

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA**

**Dottorato di Ricerca in Microbiologia e Virologia**

**XXII ciclo**

**Coordinatore: Chiar.mo Prof. Carlo Chezzi**

**ASPETTI FUNZIONALI DELLA COMPARTIMENTALIZZAZIONE  
NUCLEARE DI PROTEINE DI CITOMEGALOVIRUS UMANO  
IN UN MODELLO DI INFEZIONE LITICA *IN VITRO***

**Tutore:**

**Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina Arcangeletti**

**Dottoranda:**

**Dott.ssa Isabella Rodighiero**

## INDICE

<b>1. RIASSUNTO</b>	pag. 1
<b>2. PRESENTAZIONE DELLO STUDIO</b>	pag. 5
<b>3. INTRODUZIONE</b>	pag. 7
<b>3.1. Struttura del virione</b>	pag. 7
<b>3.2. Il genoma virale</b>	pag. 9
<b>3.3. Il ciclo litico di citomegalovirus</b>	pag. 10
<b>3.4. L'espressione genica virale nell'ambito del ciclo replicativi litico</b>	pag. 11
<b>3.5. Le proteine virali</b>	pag. 12
3.5.1. <i>Le proteine precocissime ("Immediate Early" o <math>\alpha</math>)</i>	pag. 12
3.5.2. <i>Le proteine precoci ("Early" o <math>\beta</math>)</i>	pag. 14
3.5.3. <i>Le proteine tardive ("Late" o <math>\gamma</math>)</i>	pag. 15
<b>3.6. HCMV e la cellula ospite</b>	pag. 17
3.6.1. <i>Il nucleo</i>	pag. 19
3.6.2. <i>L'involucro nucleare</i>	pag. 19
3.6.3. <i>Il nucleoplasma</i>	pag. 20
3.6.4. <i>La matrice nucleare</i>	pag. 21
3.6.5. <i>Il nucleolo</i>	pag. 21
<b>3.7. Il nucleolo e il ciclo cellulare</b>	pag. 23
<b>3.8. Il nucleolo e i virus</b>	pag. 25
<b>4. TEMA E OBIETTIVI DELLA RICERCA</b>	pag. 27
<b>5. MATERIALI E METODI</b>	pag. 29
<b>6. RISULTATI</b>	pag. 44

6.1	<b>DEPLEZIONE NUCLEOLARE DELLA PROTEINA VIRALE PP65, A SEGUITO DI TRATTAMENTO CON ACTINOMICINA-D E CON CISPLATINO</b>	pag. 44
6.2	<b>EFFETTI DELLA MANCATA LOCALIZZAZIONE NUCLEOLARE DI PP65 SULL'ESPRESSIONE DEI GENI PRECOCISSIMI VIRALI</b>	pag. 51
6.3	<b>ALTERAZIONE DEL CICLO CELLULARE AD OPERA DI HCMV IN FIBROBLASTI MRC5</b>	pag. 53
6.4	<b>ANALISI DELL'EFFICIENZA DELL'INFEZIONE LITICA DA HCMV IN CELLULE SINCRONIZZATE NELLE DIVERSE FASI DEL CICLO CELLULARE</b>	pag. 54
6.5	<b>MONITORAGGIO DELLA PROTEINA PP65 DEL VIRUS PARENTALE IN CELLULE SINCRONIZZATE NELLE DIVERSE FASI DEL CICLO CELLULARE</b>	pag. 57
6.6	<b>RICERCA DI POSSIBILI "PARTNERS" MOLECOLARI DELLA PROTEINA PP65 DI HCMV A LIVELLO NUCLEOLARE</b>	pag. 61
	6.6.1 STUDIO DELLA CINETICA DI RILASCIO DELLA PROTEINA VIRALE PP65 DALLA SEDE NUCLEOLARE, IN RELAZIONE A SPECIFICHE COMPONENTI PROTEICHE DEL NUCLEOLO	pag. 61
	6.6.2 INTERAZIONE TRA PP65 E NUCLEOLINA <i>IN VITRO</i>	pag. 63
6.7	<b>SILENZIAMENTO DELLA COMPONENTE PROTEICA NUCLEOLARE (C23) POTENZIALMENTE COINVOLTA NELL'INTERAZIONE CON LA PROTEINA PP65 DEL VIRUS PARENTALE</b>	pag. 66
	6.7.1 EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI C23 SULLA LOCALIZZAZIONE NUCLEOLARE DI PP65	pag. 66
	6.7.2 EFFETTO DEL "KONOCK DOWN" DI C23 SULL'EFFICIENZA DI INFEZIONE DA HCMV	pag. 70
7.	<b>DISCUSSIONE</b>	pag. 72
8.	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	pag.77

## 1 RIASSUNTO

Il nucleolo è un dominio nucleare coinvolto nella biogenesi dei ribosomi, così come in molte importanti attività regolatorie cellulari, tra cui il controllo del ciclo cellulare e i processi di maturazione e trasporto di mRNA. Inoltre, numerosi dati di letteratura descrivono un coinvolgimento del compartimento nucleolare durante il ciclo replicativo di molti agenti virali, tra cui i virus erpetici. Precedenti studi svolti dal nostro gruppo di ricerca su citomegalovirus umano (HCMV), hanno dimostrato l'accumulo preferenziale a livello nucleolare (in particolare, anche a livello della matrice nucleolare) di una delle maggiori fosfoproteine (pp65) del tegumento virale nel modello sperimentale costituito da fibroblasti umani infettati liticamente; tale effetto era già evidente a tempi molto precoci dopo l'infezione.

Il progetto di ricerca sviluppato e descritto in questa tesi sperimentale è stato rivolto alla valutazione delle possibili implicazioni funzionali (con particolare riferimento all'espletamento del programma di espressione litica virale) della localizzazione nucleolare della proteina pp65 di HCMV. Uno degli strumenti inizialmente impiegati per tale verifica è stato l'utilizzo di sostanze, quali actinomicina D e cisplatino, di cui è nota, qualora utilizzate a basse concentrazioni, una selettiva azione inibitoria sull'enzima RNA polimerasi I (lasciando invece inalterata l'attività di RNA polimerasi II e III) e, conseguentemente, sulla sintesi di RNA ribosomiale. In tali condizioni sperimentali è stata osservata una significativa ridistribuzione delle proteine nucleolari dal nucleolo al nucleoplasma ed una simultanea deplezione della proteina virale pp65 dal compartimento nucleolare; questo effetto era altamente evidente sia in monostrati di fibroblasti trattati per l'estrazione della matrice nucleare *in situ*, sia in cellule non trattate. In concomitanza a tali effetti, relativi alla deplezione nucleolare di pp65 ed all'inibizione dell'attività dell'enzima RNA polimerasi I, è stata di significativo interesse l'osservazione di un netto ritardo nell'avvio del programma litico di espressione genica virale. Questi risultati suggeriscono una possibile relazione tra la localizzazione nucleolare di pp65, la sintesi di rRNA, e la regolazione dell'espressione genica di HCMV.

Tra le funzioni nucleolari di possibile interesse per HCMV ed eventualmente legate anche alla sintesi di rRNA, l'attenzione si è concentrata sul ciclo cellulare, la cui regolazione avviene anche a livello nucleolare e la cui modulazione da parte di HCMV è nota in diversi modelli sperimentali. I dati ricavati dallo studio di questo importante aspetto supportano l'ipotesi di un ruolo potenzialmente rilevante di pp65, e della sua localizzazione nucleolare, nel controllo del ciclo cellulare da parte di HCMV (in grado di arrestare la proliferazione del

modello cellulare utilizzato in fase G1-G1/S), e nel corretto avvio del programma litico virale. In particolare, i risultati ottenuti dimostrano che, sebbene l'ingresso del virus nella cellula ospite non sia influenzato dalla fase metabolica in cui questa si trova, la localizzazione dell'antigene virale pp65 a livello del nucleolo è significativamente maggiore in cellule in fase G1 e G1/S, rispetto a quelle che si trovano in S o in G2/M. In concomitanza, è stato osservato che solo cellule in fase G1 o G1/S sono in grado di sostenere una corretta ed efficiente realizzazione del ciclo litico di HCMV, che risulta, invece, fortemente penalizzato in S e in G2/M. Tali osservazioni avvalorano ulteriormente l'ipotesi di un possibile coinvolgimento di pp65 nei processi di regolazione e *signaling* correlati a funzioni nucleolari, come il controllo del ciclo cellulare. Al fine di individuare possibili *partners* molecolari con cui interagirebbe la proteina virale pp65 a livello del nucleolo, l'attenzione è stata rivolta allo studio di antigeni nucleolari di rilevanza nell'ambito del controllo del ciclo cellulare (oltre che della sintesi di rRNA), come nucleolina (C23), nucleofosmina, fibrillarina e UBF ("Upstream Binding Factor"). Esperimenti di microscopia confocale e di co-immunoprecipitazione reciproca, hanno indicato C23 quale uno dei possibili *partners* molecolari di pp65 a livello nucleolare.

Questa ipotesi è stata ulteriormente supportata da esperimenti di silenziamento genico di C23. Sebbene si tratti di dati preliminari, tuttavia essi sembrano confermare un chiaro coinvolgimento di tale proteina nucleolare nell'interazione con la proteina pp65 di HCMV; infatti, in fibroblasti in cui era stato realizzato il silenziamento genico di C23, non si assisteva più alla localizzazione nucleolare di pp65. Inoltre, l'espressione delle proteine precocissime maggiori di HCMV era significativamente inibita, non solo come efficienza, ma anche relativamente alla loro dislocazione cellulare, con assenza di accumulo nucleare e presenza delle stesse a livello citoplasmatico.

## **SUMMARY**

The nucleolus is a nuclear domain involved in the biogenesis of ribosomes, as well as in many other important cellular regulatory activities, such as cell cycle control and mRNA transport and processing. Several literature data describe the involvement of the nucleolar compartment during the replication cycle of many viruses, including herpesviruses. In a previous study, we demonstrated the preferential targeting and accumulation of one of the major human cytomegalovirus (HCMV) tegument phosphoprotein (pp65) to the nucleolar compartment and, in particular, to the nucleolar matrix of lytically infected fibroblasts; such targeting was already evident at very early times after infection.

The aim of the present study was to investigate the functional significance of HCMV pp65 targeting to the nucleolar compartment (particularly related to the HCMV gene expression over the course of the lytic program). First of all, we assessed the possible effects of rRNA synthesis inhibition on the development of HCMV lytic infection, by using either actinomycin D or cisplatin at low concentrations, that are known to selectively inhibit RNA polymerase I activity, and hence ribosome biogenesis, whilst leaving RNA polymerase II and III functions unaffected. Upon inhibition of rRNA synthesis by either agent, we observed a significant redistribution of nucleolar proteins within the nucleoplasm and a simultaneous depletion of viral pp65 from the nucleolus; this effect was highly evident in both unextracted cells and in nuclear matrices *in situ*. Of particular interest, even a brief suppression of rRNA synthesis resulted in a very strong inhibition of the progression of HCMV infection, as was concluded from the absence of accumulation of HCMV major immediate-early proteins within the nucleus of infected cells. These data suggest that a functional relationship might exist between rRNA synthesis, pp65 localization to the nucleolus and the normal development of HCMV lytic infection.

Among nucleolar functions of potential interest for HCMV, and related to rRNA synthesis, we focused on cell cycle control, that occurs also in the nucleolus and which is modulated by HCMV. The original data arisen from the present study support the hypothesis of a potentially relevant role of pp65, and its nucleolar localization, in the control of the cell cycle by HCMV (that is known to induce a blockade of cell proliferation in G1-G1/S in many experimental models), and for the development of viral infection. Specifically, in this study we demonstrate that, although the incoming pp65 amount in the infected cells appears to be constant irrespective of the cell-cycle phases, its nucleolar accumulation is prominent in G1 and G1/S, but very poor in S or G2/M. This correlates with the observation that only cells in G1 and G1/S supported an efficient development of the HCMV lytic cycle, in contrast with S and G2/M phases, where infection was highly reduced. These data reinforce the hypothesis of HCMV pp65 involvement in regulatory/signaling pathways related to nucleolar functions, such as the cell-cycle control.

In order to detect possible molecular partners of pp65 in the nucleolar compartment, we focused our attention on the relationship between this viral antigen and nucleolar proteins of interest in cell cycle and rRNA synthesis control, such as nucleolin (C23), nucleophosmin, fibrillarin and UBF (Upstream Binding factor). Confocal microscopy analysis and reciprocal co-immunoprecipitation point to C23 as a possible pp65 partner in the nucleolus. Accordingly, by preliminary experiments of C23 knockdown, pp65 was no longer found in

the nucleolus of infected cells; moreover, in these experimental conditions we observed not only a significantly reduced expression of HCMV major immediate-early proteins, but also a lack of their nuclear accumulation and a poor presence in the cytoplasmic compartment.

## 2. PRESENTAZIONE DELLO STUDIO

Citomegalovirus umano (HCMV), anche chiamato herpes virus di tipo 5 (HHV5), è uno degli otto virus erpetici che infettano l'uomo. Nel corso dell'esistenza, dal 50% al 90% degli individui nei Paesi industrializzati, e la quasi totalità degli individui nei Paesi in via di sviluppo, va incontro ad infezione da HCMV. La diffusione del virus nella popolazione è favorita dal fatto che l'infezione decorre, nella maggior parte dei casi, in modo asintomatico o paucisintomatico ed è seguita dall'eliminazione prolungata (per mesi o addirittura anni) del virus in diversi fluidi corporei (urina, saliva, lacrime, sperma, latte, secrezioni cervicali). Ciò giustifica la capacità del portatore sano di diffondere l'infezione sia verticalmente che orizzontalmente. Nel corso degli ultimi anni, è stato riscontrato un notevole incremento del numero e della varietà di patologie ad esso associate: se da un lato è cresciuta l'attenzione e la sensibilizzazione verso le infezioni sostenute da HCMV in particolari situazioni fisiologiche, quali la gravidanza, attraverso un monitoraggio volto a rivelare precocemente uno stato di infezione primaria nella donna gravida, al fine di valutare la possibilità di trasmissione del virus al feto, dall'altro sono aumentati i soggetti esposti a fattori di rischio. In particolare, nell'ambito delle categorie di individui in cui il sistema immunitario non risponde adeguatamente a stimoli antigenici, condizione altamente favorente l'instaurarsi di quadri patologici sostenuti da HCMV, quelle in cui il virus può divenire maggiormente aggressivo sono rappresentate da soggetti sottoposti a trapianto d'organo o di midollo (in trattamento terapeutico immunosoppressivo), come anche da individui con infezione da HIV. Quanto brevemente esposto rende ragione del fatto che HCMV venga ancora oggi considerato uno tra gli agenti eziologici più importanti nell'indurre anomalie congenite e/o sequele neurologiche tardive nel bambino, ma ancora di più nel causare quadri patologici gravi, ed anche mortali, nei trapiantati d'organo e nei malati di AIDS.

Nonostante gli eventi biochimici che hanno luogo in corso di infezione da virus a DNA, in particolare da virus erpetici, siano stati studiati approfonditamente, alcuni degli aspetti molecolari del ciclo litico di HCMV non sono ancora del tutto noti, soprattutto quelli inerenti all'organizzazione spaziale e funzionale dei componenti virali nell'ambito della cellula infettata; rimangono inoltre aperti molti quesiti relativi a quegli eventi che possono indurre uno stato di latenza. È ormai noto che le strategie adottate dai virus per replicare ed esprimere il proprio corredo genico prevedono di cooptare apparati enzimatici e percorsi metabolici della cellula ospite e di integrarsi, dal punto di vista spaziale, in strutture preesistenti, sedi di processi cruciali. Per citomegalovirus, come per la maggior parte dei virus a DNA, il nucleo cellulare rappresenta la sede di replicazione e di assemblaggio del

nucleocapside. In particolare, le attuali conoscenze di biologia cellulare portano a considerare il nucleo non solo come quel distretto che racchiude il codice genetico della cellula, ma come una struttura altamente specializzata ed organizzata spazialmente in numerosi domini. La compartimentalizzazione nucleare è inoltre dinamica, potendo variare nel tempo e nello spazio, dipendentemente dalle esigenze della cellula e dalla relativa aggregazione di complessi multiproteici con specifiche attività enzimatiche. Risulta evidente che tale separazione in diversi domini funzionali necessita di una struttura che fornisca non solo l'impalcatura "architettonica" e veicolante, ma che sia anche sito di legame per i complessi molecolari implicati in specifiche attività metaboliche. A tale proposito, è interessante sottolineare come il nucleolo costituisca un compartimento nucleare non solo sede dei geni per l'RNA ribosomiale, e di fattori di trascrizione e maturazione del suddetto RNA, ma anche di complessi molecolari adibiti al trasporto dello stesso verso le sedi citoplasmatiche, attraverso proteine "navetta", che possono traslocare da e verso il nucleolo. Dati di letteratura descrivono un suo coinvolgimento nella maturazione e nel trasporto di alcuni mRNA e tRNA, e in numerose altre attività, come la regolazione del ciclo cellulare. È stato inoltre ipotizzato che, oltre a svolgere tali funzioni, il nucleolo possa rappresentare uno dei siti di elezione per la regolazione della trascrizione virale (il distretto perinucleolare è, peraltro, sede di molti fattori di trascrizione cellulari), per promuovere la replicazione virale o per modulare il ciclo cellulare. L'approfondimento delle conoscenze su processi di regolazione dell'espressione genica di HCMV, in particolare quelli che si realizzano a livello di compartimenti nucleari ad elevata specializzazione quali il nucleolo, è particolarmente rivolto alla delucidazione di meccanismi che possono interferire sullo svolgimento del normale programma di espressione genica nell'ambito del ciclo litico da HCMV e che potrebbero anche contribuire all'instaurarsi di uno stato di latenza.

### 3. INTRODUZIONE

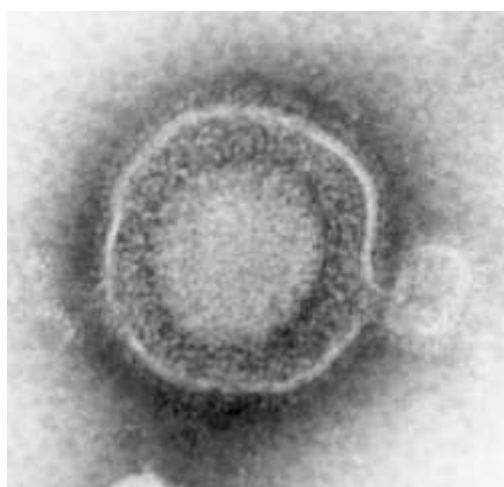
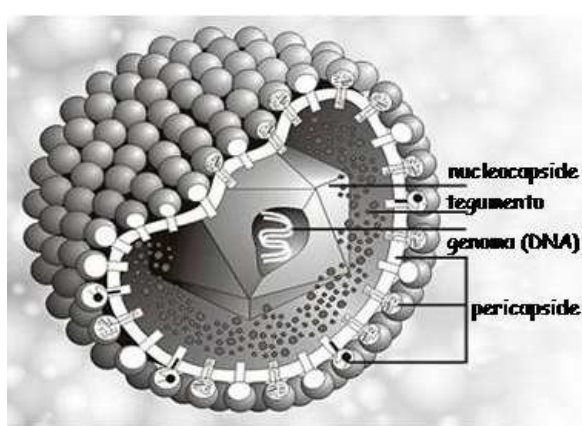
Citomegalovirus umano (HCMV o HHV5), appartenente alla famiglia *Herpesviridae*, sottofamiglia *Betaherpesvirinae*, possiede caratteristiche biologiche distintive, quali uno spiccato tropismo per le ghiandole salivari, uno spettro d'ospite ristretto ed una lenta crescita in coltura, che lo rendono il prototipo dei beta-herpesvirus [Mocarski and Courcelle, 2001]. Analogamente agli altri membri della famiglia cui appartiene, dopo l'infezione primaria HCMV può dare luogo ad un'infezione persistente o indurre uno stato di latenza, con possibilità di riattivarsi anche dopo molti anni, in seguito a stimoli diversi [Sissons et al., 2002; Malm and Engman, 2007]. Come altri beta-herpesvirus, HCMV esibisce un ristretto spettro d'ospite, con tropismo elettivo per le cellule umane quali sedi di infezione produttiva [Castillo and Kowalik, 2004]. HCMV è un patogeno ubiquitario in grado di causare infezioni, generalmente asintomatiche o paucisintomatiche e persistenti nella popolazione sana, ma anche capace di provocare gravi patologie in soggetti immunocompromessi o immunologicamente immaturi. Sebbene in tali pazienti la terapia antivirale abbia in alcuni casi marcatamente ridotto l'insorgenza di malattia, HCMV viene ancora oggi considerato uno tra gli agenti eziologici più importanti nell'indurre anomalie congenite e/o sequele neurologiche tardive nel bambino, come anche nel causare quadri patologici gravi sia in soggetti infettati da HIV sia in quelli sottoposti a trapianti d'organo [Pass, 2001; Vancikova and Dvorak, 2001; Weclawiak et al., 2008]. In generale, è possibile affermare che lo stato immunitario dell'ospite gioca un ruolo cruciale nel regolare gli esiti dell'infezione da HCMV. Tale agente è stato anche associato a malattie croniche degenerative, come arteriosclerosi, rigetto post-trapianto e a neoplasie [Cobbs et al., 2002; Michaelis et al., 2009]. Sebbene HCMV non sembri essere un virus oncogeno, esso esibisce la capacità di trasformare fibroblasti embrionali di topo e, in alcuni casi, di uomo [Geder et al., 1976; Boldogh and Vaczi, 1978; Cobbs et al., 2008; Maussang et al., 2009]. Inoltre, il rilevamento di DNA e antigeni di HCMV in biopsie da tessuti tumorali, così come l'elevato titolo anticorpale anti-HCMV di questi pazienti, suggeriscono una relazione tra il virus e alcune forme tumorali come il carcinoma della cervice, il cancro alla prostata e l'adenocarcinoma del colon [Maussang et al., 2006].

#### 3.1 Struttura del virione

Il virione maturo, di forma rotondeggiante e di diametro compreso tra i 150-250 nm, è costituito da: un involucro pericapsidico ("envelope"), formato da un doppio strato fosfolipidico tipico delle membrane cellulari, da cui sporgono diversi tipi di glicoproteine virus-specifiche; un nucleocapside icosaedrico di circa 100 nm di diametro, costituito da 162

capsomeri prismatici e, interposto tra quest'ultimo e l'"envelope", uno strato di materiale elettrondenso fibroso e granulare di natura proteica denominato tegumento (Figura 1).

I virioni presentano uno spiccato pleiomorfismo, dovuto non solo alla variabilità di spessore del tegumento, ma anche alla possibile presenza in cellule infettate di due tipi di particelle virali difettive: i "Dense Bodies" (DB) e i "Non Infectious Envelope Particles" (NIEP) [Sarov and Abady, 1975; Irmiere and Gibson, 1983; Gibson, 1996; Pepperl et al., 2000; Schierling et al., 2005]. I DB sono provvisti di un pericapside uguale a quello del virione maturo, ma privi sia di genoma virale, sia di struttura capsidica interna; i NIEP sono anch'essi privi del genoma, ma provvisti di capsid, tegumento e pericapside virale.



**Figura 1.** Citomegalovirus umano: rappresentazione schematica della struttura del virione e immagine acquisita al microscopio elettronico a trasmissione.

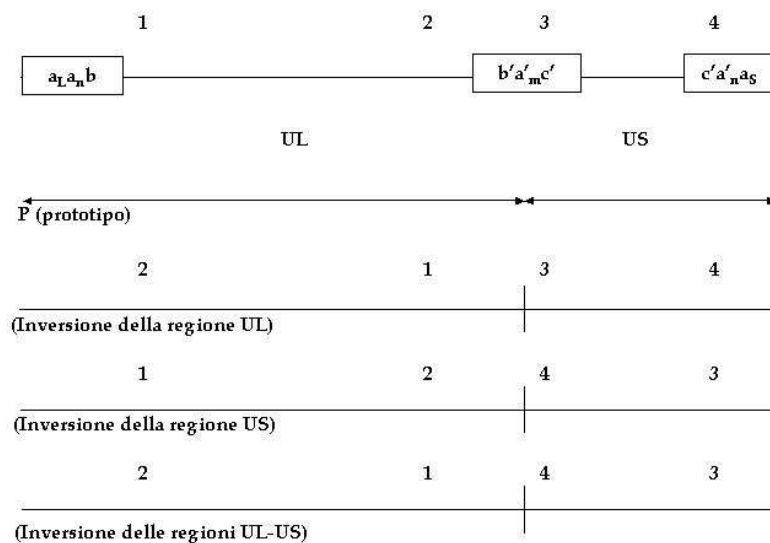
HCMV si replica *in vitro* in cellule fibroblastoidi con corredo cromosomico diploide provenienti dalla specie ospite naturale *in vivo*, mentre cellule indifferenziate, trasformate o aneuploidi non sono suscettibili all'infezione. D'altra parte, nell'infezione naturale non solo le cellule fibroblastoidi, ma anche una vasta gamma di tipi cellulari sono suscettibili all'infezione: cellule epiteliali, stromali, neuronali, epatiche, muscolari lisce, endoteliali e diverse tipologie di cellule effettrici della risposta immune, come cellule progenitrici della linea mieloide, cellule dendritiche, neutrofili, monociti e macrofagi [Sinzger et al., 1995; Pass, 2001; Arrode and Devrinche, 2003; Lunardi et al., 2005].

A differenza di altri herpesvirus, HCMV ha un ciclo replicativo assai lento (> 24 ore) e richiede un lungo periodo per indurre nelle cellule infettate un effetto citopatico con caratteristiche inclusioni nucleari e citoplasmatiche e morfologia allargata (citomegalia), alle quali deve il suo nome [Mokarski and Courcelle, 2001; Pass, 2001].

### 3.2 Il genoma virale

Come per tutti i membri della famiglia *Herpesviridae*, il genoma di citomegalovirus è costituito da un'unica molecola lineare di DNA a doppia elica, ma di dimensioni maggiori rispetto a quello degli altri herpesvirus.

Il genoma di HCMV, di lunghezza compresa tra i 200 e 240 Kpb e di peso molecolare di  $150-155 \times 10^6$  daltons, è formato da due sequenze nucleotidiche di lunghezza diversa, UL ("Unique Long") e US ("Unique Short"), fiancheggiate da brevi sequenze di basi ripetute e invertite, indicate rispettivamente come *b* (TRL/IRL: "Terminal Repeats Long/Internal Repeats Long") e *c* (IRS/TRS: "Internal Repeats Short/Terminal Repeats Short") che consentono l'organizzazione del genoma stesso in quattro forme isomeriche (Figura 2).



**Figura 2.** Rappresentazione schematica delle quattro forme isomeriche del genoma di HCMV.

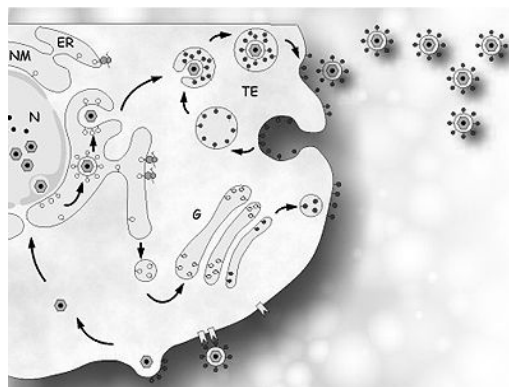
Una sequenza ripetuta, ma non invertita, denominata sequenza *a*, si colloca alle estremità della molecola di DNA. La stessa sequenza, ma con orientamento invertito, si trova localizzata anche nel punto di congiunzione tra le due sequenze UL ed US. Questa peculiare distribuzione della sequenza *a* promuove l'inversione genomica.

La sequenza *a* porta inoltre segnali di regolazione in *cis*, *pac-1* e *pac-2*, altamente conservati in tutti gli herpesvirus, per il taglio e l'incapsidamento del genoma virale [McVoy et al., 1998; Mocarski and Courcelle, 2001].

Il virione maturo di HCMV, a differenza di altri virus a DNA, contiene, oltre alla molecola di DNA genomico, due classi di molecole di RNA. Un tipo di RNA forma strutture ibride RNA-DNA all'interno dell'origine di replicazione litica *oriLyt*, che potrebbero facilitare la replicazione dello stesso DNA virale [Prichard et al., 1998; Xu et al., 2004]; la seconda classe

di trascritti sembra essere invece localizzata a livello del tegumento virale; la sua traduzione avverrebbe subito dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite. Le proteine codificate da questi RNA hanno funzione ancora poco conosciuta [Bresnahan and Shenk, 2000; Terhune et al., 2004].

### 3.3 Il ciclo litico di Citomegalovirus



**Figura 3.** Rappresentazione grafica del ciclo replicativo virale di HCMV. Immagine modificata da [www.virology.net/Big\\_Virology/BVDNAherpes.html](http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNAherpes.html) di Dr. Marko Reschke in Marburg, Germany.

Le conoscenze sugli eventi iniziali del ciclo di moltiplicazione virale di HCMV (Figura 3) sono a tutt'oggi ancora incomplete. L'attacco alla superficie cellulare è rapido ed efficiente, sia in cellule permissive, sia in cellule non permissive, suggerendo una vasta distribuzione dei recettori cellulari riconosciuti da HCMV. L'interazione tra virus e cellula ospite, come nel caso di altri herpesvirus, è mediato dal legame a bassa affinità degli antirecettori virali con le molecole di eparan-solfato dei proteoglicani di membrana [Compton et al., 1993; Boyle and Compton, 1998]. All'iniziale interazione con i residui di eparan-solfato seguono l'adsorbimento e la penetrazione mediate dalla fusione del pericapside virale con la membrana cellulare, processo che risulta indipendente dall'abbassamento del pH [Compton et al., 1993] e che, probabilmente, coinvolge in prima istanza il complesso glicoproteico virale gH-gL-gO [Keay and Baldwin, 1991; Theiler and Compton, 2001]. Mentre gli antirecettori virali sono rappresentati, con ogni probabilità, dalle glicoproteine gB e gH/gL [Kinzler and Compton, 2005], i recettori cellulari, sebbene abbondantemente espressi, sono scarsamente caratterizzati. Recentemente è stata dimostrata un'associazione delle glicoproteine gB e gH con le molecole "Toll-like receptor 2" (TLR-2) e "Toll-like receptor 1" (TLR-1), due recettori transmembrana la cui funzione è quella di mediare le fasi iniziali dell'immunità innata, ovvero attivare la cascata di eventi che culmina nell'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- $\kappa$ B e nella secrezione di citochine infiammatorie. L'associazione delle glicoproteine virali con TLR-2 e TLR-1 durante le fasi di attacco e penetrazione del virus

nella cellula ospite potrebbe rappresentare un notevole vantaggio temporale per la risposta immune dell'ospite contro l'infezione virale [Boehme et al., 2006].

Dopo l'adsorbimento, il nucleocapside virale si muove rapidamente verso il nucleo, dove il genoma circolarizzato grazie alla presenza delle strutture palindromiche alle sue estremità, come precedentemente descritto, viene trascritto dagli enzimi cellulari, quali l'RNA polimerasi II ed altri fattori che fanno parte del complesso apparato trascrizionale della cellula ospite [Fortunato and Spector, 1999; Mocarski and Courcelle, 2001]. Sempre a livello nucleare, il DNA replicato viene inserito nei capsidi preformati: in questo modo, le particelle sub-virali acquistano dimensioni tali da non potere abbandonare il nucleo se non attraverso la lamina nucleare, al fine di raggiungere la membrana nucleare interna. Questo processo richiede la depolimerizzazione della lamina nucleare stessa che, molto probabilmente, avviene per fosforilazione delle proteine che la compongono, in particolare in seguito all'attivazione di chinasi cellulari reclutate dal virus [Muranyi et al., 2002]. Durante la successiva fase di gemmazione attraverso la membrana nucleare interna verso lo spazio perinucleare, le particelle sub-virali acquisiscono alcune proteine del tegumento ed un pericapside primario che, fondendosi con la membrana nucleare esterna, permette il rilascio del nucleocapside nel citoplasma. I nucleocapsidi "nudi" raggiungono in seguito il reticolo endoplasmatico e, infine, l'apparato del Golgi, acquisendo addizionali proteine del tegumento ed il loro pericapside maturo. I virioni sono quindi trasportati verso la membrana citoplasmatica in vescicole derivate dall'apparato del Golgi e vengono liberati all'esterno della cellula ospite per esocitosi [Sanchez and Spector, 2002].

### **3.4 L'espressione genica virale nell'ambito del ciclo replicativo litico**

Durante l'infezione produttiva, l'espressione del genoma virale avviene in modo sequenziale e temporalmente regolato. Sulla base di questo criterio, possono essere identificate tre classi di geni virali, la cui espressione porta alla sintesi di tre categorie di prodotti proteici: proteine precocissime ("Immediate Early"/IE o  $\alpha$ ), precoci ("Early"/E o  $\beta$ ) e tardive ("late"/L o  $\gamma$ ).

La replicazione del DNA si situa temporalmente tra l'espressione dei geni  $\beta$  e quella dei geni  $\gamma$ . Il genoma di HCMV contiene, localizzata all'interno della regione UL, un'unica origine di replicazione *oriLyt*. In seguito alla circolarizzazione del DNA virale, la replicazione del genoma virale procede da *oriLyt* in modo bi-direzionale (modalità di replicazione "rolling-circle" o modello del cerchio rotante) [McVoy and Adler, 1994], ad opera della DNA polimerasi virus-specifica di tipo  $\alpha$ . L'espressione dei geni IE avviene immediatamente dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite ed è indipendente dall'espressione di altri geni virali.

L'espressione dei geni E, al contrario, dipende dall'espressione dei geni IE; alla stessa stregua, la successiva espressione dei geni L è dipendente dai geni E. La trascrizione dei geni virali dipende dall'enzima RNA polimerasi II cellulare e da altri fattori che fanno parte del complesso apparato trascrizionale della cellula ospite, cooptata dal virus durante l'infezione attraverso la produzione di transattivatori virus-specifici, in grado di modulare l'espressione sia dei geni virali, sia dei geni cellulari [Fortunato and Spector, 1999; Mocarski and Courcelle, 2001].

### **3.5 Le proteine virali**

#### *3.5.1 Le proteine precocissime ("immediate-early" o $\alpha$ )*

L'espressione genica relativa al ciclo di replicazione litico di HCMV prevede, come atto iniziale, la sintesi di un esiguo numero di proteine definite precocissime o "immediate-early" (IE) o  $\alpha$ , prodotte nell'ambito delle prime ore di infezione. Tali proteine vengono codificate dai due geni precocissimi maggiori ("Major Immediate-Early"/MIE) e da geni ausiliari, quali UL36-UL38, UL115-UL119, IRS1/TRS1 e US3; esse hanno un profondo impatto sulla fisiologia della cellula ospite, dovuto alla loro capacità di regolare l'espressione di numerosi geni cellulari [Fortunato and Spector, 1999; Petrik et al., 2006; Cosme et al., 2009].

Le proteine precocissime maggiori (MIE) IEp72 e IEp86 sono codificate, rispettivamente, dai geni IE UL123 (IE1) e UL122 (IE2), la cui espressione è regolata da un elemento modulatore - "enhancer", che è in grado di promuovere con elevata efficienza l'attività di trascrizione virale, anche attraverso l'interazione con fattori trascrizionali della cellula ospite quali NF- $\kappa$ B, AP-1, Sp1 e CREB/ATF [Boshart et al., 1985; Sun et al., 2001; Isomura et al., 2008; Stern et al., 2008], attivati dall'infezione stessa con HCMV. Le proteine IEp72 ed IEp86 sono accomunate da una breve sequenza aminoacidica codificata dall'esone 2 e dall'esone 3 della suddetta regione. Recentemente è stato attribuito alla sequenza dell'esone 3 un ruolo di spicco nell'ambito della regolazione della trascrizione, dell'espressione dei geni virali precoci e nella modulazione di proteine, quali ad esempio le cicline, direttamente coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare [White and Spector, 2005].

