMan	5' 6FAM-CTC TGC CCT CTG GAT GGC GG-TAMRA 3'	60°C	IL-1 β
23	SDF-1 α Fw	5' TCA GCC TGA GCTA CAG ATGC 3'	60°C	SDF-1 α
24	SDF-1 α Rev	5' CTT TAG CTT CGG GTC AAT GC 3'	60°C	SDF-1 α
25	Rantes Fw	5' AGC TAC TCG GGA GGC TAA GG 3'	60°C	Rantes
26	Rantes Rev	5' CAA AGC CAG AGC TCA GAA CC 3'	60°C	Rantes

Tabella1. Oligonucleotidi innesco usati e loro principali caratteristiche.

5.2. Metodi

5.2.1. Preparazione del DNA plasmidico

Il DNA plasmidico è stato estratto dal ceppo DH5 α di *E. coli* con il metodo della lisi alcalina applicato per preparazioni plasmidiche in piccola scala (*miniprep*) per piccoli volumi di coltura batterica (1-2 ml). La metodica prevede l'utilizzo del potassio acetato ad elevata molarità (5 M) che precipita le molecole di DNA ad alto peso molecolare. Il DNA così ottenuto è stato precipitato con etanolo al 96% (v/v) e risospeso in TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8) contenente RNAsi pancreatica 20 μ g/ml (Roche-Boehringer, Basel, Switzerland).

Per preparazioni di DNA plasmidico su larga scala (*maxiprep*) ad elevato grado di purezza è stato utilizzato il QIAGEN® *Plasmid MAXI kit* (QIAGEN, Venlo, Netherlands) basato sull'utilizzo di colonne dotate di resine a scambio anionico. Attraverso questo procedimento il DNA plasmidico si lega alla resina della colonna utilizzando tamponi a bassa concentrazione salina, mentre viene purificato da RNA, proteine e impurità ad alto peso molecolare. Il DNA plasmidico viene poi eluito dalla colonna per mezzo di tamponi ad elevata concentrazione salina. Il plasmide, in seguito, viene concentrato e pulito da sali mediante precipitazione con isopropanolo e lavaggio con etanolo al 70% (v/v). Il pellet di DNA viene risospeso in *buffer* TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0). Il DNA ottenuto viene controllato mediante restrizione enzimatica ed elettroforesi su gel di agarosio alla opportuna concentrazione (p/v), utilizzando il tampone TBE 1 X (9 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8) ed opportuni marcatori di peso molecolare (Roche-Boehringer, Basel, Switzerland). Quando necessario, la quantità di DNA plasmidico è stata quantificata allo spettrofotometro *BioPhotometer* (Eppendorf, Hamburg, Germany) mediante lettura della assorbanza (A) di diluizioni degli acidi nucleici alla lunghezza d'onda di

260 nm, che corrisponde al massimo di assorbimento per le basi azotate. E' possibile ricavare la concentrazione del campione sfruttando la legge di Lambert-Beer:

$$A = C \cdot l \cdot \varepsilon$$

dove: *A* rappresenta la assorbanza del campione,

C rappresenta la concentrazione del campione in soluzione,

l rappresenta la lunghezza del cammino ottico della cuvetta (0.1 cm con cuvette Eppendorf UVette 50-200 µl),

ε rappresenta il coefficiente di estinzione molare del campione in analisi (pari a 20 g⁻¹cm⁻¹L per il DNA a doppio filamento).

La presenza di eventuali contaminazioni veniva rivelata tramite lettura della preparazione alla lunghezza d'onda di 280 nm, alla quale il legame peptidico presenta il picco di assorbimento. Venivano considerate pure le preparazioni per le quali il rapporto A₂₆₀/A₂₈₀ era compreso tra 1,8 e 2.

5.2.2. Restrizioni enzimatiche

Le reazioni di restrizione enzimatica sono state condotte con gli appropriati enzimi in presenza dei tamponi specifici (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) alla loro temperatura ottimale e solitamente per un tempo non superiore alle 2-4 ore. Una aliquota dei prodotti di digestione è stata controllata mediante migrazione elettroforetica in gel d'agarosio alla opportuna concentrazione (p/v), utilizzando il tampone TBE. Per verificare la corretta dimensione dei frammenti sono stati utilizzati opportuni marcatori di peso molecolare (Roche-Boehringer, Basel, Switzerland).

5.2.3. Tecniche di clonaggio

La strategia di clonaggio ha previsto l'ottenimento del frammento da clonare mediante restrizione enzimatica o PCR a partire dal plasmide nel quale esso è contenuto. Alla fine della reazione, la miscela è stata sottoposta a migrazione elettroforetica in gel d'agarosio alla opportuna concentrazione (p/v), utilizzando il tampone TBE. Per verificare la corretta dimensione dei frammenti sono stati utilizzati opportuni marcatori di peso molecolare (Roche-Boehringer, Basel, Switzerland). Il frammento di gel, contenente la banda corretta, è stato inciso con un bisturi ed il DNA è stato purificato grazie all'utilizzo del *QIAquick® gel extraction kit* (QIAGEN, Venlo, Netherlands). Questo sistema è basato sulla solubilizzazione dell'agarosio e sul successivo legame specifico degli acidi nucleici alla membrana di

silice-gel di una colonna a scambio anionico in presenza di un sale caotropico. I contaminanti non vengono trattiene e le impurità vengono lavate via in modo efficiente. La separazione finale del DNA, liberato da sali ed enzimi, è resa possibile attraverso una serie di eluizioni progressive. Infine, il DNA legato alla membrana viene eluito nel buffer EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5).

Per procedere alla reazione di ligazione, è stata utilizzata la attività dell'enzima ligasi del batteriofago T4 (4×10^5 U/ml) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), 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. Le reazioni sono state effettuate in un volume finale di 20 µl, impiegando 1 unità di ligasi ed incubate a 16°C per 16 ore. Le quantità di vettore ed inserto da utilizzare nella reazione di ligazione vengono determinate utilizzando la seguente formula:

$$X \text{ (ng)} = [Y_{pb} \cdot 300 \text{ ng}] / V_{pb}$$

dove: X indica i ng dell'inserto,

Y_{pb} indica il numero di paia di basi dell'inserto,

300 ng indica il quantitativo in ng di vettore utilizzato,

V_{pb} indica il numero di paia di basi del vettore plasmidico.

I prodotti di ligazione sono poi utilizzati per la trasformazione dei batteri come descritto nel Paragrafo 5.2.4. I batteri vengono successivamente seminati su terreno LB agar addizionato con l'opportuno agente di selezione ed incubate a 37°C. Le singole colonie resistenti vengono selezionate ed incubate in 5 ml di terreno LB, in presenza dell'antibiotico appropriato, e fatte crescere 16 ore a 37°C in agitazione. La presenza del DNA plasmidico viene verificata usando il protocollo delle "miniprep" (Paragrafo 5.2.1). Successivamente il DNA plasmidico presente nelle colonie, viene controllato mediante restrizione enzimatica, gel di elettroforesi e sequenziamento dell'inserto.

5.2.4. Competenza e trasformazione batterica

I plasmidi e i prodotti delle reazioni di ligazione sono stati utilizzati per la trasformazione di cellule batteriche *E. coli*, ceppo DH5α, rese artificialmente competenti mediante la tecnica del cloruro di calcio. In dettaglio, la competenza batterica è stata ottenuta facendo crescere le colonie batteriche a 37°C in 3 ml di terreno liquido LB contenente 15 mM MgCl₂, in assenza di antibiotico per circa 12 ore. In seguito l'inoculo è stato trasferito in 400 ml dello stesso terreno. Una volta raggiunta la densità ottica (D.O.) 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 10 mM MnCl₂·4H₂O, 50 mM CaCl₂, 10 mM MES [2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid] pH 6.3. I batteri sono stati poi ricentrifugati, delicatamente risospesi in 10 ml della medesima soluzione fredda addizionata di glicerolo al 15% (v/v) e, quindi, aliquotati e conservati a -80°C.

Per la trasformazione batterica si sono incubati sterilmente 50 µl di batteri competenti DH5α, con 100-300 ng di DNA plasmidico o con i prodotti delle reazioni di ligazione (Paragrafo 5.2.3) per 30 minuti in ghiaccio. In seguito sono stati sottoposti a *shock* termico mediante esposizione dei batteri a 37°C per 3 minuti, successivamente raffreddati in ghiaccio ed infine incubati con 250 µl di terreno LB senza agente di selezione a 37°C per 45 minuti. In questo modo si favorisce la espressione della proteina per la resistenza all'antibiotico, consentendo la selezione dei soli cloni trasformati con il DNA plasmidico di interesse. Infine, 250 µl della sospensione sono stati seminati in piastre Petri contenenti LB agar addizionato con ampicillina (100 µg/ml) o kanamicina (30 µg/ml) ed incubati a 37°C per 16 ore al fine di selezionare i batteri trasformati.

5.2.5. Sequenziamento dei plasmidi

Oltre all'analisi enzimatica i plasmidi ottenuti sono stati controllati mediante sequenziamento. A tale scopo, è stato utilizzato il *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) basato sul metodo di Sanger modificato. Durante la reazione, l'enzima DNA Polimerasi AmpliTaq amplifica copie di DNA a singolo filamento di circa 300 nucleotidi a partire dall'oligonucleotide innesco fornito (Tabella 1), incorporando casualmente i quattro deossinucleotidi trifosfato (dNTPs) e dideoxinucleotidi trifosfato (ddNTPs), ognuno dei quali è coniugato ad un diverso cromoforo, che arrestano la reazione. Questi cromofori, quando eccitati con la stessa lunghezza d'onda (448 nm), sono in grado di emettere fluorescenza a lunghezza d'onda diversa compresa tra 500 e 700 nm e di legarsi ai ddNTPs in modo tale da non interferire stericamente nella reazione di polimerizzazione. Le dimensioni dei vari amplificati vengono analizzate in un capillare sottile che riconosce il fluoroforo associato ad ogni nucleotide terminatore; in questo modo si può risalire a ritroso alla sequenza nucleotidica complementare. Tale procedura di elettroforesi capillare viene effettuata utilizzando un sequenziatore automatico ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con gli

appropriati parametri strumentali. Il risultato di un sequenziamento automatico corrisponde ad un profilo densitometrico di picchi fluorescenti.

La reazione di sintesi del prodotto da sequenziare è stata allestita in un volume finale di reazione di 15 o 20 µl contenente rispettivamente 40 ng di prodotto di PCR, precedentemente purificato mediante passaggio in colonne Microcon (Millipore, Billerica, MA, USA), o 300 ng di DNA estratto da preparazioni plasmidiche, 3.2 pmol di oligonucleotidi innesco alla concentrazione 1 µM, 1 µl di tampone 5 X (200 mM Tris-HCl pH 9.0, 5 mM MgCl₂), 1 µl della miscela del *kit* e acqua deionizzata per arrivare a volume. Come inneschi sono stati utilizzati opportuni oligonucleotidi riportati in Tabella 1. Sono stati effettuati 35 cicli di amplificazione in termociclatore *Thermal Cycler 2400* (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), comprendenti una fase di denaturazione a 95°C per 10 secondi, una fase di appaiamento degli oligonucleotidi a 50°C per 10 secondi e una fase di elongazione a 62°C per 4 minuti. Allo scopo di denaturare il DNA stampo e di attivare la polimerasi, i 35 cicli sono stati preceduti da una incubazione della miscela di reazione a 95°C per 10 minuti. Il prodotto della reazione di sequenziamento è stato precipitato in presenza di 1/10 del volume di 3 M sodio acetato pH 4.6 e 2 volumi di etanolo, e successivamente risospeso in acqua per essere caricato nel sequenziatore automatico.

5.2.6. Reazione di amplificazione a catena della polimerasi (PCR)

Per la amplificazione di opportuni frammenti di DNA è stata utilizzata la tecnica di amplificazione a catena della polimerasi (PCR, *Polymerase Chain Reaction*), avvalendosi di specifiche coppie di oligonucleotidi innesco (Tabella 1).

La reazione prevede l'utilizzo del DNA del campione da amplificare (100 ng), 5 µl del tampone di reazione 10 X (10 mM Tris-HCl pH 8.3 e 50 mM KCl), 15 mM MgCl₂, 2.5 µl di ciascun oligonucleotide di innesco (10 µM), 8 µl dalla miscela dei quattro diversi dNTPs 0.1 mM, 0.5 µl dell'enzima AmpliTaq Gold (5 U/µl) ed acqua deionizzata fino ad un volume di 50 µl. Tutti i reagenti utilizzati sono stati forniti dalla ditta Roche-Boeringer (Basel, Switzerland). Sono stati effettuati 40 cicli di amplificazione in termociclatore *Thermal Cycler 2400* (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), comprendenti una fase di denaturazione a 95°C per 1 minuto e 30 secondi, una fase di appaiamento degli oligonucleotidi innesco per 1 minuto alla temperatura ottimizzata per ciascuna reazione (Tabella 1), ed una fase di elongazione a 72°C per 1 minuto. Allo scopo di denaturare il DNA stampo e di attivare la polimerasi, i cicli sono stati preceduti da una incubazione delle miscele di reazione a 95°C per 5 minuti. I frammenti ottenuti sono stati analizzati mediante migrazione elettroforetica in gel di agarosio alla opportuna concentrazione, utilizzando il marcatore di peso

molecolare opportuno per verificare che le dimensioni degli amplificati fossero corrette.

Per amplificare frammenti superiori alle 2000 pb è stato utilizzato l'enzima rTth DNA Polymerase XL (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). La reazione prevede il DNA del campione da amplificare (250 ng), 15 µl del tampone di reazione 3.3x (50% (v/v) glicerolo, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT [ditiotreitolo], 0.5% (v/v) Tween[®] 20), 3 µl Mg(OAc)₂, 2.5 µl di ciascun oligonucleotide di innesco (10 µM), 8 µl dalla miscela dei quattro diversi dNTPs (625 µM, Roche, Basel, Switzerland), 0.5 µl dell'enzima rTth DNA Polymerase XL ed acqua deionizzata fino ad un volume di 50 µl. Sono stati effettuati 40 cicli di amplificazione in termociclatore *Termal Cycler 2400* (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA), comprendenti una fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una fase di appaiamento degli oligonucleotidi innesco per 30 secondi alla temperatura ottimizzata per ciascuna reazione (Tabella 1), ed una fase di elongazione a 72°C per 30 secondi. Allo scopo di denaturare il DNA stampo e di attivare la polimerasi, i cicli sono stati preceduti da una incubazione delle miscele di reazione a 95°C per 10 minuti.

5.2.7. Estrazione dell'RNA e RT-PCR

Per verificare la presenza di specifici trascritti genici, le cellule sono state sottoposte a lisi e successiva estrazione dell'mRNA, poi retrotrascritto mediante l'utilizzo dell'enzima retrovirale trascrittasi inversa (RT), prima di procedere all'amplificazione della sequenza di interesse mediante PCR (Paragrafo 5.2.6) e/o *Real-Time* PCR. L'RNA è stato estratto utilizzando l'*RNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Venlo, Netherlands) basato sull'utilizzo di colonne ad affinità con matrice di silice. Queste colonne consentono di purificare gli RNA di lunghezza superiore a 200 bp direttamente da un lisato cellulare. 5×10^6 cellule sono state tripsinizzate e risospese in PBS, centrifugate a 1800 rpm per 8 minuti e successivamente lisate utilizzando il tampone contenente guanosina isotiocianato (GITC), che inattiva l'RNAsi cellulare, e β-mercaptoetanolo, un agente in grado di ridurre i ponti disolfuro. Quindi, dopo la aggiunta di etanolo al 70% (v/v), l'estratto cellulare è stato trasferito in colonna dove è stato centrifugato a 13000 rpm per 15 secondi per purificarlo e poi sottoporlo a lavaggi con opportuni tamponi necessari per rendere il legame dell'RNA più restrittivo. Infine, l'RNA è stato eluito in 30 µl di acqua priva di RNAsi. Per eliminare residui di DNA, l'mRNA è stato incubato con DNAsi (Roche-Boeringer, Basel, Switzerland) in presenza del tampone adeguato per 1 ora a 37°C. Per

inattivare la DNAsi i campioni sono stati incubati 5 minuti a 95°C e sono stati in seguito posti 2 minuti in ghiaccio. L'RNA, dopo essere stato quantificato allo spettrofotometro, è stato conservato a -80°C per poi essere utilizzato.

