UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Scienze Chirurgiche e Microbiologia Applicata

Ciclo XXIX

POSSIBILI MECCANISMI E FATTORI DI VIRULENZA DI CITOMEGALOVIRUS UMANO *IN VITRO* ED *EX VIVO*

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Luigi Roncoroni

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa Adriana Calderaro

Dottoranda:

Dott.ssa Rosita Vasile Simone

INDICE

1. RIASSUNTO pag. 2

2. INTRODUZIONE pag. 7

3. OBIETTIVI DELLA RICERCA pag. 28

4. MATERIALI E METODI pag. 31

5. RISULTATI E DISCUSSIONE pag. 49

6. COMMENTI CONCLUSIVI pag. 84

7. BIBLIOGRAFIA pag. 87

1. RIASSUNTO

Citomegalovirus umano (HCMV) è un virus erpetico ubiquitario e molto diffuso nella popolazione, come dimostra l'elevata sieroprevalenza a livello mondiale. Come tutti i membri della famiglia di appartenenza, dopo l'infezione primaria HCMV può stabilire uno stato di latenza nell'ospite, con possibilità di dare luogo a riattivazione. Sia l'infezione primaria, sia la riattivazione possono essere clinicamente silenti oppure sintomatiche, con quadri clinici di notevole gravità e possibili conseguenze fatali in particolari categorie di soggetti. Tra tali conseguenze quelle più importanti sono nei neonati con infezione congenita da HCMV, trasmessa da madri con infezione primaria e nei soggetti trapiantati d'organo, per i quali l'evento più frequente è, in genere, la riattivazione del virus dalla latenza.

Per potere meglio delineare i quadri clinici di cui HCMV si rende responsabile, è bene sottolineare che il possibile esito dell'infezione è il risultato di una serie di fattori, alcuni dei quali legati all'ospite ed altri a determinanti prettamente virali.

Tra i possibili fattori responsabili della virulenza e del tropismo tessutale di HCMV sono state indicate specifiche glicoproteine (g) del pericapside virale, quali gB, gN e gO, coinvolte in processi cruciali del ciclo replicativo virale. I geni che codificano per le suddette proteine sono polimorfici, ossia presentano regioni ipervariabili che danno origine a diversi genotipi co-circolanti in natura.

Sulla base di tali considerazioni supportate da evidenze scientifiche, è plausibile ritenere che genotipi diversi possano modulare in maniera differenziale il tropismo tessutale e d'organo di HCMV e, di conseguenza, influenzare i possibili esiti dell'infezione. In tale ottica, l'analisi dei polimorfismi genici di HCMV come marcatori di virulenza e la valutazione del loro valore prognostico nei riguardi della severità dell'infezione da HCMV appare di notevole rilevanza.

È anche probabile ritenere che il profilo fenotipico di uno specifico ceppo virale di isolamento clinico sia più appropriatamente definito attraverso la caratterizzazione di combinazioni di diversi genotipi, piuttosto che da singoli genotipi.

Per effettuare uno studio *ex vivo*, volto alla caratterizzazione dei genotipi virali gB, gN e gO attraverso analisi del polimorfismo di restrizione, sequenziamento genico ed analisi filogenetica, la categoria di soggetti presa in considerazione è rappresentata da bambini con infezione congenita da HCMV. In particolare, è stata considerata una coorte di quaranta soggetti pediatrici con infezione congenita (19) o con infezione post-natale (21) da HCMV, al fine di verificare la presenza di specifici genotipi e di combinazioni genotipiche come marcatori di infezione congenita. I risultati ottenuti, validati statisticamente, mostrano che solo nelle infezioni congenite sono presenti in maniera significativa il genotipo gN4c e il genotipo gO3, spesso in combinazione; inoltre, in tutti neonati con infezione congenita che mostravano segni clinici alla nascita era presente il genotipo gN4c, quasi in tutti nella combinazione gN4c-gO3.

Altra categoria di soggetti che, come già accennato, può contrarre un'infezione da HCMV clinicamente manifesta è rappresentata dai trapiantati d'organo.

In particolare, come fase propedeutica a futuri studi di genotipizzazione delle glicoproteine B, N e O quali fattori di virulenza e possibili marcatori prognostici dell'esito dell'infezione, è stata effettuata un'indagine epidemiologica retrospettiva sulla circolazione di HCMV in una coorte di soggetti trapiantati di rene in un arco temporale di cinque anni (2011-2015). L'analisi dei risultati di indagini virologiche effettuate per la diagnosi di infezione da HCMV su campioni di sangue per la determinazione dell'antigenemia e DNAemia da HCMV (compendiate dal dato anticorpale), hanno dimostrato una prevalenza e un'incidenza d'infezione con valori medi intorno al 7,5% e 3,5%, rispettivamente, per gli anni 2011, 2013, 2014, e intorno al 15% e 9%, rispettivamente, per gli anni 2012 e 2015. Inoltre, tale studio ha messo in luce come nei soggetti sottoposti a

trapianto di rene, l'infezione/malattia da HCMV sia prevalentemente il risultato di un evento di riattivazione virale. Quest'ultima appare un'evenienza molto temibile e purtroppo frequente nei soggetti che, come i trapiantati d'organo, hanno un alterato stato immunitario, con possibile sviluppo di patologie non di rado mortali.

In tale ottica, molti gruppi di ricerca sono ad oggi impegnati nello studio dei possibili meccanismi che regolano il passaggio dell'infezione da HCMV dalla latenza alla riattivazione.

Purtroppo, gli studi di questi rilevanti aspetti, effettuati attraverso l'utilizzo di modelli cellulari sedi naturali di latenza di HCMV (in particolare, monociti del sangue periferico), sono gravemente ostacolati dalla bassa frequenza di cellule mononucleate positive (solo intorno allo 0,01%) e al loro basso contenuto di DNA di HCMV.

Quanto sopra evidenziato rende pressante la necessità di utilizzare modelli monocitari umani *in vitro,* in cui l'infezione da HCMV coinvolga un numero maggiore di cellule rispetto a quelle reperibili *in vivo,* in modo da permettere una più agevole esecuzione degli studi sopra menzionati. In tale ottica, in questo studio è stato messo a punto un modello sperimentale di latenza/riattivazione dell'infezione da HCMV, utilizzando una linea monocitaria/macrofagica umana (THP-1) che sembra ricalcare gli eventi che avvengono *in vivo* a seguito di differenziamento dei monociti del sangue periferico, sedi di latenza, a macrofagi, veicoli di disseminazione tissutale dell'infezione.

Il modello THP-1 è stato caratterizzato e validato analizzando ognuno degli stadi del ciclo di replicazione litica, a seguito di riattivazione dalla latenza, dalla replicazione del DNA virale, all'espressione dei trascritti, fino alla produzione di progenie virale.

La caratterizzazione della linea THP-1 effettuata in questo studio risulta di particolare interesse in quanto offre la possibilità di eseguire, in maniera estremamente più agevole rispetto all'utilizzo del sistema naturale, lo studio dei meccanismi che regolano il passaggio dalla latenza alla riattivazione di HCMV.

Per quel che riguarda tali meccanismi, è importante sottolineare che HCMV ha sviluppato molteplici strategie in grado di portare ad una significativa alterazione del metabolismo della cellula ospite, come quelle volte all'alterazione del ciclo cellulare. È evidente come l'azione di interferenza esercitata dal virus sul ciclo cellulare dipenda, oltre che da fattori virali, anche dall'interazione con circuiti metabolici e componenti della cellula ospite, cooptati da HCMV a proprio vantaggio.

Tra i componenti cellulari messi di recente in evidenza in letteratura e che potrebbero giocare un ruolo di spicco nella regolazione del ciclo cellulare, sono da annoverare i micro-RNA (miRNA), che rappresentano meccanismi unici di regolazione post-trascrizionale, in grado di modulare una vasta gamma di processi biologici vitali per la cellula. Nell'ambito della moltitudine di miRNA cellulari che partecipano alla regolazione del ciclo cellulare, la famiglia miR-26 (miR-26a e miR-26b), i cui *loci* genici si trovano nella regione intronica del gene codificante per il gruppo di proteine CTDSP ["carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase"] denominate CTDSP1/2/L, coopera nel bloccare la transizione G1/S. È stato osservato che i miRNA 26a e 26b e le proteine CTDSP1/2/L sono espressi in concomitanza durante il ciclo cellulare e sono anche funzionalmente correlati, aumentando in fase di quiescenza (G0) e diminuendo durante la proliferazione (S). Considerando che è verosimile che l'azione esercitata da HCMV sul ciclo cellulare, osservato in cellule proliferanti come i fibroblasti MRC5 (in cui il virus blocca il ciclo cellulare in G1/S) o in cellule quiescenti come macrofagi THP-1 (che il virus spinge in fase S), possa avvalersi dell'intervento dei suddetti miRNA cellulari in sinergia con le proteine CTDSP, ci si è proposto di studiare l'espressione dei trascritti dei geni CTDSP1/2/L

in cellule THP-1 infettate dal virus a diversi tempi di infezione, a confronto con le stesse cellule non infettate. I risultati ottenuti supportano il coinvolgimento dei micro-RNA 26a e 26b nella regolazione del ciclo cellulare virus-indotta, individuando in tale classe di molecole di recente scoperta, quali effettori di processi di regolazione negativa, alcuni dei possibili fattori cellulari potenzialmente coinvolti anche nel processo di riattivazione del virus dalla latenza.

2. INTRODUZIONE

2.1 CITOMEGALOVIRUS

Citomegalovirus umano (HCMV) è un virus ubiquitario appartenente alla famiglia *Herpesviridae*, sottofamiglia *Betaherpesvirinae* [1]; tale agente è molto diffuso nella popolazione mondiale, come dimostra l'elevata sieroprevalenza in tutte le popolazioni studiate fino ad oggi (valori tra il 50% e l'85% nelle zone industrializzate; oltre il 90% nei Paesi in via di sviluppo) [2]. Come tutti i membri di questa famiglia virale, dopo l'infezione primaria HCMV può stabilire uno stato di latenza nell'ospite, con possibilità di dare luogo a riattivazione clinicamente silente oppure sintomatica, in relazione allo stato immunitario del soggetto [3-7].

HCMV può rendersi responsabile di gravi malattie con coinvolgimento di più organi e frequenti conseguenze fatali in particolari categorie di individui a rischio, quali trapiantati d'organo [8,9], soggetti con infezione da HIV [10-12], bambini nati da madri con infezione primaria da HCMV [13-17].

L'alterato stato immunitario in categorie di soggetti a rischio come quelle precedentemente menzionate, accresce la possibilità di contrarre un'infezione primaria o di sviluppare un'infezione/malattia come risultato della riattivazione di HCMV presente nell'organismo allo stato latente [6].

Per quel che riguarda, in particolare, la categoria di soggetti sottoposti a trapianto d'organo, nonostante i notevoli progressi nell'ambito delle pratiche chirurgiche relative ai protocolli di trapianto, l'infezione da HCMV rappresenta ancora un evento particolarmente temibile e purtroppo frequente. Circa il 78% dei donatori sieropositivi trasmette HCMV a riceventi sieronegativi e il 40% dei riceventi sieropositivi va incontro a riattivazione di HCMV in seguito alla somministrazione di farmaci immunosoppressivi [18,19]. Inoltre, è stata descritta la reinfezione con nuovi ceppi di HCMV in caso di

donatori e riceventi sieropositivi [18,19]. In tale categoria di soggetti HCMV è la principale causa di morbilità e mortalità durante i primi sei mesi dopo il trapianto, provocando di frequente gravi infezioni post-trapianto (quali polmonite), mentre nei malati di AIDS, la riattivazione del virus latente è spesso causa di retinite e conseguente cecità, ulcere esofagee e processi infiammatori intestinali [20,21].

È importante ricordare che i soggetti immunocompromessi, quali i pazienti sottoposti a trapianto d'organo, corrono il rischio di contrarre l'infezione da parte di diversi stipiti di HCMV nel corso del tempo, evento che, a sua volta, aumenta il rischio di sviluppare una malattia grave.

Oltre ad una diagnosi tempestiva ed accurata di infezione da HCMV in queste tipologie di pazienti, è particolarmente sentita l'esigenza di individuare strumenti che concorrano alla prevenzione non solo della malattia da HCMV ma anche degli effetti indiretti dell'infezione (rigetto acuto, perdita dell'organo trapiantato, infezioni opportunistiche, fino a morte) [22,23].

Recentemente HCMV è stato associato anche ad altre patologie, tra cui diverse tipologie di tumori, processi aterosclerotici, patologie dell'apparato cardiovascolare e malattie autoimmuni [21,24-29].

L'associazione di questo virus a quadri clinici così differenti, quali quelli sopra riportati, è motivata anche dalla vasta gamma di tipi cellulari suscettibili all'infezione *in vivo*: cellule epiteliali, fibroblastiche, stromali, neuronali, epatiche, muscolari liscie, endoteliali e diverse tipologie di cellule effettrici della risposta immune come cellule progenitrici della linea mieloide, cellule dendritiche, neutrofili, monociti e macrofagi [20,30-32]. Il sistema monocita-macrofago, in particolare, rappresenta non solo una importante sede di latenza (monocita), ma anche un mezzo di disseminazione virale nell'organismo (macrofago tissutale) [33,34].

Come già accennato, un'altra importante categoria di soggetti a rischio è rappresentata da bambini che abbiano contratto l'infezione da HCMV in utero, trasmessa da madri con infezione primaria da HCMV; infatti, tale virus viene ancora oggi considerato uno tra gli agenti eziologici più importanti d'infezione congenita, con possibili gravi conseguenze per il neonato alla nascita e/o sequele neurologiche tardive nel bambino: oltre il 10% dei neonati con infezione congenita è sintomatico alla nascita e il 10-15% dei neonati asintomatici sviluppa sequele neurologiche tardive quali ritardo mentale, sordità e difetti visivi [16,35,36]. La dimostrazione del virus nelle urine entro pochi giorni di vita, attraverso l'inoculo del materiale in colture cellulari o mediante metodi molecolari, è considerato un indicatore di infezione congenita da HCMV (Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, USA; www.cdc.gov/cmv/testing-diagnosis.htlm). Tuttavia, questo dato non fornisce sufficienti informazioni in merito ai danni a cui potrà andare incontro il neonato. L'infezione da HCMV può anche avvenire in epoca più tardiva (infezione post-natale), con esiti normalmente più favorevoli rispetto all'infezione congenita.

Per potere meglio delineare i quadri patologici di cui HCMV si rende responsabile, è bene sottolineare che il possibile esito dell'infezione è il risultato di una serie di fattori, alcuni dei quali legati all'ospite ed altri a determinanti prettamente virali [37]. Un fattore da sempre ritenuto determinante per la virulenza degli isolati clinici di HCMV è la specificità genotipica e fenotipica del ceppo virale infettante [17,38].

2.1.1 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).

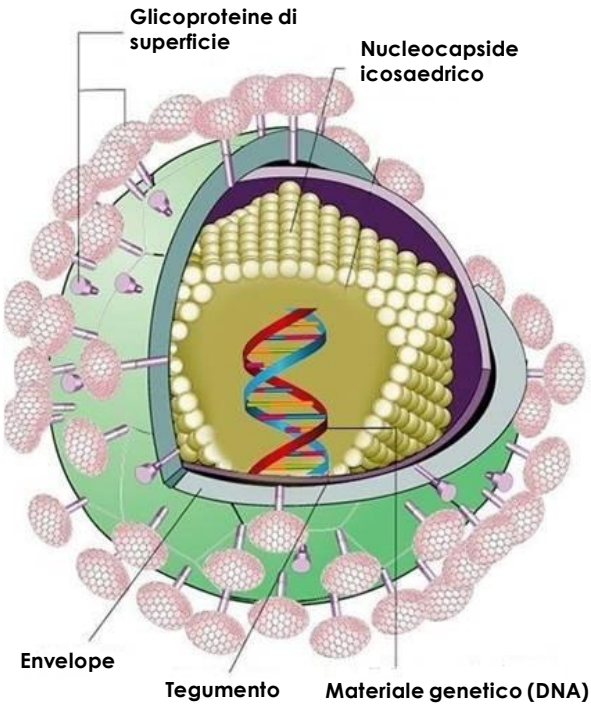


Figura 1. Citomegalovirus umano: rappresentazione schematica (immagine modificata da http://todosobremicrobiologia.blogspot.it/2015/02/virus-las-particulas-viricas-solo.html della struttura del virione.

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 Enveloped Particles" (NIEP) [39,40]. 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 capside, tegumento e pericapside virale.

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 [41]. A differenza di altri virus erpetici, HCMV ha un ciclo replicativo molto lento (maggiore di 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 [1,20].

2.1.2 IL GENOMA DI CITOMEGALOVIRUS

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 di altri virus erpetici.

Il genoma di HCMV, di lunghezza compresa tra 200 e 240 Kb e di peso molecolare di 150-155x10^6 Dalton, 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 in Figura 2, 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).

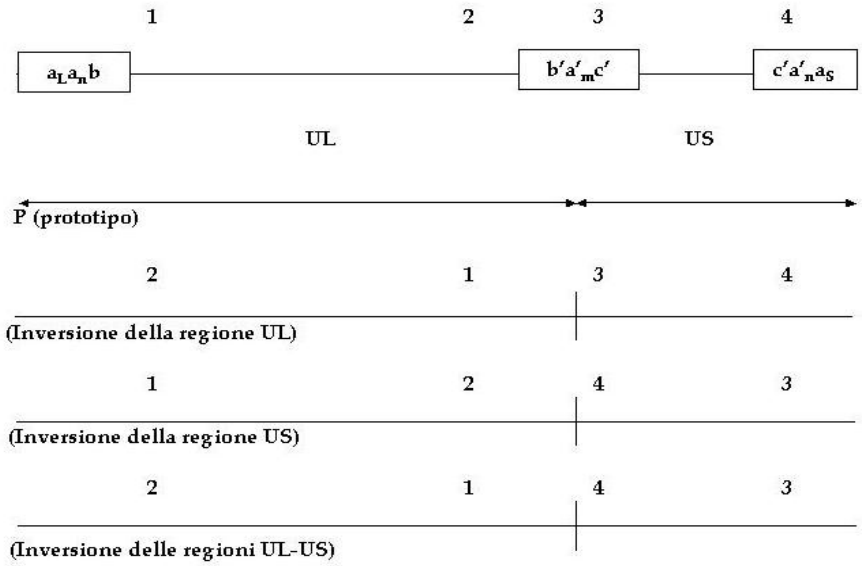


Figura 2. Rappresentazione schematica delle quattro forme isomeriche del genoma di HCMV.

Una sequenza ripetuta, ma non invertita, indicata in Figura 2 come 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 [1,42].
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 "*ori*Lyt", che potrebbero facilitare la replicazione dello stesso DNA virale [43,44]; la seconda classe di trascritti, invece, sembra essere localizzata a livello del tegumento virale; la sua traduzione avverrebbe subito dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite [45,46].

2.2 IL CICLO REPLICATIVO LITICO DI CITOMEGALOVIRUS

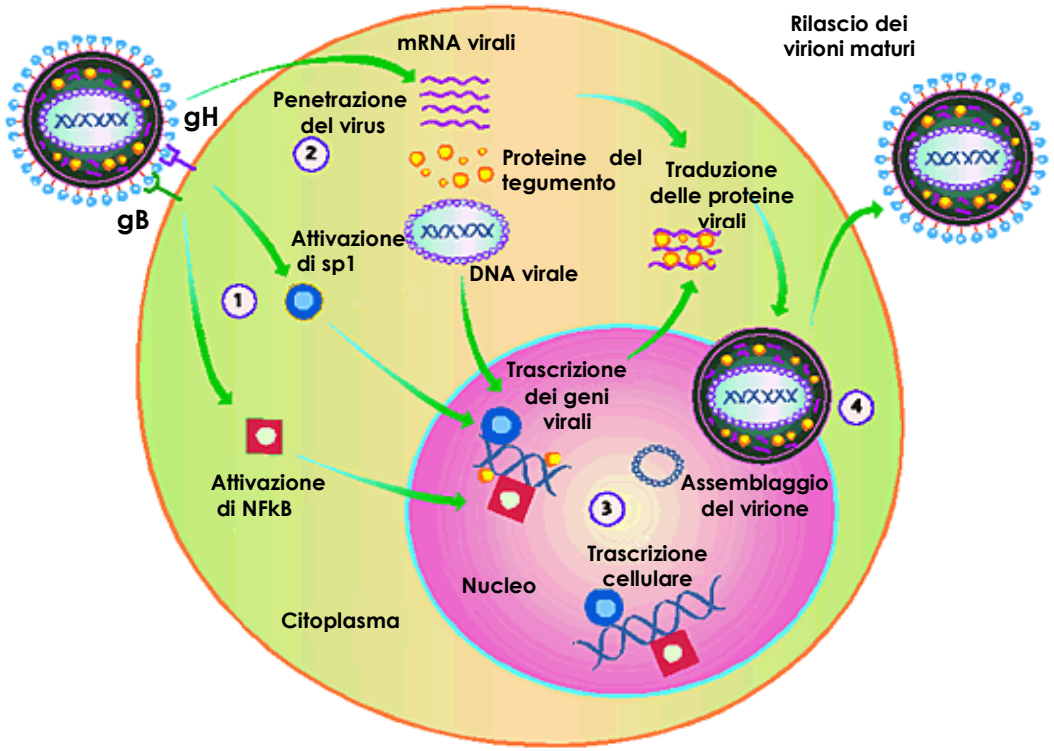


Figura 3. Rappresentazione schematica del ciclo replicativo litico virale di HCMV. Immagine modificata da http://www.nature.com/nm/journal/v6/n8/fig_tab/nm0800_863_F1.html [Huang and Johnson, 2000].

Le conoscenze relative agli eventi iniziali del ciclo di replicazione di HCMV (Figura 3) sono a tutt'oggi ancora incomplete. Il legame 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 (Figura 3-①), come nel caso di altri virus erpetici, è mediata dal legame a bassa affinità degli antirecettori virali con le molecole di eparan-solfato dei proteoglicani di membrana [47-49]. All'iniziale interazione con i residui di eparan-solfato seguono l'adsorbimento e la penetrazione (Figura 3-②) mediati dalla fusione del pericapside virale con la membrana cellulare, processo che risulta indipendente dall'abbassamento del pH [48] e che, probabilmente, coinvolge in prima istanza il complesso glicoproteico virale gH-gL-gO [50,51]. Altre glicoproteine virali coinvolte nell'interazione tra virus e cellula ospite sono le

glicoproteine N e O; la prima è implicata sia nella fase di legame del virus alla cellula ospite, sia nella diffusione del virus nell'organismo, la seconda risulta coinvolta nella fusione dell'"envelope" virale con la membrana cellulare, promuovendo la penetrazione e il rilascio del virus [13,52].

Mentre gli antirecettori virali sono rappresentati dalle glicoproteine gB, gN, gO e gH/gL [52,53], i recettori cellulari, sebbene abbondantemente espressi, sono scarsamente caratterizzati.

È stata dimostrata un'associazione delle glicoproteine gB e gH con le molecole "Toll-like receptor" 2 (TLR2) e "Toll-like receptor" 1 (TLR1), due recettori transmembrana la cui principale funzione, comune a tutti i TLR, 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-kB e nella secrezione di citochine infiammatorie. L'associazione delle glicoproteine dell'"envelope" virale con TLR2 e TLR1 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 [54]. Più recentemente, anche TLR4 è stato indicato quale possibile molecola co-recettoriale in macrofagi [55].

Successivamente alla penetrazione nella cellula ospite, il nucleocapside virale si muove rapidamente verso il nucleo (Figura 3-③), dove il genoma virale circolarizza grazie alla presenza delle strutture palindromiche alle sue estremità, e viene trascritto, ad opera dell'enzima RNA polimerasi II cellulare e di altri fattori che fanno parte del complesso apparato trascrizionale della cellula ospite [1,56].

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 (Figura 3-④) 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 [57]. 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 ed, 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 [58].

2.2.1 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 α), precoci ("Early"/E o β) e tardive ("late"/L o γ).

La replicazione del DNA si situa temporalmente tra l'espressione dei geni β e quella dei geni γ. Il genoma di HCMV contiene, localizzata all'interno della regione UL, un'unica origine di replicazione *ori*Lyt. In seguito alla circolarizzazione del DNA virale, la sua replicazione procede da *ori*Lyt in modo bi-direzionale (modalità di replicazione "rolling-circle") [59], ad opera della DNA polimerasi virus-specifica di tipo α. 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 IE ed E. La trascrizione dei geni virali avviene ad opera

dell'enzima RNA polimerasi II cellulare e di altri fattori che fanno parte del complesso apparato trascrizionale della cellula ospite, cooptato 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 [1,56].