IEp86 rappresenta la più importante proteina con funzioni regolatorie codificata dal virus [Spector, 1996; Stenberg, 1996; Petrik et al., 2006]. Il ruolo più rilevante di questa proteina consiste nell'attivazione dell'espressione sia dei geni  $\beta$ , sia dei geni  $\gamma$ . Compito di IEp86 è, inoltre, quello di assicurare che l'espressione di tali geni, durante l'infezione, avvenga in modo sequenziale e temporalmente regolato [Fortunato and Spector, 1999; Stinski and Petrik, 2008], oltre che di garantire la repressione dell'espressione dei geni  $\alpha$  IE1/IE2 e US3, nelle

fasi tardive dell'infezione [Fortunato and Spector, 1999; Mocarski and Courcelle, 2001]. Questa proteina funziona quindi da attivatore trascrizionale, coadiuvata dal prodotto del gene IE1 che ne promuove ulteriormente l'attività.

Una funzione inedita è stata recentemente attribuita alla proteina IEp86, che risulta coinvolta nella regolazione dell'espressione dei geni che codificano per proteine che agiscono come mediatori e regolatori dell'immunità innata. In corso d'infezione virale, le cellule infettate sono in grado di rispondere al virus mediante l'attivazione di citochine pro-infiammatorie. In particolare, le prime citochine espresse e secrete in corso di infezione virale sono l'interferone  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) e l'interferone  $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), il cui scopo è quello di bloccare la replicazione del genoma virale in cellule infettate e nei tessuti circostanti. Le cellule infettate possono, inoltre, produrre chemochine, la cui funzione è quella di consentire la rimozione degli agenti virali mediante il richiamo di leucociti, di macrofagi, di cellule "Natural Killer" (NK) e di cellule T al sito di infezione, potenziando da un lato l'attività citotossica che caratterizza le cellule NK e T e, dall'altro, bloccando l'entrata degli agenti virali che riconoscono i recettori per le chemochine.

Numerosi dati di letteratura mettono in evidenza come HCMV regoli l'espressione dell'interferone  $\beta$  [Zhu et al., 1998; Browne et al., 2001; Browne and Shenk, 2003; Taylor and Bresnahan, 2005], di alcune chemochine, quali per esempio quelle definite come "regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted" (RANTES) [Zhu et al., 1998; Browne et al., 2001; Browne and Shenk, 2003; Abate et al., 2004; Gravel and Servant, 2005], di monociti indotti dall'interferone  $\gamma$  ("monokine induced by interferon- $\gamma$ " o MIG) [Browne et al., 2001; Browne and Shenk, 2003; Abate et al., 2004], delle proteine 1 e 2 di monociti chemiotattici (MCP-1 e -2) [Hirsch and Shenk, 1999; Browne and Shenk, 2003], della proteina  $1\alpha$  di macrofagi indotti dal processo infiammatorio (MIP- $1\alpha$ ) [Browne et al., 2001; Abate et al., 2004] e, infine, dell'interleuchina 8 [Craigien et al., 1997; Randolph-Habecker et al., 2002; Browne and Shenk, 2003]. L'espressione delle suddette proteine risulta particolarmente pronunciata quando l'espressione dei geni virali di HCMV è arrestata, facendo pertanto supporre che una o più proteine virali di nuova sintesi possano bloccare attivamente l'espressione di questi geni [Hirsch and Shenk, 1999; Browne et al., 2001]. Studi recenti hanno dimostrato che, in corso di infezione virale da HCMV, la proteina virale IEp86 è in grado di impedire l'induzione dell'interferone  $\beta$  [Taylor and Bresnahan, 2005], di intervenire nella soppressione dell'induzione trascrizionale delle citochine e, parallelamente, di causare un blocco dell'espressione dei geni che codificano per citochine e chemochine pro-infiammatorie [Taylor and Bresnahan, 2006].

IEp86 è inoltre coinvolta nel blocco del ciclo cellulare in fase G1/S [Jault et al., 1995; Lu and Shenk, 1996; Bresnahan et al., 1996; Dittmer and Mocarski, 1997; Salvant et al., 1998; Sanchez and Spector, 2008], con conseguente blocco della sintesi di DNA cellulare. Questo evento crea un ambiente favorevole alla replicazione del virus che può così sfruttare a proprio vantaggio il corredo enzimatico e l'apparato biosintetico della cellula ospite [Fortunato et al., 2000; Kalejta and Shenk, 2002].

Per quanto concerne la proteina IEp72, è da sottolineare che non solo essa è in grado di cooperare con la proteina IEp86, ma anche di regolare direttamente l'espressione dei geni IE1/IE2, oltre a quella del gene US3 [Mocarski et al., 1996; Meier and Pruessner, 2000]. Inoltre, IEp72 è coinvolta in numerosi processi cellulari quali, ad esempio: regolazione genica, progressione del ciclo cellulare, trasduzione dei segnali, dispersione dei "PML oncogenic domains" (PODs o "nuclear dots"/ND10) e apoptosi [Zhu et al., 1995; Ahn. and Hayward, 1997; Muller and Dejean, 1999; McElroy et al., 2000].

Nell'ambito dell'espressione dei geni  $\alpha$  ausiliari, sono da evidenziare i diversi prodotti di "splicing" codificati dal gene US3, che hanno caratteristiche di glicoproteine integrali di membrana e risultano coinvolti nella diminuita espressione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC di classe I), ostacolandone sia il trasporto intracellulare, sia la maturazione [Stasiak and Mocarski, 1992; Jones et al., 1996; Liu et al., 2002]. Il gene US3 rappresenta il primo gene virale trascritto subito dopo l'inizio dell'infezione; esso contribuisce, insieme a numerose altre strategie attuate da HCMV, all'evasione del virus nei confronti della risposta immunitaria [Liu et al., 2002, 2009; Misaghi et al., 2004].

### 3.5.2 Le proteine precoci ("Early" o $\beta$ )

Il gruppo dei geni precoci codifica per proteine non strutturali, tra cui enzimi coinvolti nella replicazione del DNA virale (UL112/113, UL54, UL44), enzimi di riparazione dell'acido nucleico e proteine che concorrono ad eludere i meccanismi di difesa del sistema immunitario cellulare (US2, US11, US27, US28) [Mocarski and Courcelle, 2001].

In particolare, le proteine codificate dai geni UL112/UL113 si legano al DNA virale e contribuiscono alla formazione dei centri di replicazione per l'enzima DNA polimerasi (UL54), riscontrabili nel distretto nucleare in corso di infezione produttiva [Mocarski and Courcelle, 2001].

Le glicoproteine codificate dai geni US2 e US11 mediano invece l'evasione del virus dal sistema immune, legandosi alle catene pesanti delle molecole MHC di classe I e

trasportandole nel citoplasma dove vengono degradate dal proteosoma [Story et al., 1999; Chevalier et al., 2002; Chevalier and Johnson, 2003].

La stessa funzione è svolta, mediante un meccanismo differente, dalle proteine codificate dai geni US27 e US28, omologhe a recettori per specifiche chemochine. [Chee et al., 1990; Michelson, 2004]. In particolare US28, omologo del recettore per RANTES ed MCP-1, agisce sequestrando tali chemochine ed eludendo la risposta cellulo-mediata da esse attivata: in questo modo viene evitata l'eliminazione di cellule infettate da HCMV [Gao and Murphy, 1994; Bodaghi et al., 1998; Michelson, 2004].

### 3.5.3 Le proteine tardive ("Late" o $\gamma$ )

Il complesso dei geni tardivi, trascritti dopo la replicazione del DNA virale, codifica per le proteine strutturali che andranno a comporre il capside, il tegumento ed il pericapside delle particelle virali.

Il capside virale è composto da sette tipi di proteine diverse: "Major Capsid Protein" (MCP), che rappresenta il principale componente dei pentoni ed esoni capsidici, "Minor Capsid Protein" (mCP), "Minor Capsid Binding Protein" (mC-BP), "Smallest Capsid Protein" (SCP) ed infine, tre distinte proteine che svolgono funzioni diverse nella costruzione del capside stesso. Nell'ambito di queste ultime, la più rappresentata è la proteina "Assembly Protein" (AP), che deriva dalla scissione proteolitica del suo precursore, operata da una proteina virale con attività proteasica, detta assemblina [Welch et al., 1991]. La proteina AP è presente solo nei capsidi virali privi di DNA (NIEP) e non nelle particelle virali mature contenenti l'acido nucleico [Robson and Gibson, 1989]; questo depone per un coinvolgimento attivo della stessa proteina nel processo di incapsidamento del DNA virale.

Il tegumento, o matrice, è costituito da 25 tipi diversi di proteine fosforilate, come sottolineato dal prefisso *pp* ("phosphoprotein") che le contraddistingue; tali proteine sono altamente immunogene. Le più rappresentate sono: ppUL83 (pp65), ppUL32 (pp150), ppUL99 (pp28), ppUL82 (pp71) e ppUL48 ("huge tegument protein") [Bradshaw et al., 1994; Gibson, 1996]. La funzione della maggior parte delle proteine che compongono il tegumento rimane ignota; è stato ipotizzato che molte di esse siano coinvolte nella regolazione dell'espressione genica come transattivatori trascrizionali [Liu and Stinski, 1992; Winkler et al., 1995; Romanowski et al., 1997].

Le due proteine del tegumento pp150 ("Basic Phosphoprotein" o BPP) e pp65 ("Lower Matrix Protein" o LMP), rappresentano le proteine più abbondantemente prodotte durante la

replicazione virale. Nel loro insieme, le due proteine costituiscono il 35% dell'intera massa proteica del virione.

Già nell'ambito della prima ora di infezione la proteina pp65 del virus "parentale" viene velocemente traslocata verso il nucleo cellulare, grazie a specifici segnali di localizzazione nucleare [Gallina et al., 1996; Giesen et al., 2000; Nguyen et al., 2008] e manifesta un significativo accumulo a livello nucleolare, visibile anche a tempi più tardivi, per il virus neoformato [Arcangeletti et al., 2003; 2009]. Tali segnali sono costituiti da brevi sequenze di amminoacidi basici denominate sequenze di localizzazione nucleare o "NLS" [Gallina et al., 1996; Giesen et al., 2000; Nguyen et al., 2008]. E' stato ipotizzato che queste sequenze vengano riconosciute, probabilmente a livello citoplasmatico, da proteine con funzione recettoriale che si legano ad esse trasportandole verso il poro nucleare. In questo processo, le nucleoporine svolgono un ruolo primario, riconoscendo le sequenze "NLS" insieme alle proteine recettoriali a cui sono legate e consentendone il passaggio attraverso il poro nucleare. La proteina pp65 contiene due "NLS", funzionalmente e strutturalmente distinte, localizzate entrambe all'estremità carbossi-terminale della proteina, ed una sequenza addizionale che ne garantiscono un efficace trasferimento in sede nucleare. L'accentuato tropismo nucleare di pp65 a tempi precocissimi dopo l'infezione, unitamente ad una dimostrata attività protein-chinasica, la rendono candidata ideale quale fattore di regolazione dell'espressione genica virale [Gallina et al., 1999]. Contrariamente alle proteine codificate dalla regione US che stimolano la risposta immune interagendo con il complesso MHC di classe I, pp65 sembra influenzare l'attività di specifici linfociti T citotossici (CTL), regolando altri antigeni virali come, ad esempio, la proteina IEp72 (IE1) di HCMV. Nelle fasi precoci dell'infezione virale, infatti, si assiste ad una forte risposta mediata da CTL nei confronti delle proteine precocissime IE1. Sebbene non sia ancora del tutto chiarito la modalità con cui pp65 possa ridurre l'attività di CTL verso IEp72, appare verosimile che attraverso un processo di fosforilazione possa interferire con i meccanismi di processamento e/o degradazione degli antigeni IE1 [Gilbert et al., 1996]. L'attività protein-chinasica mostrata dalla proteina pp65 potrebbe essere dovuta alla sua interazione con una chinasi di derivazione cellulare [Roby and Gibson, 1986; Gallina et al., 1999]. Di particolare rilevanza è la dimostrazione di un'associazione della proteina pp65 ai cromosomi della cellula infettata durante la metafase. Il significato di tale associazione resta ancora da indagare, ma potrebbe essere collegato alla capacità di HCMV di indurre aberrazioni cromosomiche [Dal Monte et al., 1996a; Fortunato et al., 2000].

Oltre a un putativo ruolo di pp65 nella regolazione della replicazione e dell'espressione genica virale, tale proteina è in grado di indurre una inibizione parziale dell'espressione di IFN  $\beta$  e di alcune chemochine in corso di infezione virale, mentre essa non sembra essere coinvolta nella regolazione delle citochine pro-infiammatorie, a differenza di quanto osservato per la proteina IEp86 [Browne and Shenk, 2003; Abate et al., 2004; Taylor and Bresnahan, 2006].

Un'altra abbondante fosfoproteina del tegumento è la proteina pp71 ("Upper Matrix Protein" o UMP), che costituisce un'importante transattivatore trascrizionale, in grado di attivare l'espressione del locus IE1/IE2 [Nicholson et al., 2009].

Il pericapside virale è formato, come già accennato, da un doppio strato lipidico, tipico delle membrane cellulari, in cui sono inseriti complessi glicoproteici virus-specifici, che svolgono funzioni di rilievo in diversi processi, quali l'ingresso del virus nella cellula ospite o, ancora, la risposta immunitaria, in quanto siti di legame per gli anticorpi neutralizzanti. In particolare, sono due i principali complessi glicoproteici conservati in tutti i sottogruppi (*Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae*, *Gammaherpesvirinae*) della famiglia *Herpesviridae* [Britt and Mach, 1996]. Uno di questi complessi viene codificato dal gene gB. Il gene gB viene trascritto in un mRNA codificante per una proteina che, dopo glicosilazione e trasporto nell'apparato del Golgi, subisce un taglio endoproteolitico che dà luogo ad un dimerico della glicoproteina B (gB). Il secondo complesso glicoproteico è formato dai prodotti di tre geni distinti: gH, gL e gO. Il genoma di HCMV codifica, inoltre, per numerose proteine con caratteristiche tipiche delle proteine transmembrinarie, come la proteina "integrate membrane protein" [Lehner et al., 1989], che potrebbero rappresentare costituenti minori del pericapside virale ed essere coinvolte nelle fasi di attacco e di ingresso del virus nella cellula ospite.

### **3.6 HCMV e la cellula ospite**

Nonostante gli eventi biochimici che hanno luogo in corso di infezione da virus a DNA, in particolare da virus erpetici, siano stati studiati approfonditamente, alcuni degli aspetti molecolari del ciclo litico di HCMV non sono ancora noti, soprattutto quelli inerenti all'organizzazione spaziale e funzionale dei componenti virali nell'ambito della cellula infettata. È ormai noto che le strategie adottate dai virus per replicare ed esprimere il proprio corredo genico prevedono di cooptare apparati enzimatici e percorsi metabolici della cellula ospite e di integrarsi, dal punto di vista spaziale, in strutture preesistenti, sedi di processi metabolici cruciali. Per quel che riguarda la situazione *in vivo*, si sottolinea come HCMV sia

in grado di infettare anche cellule quiescenti, ossia cellule che dispongono di una ridotta quantità di desossiribonucleotidi e cofattori che possano essere cooptati dal virus per la replicazione del proprio DNA. Apparentemente, la mancanza di “costituenti della fase S” rappresenta una condizione sfavorevole per la riproduzione virale, pertanto appare evidente l’importanza, per HCMV, di sviluppare strategie volte alla modulazione del ciclo cellulare [Castillo and Kowalik, 2002]. In effetti, durante l’infezione sostenuta da HCMV si assiste ad un aumento dell’attività trascrizionale e traduzionale della cellula ospite [Jeor et al., 1974; Tanaka et al., 1975; Jarskaja et al., 2002].

Dopo l’ingresso del virus nella cellula infettata, proteine virali con funzione regolatoria, come la proteina IEp72, entrano in gioco modulando positivamente o negativamente l’espressione genica cellulare [Meier and Pruessner, 2000]. Un’efficiente replicazione virale dipende dall’espressione di particolari geni cellulari, tra i quali i seguenti prodotti genici: enzimi coinvolti nel metabolismo del DNA cellulare, DNA polimerasi  $\alpha$  e “proliferating cell nuclear antigen” (“PCNA”) [Dittmer and Mocarski, 1997]; funzioni del ciclo cellulare, ciclina E, ciclina B, pRB e p53 [Jault et al., 1995; Hwang et al., 2009]; fattori trascrizionali, alcuni dei quali (o forse tutti) richiedono prodotti genici virali per essere adeguatamente indotti [Yurochko et al., 1997]. Nonostante l’espressione di un insieme di geni della cellula ospite, i cui prodotti permetterebbero, in linea di principio, la progressione del ciclo cellulare, l’infezione produttiva delle cellule permissive non porta né alla sintesi di DNA cellulare, né alla divisione cellulare. In cellule permissive, HCMV inibisce la sintesi del DNA cellulare e la progressione del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S [Bresnahan et al., 1996; Lu and Shenk, 1996; Sanchez and Spector, 2008]. Sebbene venga descritto “l’arresto in fase G1” delle cellule infettate, dal punto di vista biochimico la cellula ospite manifesta tutti i marcatori dell’ingresso in fase G1/S, incluse le proteine Rb iperfosforilate, elevati livelli di attività chinasi delle cicline E e A ed elevata attività trascrizionale del fattore E2F, nonché l’espressione di molti geni propri della fase S come la diidrofolato reduttasi (DHFR), la DNA polimerasi alfa, gli antigeni di proliferazione cellulare nucleare (PCNA) e la topoisomerasi II [Bresnahan et al., 1996; Dittmer et al., 1997; Johnson et al., 1993].

Due proteine virali potrebbero essere coinvolte nell’arresto del ciclo cellulare da G1 ad S, la proteina del tegumento ppUL69 e la proteina regolatoria IEp86. In particolare, per quel che riguarda IEp86, la regolazione del ciclo cellulare avverrebbe per interazione diretta con diverse proteine regolatorie del ciclo cellulare, quali p53 [Tsai et al., 1996], pRB [Hagemeier et al., 1994] e p21<sup>cip1</sup> [Sinclair et al., 2000].

La capacità di HCMV di stimolare il metabolismo della cellula ospite potrebbe correlare con un coinvolgimento del virus nello sviluppo di diverse malattie proliferative e croniche, quali neoplasie [Rosenthal and Choudhury, 1993] e malattie vascolari (aterosclerosi e stenosi dopo angioplastica) [Streblow et al., 2008].

### 3.6.1 *Il nucleo*

Il nucleo cellulare, la prima struttura intracellulare ad essere stata scoperta, originariamente descritto da Franz Bauer nel 1802 e poi reso popolare da Robert Brown, è un organello circondato da membrana che contiene il genoma e i complessi proteico-enzimatici essenziali per la sua espressione. Diversi studi hanno identificato un numero crescente di domini specializzati o organelli subnucleari nel nucleo, quali "Cajal bodies" (CBs), "Gems", PML, "Cleavage bodies", nucleolo con compartimento perinucleolare (PNC) e "Splicing speckles" [Spector, 1993; Lamond and Ernshaw, 1998; Spector, 2001]. Queste strutture sono caratterizzate dall'assenza di una membrana, ma devono essere considerati "compartimenti" per diverse ragioni. Innanzitutto contengono una ben definita serie di proteine residenti; secondariamente, possono essere identificati morfologicamente per mezzo del microscopio ottico ed elettronico; infine, alcuni dei suddetti compartimenti possono essere isolati biochimicamente. In alcuni casi, inoltre, questi domini hanno mostrato di essere strutture dinamiche e costantemente coinvolte in rapidi scambi proteici con il nucleoplasma [Misteli, 2000; Dundr and Misteli, 2001; Spector, 2001].

### 3.6.2 *L'involucro nucleare*

L'involucro nucleare è costituito da due membrane (ciascuna con spessore di 6,5 nm) separate da uno spazio di 10-30 nm, in cui la superficie rivolta verso il nucleoplasma è rivestita da uno strato proteico fibroso più o meno denso dello spessore di circa 100 nm, denominata lamina nucleare, probabilmente derivante da filamenti intermedi del citoscheletro. Si suppone che tale lamina rivesta un ruolo nel "legare" la cromatina all'involucro. La superficie della membrana esterna rivolta verso il citosol è cosparsa di ribosomi, talora in intensa attività di sintesi. Lo spazio intermembrana (perinucleare) è in continuità con il lume del reticolo endoplasmatico (RE) rugoso; in definitiva, l'involucro nucleare potrebbe essere inteso come se fosse costituito dal RE. La continuità tra involucro nucleare e RE, e tra RE di cellule adiacenti, mediante i plasmodesmi, permette la comunicazione fra nuclei di cellule diverse e la sincronizzazione di alcuni eventi.

L'involucro nucleare è inoltre cosparso di numerose aperture, denominate pori nucleari, che hanno una densità variabile, ma in media occupano circa il 5% della superficie. La struttura dei pori è complessa: il bordo (anello) è rialzato e presenta 8 "granuli del complesso del poro" i quali si collegano ad un granulo centrale tramite una spicola o filamento radiale; i granuli sono costituiti essenzialmente da RNA ed il granulo centrale potrebbe rappresentare RNA o particelle ribonucleoproteiche nell'atto di uscire dal nucleo. Il diametro esterno di ciascun poro è di circa 100 nm. L'involucro nucleare si dissolve durante la mitosi.

### 3.6.3 *Il nucleoplasma*

Il nucleoplasma contiene DNA, proteine e RNA in rapporto di massa 1:3:0,5. Il DNA è il principale costituente della cromatina, la quale deriva il proprio nome dall'intensa colorabilità con coloranti specifici per gli acidi nucleici. Nella cromatina, il DNA è associato ad istoni, proteine basiche, ricche di lisina o arginina, con carica positiva, che "tamponano" l'acidità del DNA stesso. Altre proteine non istoniche sono presenti nel nucleoplasma ed alcune di esse hanno il compito di "compattare" il DNA. Nella maggior parte dei casi, la lunghezza notevole del DNA porta alla necessità di un suo compattamento all'interno del nucleo: ciò viene attuato grazie alla particolare configurazione della cromatina. Se isolata e distesa, la cromatina presenta granuli collegati fra loro da un sottile filo, i nucleosomi, che rappresentano il primo stadio di compattamento del DNA: ognuno di essi è costituito da 4 coppie di istoni diversi attorno ai quali è avvolto il DNA (come un filo su un rocchetto) ed è collegato, a distanza costante, ad un altro nucleosoma tramite un tratto di DNA (DNAlinker), con un aspetto simile ad una "collana di perle". Il DNA è associato agli istoni elettrostaticamente come un polianione ad un policatione. La configurazione del nucleosoma ostacola la trascrizione del tratto di DNA interessato, pertanto dal nucleosoma si libera, di volta in volta e per un breve momento, quel tratto di DNA interessato alla trascrizione. Lo spessore del filamento o fibrilla di cromatina distesa è di circa 11 nm, ma nel ciclo cellulare si susseguono avvenimenti che portano ad un maggior compattamento della cromatina sino ad arrivare alla formazione dei cromosomi metafasici (che rappresentano la forma di trasporto della cromatina): i nucleosomi si addensano, così che lo spessore raggiunge i 30 nm, poi i filamenti di DNA ed istoni si ripiegano e si avvolgono più volte passando a stadi di spessore progressivamente maggiore (300, 700 ed infine 1400 nm). I cromosomi appaiono come strutture a bastoncino, nelle quali si distinguono i cromatidi appaiati, i bracci, il centromero ed eventuali satelliti.

#### 3.6.4 *La matrice nucleare*

La matrice nucleare è rappresentata da un reticolo di fibrille, una intelaiatura che mantiene la forma del nucleo; essa contiene circa il 20% delle proteine nucleari, ma non gli istoni. Alla matrice nucleare è ancorato gran parte del DNA nucleare, che è normalmente organizzato in anse ("loops") durante la trascrizione. La matrice nucleare ha pertanto un ruolo importante nella regolazione della trascrizione, e della replicazione, esercitato, forse, attraverso particolari siti di collegamento con il DNA (MARS, "Matrix Attachment Regions").

#### 3.6.5 *Il nucleolo*

Uno dei compartimenti funzionali più importanti del nucleo è rappresentato dal nucleolo il quale, sebbene non separato da membrane, viene considerato una specifica struttura intranucleare visualizzabile in contrasto di fase nelle cellule in interfase, presente in numero variabile e costituito da differenti proteine. Nelle cellule in attiva divisione, i nucleoli vengono assemblati alla fine del processo mitotico e sono funzionalmente attivi durante l'interfase, mentre vengono disassemblati all'inizio di una nuova fase mitotica [Verdun et al., 2010]. Il nucleolo costituisce una regione plurifunzionale che, oltre ad essere sede delle diverse fasi della biogenesi dei ribosomi (i.e., trascrizione/processamento rDNA; maturazione/processamento rRNA e assemblaggio di rRNA con le proteine ribosomiali), è implicato in numerosi altri processi vitali per la cellula eucariota, come la maturazione e trasporto di mRNA verso le sedi citoplasmatiche attraverso proteine "navetta", il controllo del ciclo cellulare, la proliferazione e l'apoptosi [Pederson, 1998a; Boisvert et al., 2007; Pederson and Tsai, 2009; Verdun et al., 2010]. Inoltre, molteplici dati di letteratura ne attestano la rilevanza anche nell'ambito del ciclo replicativo di numerosi virus a DNA ed a RNA [Matthews, 2000; Michienzi et al., 2006; Shimakami et al., 2006; Boyne and Whitehouse, 2006; Callé et al., 2008; Sirri et al., 2008; Sonntag et al., 2010]. La maggior parte delle cellule di mammifero contiene da 1 a 5 nucleoli, ciascuno con un diametro compreso tra 0,5 e 5,0  $\mu\text{m}$  [Spector, 2001], assemblati attorno ad un gruppo di geni ribosomiali ripetuti in tandem ("rDNA genes", approssimativamente 250 copie/cellula), trascritti dall'RNA polimerasi I [Scheer and Hock, 1999; Carmo-Fonseca et al., 2000] in rRNA e successivamente assemblati in particelle pre-ribosomiali. Nel nucleolo si conoscono tre regioni morfologicamente distinte, che riflettono le fasi di biogenesi dei ribosomi: i centri fibrillari (FC), generalmente abbondanti in cellule con un'alta frequenza di produzione dei ribosomi [Sirri et al., 2008], i componenti fibrillari densi (DFC), che circondano i centri FC, e i componenti granulari (GC), costituiti da particelle pre-ribosomiali a differenti stadi di maturazione e piccole

ribonucleoproteine (snoRNP) [Spector, 2001], che si distribuiscono radialmente rispetto ai DFC [Dundr and Misteli, 2001; Boisvert et al., 2007]. I differenti fattori proteici che compongono questo dominio, quali nucleolina (C23, circa il 10% delle proteine nucleolari totali), fibrillarina, spectrina, nucleofosmina (B23), UBF (“Upstream Binding Factor”), RNA polimerasi I e proteine ribosomiali si associano all’rDNA, costituendo le regioni di organizzazione nucleolare (NOR) [Fatica and Tollervey, 2002; Hiscox, 2002]. Inoltre, la loro organizzazione e dimensione riflette il livello di biogenesi dei ribosomi, ovvero è correlata direttamente alla produzione dei ribosomi [Verdun et al., 2010].

Recenti studi di proteomica hanno stimato la presenza di 700 proteine localizzate nel compartimento nucleolare [Andersen et al., 2002, 2005; Leung et al., 2003; Wang et al., 2010] verosimilmente grazie alla presenza di sequenze (o segnali) di localizzazione nucleolare (NoLS), sebbene queste non siano ben caratterizzate, rispetto alle sequenze di localizzazione nucleare (NLS).

Le molteplici funzioni del nucleolo sono anche supportate dal fatto che solo il 39% delle sue proteine sono proteine ribosomiali, o che partecipano alla biogenesi dei ribosomi [Scherl et al., 2002]. Le più abbondanti e ben caratterizzate proteine del nucleolo sono nucleolina (C23), fibrillarina, nucleofosmina (B23) e UBF (“Upstream Binding Factor”).

- Nucleolina è stata per la prima volta rilevata all’inizio del 1970 da Orrick e collaboratori nel laboratorio di Harris Busch durante il confronto di proteine isolate dal nucleolo di cellule provenienti da un’epatoma, rispetto a cellule normali [Ginisty et al., 1999]. È una proteina di circa 100-110 kDa, costituita da tre regioni con struttura e funzione differente chiamate domini N-terminale, centrale e C-terminale [Ginisty et al., 1999, Hanakahi et al., 2000]. È altamente fosforilata e metilata, e può essere anche ADP-ribosilata [Pellar and Dimario, 2003]; inoltre, possiede la potenziale capacità di legame all’RNA in regioni bersaglio: questo potrebbe riflettere la grande varietà di funzioni ad essa associate, tra le quali la principale è il coinvolgimento nella fase di taglio dell’rRNA in presenza di U3 snoRNP. D’altra parte, nucleolina potrebbe funzionare come “chaperone” per il corretto ripiegamento del pre-rRNA nelle fasi di processamento dello stesso. È nota, infatti, la sua partecipazione al processamento dell’rRNA in associazione con altre proteine (B23, fibrillarina), formando un complesso proteico che, in seguito all’inibizione della sintesi dell’RNA, viene rilocalizzato nel nucleoplasma. Tale rilocalizzazione potrebbe essere legata al ruolo di nucleolina come proteina “shuttle” tra il nucleolo e il nucleoplasma [Chen and Huang, 2001], grazie alla sua fosforilazione e defosforilazione, influenzando in tal modo la biogenesi dei ribosomi [Learly and Huang, 2001]. Infine, questa proteina sembra essere implicata nella repressione della

trascrizione dell'rDNA, legandosi al pre-rRNA nascente e bloccando l'azione della RNA polimerasi I [Roger et al., 2001].

- Fibrillarina, è una proteina nucleolare di circa 35 kDa, altamente conservata negli eucarioti. Essa è direttamente coinvolta in differenti processi post-trascrizionali, inclusi il processamento del pre-rRNA, la sua metilazione e l'assemblaggio dei ribosomi in seguito all'interazione dei "prenuclear bodies" (PNBs) [Lafontaine and Tollervey, 2000; Newton et al., 2003]. Inoltre la sua inibizione determina l'arresto della crescita cellulare [Amin et al., 2007].

- Nucleofosmina (anche chiamata B23 o NPM), è una proteina plurifunzionale, altamente espressa nelle cellule tumorali e in attiva proliferazione [Pianta et al., 2010]. D'altra parte, nucleofosmina è "down"-regolata in cellule indotte al differenziamento o all'apoptosi [Patterson et al., 1995]. È variamente distribuita nelle differenti specie, approssimativamente con la stessa massa di 35-40 kDa. Analogamente a C23 e fibrillarina, essa mostra molte funzioni ed è implicata nell'assemblaggio dei ribosomi, nel legame con altre proteine nucleolari, nel trasporto alla regione nucleoplasmatica, nel mediare modificazioni strutturali della cromatina responsabili della regolazione della trascrizione dell'rDNA, nella progressione del ciclo cellulare e nella risposta agli stress, agendo come regolatore negativo della proteina p53 [Li et al., 2006].

- I centri fibrillari del nucleolo sono ricchi di RNA polimerasi I e di UBF, un complesso proteico ad alta mobilità ("high mobility group", HMB - box) che riveste un ruolo chiave nelle fasi iniziali della sintesi dell'rRNA, presumibilmente agevolando il legame dei fattori proteici richiesti al promotore dell'rDNA [Jansen et al., 1991].

### **3.7 Il nucleolo e il ciclo cellulare**

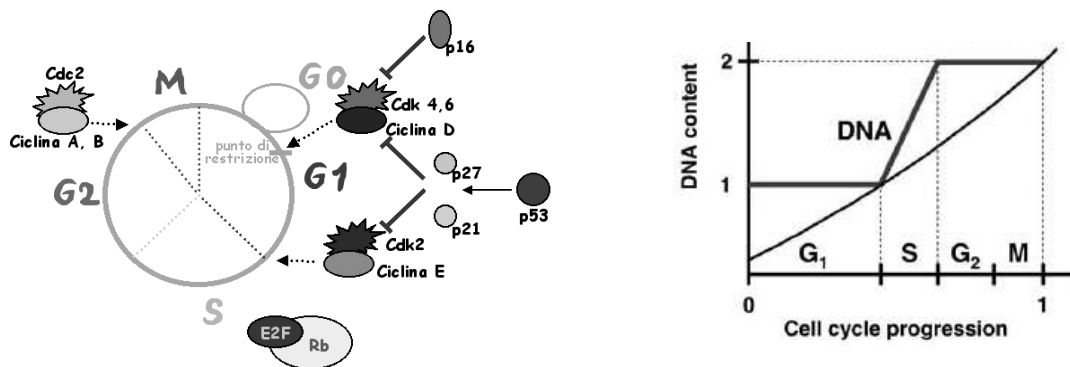
Il nucleolo e le proteine ad esso associate sono anche implicate, come precedentemente accennato, nella regolazione del ciclo cellulare [Sirri et al., 2008; Wang et al., 2010], infatti durante l'interfase, nella maggior parte delle cellule eucariote, il numero dei nucleoli varia dipendentemente dalla fase del ciclo cellulare e inoltre, essi scompaiono durante la mitosi [Boisvert et al., 2007; Verdun et al., 2010].

Il ciclo cellulare si articola principalmente in quattro fasi (Figura 4): nel corso della prima (fase G1; quantità di DNA 2N), la cellula svolge le sue normali funzioni metaboliche, cresce in volume e sintetizza le diverse molecole (tra cui numerosi enzimi) necessarie per la fase successiva (fase S), che è quella più impegnativa dal punto di vista energetico. In questa fase viene duplicato il DNA cellulare, così come tutte le altre strutture cellulari. Terminata la fase

S, la cellula intraprende una ulteriore fase di preparazione (fase G<sub>2</sub>, quantità di DNA 4N), in cui si ha il controllo quantitativo e qualitativo dell'avvenuta duplicazione del DNA e vengono prodotte proteine attive nella successiva mitosi (fase M, composta a sua volta da profase, metafase, anafase, telofase e citochinesi).

Ognuna delle fasi del ciclo cellulare è caratterizzata da numerosi eventi che si susseguono in maniera estremamente ordinata, grazie ad elaborati meccanismi di regolazione che ne controllano l'evoluzione. Un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare è svolto dalla fosforilazione e defosforilazione di substrati proteici da parte di specifiche chinasi (tra cui, soprattutto, le serina-treonina chinasi ciclina-dipendenti, o cdk) e a tale riguardo, vi sono dati che avvalorano l'ipotesi di un diretto coinvolgimento del nucleolo [Visintin and Amon, 2000; Ugrinova et al., 2007] mediante il sequestro, in sede nucleolare, di specifiche proteine in modo tale da renderle disponibili solo durante precise fasi del ciclo cellulare. Ad esempio, la trascrizione dell'rDNA è massima durante la fase S e G<sub>2</sub>/M, silente durante la mitosi e debolmente riavviata in fase G<sub>1</sub>. Queste modificazioni dipendono dallo stato di fosforilazione/defosforilazione delle componenti proteiche associate all'RNA pol I (come UBF) e quindi alla variazione di attività e interazione di queste proteine, che possono così modulare la trascrizione dei geni ribosomiali durante il ciclo cellulare [Verdun, 2006a].