Successivamente si è proceduto alla retrotrascrizione dell'mRNA ad opera della retrotrascrittasi del virus della leucemia murina di Moloney (Mo-MLV), in grado di retrotrascrivere l'mRNA in presenza di ioni magnesio. La reazione prevede l'utilizzo di 5 µg di RNA totale estratto, 5 µl del tampone 10 X (50 mM KCl, 10 mM Tris HCl pH 8.3), 11 µl di 25 mM MgCl₂ (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 10 µl di una miscela contenente i quattro dNTPs (0.4 mM), 2.5 µl di oligonucleotidi universali (1.5 mM), 1 µl di RNAsin (inibitore dell'RNAsi) (concentrato 20 U/µl) (Promega Corporation, Madison, WI, USA) e 2.5 µl della RT di MoMLV (concentrata 50 U/µl). Il volume totale della reazione è stato portato a 50 µl aggiungendo acqua. La reazione di retrotrascrizione è avvenuta nel termociclatore *Thermal Cycler 2400* (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) seguendo le fasi di attivazione a 25°C per 10 minuti, di allungamento a 42°C per 50 minuti, di inattivazione a 95°C per 5 minuti. I trascritti sono stati poi sottoposti a reazione di PCR (Paragrafo 5.2.6) e/o *Real Time* PCR (Paragrafo 5.2.8). Per valutare la qualità del cDNA ottenuto, sono stati amplificati i geni della β-actina o della RNA polimerasi, costitutivamente espressi in tutti i tipi cellulari, utilizzando oligonucleotidi specifici e le condizioni opportune (Tabella 1). In particolare, sono stati amplificati 5 µl della miscela di retrotrascrizione, contenente il cDNA, con la coppia di oligonucleotidi innesco specifica per il trascritto ricercato.

5.2.8. Real-Time PCR

La tecnologia *Real-Time* PCR permette una valutazione quantitativa dei prodotti di PCR. In particolare in questo lavoro di tesi sono state utilizzate due tecniche: la prima sfrutta sonde TaqMan, ed è stata utilizzata per gli mRNA dei geni TNFα ed IL-1β, e la seconda *sybr green*, che è stata usata per gli mRNA di ALK, SDF-1α, Rantes, RNA Polimerasi II *largest subunit* e β-actina (Tabella1). In particolare, gli oligonucleotidi usati per il metodo *sybr green* sono stati selezionati dal nostro gruppo di ricerca mediante l'utilizzo del programma (primer 3.cgi v.02.c) presente in internet (www.genome.wi.mit.edu).

In dettaglio, la tecnica TaqMan prevede l'impiego di sonde TaqMan che contengono un cromoforo *reporter* alla estremità 5' ed un cromoforo *quencher* alla estremità 3' e sfrutta la attività 5'-3' esonucleasica dell'enzima Taq polimerasi. Infatti, durante la fase di estensione l'enzima Taq polimerasi degrada la sonda marcata che si appaia

all'interno della regione di DNA da amplificare, a partire da uno dei due oligonucleotidi innesco. La sonda viene così tagliata tra *reporter* e *quencher* e la fluorescenza viene emessa dal fluoroforo in modo proporzionale all'accumulo del prodotto, mentre la polimerizzazione del filamento può procedere. Questo processo si ripete ad ogni ciclo e non interferisce con l'accumulo del prodotto. La molecola fluorescente *reporter* viene, quindi, usata per monitorare la reazione di PCR durante il suo svolgimento; infatti, la sua fluorescenza cresce con l'accumularsi del prodotto durante il susseguirsi dei cicli di amplificazione. Durante i primi cicli, la variazione della fluorescenza è solitamente impercettibile, poiché la sonda è intatta e, quindi, il *reporter* e il *quencher* si trovano vicini e questo determina la soppressione della fluorescenza del *reporter*. Ad un certo momento però, l'accumulo del prodotto si traduce in un aumento misurabile della fluorescenza all'interno della *mix* di reazione. Il ciclo nel quale la fluorescenza supera in modo apprezzabile il rumore di fondo (*background*) viene chiamato ciclo soglia (C_T , *threshold cycle*). Esiste una relazione lineare tra il logaritmo della quantità iniziale di template ed il corrispondente ciclo soglia durante la relazione di *Real-Time* PCR. Poiché l'incremento della fluorescenza è rilevato solo se la sequenza bersaglio è complementare alla sonda, non vengono rilevate le amplificazioni aspecifiche.

Per gli altri mRNA si è invece utilizzato il sistema basato sull'uso di un *reporter* fluorescente aspecifico, detto *sybr green*. In questo caso la fluorescenza aumenta in modo significativo durante la fase di estensione nella quale i fluorofori aspecifici hanno la possibilità di legarsi intercalandosi alla doppia elica del DNA.

I valori di ciclo soglia ottenuti per ogni sequenza di DNA, vengono normalizzati sul valore ottenuto dalla amplificazione di un gene espresso in modo costitutivo, come ad esempio la β -actina o la RNA polimerasi II (Tabella 1).

5.2.9. Tecniche di trasfezione

Le cellule sono state seminate 24 ore prima della trasfezione ad una concentrazione di $1,5 \times 10^5$ cellule in piastre da 6 pozzetti o 2×10^6 cellule in piastre da 100 mm di diametro in terreno completo. La mattina successiva, il terreno di coltura viene sostituito con terreno privo di FBS, ma contenente BSA, e lasciato ad equilibrare per due ore a 37°C nell'incubatore. Le cellule vengono poi trasfettate con 1.5 μg totali di DNA e 5 μl di Lipofectamin 2000 per le piastre da 6 pozzetti (BD Biosciences, Falcon, Mountain View, CA, USA), mentre 7 μg totali di DNA e 20 μl di Lipofectamin 2000 per le piastre da 100 mm di diametro (BD Biosciences, Falcon, Mountain View, CA, USA), secondo le indicazioni del produttore (Invitrogen

Corporation, Carlsbad, CA, USA). Dopo una incubazione di 20 minuti a temperatura ambiente, i campioni sono stati distribuiti uniformemente sulle cellule. Dopo circa 5 ore di incubazione, alle cellule è stata aggiunta una quantità di terreno fresco contenente FBS pari a 10 ml.

5.2.10. Produzione di virioni ricombinanti HIV-1

Le cellule 293T venivano seminate il giorno precedente alla trasfezione ad una densità di 3×10^6 cellule in piastre da 100 mm di diametro (BD Biosciences, Falcon, Mountain View, CA, USA) in terreno DMEM addizionato con FBS. La trasfezione è stata condotta mediante lipofezione con Lipofectamin 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) ed in particolare sono stati utilizzati 10 μg del plasmide cPPT.hCMV.GFP o cPPT.hCMV.Nef-HA, 7.5 μg del plasmide pMDL, 3 μg del plasmide pRev e 3.5 μg del plasmide pVSV_G. Il giorno successivo, il terreno veniva sostituito con terreno fresco contenente FBS, per eliminare la Lipofectamin 2000. I virioni ricombinanti HIV-1 rilasciati nel sovrinatante della coltura cellulare venivano raccolti il giorno successivo, cioè 48 ore dopo la trasfezione. Il sovrinatante veniva poi centrifugato a 1200 rpm per 10 minuti per eliminare i residui cellulari, e successivamente filtrato con filtri da 0.45 μm (Millipore, Billerica, MA, USA). Il virus, una volta aliquotato, veniva conservato a -80°C .

5.2.11. Trasduzione di cellule bersaglio con virioni ricombinanti HIV-1 mediante *spin inoculation*

Le cellule SK-N-SH venivano seminate nelle piastre da 6 pozzetti (BD Biosciences, Falcon, Mountain View, CA, USA) alla densità di 5×10^5 cellule per pozzetto in terreno MEM α addizionato di FBS. Il giorno successivo, le cellule venivano trasdotte con 750 μl di virioni ricombinanti HIV-1 (ottenuti come descritto nel Paragrafo 5.2.10) in centrifuga a 1200 rpm a 4°C per 1 ora. Successivamente il sovrinatante veniva sostituito con MEM α addizionato di FBS. Le cellule venivano poi lisate a diversi tempi di raccolta.

5.2.12. SDS-gel elettroforesi

Le cellule sono state lisate mediante risospensione in soluzione di lisi RIPA 1 X (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% (v/v) IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich, St

Louis, MO, USA), 0.1% (p/v) sodio deossicolato (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), 4 mM EDTA), con la aggiunta della miscela di inibitori delle proteasi, “Complete” (estratto di pancreas, pronasi, termolisina, chimotripsina, tripsina, papaina) (Roche, Basel, Switzerland) ed inibitori delle fosfatasi (1 mM PMSF [fluoruro di fenilmetansulfonile], 2.5 mM Na₃OV₄ [sodio ortovanadato]). I lisati sono stati sottoposti a 3 cicli di gelo/scongelo per favorire la lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine bloccando la attività delle proteasi e delle fosfatasi intracellulari che, una volta rilasciate, potrebbero degradare le proteine di interesse e/o i siti fosforilati. In seguito a centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti, i sovranatanti sono stati prelevati e conservati a -80°C.

La quantità totale delle proteine contenute negli estratti cellulari è stata determinata tramite un saggio colorimetrico seguito da quantificazione allo spettrofotometro. I reattivi per il saggio sono disponibili in un *kit* (*Micro BCA Protein Assay kit*) (Pierce, Rockford, IL, USA). Tale saggio sfrutta le proprietà dell'acido bicinconinico (BCA), fornito sotto forma di sale sodico, di reagire con elevata sensibilità con gli ioni rame (Cu¹⁺) per formare un prodotto di reazione di colore viola, idrosolubile e caratterizzato da un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 562 nm. Gli ioni rame (Cu¹⁺) sono resi disponibili in ambiente alcalino in seguito all'interazione tra proteine e gli ioni Cu²⁺ (reazione del biureto). Poiché il prodotto di reazione è direttamente proporzionale alla quantità totale di proteine presenti nei reagenti, è possibile una quantificazione proteica mediante analisi spettrofotometrica. Per ogni campione di lisato proteico venivano prelevati 2µl dagli estratti cellulari, seminati in piastre da 96 pozzetti (BD Biosciences, Falcon, Mountain View, CA, USA), diluiti fino ad un volume di 100 µl in acqua ed incubati con 100µl della miscela dei reagenti del *kit*. Dopo una incubazione di 2 ore a 37°C, il prodotto di reazione veniva quantificato allo spettrofotometro, e la quantità totale di proteine presenti nei campioni veniva estrapolata per confronto con una curva di taratura ottenuta con quantità note di albumina di siero bovino (BSA) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA).

Una volta determinata la concentrazione delle proteine, 40 di lisato cellulare totale vengono diluiti 1:2 con il tampone di caricamento *Laemmli Buffer 2 X* (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% (p/v) SDS, 20% (p/v) glicerolo, 0.2% (p/v) blu di bromofenolo, 200 mM DTT, 20% (v/v) β-mercaptoetanolo). Prima di essere caricati in gel di poliacrilammide, i campioni venivano incubati a 100° C per 5 minuti. Per la analisi delle proteine sono stati preparati gel di poliacrilammide delle dimensioni di 200 x 200 mm e dello spessore di 1.5 mm come da ricetta, utilizzando reagenti Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA:

Gel di concentrazione (*Stacking gel*) al 4.5% (p/v) di acrilammide costituito da 4 ml di 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 2.4 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v), 160 µl di 10% (p/v) SDS, 20 µl di N,N,N,N',N'-tetrametiletilenediammina, (TEMED) e 80 µl di 10% (p/v) ammonio persolfato (APS) e portato al volume finale di 16.06 ml con acqua deionizzata;

Gel di separazione (*Separating gel*) al 10% (p/v) di acrilammide costituito da 12.5 ml di 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 16.6 ml della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v), 500 µl di 10% (p/v) SDS, 40 µl di TEMED e 200 µl di 10% (p/v) APS e portato al volume finale di 50 ml con acqua deionizzata.

La migrazione elettroforetica è stata effettuata con una intensità di corrente costante di 80 V per un tempo di 12 ore circa in presenza di un tampone di corsa costituito da 0.25 M Tris, 1.9 M glicina, 1% (p/v) SDS pH 9.2, nell'apparato di corsa Protean II System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

5.2.13. Immunoblotting

Dopo separazione in SDS-PAGE, le proteine sono state trasferite elettricamente su una membrana di nitrocellulosa "*Hybond-C Extra*" (Amersham, GE Healthcare, UK), utilizzando l'apparato per il trasferimento *Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Precedentemente, la membrana ed il gel sono stati equilibrati per 30 minuti in tampone di trasferimento (48 mM Tris, 39 mM glicina, 33% (v/v) metanolo), precedentemente raffreddato a 4°C. Il trasferimento è stato condotto per due ore, a voltaggio costante di 50 V e a temperatura ambiente. In seguito, per saturare tutti i siti di legame aspecifici, la membrana è stata incubata per 1 ora in agitazione con una soluzione di bloccaggio al 5% (p/v) di latte scremato (Bio-Rad, Laboratories, Hercules, CA, USA) o BSA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) in polvere in TBS (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl) addizionato di 0.1% (v/v) Tween 20 (da ora in poi indicato come TBS-T). Dopo 3 lavaggi di 10 minuti ciascuno in TBS-T, si procede con la incubazione con l'anticorpo primario per 16 ore in agitazione a 4°C. Gli anticorpi primari utilizzati sono di topo anti-Flag (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), anti-HA (Covance Inc., Princeton, NJ, USA), anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA), anti-phospho MAP-K ed anti-total MAP-K (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA); e di coniglio anti-ALK (gentilmente fornito dal Dr. Morris (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA). Tutti gli anticorpi primari sono stati diluiti 1:1000 nella soluzione all'1% (p/v) di latte scremato o BSA in polvere in tampone TBS-T. Il

giorno successivo, dopo aver subito 3 lavaggi come i precedenti, la membrana è stata incubata a temperatura ambiente per 1 ora, con l'anticorpo secondario coniugato all'enzima perossidasi di rafano (HRS, *horseradish peroxidase*), diluito 1:1000 nella soluzione allo 5% di latte scremato in polvere in tampone TBS-T. Dopo 3 lavaggi analoghi ai precedenti, la membrana è stata lavata in TBS 1 X per 10 minuti in agitazione, e poi incubata per 2 minuti con una soluzione contenente il substrato per la reazione chemio-luminescente della perossidasi di rafano del *kit ECL Plus Western Blotting Detection System* (Amersham, GE Healthcare, UK), necessario per impressionare le lastre fotografiche *Biomax light film* (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) per sovrapposizione con la membrana. Le lastre sono state esposte alla membrana per un tempo variabile, tra 30 secondi e 15 minuti in base al segnale emesso, e successivamente sviluppate.

5.2.14. Immunoprecipitazione

Le biglie per immunoprecipitazione (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) sono state inizialmente lavate nel tampone di lisi cellulare usato per ottenere i lisati. In particolare, i lavaggi consistono nel risospendere il volume di biglie necessario (30 µl per reazione) nella soluzione di lisi cellulare, fino ad un volume di 2 ml o 5 ml in base al volume iniziale di biglie. Successivamente, le biglie vengono sottoposte a centrifugazione a 1000 rpm e, dopo aver eliminato il sovrantante, risospese nella soluzione di lisi ripetendo il procedimento per 3 volte. In fine, le biglie vengono messe a contatto con l'anticorpo adatto alla immunoprecipitazione per 3 ore a temperatura ambiente in agitazione.

Intanto le cellule vengono lisate mediante risospensione in soluzione di lisi RIPA od ODG, contenente 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100mM (NH₄)₂SO₄, 20% glicerolo, 0.5% ODG (Octyl α -D-glucoopyranoside), con la aggiunta di una miscela di inibitori delle proteasi, "Complete" (estratto di pancreas, pronasi, termolisina, chimotripsina, tripsina, papaina (Roche, Basel, Switzerland) ed inibitori delle fosfatasi (1 mM PMSF, 1 mM sodio ortovanadato), come precedentemente descritto nel Paragrafo 5.2.12. Una volta determinata la concentrazione delle proteine, 1 mg di lisato proteico cellulare totale viene messo a contatto con la soluzione biglie-anticorpo per 2 ore a 4°C. Dopo aver lavato la reazione 5 volte con la soluzione RIPA od ODG, come descritto precedentemente, si risospende la *mix* finale in *Laemmli Buffer 2 X* e si bolle a 95°C per 5 minuti. Il campione viene successivamente centrifugato per 3 minuti a massima velocità ed il sovrantante viene caricato su un SDS-gel da

elettroforesi al 10%, continuando con il protocollo per la SDS-elettroforesi ed Immunoblotting (Paragrafo 5.2.12 e 5.2.13).