2.2.2 LE PROTEINE VIRALI

- *Le proteine precocissime* (*"immediate-early" o* α).

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 α, 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 [56,60,61].

Le proteine precocissime maggiori 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-kB, AP-1, Sp1 e CREB/ATF, attivati dall'infezione stessa [62-64]. Le proteine IEp72 ed IEp86 sono accomunate da una breve sequenza aminoacidica (circa 85 aminoacidi) codificata dai primi tre esoni dell'mRNA codificante per esse, mentre differiscono nella porzione codificata dagli esoni 4 e 5 [65]. Un ruolo di spicco è stato attribuito alla sequenza dell'esone 3 nell'ambito della regolazione della trascrizione, dell'espressione dei geni virali precoci e nella modulazione funzionale di proteine, quali ad esempio le cicline, direttamente coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare [66].

IEp86 rappresenta la più importante proteina con funzioni regolatorie codificata dal virus [60,67,68]. Il ruolo più rilevante di questa proteina consiste nell'attivazione dell'espressione sia dei geni β, sia dei geni γ. Compito di IEp86 è, inoltre, quello di assicurare che l'espressione di tali geni, durante l'infezione, avvenga in modo sequenziale e temporalmente regolato [56,69], oltre a quello di garantire la repressione dell'espressione dei geni α IE1/IE2 e US3, nelle fasi tardive dell'infezione [1,56]. Questa proteina funziona quindi da attivatore trascrizionale, coadiuvata dal prodotto del gene IE1 che ne promuove ulteriormente l'attività.

Una funzione inedita è stata attribuita alle proteine IEp86 e IEp72, che risultano coinvolte nella regolazione dell'espressione dei geni che codificano per proteine che agiscono come mediatori e regolatori dell'immunità innata [70-72]. 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 β (IFN β) e l'interferone α (IFN α), 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 β [73-76], di alcune chemochine, quali per esempio quelle definite come "regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted" (RANTES) [74,75,77,78], di monociti indotti dall'interferone γ ("monokine induced by interferon-γ" o MIG) [74.75,77], delle proteine 1 e 2 di monociti chemiotattici (MCP-1 e -2) [75,79], della proteina 1α di macrofagi indotti dal processo infiammatorio (MIP-1α) [74,77] e, infine, dell'interleuchina 8

[75,80,81]. La proteina virale IEp86 è inoltre coinvolta nel blocco del ciclo cellulare in fase G1/S [82-87], con conseguente blocco della sintesi di DNA cellulare. Questo evento è rilevante in quanto 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 [88-89].

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 [90-91]. Inoltre, IEp72 è coinvolta in numerosi processi cellulari quali, ad esempio: regolazione genica di geni coinvolti nel ciclo cellulare e nella risposta immunitaria, progressione del ciclo cellulare, dispersione dei "PML oncogenic domains" (PODs), anche noti come "nuclear dots" (ND10) e apoptosi [92-94].

Nell'ambito dell'espressione dei geni α 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 [95-96]. Il gene US3 rappresenta il primo gene virale trascritto subito dopo l'inizio dell'infezione; la sua espressione contribuisce, insieme a numerose altre strategie attuate da HCMV, all'evasione del virus nei confronti della risposta immunitaria [96-98].

- *Le proteine precoci* (*"Early" o* β).

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) [1].

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 virus-specifico (UL54), riscontrabili nel distretto nucleare in corso di infezione produttiva [1].
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 proteasoma [99-100].
La stessa funzione è svolta, mediante un meccanismo differente, dalle proteine codificate dai geni US27 e US28, omologhe a recettori per specifiche chemochine [101]. In particolare US28, omologo del recettore per RANTES ed MCP-1 ("monocyte chemotactic protein-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 [101].

• *Le proteine tardive* (*"Late" o* γ).

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 [102]. La proteina AP è presente solo nei capsidi virali privi di DNA (NIEP) e non nelle particelle virali mature contenenti

l'acido nucleico [103]; 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") [104]. 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 [105].

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 [106-107] e manifesta un significativo accumulo a livello nucleolare, visibile anche a tempi più tardivi, per il virus neoformato [108-110]. Tali segnali sono costituiti da brevi sequenze di aminoacidi basici denominate sequenze di localizzazione nucleare o "NLS" [106,107]. È 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 sequenze "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, rendono tale proteina candidata ideale quale fattore di regolazione dell'espressione genica virale [110]. Oltre a un putativo ruolo di pp65 nella regolazione della replicazione e dell'espressione genica virale, tale proteina è in grado di indurre una modulazione parziale dell'espressione di IFN β e di alcune chemochine in corso di infezione virale, mentre essa non sembra essere coinvolta nella regolazione di altre citochine pro-infiammatorie a differenza di quanto osservato per la proteina IEp86 [75-77].

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 [111].

Il pericapside virale è formato da un doppio strato lipidico, tipico delle membrane cellulari, in cui sono inseriti tre grandi complessi glicoproteici virus-specifici. Il complesso glicoproteico I è costituito essenzialmente dalla glicoproteina B (proteina polimorfica); il complesso glicoproteico II è formato dalle glicoproteine M (che rappresentano la sua parte maggiore) ed N (proteina transmembrana molto piccola ed altamente polimorfica) [112-113]; il complesso glicoproteico III è formato da tre glicoproteine: due di esse (gH e gL) sono proteine transmembrana mentre gO è legata covalentemente a gH [51]. Come già menzionato questi tre complessi, 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. Il genoma di HCMV codifica, inoltre, per numerose proteine con caratteristiche tipiche delle proteine transmembranarie, come la proteina "integral membrane protein" [114], che potrebbero rappresentare costituenti minori del pericapside virale ed essere coinvolte nelle fasi di legame e di ingresso del virus nella cellula ospite.

2.3 LE GLICOPROTEINE DEL PERICAPSIDE DI HCMV QUALI FATTORI DI VIRULENZA

Tra i possibili fattori responsabili della virulenza e del tropismo tessutale di HCMV sono state indicate specifiche glicoproteine del pericapside virale, coinvolte in processi cruciali del ciclo replicativo [13,52]. Tra queste, la glicoproteina B (gB) [115-117] e, più recentemente, le glicoproteine N e O, sono implicate nel riconoscimento e legame ai recettori cellulari, nell'internalizzazione, nel rilascio e nella propagazione del virus [16,52,118]. I geni che codificano per le suddette proteine sono polimorfici, ossia presentano regioni ipervariabili che danno origine a diversi genotipi co-circolanti in natura [13,117,119,120]. Sulla base di tali considerazioni e di evidenze di letteratura, è plausibile ritenere che genotipi diversi possano modulare in maniera differenziale il tropismo tessutale e d'organo di HCMV e, di conseguenza, influenzare i possibili esiti dell'infezione [121].

Diversi gruppi di ricerca hanno condotto studi volti a verificare l'associazione di specifici genotipi di glicoproteine pericapsidiche di HCMV con quadri patologici di diversa severità in categorie di soggetti a rischio, con risultati a volte conflittuali. A tale riguardo è da sottolineare come la quasi totalità di tali studi abbia preso in considerazione la distribuzione dei genotipi di singole glicoproteine [122-125].

Tuttavia, è maggiormente plausibile ritenere che il profilo fenotipico di uno specifico ceppo virale di isolamento clinico sia più appropriatamente definito attraverso la caratterizzazione di combinazioni di diversi genotipi, piuttosto che da singoli genotipi. È impensabile che un solo gene ed una sola variante genomica possano determinare la virulenza complessiva di un agente virale complesso come HCMV. In effetti, è stato descritto che geni collocati in *loci* adiacenti spesso agiscono in maniera coordinata e sinergica [126-127]; per quel che riguarda le glicoproteine del pericapside di HCMV, questo è il caso di gN e gO. Considerando tali presupposti, è plausibile ritenere che dallo studio dell'associazione genotipica delle suddette glicoproteine virali (gB, gN, gO) si possano ricavare informazioni maggiormente esaustive per la tipizzazione del ceppo

coinvolto nell'infezione e le possibili evoluzioni dell'infezione da esso causata. In tale ottica, l'analisi dei polimorfismi genici di HCMV come marcatori di virulenza e la valutazione del loro valore prognostico nei riguardi della severità dell'infezione da HCMV riveste notevole importanza.

2.4 L'INFEZIONE LATENTE DA CITOMEGALOVIRUS

Un'interessante proprietà biologica di HCMV, comune a tutti i virus erpetici, è la sua capacità di persistere, dopo un'infezione primaria generalmente asintomatica, in specifiche sedi anatomiche dell'organismo ospite [128] in una condizione di latenza da cui può sporadicamente riattivarsi [3]. Per molti anni i tentativi di definire le sedi di latenza virale sono stati resi vani dalla difficoltà di individuare la presenza del virus in individui sani, sieropositivi per HCMV. L'introduzione di strumenti molecolari quali la reazione polimerasica a catena (PCR) [129-131] ha fornito un valido strumento per rilevare la presenza anche di un basso numero di copie genomiche di HCMV nelle cellule del sangue periferico di portatori sani [132-133] e ha consentito di arrivare alla definizione dei monociti del sangue periferico e dei loro progenitori CD34+ nel midollo osseo quali sedi certe di latenza di citomegalovirus [134] e di disseminazione virale a seguito di differenziamento a macrofagi [135].

Durante l'infezione latente il DNA di HCMV rimane nel nucleo delle cellule infettate in forma episomale [136], in assenza di progenie virale. In tali cellule l'espressione genica virale sembra essere limitata ad un gruppo di trascritti, definiti genericamente come trascritti associati alla latenza ("cytomegalovirus latency transcripts" – CLTs) [137,138].

2.5 LATENZA E RIATTIVAZIONE DI HCMV: MODELLI DI STUDIO *IN VITRO*

Sulla base di quanto precedentemente esposto, risulta evidente come diversi gruppi di ricerca siano impegnati ad individuare e studiare i possibili meccanismi che regolano il

passaggio da uno stato di latenza ad uno stato riattivato con innesco del ciclo di replicazione litico.

Come già accennato, i monociti del sangue periferico e i loro progenitori CD34+ del midollo osseo sono stati indicati quali sedi certe di latenza di HCMV [134] e di disseminazione virale a seguito di differenziamento a macrofagi [135]. Purtroppo, gli studi sulla latenza di HCMV *ex vivo* sono gravemente ostacolati dalla bassa frequenza di cellule mononucleate positive (solo intorno allo 0,01%) e al loro basso contenuto di DNA di HCMV [139-142]. Diversi studi forniscono evidenze sul fatto che il differenziamento dei monociti a macrofagi *in vivo* rappresenti un evento chiave che innesca la riattivazione del virus dalla latenza, dando luogo ad un'infezione produttiva e consentendo al virus di diffondere nei tessuti dell'ospite [128,142-145]. Data l'esigua quantità di DNA di HCMV reperibile nelle sedi naturali di latenza, appare evidente la necessità di approfondire questi studi utilizzando modelli monocitari umani *in vitro* [146] che permettano di mettere a punto un protocollo per una più agevole ricerca di HCMV allo stato latente, per poterlo in seguito applicare al modello naturale *ex vivo*. Tra le linee cellulari assimilabili per diverse caratteristiche al sistema naturale, sono ampiamente utilizzate le cellule leucemiche monocitiche umane THP-1 come modello di infezione latente di HCMV [34,147-150]; in assonanza con i monociti del sangue periferico, tali cellule non sono permissive all'infezione litica da HCMV, ma albergano il genoma virale nel nucleo [34,149,151]. Inoltre, i monociti THP-1 sono stati impiegati spesso come modello di infezione litica in seguito a differenziamento a macrofagi, condizione di permissività all'infezione da HCMV indotta dopo trattamento con esteri del forbolo [34,143,152,153], consentendo l'avvio del ciclo litico fino alla produzione di progenie virale. D'altra parte, le cellule THP-1 sono state impiegate in misura minore come modello di riattivazione dell'infezione da HCMV, con presentazione di dati incompleti e non abbastanza dimostrativi della sua validità [138,154-156.

2.6 MECCANISMI DI REGOLAZIONE DEL METABOLISMO CELLULARE INDOTTI DA HCMV

2.6.1 ALTERAZIONE DEL CICLO CELLULARE INDOTTA DA HCMV

Come già ribadito, l'importanza di questo virus quale patogeno umano, responsabile di gravi malattie nei soggetti immunocompromessi, così come nei neonati con infezione congenita, rende ancora più evidente la potenziale rilevanza degli studi volti alla comprensione dei meccanismi di regolazione messi a punto da tale agente virale per cooptare a proprio vantaggio i circuiti metabolici della cellula ospite dando luogo ad un ciclo litico o, alternativamente, per creare le condizioni che permettano la sopravvivenza di quest'ultima garantendo, al contempo, la persistenza dello stesso virus. HCMV ha sviluppato molteplici strategie in grado di portare ad una significativa alterazione del metabolismo della cellula ospite, come quelle volte all'alterazione del ciclo cellulare [109,110].

In linea con i suddetti studi, dati precedentemenți ottenuti dal nostro gruppo di ricerca hanno dimostrato che HCMV è in grado di alterare il ciclo cellulare in modelli sperimentali di infezione litica che ricalcano tipologie cellulari molto rilevanti *in vivo* per tale agente, quali macrofagi [55] e fibroblasti [109,110]. In particolare, per quanto attiene al modello macrofagico, è stato dimostrato che HCMV è in grado di alterare il ciclo cellulare in cellule quiescenti (macrofagi THP-1), spingendoli a rientrare nella fase S del ciclo cellulare, per sfruttare a proprio vantaggio le componenti cellulari sintetizzate in quella fase. Invece, per quanto concerne il modello cellulare fibroblastico (fibroblasti di polmone embrionale umano MRC5), è stato dimostrato che HCMV è in grado di arrestare il ciclo cellulare in tarda fase G1 o alla transizione G1/S, con la finalità di garantirsi la disponibilità di fattori di trascrizione e di enzimi utili per la successiva fase S, utilizzandoli a proprio vantaggio e bloccando, al contempo, la sintesi di DNA cellulare. Quanto al possibile ruolo esercitato in tale contesto da fattori virali, i dati ottenuti dal nostro gruppo di ricerca supportano l'intervento della fosfoproteina di matrice pp65, con putative funzioni di chinasi, attraverso

il suo insediamento nucleolare [109,110]. Infine, dati preliminari dello stesso gruppo depongono per l'induzione virus-indotta di più elevati livelli di specifiche cicline (proteine che regolano la progressione del ciclo cellulare) e la concomitante inibizione di altre [55].
È evidente come l'azione di interferenza esercitata dal virus sul ciclo cellulare dipenda, oltre che da fattori virali, anche dall'interazione con circuiti metabolici e componenti della cellula ospite, cooptati da HCMV a proprio vantaggio.

2.6.2 MICRO-RNA E REGOLAZIONE DEL CICLO CELLULARE

Tra i componenti cellulari messi di recente in evidenza in letteratura e che potrebbero giocare un ruolo di spicco nella regolazione del ciclo cellulare, sono da annoverare i micro-RNA (miRNA), che rappresentano meccanismi unici di regolazione post-trascrizionale, in grado di modulare una vasta gamma di processi biologici vitali per la cellula [157]. I miRNA sono piccole molecole di RNA non codificante che attraverso il legame con regioni dell'RNA messaggero (mRNA) bersaglio, regolano negativamente l'espressione genica provocando la repressione delle corrispondenti proteine [157]. Nell'ambito della moltitudine di miRNA cellulari che partecipano alla regolazione del ciclo cellulare, la famiglia miR-26 (miR-26a e miR-26b), i cui *loci* genici si trovano nella regione intronica del gene codificante per il gruppo di proteine CTDSP ["carboxy-terminal domain RNA polymerase II polypeptide A small phosphatase"] denominate CTDSP1/2/L, coopera nel bloccare la transizione G1/S attivando sinergicamente la proteina del retinoblastoma (pRb) [158].
In Figura 4 viene rappresentata schematicamente la posizione dei *loci* genici dei miRNA 26a e 26b sulla regione intronica del gene codificante per le proteine CTDSP.
È stato osservato che i miRNA 26a e 26b e le proteine CTDSP1/2/L sono espressi in concomitanza durante il ciclo cellulare e sono anche funzionalmente correlati, aumentando in fase di quiescenza (G0) e diminuendo durante la proliferazione (S). Inoltre,

i miRNA 26a e 26b, così come le proteine CTDSP1/2/L, inducono la diminuzione della forma fosforilata di pRb [158]. È verosimile che l'azione esercitata da HCMV sul ciclo cellulare osservato in cellule attivamente ciclanti come i fibroblasti MRC5 (in cui il virus blocca il ciclo cellulare in G1/S) o in cellule quiescenti come macrofagi THP-1 (che il virus spinge in fase S), possa avvalersi dell'intervento dei suddetti miRNA cellulari in sinergia con le proteine CTDSP.

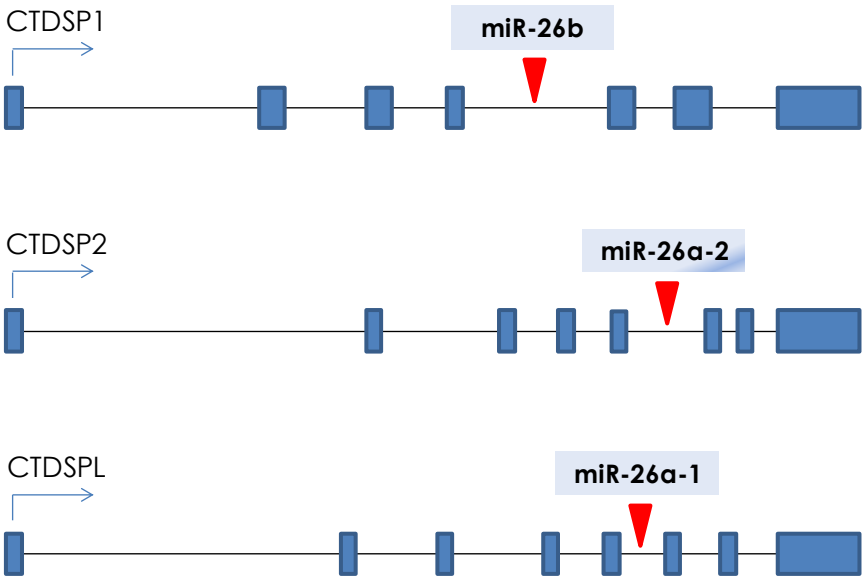


Figura 4. Rappresentazione schematica dei loci genici dei miR-26a e miR-26b posizionati sulla regione intronica dei geni codificanti per il gruppo di proteine CTDSP.

3. OBIETTIVI DELLA RICERCA

OBIETTIVO 1 - STUDIO *EX VIVO*: SPECIFICHE ASSOCIAZIONI GENOTIPICHE DI GLICOPROTEINE PERICAPSIDICHE DI HCMV QUALI MARCATORI DI INFEZIONE CONGENITA

La prima categoria di soggetti a rischio presa in considerazione in questo studio *ex vivo* è rappresentata da neonati e bambini con infezione congenita o post-natale da HCMV. L'obiettivo primario di questo studio è quello di effettuare una caratterizzazione molecolare delle glicoproteine B, N e O del pericapside di HCMV mediante analisi del polimorfismo di restrizione (RFLP), per verificare la presenza di specifici genotipi e di combinazioni genotipiche come marcatori di infezione congenita, con lo scopo di identificare precocemente e seguire nel tempo i bambini con maggiore rischio di sviluppare patologie multi-organo e/o andare incontro a sequele neurologiche.
I risultati ottenuti mediante RFLP, verranno confermati mediante analisi di sequenza genica e successiva analisi filogenetica.

OBIETTIVO 2 - STUDIO EPIDEMIOLOGICO RETROSPETTIVO SULLA PREVALENZA DI INFEZIONE DA HCMV IN SOGGETTI TRAPIANTATI DI RENE

HCMV può rendersi responsabile di gravi malattie con coinvolgimento di più organi e frequenti conseguenze fatali in particolari categorie di individui a rischio; come già accennato, una tra le più importanti è rappresentata dai soggetti sottoposti a trapianto d'organo. In tale ottica, obiettivo di questo studio è quello di effettuare un'indagine epidemiologica per valutare la prevalenza e l'incidenza d'infezione da HCMV nella suddetta categoria di individui attraverso l'analisi dei risultati di indagini di laboratorio effettuate su campioni di sangue di soggetti trapiantati di rene in un arco temporale di cinque anni (2011-2015). Tale studio verrà effettuato attraverso valutazione dei risultati

delle indagini relative ai parametri sierologici, all'antigenemia e DNAemia virale effettuate per la diagnosi di laboratorio di infezione da HCMV (dati presenti nell'archivio informatico presso l'Unità Operativa (UO) di Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria (AOU) di Parma).

OBIETTIVO 3 - MESSA A PUNTO DI UN MODELLO DI INFEZIONE *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA LATENZA E DELLA RIATTIVAZIONE DI HCMV

Diversi studi forniscono evidenze sul fatto che il differenziamento dei monociti a macrofagi *in vivo* rappresenta un evento chiave legato alla riattivazione del virus dalla latenza. Allo stesso tempo gli studi *ex vivo* sono fortemente ostacolati dal fatto che la quantità di DNA di HCMV reperibile nelle sedi naturali di latenza è estremamente esigua. Sulla base di tali premesse, tale obiettivo si focalizza sulla messa a punto e validazione della linea monocitaria umana THP-1 come modello di riattivazione di HCMV dalla latenza, dando luogo a produzione di progenie virale. A tale scopo, ricalcando le caratteristiche dell'infezione virale che si verifica *in vivo* nei macrofagi, cellule responsabili della disseminazione del virus nei tessuti dell'ospite a seguito di riattivazione del virus latente nei monociti, verrà verificata la possibilità che le cellule THP-1 forniscano uno strumento efficace per gli studi volti a chiarire i meccanismi che regolano il passaggio dalla latenza alla riattivazione.

OBIETTIVO 4 - MECCANISMI DI REGOLAZIONE DEL METABOLISMO CELLULARE INDOTTI DA HCMV: STUDIO *IN VITRO* DEL POSSIBILE INTERVENTO DI SPECIFICI MICRO-RNA CELLULARI NELL'ALTERAZIONE DEL CICLO CELLULARE

L'azione di interferenza esercitata dal virus sul ciclo cellulare di cellule ospiti, dipende, oltre che da fattori virali, anche dall'interazione con circuiti metabolici e componenti della

cellula ospite, cooptati da HCMV a proprio vantaggio. Tra i componenti cellulari possibilmente implicati, verranno studiati i miR-26a e miR-26b che sono espressi in concomitanza con le proteine CTDSP1/2/L durante il ciclo cellulare e che sembrerebbero intervenire nella regolazione della proliferazione cellulare. Considerando che è verosimile che l'azione esercitata da HCMV sul ciclo cellulare possa avvalersi anche dell'intervento di tali miRNA in sinergia con le proteine CTDSP, ci si propone di studiare l'espressione dei trascritti dei geni CTDSP1/2/L in cellule THP-1 infettate dal virus a diversi tempi di infezione, a confronto con le stesse cellule non infettate.

4. MATERIALI E METODI

1 - STUDIO *EX VIVO*: SPECIFICHE ASSOCIAZIONI GENOTIPICHE DI GLICOPROTEINE PERICAPSIDICHE DI HCMV QUALI MARCATORI DI INFEZIONE CONGENITA

Campioni biologici e caratteristiche della popolazione inclusa nello studio

Sono stati inclusi nello studio 40 campioni di urina di altrettanti bambini (di età compresa tra 1 giorno e 6 anni), 19 con infezione congenita e 21 con infezione post-natale da HCMV, afferenti all'AOU di Parma in un arco temporale di quindici anni; i campioni che erano risultati positivi per specifiche proteine di HCMV mediante reazione di immunofluorescenza previo esame colturale rapido, sono stati conservati a -80° C presso l'UO di Virologia della suddetta AOU. La classificazione in infezioni congenite o post-natali è stata fatta sulla base del risultato positivo o negativo del suddetto saggio per la ricerca di HCMV effettuato su campioni di urine alla nascita.

Neonati con infezione congenita

-Fascia di età al momento del saggio su urina positivo per HCMV: da 1 a 5 giorni dopo la nascita.