L'attività delle chinasi è a sua volta soggetta ad una serie di complessi meccanismi di controllo. Le subunità catalitiche cdk si legano a specifiche proteine a funzione regolatoria denominate cicline (A, B, D ed E), per formare un complesso attivo ciclina-cdk. La formazione, l'attivazione ed il disassemblaggio del complesso ciclina-cdk rappresentano gli eventi pilota che guidano la cellula attraverso il ciclo cellulare, compresi i relativi punti di regolazione o "restriction points", in cui viene "vagliata", a livello molecolare, la possibilità di proseguire alla successiva fase del ciclo cellulare.



**Figura 4.** Le fasi del ciclo cellulare e relativi punti di regolazione (frecce tratteggiate) (immagine ottenuta dal sito internet: [www.users.unimi.it](http://www.users.unimi.it)).

Per quel che riguarda, in particolare, gli eventi salienti che caratterizzano la fase G1 e la transizione G1/S, così come l'eventuale ruolo del nucleolo nei suddetti periodi, occorre innanzitutto ricordare che le cicline e relative chinasi coinvolte sono la D (con le chinasi cdk 4 e 6) e la E (con cdk2), quest'ultima implicata soprattutto nel passaggio alla fase S. Bersagli noti ed importanti delle chinasi cdk G1-specifiche sono la famiglia di proteine multifunzionali soppressori di tumore appartenenti al gruppo "retinoblastoma" (Rb), quali pRb, p107 e p130, che fungono da regolatori negativi del complesso eterodimerico di fattori di trascrizione E2F-DP. Nello specifico, il gruppo di proteine Rb funge da interruttore molecolare sulla repressione/attivazione di E2F attraverso il suo stato di fosforilazione: in forma ipofosforilata, Rb rimane legata ad E2F, che è inattivo, mentre la iperfosforilazione di Rb (che avviene in tarda fase G1 principalmente ad opera di cdk 2, 4 e 6) porta al rilascio di E2F (nella forma di eterodimero E2F-DP), che a sua volta agisce attivando la trascrizione di geni che codificano per le proteine a funzione enzimatica da utilizzare in fase S, quali DNA polimerasi alfa, timidina chinasi, diidrofolato reduttasi [Bain and Sinclair, 2007]. Per quel che riguarda il ruolo del nucleolo durante G1 e G1/S, è stata descritta una associazione tra Rb e nucleolina, una delle più abbondanti proteine nucleolari con proprietà di legame con il DNA e di regolazione della trascrizione di RNA. La suddetta associazione è descritta, in fase G1 precoce, con la forma ipofosforilata di Rb e suggerisce una sorta di azione di sequestro di tale proteina, impedendo il rilascio e la conseguente attività dei fattori di trascrizione E2F-DP, fino alla iperfosforilazione della stessa ad opera di specifiche chinasi [Grinstein et al., 2006]. D'altra parte, la forma iperfosforilata di Rb sembra interagire con B23 (nucleofosmina), un'altra importante proteina nucleolare, ed è nuovamente sequestrata e mantenuta inattiva in sede nucleolare dopo la replicazione del DNA e durante la fase G2 [Takemura et al., 2002]. Anche nucleolina può essere fosforilata da diverse chinasi, tra cui cdk e questo evento porta ad una più elevata sintesi di rRNA ed alla proliferazione cellulare [Ugrinova et al., 2007]. In effetti, è noto come i livelli di trascrizione di rDNA aumentino durante la fase G1 e come la sintesi di rRNA sia principalmente mediata anche dalla fosforilazione (in particolare ad opera di cdk4-ciclina D1 e cdk2-ciclina E) dei fattori di trascrizione che modulano l'attività dell'enzima RNA polimerasi I, quali UBF [Voit et al., 1999]. A tale proposito, studi *in vitro* hanno anche dimostrato un'interazione tra la forma ipofosforilata di Rb e UBF e conseguente abrogazione dell'attività trascrizionale di RNA polimerasi I [Voit et al., 1999].

### **3.8 Il nucleolo e i virus**

Nel corso degli anni, una consistente mole di dati scientifici ha avvalorato la necessità per molti agenti virali di cooptare il distretto nucleare e diversi domini in esso contenuti, in

particolare il nucleolo. In effetti, quest'ultimo rappresenta il bersaglio di specifiche proteine virali, indispensabili per la stessa replicazione del virus: un numero sempre crescente di proteine chiave, sia appartenenti a virus a DNA che a RNA, si localizza a livello nucleolare e, per alcune di esse, sono state individuate le sequenze di localizzazione nucleolare (NoLs) [Hiscox, 2007; Kann, 2007; Wang et al., 2010]. Alcune proteine virali che si localizzano nel nucleolo presentano affinità di legame per l'RNA a doppia elica (dsRNA) o per il DNA [Melen et al., 2007]. Altri studi mostrano che la localizzazione nucleolare delle proteine virali è dipendente dal ciclo cellulare [Cawood et al., 2007; Arcangeletti et al., 2011]. Un'alterazione dell'architettura nucleolare è stata osservata in cellule infettate con virus *Herpes simplex* di tipo 1 (HSV1): la proteina virale UL24, importante per la replicazione e la riattivazione virale nei neuroni, colocalizza con nucleolina nei nucleoli e provoca una redistribuzione della proteina cellulare, osservabile dopo 9 ore di infezione [Callé et al., 2008]. Questo fenomeno potrebbe suggerire un'influenza del virus nella biogenesi dei ribosomi e potrebbe agevolare la replicazione del materiale genetico virale [Lymberopoulos and Pearson, 2007].

Nonostante i numerosi dati di letteratura a disposizione, non è ancora del tutto chiarito per quale motivo i virus debbano localizzarsi in tale compartimento, sebbene diversi Autori abbiano riportato l'ipotesi che alcune proteine nucleolari possano essere coinvolte sia nella replicazione del genoma virale, sia nelle fasi post-trascrizionali dell'espressione genica virale [Dang and Lee, 1989; Boyne and Whitehouse, 2006].

Altri Autori sostengono, invece, che la compartimentalizzazione nucleolare di proteine virali potrebbe favorire il traffico di queste ultime nella cellula e la diffusione dell'infezione stessa [Sirri et al., 2008; Lam et al., 2010]. Recenti studi mostrano come il legame tra nucleolina e proteine virali determini un incremento del trasferimento della proteina nucleolare verso il citoplasma veicolando in tal modo anche l'antigene virale [Hiscox 2002, 2007]. Si potrebbe quindi considerare che la capacità di nucleolina di rilocalizzarsi tra il nucleolo, il nucleoplasma, il nucleo e il citoplasma sia un fenomeno essenziale per la replicazione virale e che la sua localizzazione al di fuori del nucleolo della cellula ospite sia un evento che altera la biogenesi dei ribosomi, facilitando la trascrizione del genoma virale [Hiscox, 2002].

#### 4. TEMA E OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il ruolo della compartimentalizzazione nucleare per la regolazione dell'espressione genica ha assunto un sempre maggiore interesse scientifico [Pliss et al., 2005; Gorski et al., 2006; Malyavantham et al., 2008; Misteli, 2008]. In particolare il nucleolo che, come già sottolineato, viene considerato non solo come "la fabbrica dei ribosomi" ("the ribosome factory"), ma anche come un sito multifunzionale coinvolto in diversi processi cellulari, tra i quali anche il controllo del ciclo cellulare, la proliferazione e l'apoptosi [Pederson, 1998b; Verdun, 2006b], è frequentemente bersaglio di differenti virus a DNA o a RNA durante l'infezione litica. Inoltre, proteine virus specifiche spesso si accumulano a livello nucleolare o formano complessi con antigeni nucleolari [Hiscox, 2002; Boyne and Whitehouse, 2006; Michienzi et al., 2006; Shimakami et al., 2006; Callé et al., 2008] che, in seguito all'infezione virale, subiscono una redistribuzione, con una rilocalizzazione a livello nucleoplasmatico e citoplasmatico [Matthews, 2000; Bevington et al., 2007; Callé et al., 2008].

Studi precedentemente effettuati dal nostro gruppo di ricerca hanno permesso di evidenziare un significativo accumulo della proteina pp65 del tegumento di HCMV a livello nucleolare in fibroblasti umani; tale accumulo rimane evidente anche in preparazioni di matrice nucleare ed è osservabile già entro la prima ora di infezione, tempo in cui prende l'avvio il programma di trascrizione genica virale nell'ambito del ciclo litico. L'approfondimento delle conoscenze su processi di regolazione dell'espressione genica di HCMV, in particolare quelli che si realizzano a livello di compartimenti nucleari ad elevata specializzazione quali il nucleolo, è particolarmente rivolto alla delucidazione di meccanismi che possono interferire con lo svolgimento del normale programma di espressione genica nell'ambito del ciclo litico da HCMV e che potrebbero anche contribuire all'instaurarsi di uno stato di latenza.

Il progetto di ricerca sviluppato nei quattro anni di dottorato, si è proposto di valutare il possibile significato funzionale della localizzazione nucleolare di pp65 relativamente all'evoluzione del ciclo replicativo di HCMV in un modello sperimentale di infezione litica (stipite virale umano AD169 utilizzato per l'infezione di fibroblasti di polmone embrionale umano MRC5).

Il primo obiettivo di questo studio è stato quello di verificare la possibile esistenza di una correlazione tra la distribuzione nucleolare della proteina pp65 del virus infettante ed aspetti funzionali legati alla suddetta compartimentalizzazione, quali quelli relativi all'espressione dei geni precocissimi di HCMV, che danno l'avvio al programma di infezione litica.

Il secondo obiettivo è consistito nella valutazione del possibile legame tra insediamento nucleolare di HCMV e processi cellulari potenzialmente vantaggiosi per il virus, quale il

ciclo cellulare, di cui citomegalovirus induce alterazione ed il cui normale espletamento è assicurato anche da specifiche proteine nucleolari.

Il terzo obiettivo è stato incentrato sull'individuazione della/e componente/i proteica/che del nucleolo con cui interagirebbe la proteina pp65 di HCMV ed i relativi aspetti funzionali legati alle suddette componenti nucleolari, al fine di precisare il possibile ruolo di pp65 in questo compartimento nucleare.

## 5. MATERIALI E METODI

### COLTURE CELLULARI

Monostrati di fibroblasti embrionali umani (MRC5), coltivati a 37°C, in atmosfera addizionata del 5% di CO<sub>2</sub>, usando terreno MEM (Minimum Essential Medium, Invitrogen - Milano, Italia), modificato con sali di Earle ed addizionato di siero fetale di vitello (10%), sodio piruvato (1%), amminoacidi non essenziali (1%), L-glutamina (1%) ed antibiotici (penicillina 10.000 unità/ml e streptomina 10.000 µg/ml), sono stati utilizzati per lo studio dell'infezione produttiva da citomegalovirus umano (HCMV) *in vitro*.

### VIRUS

Il ceppo di HCMV che è stato utilizzato è rappresentato dallo stipite di riferimento AD169 (ATCC N. VR538), riprodotto in cellule MRC5 e titolato, sulla base della determinazione quantitativa dell'infettività (numero di fibroblasti - infettati con diluizioni scalari della suddetta riproduzione virale - che esprimono la proteina precocissima IEp72, mediante reazione di immunofluorescenza).

### INFEZIONE DI FIBROBLASTI EMBRIONALI UMANI MRC5 CON IL CEPPO ATCC AD169 DI HCMV

Cellule MRC5, coltivate a bassa densità iniziale in provette contenenti un vetrino sul fondo ("shell vials"), sono state incubate per 48 ore a 37°C in atmosfera addizionata del 5% di CO<sub>2</sub> fino al raggiungimento della semi-confluenza. Dopo un lavaggio con MEM privo di siero fetale di vitello, i monostrati sono stati inoculati con il ceppo AD169 di HCMV (titolo 5x10<sup>6</sup> ufp/ml) a molteplicità di infezione (m.o.i.) stabilita in dipendenza della tipologia di esperimento e incubati per 60 minuti a 37°C. Al termine dell'adsorbimento, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito con terreno di coltura addizionato di siero fetale di vitello al 10%. I monostrati infettati sono stati, infine, incubati a 37°C per i tempi prestabiliti.

### TRATTAMENTO DI MONOSTRATI DI CELLULE MRC5 CON ACTINOMICINA-D E CISPLATINO

I monostrati cellulari sono stati coltivati in "shell vials" per 48 ore a 37°C in atmosfera addizionata del 5% di CO<sub>2</sub>. Al raggiungimento della semiconfluenza, essi sono stati trattati con due distinte sostanze secondo modalità di seguito dettagliate:

- Actinomicina-D (act-D)

Soluzioni stock di 1 mg/ml (Sigma Aldrich, Milano, Italia) sono state preparate in dimetilsolfossido (DMSO) e conservate a 4°C. Act-D è stata addizionata alle colture cellulari di MRC5 alla concentrazione finale di 0,05 µg/ml per 1 ora e 30 minuti di pre-trattamento, così come per tutta la durata dell'infezione [Chen and Jiang, 2004]. In particolare, i monostrati cellulari pre-trattati sono stati infettati ad una m.o.i. di 1 e incubati a 37°C per 1 ora in presenza della suddetta sostanza. Dopo l'adsorbimento, il virus libero è stato rimosso ed è stato ripristinato il terreno fresco di mantenimento addizionato con act-D. Le cellule sono state incubate a 37°C per i tempi di infezione stabiliti.

- Cisplatino (*Cis*-DDP)

Cis-diamminodichloroplatinum (II) (*cis*-DDP, Sigma Aldrich, Milano, Italia) è stato aggiunto alle colture cellulari di MRC5 alla concentrazione finale di 20 µg/ml (soluzione stock di 20 mg/ml in DMSO) 7 ore prima dell'infezione [Jordan and Carmo-Fonseca, 1998]. I monostrati cellulari trattati sono stati infettati ad una m.o.i. di 1 e incubati a 37°C; dopo l'adsorbimento, il virus libero è stato rimosso ed è stato ripristinato il terreno fresco di mantenimento in assenza di *cis*-DDP.

#### ANTICORPI

Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi primari:

- anticorpo monoclonale purificato (cloni 1C3 e AYM-1) diretto verso la fosfoproteina strutturale di matrice di 65-68 kDa (pp65) di HCMV (Argene Srl, Milano, Italia);
- anticorpo monoclonale (clone 1-L-11) diretto verso la fosfoproteina strutturale di matrice di 65-68 kDa (pp65) di HCMV (Santa-Cruz, Heidelberg, Germania);
- anticorpo monoclonale specifico per l'epitopo comune codificato dall'esone 2 dei prodotti dei geni precocissimi virali IEp72 e IEp86, proteine di peso molecolare 72 kDa e 86 kDa (Argene Srl, Milano, Italia);
- antisiero umano "ANA positive control serum-nucleolar", contenente anticorpi diretti verso antigeni nucleolari ("The Binding Site" - United Kingdom), in grado di riconoscere le proteine nucleolari nucleolina, ku, PM-Scl ed altri antigeni nucleolari.
- anticorpi policlonali specifici per nucleolina (C23), nucleofosmina (B23), fibrillarina e "Upstream Binding Factor" (UBF), della ditta Santa Cruz (Heidelberg, Germania);
- anticorpo monoclonale diretto contro la proteina tubulina (Abcam, United Kingdom);
- anticorpo policlonale diretto contro amminoacidi della regione interna della proteina promielocitica (PML) della ditta Santa-Cruz (Heidelberg, Germania);

- anticorpo policlonale diretto contro il trasportatore di membrana del glutammato (EAAT3) della ditta Santa Cruz (Heidelberg, Germania).

Per quel che riguarda l'impiego dei suddetti anticorpi in immunofluorescenza, gli anticorpi anti-pp65 e anti-IE virali sono stati utilizzati alla diluizione di 1:30, gli anticorpi policlonali sono stati diluiti 1:50, mentre l'antisiero diretto contro le proteine nucleolari è stato usato *in toto*; come tampone di diluizione per anticorpi è stata impiegata sieralbumina bovina (BSA) allo 0.2% in tampone salino fosfato (PBS) [7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 7.4), 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl].

Le immunoreazioni sono state rivelate mediante anticorpi anti-IgG di topo coniugati con isotiocianato di tetrametil-rodamina (Alexa 594, Invitrogen) o isotiocianato di fluoresceina (Alexa 488, Invitrogen), per quel che riguarda gli antigeni virali pp65 e IEp72/86, e mediante anti-IgG di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC) Alexa 488, nel caso di anticorpi policlonali. Le proteine nucleolari sono state rilevate attraverso l'uso di anticorpi anti-IgG umane coniugati con il fluorocromo "verde" (Alexa 488, Invitrogen).

Per l'analisi citofluorimetrica al FACS ("Fluorescence Activated Cell Sorter") è stato impiegato l'intercalante del DNA ioduro di propidio (PI, 10 µg/ml).

Per quanto attiene all'utilizzo degli anticorpi in Western Blotting (WB), l'anticorpo anti-pp65 (Santa-Cruz) è stato utilizzato alla diluizione di 1:200; l'anticorpo policlonale anti-C23 è stato diluito 1:100; l'anticorpo anti-tubulina è stato diluito 1:200; l'anticorpo anti-EAAT3 è stato impiegato alla diluizione 1:500. Per l'immunorivelazione sono stati utilizzati anticorpi secondari anti-topo e anti-coniglio coniugati con fosfatasi alcalina alla diluizione di 1:250 (DakoCytomation).

#### **PREPARAZIONE DI MATRICI NUCLEARI *IN SITU***

L'isolamento di matrici nucleari *in situ* è stato effettuato secondo il protocollo sperimentale messo a punto da S.V. Razin e collaboratori [Razin, 1997]. Per l'isolamento di matrici nucleari *in situ*, sono state utilizzate colture di fibroblasti MRC5; dopo lavaggio rapido con tampone TM (Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub> 3 mM), tali colture sono state incubate per 10 minuti in ghiaccio con tampone TM contenente "phenylmethylsulphonyl fluoride" (PMSF) 0,2 mM, Triton X-100 0,5% e CuCl<sub>2</sub> 0,5 mM. I monostrati cellulari sono stati quindi sottoposti a due lavaggi rapidi con tampone TM e trattati per 20 minuti a 37°C con l'enzima DNasi I (100 unità/ml). Dopo avere eliminato il tampone TM contenente l'enzima, i monostrati cellulari sono stati incubati per 30 minuti in ghiaccio con NaCl 2M in tampone TM ed in seguito lavati

con tampone TM, prima di essere fissati e sottoposti a reazione di immunofluorescenza indiretta.

#### **IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA**

Prima dell'esecuzione della reazione di immunofluorescenza, le cellule sono state lavate delicatamente con tampone per citoscheletro CSK (saccarosio, NaCl 4M, MgCl<sub>2</sub> 0,3 M, Pipes 1M pH 6,9) e quindi contemporaneamente permeabilizzate e fissate utilizzando una miscela di Triton X-100 al 2,5% in tampone CSK e paraformaldeide all'1% nello stesso tampone per 20 minuti a temperatura ambiente.

Per l'esecuzione della reazione di immunofluorescenza con l'anticorpo monoclonale anti-IEp72/86, le cellule sono state lavate delicatamente con PBS e permeabilizzate/fissate in metanolo freddo per 10 minuti a -20°C. Trascorso questo periodo di incubazione, i monostrati sono stati lasciati asciugare a temperatura ambiente per eliminare ogni residuo di metanolo.

Dopo tre lavaggi di 5 minuti l'uno con PBS, i preparati cellulari sono stati trattati con BSA all'1% in PBS per 10 minuti al fine di saturare i siti immunoreattivi non specifici; le cellule sono state successivamente lavate con PBS prima di dispensare l'anticorpo primario.

Per l'immunoreazione, le cellule sono state incubate con gli anticorpi monoclonali anti-proteine virali (reazione di singola colorazione), o miscelati all'antisiero specifico per antigeni nucleolari (reazione di doppia colorazione) per un'ora a 37°C in camera umida. Dopo tre lavaggi di 5 minuti ciascuno con PBS, è seguita l'incubazione con gli specifici anticorpi secondari per 45 minuti a 37°C, in camera umida. Le cellule sono state quindi lavate con PBS (tre lavaggi da 5 minuti ciascuno) e montate con liquido di montaggio (ProLog® Gold Antifade Reagents, Molecular Probes, Invitrogen, Italia).

Infine, i preparati cellulari sono stati osservati mediante microscopio a fluorescenza (Leica-DMLB) o mediante microscopio confocale (510 META della ditta Zeiss). Le immagini acquisite sono state processate con "Image Space Software - Molecular Dynamics".

#### **ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE DA CELLULE MRC5**

L'RNA totale è stato estratto da cellule MRC5 non infettate o infettate con lo stipite virale AD169 di HCMV, nelle varie condizioni sperimentali considerate nello studio, seguendo il protocollo fornito dal sistema "NucleoSpin® RNAII kit" della ditta Macherey-Nagel. In breve, dopo la lisi cellulare ottenuta attraverso incubazione delle cellule in una soluzione ad alta concentrazione di ioni caotropici, mediante un sistema a colonne è stato favorito

l'adsorbimento dell'RNA totale alla membrana di silice, rimuovendo il DNA contaminante con l'azione dell'enzima DNasi a temperatura ambiente per 15 minuti. Varie fasi di lavaggio con tamponi specifici hanno consentito la rimozione dei sali, di metaboliti e di componenti macromolecolari cellulari. Infine, l'RNA purificato è stato eluito in condizioni di bassa concentrazione ionica con acqua priva di RNasi. L'integrità degli estratti è stata valutata dopo migrazione elettroforetica degli stessi in gel di agarosio denaturante, mentre la loro purezza e quantità è stata determinata misurando l'assorbanza a 260nm e a 280nm (Eppendorf - Biophotometer) dei campioni opportunamente diluiti in Tris-HCl (pH 7,5).

#### **REAZIONE POLIMERASICA A CATENA PREVIA RETROTRASCRIZIONE (RT-PCR)**

Gli RNA "template" sono stati retrotrascritti e sottoposti a reazione polimerasica a catena (PCR) utilizzando il sistema "SuperScript III One Step RT-PCR kit with Platinum Taq" della ditta Invitrogen, il cui protocollo prevede un'incubazione di 30 minuti a 50°C per un'efficiente sintesi del cDNA, seguita da 2 minuti a 94°C per l'inattivazione dell'enzima SuperScript™ II RT, la riattivazione dell'enzima DNA polimerasi Platinum® Taq e la denaturazione dell'ibrido RNA/cDNA. Le temperature di "annealing" sono di circa 10 °C al di sotto delle temperature di "melting" di ciascuna coppia di "primers" utilizzata ed i tempi di estensione variano in base alla taglia dell'amplificato (approssimativamente 1 minuto ogni Kb).

Per quel che riguarda la reazione di PCR con metodo "semi-quantitativo", sono stati disegnati i seguenti "primers" [Arcangeletti et al., 2009]:

- 5' - AGACGCCCTAGCGGGAAGG - 3' e 5' - AGGGCGTCGTTGGTGTGC - 3'

- 5' - AGAAAGAAGGGCGTGTTCGT - 3' e 5' - AGACGCCCTAGCGGGAAG - 3'

Specifici per la regione intronica ITS1 ("Internal Transcribed Spacer 1") localizzata tra i geni 18S e 5,8S dell'rDNA (prodotti di amplificazione attesi: 293 pb e 300 pb rispettivamente).

- 5' - GTGCGCCTACTTAATACAC - 3' e 5' - GCCCTTTCCTCACTGGTTC - 3'

Specifici per il terzo introne del gene codificante per β-actina (prodotto di amplificazione atteso: 242 pb).

Il termociclatore è stato programmato per 30, 35 e 40 cicli di denaturazione (94°C), "annealing" alla temperatura di 56 °C ed estensione (72°C). I prodotti dell'amplificazione sono stati rivelati mediante elettroforesi in gel di agarosio (1,5%) colorato con bromuro di

etidio ed affiancati da un marcatore di pesi molecolari (1kb DNA Ladder-Invitrogen, Milano, Italia).

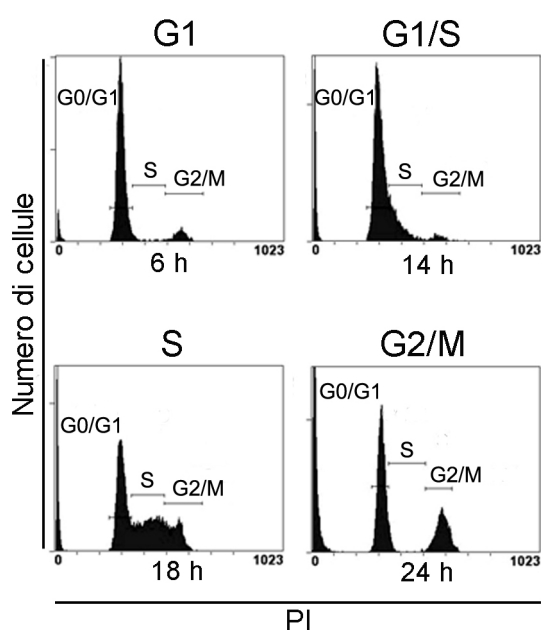
Per quel che riguarda l'analisi dei trascritti virali, essa è stata effettuata estraendo l'RNA totale da cellule MRC5 arricchite nelle diverse fasi del ciclo cellulare ed infettate con lo stipite virale AD169 di HCMV (m.o.i = 3); successivamente, gli RNA "template" ottenuti in ciascuna fase, sono stati retrotrascritti e sottoposti a PCR (30 cicli), alle temperature di "annealing" indicate, per l'amplificazione di sequenze specifiche nell'ambito dei geni precocissimi IE1 ("immediate-early"; 56°C, prodotto di amplificazione atteso: 303 pb), precoci UL54 ("early"; 55 °C, prodotto di amplificazione atteso: 237 pb), precoci-tardivi UL83 ("early-late"; 59 °C, prodotto di amplificazione atteso: 231 pb) e tardivi UL32 ("late"; 57 °C, prodotto di amplificazione atteso: 206 pb) di HCMV [Ioudinkova et al., 2006]. Come controllo è stata utilizzata una coppia di "primers" che amplifica una regione genica cellulare che codifica per l'enzima costitutivo gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi (GAPDH; 56 °C, prodotto di amplificazione atteso: 242 pb).

Per quanto attiene alla valutazione del trascritto per nucleolina a seguito di trasfezione di "small interfering RNA" (si veda di seguito) è stata effettuata una RT-PCR (30 cicli) con temperatura di "annealing" di 56 °C con "primers" specifici disegnati a cavallo della sequenza silenziata di nucleolina (F: 5'-AGGAGGAGGAAGAGCCTGTC-3'; R: 5'-AGCCACCTTCACCCTTAGGT-3').

#### **SINCRONIZZAZIONE DEI MONOSTRATI DI CELLULE MRC5**

I monostrati cellulari sono stati coltivati in fiasche da 75 cm<sup>2</sup> a 37°C in terreno addizionato di SVF (10%) sino ad una confluenza >70%. Successivamente le cellule MRC5 sono state lavate con soluzione salina bilanciata HBSS ("Hank's Buffered Salt Solution") a temperatura ambiente e incubate per 5 minuti con TE (Trypsina-EDTA) al fine di consentire la rottura dei legami intercellulari. Le cellule sono state raccolte in 10 ml di terreno MEM addizionato di SVF (10%), contate in camera di Burker allestendo una diluizione 1:10 nel medesimo terreno e, infine, utilizzate per l'allestimento di monostrati cellulari in piastre a 6 pozzetti con circa 1 x 10<sup>6</sup> cellule/pozzetto, in terreno MEM addizionato di SVF (20%); le cellule sono state incubate a 37°C per i tempi prestabiliti (5 ore per G0/G1, 14 ore per G1/S, 18 ore per S, 24 ore per G2/M). Al termine di tale periodo, le cellule di ciascun pozzetto sono state sottoposte a tripsinizzazione e raccolte in una provetta tipo eppendorf in un volume finale di PBS 1X di 2 ml. Dopo centrifugazione a 800 x g a temperatura ambiente per 10 minuti, i sedimenti cellulari, risospesi delicatamente in 0,6 ml di PBS 1X e 1,4 ml di etanolo 100% aggiunto goccia

a goccia, sono stati fissati e permeabilizzati “overnight” a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al termine di questo periodo sono state centrifugate a  $800 \times g$  a temperatura ambiente per 10 minuti. Il sovrantante è stato eliminato per inversione e il sedimento così ottenuto risospeso immediatamente in 0,5 ml di PBS 1X addizionato di ioduro di propidio ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) e RNasi ( $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) nel caso in cui le cellule non fossero state precedentemente sottoposte ad infezione; in caso contrario, si è proceduto all’immunofluorescenza per la rivelazione delle proteine precocissime IE (IEp72 e IEp86) o della fosfoproteina del tegumento virale pp65. Di seguito, in Figura 5, vengono riportati i grafici a istogrammi della distribuzione del contenuto di DNA nelle cellule sincronizzate seguendo il piano sperimentale sopra descritto.



**Figura 5.** Istogrammi rappresentativi del contenuto di DNA (PI: ioduro di Propidio) a confronto con il numero di cellule registrato (“cell number”) per mezzo del citofluorimetro (FACS). Fibroblasti embrionali umani MRC5 sono stati fatti crescere a piena confluenza e mantenuti ad alta densità, successivamente sono stati tripsinizzati e riseminati in piastre da 3 cm di diametro per il tempo indicato in figura. Le cellule sono state raccolte e colorate con PI e il loro contenuto di DNA analizzato al FACS. In figura è riportata la distribuzione della popolazione cellulare nelle differenti fasi del ciclo cellulare. I profili di distribuzione ottenuti si riferiscono ad una singola analisi rappresentativa di tre indipendenti esperimenti con risultati simili.

#### INFEZIONE IN CELLULE SINCRONIZZATE

Le cellule sono state fatte crescere fino alla confluenza e mantenute ad alta densità per circa 3 giorni. Quindi sono state tripsinizzate e seminate in piastre a 6 pozzetti con una densità di  $1 \times 10^6$  cellule/pozzetto e lasciate in terreno di mantenimento MEM addizionato di SVF 20% per 4 ore prima dell’inoculo del virus (ceppo AD169 di HCMV; m.o.i. =3; 3 ore p.i.). Dopo 1 ora è stato rimosso l’inoculo virale e ripristinato il terreno di mantenimento per i tempi di

infezione previsti. Al termine del periodo di incubazione, i monostrati cellulari sono stati trattati come descritto nella precedente sezione e fissati in etanolo 70% "overnight".

#### **IMMUNOFLUORESCENZA IN CELLULE SINCRONIZZATE**

Il sedimento cellulare, ottenuto dalla centrifugazione della sospensione di cellule fissate precedentemente in etanolo al 70%, è stato risospeso in 50 µl di una diluizione 1:30 dell'anticorpo monoclonale specifico per l'epitopo comune codificato dall'esone 2 dei prodotti dei geni precocissimi virali IEp72 e IEp86 in tampone di diluizione ("dilution buffer": PBS-0.5% BSA- 0.5% Tween 20) oppure, per la rivelazione di pp65, in 50 µl di una diluizione 1:30 anticorpo monoclonale diretto verso la fosfoproteina strutturale di matrice di 65-68 kDa (pp65) di HCMV. La sospensione cellulare addizionata degli specifici anticorpi è stata poi incubata al buio per 30 minuti a temperatura ambiente; al termine di questo periodo, essa è stata lavata con 1 ml di soluzione di lavaggio ("wash buffer": PBS - 0,5% BSA) e centrifugata 10 minuti a temperatura ambiente a 800 x g. Successivamente, il sedimento cellulare è stato risospeso in 50 µl di una diluizione 1:500 (in tampone di diluizione) dell'anticorpo secondario anti-IgG di topo coniugato con isotiocianato di fluoresceina (Alexa 488, Invitrogen), per l'antigene virale pp65 e per gli antigeni virali IE. Al termine di un periodo di incubazione di 30 minuti al buio, a temperatura ambiente, la sospensione cellulare è stata lavata con la soluzione di lavaggio (1 ml), poi centrifugata 10 minuti a temperatura ambiente a 800 x g; infine, il sedimento cellulare è stato risospeso in 0,5 ml di PBS 1X.

Per la successiva analisi citofluorimetrica a flusso, il sedimento cellulare veniva risospeso in PBS 1X addizionato di ioduro di propidio (10 µg/ml) e RNasi (100 µg/ml).

#### **ANALISI CITOFLUORIMETRICA A FLUSSO**

Dopo i passaggi descritti nella precedente sezione, la sospensione cellulare è stata analizzata in citofluorimetria tramite lo strumento EPICS® XL-MCL COULTER (Beckman, Figura 6), al fine di attuare la valutazione del contenuto di DNA (fluorescenza emessa dal PI) e di parametri di infezione virale (antigene pp65 o antigeni precocissimi di HCMV rivelati, tramite immunofluorescenza indiretta, con anticorpi secondari coniugati con fluorocromo) nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Tramite il software "Expo32" (Beckman) è stata effettuata l'analisi degli eventi analizzati: in particolare, sono stati impostati "cursori" che delimitano le aree sottese dai picchi dell'istogramma e sono stati quantificati gli eventi che rientrano in tali aree ("gate"). Come controlli per l'impostazione dei "cursori" e

l'identificazione delle varie sottopopolazioni cellulari, le cellule sono state colorate con anticorpi irrilevanti di controllo. La quantità di "eventi" registrati, ovvero la quantità di cellule racchiusa nel "gate" è stata espressa come valore percentuale.

I picchi corrispondenti alle regioni G0/G1, S e G2/M derivano dalla rielaborazione delle misure ottenute al citofluorimetro, relative al progressivo aumento del volume cellulare (FS) e della complessità nucleo/citoplasmatica (SS) durante le fasi di transizione del ciclo cellulare.



Figura 6. Strumento per analisi citofluorimetrica EPICS® XL-MCL COULTER (Beckman)

#### **INATTIVAZIONE VIRUS**

Per l'inattivazione del virus ai raggi ultravioletti (UV), la sospensione virale purificata (HCMV, stipite AD169), risospesa in 1 ml di MEM privo di siero di vitello fetale, è stata posta in piastra di 3 cm di diametro. La sospensione virale, mantenuta in ghiaccio, è stata irradiata per 2 ore alla distanza di 5 cm dalla sorgente di raggi UV. Il virus inattivato agli UV non si replica e non produce livelli rilevabili di proteine precocissime IE (dati non mostrati nella sezione "Risultati")

#### **FRAZIONAMENTO DELLE CELLULE MEDIANTE LISI IPOTONICA**

Le cellule ( $12 \times 10^6$ ), tripsinizzate e raccolte in terreno di coltura, sono state lavate in PBS freddo e centrifugate a  $500 \times g$  per 5 minuti. Il sedimento cellulare risospeso in 15 volumi di soluzione di lisi ipotonica (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM NaCl, e 1 mM  $MgCl_2$ ), è stato posto in incubazione in ghiaccio per circa 20 minuti. La lisi cellulare è stata eseguita aggiungendo Nonidet P-40, ad una concentrazione finale di 0.3%, e trasferendo la sospensione in un Dounce pre-raffreddato in ghiaccio (10 colpi con un pestello sottile). Dopo

aggiunta di 10 volumi di una soluzione di saccarosio 0,25 M e MgCl<sub>2</sub> 10 mM, al fine di ripristinare l'isotonicità, i nuclei sono stati raccolti mediante centrifugazione a 1200 x g per 5 minuti. Il sopranatante, costituito dalla frazione citoplasmatica, è stato raccolto e conservato a - 20°C fino al momento della successiva analisi. I nuclei sono stati purificati centrifugandoli a 1200 x g per 10 minuti per mezzo di un cuscino di saccarosio 0,88 M contenente MgCl<sub>2</sub> 0,05 mM. Il sedimento nucleare è stato risospeso in una soluzione di saccarosio 0,34 M e MgCl<sub>2</sub> 0,05 mM e conservato a - 20 °C per la successiva analisi; parte di questa sospensione è stata utilizzata per ottenere le frazioni nucleoplasmatica e nucleolare. Inizialmente si è proceduto a sonicazione (SonoPlus, Bandelin: 4 colpi della durata di 30 secondi ogni 5 minuti in ghiaccio). Successivamente, i nucleoli sono stati purificati dall'omogenato risultante dalla sonicazione mediante centrifugazione a 2000 x g per 20 minuti, attraverso un cuscino di saccarosio 0,88 M contenente MgCl<sub>2</sub> 0,05 mM. Il sopranatante, contenente la frazione nucleoplasmatica è stato raccolto e conservato a - 20°C per la successiva analisi, mentre il sedimento nucleolare è stato risospeso in 0,34 M di saccarosio contenente 0,05 mM MgCl<sub>2</sub>. Tutte le frazioni cellulari sono state sottoposte a quantificazione proteica, seguendo il metodo Bradford (Bio-Rad, Milano, Italia).