5.2.15. Zimografia

La zimografia permette di valutare lo stato di attivazione delle metallo-proteasi della matrice (MMP) che degradano la porzione di gel in cui è presente il loro substrato specifico. In questo caso è stata utilizzata la gelatina per verificare la attività delle MMP-2 e MMP-9, rispettivamente gelatinosi A e B. I lisati proteici sono stati ottenuti seguendo il protocollo per la SDS-elettroforesi (Paragrafo 5.2.12). Le proteine sono state successivamente analizzate tramite un gel da SDS-PAGE al 12% contenente 1 mg/ml di gelatina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). La migrazione elettroforetica è stata effettuata nel tampone di corsa (0.25 M Tris-HCl pH 7.5, 1.9 M glicina, 1% (p/v) SDS) ad una intensità di corrente pari a 80 V, alla temperatura di 4°C per quattro ore. Il gel è stato poi lavato per tre volte nel tampone di lavaggio contenente 2.5% Triton X-100 in acqua distillata, e successivamente incubato 16 ore a temperatura ambiente nel tampone di rinaturazione (50 mM Tris-HCl pH7.5, 5mM CaCl₂, 2.5% Triton X-100). Il giorno successivo, il gel è stato incubato nel tampone di reazione (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 5 mM CaCl₂, 1 µM ZnCl₂, 0.01% sodio azide) 16 ore a 37°C. Il gel è stato poi lavato in acqua distillata e colorato con blu di *Coomassie* per 4 ore a temperatura ambiente, e successivamente decolorato per 1 ora a temperatura ambiente nel tampone di decolorazione (45% metanolo, 10% acido acetico, 45% acqua distillata).

5.2.16. Trattamento con glicosidasi

Il saggio di glicosidazione nei gruppi N-glicosidici è stato effettuato tramite l'enzima PNGase F (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), secondo il protocollo fornito dalla ditta. In particolare, le cellule venivano risospese nel tampone di lisi *Glycoprotein Denaturing* (0.5% SDS, 40 mM DTT) e poi bolliti per 10 minuti a 95°C. Successivamente, i lisati venivano centrifugati per 20 minuti a 14000 rpm a 4°C. Il sovrantante veniva prelevato e a 20 µl di campione venivano aggiunti 5.5 µl dell'enzima PNGase F (risospeso in un tampone contenente 50 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.5, 50% glicerolo), 5.5 µl di 10 X NP-40, 5 µl di *G7 Reaction Buffer* (50 mM sodium fosfato pH 7.5), ed incubati a 37°C per 3 ore e 30 minuti. Successivamente venivano prelevati 30 µl dalla *mix* di reazione e venivano aggiunti

30 μ l di *Laemli Buffer* per seguire la metodica di SDS-gel elettroforesi ed Immunoblotting (Paragrafo 5.2.12 e 5.2.13).

5.2.17. Immunocitofluorescenza indiretta

Le linee cellulari vengono seminate ad una concentrazione di $1,5 \times 10^5$ cellule in piastre da 6 pozzetti su vetrini 22x22 mm in terreno completo. In seguito al trattamento previsto, vengono lavate per tre volte in tampone fosfato PBS e fissate in 2% paraformaldeide per 20 minuti a temperatura ambiente. Le cellule vengono poi permeabilizzate con 1% BSA in PBS addizionato con lo 0.2% (v/v) di Triton X-100 (da qui in poi indicato PBS-T) per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo 3 lavaggi in PBS, alle cellule viene aggiunta la soluzione di *quenching* (125 mM glicina in PBS) per 20 minuti a temperatura ambiente, seguita dalla incubazione nella soluzione bloccante al 3% BSA in PBS-T per 30 minuti a temperatura ambiente. L'anticorpo primario viene poi diluito 1:100 in una soluzione composta da 1% BSA in PBS-T per 2 ore a 37°C e successivamente si procede a 3 lavaggi in PBS-T. Gli anticorpi primari utilizzati sono di coniglio anti-Flag (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) e di topo anti-HA (Covance Inc., Princeton, NJ, USA). L'anticorpo secondario viene diluito 1:1000 in 1% BSA in PBS-T. Dopo 3 lavaggi in PBS-T ed un lavaggio in acqua per eliminare i sali, i vetrini vengono montati sui portaoggetti con il mezzo di montaggio *Vectashield* (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Le immagini vengono acquisite al microscopio confocale invertito TCS SP2 Leica (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) usando l'obiettivo 63x ad immersione ad olio.

6. RISULTATI

Premessa

Il ruolo della proteina Nef di HIV-1 nella demenza associata ad HIV-1 (HAD) è sostenuto da vari dati sperimentali. In particolare, la espressione di Nef è presente in astrociti di pazienti con demenza rapidamente progressiva che possono così fungere da *reservoir* a livello del sistema nervoso centrale (SNC) [Ranki et al., 1995; Trillo-Pazos et al., 2000]. Nef sembra, inoltre, direttamente citotossico per gli astrociti *in vitro*, dove agisce, inoltre, in modo indiretto sulla sopravvivenza neuronale, inducendo il rilascio di neurotossine da parte degli astrociti stessi [van Marle et al., 2004]. Infine, la neuropatogenicità di Nef è stata dimostrata sia in modelli animali, dove la sua espressione determina la distruzione della barriera emato-encefalica (BEE) attraverso la attivazione delle metallo-proteasi della matrice (MMP) [Sporer et al., 2004], sia in pazienti infetti da HIV-1, che presentano livelli di MMP aumentati in associazione con la HAD [Conant et al., 1999]. Inoltre, ceppi virali caratterizzati da sequenze diverse di Nef possono penetrare nel SNC e provocare danni neuronali [Singh et al., 2002; Churchill et al., 2004].

Poiché Nef è in grado di alterare le vie di trasduzione del segnale di proteine coinvolte nella normale omeostasi cellulare, si è ipotizzato che potesse modificare anche quelle mediate da proteine importanti per il mantenimento del fenotipo differenziato a livello del SNC, tra cui ALK. In particolare, ALK controlla il differenziamento cellulare tramite la attivazione delle MAP-K, come è stato dimostrato nel modello cellulare di neuroblastoma SK-N-SH [Motegi et al., 2004]. Inoltre, ALK è in grado di contribuire al controllo della espressione delle MMP e dei TIMP, sfruttando la via di trasduzione di Stat3 [Zamo et al., 2002]. Stat3 svolge un ruolo importante sia a livello del SNC per il mantenimento del fenotipo differenziato, che in linee tumorali di diversa origine dove aumenta la crescita invasiva e la metastatizzazione, come ad esempio nelle metastasi di melanoma nel cervello [Xie et al., 2006; Tsareva et al., 2007].

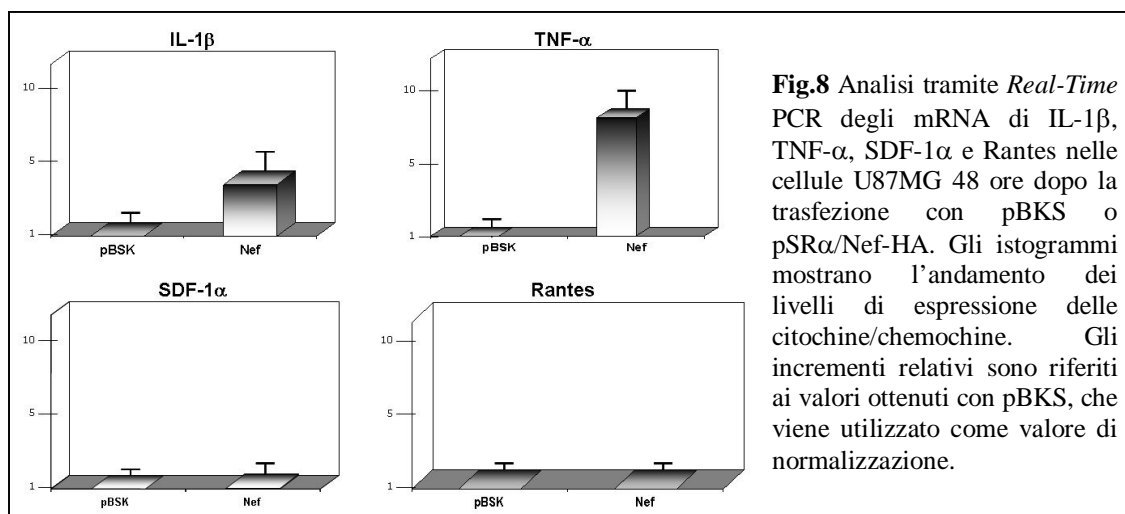
Nel complesso, il seguente lavoro di tesi si è articolato nella:

1. analisi degli effetti di Nef su linee gliali e neuronali *in vitro*;
2. analisi delle vie di trasduzione comuni tra Nef ed ALK, per provare a chiarire i meccanismi che potrebbero contribuire al danno neuronale.

6.1. Nef

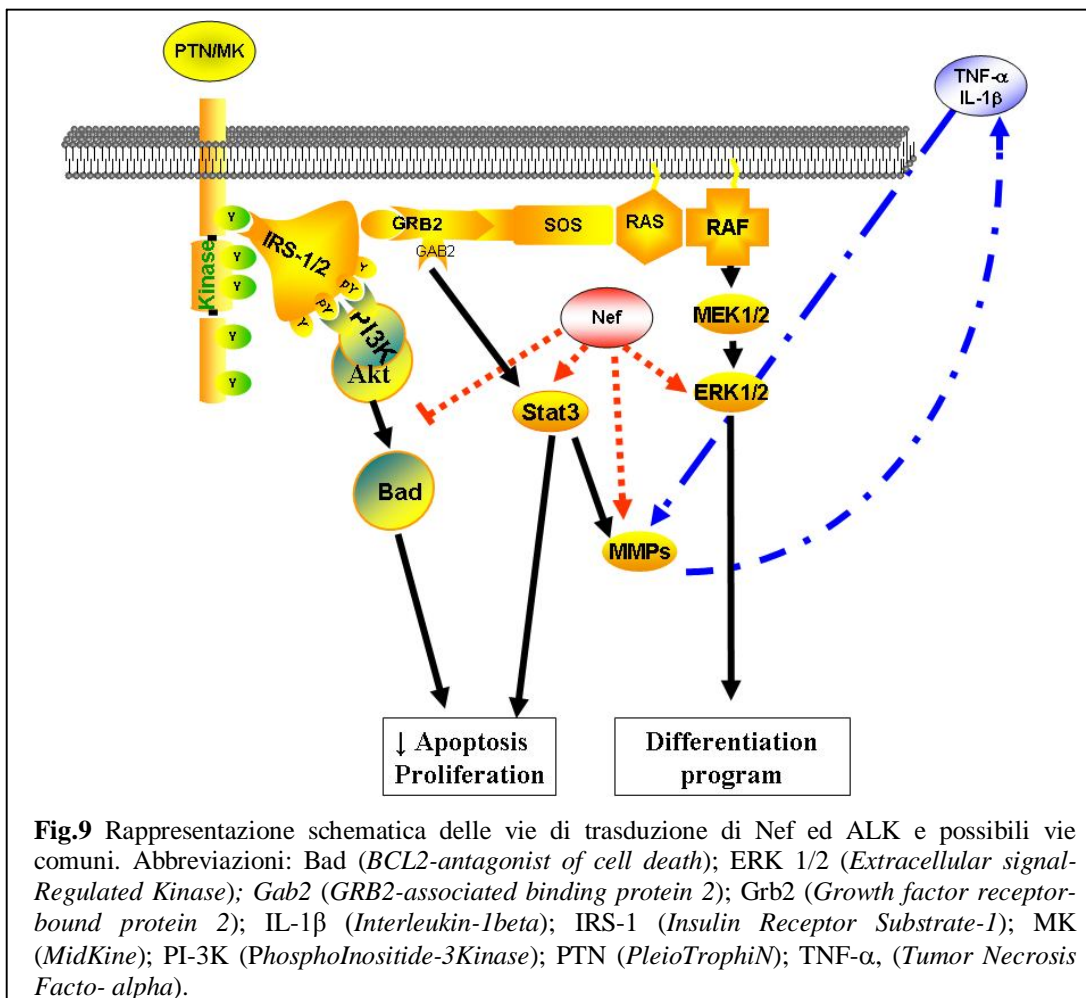
6.1.1. Analisi degli effetti di Nef sulla espressione di citochine e chemochine

Durante i processi di infiammazione cronica, come quella presente nella HAD, il danno tissutale può essere in parte spiegato anche dalla attivazione delle MMP, la cui regolazione è strettamente correlata alla regolazione di citochine e chemochine. Le MMP sono indotte dalle citochine durante una risposta infiammatoria. In particolare la IL-1 β (*InterLeukin-1 β*) induce la MMP-3, mentre sia la IL-1 β che il TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) inducono la MMP-2 e la MMP-9 [Chakraborti et al., 2003]. Inoltre, i livelli delle due chemochine SDF-1 α (*Stromal cell-Derived Factor-1 α*) e Rantes sono alterati nel *liquor* dei pazienti con la HAD, e la espressione dei loro recettori viene diminuita da Nef. Per analizzare il ruolo di Nef in questo aspetto del danno in corso della HAD, la linea cellulare di glioblastoma U87MG è stata trasfettata con il plasmide pSR α /Nef-HA per valutare gli effetti della espressione della proteina Nef sulla produzione di queste quattro citochine/chemochine da parte della linea di glioblastoma stessa. Le cellule sono state trasfettate, inoltre, con il plasmide pBKS, usato come valore di riferimento per la normalizzazione dei valori ottenuti. Le cellule U87MG sono state lisate 48 ore dopo la trasfezione (Paragrafo 5.2.9) per procedere alla estrazione dell'mRNA che è stato successivamente analizzato tramite *Real-Time* PCR. Come si osserva in Fig.8, mentre i livelli di espressione degli mRNA di SDF-1 α e Rantes non sembrano alterati da Nef, al contrario quelli di IL-1 β e TNF- α , risultano aumentati. Quindi, i dati ottenuti nel nostro modello cellulare sono in accordo con i dati presenti in letteratura sulla capacità di Nef di indurre IL-1 β e TNF- α sia in modelli *in vitro*, che nel *liquor* dei pazienti HIV-1 positivi [Tyor et al., 1992; Olivetta et al., 2003; Brabers and Nottet, 2006].



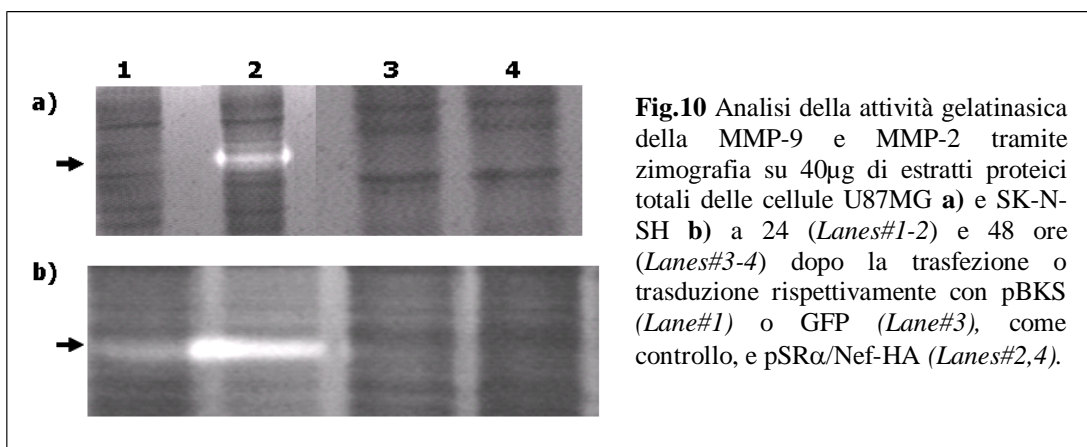
6.1.2. Analisi degli effetti di Nef sulle MMP

Per analizzare i meccanismi alla base della HAD, è stata valutata la capacità di Nef di indurre alterazioni a carico delle vie di trasduzione del segnale a livello intracellulare. In particolare, come riportato in Fig.9, Nef trasduce lungo vie di segnale comuni ad altre proteine importanti a livello del SNC per la omeostasi e lo sviluppo del SNC stesso, come ALK. Infatti, entrambe le proteine utilizzano la via Stat3 mediata che è strettamente regolata nel SNC e che può controllare la attivazione delle MMP, diventando così in grado di influenzare il danno a carico della BEE presente nella HAD. Inoltre, entrambe le proteine utilizzano la via di trasduzione del segnale che coinvolge le MAP-K, che controllano il differenziamento neuronale.