-Sesso: 9 femmine e 10 maschi.

-Sierologia materna nei confronti di HCMV nel periodo gestazionale: 16 mostravano sieroconversione per HCMV durante la gravidanza; in 3 casi non erano disponibili informazioni.

-Motivi dell'effettuazione del saggio su urina del neonato per la ricerca di HCMV: 16 bambini nati da madri con sieroconversione per HCMV durante la gravidanza (1 neonato presentava linfoadenomegalia cervicale, 3 presentavano ingrossamento del fegato, 12 presentavano parametri normali alla nascita). Dei tre casi di cui non si avevano

informazioni sulla sierologia materna nei confronti di HCMV, 1 neonato presentava epatopatia acuta, 1 presentava ventricolomegalia transitoria, 1 presentava epatomegalia e aumento delle transaminasi.

Bambini con infezione post-natale

-Fascia di età al momento del saggio su urina negativo per HCMV: da 3 a 9 giorni dopo la nascita.

-Fascia di età al momento del saggio su urina positivo per HCMV: da 2 mesi a 5 anni dopo la nascita.

-Sesso: 12 femmine e 9 maschi.

-Sierologia materna nei confronti di HCMV nel periodo gestazionale: 10 presentavano immunoglobuline G anti-HCMV prima della gravidanza; 2 non presentavano anticorpi anti-HCMV durante la gravidanza; in 9 casi non erano disponibili informazioni.

-Motivi dell'effettuazione del saggio su urina per la ricerca di HCMV al momento della nascita: in due casi era necessaria la diagnosi differenziale tra infezione da HCMV e infezione da *Toxoplasma gondii* verificatasi durante la gravidanza; 3 bambini presentavano "rash", in seguito attribuito a reazione allergica; 5 presentavano un aumento dei livelli delle transaminasi, ma normali dimensioni di fegato e milza; 6 neonati erano nati prematuramente; 3 presentavano ridotte dimensioni alla nascita; 1 neonato presentava linfadenopatia in seguito attribuita ad infezione batterica e, infine, un neonato presentava un'affezione respiratoria in seguito attribuita ad infezione batterica.

Tutti i soggetti inclusi nello studio non presentavano segni neurologici o compromissione sensoriale alla nascita. Inoltre, non è stato possibile reperire dati relativi ad un eventuale "follow-up" dei bambini con infezione congenita durante la prima infanzia.

Ceppi virali di controllo

I ceppi virali scelti come controllo erano rappresentati dagli stipiti umani AD169 (ATCC n. VR-538) e Towne (ATCC n. VR-977) di HCMV, riprodotti in cellule fibroblastiche MRC5 e titolati, sulla base della determinazione quantitativa dell'infettività, mediante una reazione di immunofluorescenza condotta sulle stesse cellule, impiegando un anticorpo monoclonale che riconosce un epitopo comune alle 2 proteine precocissime maggiori (IEp72/IEp86) di HCMV [109].

Estrazione del DNA ed amplificazione delle sequenze geniche d'interesse

I campioni di urina della popolazione pediatrica inclusa nello studio sono stati sottoposti ad estrazione del DNA con il saggio commerciale QIAamp® DNA Mini and Blood Mini Handbook (Qiagen) e successiva amplificazione mediante PCR dei geni UL55 (gB), UL73 (gN) e UL74 (gO). Il DNA estratto dagli stipiti virali di riferimento Towne e AD169 è stato impiegato come controllo di amplificazione.

I "primers" utilizzati per le reazioni di amplificazione sono di seguito riportati:

gB (UL55; amplificato atteso: 302 bp) [159]

gB F: 5'-TGG AAC TGG AAC GTT TGG C-3'

gB R: 5'-GAA ACG CGC GGC AAT CGG-3'

gN (UL73; prodotto di amplificazione atteso: ~400 pb) [13]

gN F 5'-TGG TGT GAT GGA GTG GAA C-3'

gN R 5'-TAG CCT TTG GTG GTG GTT GC-3'

gO (UL74; amplificato atteso: ~372 pb) [120]

74 up out: 5'-CAG CTT CGA AAA CCG GCC AAA TAC G-3'

74 lo out: 5'-AAT ATA CTT GGG GAC GCG AAA ATA GA-3'

74 up in: 5'-GCT TCG AAA ACC GGC CAA ATA CG-3'

74 lo in: 5'-ATA CTT GGG GAC GCG AAA TAG A-3'

74 TOW up out: 5'-CAA CTC CGT AAA CCG GCC AAA T-3'

74 TOW lo out: 5'-ATA TAC TTG GGA ACG CGG-3'

74 TOW up in: 5'-CTC CGT AAA CCG GCC AAA TAT G-3'

74 TOW lo in: 5'-TAC TTG GGA ACG CGG AAT-3'

I prodotti di amplificazione erano sottoposti a migrazione elettroforetica in gel d'agarosio all'1%, in tampone TAE 1x (40 mM Tris-Acetato e 1 mM EDTA), applicando una differenza di potenziale di 100 Volt, e rivelati, previa addizione al tampone di corsa dell'intercalante del DNA bromuro di etidio. Le bande di amplificazione sono state visualizzate sottoponendo il gel ai raggi UV utilizzando lo strumento GelDoc XR (BioRad) dotato di fotocamera digitale e software per l'acquisizione delle immagini.

Digestione enzimatica mediante RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism")

I relativi prodotti di amplificazione sono stati sottoposti a digestione enzimatica (RFLP: "Restriction Fragment Length Polymorphism") con enzimi di restrizione differenti al fine di rilevare i diversi genotipi.

Gli enzimi di restrizione utilizzati secondo le indicazioni della ditta produttrice (Fermentas) sono di seguito riportati:

-RsaI (*Rhodopseudomonas sphaeroides*) e HinfI (*Haemophilus influenzae*) per la digestione del gene gB;

-SacI (*Streptomyces achromogenes*), ScaI (*Streptomyces caespitosus*) e SalI (*Streptomyces albus G.*) per la digestione del gene gN;

-HpaII (*Haemophilus parainfluenzae*) per la digestione del gene gO.

I prodotti di digestione sono stati, infine, caricati su gel di agarosio al 2% e sottoposti ad elettroforesi (100 Volt).

Sequenziamento genico ed analisi filogenetica

I relativi prodotti di amplificazione sono stati purificati (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) e sottoposti a sequenziamento di tipo Sanger mediante un sequenziatore automatico (CEQ 2000XL sistema di analisi del DNA – Beckman Coulter). Gli elettroferogrammi ottenuti sono stati analizzati utilizzando l'apposito software DNA Sequencing Analysis Versione 3 (Applied Biosystem) e l'identità genetica di ogni campione è stata verificata mediante allineamento con i ceppi di riferimento depositati su GenBank. Le sequenze ottenute dei relativi geni UL55, UL73 e UL74 dei campioni inclusi nello studio sono state depositate in GenBank. L'analisi filogenetica è stata condotta utilizzando il programma "Molecular Evolutionary Genetic Analysis" (MEGA) versione 6 [160], applicando metodi di costruzione e modelli di correzione statistica appropriati (metodo "maximum-likelihood"). L'affidabilità dell'albero filogenetico è stata valutata mediante i valori di bootstrap (numero di repliche maggiori di 1000).

Analisi statistica

I dati sono stati ottenuti analizzati utilizzando il test esatto di Fisher. La significatività dei dati è stata stabilita per valori di $P<0,5$.

La potenza della campionatura è stata calcolata mediante applicazione di quattro diversi "software" statistici: "SELECT – STATISTICAL SERVICES", "R 3.2.2. + PWR PACKAGE", "WINPEPI" e "G* POWER 3.1".

2 - STUDIO EPIDEMIOLOGICO RETROSPETTIVO SULLA PREVALENZA DI INFEZIONE DA HCMV IN SOGGETTI TRAPIANTATI DI RENE

Campioni e soggetti

Sono stati analizzati i risultati di indagini virologiche per la diagnosi di infezione da HCMV ed effettuate su 1977 campioni di sangue periferico pervenuti negli anni 2011-2015 presso l'UO di Virologia dell'AOU di Parma. I suddetti campioni appartenevano a 658 soggetti di età compresa tra 12 e 90 anni, afferenti ai reparti e/o agli ambulatori della Nefrologia dell'AOU di Parma per trapianto di rene.

Indagini virologiche condotte a scopo diagnostico

La diagnosi di laboratorio delle infezioni da HCMV effettuata presso l'UO di Virologia dell'AOU di Parma si avvale dell'ausilio di diversi metodi, anche utilizzati in combinazione. Per quel che riguarda la ricerca di componenti virali in campioni di sangue periferico, l'antigenemia da HCMV è un metodo rapido tra i più utilizzati. Si tratta di un'indagine quantitativa che valuta il numero di leucociti polimorfonucleati del sangue periferico (su 200.000 leucociti analizzati) positivi per la fosfoproteina virale strutturale di peso molecolare 65.000 (pp65). Altra importante possibilità diagnostica prevede l'utilizzo di metodi di amplificazione genica, in particolare Real-Time PCR, per mettere in evidenza la presenza di DNA virale (DNAemia) negli elementi cellulari del sangue e nel plasma. Inoltre, la dimostrazione dell'avvenuta risposta anticorpale (IgM e IgG) nei confronti di HCMV è in genere associata a completamento del pannello diagnostico, come indagine di primo livello.

3 - MESSA A PUNTO DI UN MODELLO DI INFEZIONE *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA LATENZA E DELLA RIATTIVAZIONE DI HCMV

Colture cellulari

- Le cellule monocitarie THP-1 derivate da leucemia umana acuta (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna; BS TCL 138), modello sperimentale utilizzato per lo studio in oggetto, sono state coltivate in sospensione in terreno RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640, addizionato di siero fetale di vitello (10%), sodio piruvato (1%), L-glutamina (1%), antibiotici (penicillina 100 unità/ml e streptomicina 100 mg/ml) e beta-mercaptoetanolo (50 µM).

Per indurre il differenziamento cellulare (monociti THP-1 differenziati a macrofagi), aliquote a concentrazione nota di monociti THP-1 sono state trattate per 48 h con 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA) 80 nM (Sigma– Aldrich) risospeso in dimetilsulfossido (DMSO).

- I fibroblasti da polmone embrionale umano MRC5 (American Type Culture Collection, ATCC; CCL-171) sono stati coltivati in terreno MEM (Minimum Essential Medium), modificato con sali di Earle e addizionato di siero fetale di vitello (10%), sodio piruvato (1%), aminoacidi non essenziali (1%), L-glutamina (1%) ed antibiotici (Penicillina 100 unità/ml e streptomicina 100 mg/ml).

Virus

Il ceppo virale utilizzato per l'infezione sperimentale dei monociti THP-1 (modello di latenza), per quella delle stesse cellule differenziate a macrofagi dopo l'infezione (modello di riattivazione) e per quella delle stesse cellule differenziate a macrofagi e poi infettate (modello litico) è il ceppo endoteliotropico TB40E (gentilmente fornito dal Prof. Thomas Mertens. Università di Ulm, Germania) riprodotto in fibroblasti umani MRC5.

La riproduzione virale è stata titolata sulla base della determinazione quantitativa dell'infettività come precedentemente descritto [108]; il titolo virale è stato espresso in unità formanti placca [UFP]/ml.

Inattivazione di HCMV, ceppo TB40E

Un'aliquota di virus è stata diluita in 1 ml di RPMI privo di siero per ottenere una molteplicità d'infezione (MOI) 0,5 per i tempi di infezione previsti e trasferita in una piastra Petri di 3 cm di diametro. La sospensione virale è stata esposta per 2 h a luce ultravioletta mantenendo la piastra in ghiaccio ad una distanza massima di 4,5 cm dalla lampada [55].

Infezione virale dei modelli latente, riattivato e litico

Aliquote a concentrazione nota di cellule THP-1 non differenziate (modello di latenza) sono state infettate con lo stipite TB40E di HCMV a MOI decrescenti (0,5 – 0,25 – 0,125 UFP/cellula). Le sospensioni cellulari infettate sono state poste in piastre a 6 pozzetti alla concentrazione di $5x10^6$ cellule per pozzetto (pari a circa $1,7x10^6$ cellule/ml), centrifugate per 45 minuti a 700 x *g* e, successivamente, incubate a 37°C per 75 minuti. Al termine del periodo di adsorbimento (2 h), le cellule sono state sottoposte a due lavaggi con RPMI privo di siero e incubate a 37 °C per 30 h, 4, 6 e 7 giorni. Lo stesso protocollo sperimentale è stato applicato al modello di riattivazione, ad eccezione del fatto che, dopo un giorno di incubazione, i monociti THP-1 infettati sono stati differenziati a macrofagi addizionando TPA (80nM) al terreno di coltura. Le cellule differenziate sono state poi incubate per i tempi prestabiliti.

Per il modello litico, i monociti THP-1 sono stati differenziati a macrofagi aggiungendo TPA al mezzo di coltura per 48 h. Dopo un lavaggio in RPMI privo di siero fetale di vitello, le cellule aderenti sono state infettate con HCMV a MOI 0,5, 0,25 o 0,125.

L'adsorbimento è stato eseguito in centrifugazione a 700 x *g* per 45 min e le cellule sono state poi incubate a 37 °C per 75 min. Successivamente, l'inoculo del virus è stato rimosso e sostituito con RPMI al 10% di siero di vitello fetale e le cellule infettate sono state incubate a 37 ° C per i tempi prestabiliti.

Come per l'infezione delle cellule THP-1, anche per i fibroblasti MRC5 l'adsorbimento del virus è stato effettuato in centrifugazione a 700 x *g* per 45 min seguito da un'incubazione di 15 min a 37°C; dopo l'adsorbimento, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito con E-MEM al 10% di siero di vitello fetale.

Frazionamento cellulare

Le cellule THP-1 non differenziate e differenziate (queste ultime sono aderenti e sono state, pertanto, sottoposte a tripsinizzazione), sono state raccolte e centrifugate a 500 x *g* per 10 min. Dopo due lavaggi successivi in tampone fosfato salino (PBS), i sedimenti sono stati risospesi in 8 volumi di tampone ipotonico (Tris-HCl 10 mM [pH 7.4], NaCl 10 mM, MgCl2 1 mM) ed incubati a 4°C. Prima del frazionamento cellulare, al fine di valutare la percentuale di cellule vitali, un'aliquota di cellule è stata sottoposta a conta in presenza del colorante vitale "Trypan blue". Mantenendo le cellule in ghiaccio, esse sono state sottoposte a rottura meccanica della membrana citoplasmatica mediante "dounce", al fine di ottenere la separazione dei nuclei dal citoplasma attraverso monitoraggio della lisi al microscopio ottico. La lisi cellulare è stata eseguita addizionando Nonidet P-40, ad una concentrazione finale di 0,3%. A risultato ottenuto (Figura 5A e 5B) è stata ristabilita una condizione di isotonicità mediante aggiunta di saccarosio 0,25 M finale [161].

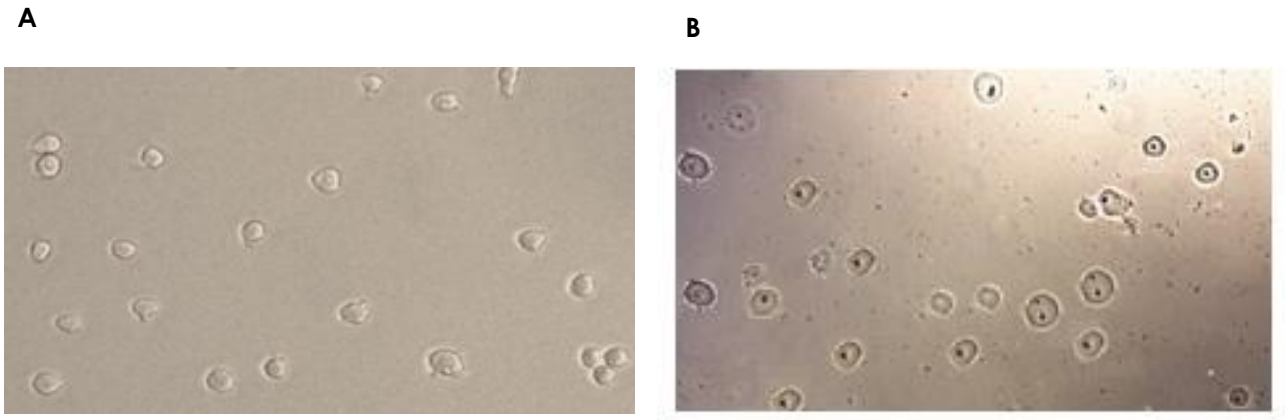


Figura 5. Immagine al microscopio a contrasto di fase raffigurante cellule THP-1 prima (A) e dopo (B) frazionamento cellulare; pannello A: cellule THP-1 integre; pannello B: nuclei di cellule THP-1 ottenuti mediante frazionamento cellulare.

I nuclei sono stati raccolti mediante centrifugazione a 1200 x *g* per 10 min; il sopranatante, corrispondente alla frazione citoplasmatica, è stato raccolto e conservato a -20 ° C per ulteriori analisi. I nuclei sono stati risospesi nel tampone isotonico (tampone ipotonico addizionata di saccarosio 0,25 M) e sottoposti a sonicazione in ghiaccio mediante omogeneizzatore ad ultrasuoni (HD 2070 Bandelin Sonopuls). Sono stati trasmessi tre impulsi di energia della durata di 6 secondi ciascuno, con 6 secondi di pausa tra di loro. Le frazioni nucleari ottenute sono state utilizzate per l'estrazione del DNA. Tutte le frazioni cellulari (lisato cellulare totale, frazioni nucleari e frazioni citoplasmatiche) sono state sottoposte a quantificazione proteica mediante metodo Bradford [162].

Precipitazione proteica

Diversi volumi di ciascuna delle suddette frazioni cellulari (nucleari e citoplasmatiche) di entrambi i modelli (latente e riattivato) di infezione da HCMV sono stati sottoposti a precipitazione proteica al fine di avere uguali quantità di proteine per ogni frazione (30 µg). Ad ogni frazione proteica è stato addizionato acido tricloroacetico (TCA 100%, 1:10 v/v, Sigma Aldrich); dopo aver mescolato accuratamente, i campioni sono stati incubati in ghiaccio per 30 min. Successivamente, ciascuna frazione è stata sottoposta a

centrifugazione a 12.000 x *g* per 20 min a 4 °C ed i sopranatanti sono stati scartati. I sedimenti di ciascuna frazione proteica sono stati risospesi in 1 ml di acetone freddo (Carlo Erba) e incubati in ghiaccio per 10 min. Infine, è stata effettuata una centrifugazione a 12000 x *g* per 15 min a 4 °C e i sedimenti sono stati risospesi in 15 µl di tampone Laemmli. Alcune gocce di Tris-HCl (1 M, pH 8,5) sono state aggiunte per regolare il pH a 6,8.

Dopo ebollizione a 95 °C in termo blocco (pbInternational), quantità uguali (30 µg) di ciascuna frazione proteica sono state analizzate mediante elettroforesi su gel di poliacrillamide al 12,5% in condizioni denaturanti per la presenza di sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE).

Elettroforesi su gel di poliacrilamide ("SDS-PAGE")

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%: "running gel"), che consente la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare.

La migrazione elettroforetica è stata effettuata a 100 Volt per circa 1 h in soluzione elettrolitica contenente Tris 25 mM, glicina 192 mM (pH 8,3) e SDS 0,1%. In ogni pozzetto preformato nel gel di "stacking" sono state caricate quantità uguali di proteine per ciascun estratto, in un volume di 10 µl/pozzetto; uno di essi è stato utilizzato per caricare una miscela di proteine colorate a peso molecolare noto (3,5-260 kDa Prestrained Protein Standard; Novex® Sharp).

Western Blotting (WB)

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), 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 (Tris 12 mM, glicina 96 mM, metanolo 20%, acqua Milli-Q) e trasferiti elettroforeticamente a basso voltaggio (20 Volt) per una notte a 4°C. Successivamente, le membrane sono state incubate in latte magro per 30 min in modo da impedire il legame aspecifico degli anticorpi alla superficie della membrana, ed in seguito sono state incubate per 1 h e 30 min in agitazione, a temperatura ambiente con gli anticorpi d'interesse. Per l'analisi del frazionamento cellulare sono stati utilizzati due anticorpi primari aggiunti simultaneamente (anti-nucleofosmina o B23, policlonale, Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:100 in latte magro e anti-beta-actina, monoclonale, Biovision, diluito 1:1000 in latte magro). Dopo incubazione con gli anticorpi primari, la membrana è stata lavata con PBS integrato con Tween20 0,2% (Sigma-Aldrich) e successivamente incubata (1 h in agitazione, a temperatura ambiente) con gli anticorpi secondari coniugati con fosfatasi alcalina (AP): anti-coniglio (Santa Cruz Biotechnology, diluito 1:600 in PBS) e anti- topo (Sigma Aldrich; diluito 1:6000 in PBS). 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 AP (BCIP/NBT-buffered, Sigma Aldrich).

Estrazione del DNA ed amplificazione delle sequenze geniche d'interesse

Il materiale nucleare, sottoposto a rottura meccanica mediante sonicazione è stato utilizzato per l'estrazione del DNA totale mediante strumento NucliSENS® EasyMAG®

(bioMérieux). Come controllo del corretto frazionamento subcellulare, l'estrazione del DNA e la successiva amplificazione genica sono state eseguite anche sulla frazione citoplasmatica (controllo negativo). Lo stesso procedimento è stato applicato anche utilizzando il virus inattivato mediante esposizione a raggi UV.

Il DNA ottenuto è stato sottoposto ad amplificazione genica mediante Real-Time PCR di tipo quantitativo, utilizzando il kit CMV Elite MGB® (ELITechGroup) che utilizza come bersaglio una regione dell'esone 4 del gene precocissimo IE. Il gene cellulare della beta-globina è stato co-amplificato in modo qualitativo come controllo di reazione. L'amplificazione genica è stata eseguita in termociclatore 7300 (ABI PRISM, Applied Biosystems) secondo le indicazioni della ditta produttrice. I risultati della reazione di Real-Time PCR sono stati espressi come copie di DNA/ml (in scala logaritmica).

Analisi del trascritto di latenza anti-CLT ("antisense-Cytomegalovirus Latency Transcript") e dei trascritti caratteristici del ciclo replicativo litico di HCMV

Le cellule THP-1 infettate a MOI decrescenti (0,5 – 0,25 – 0,125 UFP/cellula) sono state mantenute in coltura come monociti (modello di infezione latente) o successivamente differenziate a macrofagi (modello di riattivazione virale) per 7 giorni. Successivamente l'RNA totale è stato estratto seguendo il protocollo fornito dal sistema "NucleoSpin® RNAII kit" della ditta Macherey-Nagel. L'RNA estratto è stato retrotrascritto mediante il sistema "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" (Thermo Scientific) e amplificato utilizzando le coppie di "primers" per il trascritto di latenza antisenso anti-CLT e per i geni virali IE1, DNA Pol, pp65 e pp150. Il gene cellulare costitutivo GAPDH è stato usato come controllo di estrazione. Le coppie di "primers" utilizzate vengono riportate in Tabella 1. Per confermare l'assenza di contaminazione di DNA virale, la PCR è stata eseguita anche su estratti di RNA non retrotrascritto per ciascuno dei prodotti virali sopra menzionati. I prodotti di

amplificazione sono stati rivelati mediante elettroforesi (100 Volt) in gel di agarosio all'1% colorato con bromuro di etidio.

Tabella 1. Coppie di primers utilizzate per le reazioni di amplificazione dei trascritti del gene di latenza anti-CLT, dei geni virali DNA pol, IE1, pp65 e pp150 e del gene cellulare GAPDH.