#### **IMMUNOPRECIPITAZIONE DI COMPLESSI PROTEICI**

I monostrati cellulari (fibroblasti MRC5), non infettati o sottoposti ad infezione (m.o.i = 5; 2 ore e 30 minuti p.i.), sono stati tripsinizzati e raccolti in PBS 1X per essere sottoposti a lisi ipotonica come descritto precedentemente. I lisati cellulari totali sono stati poi sottoposti a co-immunoprecipitazione (Co-IP), utilizzando i reagenti del prodotto commerciale ExactaCruz™ B ed ExactaCruz™ C della ditta Santa Cruz Biotechnology. Ciascuno dei suddetti prodotti conteneva la matrice IP necessaria per precipitare l'immunocomplesso costituito dall'antigene "catturato" dall'anticorpo specifico (anticorpo policlonale per nucleolina [C23] o anticorpo monoclonale per pp65), e dalla proteina di interesse (antigene virale pp65 o antigene cellulare C23); quest'ultima è stata rivelata in Western Blotting (si veda di seguito), utilizzando un sistema rivelatore legato a fosfatasi alcalina e rivelando la reazione con il substrato dell'enzima (BCIP/NBT, Sigma Aldrich). Seguendo le indicazioni riportate dalla casa produttrice, per la formazione della matrice IP si è proceduto, innanzitutto, ad un'incubazione "over-night" a 4°C, utilizzando 50 µl di matrice IP "Rabbit" o IP "Mouse", 5 µl di anticorpo anti-nucleolina o anti-pp65 e 500 µl di PBS 1X. Successivamente è stata eseguita una centrifugazione alla massima velocità (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Milano, Italia; rotore FA-45-24-11 alla velocità di 13200 rpm) per 30

secondi a 4°C, lavando il sedimento con PBS 1X per 2 volte. Per la precipitazione dell'immunocomplesso, il lisato cellulare precedentemente allestito è stato aggiunto alla matrice IP-Matrix e poi incubato "over-night" a 4°C. Dopo 4 lavaggi con PBS 1X, centrifugando alla massima velocità ad ogni passaggio, il sedimento è stato risospeso in tampone Laemmli 2X. Dopo ebollizione a 95°C, i campioni sono stati utilizzati per verificare l'avvenuta co-immunoprecipitazione mediante elettroforesi in SDS-PAGE e Western Blotting.

#### **ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMIDE ("SDS-PAGE")**

Per l'analisi di proteine sottoposte a denaturazione è stato utilizzato il metodo denominato "SDS-PAGE", che prevede la migrazione elettroforetica delle proteine in gel di poliacrilamide in condizioni denaturanti (presenza di SDS). Il detergente SDS è stato aggiunto sia al tampone di corsa elettroforetica sia a quello di diluizione del campione. L'elettroforesi è stata realizzata utilizzando il sistema Bio-Rad modello Mini-Protean III; questo tipo di elettroforesi sfrutta la combinazione di un gel in cui il campione si concentra (poliacrilamide al 4%: "stacking gel") e di un gel a concentrazione di acrilamide utile all'analisi di interesse (nel caso specifico: poliacrilamide al 12,5%: "resolving gel" o "running gel"), che consente la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare.

<b>Stacking gel (4%)</b>	<i>Volume</i>
* Stacking gel 4x	1,3 ml
30% Acrilamide/Bis (2,6%)	0,7 ml
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilenediamina) 97%	5 µl
ammonio persolfato (APS) al 25%	25 µl
Acqua	3 ml
*Tampone dello stacking gel 10x: 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8) e 0,4% SDS	

<b>Running gel (12,5%)</b>	<i>Volume</i>
** Running gel 4x	2 ml
30% Acrilamide/Bis (2,6%)	3,3 ml
TEMED (N,N,N',N'-tetrametil-etilenediamina) 97%	7,5 µl
ammonio persolfato (APS) al 25%	7,5 µl
Acqua	2,7 ml
**Tampone del Running gel 4x: 1,5 M Tris-HCl (pH=8,8) e 0,4% SDS	

La migrazione elettroforetica è stata effettuata a 100 Volts per circa 1 ora in soluzione elettrolitica contenente 25 mM Tris-base, 192 mM glicina (pH 8,3) e 0,1% SDS.

In ogni pozzetto preformato nel gel di "stacking" sono state caricate quantità uguali di proteine per ciascun estratto, fino ad un massimo di 10 µl/pozzetto; uno di essi è stato utilizzato per caricare una miscela di proteine colorate a peso molecolare noto ("SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Protein Standard"; Invitrogen, Milano, Italia).

#### **WESTERN BLOTTING**

Una volta terminata la migrazione elettroforetica su gel, le proteine sono state trasferite elettroforeticamente ("elettroblotting") su un supporto sintetico solido, costituito da una membrana di fluoruro di polivinilidene (PVDF; Immobilon P., Millipore, Bedford, MA), mediante il sistema "Novex® Western Transfer Apparatus" (Invitrogen). L'elettroblotting è stato effettuato assemblando preventivamente i diversi componenti (spugna, carta assorbente per il blotting, gel, membrana di trasferimento, carta assorbente per il blotting, spugna) che poi sono stati immersi in tampone di trasferimento (12 mM Tris-base, 96 mM glicina, 20% metanolo, acqua Milli-Q) e trasferiti elettroforeticamente a basso voltaggio (20 V) per una notte a 4°C. Le membrane di PVDF sono state in seguito saturate per 2 ore a temperatura ambiente con una soluzione contenente PBS, Tween 20 (0,20%) e latte magro in polvere (4%), in modo da impedire il legame aspecifico degli anticorpi alla superficie della membrana. In seguito, quest'ultima è stata incubata con l'anticorpo primario per 1 ora in agitazione, a temperatura ambiente. Per l'analisi delle proteine presenti negli estratti cellulari, sono state impiegate sonde immunologiche dirette verso proteine cellulari (nucleolina, nucleofosmina, EAAT-3, tubulina) e virali (pp65). Dopo incubazione con gli anticorpi primari, la membrana è stata lavata con PBS 1X e successivamente incubata (1 ora in agitazione, a temperatura ambiente) con l'anticorpo secondario anti-coniglio o anti-topo, coniugati con fosfatasi alcalina (AP). Una volta terminato il periodo di incubazione, la membrana è stata lavata per 4 volte con PBS 1X e sottoposta all'immunorivelazione con il substrato dell'enzima (BCIP/NBT, Sigma Aldrich).

#### **COSTRUZIONE DEGLI "SMALL INTERFERING" RNA (siRNA)**

Una volta individuata la sequenza "target" del mRNA della proteina di interesse (es.: nucleolina), è stato utilizzato il programma "siRNA Target Finder" (Applied Biosystems Website) per disegnare le sequenze senso e antisense degli oligonucleotidi stampo (costituiti da 21 nucleotidi) per i siRNA. Per la determinazione delle sequenze nucleotidiche idonee

quali oligonucleotidi stampo, al fine di ottenere siRNA in grado di riconoscere regioni dell'mRNA di nucleolina, è stato impiegato il programma disponibile al sito [http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA\\_finder.html](http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html), attraverso il quale sono state individuate 3 sequenze di seguito riportate:

5'-  -3'  **Target sequence 12 (TSeq12)**

siRNA target sequence e (sotto) primer da impiegare nel Silencer Kit

**Results: Antisense siRNA Oligonucleotide Template:**

5'- AATCAAGACTATAGAGGTGGACCTGTCTC -3'

**Results: Sense siRNA Oligonucleotide Template:**

5'- AATCCACCTCTATAGTCTTGACCTGTCTC -3'

5'-  -3'  **SEQ# 2**

**Results: Antisense siRNA Oligonucleotide Template:**

5'- AATCCAAGGTAAC TTTATTCTCCTGTCTC -3'

**Results: Sense siRNA Oligonucleotide Template:**

5'- AAAGAATAAAGTTACCTTGGACCTGTCTC -3'

5'-  -3'  **SEQ # 4**

**Results: Antisense siRNA Oligonucleotide Template:**

5'- AATCTTTGACAGGCTCTTCCCCTGTCTC -3'

**Results: Sense siRNA Oligonucleotide Template:**

5'- AAGGAAGAGCCTGTCAAAGAACCTGTCTC -3'

Oligonucleotidi stampo per i siRNA:

5'- AATTCTTTGACAGGCTCTTCCCCTGTCTC -3'  
5'- AAGGAAGAGCCTGTCAAAGAACCTGTCTC -3'

5'- AATCAAGACTATAGAGGTGGACCTGTCTC -3'  
5'- AATCCACCTCTATAGTCTTGACCTGTCTC -3'

5'- AATCCAAGGTAACCTTTATTCTCCTGTCTC -3'  
5'- AAAGAATAAAGTTACCTTGGACCTGTCTC -3'

I tre siRNA sono stati ottenuti dai suddetti oligonucleotidi stampo mediante il prodotto commerciale "Silencer siRNA Construction kit" della ditta Ambion, che prevede, in due reazioni separate di amplificazione (filamento senso e antisense) con il "T7 Promoter Primer", che 8 nucleotidi "CCTGTCTC" complementari al primer Promotore T7 fornito nel kit, vengano aggiunti alla sequenza oligonucleotidica (senso e antisense), in posizione 3'-terminale. L'estremo 3' delle sequenze di DNA ibridizzate viene esteso per mezzo del frammento di Klenow della DNA polimerasi per creare un doppio filamento di DNA formato da una regione "leader" in 5' a singolo filamento, una regione di 19 nucleotidi specifica per la sequenza bersaglio da silenziare e una sequenza terminale 3'-UU. Il doppio filamento funge da stampo per la trascrizione ad opera della T7 RNA polimerasi dei trascritti di RNA a singolo filamento (senso e antisense) che vengono successivamente ibridizzati ottenendo un dsRNA.

La sequenza "leader" viene rimossa attraverso la digestione del dsRNA con una ribonucleasi specifica, che mantiene gli estremi 3'-UU, poiché essa non taglia i residui di uracile. Il DNA stampo viene contemporaneamente rimosso da una deossiribonucleasi. Il siRNA risultante viene purificato su filtri a fibre di vetro ed eluito per rimuovere l'eccesso di nucleotidi, proteine, corti oligomeri e sali presenti nella reazione. Il prodotto finale è un siRNA a doppio filamento di 21 nucleotidi con dimeri di uridina in 3' potenzialmente capaci di ridurre l'espressione dell' mRNA bersaglio nella cellula in cui vengono trasfettati.

Il silenziamento di C23 è stato realizzato mediante trasfezione di fibroblasti MRC5 con liposomi (SuperFect Transfection Kit, Qiagen). Inoltre, come verifica del silenziamento genico, sono stati disegnati "primers" specifici per C23, a cavallo della regione silenziata, (F: 5'-AGGAGGAGGAAGAGCCTGTC-3'; R: 5'-AGCCACCTTCACCCCTTAGGT-3') che amplificano una regione di 1000 pb.

### **TRASFEZIONE DI siRNA MEDIANTE "SUPERFECT TRANSFECTION REAGENT"**

Il giorno antecedente la trasfezione, fibroblasti MRC5 sono stati seminati in piastre da 3 cm ( $5 \times 10^5$  cellule/piastra) in terreno MEM 10%. Dopo 24 ore di crescita a 37°C e lavaggio del monostrato con PBS 1X a 37°C, è stata aggiunta una soluzione (700 µl) così costituita: siRNA (100 nM), SuperFect Transfection Reagent (10 µl) della ditta Qiagen ed MEM 1X (senza siero ed antibiotici), miscelati ed incubati 5 minuti a temperatura ambiente per permettere la formazione delle "micelle", a cui poi è stato addizionato il terreno completo (MEM 10%). Dopo un'incubazione di almeno 3 ore a 37°C, i monostrati sono stati lavati ed è stato ripristinato il terreno di mantenimento. Ad una prima trasfezione è seguita, dopo 24 ore, una seconda; infine, dopo 4 giorni dalla seconda trasfezione si è proceduto, come descritto, all'estrazione dell'RNA totale o delle proteine per le successive analisi.

## 6 RISULTATI

Come precedentemente esplicitato, gli esperimenti pianificati in questo studio sono stati finalizzati alla verifica dell'esistenza di un possibile legame tra l'insediamento nucleolare di HCMV (in particolare, della proteina pp65 del virus infettante), a tempi precocissimi dopo l'infezione e l'avvio del normale ciclo replicativo litico virale in un modello sperimentale *in vitro*. Sono state adottate diverse strategie ed approcci sperimentali mirati alla risoluzione dei quesiti scientifici posti ed elencati nel capitolo "Tema e obiettivi della ricerca", verificando innanzitutto, l'effetto della deplezione nucleolare della proteina virale pp65 sulle fasi precocissime dell'infezione virale produttiva.

Successivamente, lo studio è stato orientato alla verifica dell'esistenza di un possibile legame tra insediamento nucleolare di HCMV ed alterazione di processi cellulari potenzialmente vantaggiosi per il virus, quali il ciclo cellulare, la cui regolazione avviene, in modo rilevante, anche nel nucleolo.

Infine, la ricerca si è focalizzata sulla individuazione della/e componente/i proteica/che del nucleolo con cui interagirebbe la proteina pp65 di HCMV, prendendo inizialmente in considerazione quelle maggiormente rappresentate a livello nucleolare e di rilevanza funzionale nell'ambito del controllo del ciclo cellulare e/o della trascrizione di rDNA (nucleolina, nucleofosmina, fibrillarina e UBF).

### 6.1 DEPLEZIONE NUCLEOLARE DELLA PROTEINA VIRALE PP65, A SEGUITO DI TRATTAMENTO CON ACTINOMICINA-D O CON CISPLATINO

Al fine di provocare la deplezione nucleolare della proteina virale pp65, il piano sperimentale ha previsto l'impiego di due sostanze, actinomicina-D (act-D) e cisplatino (*cis*-DDP) (Figura 7) che, se usate a bassa concentrazione (0,05 µg/ml e 20 µg/ml, rispettivamente), determinano una redistribuzione di proteine nucleolari nel nucleoplasma, provocando un effetto di "svuotamento" del nucleolo.

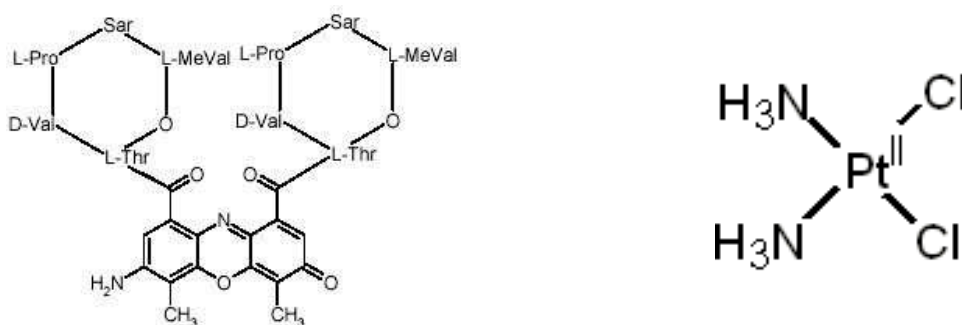


Figura 7. Formula chimica delle molecole di actinomicina D (a sinistra) e cisplatino.

Il presupposto all'attuazione di tale esperimento si basa, innanzitutto, sulla considerazione che il nucleolo è privo di membrana; è dunque verosimile che la proteina virale pp65 sia legata a proteine nucleolari, capaci di "ancorarla" in quella sede. Pertanto, è sembrato logico ipotizzare che gli esperimenti di infezione *in vitro* in cellule trattate con le suddette sostanze, che provocano una graduale redistribuzione delle proteine nucleolari nel nucleoplasma, avrebbero al contempo permesso il rilascio della proteina virale pp65 dalla sede nucleolare.

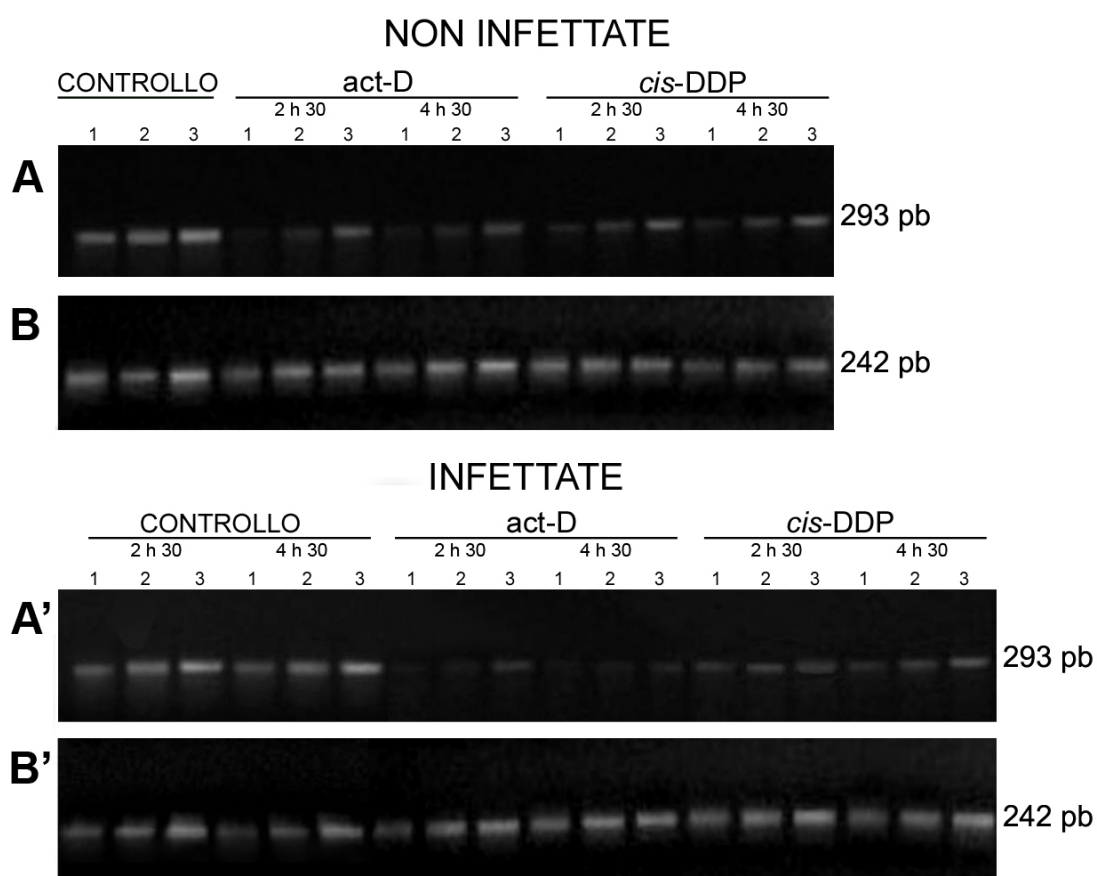
Va altresì sottolineato che l'azione di redistribuzione delle proteine nucleolari esercitata da act-D e *cis*-DDP è legata al concomitante effetto selettivamente inibitorio provocato dalle stesse sull'attività dell'enzima RNA polimerasi I, con conseguente blocco della trascrizione nucleolare (sintesi di RNA ribosomiale); act-D e *cis*-DDP (alle basse concentrazioni utilizzate per questo studio) lascerebbero invece inalterata l'attività dell'enzima RNA polimerasi II (impiegata anche dal virus per la trascrizione dei propri geni).

Le due sostanze agiscono con meccanismi diversi. In particolare, act-D è un agente intercalante del DNA a doppia elica, preferenzialmente a livello di regioni del DNA in cui sono presenti sequenze ricche in guanina-citosina (GC) [Sobell, 1985]. Il DNA nucleolare, che codifica per l'RNA ribosomiale, è particolarmente ricco di sequenze GC e questo spiega il motivo per il quale, utilizzando act-D a basse concentrazioni (0,05 µg/ml), il bersaglio preferenziale sia rappresentato dal DNA nucleolare [Iapanucci-Espinoza and Franze-Fernández 1979], provocando al contempo la dislocazione nel nucleoplasma di diverse proteine nucleolari, tra cui fibrillarina e nucleolina, nonché la redistribuzione di TBP ("TATA-binding protein"), hUBF ("human upstream binding factor") e RNA polimerasi I [Jordan et al., 1996].

*Cis*-DDP a bassa concentrazione (20 µg/ml), come act-D, ha come bersaglio il DNA nucleolare; in particolare, esso è in grado di perturbare l'attività di trascrizione attraverso differenti modalità: "crosslinking" intracatenari mediante legame covalente di cisplatino con due basi puriniche adiacenti, "crosslinking" intercatenari, oppure mediante interazioni DNA-proteina [Jordan and Carmo-Fonseca, 1998]. Inoltre, per cisplatino è stato dimostrato che particolari tipi di proteine nucleolari (quali ad esempio fattori di regolazione della trascrizione) sono in grado di legarsi in modo specifico a zone di DNA danneggiate dalla sua azione, venendo pertanto apparentemente sottratte alla loro normale funzione regolatoria [Jordan et al., 1996]. Tra tali proteine nucleolari, è da annoverare, in particolare, il fattore di trascrizione hUBF, la cui funzione è fondamentale per l'attività dell'enzima RNA polimerasi I (trascrizione dei geni nucleolari). In presenza di cisplatino, hUBF viene specificatamente reclutato a livello dei tratti di DNA nucleolare che legano tale sostanza, impedendone la

trascrizione [Treiber et al., 1994]; tale proteina di regolazione della trascrizione dei geni ribosomiali subisce pertanto una concomitante redistribuzione verso la periferia del nucleolo assieme a RNA polimerasi I, ad alcuni fattori di trascrizione e agli stessi geni ribosomiali inattivi. Tuttavia, l'attività di RNA polimerasi II non viene modificata [Jordan and Carmo-Fonseca, 1998].

A dimostrazione dell'azione inibitoria sulla trascrizione nucleolare, esercitata da act-D e *cis*-DDP (utilizzate alle concentrazioni prescelte per il presente studio), sono stati effettuati esperimenti di estrazione di RNA totale da cellule MRC5 non infettate o a tempi precoci dopo l'infezione (2 ore 30 minuti p.i.; 4 ore 30 minuti p.i.), in assenza o in presenza delle suddette sostanze, seguiti da reazione polimerasica a catena previa retrotrascrizione (RT-PCR), con "primers" specifici per la regione intronica ITS1 (regione intronica tra 18 S e 5,8 S; prodotto atteso: 293 pb) del trascritto primario di rRNA (Figura 8, A, A').

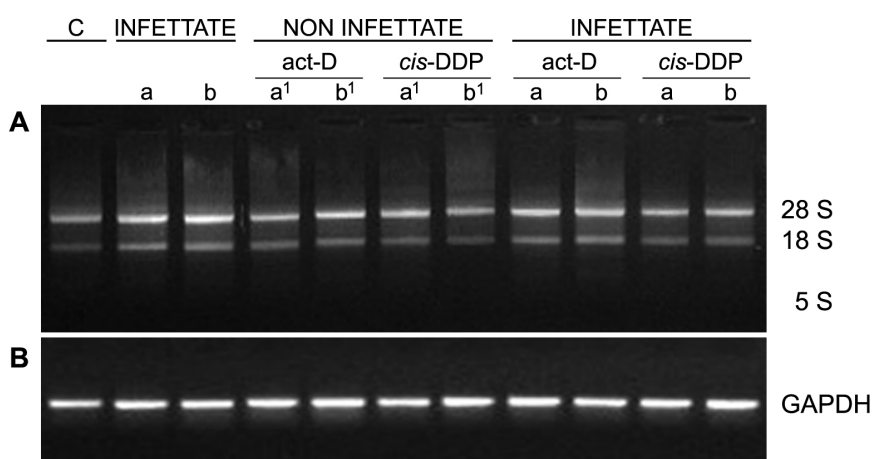


**Figura 8.** Effetto del trattamento con actinomicina-D (act-D) o cisplatino (*cis*-DDP) sull'rRNA e sulla sintesi dell'mRNA della  $\beta$ -actina in cellule MRC5 non infettate o infettate con HCMV (m.o.i.=2). Sia i fibroblasti MRC5 non infettati (A, B) sia quelli soggetti a infezione con HCMV (A', B'), sono stati non trattati o trattati con act-D, o *cis*-DDP-prima dell'estrazione dell'RNA totale e della RT-PCR. I tempi di infezione considerati sono stati 2 ore 30 minuti e 4 ore 30 minuti. A, A': profilo di amplificazione mediante RT-PCR (1, 2, 3: 25, 30, 35 cicli) del prodotto di 293 pb, utilizzando specifici primers per la regione intronica ITS1 dell'rRNA. B, B': profilo di amplificazione mediante RT-PCR (1, 2, 3: 30, 35, 40 cicli) del prodotto di 242 pb, utilizzando specifici primers per il terzo introne dell'mRNA della  $\beta$ -actina.

Per dimostrare che act-D e *cis*-DDP, al contrario, non inibiscono l'azione dell'enzima RNA polimerasi II alle basse concentrazioni utilizzate, è stata amplificata una regione del trascritto primario dell'mRNA del gene per la  $\beta$ -actina, con "primers" specifici per il terzo introne (prodotto atteso: 242 pb) (Figura 8 B, B').

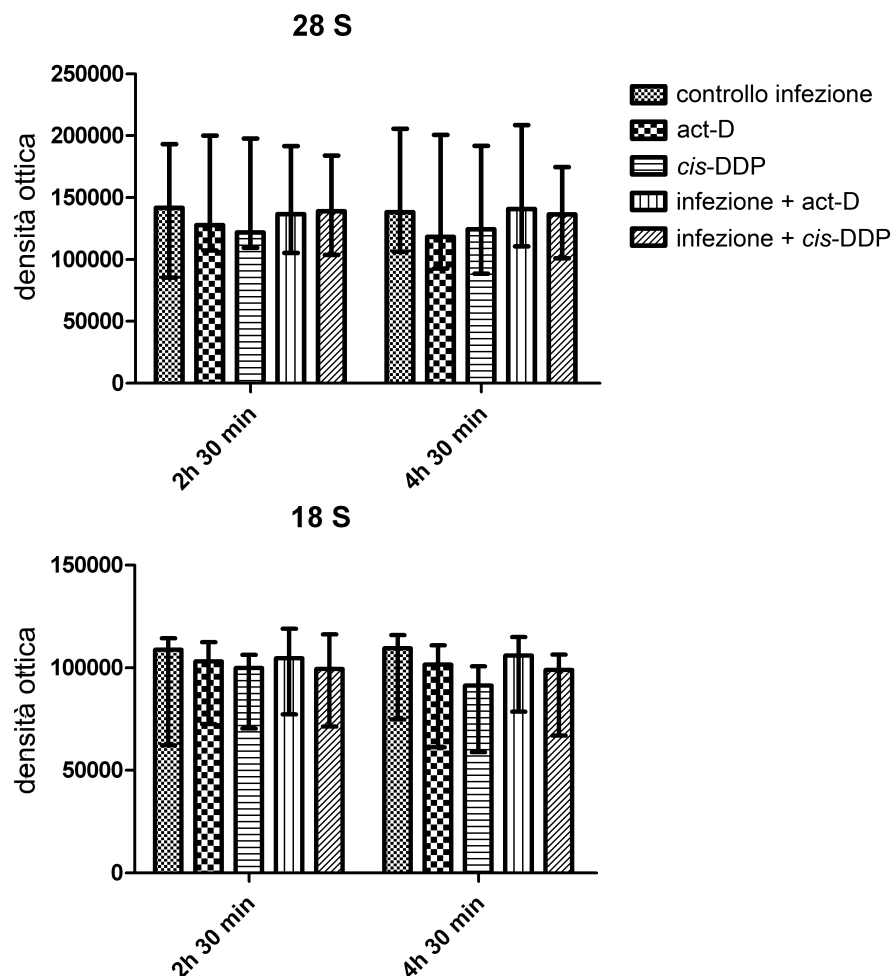
Utilizzando gli estratti ottenuti da cellule trattate con le due sostanze, infettate o non sottoposte ad infezione, il frammento di 293 pb, corrispondente alla regione intronica ITS1, è stato rivelato, prevalentemente, solo a 35 cicli di amplificazione, con segnale molto più debole rispetto ai controlli non trattati, in cui la banda di 293 pb è rilevabile anche a 25 cicli di amplificazione. Tale risultato è compatibile con l'azione inibitoria esercitata da act-D e *cis*-DDP sulla trascrizione degli rRNA ribosomiali, operata dall'enzima RNA polimerasi I. Gli stessi estratti sono stati utilizzati come template per l'amplificazione della regione intronica (terzo introne) del pre-mRNA della  $\beta$ -actina. In tutte le condizioni sperimentali prese in considerazione, è stato rilevato l'amplificato atteso di 242 pb, con intensità paragonabile delle bande ottenute.

È anche importante sottolineare che il breve trattamento inibitorio della trascrizione dell'RNA ribosomiale non si traduce in una deplezione dei ribosomi nel citoplasma, come si evince dal confronto tra la quantità di rRNA estratto da cellule infettate e non infettate di controllo e cellule sottoposte a trattamento con le sostanze ad azione inibitoria sulla RNA polimerasi I (Figura 9).



**Figura 9.** Analisi comparativa dell'RNA presente in cellule infettate e di controllo trattate per un breve periodo con inibitori della trascrizione dell'rRNA. A: Identiche aliquote di RNA totale estratto da fibroblasti MRC5 infettati e non infettati, in presenza o in assenza di act-D e *cis*-DDP, sono stati separati in un gel al 2% di agarosio: la posizione delle bande 28S, 18S e 5S di rRNA è indicata a destra. "C": cellule di controllo non infettate; "a": 2 ore 30 min p.i.; "b": 4 ore 30 min p.i.; "a<sup>1</sup>": 2 ore 30 min controllo; "b<sup>1</sup>": 4 ore 30 min controllo. B: RT-PCR pattern di amplificazione del trascritto GAPDH (242 pb), utilizzando come template i campioni di RNA mostrati nella sezione A.

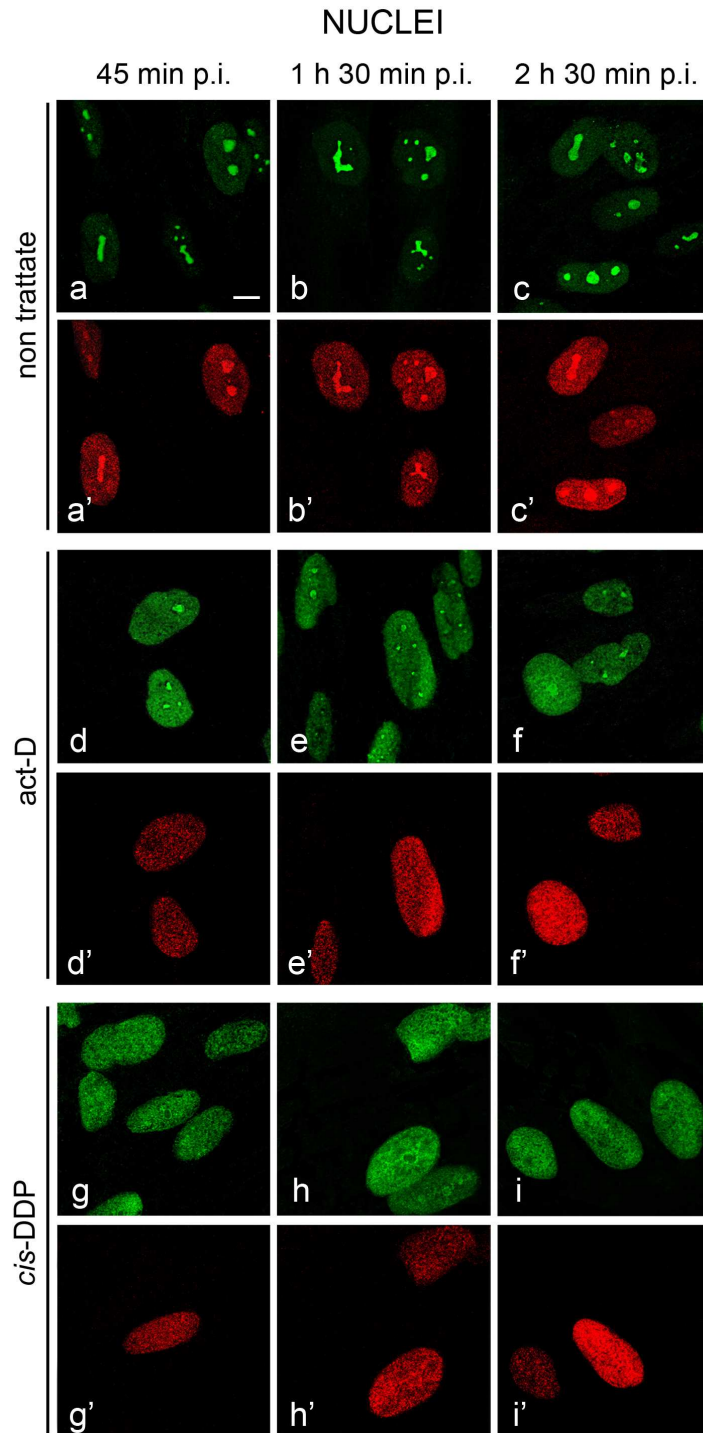
I campioni di RNA estratti sono stati analizzati mediante migrazione elettroforetica e l'intensità delle bande valutata con analisi densitometrica; i dati ottenuti da 4 differenti esperimenti sono stati successivamente sottoposti a rielaborazione statistica (ANOVA a due vie) (Grafico 1). Questo ha permesso di stabilire che non vi sono differenze significative tra le quantità di rRNA 18S e 28S nelle condizioni sperimentali adottate per sopprimere la trascrizione dell'rRNA, rispetto ai controlli.



**Grafico 1.** Analisi statistica dei dati sperimentali mostrati in Figura 9. L'intensità del segnale ottenuto in 4 esperimenti indipendenti è stato quantificato mediante analisi densitometrica (Gel Doc™; Software: Quantity One®, BioRad). Il grafico rappresenta la mediana di ciascuna condizione sperimentale (n=4), raggruppati in accordo con i tempi di infezione adottati. L'analisi statistica (ANOVA a due vie) non mostra differenze significative tra i gruppi.

In parallelo, nelle medesime condizioni sperimentali adottate per gli studi con tecniche di biologia molecolare sopra riportati, sono stati condotti esperimenti di immunofluorescenza su cellule MRC5 non infettate o a diversi tempi dopo l'infezione, in assenza o in presenza di act-D o *cis*-DDP. In accordo con i dati di uno studio precedente condotto dal nostro gruppo

di ricerca [Arcangeletti et al., 2003], che indicava una rapida localizzazione nucleolare per la proteina del tegumento virale pp65 in cellule infettate, anche in questi esperimenti i risultati conseguiti (Figura 10) permettono, innanzitutto, di confermare il preferenziale accumulo nel compartimento nucleolare dell'antigene virale. (Figura 10: pannelli a', b', c').