Per valutare la attività delle MMP in presenza della espressione di Nef, sono state utilizzate due linee di derivazione neuronale. In particolare, la linea di glioblastoma

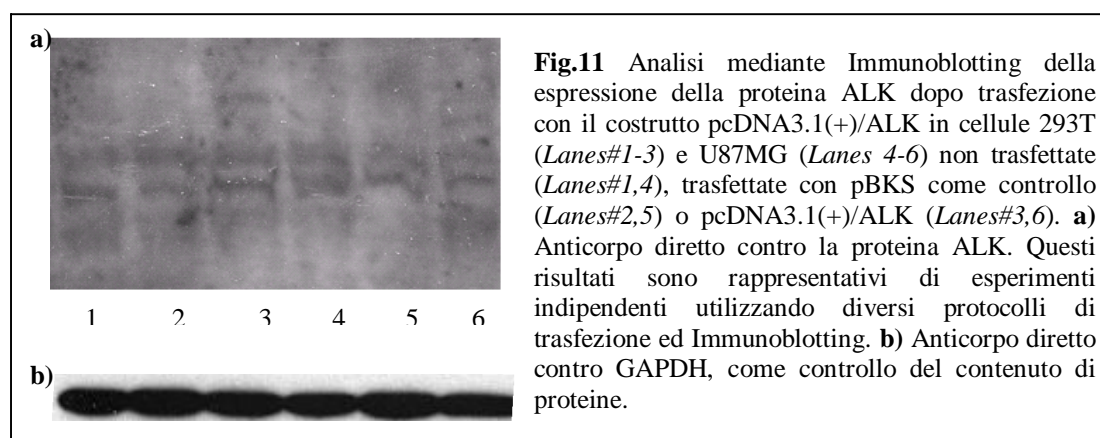
U87MG è stata trasfettata (Paragrafo 5.2.9) con il plasmide pSR α /Nef-HA o pBKS (come controllo), e le cellule sono state lisate dopo 24 e 48 ore. La linea di neuroblastoma SK-N-SH è stata invece trasdotta con i virioni ricombinanti di HIV-1 esprimenti la proteina Nef o GFP (Paragrafo 5.2.11), e successivamente lisate dopo 24 e 48 ore. I lisati sono poi stati analizzati tramite zimografia per verificare la eventuale presenza di attività gelatinasica. Infatti, questa tecnica permette di valutare lo stato di attivazione delle metallo-proteasi della matrice ed in particolare delle MMP-2 e MMP-9, rispettivamente gelatinasi A e B. Come è mostrato in Fig.10, Nef è in grado di indurre la attività gelatinasica a 24 ore, ma, mentre nelle U87MG viene indotta la MMP-9 (92 kDa) (Fig.10a), nelle SK-N-SH viene indotta la MMP-2 (72 kDa) (Fig.10b). Per verificare che questo effetto fosse specifico in linee cellulari di origine neuronale, le cellule 293T sono state trasfettate con i plasmidi pSR α /Nef-HA o pBKS (come le cellule U87MG). Nelle 293T non è risultata rilevabile nessuna attivazione né della MMP-2 né della MMP-9, a conferma della attivazione specifica in linee neuronali.



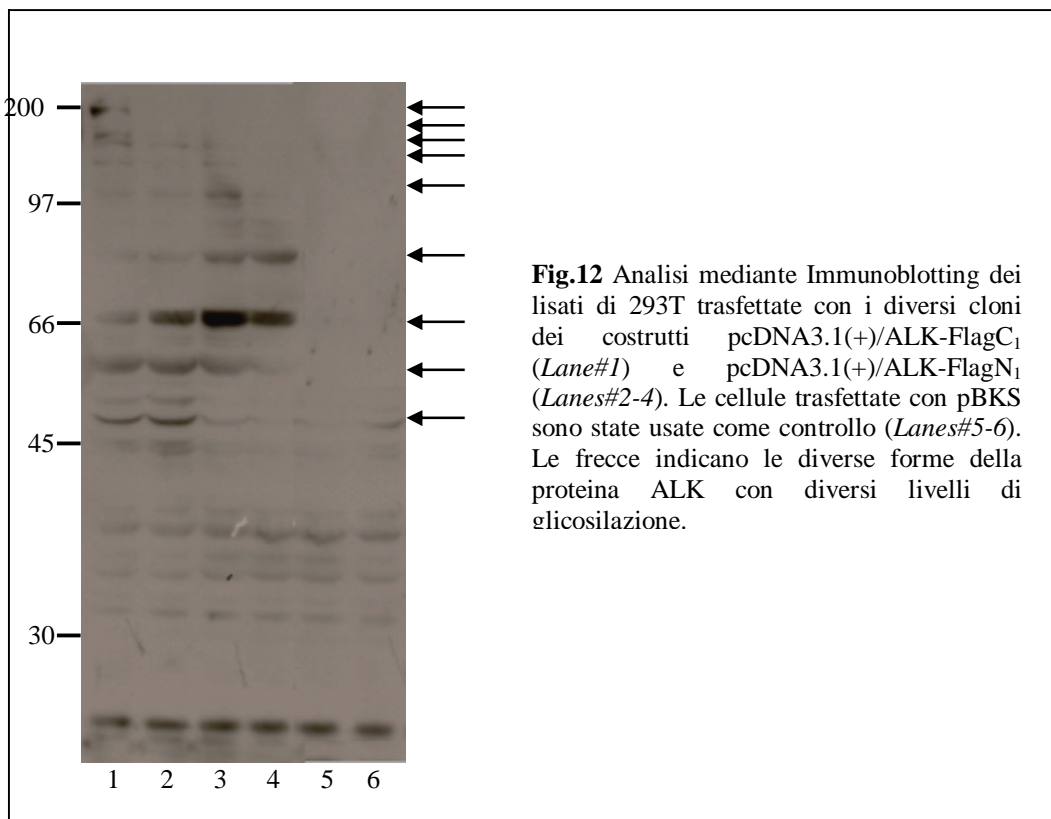
6.2. Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)

Per cercare di caratterizzare i meccanismi di *signaling* molecolare alla base della alterazione a carico di citochine e delle MMP che Nef è in grado di indurre, sono state analizzate varie proteine che controllano il mantenimento del fenotipo differenziato a livello del SNC. Tra queste ci si è focalizzati sulla proteina ALK che è importante per la omeostasi del tessuto cerebrale e del suo mantenimento. In particolare, è stata scelta la proteina ALK, poiché condivide con Nef alcune proteine coinvolte nel *signaling* intracellulare (Fig. 9). Infatti, entrambi trasducono lungo il *pathway* di Stat3, che è importante nel SNC e può controllare la attivazione delle MMP, diventando così in grado di influenzare il danno alla BEE presente in corso della HAD, e la via di trasduzione legata alle MAP-K, che controllano il fenotipo neuronale terminalmente differenziato.

Innanzitutto, la proteina ALK è stata espressa ad alti livelli nelle linee cellulari di glioblastoma U87MG, che rappresentano una sede più simile alla sede di espressione di ALK *in vivo*, e nelle 293T, che garantiscono una efficienza di trasfezione maggiore. In particolare, le cellule sono state trasfettate con il plasmide pcDNA3.1(+)/ALK, ottenuto a partire dal plasmide pBKS/ALK, gentilmente fornito dal Dott. Morris (Paragrafo 5.1.2). I lisati proteici sono stati successivamente sottoposti ad analisi mediante Immunoblotting, utilizzando anticorpi commerciali diretti contro la porzione N-terminale o C-terminale di ALK. Nonostante siano stati provati vari protocolli, sia per la trasfezione che per l'Immunoblotting, la espressione della proteina ALK non è stata rilevabile con gli anticorpi disponibili commercialmente per il rumore di fondo troppo alto e per la mancanza di un segnale chiaro da attribuire alla proteina ALK, come è evidenziato nella Fig.11.

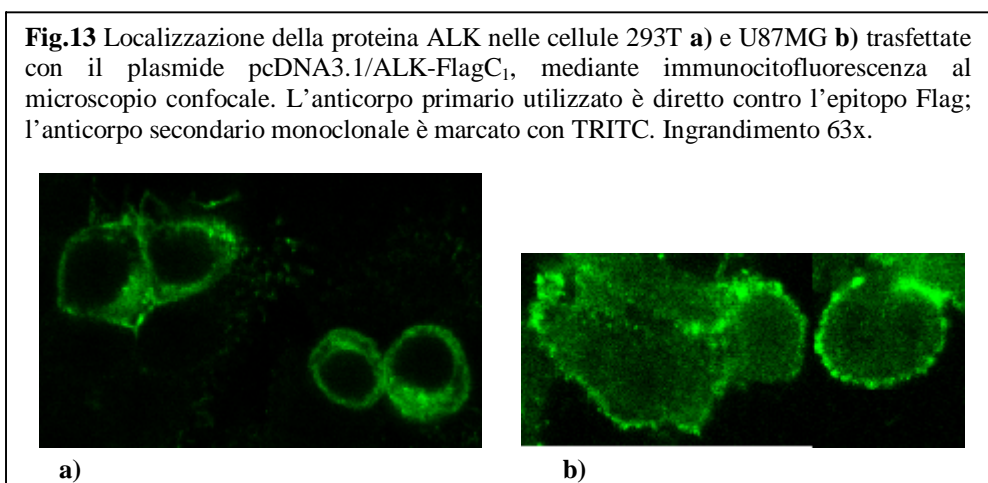


Quindi, si è deciso di fondere alla porzione terminale della proteina ALK l'epitopo Flag. In particolare, come riportato nel Paragrafo 5.1.2, sono stati ottenuti i costrutti pcDNA3.1(+)/ALK-FlagN₁ e pcDNA3.1(+)/ALK-FlagC₁ che presentano l'epitopo Flag in posizione N-terminale o C-terminale rispettivamente. Come riportato in Fig. 12, nelle cellule 293T, il processamento della proteina ALK che presenta l'epitopo Flag in posizione N-terminale risulta difficoltoso, probabilmente perché interferisce con il segnale di localizzazione su membrana che si trova in quella porzione della proteina. Questo potrebbe anche giustificare il livello inferiore di espressione visibile in Immunoblotting. Inoltre, mancano le forme di glicosilazione ad alto peso molecolare, il che fa ipotizzare che anche le modificazioni post-traduzionali vengano alterate, possibilmente a causa di un *trafficking* alterato anche a livello di localizzazione sulle membrane dell'apparato di Golgi e/o del reticolo endoplasmatico.



Quindi, poiché il costrutto pcDNA3.1(+)/ALK-FlagN₁ non viene processato in maniera corretta, si è deciso di utilizzare solo il costrutto pcDNA3.1(+)/ALK-FlagC₁ che presenta un *pattern* di glicosilazione paragonabile a quello riportato in letteratura [Morris et al., 1997; Iwara et al., 1997].

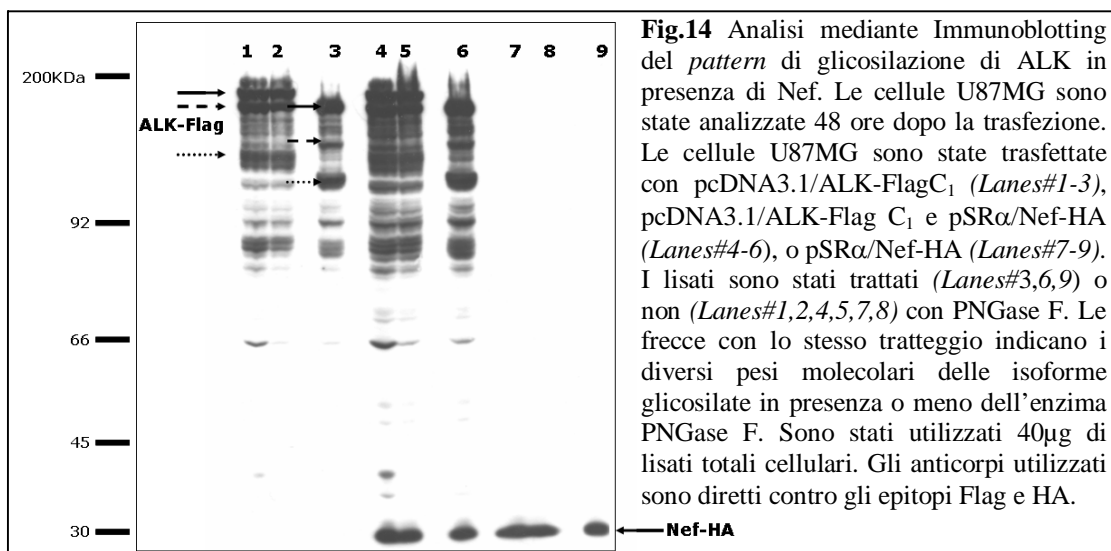
Successivamente, è stata valutata la localizzazione cellulare della proteina ALK nelle linee cellulari U87MG e 293T per verificare che la proteina venisse espressa in modo corretto sulla superficie cellulare, come riportato in letteratura [Morris et al., 1997]. Le cellule 293T ed U87MG sono state trasfettate con il plasmide pcDNA3.1/ALK-FlagC₁ e successivamente fissate in paraformaldeide per l'analisi al microscopio confocale. Come mostrato in Fig.13, e, come atteso, la fluorescenza relativa alla proteina ALK è concentrata principalmente sulla membrana cellulare.



6.3. Possibili interazioni tra Nef ed ALK

6.3.1. Valutazione dell'effetto di Nef sul *pattern* di glicosilazione di ALK

Poiché ALK è una proteina di recente scoperta e non è stata ancora completamente caratterizzata, si è voluto innanzitutto analizzare il suo *pattern* di glicosilazione, in presenza o meno di Nef, in modo da caratterizzarla meglio. Infatti, è noto che molti virus neurotropi posseggono la capacità di alterare la glicosilazione e che in molte malattie genetiche che portano ad alterazioni neuronali, il *pattern* di glicosilazione di proteine fondamentali per il funzionamento del SNC risulta compromesso [Grunewald et al., 2002; Pillai et al., 2006]. A questo scopo, le cellule U87MG sono state trasfettate con i plasmidi pBKS (come controllo) e pcDNA3.1(+)/ALK-FlagC₁ in presenza o meno di pSR α /Nef-HA. Come riportato in Fig.14, confrontando i lisati trattati con quelli non trattati con la glicosidasi, si evince che ALK è una proteina altamente N-glicosilata (infatti, questi residui possono essere rimossi dalla N-glicosidasi). I diversi siti di glicosidazione determinano la formazione di proteine a diverso peso molecolare. La presenza di Nef non altera però il normale *pattern* di glicosilazione di ALK.



6.3.2. Analisi della localizzazione intracellulare di Nef ed ALK in cellule overesprimenti entrambe le proteine

Per verificare se Nef ed ALK potessero interferire l'una con l'altra, in primo luogo si è valutata la localizzazione cellulare delle due proteine. Cellule 293T ed U87MG sono state trasfettate con i plasmidi pSR α /Nef-HA e pcDNA3.1(+)/ALK-FlagC₁ ed

analizzate 48 ore dopo, tramite immunocitofluorescenza indiretta. Come mostrato in Fig.15, le due proteine co-localizzano sulla superficie cellulare, e questo dato conferma quanto riportato in letteratura relativamente alla localizzazione di queste due proteine a livello cellulare [Guy et al., 1990; Morris et al., 1997].

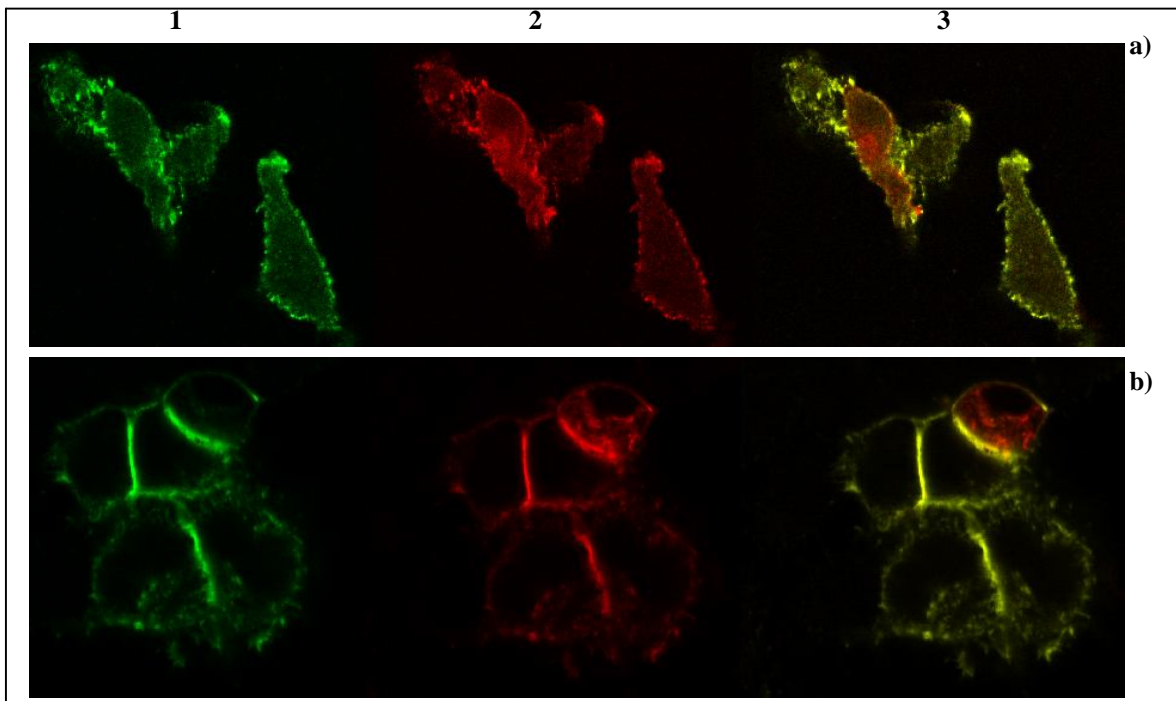


Fig.15 Analisi mediante immunocitofluorescenza della co-localizzazione delle proteine Nef-HA ed ALK-Flag nelle cellule U87MG **a)** e 293T **b)** trasfettate con i plasmidi pSR α /Nef-HA e pcDNA3.1(+)/ALK-FlagC₁. Gli anticorpi primari utilizzati sono diretti contro gli epitopi HA e Flag; gli anticorpi secondari sono marcati con TRITC e FITC rispettivamente. Nel pannello **1** è riportata la fluorescenza verde relativa ad ALK, nel **2** quella rossa relativa a Nef e nel **3** la sovrapposizione delle due fluorescenze in giallo, che indica la co-localizzazione. Ingrandimento 63x al microscopio confocale.