Primers	Sequenza nucleotidica	Dimensione amplificato
Anti-CLT	**F** 5'-ACT CAT GGT CGC TCG GCA GCT TCC TTG CTC - 3' **R** 5'- AAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGG - 3'	469 pb
IE1	**F** 5'- AAG AAC TCA GCC TTC CCT AA - 3' **R** 5'- TAA GAC ATA GCA GCA CAG CA - 3'	303 pb
DNA Pol	**F** 5'- GAC AGT AAC GGC CTA CCT GG - 3' **R** 5'- CCT CGG CTT CTC ACA ACA AT- 3'	237 pb
pp65	**F** 5'- CCC TGA ACC GTA GCC ACC AT - 3' **R** 5'- CCG CAA ACG CAA ATC AGC AT- 3'	213 pb
pp150	**F** 5'- TCT CGG TAT CCG TGA TGT CC- 3' **R** 5'- GGC TTT CAG TCT CGT CTC CC- 3'	206 pb
GAPDH	**F** 5' – AAG GCT GTG GGC AAG GTC AT - 3' **R** 5' – GAG GAG TGG GTG TCG CTG TT - 3'	242 pb

Analisi della progenie virale

L'analisi della progenie virale derivante da cellule THP-1 infettate alle tre MOI considerate (0,5, 0,25, 0,125) e in seguito differenziate (modello di riattivazione) e mantenute in coltura per 7 giorni, è stata eseguita utilizzando il sopranatante delle cellule infettate a ciascuna MOI, centrifugato a 13900 x *g* per 30 min a 4 ° C e poi ultracentrifugato a 60000 x *g* per 1 ora a 4°C. Il sedimento (contenente particelle virali concentrate attraverso ultracentrifugazione) è stato utilizzato per l'infezione di fibroblasti MRC5 (modello permissivo per eccellenza *in vitro*) coltivati in monostrato in tubi con vetrino sul fondo.

La stessa procedura è stata applicata anche al modello sperimentale di latenza come controllo negativo. La presenza di progenie virale (rilevamento delle proteine virali precocissime o IE) è stata valutata dopo 24 h di infezione mediante immunofluorescenza indiretta, utilizzando un anticorpo monoclonale (diluito 1:20 in PBS) diretto contro un epitopo comune alle proteine precocissime maggiori IE1 e IE2 di HCMV (Argène – BioMérieux).

Per l'immunoreazione, le cellule sono state incubate a 37 °C per 1 h in camera umida. Dopo 4 lavaggi in PBS 1X, i preparati cellulari sono stati incubati, con immunoglobuline anti-topo coniugate con isotiocianato di fluoresceina (Argène; diluito 1:500 nel colorante della cromatina DAPI (dye 4',6-diamidino-2-phenylindole) e nel colorante di contrasto blu Evans), a 37 ° C per 30 min in camera umida.

Al termine del periodo di incubazione i vetrini con i monostrati cellulari sono stati lavati con PBS 1X, montati su vetrini portaoggetti con relativo liquido di montaggio e analizzati con microscopia a fluorescenza (Leica DMLB).

Per eseguire una valutazione quantitativa di fibroblasti MRC5 positivi per IE, sono stati contati dieci campi per vetrino selezionati casualmente e il numero di cellule positive è stato espresso come valore medio percentuale rispetto al numero totale di cellule per campo (da 280 a 340 fibroblasti MRC5 totali).

Per valutare l'efficienza di infezione del ceppo TB40E in cellule THP-1 utilizzate come modello litico (monociti THP-1 differenziati a macrofagi prima dell'infezione) e in fibroblasti MRC5 (modello permissivo per eccellenza *in vitro*), il sopranatante derivato dal modello THP-1 di infezione litica e da MRC5 dopo 7 giorni di infezione è stato utilizzato per infettare fibroblasti MRC5 applicando la procedura sperimentale sopra descritta per il modello di riattivazione.

Valutazione dell'infettività virale mediante titolazione della dose infettante il 50% delle colture cellulari ("Tissue Culture Infectious Dose 50": TCID50)

Allo scopo di valutare l'infettività della progenie virale derivante dal modello di riattivazione, sono state allestite in terreno E-MEM privo di siero FBS, 10 diluizioni seriali in base 10 della progenie virale derivata dal modello di riattivazione (terreno di coltura di cellule THP-1 infettate e poi differenziate) a tutte le MOI considerate. Una volta allestite le diluizioni della sospensione virale, è stata utilizzata una micropiastra a 96 pozzetti, nella quale per ciascuna diluizione sono stati distribuiti 100 µl per pozzetto (4 repliche per diluizione). Infine, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 µl di sospensione cellulare di fibroblasti MRC5 (6×10^5 cellule/ml) allestita in terreno E- MEM integrato con 5% di siero FBS precedentemente scomplementato a 56°C per 30 min. Nella stessa piastra sono stati riservati due pozzetti per il controllo cellule non infettate e due pozzetti per i controlli di infezione rappresentati dalla sospensione virale non diluita. La piastra è stata successivamente incubata a 37°C in termostato e osservata quotidianamente, per 5-6 giorni, al fine di evidenziare la presenza di effetto citopatico. I valori di TCID50 sono stati calcolati utilizzando il metodo stabilito da Reed e Muench [163] ed espressi come valori di TCID50 per 0,1 ml.

Stesso procedimento sperimentale è stato applicato per valutare il titolo della progenie virale infettante derivata da cellule THP-1 utilizzate come modello litico e da fibroblasti MRC5 (modello permissivo per eccellenza *in vitro*).

4 - MECCANISMI DI REGOLAZIONE DEL METABOLISMO CELLULARE INDOTTI DA HCMV: STUDIO *IN VITRO* DEL POSSIBILE INTERVENTO DI SPECIFICI MICRO-RNA CELLULARI NELL'ALTERAZIONE DEL CICLO CELLULARE

Colture cellulari ed infezione virale

Il modello sperimentale utilizzato per lo studio in oggetto è rappresentato dalla linea monocitaria THP-1 derivante da leucemia umana acuta. Per questo studio preliminare, i monociti THP-1 sono stati differenziati a macrofagi mediante trattamento con TPA ed in seguito infettati con lo stipite TB40E di HCMV (modello di infezione litica).

Aliquote a concentrazione nota di cellule THP-1 sono state inoculate in piastra a 6 pozzetti, in presenza di TPA (80nM) per indurne il differenziamento a macrofagi ed incubate per 48 h a 37°C. Dopo un lavaggio con terreno di coltura RPMI privo di siero fetale di vitello, i monostrati cellulari sono stati infettati con il ceppo virale TB40E a MOI 1 e sottoposti a centrifugazione a 700 x *g* per 45 min. Al termine della centrifugazione, le cellule infettate sono state incubate a 37°C per un ulteriore periodo di 75 min (periodo di adsorbimento complessivo: 2 h). Al termine dell'adsorbimento, i monostrati infettati sono stati incubati a 37°C per i tempi prestabiliti (24, 48 e 72 h). In parallelo, sono state allestite colture di macrofagi THP-1 non infettati.

Estrazione ed analisi dei trascritti di proteine associate ai micro-RNA cellulari 26a e 26b

L'estrazione dell'RNA totale e la successiva retrotrascrizione a cDNA da cellule THP-1 differenziate a macrofagi, non infettate o infettate per 24, 48 e 72 h è stata effettuata con le modalità già descritte in questa stessa sezione.

Le aliquote di cDNA ottenute sono state sottoposte ad amplificazione utilizzando le coppie di "primers" per i geni cellulari CTDSP1/2/L. Le coppie di "primers" utilizzate [158] sono riportate in Tabella 2.

Tabella 2. Coppie di primers utilizzate per le reazioni di amplificazione dei trascritti cellulari CTDSP1/2/L e del trascritto del gene costitutivo GAPDH.

Primers	Sequenza nucleotidica	Dimensione amplificato
CTDSP1	**F** 5'- GCG AGC TCT TTG AAT GTG TG - 3' **R** 5'- GGC TCA GGT CCT TCA CGT AG - 3'	153 pb
CTDSP2	**F** 5'- ATG TTG GCC AGT CAA GTT CC - 3' **R** 5'- CTG TCA CCT CTG GGA GCA G- 3'	141 pb
CTDSPL	**F** 5'- TGC TGA GGG AGG GGA GTG AG - 3' **R** 5'- GCA GCA TGC CAC AGG TTG TC- 3'	79 pb
GAPDH	**F** 5' – AAG GCT GTG GGC AAG GTC AT - 3' **R** 5' – GAG GAG TGG GTG TCG CTG TT - 3'	236 pb

Il trascritto cellulare costitutivo GAPDH è stato utilizzato come controllo di estrazione. I prodotti di amplificazione sono stati rivelati mediante elettroforesi (100 Volt) in gel di agarosio all'1% colorato con bromuro di etidio.

Al fine di verificare il corretto impiego delle stesse quantità dei campioni utilizzati per l'analisi elettroforetica dei trascritti oggetto di studio, è stata condotta, attraverso lo strumento GelDoc (Bio-Rad) e mediante il programma informatico Quantity one, l'analisi quantitativa di densità ottica dei trascritti CTDSP1/2/L e dei relativi trascritti cellulari GAPDH allo scopo di normalizzare i valori ottenuti.

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

1 – STUDIO *EX VIVO*: SPECIFICHE ASSOCIAZIONI GENOTIPICHE DI GLICOPROTEINE PERICAPSIDICHE DI HCMV QUALI MARCATORI DI INFEZIONE CONGENITA

Analisi della distribuzione dei genotipi gB, gN e gO di HCMV nella popolazione pediatrica inclusa nello studio

I risultati ottenuti dall'analisi retrospettiva effettuta mediante caratterizzazione molecolare RFLP delle sequenze genetiche che codificano per le glicoproteine B, N e O del pericapside di HCMV in pazienti pediatrici con infezione congenita o post-natale, ha permesso di valutare la distribuzione dei genotipi gB, gN, gO nel campione di popolazione pediatrica considerato, mostrando associazioni genotipiche diverse, relativamente ai genotipi gN e gO, nelle infezioni congenite rispetto a quelle post-natali. In Figura 6 vengono mostrati i profili dei frammenti di restrizione di gB (Figura 6A), gN (Figura 6B) e gO (Figura 6C), ottenuti dopo digestione enzimatica.

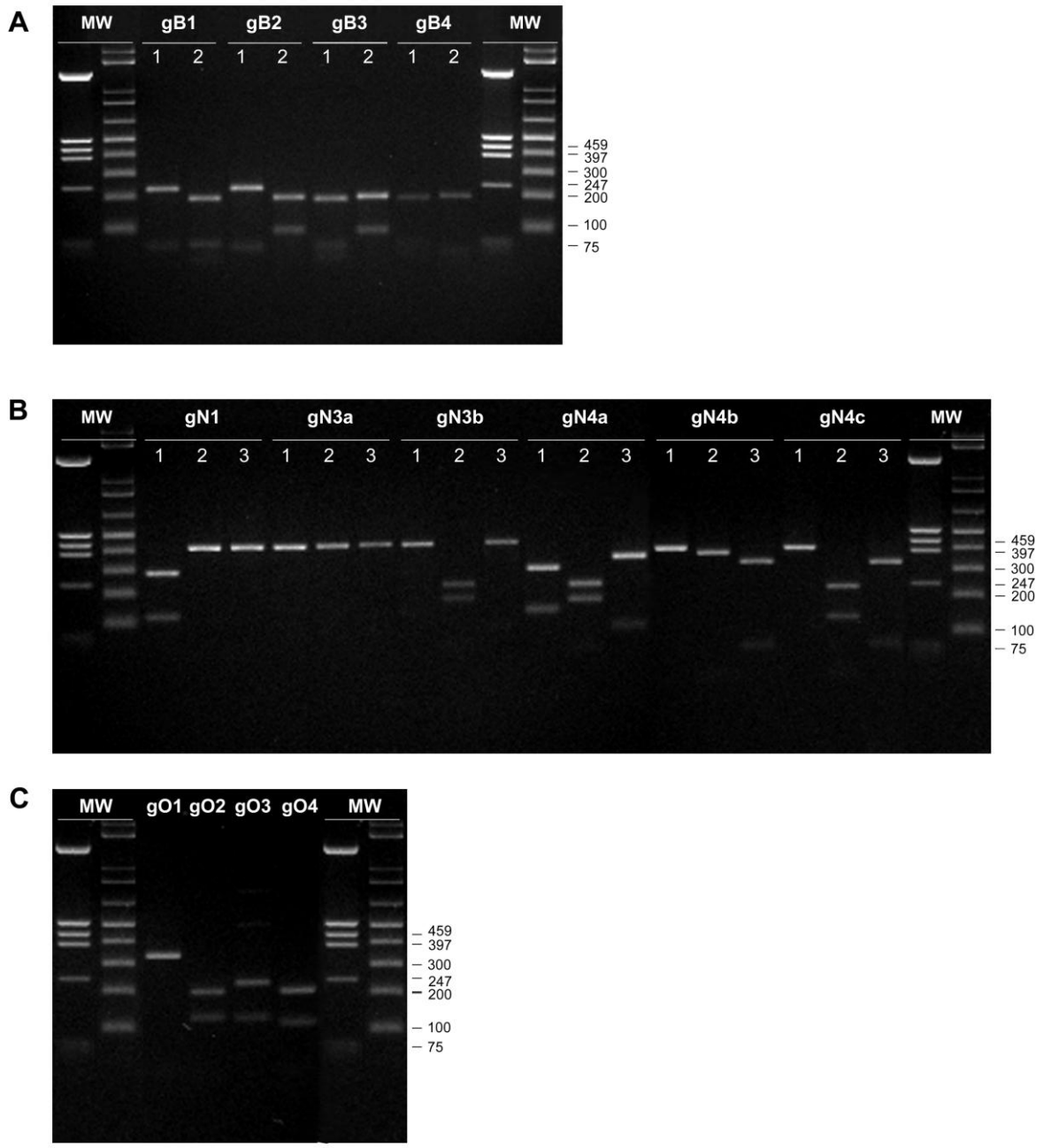


Figura 6. Profili RFLP rappresentativi delle glicoproteine gB, gN e gO di HCMV nel campione di popolazione studiato. L'analisi RFLP è stata effettuata sul prodotto di amplificazione del gene gB (A), gN (B), e gO (C). Ciascun campione è stato digerito con specifiche combinazioni di enzimi di restrizione, come indicato nella sezione "Materiali e Metodi". Nella parte superiore dei pannelli A (gB) e B (gN), i numeri "1, 2" (pannello A), e "1, 2, 3" (pannello B) indicano gli enzimi di restrizione usati (gB: 1 = RsaI; 2 = HinfI; gN: 1 = SACI; 2 = SCAI; 3 = SalI). Una singola digestione con HpaII è stato utilizzata per caratterizzare i prodotti genici di gO (pannello C).

Per quel che riguarda la distribuzione dei diversi genotipi nell'ambito delle infezioni congenite e post-natali, è stata osservata una distribuzione abbastanza omogenea tra i

diversi genotipi gB, ad eccezione di gB4 che è risultato poco presente nelle infezioni post-natali e assente nelle infezioni congenite (Figura 7A); d'altra parte, significative differenze sono state messe in rilievo per i genotipi gN e gO nella popolazione con infezione congenita. Nello specifico, per quanto riguarda gN, i genotipi gN3a, gN4b e gN4c erano maggiormente rappresentati nell'insieme della popolazione pediatrica considerata, mentre solo gN4c prevaleva nettamente nei bambini con infezione congenita (Figura 7B). Per quanto concerne gO, i genotipi gO1 e gO3 erano i più rappresentati nell'insieme delle due categorie di bambini analizzate, mentre solo gO3 predominava nelle infezioni congenite (Figura 7C).

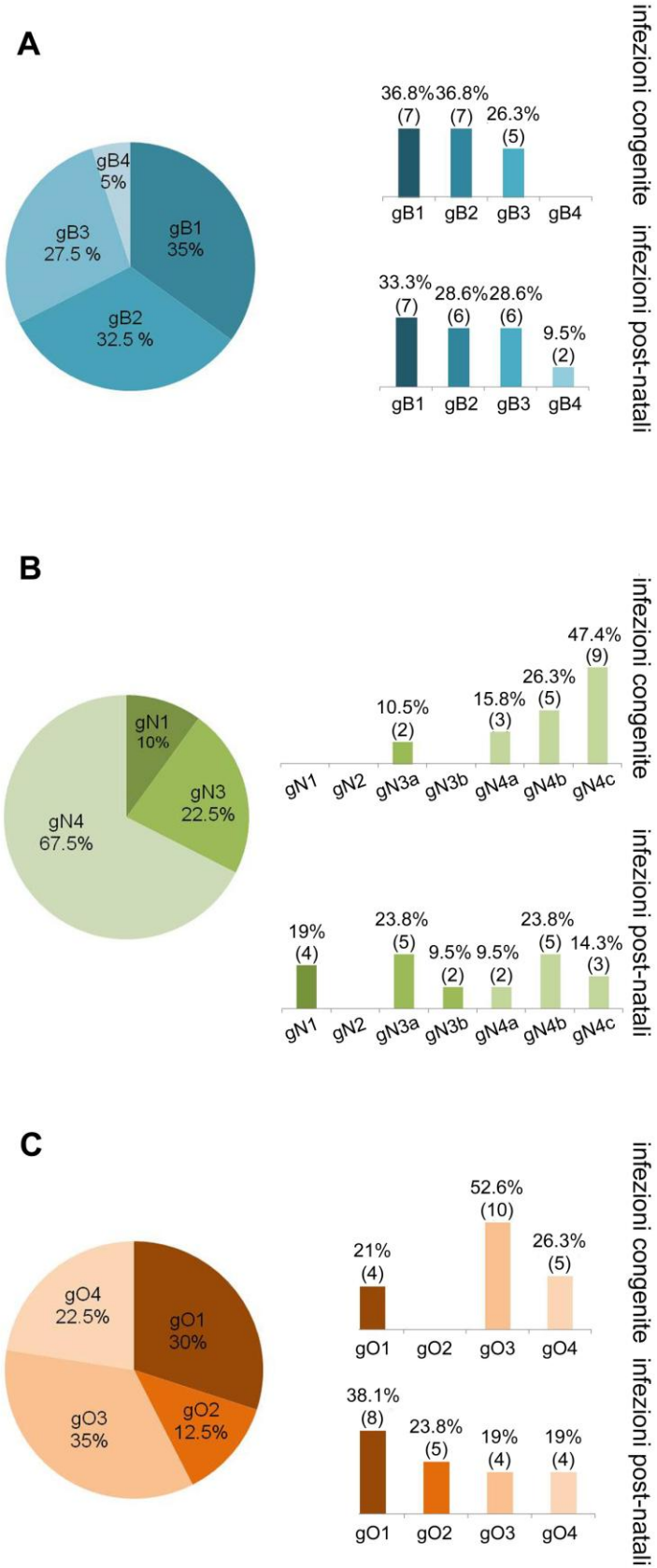


Figura 7. Distribuzione dei genotipi gB (A), gN (B) e gO (C) nella popolazione pediatrica con infezione congenita o post-natale.

Inoltre, per quel che riguarda lo studio delle combinazioni genotipiche, nelle infezioni congenite è risultata di spicco l'associazione genotipica gN4-gO3 (47,4%), a confronto con le post-natali (14,3%), con particolare riguardo per la variante gN4c-gO3 (Figura 8).

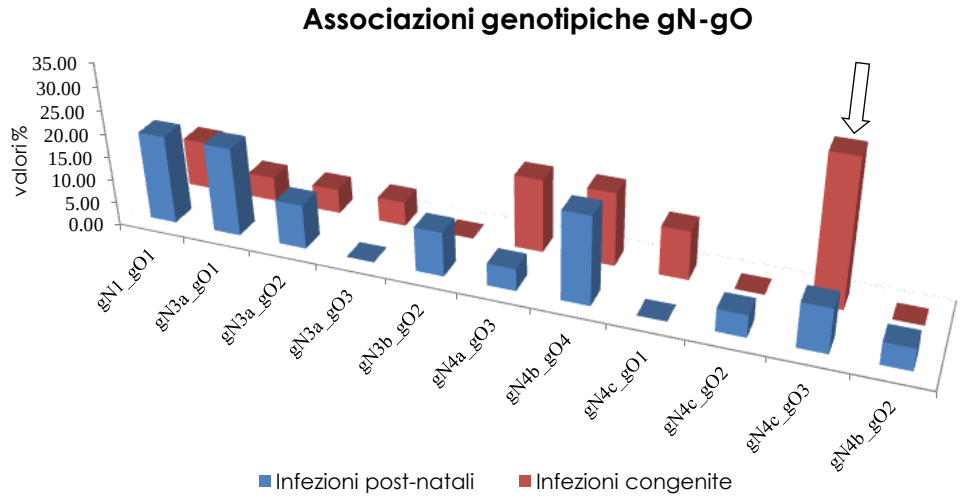


Figura 8: Distribuzione delle associazioni genotipiche gN-gO nella popolazione pediatrica inclusa nello studio.

Considerando da un lato il potenziale rilievo dei dati ottenuti e, dall'altro, le ridotte dimensioni del campione di popolazione pediatrica inclusa nello studio (19 infezioni congenite e 21 post-natali), questa ricerca è stata approfondita, innanzitutto per verificare se i dati più rilevanti ottenuti fossero statisticamente significativi.

In tale ottica, è stata effettuata un'analisi statistica dei dati utilizzando il test esatto di Fisher. Preliminarmente, mediante applicazione di quattro diversi software statistici, è stata calcolata la potenza del campione considerato, ottenendo in tutti e quattro i casi conferma di una numerosità adeguata per validare la significatività dei dati.

Per quanto attiene ai genotipi virali considerati singolarmente, l'analisi statistica della

frequenza di distribuzione dei genotipi gB, gN e gO nelle infezioni congenite rispetto alle post-natali ha mostrato una significativa associazione tra gN4 (P=0,006), in particolare la variante gN4c (P=0,037), e le infezioni congenite; un andamento analogo è stato trovato per gO3 (P=0,045).

Nell'ambito delle associazioni genotipiche, l'associazione gN4-gO3 nelle infezioni congenite è risultata statisticamente significativa (P=0,037).

Quanto alle possibili relazioni tra le combinazioni genotipiche e i quadri clinici alla nascita (Tabella 3) è risultata di spicco, nelle infezioni congenite, la relazione tra l'associazione genotipica gN4-gO3 e quadri clinici compatibili con infezione da HCMV.

Tabella 3. Associazioni genotipiche gN-gO nella popolazione pediatrica con infezione congenita e post-natale da HCMV in relazione ai dati clinici alla nascita.

INFEZIONI CONGENITE n=19				INFEZIONI POST-NATALI n=21			
Associazioni genotipiche gN-gO	**Segni clinici alla nascita**	**n**	**%**	**Associazioni genotipiche gN-gO**	**Segni clinici alla nascita**	**n**	**%**
gN1-gO1	/	0	0	gN1-gO1 gN1-gO1** gN1-gO1** gN1-gO1	"Rash" allergico Assenti Assenti Assenti	4	19,0
gN3a-gO1	Assenti	1	5,3	gN3a-gO1 gN3a-gO1 gN3a-gO1	Linfoadenopatia (infezione batterica) Bronchite "Rash" allergico	3	14,3
gN3a-gO2	/	0	0	gN3a-gO2*	Assenti	1	4,8
gN3a-gO3	Assenti	1	5,3	gN3a-gO3	Assenti	1	4,8
gN3b-gO2	/	0	0	gN3b-gO2* gN3b-gO2	Assenti Assenti	2	9,5
gN4a-gO1	/	0	0	gN4a-gO1	Assenti	1	4,8
gN4a-gO3 gN4a-gO3 gN4a-gO3	Lieve ingrossamento del fegato Lieve ingrossamento del fegato Ventricomegalia transitoria	3	15,8	gN4a-gO3*	Assenti	1	4,8
gN4b-gO2	/	0	0	gN4b-gO2**	Assenti	1	4,8
gN4b-gO4 gN4b-gO4 gN4b-gO4 gN4b-gO4 gN4b-gO4	Epatopatia acuta Assenti Assenti Assenti Assenti	5	26,3	gN4b-gO4 gN4b-gO4 gN4b-gO4* gN4b-gO4*	Sospetta infezione da *Toxoplasma gondii* Sospetta infezione da *Toxoplasma gondii* Assenti Assenti	4	19,0
gN4c-gO1 gN4c-gO1 gN4c-gO1	Assenti Assenti Assenti	3	15,8	gN4c-gO1	/	0	0
gN4c-gO2	/	0	0	gN4c-gO2	"Rash" allergico	1	4,8
gN4c-gO3 gN4c-gO3 gN4c-gO3 gN4c-gO3 gN4c-gO3 gN4c-gO3	Epatomegalia e stenosi del tratto epatico Lieve ingrossamento del fegato Linfoadenomegalia Assenti Assenti Assenti	6	31,6	gN4c-gO3* gN4c-gO3	Assenti Assenti	2	9,5

* Nascita prematura ** Ridotte dimensioni alla nascita

Sequenziamento genico e analisi filogenetica

Al fine di confermare i dati ottenuti mediante RFLP, è stata eseguita un'analisi più accurata mediante sequenziamento genico e analisi filogenetica.