**Figura 10.** Analisi al microscopio confocale del profilo nucleare e nucleolare della proteina virale pp65 del virus parentale in presenza di inibitori della sintesi di rRNA in cellule MRC5 infettate con HCMV. Fibroblasti MRC5 sono stati coltivati su vetrino e infettati (m.o.i.=2) in assenza (non trattate) o in presenza ("act-D"; "cis-DDP") di inibitori dell'rRNA. Le cellule sono state fissate a 45 minuti, 1 ora 30 minuti e 2 ore 30 minuti p.i. e simultaneamente colorate con un anticorpo monoclonale diretto contro la fosfoproteina del tegumento virale di

HCMV di 65-68 kDa (pp65) e con un antisiero umano diretto contro un pool di proteine nucleolari. L'anticorpo anti-pp65 è stato rivelato con anticorpo anti-IgG di topo coniugato con rodamina (rosso) mentre le proteine nucleolari con anticorpo anti-IgG umana coniugato con fluoresceina (verde). Due sezioni equatoriali dello stesso campo sono mostrate in pannelli separati: a-i, proteine nucleolari; a'-i', pp65. Bar = 5µm.

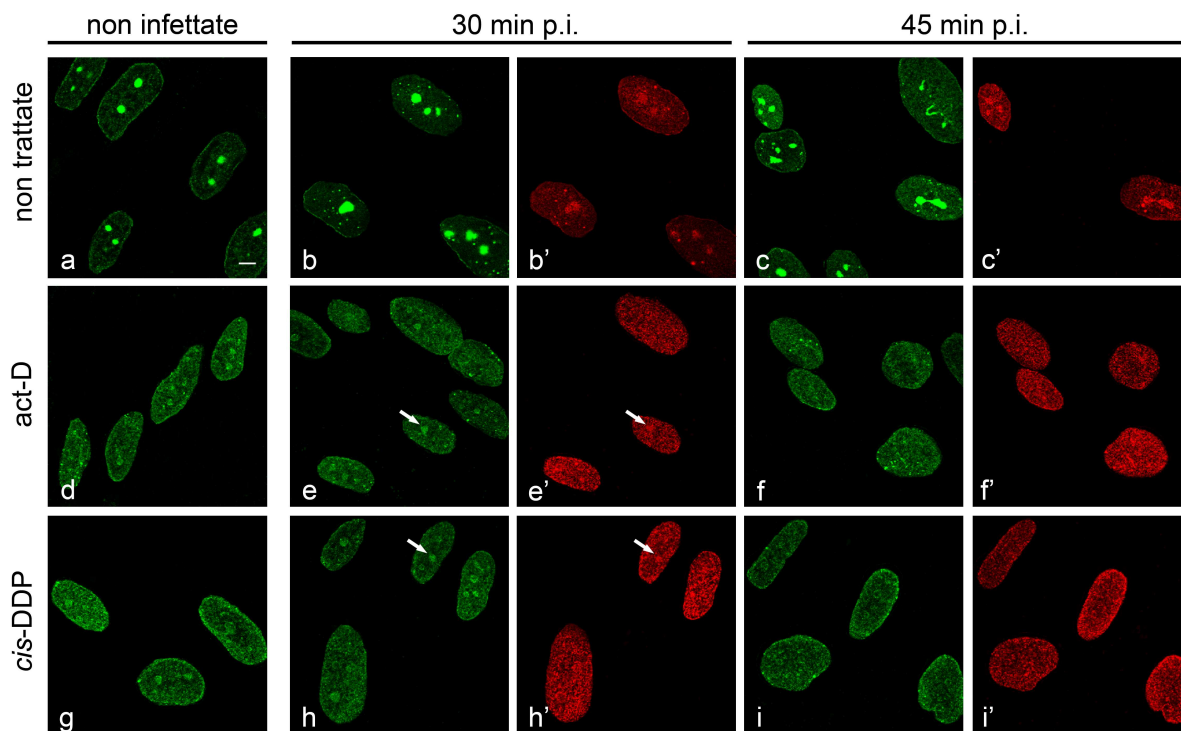
Le immagini acquisite al microscopio confocale, relative al doppio marcaggio per le proteine nucleolari (in verde) e per l'antigene pp65 (in rosso) in fibroblasti MRC5, infettati in assenza o in presenza degli inibitori della RNA polimerasi I, illustrano l'effetto delle suddette sostanze sulle proteine cellulari e virali.

Come atteso, l'azione di act-D e *cis*-DDP provoca una sostanziale redistribuzione delle proteine nucleolari (Figura 10: pannelli d, e, f, g, h, i) con dislocazione preferenziale alla periferia del nucleolo e, in maniera graduale, nel nucleoplasma, con conseguente effetto di "svuotamento" del nucleolo stesso. Per quanto attiene alla proteina virale, nei monostrati cellulari trattati con le suddette sostanze (Figura 10: pannelli d', e', f', g', h', i') si osserva una perdita di segnale nucleolare per pp65 e, anche in questo caso, una redistribuzione della proteina nel nucleoplasma. È interessante notare come la mancata localizzazione nucleolare di pp65 sia già nettamente visibile dopo 45' minuti di infezione mentre la redistribuzione delle proteine nucleolari appaia, ai tempi considerati, come un evento graduale, non del tutto completo in molte cellule.

Inoltre, in relazione ai risultati descritti, occorre sottolineare che i nucleoli sono stati marcati utilizzando un anticorpo policlonale diretto verso un pool di proteine nucleolari, ciascuna delle quali, presumibilmente, con un'affinità differente nei confronti del nucleolo (in particolare, quelle legate alla sintesi dell'rRNA). Pertanto, è possibile che specifiche proteine abbiano una cinetica di rilascio dal compartimento nucleolare sovrapponibile a quella di pp65, a seguito del trattamento con act-D o *cis*-DDP.

In esperimenti successivi, fibroblasti MRC5, sottoposti alla medesima azione inibitoria delle due sostanze (act-D e *cis*-DDP) in assenza o in presenza di infezione da HCMV, sono stati anche trattati, come dettagliatamente descritto nella sezione "Materiali e Metodi", al fine di ottenere l'estrazione di matrice nucleare *in situ* (Figura 11).

## MATRICE NUCLEARE



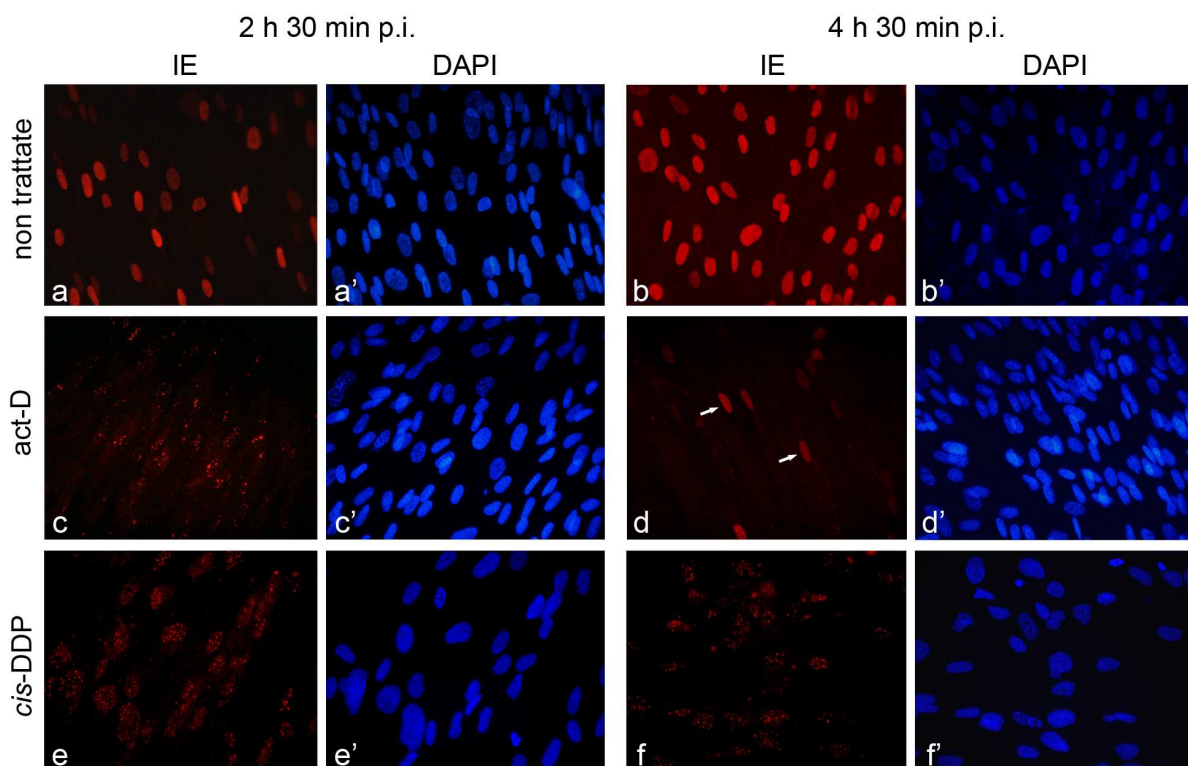
**Figura 11.** Analisi al microscopio confocale della matrice nucleolare associata a pp65 e delle proteine nucleolari a tempi differenti di infezione con HCMV (m.o.i.=2), in presenza di inibitori della sintesi di rRNA in cellule MRC5. Fibroblasti MRC5 sono stati coltivati su vetrino e infettati in assenza ("non trattate") o in presenza ("act-D"; "cis-DDP") di inibitori dell'rRNA (vedi la sezione "Materiali e Metodi"). Dopo 30 e 45 minuti p.i. le cellule sono state sottoposte ad estrazione della matrice nucleolare *in situ*, infine simultaneamente colorate con gli anticorpi già descritti per l'perimento mostrato in Figura 10. Cellule non infettate: è mostrata una sezione rappresentativa ottenuta al microscopio confocale per i pannelli a,d,g (proteine nucleolari). Cellule infettate ("30 min" e "45 min"): sono mostrate in pannelli separati (b,c,e,f,h,i: proteine nucleolari; b',c',e',f',h',i': pp65) due sezioni equatoriali dello stesso campo ottenute al microscopio confocale. Le frecce bianche nei pannelli e,e', h,h' indicano la colocalizzazione tra la matrice nucleolare e pp65. Bar = 5µm.

Anche nei controlli di matrici nucleari, in assenza di trattamento con act-D o cis-DDP (Figura 11: pannelli a, b, b', c, c'), la colocalizzazione tra pp65 e le proteine nucleolari è visibile già dopo 30 minuti di infezione. In presenza di act-D o di cis-DDP, si osserva un accumulo della fosfoproteina pp65 alla periferia del nucleolo ed in seguito, una completa perdita della localizzazione nucleolare della proteina virale. In questo caso tuttavia, a differenza di quanto osservato in cellule non trattate per la visualizzazione della matrice nucleolare (si veda Figura 10), la componente proteica nucleolare che rimane associata alla matrice è molto esigua già 30 minuti dopo l'infezione.

### 6.2 EFFETTI DELLA MANCATA LOCALIZZAZIONE NUCLEOLARE DI PP65 SULL'ESPRESSIONE DEI GENI PRECOCISSIMI VIRALI

Fibroblasti embrionali umani MRC5, trattati con act-D o cis-DDP a basse concentrazioni (insieme ai relativi controlli non trattati) e infettati con lo stipite virale AD169 di HCMV per

tempi brevi (2 ore 30 minuti e 4 ore 30 minuti p.i.), sono stati sottoposti a reazione di immunofluorescenza (Figura 12). Tale reazione è stata condotta impiegando un anticorpo monoclonale in grado di riconoscere un epitopo comune alle proteine virali precocissime IEp72 e IEp86 (prodotti principali dei geni IE1 e IE2).



**Figura 12.** Effetto modulatore della deplezione delle proteine nucleolari sulla espressione delle proteine precocissime virali di HCMV in fibroblasti MRC5. Le cellule sono state coltivate su vetrino per 48 ore, poi sono state infettate con HCMV (m.o.i.=2) in assenza (pannelli a,a'; b,b') o in presenza di act-D (pannelli c,c'; d,d') o di *cis*-DDP (pannelli e,e'; f,f'), ed infine sono state fissate dopo i tempi di infezione indicati. L'immunofluorescenza è stata eseguita al fine di rivelare le proteine precocissime di HCMV (IE) utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per l'epitopo comune codificato dall'esone 2 dei geni per IEp72 e IEp86. L'immunocomplesso è stato rivelato utilizzando un anticorpo anti-IgG di topo coniugato con rodamina (rosso, TRITC); i nuclei sono stati marcati con DAPI (blu). Le frecce nel pannello d indicano i nuclei che mostrano una rilevante espressione delle proteine virali IE. Le immagini sono state acquisite con un convenzionale microscopio a fluorescenza (ingrandimento: 500 X).

Il trattamento con le due sostanze provoca una significativa diminuzione dell'espressione delle suddette proteine virali all'interno dei nuclei delle cellule infettate (Figura 12: pannelli c, d, e, f). In particolare, dopo 2 ore e 30 minuti dall'infezione (Figura 12: pannelli c, e) le proteine IEp72 e IEp86 si esprimono in forma granulare, occupando regioni discrete e limitate nell'ambito del nucleoplasma, mentre a 4 ore e 30 minuti p.i. (Figura 12: pannelli d, f) il segnale è leggermente più marcato, ma sempre nettamente inferiore rispetto ai rispettivi controlli. Questi risultati riflettono un ritardo significativo nell'espressione delle proteine precocissime maggiori di HCMV, in seguito all'inibizione della trascrizione nucleolare

indotta da act-D e da *cis*-DDP e, verosimilmente, alla concomitante deplezione nucleolare della fosfoproteina virale pp65. È plausibile ipotizzare un ruolo modulatorio esercitato da uno o da entrambi i fattori sopra elencati (trascrizione dei geni nucleolari e/o ruolo della proteina virale pp65 in sede nucleolare) sull'espressione dei geni virali precocissimi, che a loro volta danno l'avvio e fungono da regolatori del ciclo litico di HCMV.

### **6.3 ALTERAZIONE DEL CICLO CELLULARE AD OPERA DI HCMV IN FIBROBLASTI MRC5**

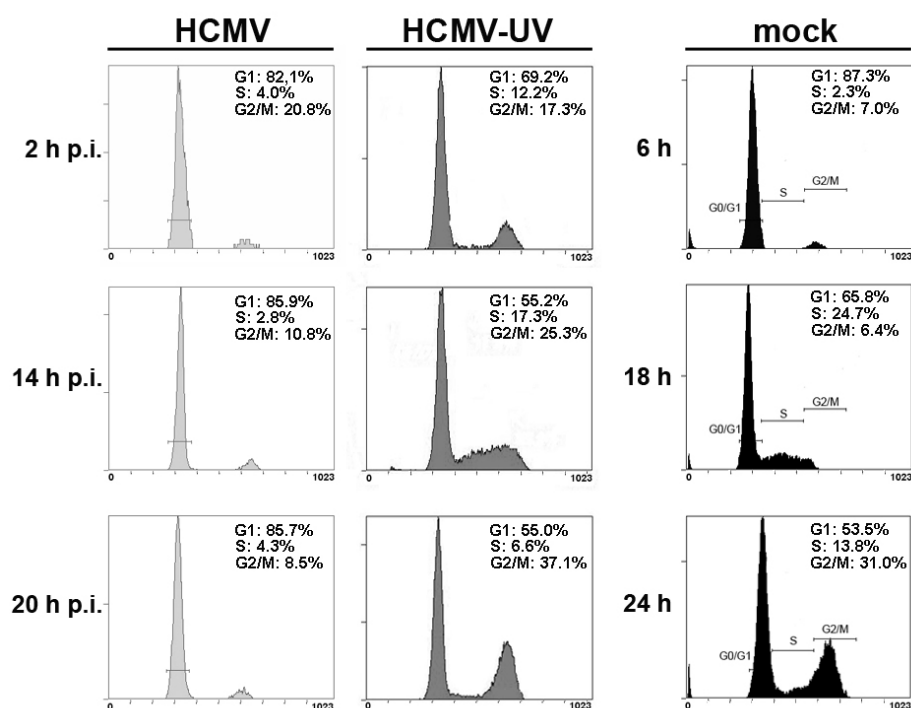
Al fine di valutare il possibile legame tra l'insediamento nucleolare di HCMV e l'alterazione di processi cellulari potenzialmente vantaggiosi per il virus, quali il ciclo cellulare, la cui regolazione avviene, in modo rilevante, anche nel nucleolo, la localizzazione nucleolare di pp65 e l'avvio del programma di espressione genica propria del ciclo litico da HCMV sono stati analizzati in relazione alle differenti fasi del ciclo cellulare.

Molti Autori descrivono come cellule infettate da HCMV subiscano una perturbazione nelle fasi del ciclo cellulare in diversi sistemi sperimentali [Salvant et al., 1998; Dittmer and Mocarski, 1997; Bain and Sinclair, 2007; Sanchez and Spector, 2008].

Allo scopo di attuare le suddette verifiche, l'infezione sperimentale da HCMV è stata studiata in una popolazione di cellule MRC5 che, dopo essere stata sincronizzata in fase G0 (tappeto cellulare a piena confluenza) ed a seguito di subcoltivazione, è stata arricchita, nel tempo, nelle diverse fasi del ciclo cellulare ed infettata nell'ambito di ciascuna di esse.

Applicando un protocollo sperimentale sviluppato dal nostro gruppo di ricerca e descritto dettagliatamente nel capitolo "Materiali e Metodi", fibroblasti MRC5 a confluenza, tripsinizzati e subcoltivati in piastre da 3 cm<sup>2</sup> (1 x 10<sup>6</sup> cellule/piastra) per un tempo sufficiente a sincronizzare le cellule in fase G1 ed infettati con HCMV (AD169, m.o.i.=3), sono stati monitorati a diversi tempi di infezione (2, 14 e 20 ore) mediante analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA, indice della percentuale di cellule in fase G1, S o G2/M (Figura 13; "HCMV", istogrammi in grigio chiaro). In parallelo, cellule non infettate sono state analizzate per lo stesso parametro (contenuto di DNA) ed agli stessi tempi (Figura 13; "mock", istogrammi in nero). In entrambe le condizioni, le cellule erano state fatte precedentemente aderire ai pozzetti per 4 ore; in tale modo, sia per cellule infettate, sia in assenza di virus, i tempi complessivi di coltivazione per i tre punti sperimentali analizzati sono stati di 6, 18 e 24 ore che, come già descritto, corrispondono a cellule arricchite in fase G1, S e G2/M. L'analisi citofluorimetrica dimostra che il virus che infetta le cellule sincronizzate in fase G1 è in grado di bloccare l'ulteriore evoluzione del ciclo cellulare, mentre in cellule non infettate si osserva l'atteso profilo di distribuzione del DNA nelle

diverse fasi del ciclo cellulare, come già illustrato in Figura 5. Parallelamente alle due condizioni sperimentali sopra citate, è stata valutata la distribuzione del contenuto di DNA anche in fibroblasti MRC5 infettati con virus inattivato agli UV (Figura 13; "HCMV-UV", istogrammi in grigio scuro): quest'ultima condizione è stata introdotta allo scopo di dimostrare che l'effetto di alterazione del ciclo cellulare, con evidente blocco delle cellule in fase G1 ed inibizione dell'avvio della fase S, fosse indotto dal virus replicantesi e non provocato semplicemente in seguito al legame ai recettori cellulari o da altri elementi presenti nel terreno di coltura (citochine o fattori di crescita).

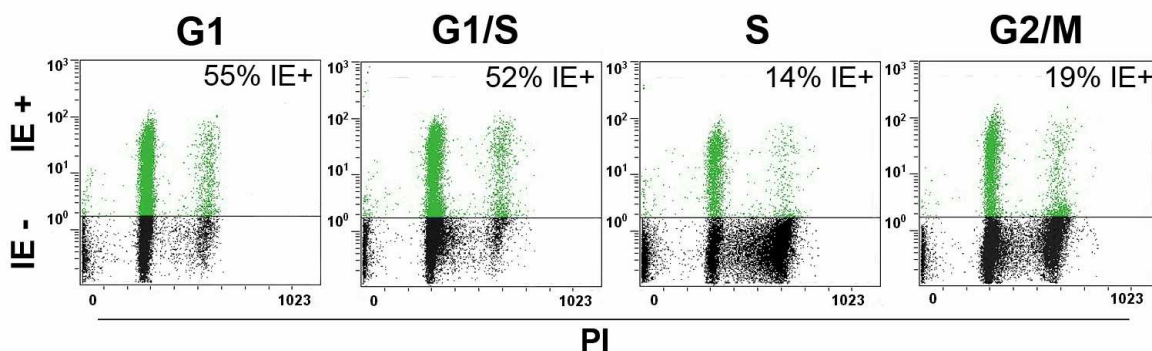


**Figura 13.** Dimostrazione dell'alterazione del ciclo cellulare in seguito all'infezione da HCMV. Fibroblasti embrionali umani MRC5 sono stati fatti aderire al substrato per 4 ore e, sincronizzati in fase G1, sono stati non infettati ("mock"), infettati con virus attivo (HCMV) o inattivato agli UV (HCMV-UV) con m.o.i.=3 PFU/cellula. Trascorsi i tempi di infezione indicati (2, 14 e 20 ore p.i., per tempi complessivi di coltivazione di 6, 18 e 24 ore, corrispondenti a quelli dei campioni di controllo non infettati) le cellule sono state raccolte, marcate con ioduro di propidio e sottoposte ad analisi citofluorimetrica per rilevare il contenuto di DNA, espresso come percentuale relativa di cellule in G1, S e G2/M nell'ambito della popolazione cellulare. I risultati mostrati nella figura (e le relative percentuali) derivano da un singolo esperimento, rappresentativo di altri tre saggi indipendenti con risultati simili.

#### 6.4 ANALISI DELL'EFFICIENZA DELL'INFEZIONE LITICA DA HCMV IN CELLULE SINCRONIZZATE NELLE DIVERSE FASI DEL CICLO CELLULARE

Monostrati di fibroblasti MRC5 a confluenza (G0), subcoltivati in piastre da 3 cm<sup>2</sup> per il tempo stabilito per sincronizzare le cellule nella fase del ciclo cellulare indicata (Figura 14), sono stati sottoposti ad infezione con lo stipite AD169 di HCMV (m.o.i.=3; 3 ore p.i.). La successiva analisi biparametrica del contenuto di DNA (colorazione con ioduro di propidio)

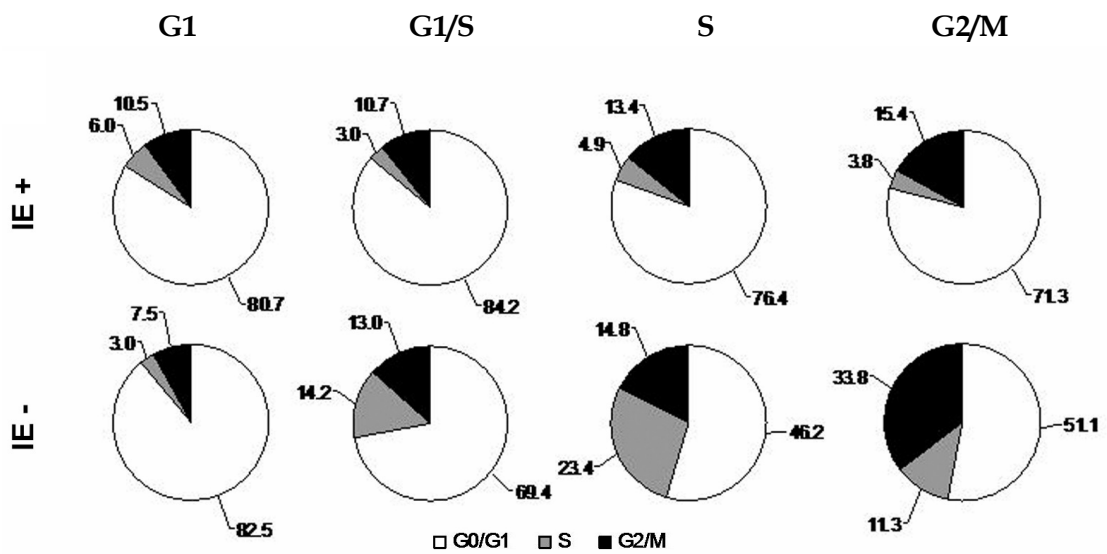
e dell'espressione degli antigeni IE virali mediante citofluorimetria a flusso (FACS) ha consentito di evidenziare le cellule infettate (IE+) in verde e non infettate (IE-) in nero.



**Figura 14.** Espressione dei geni precocissimi virali in differenti fasi del ciclo cellulare in cellule MRC5 sincronizzate. Monostrati confluenti di fibroblasti MRC5 sono stati sub-coltivati per il periodo di tempo necessario a sincronizzarli nella fase del ciclo cellulare di interesse, e successivamente infettati con HCMV AD169 (m.o.i.=3; 3 ore p.i.). Il pannello illustra l'analisi citofluorimetrica (rappresentazione grafica dot-plot) dell'espressione delle proteine IE e del contenuto di DNA (ioduro di propidio, PI). Le cellule sono state colorate con un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo comune dell'esone 2 dei geni per IEp72 e IEp86 di HCMV; l'immunocomplesso veniva rivelato utilizzando IgG anti-topo coniugate con fluoresceina; inoltre, le cellule sono state anche trattate con PI in qualità di intercalante del DNA. I "dots" in verde indicano le cellule che esprimono le proteine virali precocissime (IE+); quelli in nero rappresentano le cellule non infettate (IE-).

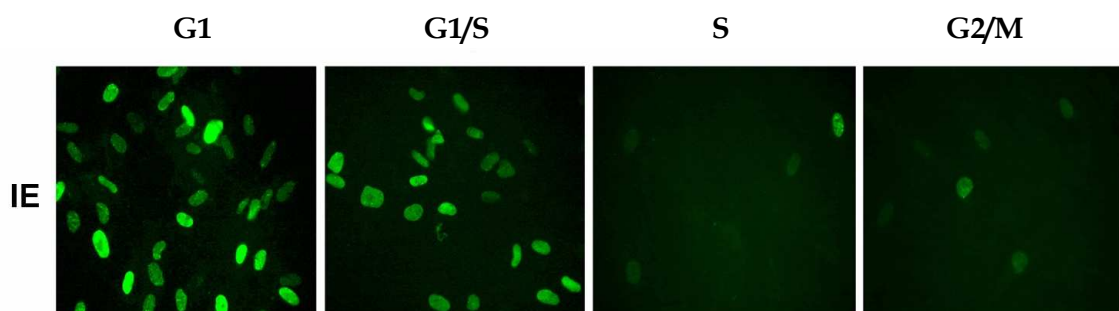
Osservando la rappresentazione grafica biparametrica ("Dot-Plot") in Figura 14, si evince che l'efficienza di infezione è significativamente elevata quando essa ha inizio in cellule sincronizzate in G1 (55% di cellule positive per IE) e/o G1/S (52%), mentre appare ridotta nelle fasi S (14%) e G2/M (19%).

La ripartizione delle cellule positive per le proteine virali IE nell'ambito delle popolazioni cellulari arricchite nelle differenti fasi del ciclo cellulare, mostra che le cellule infettate si trovano prevalentemente in G1. È soprattutto significativo che, anche nell'esiguo gruppo di cellule positive per IE in fase S (14%) ed in G2/M (19%), il 76,4% e 71,3% di esse, rispettivamente, risiede nella residua componente di popolazione cellulare che si trova in G1 (Figure 15).



**Figura 15.** Rappresentazione grafica della distribuzione percentuale relativa delle cellule infettate e non infettate in differenti fasi del ciclo cellulare. Le aree in bianco dei grafici sono rappresentative della popolazione cellulare in fase G0/G1, quelle grigie in fase S e quelle nere in fase G2/M. I dati sono stati calcolati sulla base di tre esperimenti indipendenti di citofluorimetria.

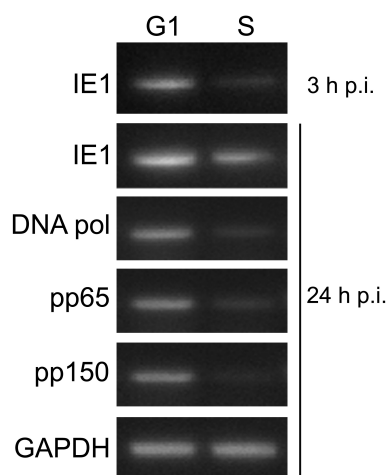
Parallelamente, le cellule sono state processate in immunofluorescenza mediante colorazione con anticorpi anti-proteine IE di HCMV (Figura 16, nuclei positivi in verde). Lo studio dell'espressione degli antigeni IE di HCMV nelle differenti fasi del ciclo cellulare mediante immunofluorescenza (come già osservato mediante analisi citofluorimetrica), mostra come in G1 ed in G1/S il tipico profilo di fluorescenza nucleare sia appannaggio di un numero significativo di fibroblasti, mentre solo un esiguo numero di cellule infettate è ravvisabile in S ed in G2/M.



**Figura 16.** Analisi al microscopio a fluorescenza dell'espressione degli antigeni virali IE di HCMV in fibroblasti MRC5 sincronizzati nelle differenti fasi del ciclo cellulare e infettati per 3 ore a m.o.i. 3 PFU/cellula. Le cellule del monostrato sono state fissate e colorate con un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo comune dell'esone 2 dei geni per IEp72 e IEp86 (IE) di HCMV. L'immunoreazione è stata rivelata con un anticorpo anti-IgG di topo coniugato con tracciante fluorescente (FITC). Le immagini del pannello sono state acquisite utilizzando un microscopio a fluorescenza convenzionale (ingrandimento: 500X).

Ad ulteriore conferma di quanto sopra illustrato, l'efficienza del programma di espressione genica virale in cellule sincronizzate in G1 e S è stata verificata mediante approccio

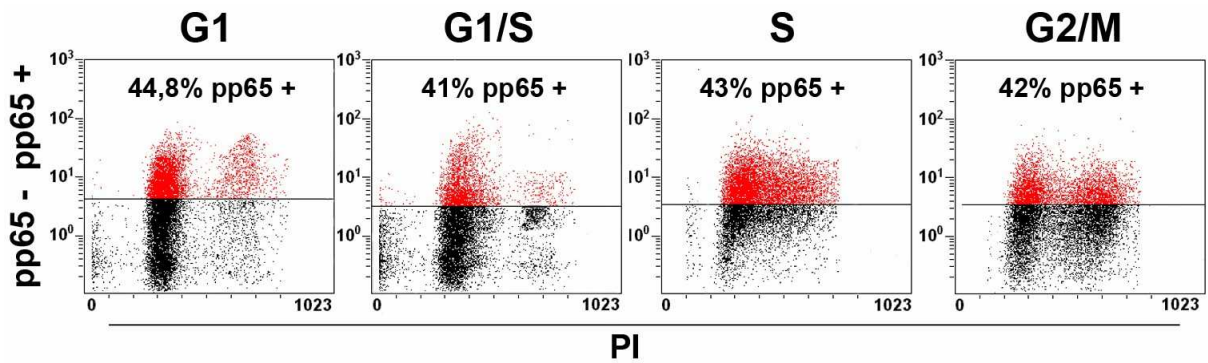
molecolare (RT-PCR), estendendo l'analisi eseguita limitatamente ai prodotti proteici dei geni precocissimi virali a quella dei trascritti rappresentativi di tutte le fasi del ciclo litico di HCMV (Figura 17). L'espressione dei trascritti virali ricalca quanto già osservato, suggerendo, quale condizione favorevole per il corretto avvio ed espletamento dell'infezione virale, la fase G1.



**Figura 17.** Profilo di amplificazione dei trascritti virali mediante RT-PCR, in cellule MRC5 sincronizzate ed infettate con HCMV. Monostrati di fibroblasti MRC5 in fase G0 sono stati sub-coltivati per il tempo necessario alla sincronizzazione degli stessi nelle fasi G1 e S del ciclo cellulare; successivamente, le cellule sono state infettate con HCMV (stipite virale AD169) a molteplicità di infezione di 3 PFU/cellula. L'RNA totale è stato estratto dopo 3 ore o 24 ore p.i. Sono stati utilizzati primers specifici per trascritti rappresentativi di geni precocissimi, precoci, precoci-tardivi, tardivi: IE1 (lunghezza del prodotto atteso: 303 pb), DNA polimerasi (lunghezza del prodotto atteso: 237 pb), pp65 (lunghezza del prodotto atteso: 213 pb), pp150 (lunghezza del prodotto atteso: 206 pb). Come controllo, è stato utilizzato il trascritto cellulare GAPDH (257 pb).

## 6.5 MONITORAGGIO DELLA PROTEINA PP65 DEL VIRUS PARENTALE IN CELLULE SINCRONIZZATE NELLE DIVERSE FASI DEL CICLO CELLULARE

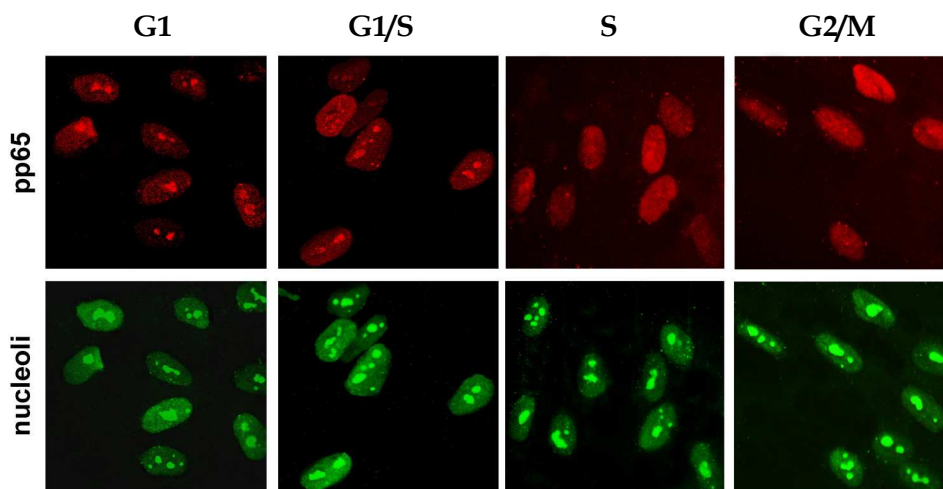
Fibroblasti MRC5 a confluenza (G0) sono stati tripsinizzati e subcoltivati per il tempo stabilito per sincronizzare le cellule in G1, G1/S, S e G2/M prima dell'infezione con lo stipite AD169 di HCMV (m.o.i.=3; 3 ore p.i.). La successiva analisi biparametrica del contenuto di DNA (colorazione con ioduro di propidio) e della proteina del tegumento virale pp65 mediante citofluorimetria a flusso ha consentito di evidenziare le cellule infettate (pp65+) in rosso e non infettate (pp65-) in nero (Figura 18).



**Figura 18.** Analisi citofluorimetrica (rappresentazione dot-plot) della proteina del tegumento (pp65) del virus in ingresso e del contenuto di DNA (ioduro di propidio, PI) in fibroblasti MRC5 sincronizzati nelle differenti fasi del ciclo cellulare, poi infettati con HCMV per 3 ore a m.o.i. 3 PFU/cellula. Le cellule sono state colorate con un anticorpo monoclonale diretto contro la fosfoproteina del tegumento virale di 65-68 kDa (pp65) di HCMV; l'immunocomplesso è stato rivelato utilizzando un anticorpo anti-IgG di topo coniugato con isotiocianato di fluoresceina (FITC). Le cellule sono state anche trattate con PI, in qualità di intercalante del DNA. In figura sono indicate con colori arbitrari le cellule infettate (pp65+), raffigurate in rosso, e le cellule non infettate (pp65-), in nero.

Come si può osservare e contrariamente a quanto rilevato per le proteine virali precocissime neoformate (si veda Figura 14), in questo caso la distribuzione della proteina pp65 del virus infettante si estende in maniera equivalente a tutte le fasi del ciclo cellulare (simili percentuali di cellule pp65+), a conferma del fatto che il virus è in grado di entrare nella cellula ospite indipendentemente dalla fase metabolica in cui la stessa si trova.