La espressione delle proteine Nef ed ALK è stata successivamente analizzata tramite Immunoblotting nelle cellule U87MG dopo 24 e 48 ore dalla trasfezione con i plasmidi pSR α /Nef-HA e/o pcDNA3.1(+)/ALK-FlagC₁. Come rappresentato in Fig.16, ALK mostra diversi livelli di glicosilazione già a 24 ore dalla trasfezione. Anche la proteina Nef risulta correttamente espressa in queste condizioni.

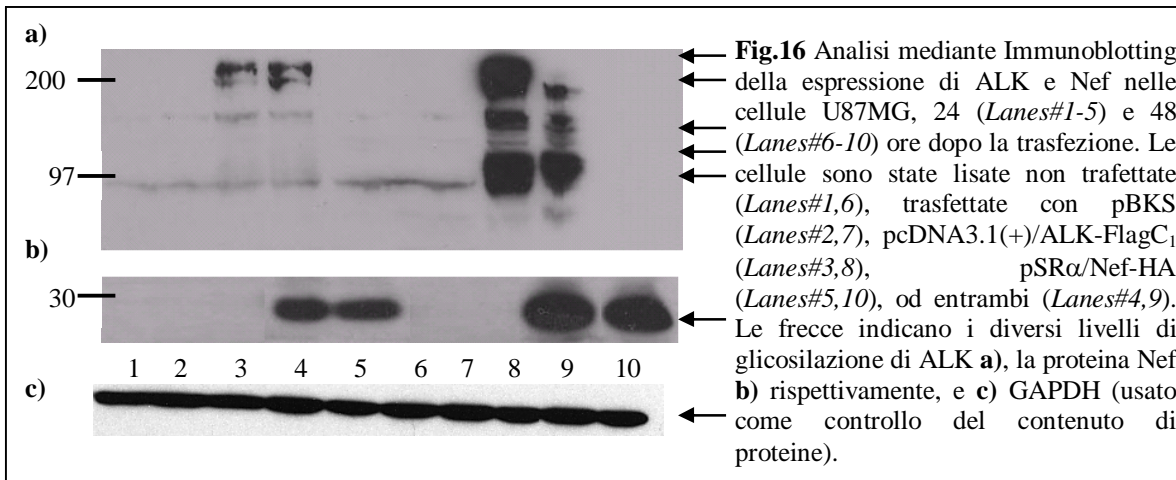
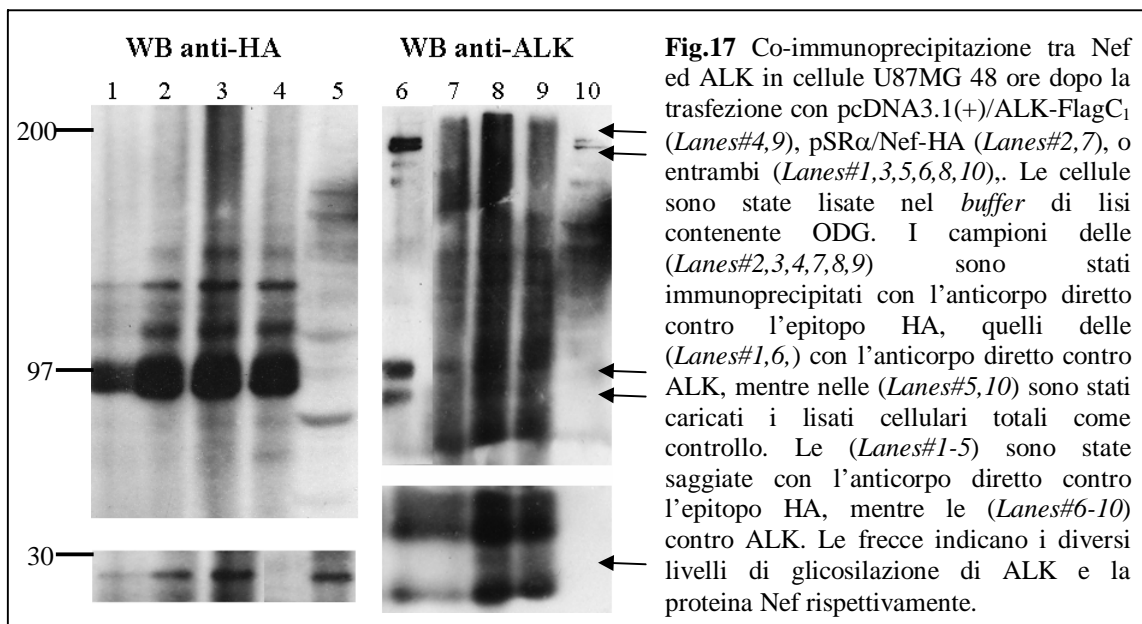


Fig.16 Analisi mediante Immunoblotting della espressione di ALK e Nef nelle cellule U87MG, 24 (*Lanes#1-5*) e 48 (*Lanes#6-10*) ore dopo la trasfezione. Le cellule sono state lisate non trasfettate (*Lanes#1,6*), trasfettate con pBKS (*Lanes#2,7*), pcDNA3.1(+)/ALK-FlagC₁ (*Lanes#3,8*), pSR α /Nef-HA (*Lanes#5,10*), od entrambi (*Lanes#4,9*). Le frecce indicano i diversi livelli di glicosilazione di ALK **a)**, la proteina Nef **b)** rispettivamente, e **c)** GAPDH (usato come controllo del contenuto di proteine).

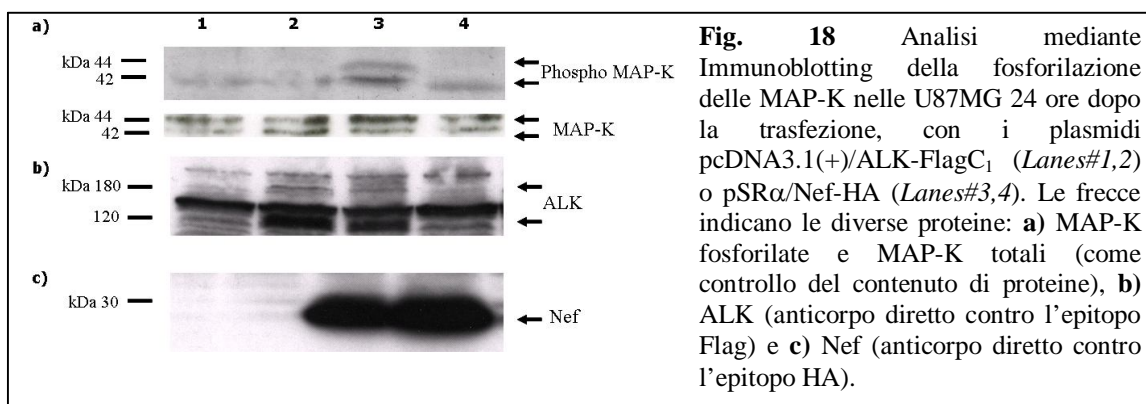
6.3.3. Analisi della interazione fisica diretta tra ALK e Nef

Poiché Nef ed ALK co-localizzano sulla membrana cellulare, in prima istanza, è stato valutato se Nef ed ALK potessero interagire fisicamente. Quindi, si è proceduto alla messa a punto di un protocollo di co-immunoprecipitazione, utilizzando *buffer* di lisi caratterizzati da una diversa forza ionica. In particolare, confrontando il *buffer* di lisi contenente NP40, che è un detergente non-ionico, ed il RIPA, il primo è meno denaturante, poiché il secondo contiene due detergenti ionici, SDS e sodio deossicolato, che è un detergente anionico in grado di mantenere il pH al di sopra di 8.0, prevenendo così la formazione di cationi divalenti, ed è moderatamente denaturante. Ovviamente questo implica una maggior capacità nella estrazione delle proteine da parte del *buffer* RIPA, ma anche un maggior rischio di rompere le interazioni fisiche proteina-proteina. Inoltre, sulla base di quanto riportato in letteratura [Pizzato et al., 2007], si è testato anche il *buffer* di lisi contenente ODG (Octyl α -D-glucopyranoside), che è un detergente non-ionico, come NP-40. Tuttavia, nonostante i diversi *buffer* di lisi utilizzati, non è stato possibile evidenziare nessuna interazione fisica tra le due proteine, come evidente in Fig.17 dove è riportato la co-immunoprecipitazione effettuata con il *buffer* di lisi contenente ODG. Questo dato può essere interpretato in due modi: o le proteine non interagiscono fisicamente o per dimostrare la loro interazione si devono ulteriormente modificare le caratteristiche dei *buffer* di lisi, come ad esempio sostituire NP-40 con Triton X-100. La mancanza di una interazione fisica tra le due proteine non esclude però che Nef ed ALK possano interferire reciprocamente sulle vie comuni di trasduzione del segnale cellulare che potrebbero essere importanti per spiegare la eziopatogenesi della HAD.

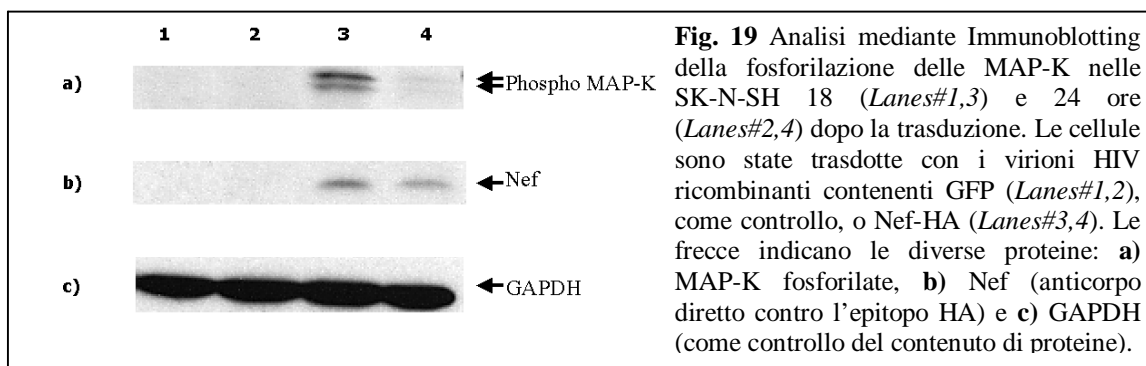


6.3.4. Valutazione dell'effetto di Nef ed ALK sulle vie di trasduzione del segnale MAP-Kinasi dipendente

Poiché non sono state dimostrate interazioni fisiche tra Nef ed ALK, ci si è concentrati sulle vie di trasduzione del segnale comuni tra loro. In primo luogo si è analizzata la via di trasduzione delle MAP-K ed in particolare il loro stato di fosforilazione. Come dimostrato in Fig.18, 24 ore dopo la trasfezione della linea cellulare U87MG con il plasmide pSR α /Nef-HA in presenza o meno della overespressione di ALK (pcDNA3.1/ALK-Flag-C₁), si ha la fosforilazione delle MAP-K solo in presenza di entrambe le proteine contemporaneamente. Nonostante in alcuni esperimenti, anche le due proteine singolarmente siano in grado di indurre la fosforilazione, si osserva comunque un effetto cumulativo di aumento della fosforilazione delle MAP-K in presenza di entrambe le proteine, ad indicare un possibile effetto sinergico e di attivazione reciproca su una via di trasduzione comune.

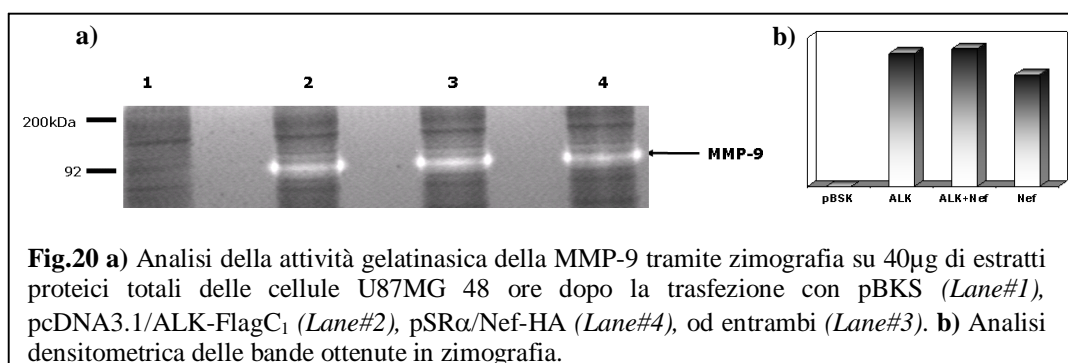


Per verificare se l'effetto sulla fosforilazione sulle MAP-K fosse presente anche nella linea di neuroblastoma SK-N-SH, le cellule sono state trasdotte con i virioni ricombinanti di HIV-1 esprimenti la proteina Nef o GFP (come controllo). Come mostrato in Fig.19, la fosforilazione della MAP-K viene indotta a 18 ore dalla trasduzione in presenza di Nef.



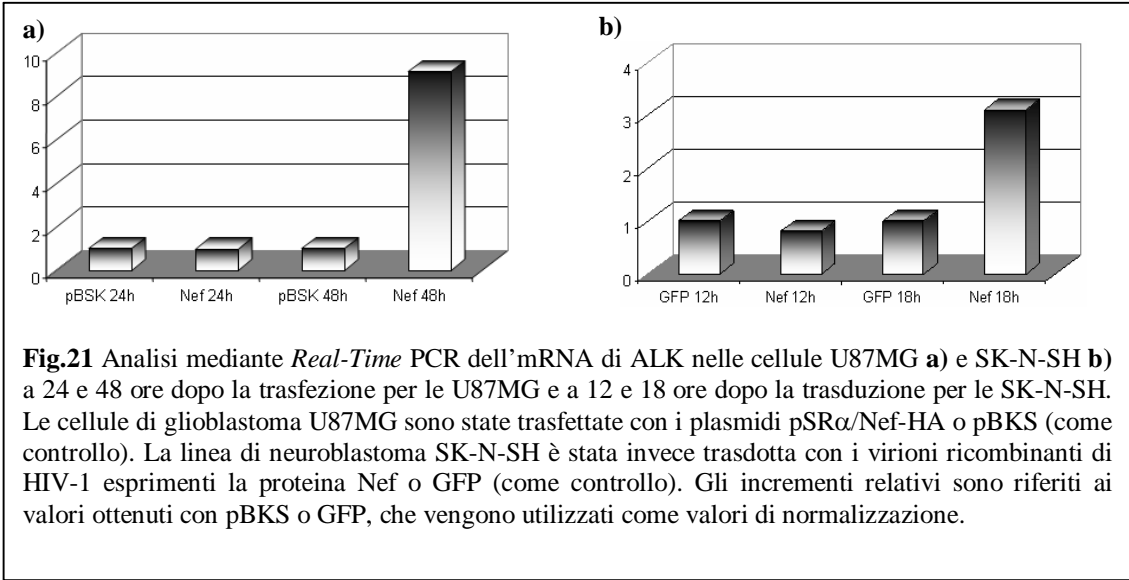
6.3.5. Valutazione dell'effetto di Nef ed ALK sulla attivazione delle metallo-proteasi della matrice (MMP)

Avendo osservato un effetto cumulativo sulla induzione della fosforilazione delle MAP-K, si è pensato di valutare il livello di attivazione delle MMP che, come riportato in Fig.10, sono indotte in presenza di Nef, e che rappresentano un elemento comune a valle della cascata di trasduzione del segnale (Fig.9). Le cellule U87MG sono state trasfettate con i plasmidi pcDNA3.1/ALK-FlagC₁ e/o pSR α /Nef-HA e lisate 48 ore dopo per sottoporle al saggio di zimografia. Come riportato in Fig.20, sia ALK che Nef sono in grado di indurre la attivazione delle MAP-K, e la presenza di entrambe le proteine determina un lieve ma significativo effetto cumulativo sulla induzione della MMP-9, come dimostrato da una analisi densitometrica delle bande.