Il sequenziamento del DNA e l'analisi filogenetica effettuati su una selezione casuale di campioni tra quelli inclusi nello studio è risultata in accordo con i dati ottenuti mediante RFLP [17]. I genotipi gB, gN e gO identificati con RFLP, segregavano con i ceppi di riferimento corrispondenti (Figura 9), con un intervallo di identità nucleotidica dal 97% al 99% per gB, dal 99% al 100% per gN e dal 99% al 100% per gO. Inoltre, per quando riguarda quest'ultimo, il sequenziamento genico e l'analisi filogenetica hanno permesso di individuare tre varianti genetiche aggiuntive (gO1a, gO1c e gO2b), non rilevate precedentemente mediante RFLP in quanto le endonucleasi di restrizione disponibili in commercio permettono di individuare solo i quattro genotipi principali (gO1, gO2, gO3 gO4).

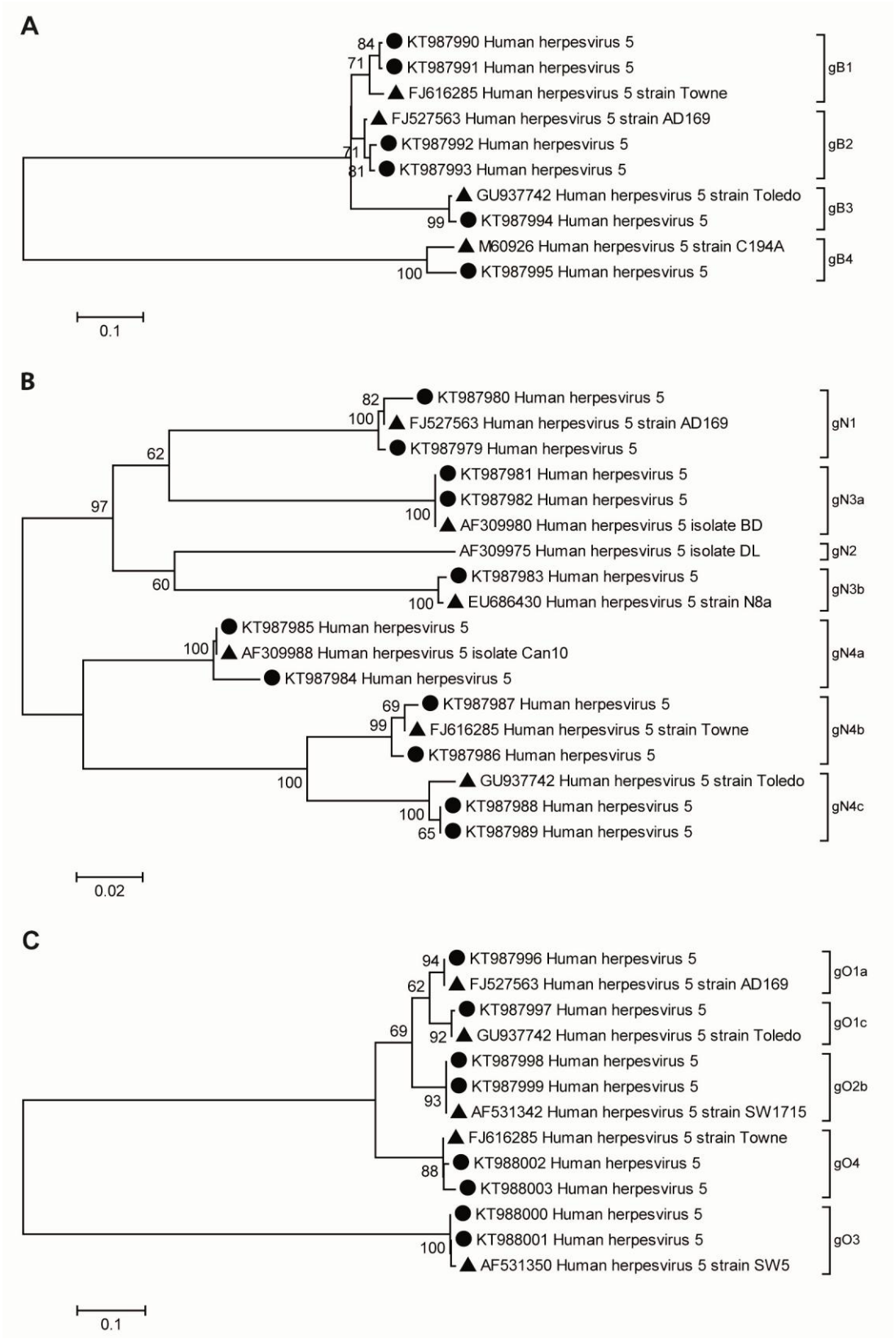


Figura 9. Analisi filogenetica basata su una porzione dei geni UL55 (gB; 496 nucleotidi) (pannello A), UL73 (gN; 313 nucleotidi) (pannello B) e UL74 (gO; 275 nucleotidi) (pannello C). In figura sono mostrati i valori di bootstrap superiori al 60%. I genotipi gB, gN e gO sono indicati sul lato destro del dendrogramma. Le sequenze dei ceppi identificati in questo studio e quelle dei ceppi di riferimento sono indicati con cerchi e triangoli, rispettivamente.

2 - STUDIO EPIDEMIOLOGICO RETROSPETTIVO SULLA PREVALENZA DI INFEZIONE DA HCMV IN SOGGETTI TRAPIANTATI DI RENE

Le indagini condotte per la diagnosi di laboratorio d'infezione da HCMV su 1977 campioni di sangue periferico prelevati da 658 soggetti trapiantati di rene negli anni 2011-2015, hanno messo in evidenza dati significativi per quanto attiene, in particolare, alla determinazione dell'antigenemia e della DNAemia da HCMV.

In Figura 10 è rappresentata la distribuzione per fasce di età del campione di popolazione esaminato; viene anche evidenziato il numero di soggetti positivi per la proteina virale pp65 per ogni fascia d'età coinvolta.

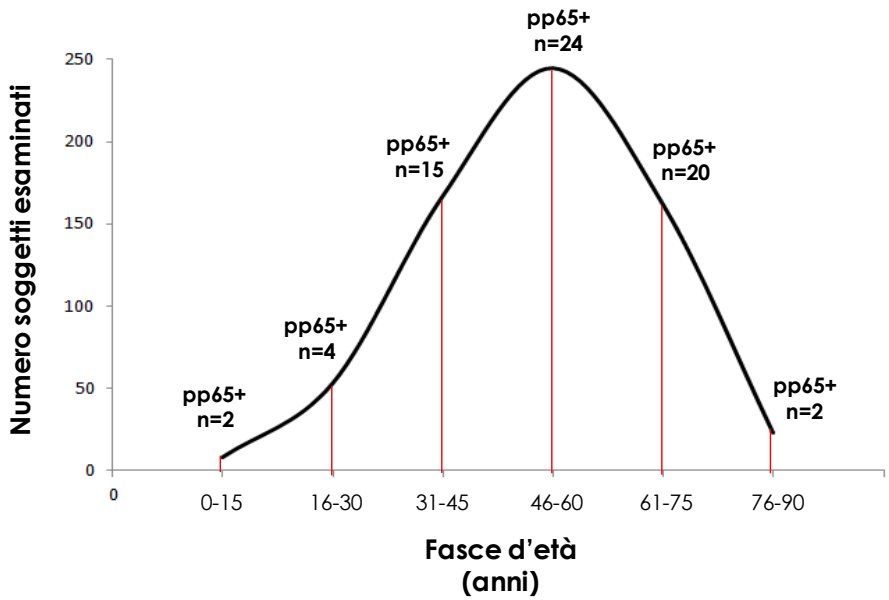


Figura 10. Distribuzione per fasce di età della popolazione esaminata e numero di soggetti positivi per la proteina virale pp65.

Come si può notare, il maggior numero di soggetti esaminati, come anche il maggior numero di soggetti positivi per pp65, cade nella fascia di età compresa tra 46 e 60 anni.

I soggetti positivi per la fosfoproteina virale pp65 di HCMV erano: 10 nel 2011 (di cui 6 nuovi casi e 4 vecchi casi), con una prevalenza di infezione del 9,2% e un'incidenza del 3,7%; 21 nel 2012 (di cui 12 nuovi casi e 10 vecchi casi), con una prevalenza di infezione

del 16,5% e un'incidenza del 9,4%; 11 nel 2013 (di cui 5 nuovi casi e 6 vecchi casi), con una prevalenza di infezione del 7,9% e un'incidenza del 3,6%; 7 nel 2014 (di cui 4 nuovi casi e 3 vecchi casi), con una prevalenza di infezione del 6,2% e un'incidenza del 3,6%; 18 nel 2015 (di cui 12 nuovi casi e 6 vecchi casi), con una prevalenza di infezione del 13,9% e un'incidenza del 9,3%.

In Figura 11 viene mostrato il numero di soggetti esaminati e quello dei soggetti positivi per la proteina virale pp65 per ogni anno preso in considerazione nello studio, con relativa percentuale di prevalenza e incidenza di infezione.

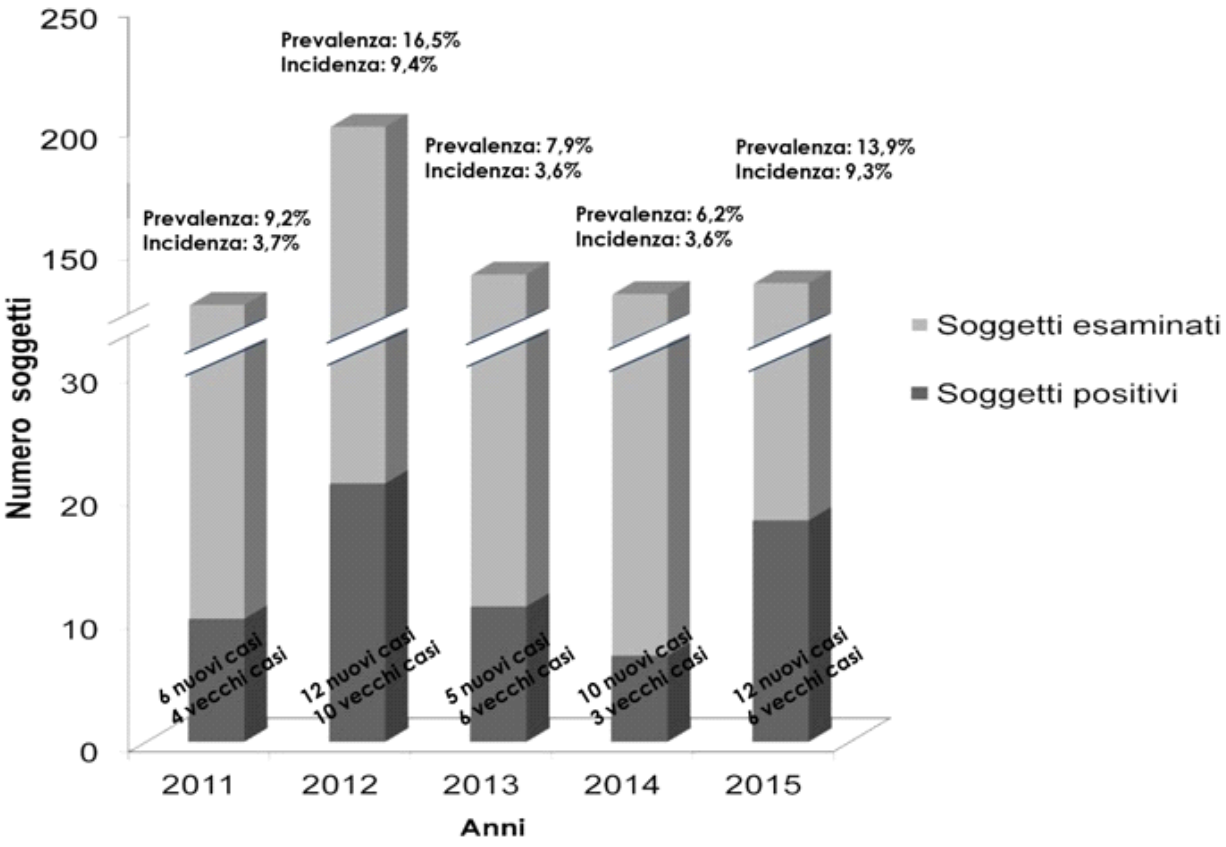


Figura 11. Rappresentazione grafica del numero di soggetti esaminati e del numero di soggetti positivi (con indicazione dei vecchie e nuovi casi) per la proteina virale pp65 negli anni 2011-2015: prevalenza e incidenza di infezione per anno sono riportate sopra ogni istogramma.

I campioni appartenenti ai soggetti risultati positivi all'analisi per l'antigenemia da HCMV sono stati sottoposti anche ad amplificazione genica mediante Real-Time PCR al fine di mettere in evidenza la presenza di DNA virale.

Il numero di soggetti e di campioni esaminati, l'analisi quantitativa dei leucociti polimorfonucleati di sangue periferico positivi per la proteina pp65 di HCMV e il numero di copie genomiche virali espresso in scala logaritmica, sono riportati in Tabella 4.

Tabella 4. Soggetti afferenti ai reparti e/o agli ambulatori della Nefrologia per trapianto di rene negli anni 2011-2015: campioni esaminati e positività per pp65 e DNA di HCMV

anni	n. campioni esaminati	n. soggetti esaminati	§n. soggetti pp65+ (n. leucociti+/200.000)	*n. soggetti DNA+ (log_{10} copie genomiche /ml)
2011	430	109	6 (0-100) 3 (100-200) 1 (>200)	6 (2,5 - 4,1) 3 (3,3 - 5) 1 (5)
2012	460	127	20 (0-100) 1 (100-200)	20 (2,7 - 4,5) 1 (4)
2013	395	138	10 (0-100) 1 (100-200)	10 (3 - 4,3) 1 (3,7)
2014	263	112	7 (0-100)	7 (2,3 - 4,2)
2015	429	129	18 (0-100)	18 (2,7 - 4)

§ n. soggetti pp65+ : numero di soggetti positivi per la fosfoproteina pp65 di HCMV; la positività è stata determinata attraverso valutazione del numero di leucociti polimorfonucleati del sangue periferico positivi per pp65 su 200.000 leucociti analizzati (n. leucociti+/200.000).

* n. soggetti DNA+ : numero di soggetti positivi per il DNA di HCMV attraverso valutazione quantitativa del numero di copie genomiche virali/ml da campioni di sangue periferico; i valori di copie genomiche sono espressi in scala logaritmica (log_{10} copie genomiche /ml).

I risultati ottenuti mediante le indagini sopra citate, messi in relazione con i risultati sierologici, sono riportati in Figura 12 per l'anno 2011, in Figura 13 per l'anno 2012, in Figura 14 per l'anno 2013, in Figura 15 per l'anno 2014 e in Figura 16 per l'anno 2015.

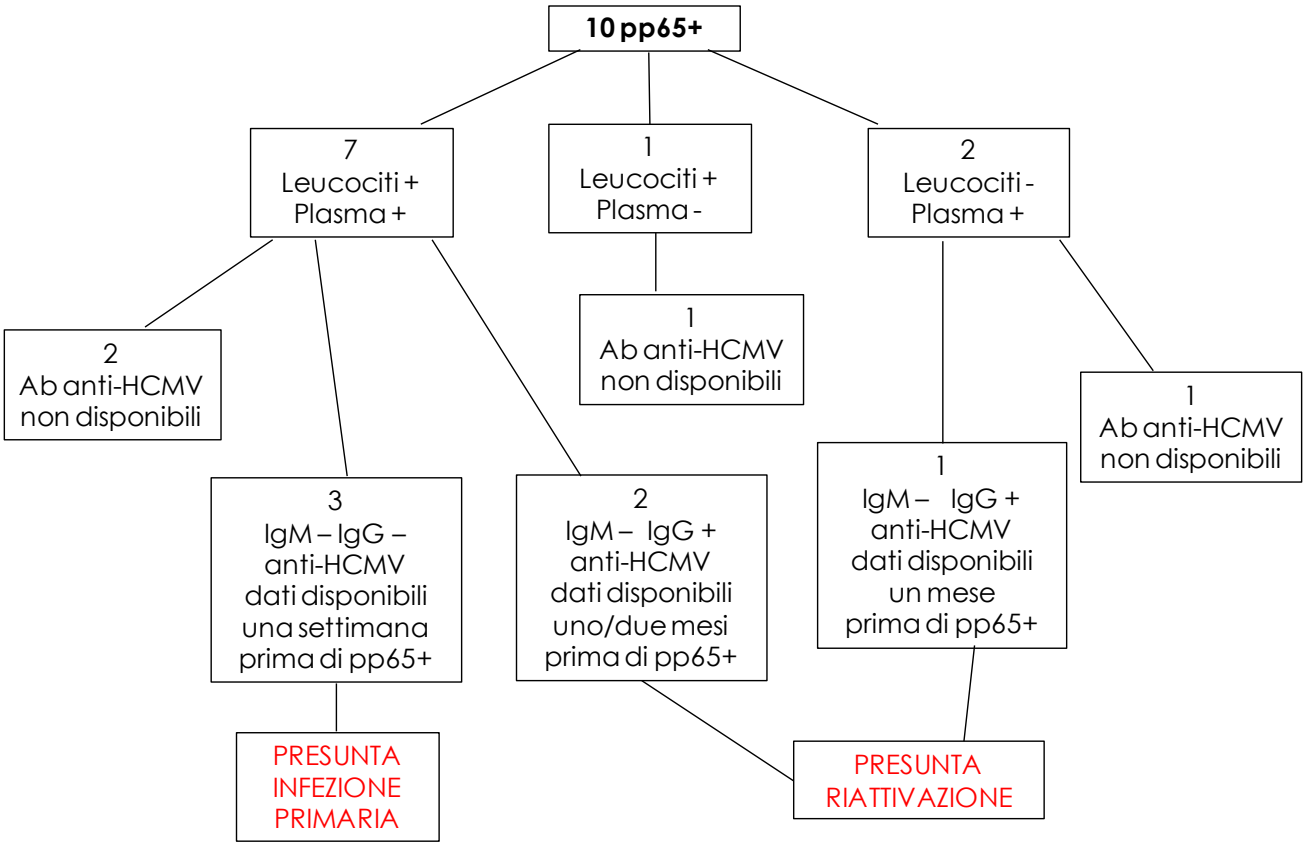


Figura 12. Numero di soggetti trapiantati di rene positivi per pp65 in leucociti polimorfonucleati (pp65+) e per DNA di HCMV in leucociti (leucociti +) e/o nel plasma (plasma+) da campioni di sangue periferico, in relazione ai dati sierologici (anno 2011).

I campioni di sangue di 10 soggetti sono risultati positivi per pp65 nel 2011 ed hanno mostrato un esito positivo anche per la ricerca del DNA virale. In particolare, 7 soggetti sono risultati positivi per la presenza di DNA virale sia nei leucociti, sia nel plasma. Per quel che riguarda la risposta anticorpale (immunoglobuline G ed M) nei confronti di HCMV di questi 7 soggetti, 2 erano positivi solo per IgG uno o due mesi prima della messa in evidenza della positività per pp65, (presunta riattivazione), 3 soggetti erano negativi per IgM e IgG anti-HCMV una settimana prima della messa in evidenza della positività per pp65, (possibile infezione primaria), ed infine per 2 soggetti non si conosceva lo stato anticorpale nei confronti di HCMV (dati non disponibili presso l'archivio informatico della UO di Virologia dell'AOU di Parma).

Dei rimanenti 3 soggetti positivi per pp65, 1 era risultato positivo per il DNA virale solo nei leucociti, ma non si conosceva lo stato anticorpale nei confronti di HCMV e 2 erano positivi per il DNA virale solo nel plasma. Per quanto riguarda questi ultimi, di uno non si conosceva lo stato anticorpale nei confronti di HCMV, mentre 1 aveva le IgG positive un mese prima della messa in evidenza della positività per pp65 (presunta riattivazione).

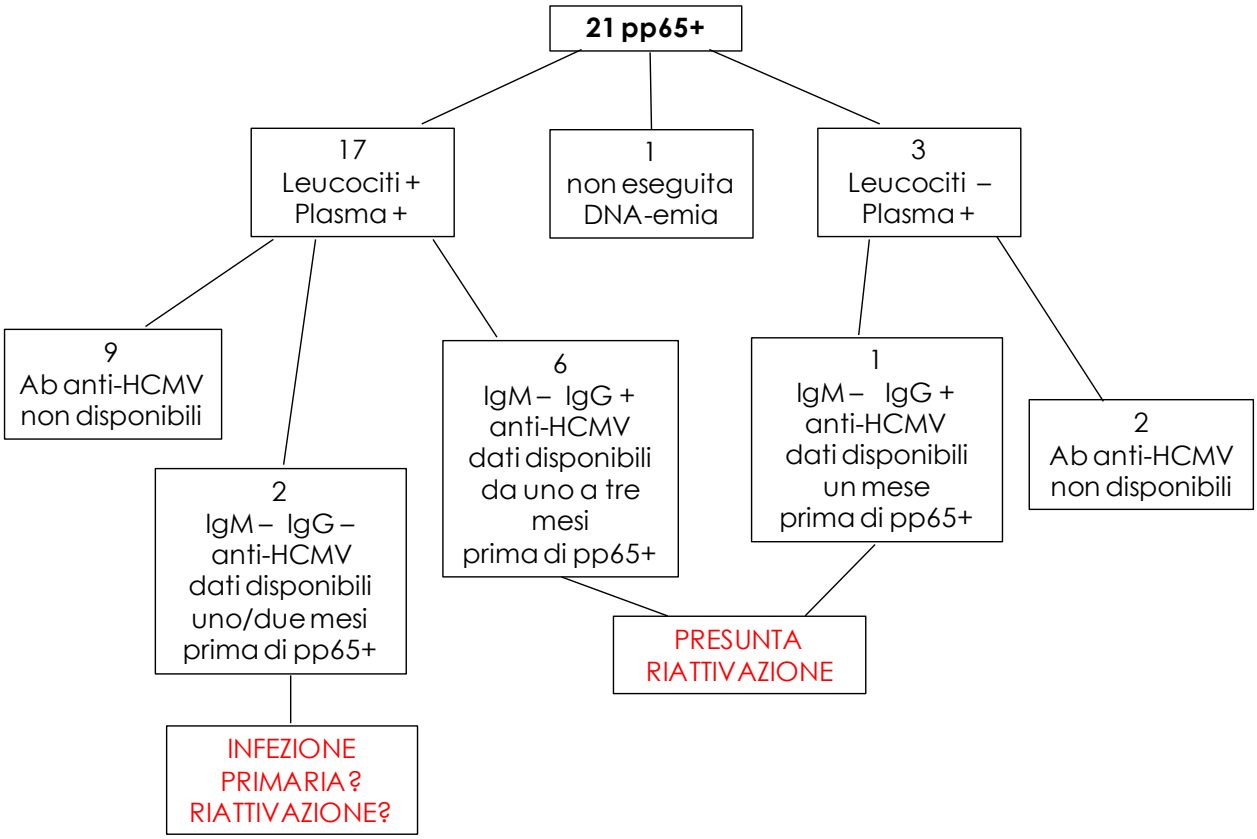


Figura 13. Numero di soggetti trapiantati di rene positivi per pp65 in leucociti polimorfonucleati (pp65+) e per DNA di HCMV in leucociti (leucociti +) e/o nel plasma (plasma+) da campioni di sangue periferico, in relazione ai dati sierologici (anno 2012).

I campioni di sangue di 21 soggetti sono risultati positivi per pp65 nel 2012 e 20 hanno mostrato un esito positivo anche per la ricerca del DNA virale; per 1 soggetto la ricerca del DNA virale non era stata eseguita. In particolare, 17 soggetti sono risultati positivi per la presenza di DNA virale sia nei leucociti, sia nel plasma. Per quel che riguarda la risposta anticorpale nei confronti di HCMV, 6 soggetti erano positivi solo per IgG da uno a tre mesi

prima della messa in evidenza della positività per pp65, (presunta riattivazione), 2 soggetti erano negativi per IgM e IgG anti-HCMV uno/due mesi prima della messa in evidenza della positività per pp65; per questi ultimi è più difficile ipotizzare la tipologia di infezione da HCMV, primaria o riattivata, in quanto la ricerca di anticorpi non era stata ulteriormente effettuata in tempi più ravvicinati rispetto alla messa in evidenza della positività dell'antigenemia virale. Infine, di 9 soggetti non si conosceva lo stato anticorpale nei confronti di HCMV (dati non disponibili presso l'archivio informatico della UO di Virologia dell'AOU di Parma). I rimanenti 3 soggetti risultati positivi per pp65, hanno mostrato il DNA virale solo nel plasma. Per quanto riguarda questi ultimi, di 2 soggetti non si conosceva lo stato anticorpale, mentre 1 aveva le IgG positive un mese prima della messa in evidenza della positività per pp65 (presunta riattivazione).