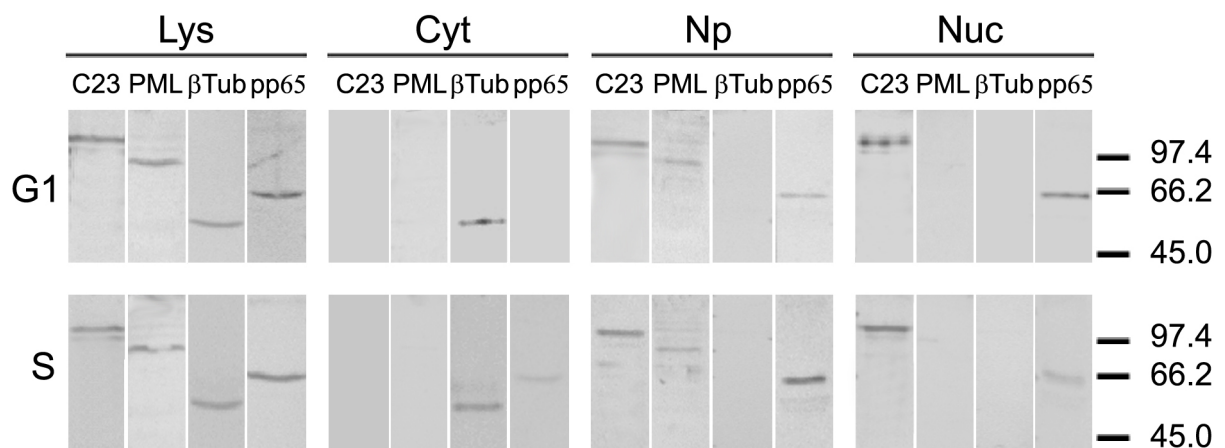
Parallelamente, le cellule sono state processate in immunofluorescenza con una doppia colorazione per il rilevamento della proteina pp65 di HCMV e per le proteine nucleolari. Come mostrato in Figura 19, l'accumulo nucleolare di pp65 è molto evidente in cellule sincronizzate in fase G1 e G1/S, mentre è nullo o trascurabile in cellule in fase S e G2/M.



**Figura 19.** Analisi al microscopio a fluorescenza della distribuzione nucleare e nucleolare della proteina virale pp65 in cellule MRC5 sincronizzate. Monostrati di fibroblasti MRC5 previamente sincronizzati in G1, G1/S, S, G2/M, sono stati infettati con HCMV per 3 ore a m.o.i. 3 PFU/cellula. Successivamente, sono stati fissati e sottoposti a doppia colorazione con un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina pp65 (analogamente a

quanto già descritto in figura 18) e con un antisiero umano diretto contro un pool di antigeni nucleolari. L'antigene virale è stato rivelato con un anticorpo anti-IgG di topo coniugato con TRITC (rosso), mentre le proteine nucleolari con un anticorpo anti-IgG umane coniugato con FITC (verde). Le immagini sono state acquisite utilizzando un microscopio a fluorescenza convenzionale (ingrandimento: 500X).

Ad ulteriore conferma della localizzazione nucleolare di pp65 [Arcangeletti et al., 2003, 2009] a tempi precoci dopo l'infezione, è stata valutata la distribuzione nucleare della suddetta proteina virale mediante approccio biochimico, previo frazionamento di cellule MRC5 sincronizzate in G1 e S e purificazione delle componenti proteiche (Figura 20).



**Figura 20.** Analisi biochimica della distribuzione nucleare e nucleolare della proteina virale pp65 in cellule MRC5 sincronizzate in fasi differenti del ciclo cellulare. Monostrati di fibroblasti MRC5 in fase G0 sono stati subcoltivati per il tempo necessario a sincronizzare le cellule in fase G1 e S, e successivamente infettati con HCMV AD169 (m.o.i.=3; 3 ore p.i.). Le cellule sono state quindi sottoposte a lisi e centrifugazioni differenziali al fine di ottenere le frazioni nucleolare (Nuc), nucleoplasmatica (Np) e citoplasmatica (Cyt) purificate. Le suddette frazioni, così come il lisato cellulare totale (Lys), usato come controllo, sono state sottoposte a SDS-PAGE e WB, utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene virale pp65 e anticorpi monospecifici diretti contro proteine cellulari (nucleolina, "C23"; proteina promielocitica "PML";  $\beta$ -tubulina, " $\beta$ Tub"), in qualità di marcatori delle frazioni nucleolare, nucleoplasmatica e citoplasmatica, rispettivamente. L'immunoreazione è stata rivelata con anticorpi anti-IgG di topo (proteina pp65 di HCMV) o di coniglio (proteine cellulari), coniugati con fosfatasi alcalina.

Fibroblasti MRC5 sincronizzati in differenti fasi del ciclo cellulare (G1 e S) ed infettati con lo stipite AD169 di HCMV, sono stati sottoposti a frazionamento biochimico per lo studio, mediante immunoblotting, della localizzazione nucleare, con particolare riferimento al distretto nucleolare, della proteina del tegumento virale pp65 durante le fasi precoci dell'infezione (3 ore p.i.). Come illustrato in Figura 20, la distribuzione di pp65 nei diversi compartimenti cellulari varia in relazione alla fase metabolica cellulare, confermando, anche mediante questo approccio sperimentale, una localizzazione nucleolare della proteina virale strettamente dipendente dal ciclo cellulare.

In particolare, in fase G1 si osserva un netto accumulo di pp65 nella frazione nucleolare (Nuc); un segnale positivo per la stessa proteina virale, sebbene di minore intensità rispetto a

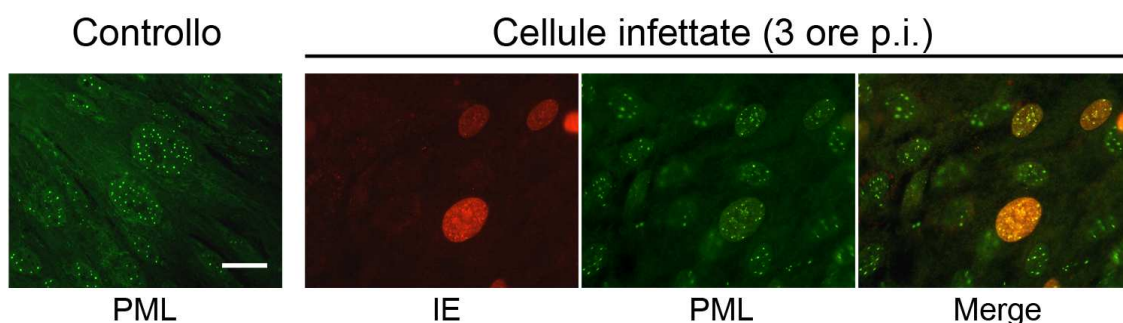
quello visibile a livello del nucleolo, si riscontra anche nella frazione nucleoplasmatica (Np) di cellule in G1. D'altra parte, la presenza di pp65 in cellule sincronizzate in S appare nettamente più scarsa, in modo particolare a livello nucleolare.

È anche interessante notare come il segnale per pp65 sia quantitativamente equivalente nel lisato totale (Lys) di fibroblasti MRC5 sincronizzati in G1 e in S, ad ulteriore dimostrazione del fatto che il virus è in grado di fare il suo ingresso nella cellula ospite indipendentemente dal suo stato metabolico, come già attestato dai dati ottenuti mediante analisi citofluorimetrica (si veda Figura 18). In definitiva, tale approccio biochimico rafforza la nozione secondo cui, a fronte di una identica efficienza di ingresso di HCMV (rappresentato dalla proteina pp65 del virus parentale) in cellule in G1 e in S, esiste invece un netto legame tra localizzazione nucleolare di pp65 e fase G1 del ciclo cellulare; non è casuale che tale fase corrisponda a quella in cui si ha la maggiore efficienza di espressione del genoma virale (si veda Figura 17).

Le stesse frazioni proteiche cellulari sono state fatte reagire anche con anticorpi anti-nucleolina (C23), anti-proteina promielocitica (PML) e anti- $\beta$  tubulina ( $\beta$ tub), marcatori dei distretti nucleolare, nucleoplasmatico e citoplasmatico, rispettivamente, in qualità di controllo del grado di purezza delle suddette frazioni ottenute mediante il protocollo di estrazione descritto nella sezione "Materiali e Metodi".

Il riscontro del segnale per C23, marcatore nucleolare, anche nella frazione nucleoplasmatica di cellule in G1 e in S non deve stupire considerando che, come già accennato, nucleolina è una proteina "shuttle", in particolare tra queste due frazioni, pur rimanendo, di norma, maggiormente concentrata nel nucleolo.

Altro aspetto da sottolineare è la scelta di PML come marcatore del nucleoplasma. In effetti, diversi Autori [Kelly et al., 1995; Muller and Dejean, 1999; Ahn and Hayward, 2000] illustrano come durante l'infezione da HCMV, o con altri virus a DNA tra i quali adenovirus e HSV, i "PML-nuclear bodies" sono disassemblati dal virus, poi eliminati già a tempi precoci dopo l'infezione. Pertanto, si è reso necessario verificare che, nelle condizioni sperimentali adottate per l'esperimento di biochimica mostrato in Figura 20, i PML fossero ancora presenti e potessero, pertanto, rappresentare validi marcatori nucleoplasmatici. Tale condizione appare rispettata, come dimostrano i risultati dell'esperimento di immunofluorescenza illustrato in Figura 21. Le immagini mostrano come, dopo 3 ore di infezione con HCMV i PML sono ancora ben visibili nel nucleoplasma con il caratteristico profilo a "spots" (in verde) e colocalizzano con gli antigeni IE di HCMV, in rosso [Ahn and Hayward, 1997; Arcangeletti et al., 2003].



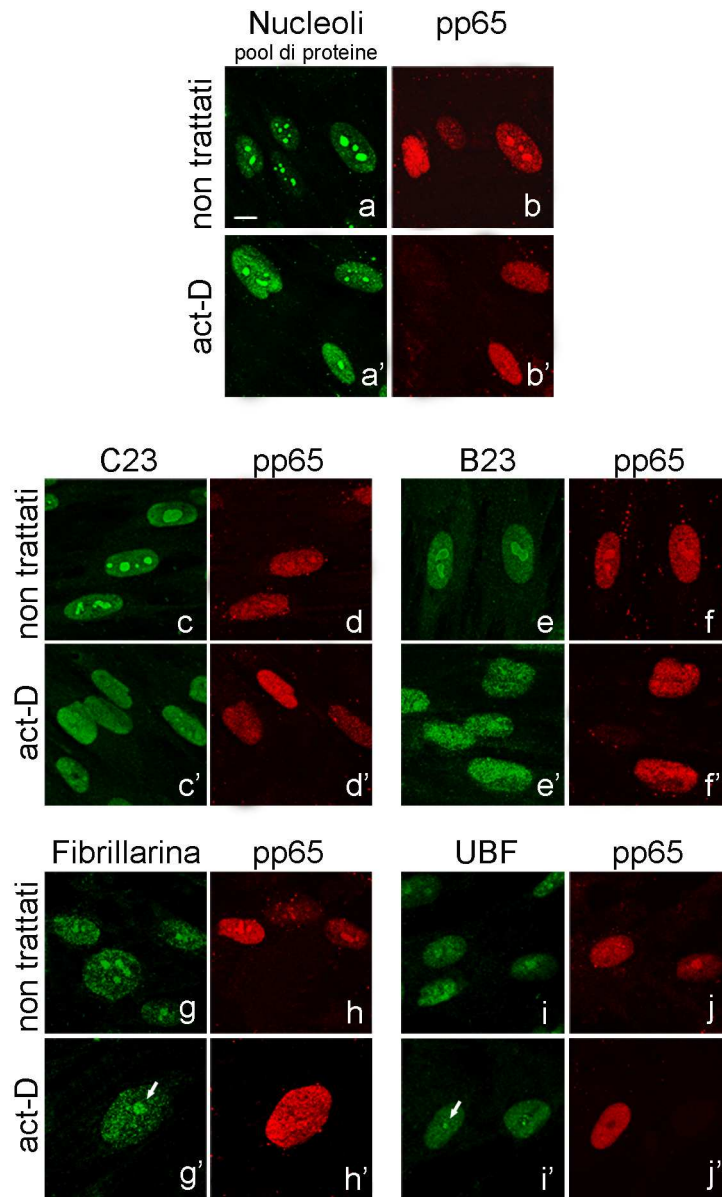
**Figura 21.** Analisi al microscopio a fluorescenza della distribuzione della proteina PML (proteina promielocitica) in cellule MRC5 non infettate (controllo) o infettate (3 ore p.i., m.o.i.=3). Le cellule sono state fissate e sottoposte a doppia colorazione in immunofluorescenza con un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo comune dell'esone 2 dei geni per IEp72 e IEp86 (IE) di HCMV e con un anticorpo policlonale anti-PML (PML). L'anticorpo anti-IE è stato rivelato con immunoglobuline anti-IgG di topo (in rosso, TRITC), mentre le proteine cellulari con anticorpi anti-IgG di coniglio (in verde, FITC). Bar = 10  $\mu$ m.

## 6.6 RICERCA DI POSSIBILI "PARTNERS" MOLECOLARI DELLA PROTEINA PP65 DI HCMV A LIVELLO NUCLEOLARE.

### 6.6.1 STUDIO DELLA CINETICA DI RILASCIO DELLA PROTEINA VIRALE PP65 DALLA SEDE NUCLEOLARE, IN RELAZIONE A SPECIFICHE COMPONENTI PROTEICHE DEL NUCLEOLO

I risultati illustrati in Figura 10 hanno messo in evidenza come l'impiego di actinomicina D (o *cis*-DDP) a bassa concentrazione determini una rapida deplezione nucleolare di pp65, già completa in un arco temporale compreso tra 45 minuti ed 1 ora e 30 minuti, dipendentemente dalla molteplicità di infezione utilizzata. Per quel che riguarda la concomitante deplezione delle proteine nucleolari a seguito del suddetto trattamento, monitorata mediante l'utilizzo di un anticorpo policlonale diretto verso un pool di proteine del nucleolo (in particolare, nucleolina, ku, PM-Scl), questa avviene secondo una cinetica di rilascio diversa da quella osservata per pp65 (il fenomeno è infatti più graduale e si completa solo dopo 5 ore). Tale osservazione non era inattesa, dal momento che, in realtà, la cinetica osservata riflette il rilascio di diverse componenti proteiche del nucleolo, verosimilmente presenti a diverse concentrazioni e/o complessate o meno con altre molecole in quella sede. Esperimenti analoghi a quello mostrato in Figura 10 sono stati ripetuti utilizzando anticorpi monospecifici, che riconoscono singole proteine nucleolari. Sono state prese in considerazione le proteine maggiormente rappresentate a livello del nucleolo e di rilevanza funzionale nell'ambito del controllo del ciclo cellulare e/o della trascrizione di rDNA (nucleolina, nucleofosmina, fibrillarina e UBF).

I pannelli di seguito riportati (Figura 22), mostrano i risultati di esperimenti di doppio marcaggio in immunofluorescenza (proteine nucleolari, in verde; proteina del tegumento virale pp65, in rosso), analizzati mediante microscopia confocale.



**Figura 22.** Analisi al microscopio confocale del profilo di distribuzione della proteina virale pp65 in presenza di inibitori della sintesi dell'rRNA in fibroblasti MRC5 infettati con HCMV (AD169). Fibroblasti MRC5 coltivati su vetrino ("shell vials") sono stati infettati con HCMV (m.o.i.=2) in assenza ("non trattati") o in presenza di actinomicina D ("act-D"), inibitore della sintesi di rRNA. La durata dell'infezione virale è stata di 1 ora e 30 minuti in cellule non trattate e trattate con act-D. In queste ultime, i primi 45 minuti di infezione si sono svolti in presenza della sostanza; questa è stata poi rimossa dal mezzo e l'infezione protratta per ulteriori 45 minuti. Infine, le cellule sono state fissate e colorate simultaneamente con un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina pp65 di HCMV (b, b', d, d', f, f', h, h', j, j') e con anticorpi policlonali diretti contro specifiche proteine nucleolari (nucleolina, C23: c, c'; nucleofosmina, B23: e, e'; Fibrillarina: g, g'; UBF: i, i'). Come controllo, è stato utilizzato un antisiero umano diretto contro un pool di proteine nucleolari (a, a'). La fosfoproteina del tegumento virale è stata rivelata con un anticorpo anti-IgG di topo (in rosso, TRITC), mentre le proteine nucleari C23, B23, Fibrillarina e UBF con un anticorpo anti-IgG di coniglio (in verde, FITC) e il pool di proteine nucleolari con anticorpo anti-IgG umane (in verde, FITC). Due sezioni equatoriali dello stesso campo, acquisite al microscopio confocale, sono riportate in pannelli separati. Le frecce nei pannelli (g') e (i') indicano la presenza della proteina nucleolare indicata e la concomitante assenza di segnale per la proteina virale pp65 (h', j'). Bar = 5 µm.

Come si può osservare, la cinetica di rilascio dalla sede nucleolare delle proteine considerate, è caratteristica per ciascuno degli antigeni studiati.

In particolare, i dati ottenuti indicano che sia fibrillarina, sia UBF non mostrano una cinetica di rilascio sovrapponibile a quella della proteina virale pp65, rimanendo ancora rivelabili (anche se in quantità ridotta) nel compartimento nucleolare dopo il tempo di infezione e trattamento considerati. Diversa è la situazione per le proteine nucleolari C23 e B23, il cui rilascio dal nucleolo è molto rapido e paragonabile a quello della suddetta proteina di HCMV. Se da un lato questi dati non forniscono indicazioni conclusive quanto alla individuazione dei possibili "partners" molecolari di pp65 nel nucleolo, dall'altro essi supportano un possibile coinvolgimento di C23 e B23 nell'interazione con tale proteina virale.

#### 6.6.2 INTERAZIONE TRA PP65 E NUCLEOLINA *IN VITRO*

I risultati preliminari ottenuti al microscopio confocale (Figura 22) sulla delocalizzazione dalla sede nucleolare dell'antigene virale pp65 e di specifiche proteine nucleolari (utilizzando act-D a bassa concentrazione), sottolineano una cinetica di rilascio simile per nucleolina (C23), così come per nucleofosmina (B23) e per la proteina virale, spiazzate dal nucleolo precocemente in seguito al trattamento con la suddetta sostanza.

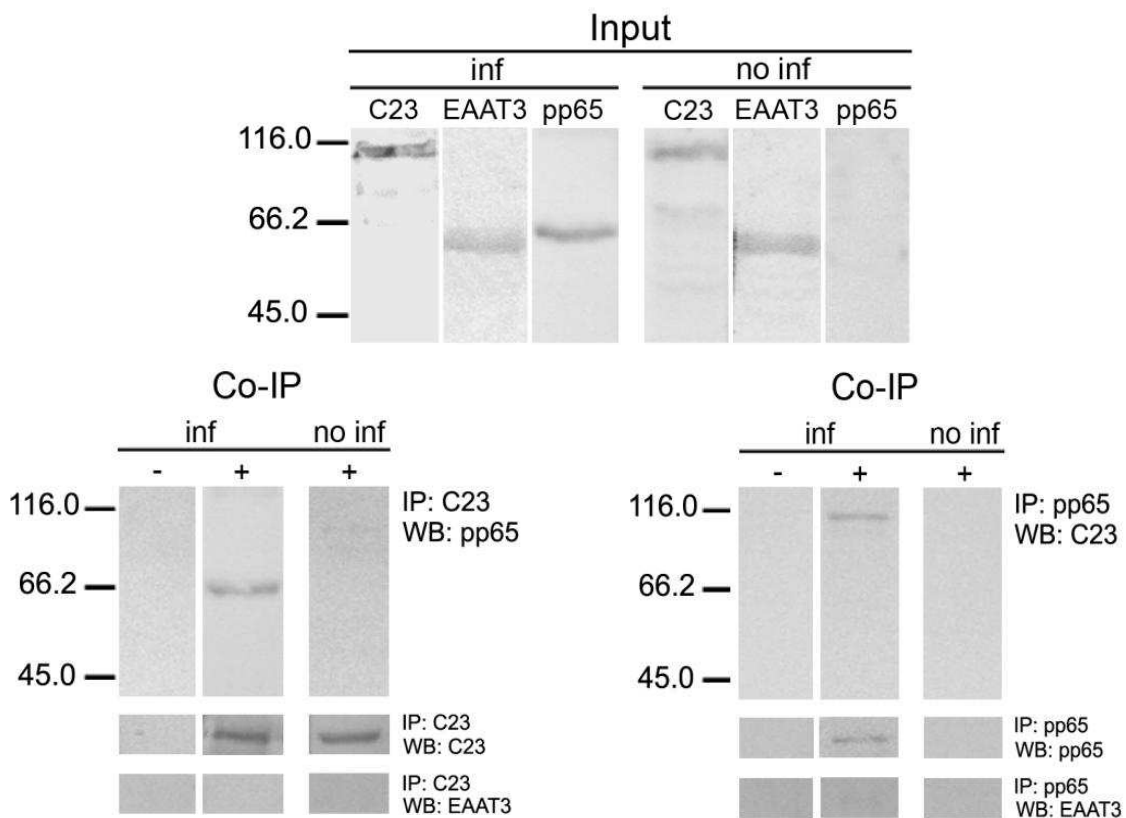
In questo studio è stata analizzata la possibile interazione tra pp65 e C23. Allo scopo, sono stati effettuati esperimenti di co-immunoprecipitazione (Co-IP) in fibroblasti MRC5 non infettati o in corso di infezione litica da HCMV (Figura 23).

La co-immunoprecipitazione, una delle tecniche immunochimiche più ampiamente usate, seguita da SDS-PAGE e immunoblotting, viene impiegata per vari scopi, tra cui lo studio delle interazioni proteina/proteina, la determinazione dell'attività enzimatica, il controllo di modificazioni post-traslazionali. In questo particolare caso, l'impiego della Co-IP è stato finalizzato alla valutazione della possibile esistenza di un complesso proteico tra pp65 e nucleolina, quest'ultima già individuata quale presunta partner dell'antigene virale, come ipotizzato dai risultati ottenuti mediante gli esperimenti di microscopia confocale mostrati in Figura 22 e, sempre indirettamente, dalle indagini biochimiche illustrate in Figura 20.

L'estratto cellulare totale (Figura 23, "input") proveniente da fibroblasti MRC5 infettati (o non infettati) con lo stipite virale AD169 di HCMV (m.o.i.=3; 3 ore p.i.) è stato co-immunoprecipitato con l'anticorpo anti-C23 (Figura 23, IP: C23) o con l'anticorpo anti-pp65 di HCMV (Figura 23, IP: pp65). Le proteine sono state successivamente separate in SDS-PAGE e trasferite su membrana di nitrocellulosa per l'immunorivelazione in Western

blotting con un anticorpo anti-pp65 (Figura 23, WB: pp65) o anti-C23 (Figura 23, WB: C23), per i complessi immunoprecipitati con C23 e con pp65, rispettivamente. Come controllo, è stato utilizzato un anticorpo anti-EAAT3 (per gentile concessione del Prof. Ovidio Bussolati, Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sezione di Patologia Generale e Clinica, Università degli Studi di Parma), che riconosce una proteina di membrana che funge da canale di trasporto di amminoacidi (trasportatore di membrana del glutammato) e che non interagisce né con la proteina nucleolare C23, né con l'antigene virale pp65.

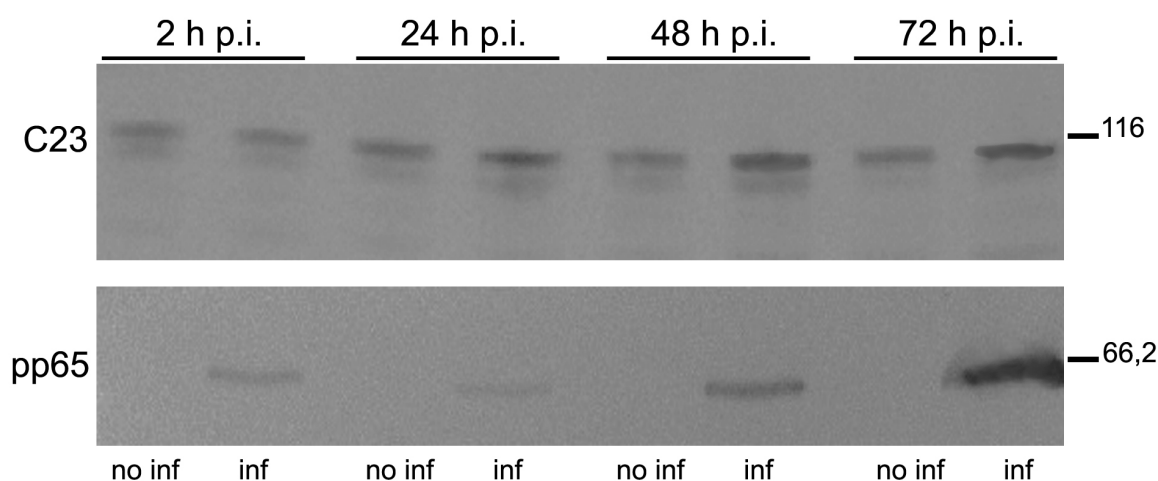
I risultati mostrano che, utilizzando un anticorpo policlonale anti-C23 per l'immunoprecipitazione e un anticorpo monoclonale anti-pp65 per la rivelazione in WB, la proteina del tegumento virale (65 kDa) viene co-immunoprecipitata con nucleolina (circa 100 kDa). Come controllo positivo, le stesse frazioni proteiche immunoprecipitate con anticorpo anti-C23, sono state immunorivelate anche con anti-C23. Ad ulteriore conferma dell'attendibilità del risultato, non è stato rilevato alcun segnale utilizzando l'anticorpo anti-EAAT3. Analogamente, impiegando l'anticorpo anti-pp65 per l'immunoprecipitazione e l'anticorpo anti-C23 per il WB, quest'ultimo marcatore risultava presente nel complesso immunoprecipitato.



**Figura 23.** Co-immunoprecipitazione (Co-IP) reciproca da lisati totali di cellule MRC5 infettate (inf) e non infettate (no inf). I fibroblasti sono stati non infettati o infettati con lo stipite virale AD169 di HCMV (m.o.i.=3), per 3 ore. L'immunoprecipitazione è stata eseguita utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro nucleolina

(IP: C23) o un anticorpo monoclonale diretto contro l'antigene virale pp65 (IP: pp65), oppure con un siero preimmune di coniglio; il complesso immunoprecipitato ("+" ) o il controllo negativo ("-"), analogamente al lisato cellulare non immunoprecipitato (input) ottenuto da cellule infettate e non infettate, sono stati analizzati mediante Western blotting per la presenza dell'antigene virale pp65 (WB: pp65), della proteina nucleolare C23 (WB: C23) e del trasportatore di membrana EAAT3 (WB: EAAT3), quest'ultimo utilizzato come controllo negativo poiché non associato a C23 o pp65. I marcatori di peso molecolare sono indicati sulla sinistra della figura.

Altra osservazione di potenziale interesse, desumibile da quanto illustrato per i lisati totali ("input") di Figura 23, è che la quantità di nucleolina sembra essere maggiore nei lisati totali ottenuti da cellule infettate rispetto ai lisati acquisiti da cellule non infettate. Per confermare questa osservazione, i lisati preparati da cellule MRC5 infettate e non infettate a differenti tempi dopo l'infezione (2, 24, 48, 72 ore) sono stati esaminati mediante WB, utilizzando un anticorpo anti-C23 e un anticorpo diretto contro l'antigene virale pp65 (Figura 24).



**Figura 24.** Analisi in Western blotting del livello di espressione di nucleolina e della proteina virale pp65 in cellule MRC5 non infettate (no inf) o infettate (inf) con HCMV (AD169, m.o.i.=3). I tempi considerati sono riportati in figura.

Analizzando i segnali in WB, si può osservare come i livelli di espressione di C23 siano simili tra loro nei campioni non infettati (no inf), mentre i lisati ottenuti da cellule infettate (inf) evidenziano un incremento di espressione della proteina nucleolare già a 24 ore p.i., tendenza che appare ancora più marcata a 48 e 72 ore di infezione. L'antigene virale pp65 presente, come atteso, solo in cellule infettate, mostra un progressivo incremento con un picco a 72 ore p.i.. L'apparente discrepanza tra l'intensità del segnale per tale proteina virale, maggiore a 2 ore p.i. rispetto a quella rilevata a 24 ore p.i., si spiega considerando il fatto che tale prodotto proteico, codificato da geni virali "precoci-tardivi", non viene neo-sintetizzato nella cellula infettata prima di circa 20 ore p.i.. Pertanto, il segnale che si osserva dopo 2 ore

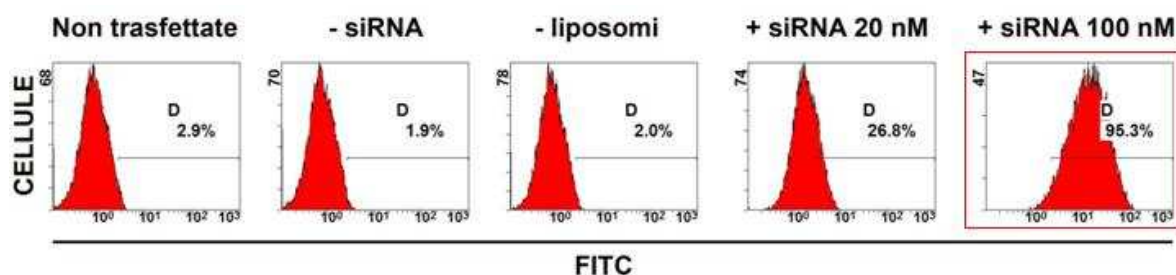
di infezione è dovuto alla massiccia presenza di pp65 nel virus parentale in ingresso nella cellula ospite.

## 6.7 SILENZIAMENTO DELLA COMPONENTE PROTEICA NUCLEOLARE (C23) POTENZIALMENTE COINVOLTA NELL'INTERAZIONE CON LA PROTEINA PP65 DEL VIRUS PARENTALE

### 6.7.1 EFFETTO DEL SILENZIAMENTO DI C23 SULLA LOCALIZZAZIONE NUCLEOLARE DI PP65

Allo scopo di verificare l'ipotetico ruolo di nucleolina quale "partner" di pp65, sono stati pianificati esperimenti di silenziamento genico della suddetta proteina per poterne studiare le ricadute sulla localizzazione nucleolare di pp65 e sul corretto espletamento del ciclo replicativo virale.

In una prima fase, sono state determinate le condizioni per la trasfezione in fibroblasti embrionali umani, verificando l'efficienza d'ingresso nelle cellule di siRNA di controllo ("small interfering RNA") marcati con un tracciante fluorescente a due differenti concentrazioni (20 nM e 100 nM) e in differenti condizioni, come illustrato nella Figura 25.



**Figura 25.** Prova preliminare mediante analisi citofluorimetrica, per verificare l'efficienza di trasfezione in cellule MRC5 con il prodotto "SuperFect Transfection Kit", della ditta Qiagen utilizzando un siRNA di controllo coniugato con un tracciante fluorescente (FITC). In figura sono riportati i grafici a istogrammi ottenuti mediante analisi citofluorimetrica dei differenti campioni: cellule non trasfettate; cellule trasfettate senza siRNA (-siRNA); cellule trasfettate senza liposomi (-liposomi); cellule trasfettate con due concentrazioni di siRNA (20 nM; 100 nM). In ordinata è riportato il numero di cellule, mentre in ascissa l'intensità della fluorescenza emessa (FITC). Il rettangolo rosso mette in evidenza la condizione che ha rivelato il valore percentuale più alto (95,3%) di emissione di fluorescenza, corrispondente alla concentrazione di 100 nM di siRNA.

Questa indagine preliminare, eseguita mediante analisi citofluorimetrica della presenza del tracciante fluorescente in cellule MRC5 trasfettate, ha permesso di rilevare che con siRNA alla concentrazione 100 nM, l'efficienza di trasfezione è del 95,3%, mentre con siRNA 20 nM essa scende a 26,8%. Come controlli, sono stati eseguiti paralleli esperimenti in condizioni di assenza di siRNA (-siRNA) o senza il reagente "SuperFect" (-liposomi): in entrambi i casi le percentuali (1,9% e 2,0%) di fluorescenza rilevata al citofluorimetro, sono paragonabili alle cellule non sottoposte a trasfezione (2,9%).

Successivamente, sono stati disegnati gli oligonucleotidi stampo dei 3 siRNA per il silenziamento di C23 mediante trasfezione di fibroblasti MRC5 con liposomi. I tre siRNA ottenuti dagli oligonucleotidi stampo mediante “Silencer siRNA Construction kit”, riconoscono tre regioni distinte sull’ mRNA di nucleolina. In Figura 26 viene riportata la sequenza del cDNA di nucleolina utilizzata per il disegno dei siRNA, chiamati Seq#2, Seq#4 e Seq#12, e la loro localizzazione sulla sequenza bersaglio; vengono anche indicati, con le frecce di colore nero, le regioni di appaiamento dei primers (F: 5’-AGGAGGAGGAAGAGCCTGTC-3’; R: 5’-AGCCACCTTCACCCTTAGGT-3’), disegnati a cavallo della regione silenziata, per l’amplificazione della sequenza di 1000 pb di una porzione del gene codificante per C23, quale controllo dell’avvenuto silenziamento.