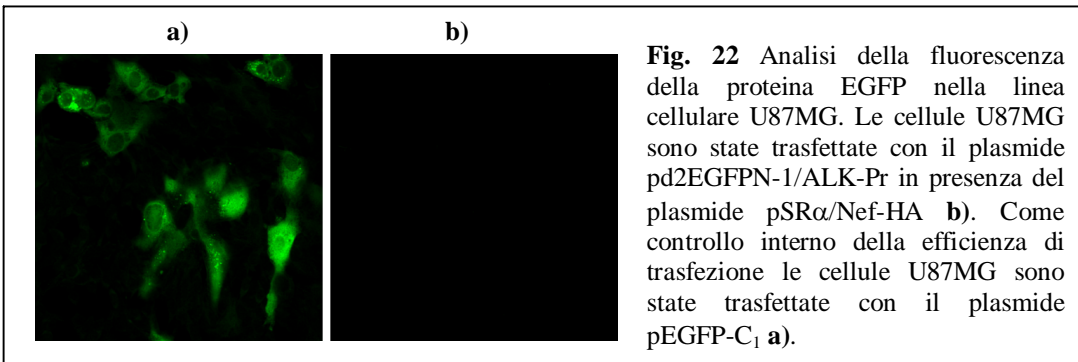
6.3.6. Interferenza di Nef sull'mRNA di ALK

Avendo dimostrato come Nef ed ALK siano in grado di interferire sulle reciproche vie di trasduzione del segnale, ma non interagiscano fisicamente, si è verificato se Nef potesse agire sulla induzione dell'mRNA di ALK. Le cellule di glioblastoma U87MG sono state trasfettate con i plasmidi pSR α /Nef-HA o pBKS (come controllo). La linea di neuroblastoma SK-N-SH è stata invece trasdotta con i virioni ricombinanti di HIV-1 esprimenti la proteina Nef o GFP (come controllo). Entrambi i tipi cellulari sono stati successivamente lisati per estrarre l'mRNA che è poi stato analizzato mediante la tecnica di *Real-Time* PCR, a 24 e 48 ore dopo la trasfezione per le U87MG e a 12 e 18 ore dopo la trasduzione per le SK-N-SH. Come si osserva in Fig.21, in entrambe le linee cellulari la presenza di Nef induce un elevato aumento della espressione dell'mRNA di ALK.



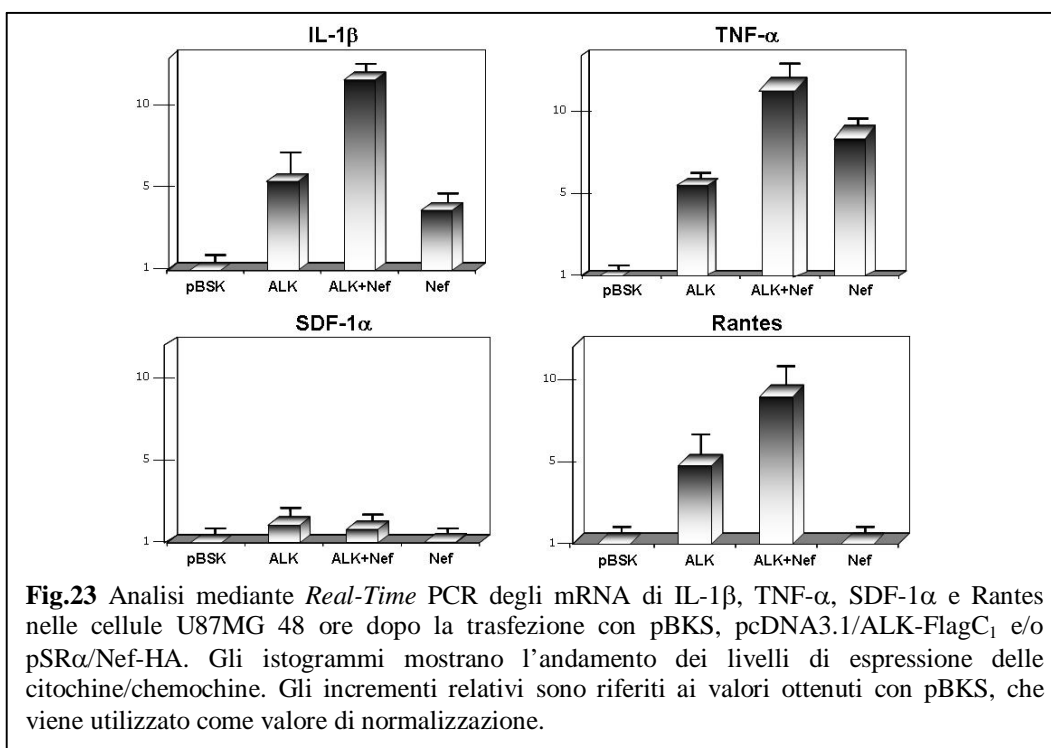
6.3.7. Analisi della attività del promotore di ALK in presenza di Nef

Poiché Nef agisce sulla induzione dell'mRNA di ALK, si è ipotizzato che Nef potesse agire a livello del promotore di ALK per indurne la trascrizione. Poiché in letteratura non è ancora presente la sequenza promotrice completa di ALK, si è deciso di inserire la porzione 5' non tradotta di ALK, considerata come putativa sequenza promotrice [Morris et al., 1997], nel plasmide pd2EGFP-N1 che non contiene una sequenza promotrice, come riportato nel Paragrafo 5.1.2, producendo il plasmide pd2EGFPN-1/ALK-Pr. A tale scopo, il plasmide pd2EGFPN-1/ALK-Pr è stato trasfettato nelle cellule U87MG in presenza o meno del plasmide pSR α /Nef-HA; le cellule sono state fissate 48 ore dopo e la fluorescenza è stata analizzata al microscopio confocale. Come mostrato in Fig.22, non si vede nessuna attivazione della trascrizione e successiva traduzione della proteina fluorescente EGFP, quindi, la sequenza promotrice putativa sembra non essere sufficiente, probabilmente perché mancano *enhancer* o comunque la sequenza al 5' non contiene tutto il promotore. Quindi, non è possibile con questi dati determinare se Nef induca la trascrizione dell'mRNA di ALK agendo sul suo promotore.



6.3.8. Analisi degli effetti di Nef ed ALK sulla espressione di citochine e chemochine

Poiché Nef è in grado di indurre la trascrizione dell'mRNA di ALK, la attivazione delle MMP e la fosforilazione delle MAP-K, si è indagato se fosse anche in grado di indurre la attivazione delle vie di trasduzione del segnale che coinvolgono le citochine/chemochine. In particolare, le cellule U87MG sono state trasfettate con i plasmidi pBKS (come valore di normalizzazione), e pcDNA3.1(+)/ALK-FlagC₁ in presenza o meno di pSR α /Nef-HA e dopo 48 ore lisate per estrarre l'mRNA, che è stato poi sottoposto ad analisi mediante *Real-Time* PCR. Come mostrato in Fig.23, mentre sulla chemochina SDF-1 α né ALK né Nef sembrano in grado di agire, IL-1 β e TNF- α mostrano una induzione in presenza di entrambe le proteine, presentando un effetto cumulativo simile a quello riscontrato per le MMP. È importante sottolineare come la presenza di ALK sia in grado di indurre l'mRNA di Rantes, al contrario di Nef, ma la presenza di entrambe le proteine sembra comunque avere un effetto cumulativo sulla espressione dell'mRNA.



7. DISCUSSIONE

Il virus della immunodeficienza umana-1 (HIV-1, *Human Immunodeficiency Virus-1*) si localizza nel cervello nelle fasi precoci della infezione sistemica, e risiede principalmente in macrofagi/microglia ed astrociti. La demenza associata ad HIV-1 (HAD) determina alterazioni a carico del sistema nervoso centrale (SNC), come danneggiamento e perdita di connessioni e funzionalità neuronale, ma i meccanismi alla base di queste alterazioni restano per lo più sconosciuti. Quindi, nel presente progetto di tesi si è valutato il ruolo di Nef nella evoluzione della HAD, esaminando in particolare l'effetto di tale proteina sulle vie di trasduzione del segnale che contribuiscono al differenziamento cellulare ed al suo mantenimento. Infatti, Nef è espresso in astrociti infettati in modo persistente con HIV-1 sia *in vivo* che *in vitro* [Brack-Werner et al., 1992; Ranki et al., 1995]. Inoltre, Nef sembra direttamente citotossico per gli astrociti *in vitro*, ed è in grado di indurre il rilascio di neurotossine che influenzano la sopravvivenza neuronale [van Marle et al., 2004]. La espressione di Nef negli astrociti *in vivo* può anche rappresentare un ulteriore *reservoir* nella demenza rapidamente progressiva [Ranki et al., 1995; Trillo-Pazos et al., 2000]. In modelli *in vivo* è stato dimostrato che diversi ceppi di Nef, anche mutati [Saksena et al., 1997; Churchill et al., 2004], possono penetrare nel SNC e provocare danni neuronali, in particolare astrocitosi [Singh et al., 2002], suggerendo una evoluzione compartimentalizzata delle sequenze di HIV-1 nel SNC [Churchill et al., 2004]. Inoltre, il *liquor* dei pazienti con la HAD presenta livelli aumentati delle metalloproteasi di matrice (MMP, *Matrix MetalloProteinases*) [Conant et al., 1999], che in un modello animale di ratto vengono attivate da Nef, che determina così la distruzione della barriera emato-encefalica (BEE) [Sporer et al., 2004]. Nef è in grado di alterare a livello molecolare vie di trasduzione del segnale come quelle mediate da Stat3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) e MAP-K (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), che risultano importanti nel SNC per il differenziamento cellulare e il mantenimento del fenotipo differenziato delle cellule neuronali. Nef viene espresso precocemente ed abbondantemente durante la infezione da HIV-1, e si localizza sulla membrana plasmatica cellulare dove è in grado di diminuire la espressione sulla superficie cellulare di alcune molecole coinvolte nel *signaling* intracellulare, tra cui CD4, CD28, MHC-1 e MHC-2 [Das et al., 2005; Greenway et al., 2003; Schindler et al., 2003; Williams M et al., 2002], grazie alla omologia con i domini SH3, che sono presenti nelle tirosin-chinasi ed in

altri enzimi cellulari, fattori di trascrizione e molecole adattatrici. Infatti, grazie a questa omologia, Nef è in grado di stimolare la proliferazione dei podociti glomerulari attraverso la attivazione delle vie di trasduzione del segnale mediate da Stat3 e MAP-K [He et al., 2004] durante la nefropatia associata ad HIV-1 (HIVAN), determinando così un elevato tasso di proliferazione, causando ipertrofia, e perdita dei *marker* di differenziamento terminale dei podociti. Poiché i processi presenti sui podociti condividono con i dendriti neuronali molte caratteristiche comuni nella organizzazione citoscheletrica e nella formazione dei processi cellulari, e data la importanza della perdita del differenziamento neuronale terminale durante la HAD, possiamo ipotizzare un ulteriore ruolo di Nef in questa patologia.

Per questi motivi, si è deciso di analizzare, come possibile proteina cellulare bersaglio della azione di Nef, una proteina importante nello sviluppo del SNC ed in grado di dirigere il differenziamento neuronale nell'adulto, come ALK (*Anaplastic Lymphoma Kinase*). La attivazione di ALK determina, infatti, sia segnali mitogenici che di differenziamento (crescita dei neuriti) tramite la via di trasduzione del segnale mediato dalle MAP-K [Motegi et al., 2004; Souttou et al., 2001]. Inoltre, ALK induce la fosforilazione di Stat3 [Zamo et al., 2002] che è importante nella rigenerazione neuronale, poiché promuove la sopravvivenza e la rigenerazione nei siti di danno, ed è in grado di indurre la espressione delle MMP e degli inibitori delle MMP (TIMP, *Tissue Inhibitors of Matrix MetalloProteinases*) in diverse linee tumorali [Lai et al., 2004]. Questo ultimo aspetto risulta molto importante durante la HAD, poiché, come già riportato, anche Nef è in grado di attivare la espressione delle MMP nel modello animale [Sporer et al., 2004].

Quindi, nel seguente progetto di tesi, in primo luogo, si sono analizzati gli effetti della espressione di Nef in modelli di linee gliali e neuronali *in vitro*, per verificare la capacità di Nef di alterare la espressione di citochine/chemochine infiammatorie e MMP, per confrontare i dati da noi ottenuti con quelli presenti in letteratura. Successivamente, sono state analizzate le vie di trasduzione del segnale comuni tra Nef ed ALK per provare a chiarire i meccanismi che potrebbero contribuire al danno neuronale in corso di HAD.

Poiché i processi di infiammazione cronica, come quella che caratterizza la HAD, sono responsabili almeno in parte del danno tissutale mediante la attivazione delle MMP, il primo intento è stato valutare la azione di Nef su citochine e chemochine che regolano le MMP stesse. Ad esempio, la IL1- β (*InterLeukin-1 β*) ed il TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) inducono la MMP-2 e la MMP-9 [Chakraborti et al., 2003]. Nel nostro modello sperimentale di linea di glioblastoma U87MG, in presenza di Nef, i livelli di espressione degli mRNA di SDF-1 α (*Stromal cell-Derived Factor-1 α*) e Rantes non sembrano alterati da Nef, mentre quelli di IL-1 β e TNF- α risultano

aumentati. Questi dati sono in accordo con i dati presenti in letteratura sulla capacità di Nef di indurre IL-1 β e TNF- α sia in modelli *in vitro*, che *in vivo* nel *liquor* dei pazienti HIV-1 positivi [Tyor et al., 1992; Olivetta et al., 2003; Brabers and Nottet, 2006].

Quindi, per valutare la attivazione delle MMP, le linee di glioblastoma U87MG e di neuroblastoma SK-N-SH sono state sottoposte ad analisi zimografica in presenza della espressione di Nef, per verificare se fosse in grado di indurre la attività gelatinasica, come riportato dalla letteratura [Sporer et al., 2004]. La zimografia permette di valutare lo stato di attivazione delle metallo-proteasi della matrice ed in particolare delle MMP-2 e MMP-9, rispettivamente gelatinasi A e B. Nel nostro modello sperimentale, Nef è in grado di indurre la attività gelatinasica, ed è importante sottolineare che questo effetto è specifico per linee cellulari di origine neuronale, poiché in linee cellulari di origine epiteliali, come le 293T, non è presente. Poiché Nef induce alterazioni a carico delle citochine IL-1 β e TNF- α e delle MMP, ci si è concentrati su quali potessero essere le vie di *signaling* molecolare alla base di queste alterazioni. Nel contesto di controllo del fenotipo differenziato a livello del SNC, ALK si inserisce opportunamente, grazie alla sua importanza nella omeostasi del tessuto cerebrale e alla condivisione con Nef di alcune vie di *signaling* implicate nel controllo del fenotipo neuronale terminalmente differenziato, come le MAP-K.

ALK è una proteina di recente scoperta, quindi, non ancora completamente caratterizzata, che presenta alti livelli di glicosilazione che determinano forme con diversi pesi molecolari. Quindi, poiché è noto che molti virus neurotropi sono in grado di alterare la glicosilazione di proteine importanti nel SNC, si è analizzato il *pattern* di glicosilazione di ALK in presenza o meno di Nef. Le proteine estratte dalla linea di glioblastoma U87MG sono, quindi, state trattate con l'enzima glicosidasi, in modo da verificare il *pattern* di glicosilazione di ALK, ma, nel nostro modello cellulare, la presenza di Nef non sembra indurre modificazioni significative.

Successivamente, per verificare se Nef ed ALK potessero interferire reciprocamente l'una con l'altra, si è valutata in prima istanza la localizzazione cellulare delle due proteine. Sia nella linea cellulare di origine gliale U87MG che in quella epiteliale 293T, Nef ed ALK co-localizzano sulla superficie cellulare e il loro processamento risulta corretto. Si è, quindi, passati a valutare se Nef ed ALK potessero interagire fisicamente, tramite la messa a punto di un protocollo di co-immunoprecipitazione, modificando diverse caratteristiche dei *buffer* di lisi, come ad esempio la forza ionica. Non essendo stato possibile dimostrare nessuna interazione tra le due proteine, si può concludere che o le proteine non interagiscono fisicamente o le condizioni sperimentali di lisi non sono quelle ottimali per preservarne la interazione. Quindi, in futuro verranno testate altre condizioni di lisi, modificando altre variabili

dei *buffer* stessi. Comunque, anche se le due proteine non interagissero fisicamente, questo non esclude che Nef ed ALK possano intervenire reciprocamente sulle comuni vie di trasduzione del segnale coinvolte nei meccanismi molecolari che portano alla insorgenza della HAD. Ci si è, quindi, focalizzati su questo aspetto ed in particolare sullo stato di fosforilazione della via di trasduzione delle MAP-K. Nella linea cellulare U87MG la fosforilazione delle MAP-K è aumentata in presenza di ALK e Nef contemporaneamente. Va, infatti, sottolineato come, nonostante in alcuni esperimenti anche le due proteine singolarmente siano in grado di indurre la fosforilazione, dato in accordo con la letteratura [Souttou et al., 2001; Lu et al., 2007], si osserva comunque un effetto cumulativo di aumento della fosforilazione delle MAP-K in presenza di entrambe le proteine. Questo dato lascia ipotizzare un possibile effetto sinergico e di attivazione reciproca delle due proteine su questa via di trasduzione comune.