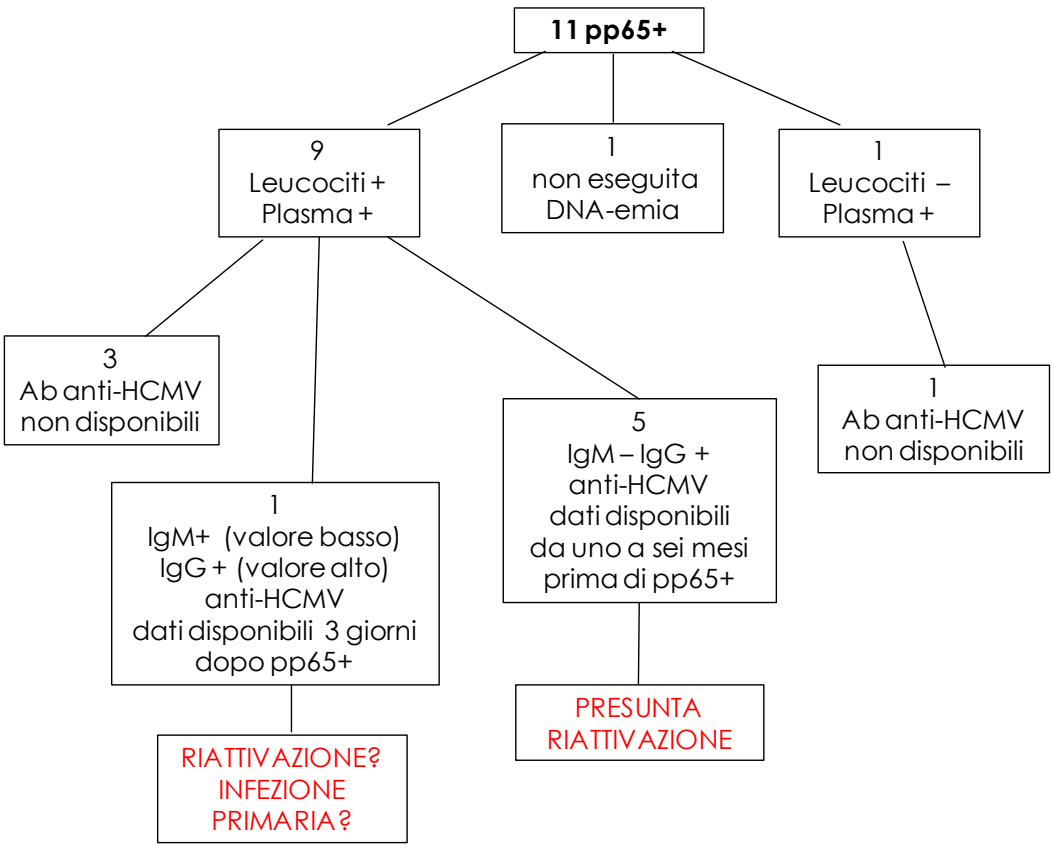


Figura 14. Numero di soggetti trapiantati di rene positivi per pp65 in leucociti polimorfonucleati (pp65+) e per DNA di HCMV in leucociti (leucociti +) e/o nel plasma (plasma+) da campioni di sangue periferico, in relazione ai dati sierologici (anno 2013).

I campioni di sangue di 11 soggetti sono risultati positivi per pp65 nel 2013 e 10 hanno mostrato un esito positivo anche per la ricerca del DNA virale; per 1 soggetto la ricerca del DNA virale non era stata eseguita. In particolare, 9 soggetti sono risultati positivi per la presenza di DNA virale sia nei leucociti, sia nel plasma. Per quel che riguarda la risposta anticorpale nei confronti di HCMV, 5 soggetti erano positivi solo per IgG da uno a sei mesi prima della messa in evidenza della positività per pp65 (presunta riattivazione), 1 soggetto era positivo per IgM e IgG anti-HCMV tre giorni dopo la messa in evidenza della positività per pp65. Considerando che le immunoglobuline di classe M possono essere presenti anche in caso di riattivazione (anche se con durata minore e a titoli più bassi rispetto a quanto rilevabile in caso di infezione primaria) e tenendo anche presente
che le IgG erano a titolo elevato, per questo soggetto potrebbe essere maggiormente ipotizzabile una riattivazione virale anche se non può essere esclusa l'ipotesi di un'infezione primaria. Infine, di 3 soggetti non si conosceva lo stato anticorpale nei confronti di HCMV (dati non disponibili presso l'archivio informatico della UO di Virologia AOU di Parma).

Il rimanente soggetto risultato positivo per pp65, era positivo per il DNA virale solo nel plasma; anche per questo soggetto non era noto lo stato anticorpale nei confronti di HCMV.

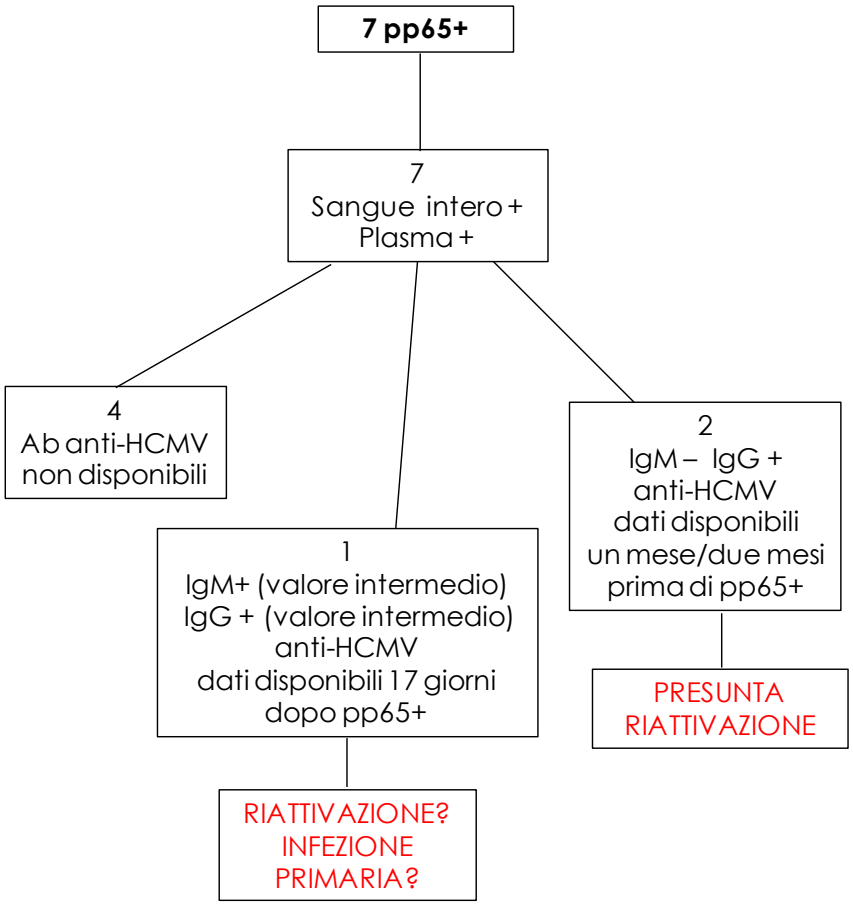


Figura 15. Numero di soggetti trapiantati di rene positivi per pp65 in leucociti polimorfonucleati (pp65+) e per DNA di HCMV in sangue intero (sangue intero +) e/o nel plasma (plasma+) da campioni di sangue periferico, in relazione ai dati sierologici (anno 2014).

I campioni di sangue di 7 soggetti sono risultati positivi per pp65 nel 2014 e hanno mostrato un esito positivo anche per la ricerca del DNA virale. La ricerca di quest'ultimo era stata effettuata sia su sangue intero, sia su plasma. Tutti i soggetti sono risultati positivi per la presenza di DNA virale sia nel sangue *in toto*, sia nel plasma. Per quel che riguarda la risposta anticorpale nei confronti di HCMV, 2 soggetti erano positivi solo per IgG uno/due mesi prima della messa in evidenza della positività per pp65, (presunta riattivazione), 1 soggetto era positivo per IgM e IgG anti-HCMV diciassette giorni dopo la messa in evidenza della positività per pp65. Per tale soggetto è possibile fare considerazioni simili a quelle evidenziate per uno dei soggetti della coorte 2013, che aveva un analogo repertorio anticorpale (IgM+, IgG+). In questo caso, tuttavia, il titolo delle IgM è risultato un

pò più alto e quello delle IgG un pò più basso rispetto al soggetto del 2013. Per questo soggetto potrebbe essere ipotizzabile sia una riattivazione virale, sia un'infezione primaria. Infine, per 4 soggetti non si conosceva lo stato anticorpale nei confronti di HCMV (dati non disponibili presso l'archivio informatico della UO di Virologia dell'AOU di Parma).

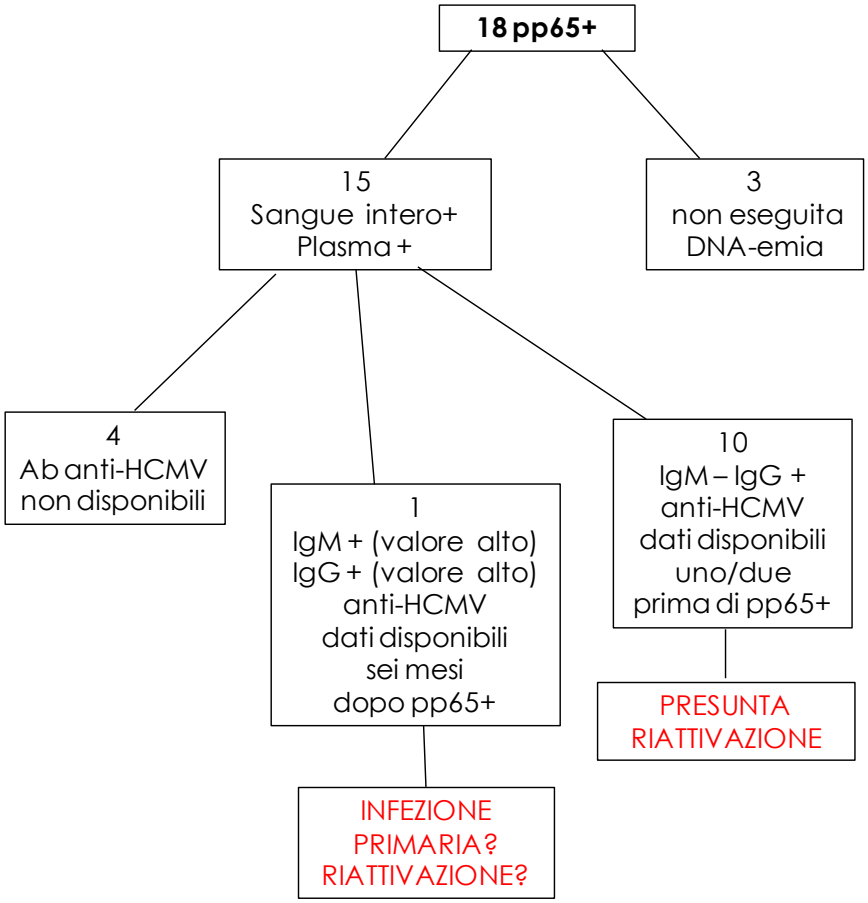


Figura 16. Numero di soggetti trapiantati di rene positivi per pp65 in leucociti polimorfonucleati (pp65+) e per DNA di HCMV in sangue intero (sangue intero +) e/o nel plasma (plasma+) da campioni di sangue periferico, in relazione ai dati sierologici (anno 2015).

I campioni di sangue di 18 soggetti sono risultati positivi per pp65 nel 2015 e 15 hanno mostrato un esito positivo anche per la ricerca del DNA virale; la ricerca di quest'ultimo era stata effettuata sia su sangue intero, sia su plasma. Per 3 soggetti la ricerca di DNA non era stata eseguita. Tutti i soggetti analizzati sono risultati positivi per la presenza di DNA virale sia nel sangue, sia nel plasma. Per quel che riguarda la risposta anticorpale nei

confronti di HCMV, 10 soggetti erano positivi solo per IgG uno/due mesi prima della messa in evidenza della positività per pp65, (presunta riattivazione), 1 soggetto era positivo per IgM e IgG anti-HCMV sei mesi dopo la messa in evidenza della positività per pp65. Analogamente ai soggetti considerati nel 2013 e 2014 (entrambi positivi per IgM e IgG), anche per tale soggetto è possibile fare considerazioni simili; in questo caso, il titolo delle IgM e quello delle IgG sono risultati elevati. Considerando che le IgM nelle infezioni primarie hanno una durata maggiore rispetto a quelle messe in evidenza nelle riattivazioni e che i dati per questo soggetto erano disponibili dopo sei mesi dalla messa in evidenza della positività per pp65, potrebbe essere ipotizzabile un'infezione primaria, anche se non può essere esclusa l'ipotesi di riattivazione virale. Infine di 4 soggetti non si conosceva lo stato anticorpale nei confronti di HCMV.

3 – MESSA A PUNTO DI UN MODELLO DI INFEZIONE *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA LATENZA E RIATTIVAZIONE DI HCMV

Come già accennato, questo studio è basato sul possibile impiego della linea monocitaria THP-1 come modello di riattivazione di HCMV dalla latenza, dando luogo a produzione di progenie virale e ricalcando così le caratteristiche dell'infezione virale che si verifica *in vivo* nei macrofagi, cellule responsabili della disseminazione del virus nei tessuti dell'ospite a seguito di riattivazione del virus latente nei monociti.

Al fine di verificare l'efficacia del suddetto modello, sono stati analizzati i diversi stadi dell'infezione, dalla valutazione quantitativa del DNA virale, alla presenza di trascritti virali fino alla produzione di progenie di HCMV nel modello di riattivazione a confronto con il modello di latenza.

Esperimenti preliminari di validazione, effettuati dal nostro stesso gruppo di ricerca, hanno permesso di verificare, mediante analisi citofluorimetrica di specifici marcatori cellulari (CD11b e CD14), il corretto differenziamento da monocita immaturo a macrofago maturo (dati non mostrati).

Valutazione dei livelli di DNA virale mediante Real-Time PCR nel modello latente e riattivato dopo 30 h, 4, 6 e 7 giorni di infezione

Dopo infezione dei monociti THP-1 (modello di latenza) e degli stessi differenziati a macrofagi dopo l'infezione (modello di riattivazione), la presenza del DNA di HCMV è stata valutata inizialmente dopo 30 h di infezione nelle frazioni nucleari del modello cellulare di infezione latente ed in quello di riattivazione.

La scelta di questo tempo è da legarsi al fatto che, considerando la lentezza di espletamento del ciclo replicativo di HCMV, tale ora d'infezione garantisce che non sia ancora avvenuta la replicazione del DNA virale nel modello di riattivazione. Inoltre, la valutazione della presenza di DNA virale nella frazione nucleare, piuttosto che nell'intera

cellula, esclude la possibilità che il segnale ottenuto includa anche particelle virali presenti nell'inoculo ma non internalizzate.

Prima del frazionamento cellulare, al fine di valutare la percentuale di cellule vitali, un'aliquota di cellule è stata sottoposta a conta in presenza del colorante "Trypan blue". La percentuale di cellule vitali per ogni MOI considerata e per ogni punto sperimentale è risultata paragonabile nel modello di latenza e di riattivazione (92% a 76% per il modello latente vs il 89% al 70% per il modello di riattivazione da 30 h a 7 giorni dopo l'infezione).

Il frazionamento cellulare è stato convalidato in via preliminare mediante saggio WB, dimostrando la localizzazione corretta dei marcatori cellulari B23 e actina a livello nucleare e citoplasmatico, rispettivamente (Figura 17A: "modello di latenza THP-1 30 h p.i." e "Modello di riattivazione THP-1 30 h p.i.").

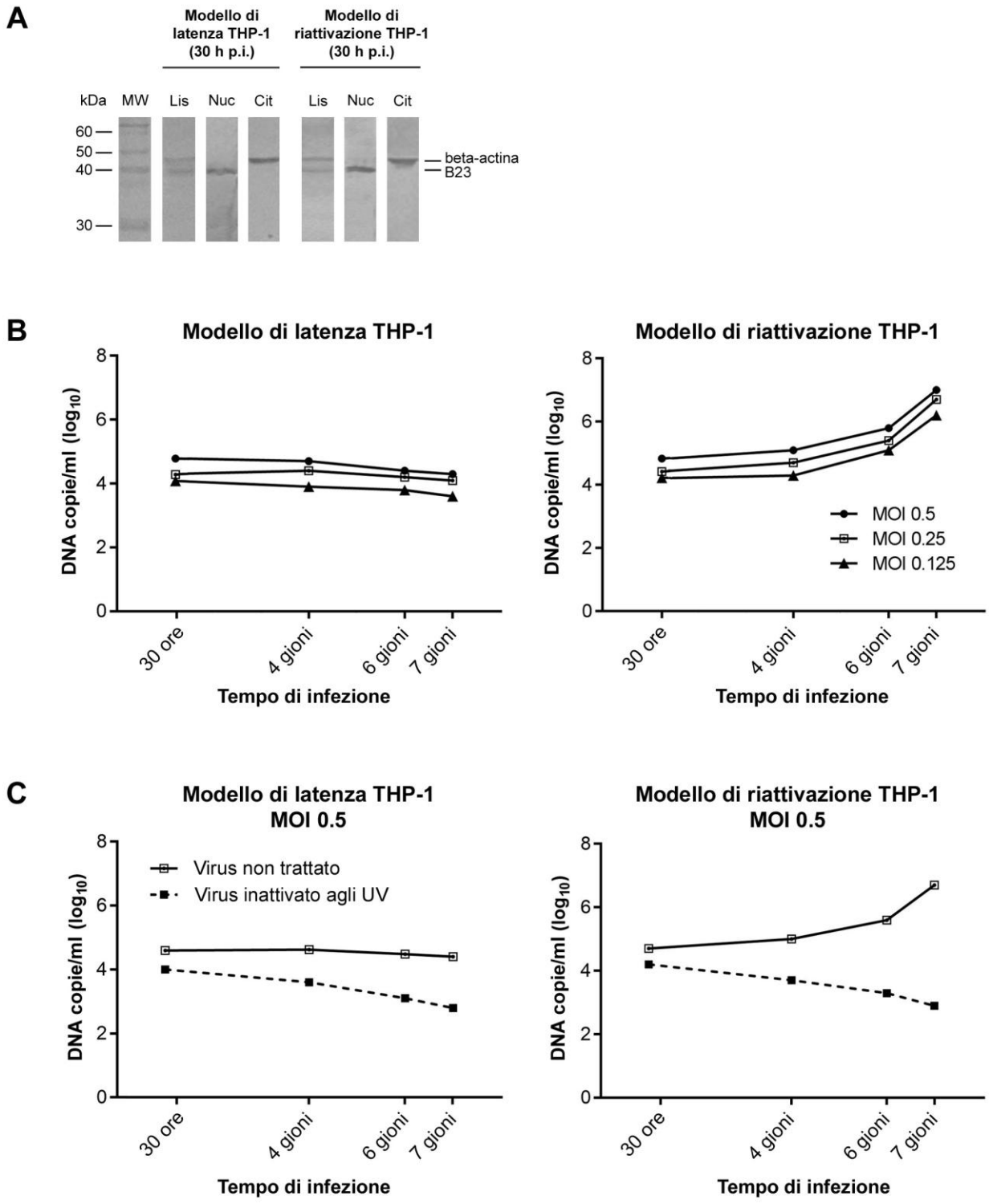


Figura 17. A- Le cellule THP-1 indifferenziate (pannello " Modello di latenza THP-1") e differenziate (pannello "Modello di riattivazione THP-1") sono state sottoposte a frazionamento cellulare per ottenere il lisato cellulare totale (Lis), la frazione nucleare (Nuc) e la frazione citoplasmatica (Cit). Dopo l'analisi in SDS-PAGE, il WB è stato effettuato utilizzando un anticorpo policlonale di coniglio diretto contro la proteina B23 (40 kDa) e un anticorpo monoclonale diretto contro la proteina beta-actina (44 kDa), marcatori nucleare e citoplasmatico, rispettivamente. Le immunoreazioni

sono state rivelate mediante anticorpi anti-coniglio e anti-topo coniugati con fluoresceina. I marcatori di peso molecolare noto sono indicati sul lato sinistro del pannello A.
B- Il DNA totale è stato estratto dai nuclei di monociti THP-1 indifferenziati (pannello "Modello di latenza THP-1") e monociti THP-1 infettati e poi differenziati (pannello "modello di riattivazione THP-1"). Le quantità di DNA sono state misurate mediante q-PCR in tempo reale a 30 h, 4, 6 e 7 giorni p.i. a MOI 0,5, 0,25 e 0,125, in entrambi i modelli sperimentali. Risultati analoghi sono stati ottenuti da due esperimenti indipendenti.
C – Il DNA totale è stato estratto dai nuclei di monociti THP-1 infettati con virus attivamente replicantesi ("Virus non trattato") e da monociti THP-1 infettati con virus reso incapace di infettare "Virus inattivato agli UV" nel modello di latenza (pannello "Modello di latenza THP-1 MOI 0.5") ed in quello di riattivazione (pannello "Modello di riattivazione THP-1 MOI 0.5"). Le quantità di DNA di HCMV sono state misurate mediante q-PCR in tempo reale a 30 h, 4, 6 e 7 giorni p.i. a MOI 0,5 in entrambi i modelli sperimentali.

La presenza e la quantificazione del DNA di HCMV estratto dai nuclei di cellule THP-1 derivate dal modello di latenza e dal modello di riattivazione sono state valutate mediante Real-time PCR a 30 h p.i. per le tre MOI considerate (0,5, 0,25, 0,125) (Figura 17B, pannelli " Modello di latenza THP-1" e "Modello di riattivazione THP-1"). A 30 p.i., i risultati ottenuti nei modelli di latenza e di riattivazione erano paragonabili, con una diminuzione progressiva delle copie del DNA di HCMV per ml in relazione alle MOI decrescenti considerate.

In seguito sono stati analizzati i risultati ottenuti mediante Real-time PCR amplificando il DNA estratto dalle frazioni nucleari derivate dai due modelli dopo 4, 6 e 7 giorni di infezione alle tre MOI considerate. Nel modello di latenza, le copie di DNA di HCMV per ml ottenute dopo 4, 6 e 7 giorni di infezione erano paragonabili al valore ottenuto dopo 30 h di infezione per ciascuna delle MOI considerate (Figura 17B, pannello "Modello di latenza THP-1"), nonostante una certa diminuzione della quantità di DNA virale, che diventava più evidente al settimo giorno, compatibile con una parziale perdita dello stesso, presente nel nucleo in forma di episoma, in concomitanza a ripetuti cicli di replicazione cellulare. Al contrario, nel modello di riattivazione, le copie del DNA di HCMV per ml aumentavano

gradualmente da 4 a 7 giorni di infezione per tutte le MOI considerate (Figura 17B, pannello "Modello di riattivazione THP-1").

Questi esperimenti sono stati ripetuti utilizzando il virus inattivato ai raggi UV ad una MOI 0,5 (Figura 17C). I risultati hanno mostrato che il DNA del virus inattivato entra nei nuclei cellulari di entrambi i modelli e che i livelli di DNA diminuiscono gradualmente durante i tempi di infezione considerati, convalidando così l'aumento dei livelli di DNA virale osservati con virus infettante nel modello di riattivazione.

Il metodo Real-time PCR applicato comprendeva anche la co-amplificazione qualitativa del gene della beta-globina di cellule THP-1; il valore soglia di amplificazione di tale gene era di 26 cicli per il modello di latenza e di 25 cicli per quello di riattivazione per tutti i punti sperimentali considerati.

I valori di DNA ottenuti per i modelli di latenza e riattivazione (Figura 17, pannelli A e B) in due esperimenti indipendenti e le relative deviazioni standard sono riportati in Tabella 5.

Tabella 5. DNA virale presente in cellule THP-1 utilizzate come modello di latenza o come modello di riattivazione (due esperimenti indipendenti) e valori di deviazione standard.