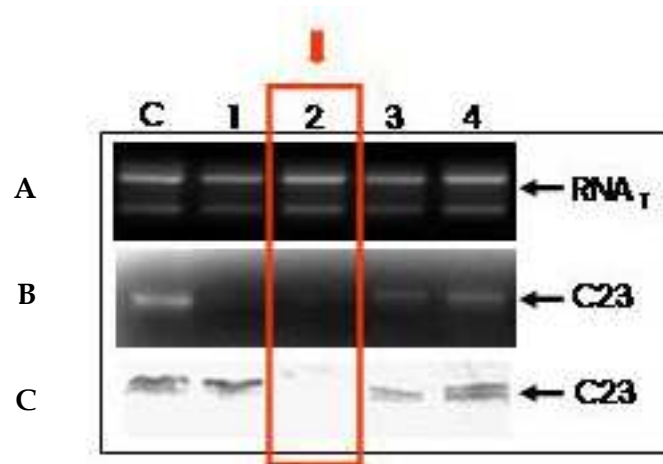
```

CTTTCGCCTC AGTCTCGAGC TCTCGTGGC CTTCCGGTGT ACGTGCTCCG GGATCTTCAG CACCCGCGGC GCCTCATGCC GTCGCTTGGC TTCTTCTGGA CTCATCTGCG CCACTGTGCC
GCTTCACACT CCGCCGCCAT CATGGTGAAG CTCGCGAAGG CAGGTAAAAA TCAAGGTGAC CCCAAGAAAA TGGCTCCTCC TCCAAAGGAG GTAGAAGAAG ATAGTGAAGA TGAGGAAATG
TCAGAAGATG AAGAAGATGA TAGCAGTGGG GAAGAGGTCC TCATACCTCA GAAGAAAGGC AAGAAGGCTG CTGCAACCTC AGCAAAGAAG GTGGTCGTTT CCCCAACAAA AAAGGTTTGA
GTTGCCACAC CAGCCAAAGAA AGCAGCTGTC ACTCCAGGCA AAAAGGCAGC AGCAACACCT GCCAAGAAGA CAGTTACACC AGCCAAAGCA GTTACCCAC CTGGCAAGAA GGGAGCCACA
CCAGGCCAAG CATTGGTAGC AACTCTGGT AAGAAGGGTG CTGCCATCCC GCCAAGGGG GCAAAGAATG GCAAAGAATG CAAGAAGGAA GACAGTGATG AAGAGGAGGA TGATGACAGT
AGGAGGATG AGGAGGATGA CGAGGAGCAG GATGAGGATG AAGATGAAAT TGAACGAGCA GCGATGAAAG CAGCAGCTGC TGCCCTGCC TCAGAGGATG AGGACGATGA GATGACGAA
GATGATGAGG ATGACGATGA CGATGAGGAA GATGACTCTG AAGAAGAAGC TATGGAGACT ACACCAGCCA AAGGAAAGAA AGCTGCAAAA GTTGTTCCTG TGAAGCCAA GAACGTGGCT
GAGGATGAAG ATGAAGAAGA GGATGATGAG GACGAGGATG ACGACGAGCA GAAGATGATG ATGATG ATGATGAAGA TGATGAGGAG GAGGAAAGAG AGGAGGAGGA GAGCCTGTC
AAAGAAGCAC CTGGAAGACG AAAGAAGGAA ATGGCCAAAC AGAAAGCAGC TCCTGA AACA Seq#12 ACAGAACC GACTACGGCTT TCAATCTCTT TGTTGGAAAC
CTAAACTTTA ACAAACTGCG TCCTGAATTA AAAACTGGTA TCAGCGATGT TTTTGTAAA AATGATCTTG CTGTTGTGGA TGTCAGAAAT GGTATGACTA GAAATTTTGG TTAATGGTAT
TTTGAATCTG CTGAAGACCT GGAGAAAGCG TTGGAACCTA CTGGTTTAAA AGTCTTTGGC AATGAAATTA AACTAGAGAA ACCAAAAGGA AAAGACAGTA AGAAAGAGCG AGATGCGAGA
ACACTTTTGG CTAATAATCT CCCTTACAAA GTCACCTCAG ATGAATTTGAA AGAAGTGTTT GAAGATGCTG CCGAGATCAG ATTAGTCAGC AAGGATGGGA AAAGTAAAGG GATTGCTTAT
ATTGAATTTA AGACAGAAGC TGATGACAGG AAAACCTTTG AAGAAAAGCA GGAACACAGG ATCGATGGGC GATCTATTTT COTGTACTAT ACTGGAGAGA AAGGTCAAAA TCAAGACTAT
AGAGGTGGAA AGAATAGCAC TTGGAGTGGT GAATCAAAA CTCTGGTTTT AAGCAACCTC TCCTACAGTG CAACAGAAGA AACTCTTCAG GAAGTATTG AGAAAGCAAC TTTTATCAAA
GTACCCGAGA ACCAAAATGG CAAATCTA Seq#2 TATAGAGTT TGCTTCATTG GAAGAGCCTA AAGAAGCTTT AAATTCCTGT AATAAAGGG AAATTGAGGG CAGAGCAATC
AGGCTGGAGT TGCAAGGACC CAGGGGATCA CCTAATGCCA GAAGCCAGCC ATCCAAAATC CTGTTTGTCA AAGGCTGCTG TGAGGATACC ACTGAAGAGA CATTAAAGGA GTCATTTGAC
GGCTCCGTTT GGGCAAGGAT AGTTACTGAC CCGGAAACTG GGTCTCCAA AGGTTTGGT TTTGTAGACT TCAACAGTGA GGAGGATGCC AAAGCTCCA AGGAGGCCAT GGAAGACGGT
GAAATTTGAT GAAATAAAGT TACCTTGGAC TGGCCAAAC CTAAGGGTGA AGGTGGCTTC GGGGTCCTT TGAGGCAG AGGCGGCTTT GGAGGACAG GTGGTGGTAG
AGGAGCCGA GAGGATTTG GTGGCAGAG CCGGGGAGG TTTGGAGG Seq#4 CCGAG CAGGAGG GAGGTGACA CAAGTCAGAA GGAAGAGGA
CGAAGTTTGA ATAGCTTCTG TCCCTCTGCT TTCCCTTTTC CATTGAAAG AAAGACTCTT GGGGTTTTTA CTGTTACCTG ATCAATGACA GAGCCTCTG AGGACATTCC AAGACAGTAT
ACAGTCTGT GGTCTCCTTG GAAATCCGTC TAGTTACAT TTCAAGGGCA ATACCCTGTT GGTTTTGACT GGATATTCAT ATAACTTTT TAAAGAGTGG AGTGATAGAG CTAACCTTTA
TCTGTGGG TTGAAATTA ATGTTTTCAT CCAATGTACA AAACATTTT TTCCACAAA TAGTTGGGT TTTGTTGTTG TTTCTTTTTT TTGTTTTTTT TTTTTTTTGC
GTTCTGGGG TTGAAGAAGA AAAGAAGCA GAATGTTTT TCATGGTTTT TGCTTCAGCG GCTTTAGGAC AAATTAAGG TCAACTCTGG TGCCCAAGAA AAAAAAAAAA

```

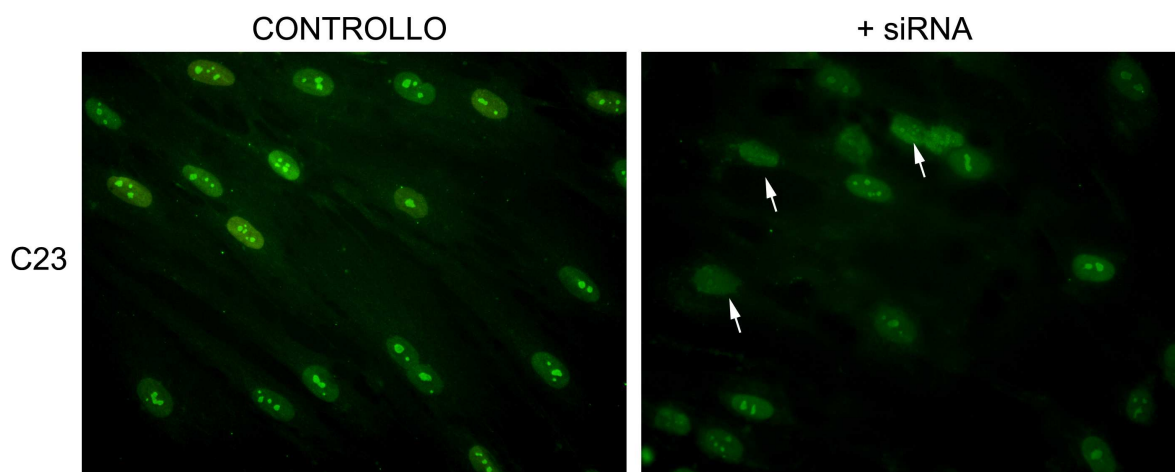
**Figura 26.** Sequenza “target” dell’ mRNA di nucleolina (C23), evidenziata dal rettangolo rosso, utilizzata con il programma “siRNA Target Finder” per disegnare le sequenze senso e antisense degli oligonucleotidi stampo per i siRNA (Seq#2; Seq#4; Seq#12) indicati in figura rispettivamente in rosso, celeste e fucsia, che sono state utilizzate con il prodotto commerciale “Silencer siRNA Construction Kit”. Le frecce nere indicano le regioni di appaiamento dei primers disegnati a cavallo della regione “target” ed impiegati come controllo dell’avvenuta reazione di silenziamento genico (prodotto di amplificazione atteso: 1000 pb).

Una volta ottenuti i siRNA per nucleolina, sono state eseguite 2 trasfezioni in cellule MRC5 non infettate a distanza di 24 ore e successivamente (dopo 1, 2, 3 e 4 giorni dalla seconda trasfezione), sono stati estratti l’RNA totale e le proteine cellulari totali (Figura 27). Tale approccio molecolare consente di bloccare l’espressione della proteina C23 neosintetizzata. Infatti, come evidenziato in Figura 27, nucleolina risultata inibita dopo 2 giorni dalla seconda trasfezione. Tuttavia, tale effetto inibitorio non si è rivelato permanente, come evidenziato dalla presenza del trascritto di C23 a 3 e 4 giorni dalla seconda trasfezione e dall’analisi della proteina mediante Western Blotting.



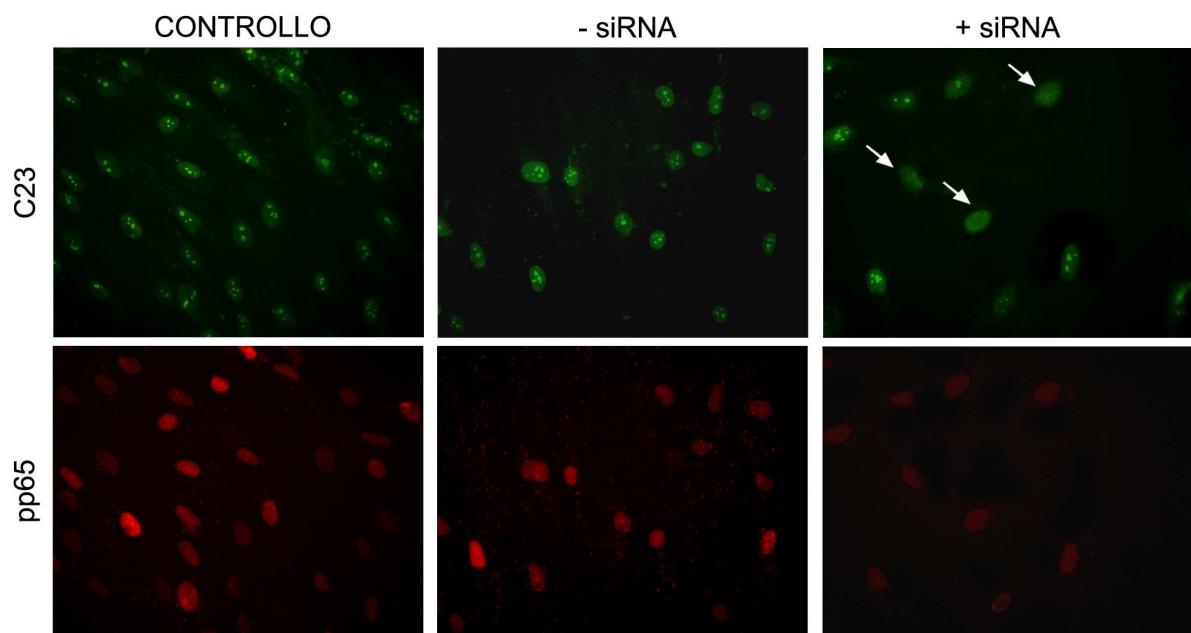
**Figura 27.** Verifica della inibizione dell'espressione della proteina neosintetizzata C23 (nucleolina) in fibroblasti MRC5 trasfettati con siRNA specifici per tale proteina. Le cellule sono state tripsinizzate e seminate in piastra, per essere sottoposte a trasfezione il giorno successivo. A distanza di 24 ore dalla prima trasfezione ne è stata eseguita una seconda; infine, le cellule sono state raccolte a distanza di 1, 2, 3, 4 giorni dalla seconda trasfezione per procedere all'estrazione dell'RNA totale o delle proteine totali. In figura vengono indicati rispettivamente con "C" il controllo non sottoposto a trasfezione e con "1", "2", "3", "4" i giorni di raccolta dei campioni dopo i due processi di trasfezione. A: RNA totale estratto dai differenti campioni analizzati; B: amplificazione dell'mRNA di nucleolina (C23), di circa 1000 pb; C: immunorivelazione degli estratti proteici mediante WB, utilizzando un anticorpo diretto contro la proteina nucleolare C23 (prodotto proteico atteso 100 kDa). Per rivelare l'immunocomplesso è stato utilizzato un anticorpo anti-coniglio coniugato con fosfatasi alcalina (PA). Il rettangolo e la freccia rossi evidenziano la condizione che si è rivelata efficace al fine di silenziare nucleolina nel modello sperimentale considerato (2 giorni dopo la seconda trasfezione).

Le condizioni adottate per il silenziamento di C23, che prevedono l'impiego di 3 differenti siRNA costruiti sulla base della sequenza genica di nucleolina (che sia in RT-PCR, sia in western blotting avevano dato risultati soddisfacenti), sono state impiegate anche in esperimenti di immunofluorescenza, inizialmente in cellule non infettate, ad ulteriore conferma dell'avvenuto abbattimento della proteina. Di seguito (Figura 28) vengono riportati i risultati di un esperimento rappresentativo in cellule non infettate.



**Figura 28.** Immunofluorescenza condotta su cellule MRC5 non infettate e non sottoposte a trasfezione, per la rivelazione della proteina C23 (CONTROLLO) e su cellule MRC5 non infettate, ma sottoposte a trasfezione per il silenziamento della proteina C23 (+ siRNA). Le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza (500X).

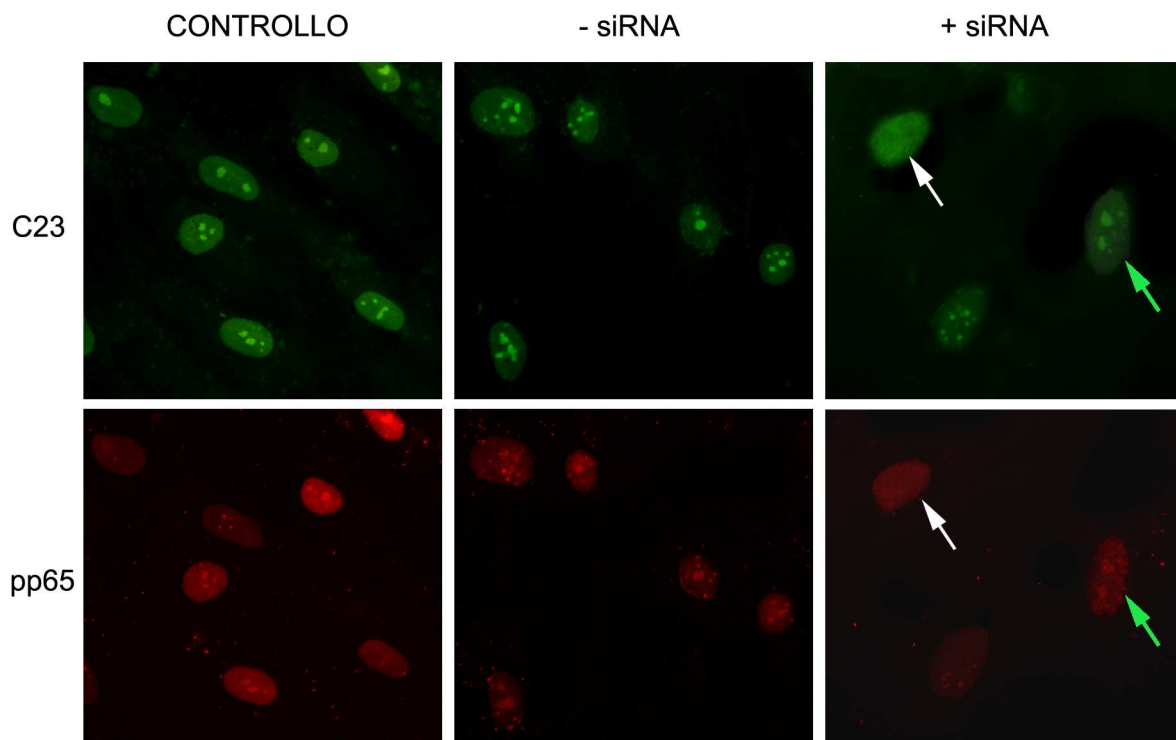
In particolare, è possibile osservare come nei campioni sottoposti a silenziamento, la proteina C23 sia scarsamente o affatto rilevabile a livello nucleolare in diverse cellule (Figura 28, frecce bianche), rispetto al controllo non sottoposto a trasfezione con i siRNA per nucleolina, in cui, invece, il marcaggio nucleolare per C23 è sempre riscontrabile. In seguito, monostrati MRC5, trasfettati e non trasfettati secondo il medesimo protocollo, sono stati sottoposti ad infezione con il ceppo AD169 di HCMV (m.o.i.=2; 2 ore p.i.) per monitorare la localizzazione nucleolare di pp65 nelle fasi precoci dell'infezione (Figura 29).



**Figura 29.** Silenziamento di nucleolina indotto da siRNA: effetto sulla localizzazione nucleolare di pp65. Fibroblasti MRC5 sono stati non trasfettati (CONTROLLO) o trasfettati con 3 differenti siRNA per nucleolina (+ siRNA) o solo con liposomi (- siRNA). Dopo 24 ore dalla prima trasfezione sono stati sottoposti ad un secondo ciclo di silenziamento con i medesimi siRNA; infine, sulla base del protocollo illustrato in figura 27, i monostrati cellulari sono stati sottoposti ad infezione con il ceppo AD169 di HCMV (m.o.i.=2, per 2 ore di infezione) e ad un doppio marcaggio per nucleolina (in verde) e pp65 (in rosso). Le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza. Ingrandimento: 500X.

Come illustrato in Figura 29, il “knock-down” di nucleolina determina uno scarso marcaggio nucleolare della suddetta proteina o addirittura la mancata rivelazione della stessa, in contrasto con quanto osservato nel campione di controllo e a conferma dei dati ottenuti in cellule non infettate, mostrati in Figura 28. Il risultato più saliente di questo esperimento riguarda le cellule infettate e silenziate per nucleolina, in cui si può constatare un evidente effetto negativo soprattutto sull’accumulo dell’antigene pp65 (rappresentativo del virus parentale) a livello nucleolare, oltre ad un’apparente diminuzione di efficacia di ingresso del virus nella cellula. Infatti, la classica localizzazione nucleolare di pp65 osservabile nel controllo, non è visibile nelle cellule sottoposte a trasfezione con i suddetti siRNA, ad eccezione di quei nuclei in cui è ancora rilevabile, seppure debolmente, la proteina cellulare

C23, come si può apprezzare chiaramente dall'osservazione di un dettaglio a maggiore ingrandimento della Figura 29, riportato in Figura 30.

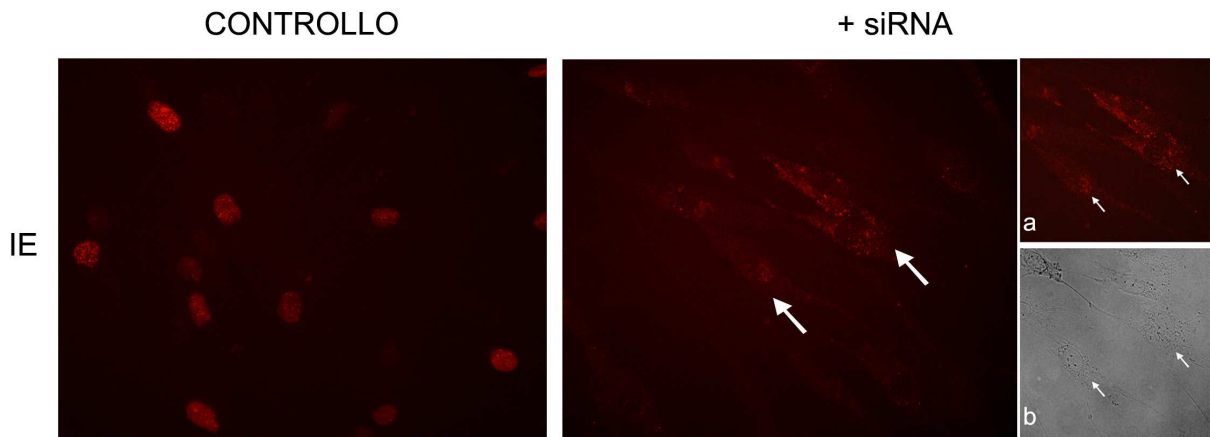


**Figura 30.** Silenziamento di nucleolina indotto da siRNA: effetto sulla localizzazione nucleolare di pp65. Dettaglio dell'immagine riportata in Figura 29: le frecce evidenziano l'effetto inibitorio sulla localizzazione della fosfoproteina virale a livello nucleolare (frecce bianche), ad eccezione di quei nuclei in cui è ancora rilevabile, seppure debolmente, la proteina cellulare C23 (frecce verdi).

Il risultato della trasfezione condotta in assenza della miscela di siRNA, ovvero solo con il substrato liposomiale che li veicola nella cellula (Figura 29 e 30, "- siRNA"), mostra una buona localizzazione nucleolare di C23 e pp65, e conferma che l'effetto inibitorio sulla compartimentalizzazione della fosfoproteina virale a livello nucleolare è un fenomeno legato specificamente alla presenza dei siRNA per nucleolina e quindi all'abbattimento dei livelli della proteina nucleolare, escludendo la possibilità di un effetto inibitorio aspecifico relativo all'utilizzo di liposomi.

#### 6.7.2 EFFETTO DEL "KNOCK DOWN" DI C23 SULL'EFFICIENZA DI INFEZIONE DA HCMV

Le conseguenze del silenziamento della proteina nucleolare C23 (e della parallela assenza della proteina virale pp65 nel nucleolo) sull'efficienza d'infezione virale, in particolar modo la ricaduta a livello dell'avvio del programma litico, sono state determinate 2 ore dopo l'infezione (m.o.i.= 2; 2 ore p.i.) attraverso la rivelazione delle proteine precocissime virali IEp72 e IEp86 (Figura 31).



**Figura 31.** Effetti del silenziamento della proteina C23 sull'espressione dei geni precocissimi (IE) virali in fibroblasti MRC5 infettati con HCMV (m.o.i.=2; 2 ore p.i.) e trasfettati con siRNA (+ siRNA), a confronto con cellule infettate nelle stesse condizioni, ma non trasfettate (CONTROLLO). I monostrati sono stati fissati e sottoposti ad immunofluorescenza per rilevare le proteine precocissime virali (IE), indicatori dell'efficienza di infezione. "a": dettaglio in IF; "b": dettaglio delle stesse cellule in contrasto di fase. Le frecce indicano la localizzazione peri-nucleare del marcaggio delle proteine virali IE in cellule trasfettate. Le immagini sono state acquisite al microscopio a fluorescenza e in contrasto di fase (ingrandimento 500X).

Il "knock-down" di nucleolina, che mostra un rilevante effetto inibitorio sulla localizzazione nucleolare di pp65, sembra influenzare anche i livelli di espressione dei prodotti genici precocissimi IEp72 e IEp86: il loro marcaggio risulta essere assente a livello nucleare o localizzato a livello citoplasmatico (come indicato in Figura 31, "+siRNA", dalle frecce bianche nel pannello principale e nei pannelli "a" e "b").

## 7 DISCUSSIONE

In questo studio sono stati apportati dati sperimentali a supporto dell'ipotesi di un coinvolgimento della fosfoproteina UL83 (pp65), uno dei maggiori componenti del tegumento di HCMV, in processi di regolazione del ciclo cellulare virus-indotti e nel corretto ed efficiente avvio del programma di espressione genica virale, attraverso la sua localizzazione nucleolare. In particolare, è stato dimostrato come tale putativa funzione della proteina pp65 del virus parentale nel corretto avvio del ciclo litico di HCMV venga rapidamente perduta, o addirittura non attuata, in seguito alla sua delocalizzazione dalla sede nucleolare, in concomitanza all'inibizione della sintesi dell'rRNA e alla deplezione delle proteine nucleolari [Arcangeletti et al., 2009]. A tale riguardo, occorre anche evidenziare che act-D e *cis*-DDP (le sostanze impiegate a bassa concentrazione per ottenere gli effetti sopra menzionati), agiscono con meccanismi differenti (act-D si intercala preferenzialmente a livello di regioni ricche in GC del DNA, mentre *cis*-DDP interferisce con l'attività della proteina UBF). Tale scelta è stata mirata al fine di minimizzare la possibilità (qualora si fosse usata una sola delle due sostanze) che gli effetti inibitori riscontrati relativamente all'avvio del ciclo litico da HCMV fossero in realtà dovuti ad un'azione diretta sul virus o a qualche effetto collaterale non ponderabile. L'osservazione di un simile effetto provocato da act-D e da *cis*-DDP sull'espressione delle proteine precocissime virali minimizza tale possibilità.

È anche interessante sottolineare come il ritardo nell'accumulo delle proteine virali IE nelle condizioni sperimentali sopra descritte non sia imputabile ad una diminuita (e quindi insufficiente) quantità di ribosomi per la traduzione delle proteine virus-specifiche. Infatti, il fenomeno è stato osservato dopo un periodo relativamente breve di trattamento con gli inibitori della trascrizione dell'rRNA e, ad ulteriore sostegno di tale osservazione, in tale arco temporale non è stata evidenziata alcuna ricaduta negativa sugli rRNA precostituiti. Quindi, sembra evidente che, in seguito ad inibizione della sintesi dell'rRNA (e concomitante deplezione nucleolare della proteina pp65), si attivi un processo che arresta la progressione dell'infezione virale.

È noto come diversi virus mostrino la capacità di modulare l'attività di trascrizione dei geni nucleolari attraverso differenti meccanismi: ad esempio, in letteratura è descritto che la proteina Tat di HIV si localizza a livello nucleolare e interagisce con fibrillarina provocando un'arresto nelle fasi di maturazione dell'rRNA, così come una significativa diminuzione del numero dei ribosomi a livello citoplasmatico, con conseguente induzione della cellula all'apoptosi [Ponti et al., 2008]. Un altro esempio è dato da poliovirus, che provoca uno "shut-off" della sintesi dell'rRNA [Banerjee et al., 2005], mentre l'infezione da adenovirus è

causa di disfunzioni nucleolari e blocco delle fasi di maturazione e trasporto dell'rRNA verso il citoplasma [Lawrence et al., 2006].

Per quanto riguarda la famiglia *Herpesviridae*, è stato dimostrato che l'infezione da *Herpes simplex* di tipo 1 induce una rapida inibizione della sintesi delle proteine cellulari, mentre la sintesi degli rRNA e delle proteine ribosomiali, così come l'assemblaggio dei ribosomi, non è influenzata neppure nelle fasi avanzate dell'infezione. Ciò nonostante, nelle cellule che albergano il virus i ribosomi subiscono diverse modificazioni, inclusi processi di fosforilazione e associazioni tra proteine cellulari e virali [Simonin et al., 1997; Diaz et al., 2002].

Contrariamente ad altri herpesvirus, HCMV è capace di stimolare la sintesi dell'RNA della cellula ospite, compreso l'RNA ribosomiale [Tanaka et al., 1975; Jarskaja et al., 2003]; tale effetto è accompagnato da una profonda riorganizzazione nucleolare [Jarskaja et al., 2002]. Di conseguenza, appare evidente come la presenza di specifiche componenti virali all'interno del compartimento nucleolare possa essere di notevole importanza per l'efficienza dell'infezione virale ipotizzando che, attraverso di esse, HCMV possa cooptare specifiche funzioni nucleolari a proprio beneficio.

Sebbene le funzioni di pp65 restino ancora non del tutto chiarite, ci sono diverse osservazioni a sostegno di un suo ruolo nella regolazione degli eventi iniziali dell'infezione. Questa ipotesi è supportata da osservazioni sperimentali relative alla localizzazione della proteina pp65 del virus in ingresso (e di quella neosintetizzata), a livello del nucleolo e della matrice nucleare [Sanchez et al., 1998; Arcangeletti et al., 2003, 2009]. Inoltre, è stata documentata un'attività di chinasi ascrivibile a tale antigene virale [Britt and Auger, 1986; Somogyi et al., 1990], così come una sua associazione con altre proteine regolatorie virali e/o chinasi cellulari [Gallina et al., 1999; Kamil and Coen, 2007]. Infine, da un lavoro di Dal Monte e collaboratori emerge che, in seguito alla soppressione della proteina pp65, si assiste all'inibizione della replicazione di HCMV in modelli sperimentali *in vitro* [Dal Monte et al., 1996b].

I risultati presentati in questo lavoro di tesi rafforzano l'ipotesi formulata, che descrive un coinvolgimento della proteina del tegumento virale pp65 nei meccanismi di regolazione e di "signaling" e che questa capacità sia strettamente correlata alla funzione del nucleolo e dipenda, direttamente o indirettamente, dalla trascrizione del DNA ribosomiale. In tale ottica, appare rilevante il controllo del ciclo cellulare delle cellule eucariote, così come la biogenesi dei ribosomi, a livello nucleolare [Ruggero and Pandolfi, 2003; Pliss et al., 2005].

È nota la capacità di HCMV di modificare, in diversi modelli cellulari, il normale svolgimento del ciclo cellulare della cellula ospite per direzionarlo a proprio vantaggio, attraverso l'arresto delle cellule in fase G1 o alla transizione G1/S [Dittmer and Mocarsky, 1997; Fortunato et al., 2002; Hertel and Mocarski, 2004; Bain and Sinclair, 2007].

A sostegno di questa osservazione vi sono studi che evidenziano la capacità di HCMV di indurre il suddetto blocco della progressione del ciclo cellulare, in particolare alla soglia della fase S (transizione G1/S), interferendo con la corretta formazione del complesso di pre-replicazione, presumibilmente prevenendo il legame dei Mini-Cromosomi (MCM) alla cromatina [Weibusch et al., 2003], e l'efficiente prosecuzione del programma di replicazione cellulare. D'altra parte, è stato anche dimostrato che HCMV non è in grado di bloccare il ciclo cellulare quando le cellule sono in attiva replicazione del proprio DNA, ossia quando, all'avvio dell'infezione, si trovano già in fase S. In tale condizione, la progressione del programma di replicazione virale viene posticipato alla successiva fase G1 [Fortunato et al., 2002; Hertel and Mocarski, 2004]. Si potrebbe affermare che HCMV adotti una duplice strategia: da un lato, esso ha la capacità di alterare la progressione del ciclo cellulare per assicurarsi un ambiente favorevole per sostenere un'efficiente sintesi del DNA virale e, dall'altro, è in grado di cooptare enzimi cellulari per favorire la replicazione del proprio genoma e, nel contempo, per abolire la sintesi del DNA cellulare.

Diversi componenti proteici nucleolari sono coinvolti nella regolazione della transizione G1 - G1/S del ciclo cellulare, principalmente attraverso processi di fosforilazione-defosforilazione dei fattori di trascrizione, e conseguente alterazione dell'interazione, o inattivazione, della RNA polimerasi I. Pertanto, sembrerebbe che la localizzazione nucleolare di pp65 che, come già accennato, possiede attività chinasi, possa rappresentare una strategia cruciale adottata dal virus per cooptare alcuni importantissimi meccanismi di controllo del ciclo cellulare, al fine di assicurare il corretto espletamento del programma litico.

A tale proposito, occorre ricordare che gli eventi che si verificano durante la transizione tra G1 e S sono tra i più importanti del ciclo cellulare: durante la fase G1 si assiste ad un aumento della sintesi e assemblaggio degli rRNA, in virtù della crescente necessità di sintesi di proteine per l'ingresso nella successiva fase S del ciclo cellulare. In particolare, in questa condizione del ciclo cellulare, è descritto il ruolo svolto da alcune proteine regolatorie appartenenti alla famiglia "retinoblastoma" (Rb), che mediano, di norma, l'inibizione di fattori trascrizionali (ad esempio il complesso E2F coinvolto nell'attivazione di importanti geni, i cui prodotti proteici conducono le cellule verso la fase S) [Hume and Kalejta, 2009]. La fosforilazione delle proteine Rb, nella tarda fase G1, determina il rilascio di fattori E2F

funzionali che, di conseguenza, stimolano la produzione di enzimi e di altre molecole necessarie per un'efficiente sintesi del DNA [Cam and Dynlacht, 2003; Hume and Kalejta, 2009]. Inoltre, alla fine della fase G1 si verifica l'assemblaggio dei complessi di pre-replicazione e, in particolare, il legame del complesso MCM a livello dell'origine di replicazione [Lei and Tye, 2001; Weibusch et al., 2003].

Sebbene la prosecuzione del programma litico di HCMV sia associata al grado di fosforilazione delle proteine Rb, ad alti livelli di espressione della ciclina E, così come alla presenza del fattore E2F trascrizionalmente attivo (entrambi indicatori proteici dell'ingresso della cellula nella fase S), è altrettanto evidente che la sintesi del DNA virale non avviene in concomitanza con la replicazione del DNA cellulare [Biswas et al., 2003].

I risultati presentati in questo lavoro di tesi sono in accordo con le conclusioni raggiunte da altri Autori, che mostrano come la condizione più favorevole per l'espletamento di un efficiente programma litico di HCMV presupponga che le cellule infettate risiedano nella fase G1 (e G1/S) del ciclo cellulare, e non procedano verso le successive fasi del ciclo cellulare. D'altra parte, come dimostrato anche in alcuni degli esperimenti presentati in questo studio, se la cellula ospite è già proiettata verso la sintesi del DNA (fase S) al momento dell'infezione, tale condizione non risulta favorevole alla replicazione del genoma virale; in particolare, in fase S si assiste all'assenza dei trascritti virali precoci (quali DNA polimerasi virale) e tardivi di HCMV.

Inoltre, i dati ottenuti in questo progetto di ricerca suggeriscono che HCMV possa acquisire il controllo del ciclo cellulare presumibilmente modificando (o compromettendo) alcune funzioni nucleolari. L'accumulo di pp65 di HCMV a livello nucleolare nelle fasi precoci dell'infezione litica e l'inibizione dell'espressione delle proteine precocissime virali, in seguito alla delocalizzazione nucleolare della fosfoproteina del tegumento virale [Arcangeletti et al., 2003, 2009], è accompagnato dall'osservazione che la localizzazione nel nucleolo della proteina virale pp65 si verifica in maniera preponderante in fase G1 e G1/S, mentre è assente, o scarsamente rilevabile, in fase S [Arcangeletti et al., 2011].

Come ampiamente descritto, il nucleolo non è solo deputato alla biogenesi dei ribosomi [Couté et al., 2006], ma è coinvolto in molte altre funzioni mediate dalle proteine che risiedono in tale distretto cellulare.

Tra queste, ad esempio, è stato riscontrato che nucleofosmina è in grado di interagire con la forma iperfosforilata delle proteine Rb, consentendo in tal modo la transizione alla fase S [Takemura et al., 2002]. Inoltre, l'aumento della trascrizione del DNA ribosomiale durante l'avanzamento della fase G1 è legato al grado di fosforilazione della proteina nucleolare UBF

[Sirri et al., 2008]. Anche per quanto riguarda nucleolina (C23), una delle principali proteine nucleolari, è stata descritta un'associazione con le proteine Rb nella fase G1 del ciclo cellulare e l'inibizione dell'attività di C23, in seguito alla perdita di legame con Rb, contribuisce alla proliferazione cellulare [Greinstein et al., 2006]. Altri studi suggeriscono che C23 possa essere coinvolta nel controllo della replicazione del DNA sia in condizione di shock termico, sia in situazioni metaboliche normali [Kim et al., 2005; Ugrinova et al., 2007; Greco, 2009].

In considerazione delle osservazioni riportate, le indagini sperimentali condotte sulla proteina nucleolare C23, in qualità di maggiore componente proteica nucleolare [Fatica and Tollervey, 2002; Hiscox, 2002], mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione reciproca, depongono per una probabile interazione della proteina virale pp65 con C23 durante le fasi precoci dell'infezione *in vitro*, nel modello cellulare adottato per questo progetto di ricerca [Arcangeletti et al., 2011]. I dati relativi all'abbattimento dei livelli della suddetta proteina cellulare mediante silenziamento genico, rafforzano ulteriormente il ruolo chiave di nucleolina nel mediare, presumibilmente, la localizzazione nucleolare di pp65, con conseguente inibizione dell'espressione delle proteine precocissime virali.

Tenendo conto della putativa attività chinasi di pp65 [Somogyi et al., 1990] e della sua capacità di interagire con altre chinasi virali e/o cellulari [Gallina et al., 1999; Kamil and Coen, 2007], come precedentemente accennato, è plausibile ipotizzare un coinvolgimento di tale fosfoproteina del tegumento di HCMV nella modulazione degli eventi di fosforilazione che guidano la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare e che avvengono nel compartimento nucleolare, con possibile delocalizzazione, o inattivazione, di una o più proteine nucleolari di rilievo nell'ambito del controllo del ciclo cellulare (tra cui nucleolina) e conseguente arresto sua della progressione.