Successivamente, si è deciso di valutare il livello di attivazione delle MMP che compaiono in entrambe le cascate di trasduzione del segnale a valle delle due proteine e che sono indotte in presenza di Nef, come dimostrato dai dati ottenuti ed in accordo con la letteratura [Sporer et al., 2004]. Infatti, nella linea cellulare di glioblastoma U87MG, la presenza di ALK e Nef determina un lieve ma significativo effetto cumulativo sulla induzione della MMP-9. Quindi, considerando il dato relativo alla induzione della attivazione cumulativa della fosforilazione delle MAP-K, e dalla analisi densitometrica sulle MMP-9, le proteine Nef ed ALK sembrano interferire reciprocamente sul controllo anche di questa via comune.

Poiché Nef ed ALK interferiscono sulle reciproche vie di trasduzione del segnale, ma non interagiscono fisicamente tra loro, si è valutato se Nef potesse agire sulla induzione dell'mRNA di ALK. Nelle cellule di glioblastoma U87MG e di neuroblastoma SK-N-SH, la presenza di Nef induce un elevato aumento della espressione dell'mRNA di ALK. Si è perciò ipotizzato che Nef potesse agire a livello del promotore di ALK per regolarne la trascrizione. Ma, nei nostri modelli sperimentali, non si riscontra attivazione del promotore di ALK da parte di Nef. La mancanza di attivazione del promotore può essere spiegato in due modi: Nef non agisce direttamente a livello del promotore di ALK e, quindi, la induzione dell'mRNA di ALK è dovuta alla attivazione indiretta sul promotore, magari sempre sfruttando le cascate di attivazione del segnale comuni a Nef ed ALK. La seconda ipotesi prevede invece che la sequenza di ALK utilizzata da noi come sequenza promotrice, non sia in realtà completa. In particolare, nella sequenza promotrice potrebbero mancare sequenze *enhancer* che potrebbero essere localizzate a monte o a valle, o la sequenza non contiene tutto il promotore, poiché la sequenza promotrice completa non è stata ancora riportata in letteratura. Non è, quindi, attualmente

possibile con questi dati determinare se Nef sia in grado di indurre o meno la trascrizione dell'mRNA di ALK agendo direttamente sul suo promotore.

Poiché Nef è in grado di indurre la trascrizione dell'mRNA di ALK e la attivazione delle MMP e delle MAP-K, si è indagato se fosse anche in grado di indurre la attivazione delle vie di trasduzione del segnale che coinvolgono le citochine/chemochine. Nelle cellule U87MG il livello di espressione dell'mRNA della chemochina SDF-1 α non viene alterato significativamente né da ALK né da Nef, mentre quelli di IL-1 β e TNF- α mostrano una induzione in presenza di entrambe le proteine, presentando un effetto cumulativo simile a quello riscontrato per le MMP e le MAP-K. Inoltre, come dato peculiare, si ha il comportamento dell'mRNA di Rantes che viene indotto in presenza di ALK e non di Nef, ma la presenza di entrambe le proteine sembra determinare un effetto cumulativo sulla espressione del suo mRNA.

Quindi, dal presente lavoro di tesi sembra rilevante la attivazione di vie di trasduzione del segnale coinvolte nel differenziamento neuronale per spiegare almeno in parte il danno neuronale in corso di HAD. In particolare, i dati riportati nella presente tesi dimostrano che Nef è in grado di alterare la espressione di ALK ed interferire con la via di trasduzione del segnale mediata da ALK stesso, modificando le vie di trasduzione del segnale che coinvolgono le MMP-9 e MMP-2. Inoltre, Nef ed ALK mostrano un effetto cumulativo sulla regolazione delle fosforilazione delle MAP-K che sono coinvolte nelle loro comuni vie di trasduzione del segnale. Quindi, tra le proteine alterate da Nef, ALK potrebbe svolgere un ruolo importante durante la HAD. In particolare, Nef potrebbe contribuire ai processi di perdita neuronale e di de-differenziamento, presenti durante la HAD, alterando la capacità di ALK di controllare il fenotipo neuronale differenziato. La capacità di ALK di controllare la attivazione delle MMP potrebbe risultare alterata dalla presenza di Nef, fino a determinare la perdita del bilancio fisiologico tra le MMP e gli TIMP. Quindi, in futuro ci si prefigge di caratterizzare più in dettaglio altre vie di trasduzione del segnale importanti e, quindi, finemente regolate nella loro attivazione a livello del SNC, come ad esempio il livello di fosforilazione della proteina Stat3. Inoltre, verranno utilizzate linee cellulari neuronali, come le SK-N-SH, in grado di differenziare a fenotipo neuronale come modello per verificare se Nef sia in grado di indurre una alterazione nella espressione di *marker* neuronali, come la sinaptopodina, che risulta alterata nei podociti di pazienti HIV positivi in corso di HIVAN. In particolare, le cellule verranno trasdotte con vettori lentivirali esprimenti Nef sia prima dell'inizio del processo differenziativo che dopo l'ottenimento del fenotipo differenziato, in modo da identificare in quale punto del controllo del differenziamento Nef possa agire, magari alterando le vie di trasduzione del segnale.

Questo servirà, quindi, a comprendere se Nef agisca bloccando l'inizio del differenziamento in possibili progenitori presenti a livello del SNC, o se sia in grado di portare cellule terminalmente differenziate a "regredire" in un fenotipo non differenziato, inducendo il de-differenziamento, come nei podociti in corso di HIVAN.

Inoltre, studi di immunohistochimica (IHC) su cervelli di pazienti HIV positivi affetti e non da HAD serviranno per verificare se le ipotesi formulate grazie ai dati ottenuti *in vitro*, possano trovare un riscontro *in vivo* nei pazienti. In particolare si analizzeranno proteine come ALK e recettori per le β -chemochine che sono normalmente espresse a bassi livelli nel SNC di pazienti HIV negativi, ma che potrebbero aumentare durante un processo degenerativo ed una infiammazione cronica come quelli presenti nella HAD.

8. ABBREVIAZIONI

AIDS	Sindrome da Immunodeficienza Acquisita
ALCL	<i>Anaplastic Large Cell Lymphoma</i>
APS	ammonio persolfato
BCA	acido bicinconinico
BEE	Barriera Emato-Encefalica
BSA	albumina di siero bovino
cPPT	<i>central Poly-Purine Tract</i>
C _T	<i>Threshold Cycle</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	acido desossiribonucleico
ddNTPs	dideossinucleotidi trifosfato
dNTPs	desossiribonucleotidi trifosfato
D.O.	densità ottica
DTT	ditiotreitolo
EB	<i>elution buffer</i>
EDTA	acido etilendiamminotetracetico
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
FBS	<i>Fetal Bovin Serum</i>
FITC	isotiocianato di fluoresceina
GITC	guanosina isotiocianato
HAART	<i>Highly Active Anti-Retroviral Therapy</i>
HAD	Demenza Associata all'HIV-1
HCMV	Citomegalovirus umano
HIV-1	Virus della Immunodeficienza di tipo 1
HIVAN	Nefropatia Associata all'HIV-1
HRP	<i>Horse-Radish Peroxidase</i>
IE	<i>Immediate-Early</i>
IN	integrasi
kb	chilobasi
kDa	chilodalton
LB	<i>Laemli Buffer</i>
LB	Luria-Bertani
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
µg	microgrammi, 10 ⁻⁶ grammi
µl	microlitri, 10 ⁻⁶ litri

MA	matrice
MNGC	<i>MultiNucleated Giant Cells</i>
MCMD	<i>Minor Cognitive Motor Disorder</i>
MEM α	<i>Minimum Essential Medium alpha</i>
MES	<i>2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid</i>
MoMLV	Virus della Leucemia Murina di Moloney
ng	nanogrammi, 10^{-9} grammi
nm	nanometri, 10^{-9} metri
NP 40	nonidet P 40
pb	paia di basi
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	<i>Primer Binding Site</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PBS-T	PBS addizionato di 0.1% Tween 20
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PIC	<i>Pre-Integration Complex</i>
PMSF	fluoruro di fenilmetansulfonile
polyA	segnale di poliadenilazione
p/v	peso su volume
RNA	acido ribonucleico
rpm	rivoluzioni per minuto
RRE	<i>Rev Responsive Element</i>
RSV	Virus del Sarcoma di Rous
RT	trascrittasi inversa
SDS	dodecilsolfato di sodio
SIV	Virus della Immunodeficienza della Scimmia
SNC	Sistema Nervoso Centrale
SNP	Sistema Nervoso Periferico
SV40	Virus Vacuolante della Scimmia
TBE	Tris Borato EDTA
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TE	Tris EDTA
TEMED	N,N,N,N',N'-tetrametiletilediammina
T _m	temperatura di appaiamento
TRITC	<i>Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate</i>
U	unità enzimatiche
U3	sequenza unica in 3'
U5	sequenza unica in 5'

UV	luce ultravioletta
VSV	Virus della Stomatite Vescicolare
VSV _G	glicoproteina G del Virus della Stomatite Vescicolare
v/v	volume su volume
WPRE	<i>Woodchuck Hepatitis C Virus Post-transcriptional Regulatory Element</i>

9. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad N, Venkatesan S, *Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR*. Science. 1988 Oct 7;242(4875):242.
- Albright AV, Shieh JT, Itoh T, Lee B, Pleasure D, O'Connor MJ, Doms RW, Gonzalez-Scarano F, *Microglia express CCR5, CXCR4, and CCR3, but of these, CCR5 is the principal coreceptor for human immunodeficiency virus type 1 dementia isolates*. J Virol. 1999 Jan;73(1):205-13.
- Albright AV, Strizki J, Harouse JM, Lavi E, O'Connor M, Gonzalez-Scarano F, *HIV-1 infection of cultured human adult oligodendrocytes*. Virology. 1996 Mar 1;217(1):211-9.
- Argyris EG, Acheampong E, Nunnari G, Mukhtar M, Williams KJ, Pomerantz RJ, *Human immunodeficiency virus type 1 enters primary human brain microvascular endothelial cells by a mechanism involving cell surface proteoglycans independent of lipid rafts*. J Virol. 2003 Nov;77(22):12140-51.
- Bagasra O, Lavi E, Bobroski L, Khalili K, Pestaner JP, Tawadros R, Pomerantz RJ, *Cellular reservoirs of HIV-1 in the central nervous system of infected individuals: identification by the combination of in situ polymerase chain reaction and immunohistochemistry*. AIDS 1996 Jun;10(6):573-85.
- Banks WA, Freed EO, Wolf KM, Robinson SM, Franko M, Kumar VB, *Transport of human immunodeficiency virus type 1 pseudoviruses across the blood-brain barrier: role of envelope proteins and adsorptive endocytosis*. J Virol. 2001 May;75(10):4681-91.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L, *Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)*. Science 1983; 220 (4599):868-71.
- Bencheikh M, Bentsman G, Sarkissian N, Canki M, Volsky DJ, *Replication of different clones of human immunodeficiency virus type 1 in primary fetal human astrocytes: enhancement of viral gene expression by Nef*. J Neurovirol. 1999 Apr;5(2):115-24.
- Bergonzini V, Delbue S, Wang JY, Reiss K, Prisco M, Amini S, Khalili K, Peruzzi F, *HIV-Tat promotes cellular proliferation and inhibits NGF-induced differentiation through mechanisms involving Id1 regulation*. Oncogene. 2004 Oct 7;23(46):7701-11.

Bischof D, Pulford K, Mason DY, Morris SW, *Role of the nucleophosmin (NPM) portion of the non-Hodgkin's lymphoma-associated NPM-anaplastic lymphoma kinase fusion protein in oncogenesis*. Mol Cell Biol. 1997 Apr;17(4):2312-25.

Blattner W, Gallo RC, Temin HM, *HIV causes AIDS*. Science 1988 Jul 29;241(4865):515-6.

Bobardt MD, Salmon P, Wang L, Esko JD, Gabuzda D, Fiala M, Trono D, Van der Schueren B, David G, Galloway PA, *Contribution of proteoglycans to human immunodeficiency virus type 1 brain invasion*. J Virol. 2004 Jun;78(12):6567-84.

Bomsel M, *Transcytosis of infectious human immunodeficiency virus across a tight human epithelial cell line barrier*. Nat Med. 1997 Jan;3(1):42-7.

Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA, *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm*. Cell. 1989 Feb 10;56(3):379-90.

Bowden ET, Stoica GE, Wellstein A, *Anti-apoptotic signaling of pleiotrophin through its receptor, anaplastic lymphoma kinase*. J Biol Chem. 2002 Sep 27;277(39):35862-8.

Brabers NA, Nottet HS, *Role of the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-1beta in HIV-associated dementia*. Eur J Clin Invest. 2006 Jul;36(7):447-58.

Brack-Werner R, Kleinschmidt A, Ludvigsen A, Mellert W, Neumann M, Herrmann R, Khim MC, Burny A, Muller-Lantzsch N, Stavrou D, et al, *Infection of human brain cells by HIV-1: restricted virus production in chronically infected human glial cell lines*. AIDS 1992, Mar;6(3):273-85.

Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T, *Regulation of matrix metalloproteinases: an overview*. Mol Cell Biochem. 2003 Nov;253(1-2):269-85.

Cheingsong-Popov R, Panagiotidi C, Ali M, Bowcock S, Watkins P, Aronstam A, Wassef M, Weber J, *Antibodies to HIV-1 nef(p27): prevalence, significance, and relationship to seroconversion*. AIDS Res Hum Retroviruses. 1990 Sep;6(9):1099-105.

Cheng-Mayer C, Iannello P, Shaw K, Luciw PA, Levy JA, *Differential effects of nef on HIV replication: implications for viral pathogenesis in the host*. Science. 1989 Dec 22;246(4937):1629-32.

Choe H, Martin KA, Farzan M, Sodroski J, Gerard NP, Gerard C, *Structural interactions between chemokine receptors, gp120 Env and CD4*. Semin Immunol. 1998 Jun;10(3):249-57.

Churchill M, Sterjovski J, Gray L, Cowley D, Chatfield C, Learmont J, Sullivan JS, Crowe SM, Mills J, Brew BJ, Wesselingh SL, McPhee DA, Gorry PR, *Longitudinal analysis of nef/long terminal repeat-deleted HIV-1 in blood and cerebrospinal fluid of a long-term survivor who developed HIV-associated dementia*. J Infect Dis. 2004 Dec 15;190(12):2181-6.

Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C, Rouzioux C, *Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS*. Science 1985;233(4761):343-6.

Conant K, McArthur JC, Griffin DE, Sjulson L, Wahl LM, Irani DN, *Cerebrospinal fluid levels of MMP-2, 7, and 9 are elevated in association with human immunodeficiency virus dementia*. Ann Neurol. 1999 Sep;46(3):391-8.

Curtain CC, Separovic F, Rivett D, Kirkpatrick A, Waring AJ, Gordon LM, Azad AA, *Fusogenic activity of amino-terminal region of HIV type 1 Nef protein*. AIDS Res Hum Retroviruses. 1994 Oct;10(10):1231-40.

Das SR, Jameel S, *Biology of the HIV Nef protein*. Indian J Med Res. 2005 Apr;121(4):315-32.

Dirks WG, Fahrnich S, Lis Y, Becker E, MacLeod RA, Drexler HG, *Expression and functional analysis of the anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene in tumor cell lines*. Int J Cancer. 2002 Jul 1;100(1):49-56.

Dorfman T, Popova E, Pizzato M, Göttlinger HG, *Nef enhances human immunodeficiency virus type 1 infectivity in the absence of matrix*. J Virol. 2002 Jul;76(13):6857-62.

Edinger AL, Mankowski JL, Doranz BJ, Margulies BJ, Lee B, Rucker J, Sharron M, Hoffman TL, Berson JF, Zink MC, Hirsch VM, Clements JE, Doms RW, *CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997 Dec 23;94(26):14742-7.

Fischer-Smith T, Rappaport J, *Evolving paradigms in the pathogenesis of HIV-1-associated dementia*. Expert Rev Mol Med. 2005 Dec 2;7(27):1-26.

Freund J, Kellner R, Konvalinka J, Wolber V, Kräusslich HG, Kalbitzer HR, *A possible regulation of negative factor (Nef) activity of human immunodeficiency virus type 1 by the viral protease*. Eur J Biochem. 1994 Jul 15;223(2):589-93.