Tempi di infezione	MOI (PFU/cell)	Modello di latenza THP-1					Modello di riattivazione THP-1				
		Copie DNA genomico/ml		Copie DNA genomico/ml (log_{10})		DS* (log_{10})	Copie DNA genomico/ml		Copie DNA genomico/ml (log_{10})		DS* (log_{10})
		1	2	1	2		1	2	1	2	
30 h	0,125	$1,32 \times 10^4$	$1,29 \times 10^4$	4,121	4,111	0,007	$1,44 \times 10^4$	$1,95 \times 10^4$	4,158	4,290	0,094
	0,25	$2,04 \times 10^4$	$2,21 \times 10^4$	4,309	4,344	0,024	$2,13 \times 10^4$	$2,69 \times 10^4$	4,328	4,430	0,072
	0,5	$6,51 \times 10^4$	$6,80 \times 10^4$	4,813	4,832	0,013	$5,80 \times 10^4$	$6,09 \times 10^4$	4,763	4,785	0,015
4 giorni	0,125	$8,96 \times 10^3$	$8,12 \times 10^3$	3,952	3,909	0,030	$2,44 \times 10^4$	$2,30 \times 10^4$	4,387	4,362	0,018
	0,25	$2,81 \times 10^4$	$2,91 \times 10^4$	4,449	4,464	0,010	$5,56 \times 10^4$	$5,80 \times 10^4$	4,745	4,763	0,013
	0,5	$4,71 \times 10^4$	$4,95 \times 10^4$	4,673	4,695	0,015	$1,32 \times 10^5$	$1,54 \times 10^5$	5,120	5,187	0,046
6 giorni	0,125	$6,31 \times 10^3$	$6,91 \times 10^3$	3,800	3,839	0,028	$1,53 \times 10^5$	$1,27 \times 10^5$	5,185	5,104	0,056
	0,25	$1,89 \times 10^4$	$1,75 \times 10^4$	4,277	4,243	0,023	$2,97 \times 10^5$	$2,50 \times 10^5$	5,473	5,398	0,053
	0,5	$2,75 \times 10^4$	$2,61 \times 10^4$	4,440	4,417	0,016	$7,30 \times 10^5$	$6,50 \times 10^5$	5,863	5,813	0,035
7 giorni	0,125	$4,80 \times 10^3$	$4,21 \times 10^3$	3,681	3,624	0,040	$1,32 \times 10^6$	$1,70 \times 10^6$	6,120	6,230	0,077
	0,25	$1,50 \times 10^4$	$1,30 \times 10^4$	4,176	4,113	0,044	$5,58 \times 10^6$	$5,42 \times 10^6$	6,747	6,734	0,009
	0,5	$2,03 \times 10^4$	$2,14 \times 10^4$	4,307	4,330	0,016	$9,08 \times 10^6$	$1,02 \times 10^7$	6,958	7,006	0,034

*DS: deviazione standard

Analisi dei trascritti virali

Per verificare l'attivazione e lo sviluppo del programma litico di HCMV in monociti THP-1 differenziati a macrofagi dopo l'infezione (modello riattivazione), è stata analizzata la presenza dei trascritti virali rappresentativi delle fasi precocissima, precoce, precoce-tardiva e tardiva del ciclo litico di HCMV (IE1, DNA pol, pp65 e pp150, rispettivamente) dopo 7 giorni di infezione (Figura 18, pannello "Modello di riattivazione THP-1").

Al fine di verificare se la presenza dei trascritti virali fosse il risultato della riattivazione di HCMV indotta dal differenziamento dei monociti THP-1, lo stesso studio è stato eseguito anche utilizzando il modello di latenza (Figura 18, pannello "Modello di latenza THP-1").

I trascritti dei geni virali precocissimi (IE1), precoci (DNA pol), precoci-tardivi (pp65) e tardivi (pp150) sono stati rilevati nel modello di riattivazione con un'intensità di segnale decrescente in relazione alla MOI utilizzata (Figura 18, pannello "Modello di riattivazione THP-1", pozzetto 1: MOI 0,5; pozzetto 2: MOI 0,25; pozzetto 3: MOI 0,125; pozzetto 4, 5 e 6 controlli negativi). Viceversa, nessun prodotto di amplificazione è stato rilevato nel modello di latenza, ad eccezione di un debole segnale per IE1 alla MOI più alta (Figura 18, "Modello di latenza THP-1", pozzetto 1).

Inoltre, nel modello di latenza, per tutte le MOI considerate è stata dimostrata la presenza del trascritto anti-senso associato alla latenza di citomegalovirus (anti-CLT) (Figura 18, pannello "Modello di latenza THP-1"); un segnale più debole per questo trascritto è stato rilevato anche nel modello di riattivazione, in accordo con quanto descritto in letteratura (Figura 18, pannello "Modello di riattivazione THP-1"). L'amplificazione di una sequenza del trascritto del gene cellulare GAPDH è stata effettuata come controllo di reazione.

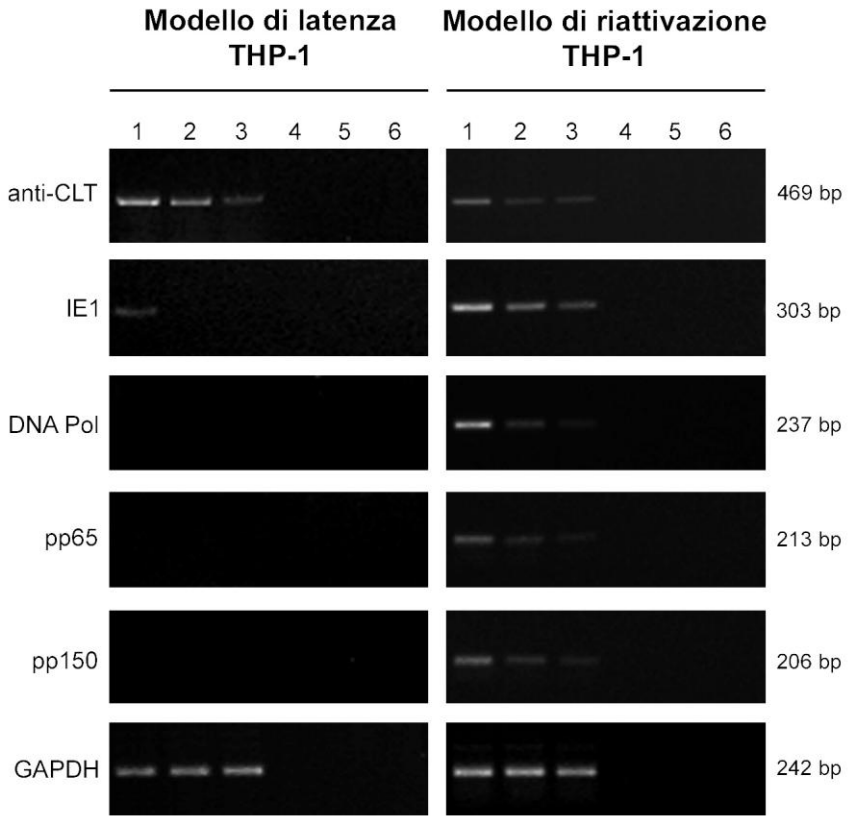


Figura 18. Analisi dei trascritti di HCMV estratti da monociti THP-1 non differenziati (modello di latenza) e da monociti THP-1 infettati e poi differenziati a macrofagi (modello di riattivazione) alle tre MOI considerate. I prodotti di amplificazione dei trascritti dei geni virali IE1 (precocissimo), DNA pol (precoce), pp65 (precoce-tardivo), pp150 (tardivo) e del gene cellulare GAPDH, sono stati analizzati dopo 7 giorni di infezione. Per il modello di latenza, è stato analizzato anche il trascritto anti-senso associato alla latenza (anti-CLT). Pozzetti 1, 2 e 3: MOI 0,5, 0,25 e 0,125, rispettivamente; pozzetti 4, 5 e 6: amplificazione dei trascritti in assenza di retrotrascrizione (controlli negativi: verifica di assenza di contaminazione da DNA). I pesi molecolari attesi per i frammenti genici amplificati sono mostrati sul lato destro. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti.

Analisi della progenie virale

Esperimenti preliminari effettuati dal nostro stesso gruppo di ricerca, hanno permesso di verificare che l'utilizzo del ceppo endoteliotropico di HCMV (TB40E), dotato di un maggiore tropismo per cellule macrofagiche rispetto al ceppo di laboratorio Towne, frequentemente usato in tali tipologie di studi, rende il modello sperimentale messo a punto molto più assimilabile a quello naturale (dati non mostrati).

Al fine di verificare il completamento del ciclo replicativo di HCMV nel modello di riattivazione, il terreno di mantenimento (sopranatante) delle cellule THP-1 infettate alle diverse MOI (e poi differenziate a macrofagi) per 7 giorni, è stato utilizzato per infettare fibroblasti umani MRC5 (modello permissivo all'infezione di HCMV).

Prima di procedere con la suddetta analisi, sono stati condotti esperimenti dal nostro stesso gruppo di ricerca, al fine di verificare l'assenza di esosomi nella sospensione virale corrispondente alla progenie derivata dal modello di riattivazione THP-1 (dati non mostrati); infatti, l'eventuale presenza di esosomi (risultati, invece, assenti) avrebbe potuto falsare il risultato sull'emergenza di virioni progenie in quanto possibili veicoli di componenti virali nel sistema permissivo (fibroblasti MRC5) utilizzato per verificare la resa virale da cellule THP-1 riattivate.

La produzione di progenie virale è stata confermata mediante la ricerca di proteine precocissime di HCMV nei nuclei dei fibroblasti mediante reazione di immunofluorescenza dopo 24 h di infezione (Figura 19A).

Le cellule positive per proteine precocissime di HCMV sono state quantificate; i valori ottenuti sono risultati compatibili con le tre MOI utilizzate per infettare le cellule THP-1 (Figura 19B: percentuale di fibroblasti positivi per le proteine precocissime virali IE1 e IE2: 14,2, 6,6, 2,6 a MOI 0,5, 0,25 e 0,125, rispettivamente).

La progenie virale ottenuta in seguito a riattivazione, è stata titolata utilizzando il metodo della diluizione limite ($TCID_{50}$) come descritto nella sezione "Materiali e Metodi" (Figura 19C).

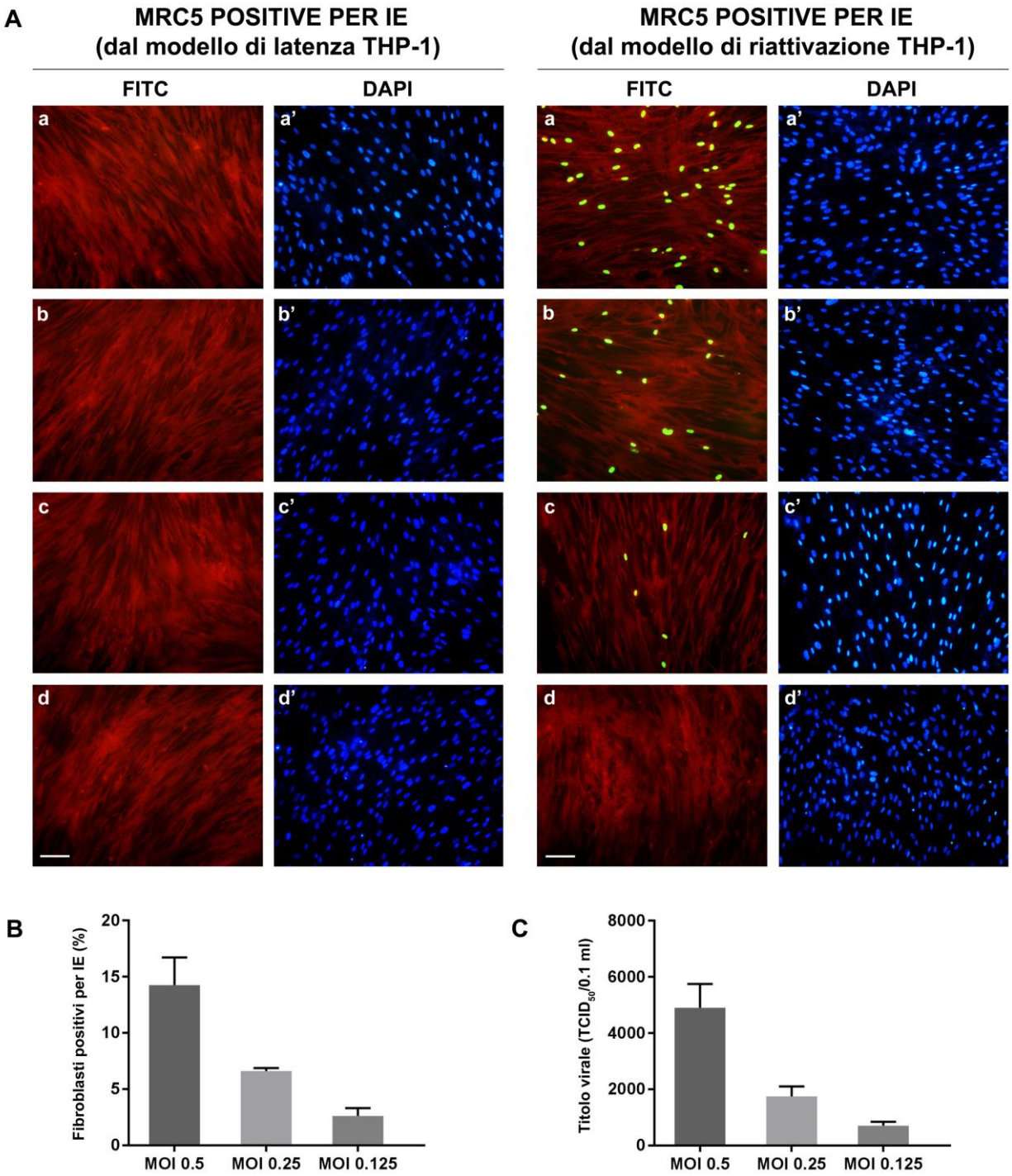


Figura 19. Analisi della progenie virale ottenuta da macrofagi THP-1 (modello di riattivazione) infettati con HCMV a differenti MOI per 7 giorni ed espressione percentuale della resa virale. Pannello A: monostrati confluenti di fibroblasti MRC5 infettati con il sopranatante di monociti THP-1 (modello di latenza) e di macrofagi THP-1 (modello di riattivazione) infettati alle 3 MOI considerate: 0,5 (pannelli a e a'), 0,25 (pannelli b e b'), 0,125 (pannelli c e c'). Dopo 24 h di infezione, la presenza di virus infettante è stata dimostrata mediante reazione di immunofluorescenza utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per l'epitopo comune alle due proteine precocissime maggiori IE1 e IE2. Le cellule sono state marcate con il colorante di contrasto blu di

Evans (cellule in rosso: pannelli a, b, c e d) ed i nuclei evidenziati con l'intercalante del DNA DAPI (pannelli a', b', c' e d'). I pannelli d e d' rappresentano cellule non infettate. Pannello B: i fibroblasti infettati e positivi per la proteina IE, rappresentativi della progenie virale infettante derivata dal modello THP-1 di riattivazione, sono espressi in valori percentuali medi derivanti da due esperimenti indipendenti (per ogni esperimento, sono stati scelti a caso dieci campi e contati i nuclei positivi). Pannello C: l'infettività virale è stata valutata utilizzando il saggio $TCID_{50}$ a partire dal sopranatante di macrofagi THP-1 (modello di riattivazione) alle MOI considerate.

Infine, l'efficienza di infezione del ceppo TB40E in cellule THP-1 utilizzate come modello di riattivazione (differenziamento dei monociti a macrofagi dopo l'infezione) (Figura 20), è stata confrontata con quella ottenuta da monociti THP-1 differenziati a macrofagi prima dell'infezione (modello litico). Il sopranatante derivato dal modello litico dopo 7 giorni di infezione è stato utilizzato per infettare fibroblasti MRC5 (Figura 20 A, B: profilo di immunofluorescenza delle proteine precocissime virali IE e percentuale di cellule positive per IE, rispettivamente; Figura 20 C: titolazione della progenie virale espressa in TCID50). I risultati mostrano un'efficienza di infezione leggermente superiore in quest'ultimo modello rispetto a quello di riattivazione, coerentemente con il fatto che il DNA di HCMV in ingresso utilizzato per l'infezione latente (prima della riattivazione) raggiunge il nucleo di monociti THP-1 con un rendimento inferiore rispetto a quanto avviene in macrofagi THP-1 [148]. L'efficienza di riattivazione del ceppo TB40E è stata anche confrontata con quella ottenuta infettando direttamente i fibroblasti MRC5, ossia il modello permissivo per eccellenza all'infezione da HCMV *in vitro* (Figura 20 D, E: profilo di immunofluorescenza di IE e titolazione delle cellule positive per IE, rispettivamente; Figura 20 F: titolazione della progenie virale espressa in TCID50). Come previsto, in quest'ultimo modello è stata osservata la massima efficienza di infezione.

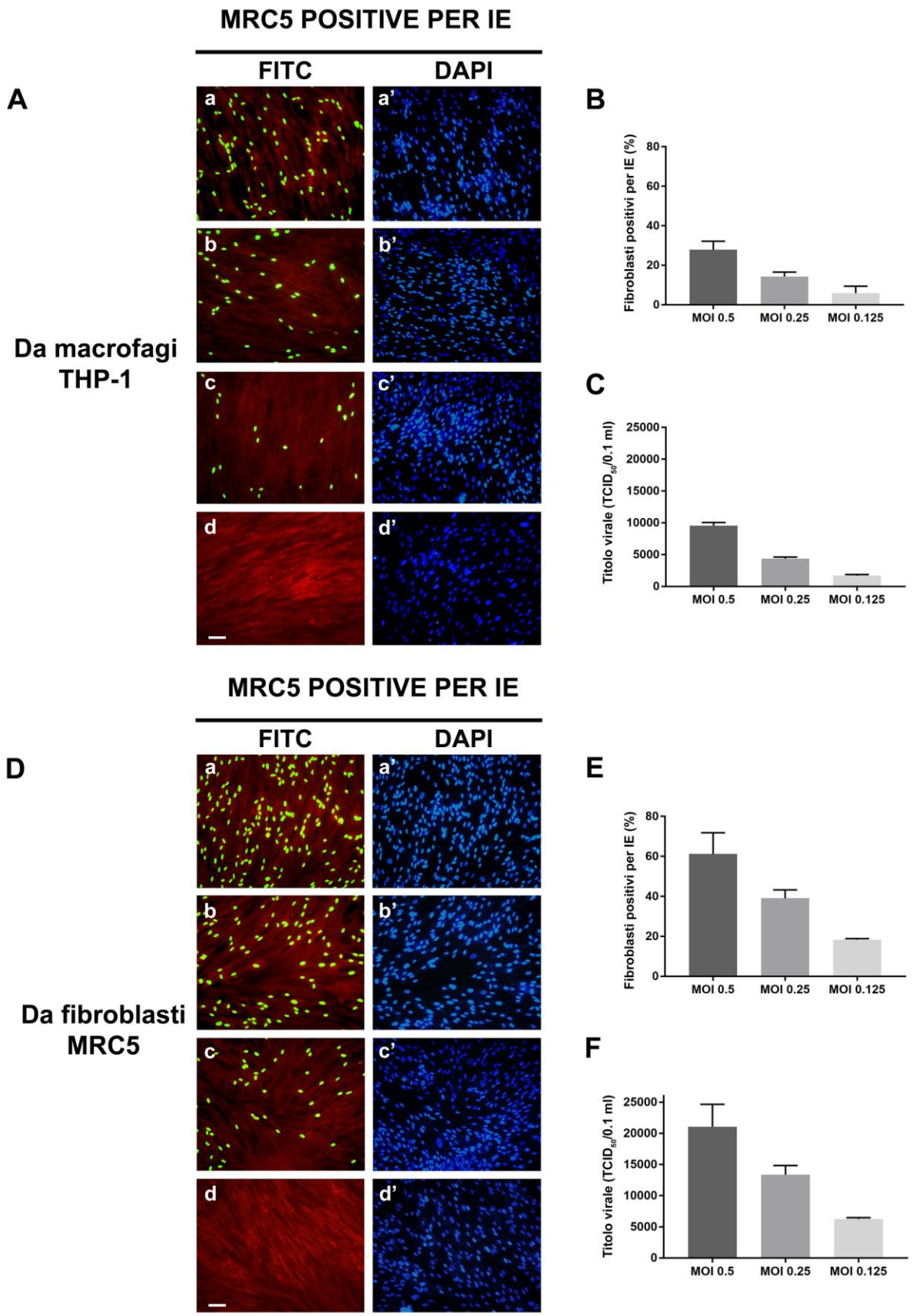


Figura 20. Analisi della progenie virale ottenuta da macrofagi THP-1 utilizzati come modello di infezione litica e da fibroblasti MRC5 infettati con HCMV TB40E a differenti MOI per 7 giorni ed

espressione percentuale della resa virale. Pannello A: monostrati confluenti di fibroblasti MRC5 infettati con il sopranatante di macrofagi THP-1 (modello litico) e con il sopranatante del modello permissivo MRC5 (Pannello D) precedentemente infettati alle 3 MOI considerate: 0,5 (pannelli a e a'), 0,25 (pannelli b e b'), 0,125 (pannelli c e c'). Dopo 24 h di infezione, la presenza di virus infettante è stata dimostrata mediante reazione di immunofluorescenza utilizzando un anticorpo monoclonale specifico per l'epitopo comune alle due proteine precocissime maggiori IE1 e IE2. Le cellule sono state marcate con il colorante di contrasto blu di Evans (cellule in rosso: pannelli a, b, c e d) ed i nuclei evidenziati con l'intercalante del DNA DAPI (pannelli a', b', c' e d'). I pannelli d e d' rappresentano cellule non infettate. I fibroblasti infettati e positivi per la proteina IE, rappresentativi della progenie virale emergente dal modello THP-1 litico (pannello B) e dai fibroblasti MRC5 (pannello E), sono espressi in valori percentuali medi derivanti da due esperimenti indipendenti (per ogni esperimento, sono stati scelti a caso dieci campi e contati i nuclei positivi). L'infettività virale è stata valutata utilizzando il saggio $TCID_{50}$ a partire dal sopranatante di macrofagi THP-1 (modello litico) (pannello C) e del sopranatante di fibroblasti MRC5 (modello permissivo) (pannello E) a tutte le MOI considerate.

4 - MECCANISMI DI REGOLAZIONE DEL METABOLISMO CELLULARE INDOTTI DA HCMV: STUDIO *IN VITRO* DEL POSSIBILE INTERVENTO DI SPECIFICI MICRO-RNA CELLULARI NELL'ALTERAZIONE DEL CICLO CELLULARE

Come precedentemente accennato, i micro-RNA cellulari miR-26a e miR-26b, che sono espressi in concomitanza con le proteine CTDSP1/2/L durante il ciclo cellulare sarebbero coinvolti nella regolazione della proliferazione cellulare; in particolare, la loro espressione, come quella dei trascritti delle proteine CTDSP1/2/L, aumenta in cellule quiescenti, ossia non più coinvolte nel ciclo cellulare, quale segno di regolazione negativa che "vieta" l'ingresso in fase S. Al contrario, la loro espressione diminuisce quando le cellule proliferano.

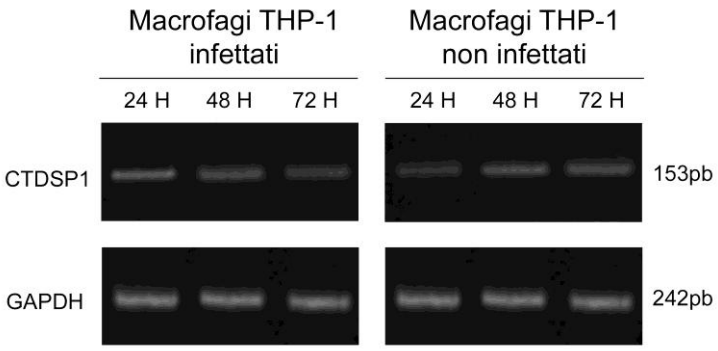
Dati precedentemente pubblicati da questo gruppo di ricerca su macrofagi THP-1 (utilizzati come modello di infezione litica) hanno dimostrato che HCMV è in grado di spingere queste cellule, allo stadio terminale di differenziamento, a rientrare nel ciclo litico con un'attiva fase S.