Inoltre, è anche importante sottolineare come questa ricerca sia stata focalizzata sulla proteina pp65 di HCMV, che si accumula abbondantemente nel nucleolo, quale componente del virione in ingresso nella cellula, tralasciando, invece, lo studio della stessa quale prodotto neosintetizzato a tempi tardivi di infezione. In tale contesto, i dati ottenuti supportano l'ipotesi dell'esistenza di un meccanismo, ad oggi non noto, che impedisce la localizzazione del virus parentale nel nucleolo quando l'infezione avviene in cellule in fase S.

L'approfondimento delle conoscenze sull'interazione tra componenti virali di HCMV e proteine nucleolari potrà favorire non solo la comprensione di funzioni ancora inedite di questo distretto cellulare, ma anche portare, nel tempo, alla individuazione di possibili bersagli per la progettazione di terapie antivirali innovative.

## 8 BIBLIOGRAFIA

- Abate DA, Watanabe S, Mocarski ES. 2004. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* 78:10995-11006.
- Ahn JH and Hayward GS. 2000. Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DNA replication in human cytomegalovirus infection. *Virology* 274:39-55.
- Ahn JH and Hayward GS. 1997. The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J Virol* 71:4599-4613.
- Amin MA, Matsunaga S, Ma N, Tarata H, Yokoyama M, Uchiyama S, Fukui K. 2007. Fibrillarin, a nucleolar protein, is required for normal nuclear morphology and cellular growth in HeLa cells. *BBRC* 360:320-326.
- Andersen JS, Lam YW, Leung AKL, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M. 2005. Nucleolar proteome dynamics. *Nature* 433:77-78.
- Andersen JS, Lyon CE, Fox AH, Leung AKL, Lam YW, Steen H, Mann M, Lamond AI. 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol* 12:1-11.
- Arcangeletti MC, De Conto F, Ferraglia F, Pinardi F, Gatti R, Orlandini G, Calderaro A, Motta F, Medici MC, Valcavi P, Razin SV, Chezzi C, Dettori G. 2003. Human cytomegalovirus proteins pp65 and IEp72 are targeted to distinct compartments in nuclei and nuclear matrices of infected human embryo fibroblasts. *J Cell Biochem* 90(5):1056-1067.
- Arcangeletti MC, Rodighiero I, De Conto F, Gatti R, Orlandini G, Ferraglia F, Motta F, Covan S, Razin SV, Dettori G, Chezzi C, 2009. Modulatory effect of rRNA synthesis and ppUL83 nucleolar compartmentalization on human cytomegalovirus gene expression in vitro. *J Cell Biochem* 108(2):415-423.
- Arcangeletti MC, Rodighiero I, Mirandola P, De Conto F, Covan S, Germini D, Razin S, Dettori G, Chezzi C. 2011. Cell-cycle-dependent localization of human cytomegalovirus

UL83 phosphoprotein in the nucleolus and modulation of viral gene expression in human embryo fibroblasts in vitro. *J Cell Biochem.* 112(1):307-317.

- Arrode G and Davrinche C. 2003. Dendritic cells and HCMV cross-presentation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 276:277-294. Review.
- Bain M and Sinclair J. 2007. The S phase of the cell cycle and its perturbation by human cytomegalovirus. *Rev Med Virol* 17(6):423-434.
- Banerjee R, Weidman MK, Navarro S, Comai L, Dasgupta A. 2005. Modifications of both selectivity factor and upstream binding factor contribute to poliovirus-mediated inhibition of RNA polymerase I transcription. *J Gen Virol* 86:2315-2322.
- Bevington JM, Needham PG, Verrill KC, Collaco RF, Basrur V, Trempe JP. 2007. Adeno-associated virus interactions with b23/nucleophosmin: identification of sub-nucleolar virion regions. *Virology* 357:102-113.
- Biswas N, Sanchez V, Spector DH. 2003. Human cytomegalovirus infection leads to accumulation of geminin and inhibition of the licensing of cellular DNA replication. *J Virol* 77:2369-2376.
- Bodaghi B, Jones TR, Zipeto D, Vita C, Sun L, Laurent L, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Michelson S. 1998. Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J Exp Med* 188:855-866.
- Boehme KW, Guerrero M, Compton T. 2006. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol* 177:7094-7102.
- Boisvert FM, van Koningsbruggen S, Navascués J, Lamond AI. 2007. The multifunctional nucleolus. *Nature Reviews* 8:574-585.
- Boldogh EG and Vaczi L. 1978 Transformation of hamster embryonic fibroblast cells by UV-irradiated human cytomegalovirus. *Acta Microbiol Acad Sci Hung* 25:269-275.

- Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41:521-530.
- Boyle KA and Compton T. 1998. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Virol* 72:1826-1833.
- Boyne JR and Whitehouse A. 2006. Nucleolar trafficking is essential for nuclear export of intronless herpesvirus mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15190-15195.
- Bradshaw PA, Duran-Guarino MR, Perkins S, Rowe JI, Fernandez J, Fry KE, Reyes GR, Young L, Fong SKH. 1994. Localization of antigenic sites on human cytomegalovirus virion structural proteins encoded by UL48 and UL56. *Virology* 205:321-328.
- Bresnahan WA and Shenk T. 2000. A subset of viral transcripts packaged within viral particles. *Science* 288:2373-2376.
- Bresnahan WA, Boldogh I, Thompson EA, Albrecht T. 1996. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* 224:150-160.
- Britt WJ and Auger D. 1986. Human cytomegalovirus virion-associated protein with kinase activity. *J Virol* 59(1):185-188.
- Britt WJ and Mach M. 1996. Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology* 39:401-412.
- Browne EP and Shenk T. 2003. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 100:11439-11444.
- Browne EP, Wing B, Coleman D, Shenk T. 2001. Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol* 75:12319-12330.
- Callé A, Ugrinova I, Epstein AL, Bouvet P, Diaz JJ, Greco A. 2008. Nucleolin is required for an efficient herpes simplex virus type 1 infection. *J Virol* 82:4762-4773.

- Cam H and Dynlacht BD. 2003. Emerging roles for E2F: beyond the G1/S transition and DNA replication. *Cancer Cell* 3:311-316.
- Carmo-Fonseca M, Mendes-Soares L, Campos I. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* Vol 2:E107-E112.
- Castillo JP and Kowalik FT. 2002. Human cytomegalovirus immediate early proteins and cell growth control. *Gene* 290:19-34.
- Castillo JP and Kowalik TF. 2004. Hcmv infection: modulating the cell cycle and cell death int. *Rev. Immunol.* 23:113-139.
- Cawood R, Harrison SM, Dove BK, Reed ML, Hiscox JA. 2007. Cell cycle dependent nucleolar localization of the Coronavirus nucleocapsid protein. *Cell cycle* 6:863-867.
- Chee MS, Satchwell SC, Preddie E, Weston KM, Barrell BG. 1990 Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature* 344:774-777.
- Chen D and Huang S. 2001. Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus And nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol* 153:169-176.
- Chen M. and Jiang P. 2004. Altered subcellular distribution of nucleolar protein fibrillarin by actinomycin D in Hep-2 cells. *Acta Pharmacol Sin* 25 (7):902-906.
- Chevalier MS, Daniels GM, Johnson DC. 2002. Binding of human cytomegalovirus US2 to major histocompatibility complex class I and II proteins is not sufficient for their degradation. *J Virol* 76(16):8265-8275.
- Chevalier MS and Johnson DC. 2003. Human cytomegalovirus US3 chimeras containing US2 cytosolic residues acquire major histocompatibility class I and II protein degradation properties. *J Virol* 77(8):4731-4738.
- Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, Nabors LB, Cobbs CG, Britt WJ. 2002. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* 62:3347-3350.

- Cobbs CS, Soroceanu L, Denham S, Zhang W, Kraus MH. 2008. Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity. *Cancer Res* 68(3):724-730.
- Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193:834-841.
- Cosme RS, Yamamura Y, Tang Q. 2009. Roles of polypyrimidine tract binding proteins in major immediate-early gene expression and viral replication of human cytomegalovirus. *J Virol* 83(7):2839-2850.
- Couté Y, Burgess JA, Diaz JJ, Chichester C, Lisacek F, Greco A, Sanchez JC. 2006. Deciphering the human nucleolar proteome. *Mass Spectrom Rev* 25:215-234.
- Craigen JL, Yong KL, Jordan NJ, MacCormac LP, Westwick J, Akbar AN, Grundy JE. 1997. Human cytomegalovirus infection up-regulates interleukin-8 gene expression and stimulates neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 92:138-145.
- Dal Monte P, Bessia C, Landini MP, Michelson S. 1996a. Expression of human cytomegalovirus ppUL83 (pp65) in a stable cell line and its association with metaphase chromosomes. *J Gen Virol* 77:2591-2596.
- Dal Monte P, Bessia C, Ripalti A, Landini MP, Topilko A, Plachter B, Virelizier JL, Michelson S. 1996b. Stably Expressed Antisense RNA to Cytomegalovirus UL83 Inhibits Viral Replication. *J Virol* 2086-2094.
- Dang CD and Lee WMF. 1989. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myc, N-myc, p53, HSP70 and HIV tat proteins. *J Biol Chem* 264:18019-18023.
- Diaz JJ, Giraud S, Greco A. 2002. Alteration of ribosomal protein maps in herpes simplex virus type 1 infection. *J Chromatogr B* 771:237-249.
- Dittmer D and Mocarski ES. 1997. Human cytomegalovirus infection inhibits G1=S transition, *J Virol* 71:1629-1634.
- Dundr M and Misteli T. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356:297-310.

- Fatica A and Tollervey D. 2002. Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol* 14(3):313-8.
- Fortunato EA and Spector DH. (1999). Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res* 54:61-128.
- Fortunato EA, McElroy AK, Sanchez I, Spector DH. 2000. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* 8:111-119.
- Fortunato EA, Sanchez V, Yen JY, Spector DH. 2002. Infection of Cells with Human Cytomegalovirus during S Phase Results in a Blockade to Immediate-Early Gene Expression That Can Be Overcome by Inhibition of the Proteasome. *J Virol* 5369-5379.
- Gallina A, Pereivalle E, Simoneini L, Revello MG, Gerna G, Milanesi G. 1996. Human cytomegalovirus pp65 lower matrix phosphoprotein harbours two transplantable nuclear localization signals. *J Gen Virol* 77:1151-1157.
- Gallina A, Simoncini L, Garbelli S, Pedrali-Noy G, Lee KS, Erikson RL, Plachter B, Gerna G and Milanesi G, 1999. Polo-like kinase 1 as a target for human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein. *J Virol* 73:1468-1478.
- Gao JL and Murphy PM. 1994. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor. *Biol Chem* 269:28539-28542.
- Geder KM, Lausch R, O'Neill F, Rapp F. 1976. Oncogenic transformation of human embryo lung cells by human cytomegalovirus. *Science* 192(4244):1134-1137.
- Gibson W. 1996. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 39:389-400.
- Giesen K, Radsak K, Bogner E. 2000. The potential terminase subunit of human cytomegalovirus, pUL56, is translocated into the nucleus by its own nuclear localization signal and interacts with importin alpha. *J Gen Virol* 81(9):2231-2244.
- Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD. 1996. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383:720-722.

- Ginisty H, Sicard H, Roger B, Bouvet P. 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* 112 (6):761-772.
- Gorski SA, Dundr M, Misteli T. 2006. The road much traveled: trafficking in the cell nucleus. *Curr Opin Cell Biol* 18:284-290.
- Gravel SP and Servant MJ. 2005. Roles of an Ikappa B kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions. *J Biol Chem* 280:7477-7486.
- Greco A. 2009. Involvement of the nucleolus in replication of human viruses. *Rev Med Virol* 19:201-214.
- Grinstein E, Shan Y, Karawajew L, Snijders PJ, Meijer CJ, Royer HD, Wernet P. 2006 Cell cycle-controlled interaction of nucleolin with the retinoblastoma protein and cancerous cell transformation. *J Biol Chem* 281(31):22223-22235.
- Hagemeyer C, Caswell R, Hayhurst G, Sinclair J, Kouzarides T. 1994. Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein. *EMBO J* 13(12):2897-2903.
- Hanakahi LA, Bu Z, Maizels N. 2000. The C-terminal domain of nucleolin accelerates nucleic acid annealing. *Biochemistry* 39(50):15493-15499.
- Hernandez-Verdun D, Roussel P, Thiry M, Sirri V, Lafontaine DLJ. 2010. The nucleolus: structure/function relationship in RNA metabolism. *Advanced Review* 1:415-431
- Hertel L and Mocarski ES. 2004. Global analysis of host cell gene expression late during cytomegalovirus infection reveals extensive dysregulation of cell cycle gene expression and induction of pseudomitosis independent of US28 function. *J Virol* 78:11988-12011.
- Hirsch, A.J. and Shenk, T. 1999. Human cytomegalovirus inhibits transcription of the CC chemokine MCP-1 gene. *J Virol* 73:404-410.
- Hiscox JA. 2002. The nucleolus - A gateway to viral infection? *Arch Virol* 147:1077-1089.
- Hiscox JA. 2007. RNA viruses: hijacking the dynamic nucleolus. *Nat Rev Microbiol* 5:119-127.

- Hume AJ and Kalejta RF. 2009. Regulation of the retinoblastoma proteins by the human herpesviruses. *Cell Div* 4:1.
- Hwang ES, Zhang Z, Cai H, Huang DY, Huong SM, Cha CY, Huang ES. 2009. Human cytomegalovirus IE1-72 protein interacts with p53 and inhibits p53-dependent transactivation by a mechanism different from that of IE2-86 protein. *J Virol* 83(23):12388-12398.
- Iapalucci-Espinoza S and Franze-Fernández MT. 1979. Effect of protein synthesis inhibitors and low concentrations of actinomycin D on ribosomal RNA synthesis. *Febs Letters* Vol 107:2.
- Ioudinkova E, Arcangeletti MC, Rynditch A, De Conto F, Motta F, Covan S, Pinardi F, Razin SV, Chezzi C. 2006. Control of human cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line. *Gene* 384:120-128.
- Irmiere A and Gibson W. 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130:118-133.
- Isomura H, Stinski MF, Kudoh A, Nakayama S, Murata T, Sato Y, Iwahori S, Tsurumi T. 2008. A cis element between the TATA Box and the transcription start site of the major immediate-early promoter of human cytomegalovirus determines efficiency of viral replication. *J Virol* 82(2):849-858.
- Jansen RP, Hurt EC, Kern H, Lehtonen H, Carmo-Fonseca M, Lapeyre B, Tollevery D. 1991. Evolutionary conservation of the human nucleolar protein fibrillarin and its functional expression in yeast. *J Cell Biol* 113:715-729.
- Jarskaja OO, Barsukova AS, Medzhidova AA, Fedorova NE, Kushch AA, Zatsepina OV. 2003. Activation of transcription of ribosome genes following human embryo fibroblast infection with cytomegalovirus *in vitro*. *Tsitologiya* 45:690-701.
- Jarskaja OO, Medzhidova AA, Fedorova NE, Kushch AA, Zatsepina OV. 2002. Immunocytochemical reorganization of the nucleolus in human embryo fibroblasts infected with cytomegalovirus *in vitro*. *Doklady Biological Sciences* 387:589-592.

- Jault FM, Jault JM, Ruchti F, Fortunato EA, Clark C, Corbeil J, Richman DD, Spector DH. 1995. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol* 69(11):6697-6704.
- Jeor SC, Albrecht TB, Funk FD, Rapp F. 1974. Stimulation of cellular DNA synthesis by human cytomegalovirus. *J Virol* 13(2):353-362.
- Johnson D, Schwarz JK, Cress WD, Nevins JR. 1993. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S-phase. *Nature* 378:206-208.
- Jones TR, Wiertz EJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL. 1996. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93:11327-11333.
- Jordan P and Carmo-Fonseca M. 1998. Cisplatin inhibits synthesis of ribosomal RNA *in vivo*. *Nucleic Acids Res* 26(12):2831-2836.
- Jordan P, Mannervik M, Tora L, Carmo-Fonseca M. 1996. *In vivo* evidence that TATA-binding protein/SL1 colocalizes with UBF and RNA polymerase I when rRNA synthesis is either active or inactive. *J Cell Biol* 133:225-234.
- Kalejta RF and Shenk T. 2002. Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus. *Front Biosci* 7:d295-306.
- Kamil JP and Coen DM. 2007. Human Cytomegalovirus Protein Kinase UL97 Forms a Complex with the Tegument Phosphoprotein pp65. *J Virol* 81:10659-10668.
- Kann M, Schmitz A, Rabe B. 2007. Intracellular transport of hepatitis B virus. *World J Gastroenterol* 13:39-47.
- Keay S and Baldwin B. 1991. Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. *J Virol* 65(9):5124-5128.
- Kelly C, Van Driel R, Wilkinson GWG. 1995. Disruption of PML-associated nuclear bodies during human cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* 76:2887-2893.

- Kim K, Dimitrova DD, Carta KM, Saxena A, Daras M, Borowiec JA. 2005. Novel checkpoint response to genotoxic stress mediated by nucleolin-replication protein a complex formation. *Mol Cell Biol* 25:2463-2474.
- Kinzler ER and Compton T. 2005. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J Virol* 79(12):7827-7837.
- Lafontaine DL and Tollervey D. 2000. Synthesis and assembly of the box C+D small nucleolar RNPs. *Mol Cell Biol* 20:2650-2659
- Lam YW, Evans VC, Heesom KJ, Lamond AI, Matthews DA. 2010. Proteomics analysis of the nucleolus in adenovirus-infected cells. *Mol Cell Proteomics* 9:117-130.
- Lamond AI and Earnshaw WC. 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* 280:547-553.
- Lawrence FJ, McStay B, Matthews DA. 2006. Nucleolar protein upstream binding factor is sequestered into adenovirus replication centres during infection without affecting RNA polymerase I location or ablating rRNA synthesis. *J Cell Sci* 119:2621-2631.
- Leary DJ and Huang S. 2001. Regulation of ribosome biogenesis within the nucleolus. *Febs Lett* 509:145-150.
- Lehner R, Meyer H, Mach M. 1989. Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses. *J Virol* 63(9):3792-800.
- Lei M and Tye BK. 2001. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* 114:1447-1454.
- Leung AK, Andersen JS, Mann M, Lamond AI. 2003. Bioinformatic analysis of the nucleolus. *Biochem J* 376(3):553-69.
- Li J, Sejas DP, Rani R, Koretsky T, Bagby GC, Pang Q. 2006. Nucleophosmin Regulates Cell Cycle Progression and Stress Response in Hematopoietic Stem/Progenitor Cells. *J Biol Chem* 281(24):16536-16545.

- Liu W, Zhao Y, Biegelke B. 2002. Analysis of human cytomegalovirus US3 gene products. *Virology* 301(1):32-42.
- Liu Z, Winkler M, Biegelke B. 2009. Human cytomegalovirus: host immune modulation by the viral US3 gene. *Int J Biochem Cell Biol.* 41(3):503-506.
- Liu, B. and Stinski, M.F. 1992. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol* 66:4434-4444.
- Lu M and Shenk T. 1996. Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J Virol* 70:8850-8857.
- Lunardi C, Bason C, Corrocher R, Puccetti A. 2005. Induction of endothelial cell damage by hCMV molecular mimicry. *Trends Immunol.* 26(1):19-24. Review.
- Lymberopoulos MH and Pearson A. 2007. Involvement of UL24 in herpes-simplex-virus-1 induced dispersal of nucleolin. *Virology* 363:397-409.
- Malm G and Engman M. 2007. Congenital cytomegalovirus infections. *Seminars in Fetal & Neonatal Medicine* 12:154-159.
- Malyavantham KS, Bhattacharya S, Alonso WD, Acharya R, Berezney R. 2008. Spatio-temporal dynamics of replication and transcription sites in the mammalian cell nucleus. *Chromosoma* 117:553-567.
- Matthews DA. 2000. Adenovirus Protein V Induces Redistribution of Nucleolin and B23 from Nucleolus to Cytoplasm. *J Virol* 75:1031-1038.
- Maussang D, Verzijl D, van Walsum M, Leurs R, Holl J, Pleskoff O, Michel D, van Dongen GA, Smit MJ. 2006. Human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103(35):13068-13073.
- Maussang D, Langemeijer E, Fitzsimons CP, Stigter-van Walsum M, Dijkman R, Borg MK, Slinger E, Schreiber A, Michel D, Tensen CP, van Dongen GA, Leurs R, Smit MJ. 2009. The human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28 promotes angiogenesis and tumor formation via cyclooxygenase-2. *Cancer Res* 69(7):2861-2869.

- McElroy AK, Dwarakanath, RS, Spector, DH. 2000. Dysregulation of cyclin E gene expression in human cytomegalovirus-infected cells requires viral early gene expression and is associated with changes in the Rb-related protein p130. *J. Virol.* 74:4192-4206.
- McVoy MA and Adler SP. 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* 68(2):1040-1051.
- McVoy MA, Nixon DE, Adler SP, Mocarski ES. 1998. Sequences within the herpesvirus-conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J Virol* 72:48-56.
- Meier JL and Pruessner JA. 2000. The human cytomegalovirus major immediate-early distal enhancer region is required for efficient viral replication and immediate-early gene expression. *J Virol* 74(4):1602-1613.
- Melén K, Kinnunen L, Fagerlund R, Ikonen N, Twu KY, Krug RM, Julkunen I. 2007. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. *J Virol* 81(11):5995-6006.
- Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J. 2009. The story of human cytomegalovirus and cancer: increasing evidence and open questions. *Neoplasia* 11(1):1-9.
- Michelson S. 2004. Consequences of human cytomegalovirus mimicry. *Immunol* 65(5):465-475.
- Michienzi A, De Angelis FG, Bozzoni I, Rossi JJ, 2006. A nucleolar localizing Rev binding element inhibits HIV replication. *AIDS Research and Therapy* 3:13.
- Misaghi S, Sun ZY, Stern P, Gaudet R, Wagner G, Ploegh H. 2004. Structural and functional analysis of human cytomegalovirus US3 protein. *J Virol* 78(1):413-423.
- Misteli T. 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci* 113 (11):1841-1849.
- Misteli T. 2008. Physiological importance of RNA and protein mobility in the cell nucleus. *Histochem Cell Biol* 129:5-11.

- Mocarski ES, Kemble GW, Lyle JM, Greaves RF. 1996. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 93(21):11321-11326.
- Mokarski ES and Courcelle CT. 2001. Cytomegalovirus and their replication. In: *Fields Virology*, Knipe, D. and Howley, P., Editors. Lippincott-Raven, Philadelphia 2629-2673.
- Muller S and Dejean A. 1999. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* 73:5137-5143.
- Muranyi W, Haas J, Wagner M, Krohne G, Koszinowski UH. 2002. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science* 297:854-857.
- Newton K, Petfalski E, Tollervey D, Caceres JF. 2003. Fibrillarin is essential for early development and required for accumulation of an intron-encoded small nucleolar RNA in the mouse. *Mol Cell Biol* 23:8519-8527.
- Nguyen NL, Loveland AN, Gibson W. 2008. Nuclear localization sequences in cytomegalovirus capsid assembly proteins (UL80 proteins) are required for virus production: inactivating NLS1, NLS2, or both affects replication to strikingly different extents. *J Virol* 82(11):5381-5389.
- Nicholson IP, Sutherland JS, Chaudry TN, Blewett EL, Barry PA, Nicholl MJ, Preston CM. 2009. Properties of virion transactivator proteins encoded by primate cytomegaloviruses. *Virol J* 27(6):65.
- Pass RF. 2001. Cytomegalovirus. In: *Fields Virology*, 4th ed., D.M. Knipe, and P.M. Howley (eds.), Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins 2575-2705.
- Patterson SD, Grossman JS, D'Andrea P, Latter GI. 1995. Reduced numatrin/B23/nucleophosmin labeling in apoptotic Jurkat T-lymphoblasts. *J Biol Chem* 270:9429-9436
- Pederson T, 1998a. The plurifunctional nucleolus. *Nucleic Acids Res* 26(17):3871-3876.
- Pederson T. 1998b. Growth factors in the nucleolus? *J Cell Biol* 143:279-281.

- Pederson T and Tsai RYL. 2009. In search of nonribosomal nucleolar protein function and regulation. *J. Cell Biol* 184:771-776.
- Pellar GJ, DiMario PJ. 2003. Deletion and site-specific mutagenesis of nucleolin's carboxy GAR domain. *Chromosoma* 111(7):461-469.
- Pepperl S, Münster J, Mach M, Harris JR, Plachter B. 2000. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol* 74(13):6132-6146.
- Petrik DT, Schmitt KP and Stinski MF, 2006. Inhibition of Cellular DNA Synthesis by the Human Cytomegalovirus IE86 Protein Is Necessary for Efficient Virus Replication. *J Virol* 80(8):3872-3883.
- Pianta A, Puppini C, Franzoni A, Fabbro D, Di Loreto C, Bulotta S, Deganuto M, Paron I, Tell G, Puxeddu E, Filetti S, Russo D, Damante G. 2010. Nucleophosmin is overexpressed in thyroid tumors. *Biochem Biophys Res Commun* 397(3):499-504.
- Pliss A, Koberna K, Vecerova J, Malinsky J, Masata M, Fialova M, Raska I, Berezney R. 2005. Spatio-temporal dynamics at rDNA foci: global switching between DNA replication and transcription. *J Cell Biochem* 94:554-565.
- Ponti D, Troiano M., Bellenchi GC, Battaglia PA, Gigliani F. 2008. The HIV Tat protein affects processing of ribosomal RNA precursor. *BMC Cell Biol* 9:32-41.
- Prichard MN, Jairath S, Penfold ME, St. Jeor S, Bohlman MC, Pari GS. 1998. Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus. *J Virol* 72:6997-7004.
- Randolph-Habecker J, Iwata M, Geballe AP, Jarrahan S, Torok-Storb B. 2002. Interleukin-1-mediated inhibition of cytomegalovirus replication is due to increased IFN-beta production. *J Interferon Cytokine Res* 22(7):765-772.
- Razin SV. 1997. The nuclear matrix and spatial organization of chromosomal DNA domains. Ed. Springer R.G. Landes Company Austin.
- Robson L and Gibson W. 1989. Primate cytomegalovirus assembly protein: genome location and nucleotide sequence. *J Virol* 63:669-676.

- Roby C and Gibson W. 1986. Characterization of phosphoproteins and protein kinase activity of virions, noninfectious enveloped particles, and dense bodies of human cytomegalovirus. *J Virol* 59(3):714-727.
- Roger B, Moisand A, Amalric F, Bouvet P. 2001. Repression of RNA Polymerase I Transcription by Nucleolin Is Independent of the RNA Sequence That Is Transcribed. *J Biol Chem* 277(12):10209-10219.
- Romanowski MJ, Garrido-Guerrero E, Shenk T. 1997. pIRS1 and pTRS1 are present in human cytomegalovirus virions. *J Virol* 71:5703-5705.
- Rosenthal LJ, Choudhury S. 1993. Potential oncogenicity of human cytomegalovirus. Molecular aspects of human cytomegalovirus diseases. In: Becker Y, Darai G, Huang E-S (eds) 412-436.
- Ruggero D and Pandolfi PP. 2003. Does the ribosome translate cancer? *Nat Rev Cancer* 3:179-192.
- Salvant BS, Fortunato EA, Spector DH, 1998. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J Virol* 72(5):3729-3741.
- Sanchez V and Spector DH. 2002. CMV makes a timely exit. *Science* 297:778-779.
- Sanchez V and Spector DH. 2008. Subversion of cell cycle regulatory pathways. *Curr Top Microbiol Immunol* 325:243-262.
- Sanchez V, Angeletti P C, Engler J A, and Britt W J. 1998. Localization of human cytomegalovirus structural proteins to the nuclear matrix of infected human fibroblasts. *J Virol* 72:3321-3329.
- Sarov I and Abady I. 1975. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virol* 66(2):464-73.
- Scheer U and Hock R.1999. Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 11:385-390.

- Scherl A, Couté Y, Déon C, Callé A, Kindbeiter K, Sanchez JC, Greco A, Hochstrasser D, Diaz JJ. 2002. Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell* 13(11):4100-4109.
- Schierling K, Buser C, Mertens T, Winkler M. 2005. Human cytomegalovirus tegument protein ppUL35 is important for viral replication and particle formation. *J Virol* 79(5):3084-3096.
- Shimakami T, Honda M, Kusakawa T, Murata T, Shimotohn K, Kaneko S, Murakami S. 2006. Effect of Hepatitis C Virus (HCV) NS5B-Nucleolin Interaction on HCV Replication with HCV Subgenomic Replicon. *J Virol* 80:3332-3340.
- Simonin D, Diaz JJ, Massé T, Madjar JJ. 1997. Persistence of ribosomal protein synthesis after infection of HeLa cells by herpes simplex virus type 1. *J Gen Virol* 78:435-443.
- Sinclair J, Baillie J, Bryant L, Caswell R. 2000. Human cytomegalovirus mediates cell cycle progression through G(1) into early S phase in terminally differentiated cells. *J Gen Virol* 81(6):1553-1565.
- Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 76(4):741-750.
- Sirri V, Urcuqui-Inchima S, Roussel P, Hernandez-Verdun D. 2008. Nucleolus: the fascinating nuclear body. *Histochem Cell Biol* 129:13-31.
- Sissons JG, Bain M, Wills MR. 2002. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Infect* 44(2):73-77.
- Sobell H. 1985. Actinomycin and DNA transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 82(16):5328-5331
- Somogyi T, Michelson S, Masse MG. 1990. Genomic location of a human cytomegalovirus protein with protein kinase activity (PK68). *Virol* 174:276-285.
- Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. 2010. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *PNAS* 1-6.

- Spector DH. 1996. Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* 39:361-377.
- Spector DL. 1993. Macromolecular domains within the cell nucleus. *Annu Rev Cell Biol* 9:265-315.
- Spector DL. 2001. Nuclear Domains *J Cell Sc* 114:2891-2893.
- St. Jeor SC, Albrecht TB, Funk FD, Rapp F. 1974. Stimulation of cellular DNA Synthesis by Human Cytomegalovirus. *J Virol* 13:353-362.
- Stasiak PC and Mocarski ES. 1992. Transactivation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the alpha gene product TRS1 in addition to IE1 and IE2. *J Virol* 66(2):1050-1058.
- Stenberg RM. 1996. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology* 39:343-349.
- Stern JL, Cao JZ, Xu J, Mocarski ES, Slobedman B. 2008. Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression by the cellular transcription factor CCAAT displacement protein. *Virology* 378(2):214-25.
- Stinski MF and Petrik DT. 2008. Functional roles of the human cytomegalovirus essential IE86 protein. *Curr Top Microbiol Immunol* 325:133-152. Review.
- Story CM, Furman MH, Ploegh HL. 1999. The cytosolic tail of class I MHC heavy chain is required for its dislocation by the human cytomegalovirus US2 and US11 gene products. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:8516-8521.
- Streblow DN, Dumortier J, Moses AV, Orloff SL, Nelson JA. 2008. Mechanisms of Cytomegalovirus-Accelerated Vascular Disease: Induction of Paracrine Factors That Promote Angiogenesis and Wound Healing. *Curr Top Microbiol Immunol* 325:397-415.
- Sun B, Harrowe G, Reinhard C, Yoshihara C, Chu K, Zhuo S. 2001. Modulation of human cytomegalovirus immediate-early gene enhancer by mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1. *J Cell Biochem.* 83(4):563-573.

- Takemura M, Ohoka F, Perpelescu M, Ogawa M, Matsushita H, Takaba T, Akiyama T, Umekawa H, Furuichi Y, Cook PR, Yoshida S. 2002. Phosphorylation-dependent migration of retinoblastoma protein into the nucleolus triggered by binding to nucleophosmin/B23. *Exp Cell Res* 276:233-241.
- Tanaka S, Fukurawa T, Plotkin S, 1975. Human Cytomegalovirus Stimulates Host Cell RNA Synthesis. *J Virol* 15:297-304.
- Taylor RT and Bresnahan WA. 2005. Human cytomegalovirus immediate-early 2 gene expression blocks virus-induced beta interferon production. *J Virol* 79(6):3873-3877.
- Taylor RT, Bresnahan WA. 2006. Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus- and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression. *J Virol*. 80(21):10763-10771.
- Theiler RN and Compton T. 2001. Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O. *J Biol Chem* 276(42):39226-39231.
- Terhune SS, Schröer J, Shenk T. 2004. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. *J Virol* 278(19):10390-10398.
- Treiber DK, Zhai X, Jantzen HM, Essigmann JM. 1994. Cisplatin-DNA adducts are molecular decoys for the ribosomal RNA transcription factor hUBF (human upstream binding factor). *Proc Natl Acad Sci USA* 91(12):5672-5676.
- Tsai HL, Kou GH, Chen SC, Wu CW, Lin YS. 1996. Human cytomegalovirus immediate-early protein IE2 tethers a transcriptional repression domain to p53. *J Biol Chem* 271(7):3534-3540.
- Ugrinova I, Monier K, Ivaldi C, Thiy M, Storck S, Mongelard F, Bouvet P. 2007. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. *BMC Mol Biol* 8:66-82.
- Vancikova and Dvorak, 2001. Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals--a review. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 1(2):179-187.

- Verdun DH. 2006a. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions. *Histochem Cell Biol* 126:135-148.
- Verdun DH. 2006b. Nucleolus: from structure to dynamics. *Histochem cell biol* 125:127-137.
- Visintin R and Amon A. 2000. The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr Op Cell Biol* 12:372-377.
- Voit R, Hoffmann M, Grummt I. 1999. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *The EMBO Journal* 18:1891-1899.
- Wang L, Ren XM, Xing JJ, Zheng AC. 2010. The nucleolus and viral infection. *Virol Sin* 25(3):151-157.
- Weibusch L, Uecker R, Hagemeyer C. 2003. Human cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting MCM loading onto chromatin. *Embo Rep* 4:42-46.
- Wéclawiak H, Kamar N, Mengelle C, Guitard J, Esposito L, Lavayssière L, Cointault O, Ribes D, Rostaing L. 2008. Cytomegalovirus prophylaxis with valganciclovir in cytomegalovirus-seropositive kidney-transplant patients. *J Med Virol* 80(7):1228-1232.
- Welch AR, Woods AS, McNally LM, Cotter RJ, Gibson W. 1991. A herpesvirus maturational proteinase, assemblin: identification of its gene, putative active site domain, and cleavage site. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 88:10792-10796.
- White EA and Spector DH. 2005. Exon 3 of the human cytomegalovirus major immediate-early region is required for efficient viral gene expression and for cellular cyclin modulation. *J Virol* 79(12):7438-7452.
- Winkler M, Schmolke S, Plachter B, Stamminger T. 1995. The pUL69 protein of human cytomegalovirus (HCMV), a homologue of the herpes simplex virus ICP27, is contained within the tegument of virions and activates the major immediate early enhancer of HCMV in synergy with the tegument protein pp71 (ppUL82). *Scand J Infect Dis Suppl* 99:8-9.

- Xu Y, Cei SA, Rodriguez Huete A, Colletti KS, Pari GS. 2004. Human cytomegalovirus DNA replication requires transcriptional activation via an IE2- and UL84-responsive bidirectional promoter element within oriLyt. *J Virol* 78(21):11664-11677.
- Yurochko AD, Mayo MW, Poma EE, Baldwin AS Jr, Huang ES. 1997. Induction of the transcription factor Sp1 during human cytomegalovirus infection mediates upregulation of the p65 and p105/p50 NF-kappaB promoters. *J Virol* 71(6):4638-4648.
- Zhu H, Cong JP, Mamtora G, Gingeras T, Shenk T. 1998. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(24):14470-14475.
- Zhu H, Shen Y, Shenk T. 1995. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* 69(12):7960-7970.