Fujinaga K, Zhong Q, Nakaya T, Kameoka M, Meguro T, Yamada K, Ikuta K, *Extracellular Nef protein regulates productive HIV-1 infection from latency*. J Immunol. 1995 Dec 1;155(11):5289-98.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J, Safai B, White G, Foster P, Markham PD, *Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS*. Science 1984;224(4648):500-3.

Gonzales-Scarano F, Martin-Garcia J, *The neuropathogenesis of AIDS*. Nat Rev Immunol. 2005 Jan;5(1):69-81.

Gouzi JY, Moog-Lutz C, Vigny M, Brunet-de Carvalho N, *Role of the subcellular localization of ALK tyrosine kinase domain in neuronal differentiation of PC12 cells.* J Cell Sci. 2005 Dec 15;118(Pt 24):5811-23.

Gray F, Chretien F, Vallat-Decouvelaere AV, Scaravilli F, *The changing pattern of HIV neuropathology in the HAART era.* J Neuropathol Exp Neurol. 2003 May;62(5):429-40.

Greenway AL, Holloway G, McPhee DA, Ellis P, Cornall A, Lidman M, *HIV-1 Nef control of cell signalling molecules: multiple strategies to promote virus replication.* J Biosci. 2003 Apr;28(3):323-35.

Griffin WC 3rd, Middaugh LD, Cook JE, Tyor WR, *The severe combined immunodeficient (SCID) mouse model of human immunodeficiency virus encephalitis: deficits in cognitive function.* J Neurovirol. 2004 Apr;10(2):109-15.

Grunewald S, Matthijs G, Jaeken J, *Congenital disorders of glycosylation: a review.* Pediatr Res. 2002 Nov;52(5):618-24.

Guy B, Riviere Y, Dott K, Regnault A, Kieny MP, *Mutational analysis of the HIV nef protein.* Virology 1990;176:413-25.

Guyader M, Emereman M, Sonigo P, Clavel F, Montagnier L, Alizon M, *Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2.* Nature 1987;326(6114):622-9.

Hanna Z, Priceputu E, Kay DG, Poudrier J, Chrobak P, Jolicoeur P, *In vivo mutational analysis of the N-terminal region of HIV-1 Nef reveals critical motifs for the development of an AIDS-like disease in CD4C/HIV transgenic mice.* Virology. 2004 Oct 1;327(2):273-86.

Harris M, *HIV: a new role for Nef in the spread of HIV.* Curr Biol. 1999 Jun 17;9(12):R459-61.

He JC, Husain M, Sunamoto M, D'Agati VD, Klotman ME, Iyengar R, Klotman PE, *Nef stimulates proliferation of glomerular podocytes through activation of Src-dependent Stat3 and MAPK1,2 pathways.* J Clin Invest. 2004 Sep;114(5):643-51.

Iwahara T, Fujimoto J, Wen D, Cupples R, Bucay N, Arakawa T, Mori S, Ratzkin B, Yamamoto T, *Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system.* Oncogene. 1997 Jan 30;14(4):439-49.

Kaul, M, Garden GA, Lipton SA, *Pathways to neuronal injury and apoptosis in HIV-associated dementia.* Nature. 2001 Apr 19;410(6831):988-94.

Kim WK, Corey S, Alvarez X, Williams K, *Monocyte/macrophage traffic in HIV and SIV encephalitis.* J Leukoc Biol. 2003 Nov;74(5):650-6.

Kobayashi N, Gao SY, Chen J, Saito K, Miyawaki K, Li CY, Pan L, Saito S, Terashita T, Matsuda S, *Process formation of the renal glomerular podocyte: is there*

common molecular machinery for processes of podocytes and neurons? Anat Sci Int. 2004 Mar;79(1):1-10.

Kobayashi N, *Mechanism of the process formation; podocytes vs. neurons.* Microsc Res Tech. 2002 May 15;57(4):217-23.

Koedel U, Kohleisen B, Sporer B, Lahrtz F, Ovod V, Fontana A, Erfle V, Pfister HW, *HIV type 1 Nef protein is a viral factor for leukocyte recruitment into the central nervous system.* J Immunol. 1999 Aug 1;163(3):1237-45.

Lai R, Rassidakis GZ, Medeiros LJ, Ramdas L, Goy AH, Cutler C, Fujio Y, Kunisada K, Amin HM, Gilles F, *Signal transducer and activator of transcription-3 activation contributes to high tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in anaplastic lymphoma kinase-positive anaplastic large cell lymphoma.* Am J Pathol. 2004 Jun;164(6):2251-8.

Lamant L, Pulford K, Bischof D, Morris SW, Mason DY, Delsol G, Mariame B, *Expression of the ALK tyrosine kinase gene in neuroblastoma.* Am J Pathol. 2000 May;156(5):1711-21.

Lane JH, Sasseville VG, Smith MO, Vogel P, Pauley DR, Heyes MP, Lackner AA, *Neuroinvasion by simian immunodeficiency virus coincides with increased numbers of perivascular macrophages/microglia and intrathecal immune activation.* J Neurovirol. 1996 Dec 2; (6):423-432.

Liu NQ, Lossinsky AS, Popik W, Li X, Gujuluva C, Kriederman B, Roberts J, Pushkarsky T, Bukrinsky M, Witte M, Weinand M, Fiala M, *Human immunodeficiency virus type 1 enters brain microvascular endothelia by macropinocytosis dependent on lipid rafts and the mitogen-activated protein kinase signaling pathway.* J Virol. 2002 Jul;76(13):6689-700.

Lu TC, He JC, Klotman PE, *Podocytes in HIV-associated nephropathy.* Nephron Clin Pract. 2007;106(2):c67-71.

McArthur JC, *HIV dementia: an evolving disease.* J Neuroimmunol. 2004 Dec;157(1-2):3-10.

McArthur JC, Hoover DR, Bacellar H, Miller EN, Cohen BA, Becker JT, Graham NM, McArthur JH, Selnes OA, Jacobson LP, et al. *Dementia in AIDS patients: incidence and risk factors. Multicenter AIDS Cohort Study.* Neurology. 1993 Nov;43(11):2245-52.

McArthur JC, Sacktor N, Selnes O, *Human immunodeficiency virus-associated dementia.* Semin Neurol. 1999;19(2):129-50.

Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, Dittmer KG, Shapiro DN, Saltman DL, Look AT, *Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma.* Science. 1995 Jan 20;267(5196):316-7.

Morris SW, Naeve C, Mathew P, James PL, Kirstein MN, Cui X, Witte DP, *ALK, the chromosome 2 gene locus altered by the t(2;5) in non-Hodgkin's lymphoma, encodes a novel neural receptor tyrosine kinase that is highly related to leukocyte tyrosine kinase (LTK)*. *Oncogene* 1997 Dec 4;15(23):2883-2896.

Motegi A, Fujimoto J, Kotani M, Sakuraba H, Yamamoto T, *ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth*. *J Cell Sci*. 2004 Jul 1;117(Pt 15):3319-29.

Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE, Fukasawa K, *Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication*. *Cell*. 2000 Sep 29;103(1):127-40.

Olivetta E, Percario Z, Fiorucci G, Mattia G, Schiavoni I, Dennis C, Jäger J, Harris M, Romeo G, Affabris E, Federico M, *HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation*. *J Immunol*. 2003 Feb 15;170(4):1716-27.

Overholser ED, Coleman GD, Bennett JL, Casaday RJ, Zink MC, Barber SA, Clements JE, *Expression of simian immunodeficiency virus (SIV) nef in astrocytes during acute and terminal infection and requirement of nef for optimal replication of neurovirulent SIV in vitro*. *J Virol*. 2003 Jun;77(12):6855-66.

Peruzzi F, Bergonzini V, Aprea S, Reiss K, Sawaya BE, Rappaport J, Amini S, Khalili K, *Cross talk between growth factors and viral and cellular factors alters neuronal signaling pathways: implication for HIV-associated dementia*. *Brain Res Rev*. 2005 Dec 1;50(1):114-25.

Pillai SK, Pond SL, Liu Y, Good BM, Strain MC, Ellis RJ, Letendre S, Smith DM, Günthard HF, Grant I, Marcotte TD, McCutchan JA, Richman DD, Wong JK, *Genetic attributes of cerebrospinal fluid-derived HIV-1 env*. *Brain*. 2006 Jul;129(Pt 7):1872-83.

Pizzato M, Helander A, Popova E, Calistri A, Zamborlini A, Palu G, Gottlinger HG, *Dynamin 2 is required for the enhancement of HIV-1 infectivity by Nef*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Apr 17;104(16):6812-7.

Ranki A, Nyberg M, Ovod V, Haltia M, Elovaara I, Raininko R, Haapasalo H, Krohn K, *Abundant expression of HIV Nef and Rev proteins in brain astrocytes in vivo is associated with dementia*. *AIDS*. 1995 Sep;9(9):1001-8.

Roeth JF, Collins KL, *Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006 Jun;70(2):548-63.

Saksena AN, Wang B, Ge YC, Chang J, Dwyer DE, Xiang SH, Packham DR, Randle C, Cunningham AL, *Region-specific changes, gene duplications, and random*

deletions in the nef gene from HIV type 1-infected brain tissues and blood of a demented patient. AIDS Res Hum Retroviruses. 1997 Jan 1;13(1):111-6.

Schindler M, Wurfl S, Benaroch P, Greenough TC, Daniels R, Easterbrook P, Brenner M, Munch J, Kirchhoff F, *Down-modulation of mature major histocompatibility complex class II and up-regulation of invariant chain cell surface expression are well-conserved functions of human and simian immunodeficiency virus nef alleles.* J Virol. 2003 Oct;77(19):10548-56.

Shiota M, Fujimoto J, Semba T, Satoh H, Yamamoto T, Mori S, *Hyperphosphorylation of a novel 80kDa protein-tyrosine kinase similar to Ltk in a human Ki-1 lymphoma cell line, AMS3.* Oncogene. 1994 Jun;9(6):1567-74.

Shiota M, Nakamura S, Ichinohasama R, Abe M, Akagi T, Takeshita M, Mori N, Fujimoto J, Miyauchi J, Mikata A, Nanba K, Takami T, Yamabe H, Takano Y, Izumo T, Nagatani T, Mohri N, Nasu K, Satoh H, Katano H, Fujimoto J, Yamamoto T, Mori S, *Anaplastic large cell lymphomas expressing the novel chimeric protein p80NPM/ALK: a distinct clinicopathologic entity.* Blood. 1995 Sep 1;86(5):1954-60.

Singh DK, McCormick C, Pacyniak E, Griffin D, Pinson DM, Sun F, Berman NE, Stephens EB, *Pathogenic and nef-interrupted simian-human immunodeficiency viruses traffic to the macaque CNS and cause astrocytosis early after inoculation.* Virology. 2002 Apr 25;296(1):39-51.

Souttou B, Carvalho NB, Raulais D, Vigny M, *Activation of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase induces neuronal differentiation through the mitogen-activated protein kinase pathway.* J Biol Chem. 2001 Mar 23;276(12):9526-31.

Sporer B, Koedel U, Paul R, Kohleisen B, Erfle V, Fontana A, Pfister HW, *Human immunodeficiency virus type-1 Nef protein induces blood-brain barrier disruption in the rat: role of matrix metalloproteinase-9.* J Neuroimmunol. 2004 Jan; 102(2):125-30.

Sporer B, Paul R, Koedel U, Grimm R, Wick M, Goebel FD, Pfister HW, *Presence of matrix metalloproteinase-9 activity in the cerebrospinal fluid of human immunodeficiency virus-infected patients.* J Infect Dis. 1998 Sep;178(3):854-7.

Stoica GE, Kuo A, Aigner A, Sunitha I, Souttou B, Malerczyk C, Caughey DJ, Wen D, Karavanov A, Riegel AT, Wellstein A, *Identification of anaplastic lymphoma kinase as a receptor for the growth factor pleiotrophin.* J Biol Chem. 2001 May 18;276(20):16772-9.

Stoica GE, Kuo A, Powers C, Bowden ET, Sale EB, Riegel AT, Wellstein A, *Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types.* J Biol Chem. 2002 Sep 27;277(39):35990-8.

Sunamoto M, Husain M, He JC, Schwartz EJ, Klotman PE, *Critical role for Nef in HIV-1-induced podocyte dedifferentiation*. *Kidney Int.* 2003 Nov;64(5):1695-701.

Suryadevara R, Holter S, Borgmann K, Persidsky R, Labenz-Zink C, Persidsky Y, Gendelman HE, Wu L, Ghorpade A, *Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by astrocytes: links to HIV-1 dementia*. *Glia.* 2003 Oct;44(1):47-56.

Takahashi K, Wesselingh SL, Griffin DE, McArthur JC, Johnson RT, Glass JD, *Localization of HIV-1 in human brain using polymerase chain reaction/in situ hybridization and immunocytochemistry*. *Ann Neurol.* 1996 Jun;39(6):705-711.

Tornatore C, Chandra R, Berger JR, Major EO, *HIV-1 infection of subcortical astrocytes in the pediatric central nervous system*. *Neurology* 1994 Mar;44(3):481-7.

Toschi E, Barillari G, Sgadari C, Bacigalupo I, Cereseto A, Carlei D, Palladino C, Zietz C, Leone P, Sturzl M, Butto S, Cafaro A, Monini P, Ensoli B, *Activation of matrix-metalloproteinase-2 and membrane-type-1-matrix-metalloproteinase in endothelial cells and induction of vascular permeability in vivo by human immunodeficiency virus-1 Tat protein and basic fibroblast growth factor*. *Mol Biol Cell.* 2001 Oct;12(10):2934-46.

Trillo-Pazos G, McFarlane-Abdulla E, Campbell IC, Pilkington GJ, Everall IP, *Recombinant nef HIV-IIIB protein is toxic to human neurons in culture*. *Brain Res.* 2000 May 12;864(2):315-26.

Tsareva SA, Moriggl R, Corvinus FM, Wiederanders B, Schutz A, Kovacic B, Friedrich K, *Signal transducer and activator of transcription 3 activation promotes invasive growth of colon carcinomas through matrix metalloproteinase induction*. *Neoplasia.* 2007 Apr;9(4):279-91.

Tyor WR, Glass JD, Griffin JW, Becker PS, McArthur JC, Bezman L, Griffin DE, *Cytokine expression in the brain during the acquired immunodeficiency syndrome*. *Ann Neurol.* 1992 Apr;31(4):349-60.

van de Bovenkamp M, Nottet HSLM, Pereira CF, *Interactions of human immunodeficiency virus-1 proteins with neurons: possible role in the development of human immunodeficiency virus-1-associated dementia*. *European Journal of Clinical Investigation* 2002;32:619-627.

van Marle G, Henry S, Todoruk T, Sullivan A, Silva C, Rourke SB, Holden J, McArthur JC, Gill MJ, Power C, *Human immunodeficiency virus type 1 Nef protein mediates neural cell death: a neurotoxic role for IP-10*. *Virology.* 2004 Nov 24;329(2):302-18.

Williams KC, Corey S, Westmoreland SV, Pauley D, Knight H, deBakker C, Alvarez X, Lackner AA, *Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques:*

implications for the neuropathogenesis of AIDS J. Exp. Med. 2001 Apr 16; 193(8),905-915.

Williams M, Roeth JF, Kasper MR, Fleis RI, Przybycin CG, Collins KL, *Direct binding of human immunodeficiency virus type 1 Nef to the major histocompatibility complex class I (MHC-I) cytoplasmic tail disrupts MHC-I trafficking.* J Virol. 2002 Dec;76(23):12173-84.

Xie TX, Huang FJ, Aldape KD, Kang SH, Liu M, Gershenwald JE, Xie K, Sawaya R, Huang S, *Activation of stat3 in human melanoma promotes brain metastasis.* Cancer Res. 2006 Mar 15;66(6):3188-96.

Zamo A, Chiarle R, Piva R, Howes J, Fan Y, Chilosi M, Levy DE, Inghirami G, *Anaplastic lymphoma kinase (ALK) activates Stat3 and protects hematopoietic cells from cell death.* Oncogene. 2002 Feb 7;21(7):1038-47.

10. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Giorgio Palù per avermi permesso di svolgere il Dottorato nel Suo laboratorio di ricerca. Vorrei inoltre ringraziare tutte le persone del Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche che mi hanno aiutato nel lavoro sperimentale e nella stesura di questa tesi, perché senza di loro non sarebbe stato possibile.

11. PUBBLICAZIONI ALLEGATE

Parte di questo lavoro di tesi ed altri progetti correlati, ma non discussi in questa tesi di dottorato, sono stati oggetto di presentazione a congressi e di pubblicazione di cui si allega copia, o sono oggetto di manoscritti in corso di valutazione da parte di riviste internazionali.

Bergonzini V, et al., “View and review on viral oncology research.” *Submitted*.

Bergonzini V, et al., “HIV-1 Nef and cell signaling transduction: possible involvement in HIV-1 Associated Dementia (HAD).” *Submitted*.