Considerando che è verosimile che l'azione esercitata da HCMV sul ciclo cellulare possa avvalersi anche dell'intervento dei miR-26a e miR-26b in sinergia con le proteine CTDSP, è stato iniziato uno studio volto a verificare tale ipotesi.

In particolare, gli esperimenti pianificati sono stati focalizzati sullo studio dell'espressione dei trascritti dei geni CTDSP1/2/L in monociti THP-1 differenziati a macrofagi ed in seguito infettati con HCMV (modello di infezione litica) a diversi tempi di infezione (24, 48 e 72 h), a confronto con le stesse cellule non infettate (Figura 21).

I risultati relativi al profilo elettroforetico dei trascritti sopra menzionati hanno mostrato che la loro espressione diminuiva in maniera proporzionale alle ore di infezione (Figura 21A pannello: "Macrofagi THP-1 infettati"). Al contrario, l'espressione dei trascritti dei suddetti geni in macrofagi THP-1 non infettati aumentava in linea con i tempi presi in considerazione (Figura 21A: "Macrofagi THP-1 non infettati"). In maniera esemplificativa viene mostrato solo il risultato del trascritto CTDSP1.

A



B

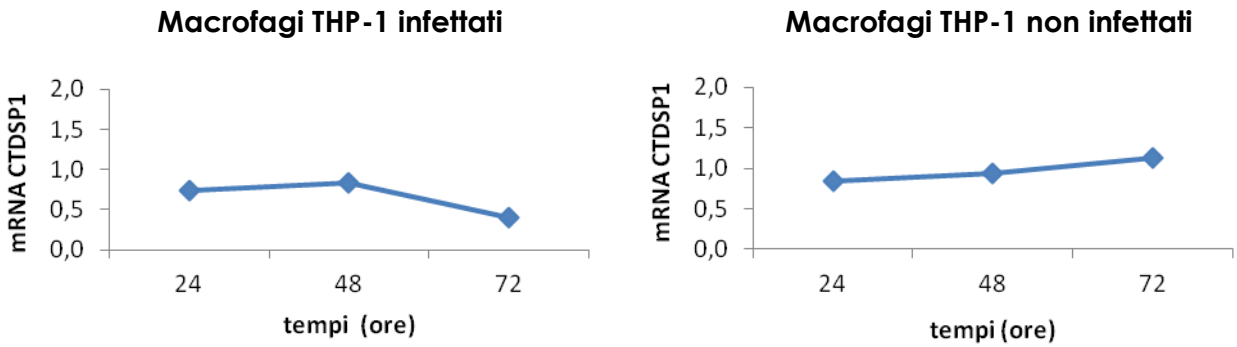


Figura 21. Analisi del trascritto cellulare del gene CTDSP1 in macrofagi THP-1 infettati da HCMV e non infettati. Pannello A. Il prodotto di amplificazione è stato analizzato dopo 24, 48 e 72 h di infezione. Il prodotto di amplificazione del trascritto dell'enzima costitutivo GAPDH è stato ottenuto in parallelo quale controllo di reazione e di quantità di materiale analizzato per ogni punto sperimentale. I pesi molecolari dei trascritti CTDSP1 e GAPDH sono mostrati sul lato destro del Pannello A. Pannello B. Analisi densitometrica del trascritto del gene cellulare CTDSP1 effettuata su macrofagi THP-1 infettati e non infettati a 24, 48 e 72.

I suddetti risultati sono stati valutati anche mediante analisi densitometrica delle bande relative al trascritto in esame, rapportando i valori trovati per CTDSP1/2/L a quelli dei corrispondenti GAPDH, allo scopo di normalizzare i valori ottenuti. In Figura 21B viene mostrata in maniera esemplificativa solo l'analisi densitometrica del trascritto CTDSP1 da macrofagi THP-1 infettati e non infettati a 24, 48 e 72 h.

Dal grafico è possibile osservare che in macrofagi THP-1 infettati (Figura 21B, pannello "Macrofagi THP-1 infettati), l'espressione relativa all'mRNA CTDSP1 rimaneva più o meno

invariata dalle 24 h alle 48 h dopo l'infezione mentre tra le 48 h e le 72 h il segnale diminuiva nettamente.

Per quel che riguarda i macrofagi THP-1 non infettati (Figura 21B, pannello "Macrofagi THP-1 non infettati) l'espressione relativa all'mRNA CTDSP1 aumentava gradualmente nel corso dei tempi considerati.

Questi risultati sembrano in linea con quanto atteso: HCMV spinge queste cellule quiescenti in fase S e, parallelamente, si assiste ad una diminuzione del trascritto delle tre proteine coespresse con i micro-RNA cellulari miR-26a e miR-26b quale evidenza di "via libera" alla replicazione del DNA , contrariamente a quanto osservato nelle stesse cellule non infettate, in cui permane la regolazione negativa sulla sintesi del DNA, attuata attraverso l'intervento dei sopracitati micro-RNA.

6. COMMENTI CONCLUSIVI

1 – STUDIO *EX VIVO*: SPECIFICHE ASSOCIAZIONI GENOTIPICHE DI GLICOPROTEINE PERICAPSIDICHE DI HCMV QUALI MARCATORI DI INFEZIONE CONGENITA

L'applicazione di tecniche molecolari quali l'RFLP insieme a sequenziamento genico e relativa analisi filogenetica, hanno permesso di ottenere risultati significativi e differenziati per le infezioni congenite e post-natali considerate. Infatti, solo nelle infezioni congenite è stata rilevata una significativa presenza del genotipo gN4c e del genotipo gO3, spesso in combinazione. Questi dati sono in linea con quanto riportato da altri Autori, che indicano i genotipi gN4 e gO3 come i più rappresentati nelle infezioni congenite da HCMV [13,120]. Inoltre, in questo studio vengono apportate ulteriori informazioni relativamente alla presenza della variante genica gN4c nelle infezioni congenite ed alla sua frequente associazione con gO3.

Inoltre, è da notare che tra tutti i neonati con infezione congenita che mostravano segni clinici alla nascita (7/19), tutti erano infettati con HCMV di genotipo gN4c e quasi tutti (6/7) mostravano la combinazione gN4c-gO3. D'altra parte, nell'ambito dei bambini con infezione post-natale, la maggior parte non mostrava segni clinici alla nascita ed una piccola minoranza mostrava segni non compatibili con l'infezione da HCMV.

Va inoltre sottolineato che, anche se nel campione di popolazione pediatrica considerato non vi erano casi di infezione congenita con sintomatologia neuro-sensoriale, la possibilità di avere marcatori virali di infezione congenita appare in ogni caso rilevante, anche in considerazione del fatto che una percentuale non trascurabile (13,4%) di bambini apparentemente sani alla nascita sviluppa in seguito sequele neurologiche tardive [14,164].

In conclusione, l'identificazione di marcatori di infezione congenita da HCMV è di potenziale rilevanza al fine di identificare precocemente e seguire nel tempo i bambini con maggiore rischio di sviluppare patologie multi-organo e/o andare incontro a sequele neurologiche. Inoltre, i prodotti di tali varianti geniche potrebbero costituire candidati ideali per l'allestimento di vaccini terapeutici.

2 - STUDIO EPIDEMIOLOGICO RETROSPETTIVO SULLA PREVALENZA DI INFEZIONE DA HCMV IN SOGGETTI TRAPIANTATI DI RENE

L'analisi epidemiologica retrospettiva sulla prevalenza e sull'incidenza d'infezione da HCMV nella coorte di soggetti trapiantati di rene nel periodo 2011-2015, ha messo in luce come in questa categoria di soggetti l'infezione/malattia da HCMV, prevalentemente come risultato della riattivazione virale, rappresenti ancora oggi un evento particolarmente temibile e purtroppo frequente.

Monitorare questi soggetti nel tempo ed effettuare studi molecolari volti alla caratterizzazione dei genotipi dei ceppi virali coinvolti, messi in relazione con i quadri clinici riscontrati, risulterà di particolare interesse al fine di stabilire un osservatorio epidemiologico-molecolare ed individuare precocemente i soggetti infettati da ceppi di HCMV caratterizzati da maggiore virulenza.

3 - MESSA A PUNTO DI UN MODELLO DI INFEZIONE *IN VITRO* PER LO STUDIO DELLA LATENZA E RIATTIVAZIONE DI HCMV

In questo studio è stato messo a punto un modello di riattivazione dell'infezione latente da HCMV *in vitro,* utilizzando una linea monocitaria/macrofagica umana (THP-1) che sembra ricalcare gli eventi che avvengono *in vivo* a seguito di differenziamento dei monociti del

sangue periferico, sedi naturali di latenza di HCMV, a macrofagi, veicoli di disseminazione tissutale dell'infezione.

La caratterizzazione della linea THP-1 effettuata in questo studio è di particolare interesse in quanto offre la possibilità di eseguire, in maniera estremamente più agevole rispetto all'utilizzo del sistema naturale, lo studio dei meccanismi che regolano il passaggio dalla latenza alla riattivazione di HCMV.

4 - MECCANISMI DI REGOLAZIONE DEL METABOLISMO CELLULARE INDOTTI DA HCMV: STUDIO *IN VITRO* DEL POSSIBILE INTERVENTO DI SPECIFICI MICRO-RNA CELLULARI NELL'ALTERAZIONE DEL CICLO CELLULARE

I risultati ottenuti verificando l'espressione dei trascritti CTDSP1/2/L sono molto incoraggianti in quanto supportano il coinvolgimento dei micro-RNA 26a e 26b nella regolazione del ciclo cellulare virus-indotta, individuando in tale classe di molecole di recente scoperta, quali effettori di processi di regolazione negativa, alcuni dei possibili fattori cellulari potenzialmente coinvolti anche nel processo di riattivazione del virus dalla latenza.

L'approfondimento delle conoscenze su fattori cellulari cruciali per le strategie virali può rappresentare la chiave interpretativa dell'esito dell'infezione e la base per l'adozione di misure volte ad arginare la disseminazione e/o la persistenza di HCMV *in vivo*.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Mocarski ES and Courcelle CT. Cytomegalovirus and their replication. In: Fields Virology, Knipe D and Howley P Editors. Lippincott-Raven, Philadelphia. 2001;2629–673.

2. Kumar A, Herbein G. Epigenetic regulation of human cytomegalovirus latency: an update. Epigenomics. 2014;6:533-46.

3. Sissons JG, Bain M, Wills MR. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. J Infect. 2002;44:73-77.

4. Malm G, Engman ML. Congenital cytomegalovirus infections. Semin Fetal Neonatal Med. 2007;12:154-9.

5. Huang MM, Kew VG, Jestice K, Wills MR, Reeves MB. Efficient human cytomegalovirus reactivation is maturation dependent in the Langerhans dendritic cell lineage and can be studied using a CD14+ experimental latency model. J Virol. 2012;86:8507-15.

6. Pawelec G. Immunosenenescence: role of cytomegalovirus. Exp Gerontol. 2014;54:1-5.

7. Sinclair J, Reeves M. The intimate relationship between human cytomegalovirus and the dendritic cell lineage. Front Microbiol. 2014;5:389.

8. Van de Berg P, Heutinck K, Raabe R. et al. Human cytomegalovirus induces systemic immune activation characterized by a type 1 cytokine signature. J Infect Dis. 2010;202:690-9.

9. Meijers R, Litjens N, Hesselink D, Langerak A, Baan C, Betjes M. Primary Cytomegalovirus Infection Significantly Impacts Circulating T Cells in Kidney Transplant Recipients. Am J Transpl. 2015.

10. Ho M. Epidemiology of cytomegalovirus infections. Infect Dis. 1990;12:S701.

11. Schoenfisch AL, Dollard SC, Amin M, Gardner LI, Klein RS, Mayer K. et al. Cytomegalovirus (CMV) shedding is highly correlated with markers of immunosuppression in CMV-seropositive women. J Med Microbiol. 2011;60:768-74.

12. Erlandson KM, Allshouse AA, Rapaport E, Palmer BE, Wilson CC, Weinberg A. et al. Physical function impairment of older, HIV-infected adults is associated with cytomegalovirus immunoglobulin response. AIDS Res Hum Retroviruses. 2015;31:905-12.

13. Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Chou S, Gojobori T, Hanada K. et al. Human cytomegalovirus glycoprotein N (gpUL73-gN) genomic variants: identification of a novel subgroup, geographical distribution and evidence of positive selective pressure. J Gen Virol. 2003;84:647-55.

14. Dollard SC, Grosse SD, Ross DS. New estimates of the prevalence of neurological and sensory sequelae and mortality associated with congenital cytomegalovirus infection. Rev Med Virol. 2007;17:355-63.

15. Yan H, Koyano S, Inami Y, Yamamoto Y, Suzutani T, Mizuguchi M. et al. Genetic linkage among human cytomegalovirus glycoprotein N (gN) and gO genes, with evidence for recombination from congenitally and post-natally infected Japanese infants. J Gen Virol. 2008;89:2275-9.

16. Nijman J, Mandemaker FS, Verboon-Maciolek MA, Aitken SC, van Loon AM. et al. Genotype distribution, viral load and clinical characteristics of infants with postnatal or congenital cytomegalovirus infection. PLoS One. 2014;9:e108018.

17. Arcangeletti MC, Vasile Simone R, Rodighiero I, De Conto F, Medici MC, Martorana D. et al. Combined genetic variants of human cytomegalovirus envelope glycoproteins as congenital infection markers. Virol J. 2015;12:202.

18. Grundy J, Lui S, Super M, Al. E. Symptomatic cytomegalovirus infection in seropositive kidney recipients: reinfection with donor virus rather than reactivation of recipient virus. Lancet. 1998;2:132–5.

19. Atabani S, Smith C, Atkinson C, Cottart CH. Cytomegalovirus replication kinetics in solid organ transplant recipients managed by preemptive therapy. Am J Transpl. 2012;12:2457–64.

20. Pass RF. Cytomegalovirus. In: Fields Virology, 4th ed. Knipe D and Howley P (eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2001;2575–705.

21. Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S. et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. Cancer Res, 2002 ;62:3347-50.

22. Santos C, Brennan D, Fraser V, Olsen M. Delayed-onset cytomegalovirus disease coded during hospital readmission after kidney transplantation. Transplantation. 2014;98(2):187-94.

23. Hernández D, Bernal-Blanco G, Cofan F, Jimeno L, Franco-Esteve A, González E, et al. Cytomegalovirus prevention strategies in seropositive kidney transplant recipients: an insight into current clinical practice. Transpl Int. 2015;28:1042-54.

24. Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, Tamassia N. et al. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. Plos. 2006;3:94-108.

25. Varani S and Landini MPCytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. Herpesviridae. 2011;2:6-20

26. Söderberg-Nauclér C. Autoimmunity induced by human cytomegalovirus in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Res Ther. 2012;14:101-2.

27. Halenius A, Hengel H. Human cytomegalovirus and autoimmune disease. Biomed Res Int. 2014;472978:1-15.

28. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni FF, Akabar A, Arens. R, Chiu YL. New advances in CMV and immunosenescence. Experimental gerontology. 2014;55:54-62.

29. Dolcino M, Puccetti A, Barbieri A. et al. Infection and autoimmunity: role of human cytomegalovirus in autoimmune andothelial cell damage. Lupus. 2015;24(4-5):419-32.

30. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. J Gen Virol. 1995; 76:741-50.

31. Arrode G and Devrinche C. Dendritic cells and HCMV cross-presentation. Curr Top Microbiol Immunol. 2003; 276:277-294.

32. Lunardi C, Bason C, Corrocher R, Puccetti A. Induction of endothelial cell damage by HCMV molecular mimicry. Trends Immunol. 2005;26:19-24.

33. Shane Smith M, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD. Human cytomegalovirus induces monocyte for dissemination and persistence differentiation and migration as a strategy. J Virol. 2004;78: 4444-53.

34. Ioudinkova E, Arcangeletti MC, Rynditch A, De Conto F, Motta F, Covan S. et al. Control of human cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line. Gene. 2006; 384:120-8.

35. Griffiths PD, Walter S. Cytomegalovirus. Curr Opin Infect Dis. 2005;18:241-5.

36. Boppana SB, Ross SA, Fowler KB. Congenital cytomegalovirus infection: clinical outcome. Clin Infect Dis. 2013;57 Suppl 4:178-81.

37. Arav-Boger R, Battaglia C, Lazzarotto T. et al. Cytomegalovirus (CMV)-encoded UL144 (truncated tumor necrosis factor receptor) and outcome of congenital CMV infection. J Infect Dis. 2006;194:464-73.

38. Pignatelli S, Lazzarotto T, Gatto MR, Dal Monte P, Landini MP, Faldella G. et al. Cytomegalovirus gN genotypes distribution among congenitally infected newborns and their relationship with symptoms at birth and sequelae. Clin Infect Dis. 2010; 51:33-41

39. Pepperl S, Münster J, Mach M, Harris JR, Plachter B. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. J Virol. 2000; 74:6132-46.

40. Schierling K, Buser C, Mertens T, Winkler M. Human cytomegalovirus tegument protein ppUL35 is important for viral replication and particle formation. J Virol. 2005; 79:3084-96.

41. Smith JD. Human cytomegalovirus: demonstration of permissive epithelial cells and non permissive fibroblastic cells in a survey of human cell lines. J Virol. 1986;60(2):583-8.

42. McVoy MA, Nixon DE, Adler SP, Mocarski ES. Sequences within the herpesvirus conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. J Virol. 1998; 72:48-56.

43. Prichard MN, Jairath S, Penfold ME, Jeor S, Bohlman MC, Pari GS. Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus. J Virol. 1998; 72:6997-7004.

44. Xu Y, Cei SA, Rodriguez Huete A, Colletti KS, Pari GS. Human cytomegalovirus DNA replication requires transcriptional activation via an IE2- and UL84-responsive bidirectional promoter element within oriLyt. J Virol. 2004; 78:11664-77.

45. Bresnahan WA and Shenk T. A subset of viral transcripts packaged within viral particles. Science. 2000;288:2373-6.

46. Terhune SS, Schröer J, Shenk T. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. J Virol. 2004;278:10390-8.

47. Boyle KA and Compton T. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. J Virol. 1998;72:1826-33.

48. Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. Virology. 1993;193:834-41.

49. Gicklhorn D, Eickmann M, Meyer G, Ohlin M, Radsak K. Differential effects of glycoprotein B epitope-specific antibodies on human cytomegalovirus-induced cell-cell fusion. J Gen Virol. 2003;84(Pt 7):1859-62.

50. Keay S and Baldwin B. Anti-idiotype antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. J Virol. 1991;65:5124-28.

51. Theiler RN and Compton T. Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O. J Biol Chem 2001;276:39226-31.

52. Pignatelli S. Recent knowledge on the linkage of strain specific genotypes with clinical manifestations of human citomegalovirus disease. Recenti progressi in Medicina. 2011;102(1):5-10.

53. Kinzler ER and Compton T. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. J Virol. 2005;79:7827-37.

54. Boehme KW, Guerrero M, Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. J Immunol. 2006;177:7094-102.

55. Arcangeletti MC, Germini D, Rodighiero I, Mirandola P, De Conto F, Medici MC, Gatti R, Chezzi C, Calderaro A. Toll-like receptor 4 is involved in the cell cyclemodulation and required for effective human cytomegalovirus infection in THP-1 macrophages. Virology. 2013;440:19-30.

56. Fortunato EA and Spector DH. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. Adv Virus Res. 1999;54:61-128.

57. Muranyi W, Haas J, Wagner M, Krohne G, Koszinowski UH. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. Science. 2002;297:854-7.

58. Sanchez V and Spector DH. CMV makes a timely exit. Science. 2002;297:778-9.

59. McVoy MA and Adler SP. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. J Virol. 1994;68:1040-51.

60. Petrik DT, Schmitt KP, Stinski MF. Inhibition of cellular DNA synthesis by the human cytomegalovirus IE86 protein is necessary for efficient virus replication. J Virol. 2006; 80:3872-3883.

61. Cosme RS, Yamamura Y, Tang Q. Roles of polypyrimidine tract binding proteins in major immediate-early gene expression and viral replication of human cytomegalovirus. J Virol. 2009 ;83:2839-50.

62. Sun B, Harrowe G, Reinhard C, Yoshihara C, Chu K, Zhuo S. Modulation of human cytomegalovirus immediate-early gene enhancer by mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1. J Cell Biochem. 2001;83:563-73.

63. Isomura H, Stinski MF, Kudoh A, Nakayama S, Murata T, Sato Y, Iwahori S. et al. 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. 2008;82:849-58.

64. Stern JL, Cao JZ, Xu J, Mocarski ES, Slobedman B. Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression by the cellular transcription factor CCAAT displacement protein. Virol. 2008;378:214-25.

65. Du G, Dutta N, Lashmit P, Stinski MF. Alternative splicing of the human cytomegalovirus major immediate-early genes affects infectious-virus replication and control of cellular cyclin-dependent kinase. J Virol. 2011;85:804-17.

66. White EA and Spector DH. Exon 3 of the human cytomegalovirus major immediate-early region is required for efficient viral gene expression and for cellular cyclin modulation. J Virol. 2005;79:7438-52.

67. Spector DH. Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. Intervirology. 1996;39:361-77.

68. Stenberg RM. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. Intervirology. 1996;39:343-9.

69. Stinski MF and Petrik DT. Functional roles of the human cytomegalovirus essential IE86 protein. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:133-52.

70. Iwamoto GK, Monick MM, Clark BD, Auron PE, Stinski MF, Hunninghake GW. Modulation of interleukin I beta gene expression by the immediate early genes of human cytomegalovirus. J Clin Invest. 1990;85:1853-7.

71. Burns LJ, Waring JF, Reuter JJ, Stinski MF , Ginder GD. Only the HLA class I gene minimal promoter elements are required for transactivation by human cytomegalovirus immediate early genes. Blood. 1993;81:1558-66.

72. Kline JN, Geist LJ, Monick MM, Stinski MF, Hunninghake GW. Regulation of expression of the IL-1 receptor antagonist (IL-1 ra) gene by products of the human cytomegalovirus immediate early genes. J Immunol. 1994;152:2351-7.

73. Zhu H, Cong JP, Mamtora G, Gingeras T, Shenk T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. PNAS. 1998;95:14470-5.

74. Browne EP, Wing B, Coleman D, Shenk T. Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. J Virol. 2001;75:12319-30.

75. Browne EP and Shenk T. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2003;100:11439-44.

76. Taylor RT and Bresnahan WA. Human cytomegalovirus immediate-early 2 gene expression blocks virus-induced beta interferon production. J Virol. 200;.79:3873-77.

77. Abate DA, Watanabe S, Mocarski ES. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the i nterferon reponse. J Virol. 2004;78:10995-11006.

78. Gravel SP and Servant MJ. Roles of an IkB kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogeninduced proatheroscleortic conditions. J Biol Chem. 2005;280:7477-86.

79. Hirsch AJ and Shenk T. Human cytomegalovirus inhibits transcription of the CC chemokine MCP-1 gene. J Virol. 1999;73:404-10.

80. Craigen JL, Yong KL, Jordan NJ, MacCormac LP, Westwick J, Akbar AN, Grundy JE. Human cytomegalovirus infection up-regulates interleukin-8 gene expression and stimulates neutrophil transendothelial migration. Immunology. 1997; 92:138-145.

81. Randolph-Habecker J, Iwata M, Geballe AP, Jarrahian S, Torok-Storb B. Interleukin 1-mediated inhibition of cytomegalovirus replication is due to increased IFN-beta production. J Interferon Cytokine Res. 2002;22:765-72.

82. Jault FM, Jault JM, Ruchti F, Fortunato EA, Clark C, Corbeil J. et al. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. J Virol. 1995;69:6697-04.

83. Bresnahan WA, Boldogh I, Thompson EA, Albrecht T. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. Virology. 1996;224:150–160.

84. Lu M and Shenk T. Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. J Virol. 1996;70:8850-7.

85. Dittmer D and Mocarski ES. Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition, J Virol. 1997;71:1629–34.

86. Salvant BS, Fortunato EA, Spector DH. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. J Virol. 1998;72:3729-41.

87. Sanchez V and Spector DH. Subversion of cell cycle regulatory pathways. Curr Top Microbiol Immunol. 2008;325:243-62.

88. Fortunato EA, McElroy AK, Sanchez I, Spector DH. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. Trends Microbiol. 2000;8:111–9.

89. Kalejta RF and Shenk T. Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus. Front Biosci. 2002;7:295-306.

90. Mocarski ES, Kemble GW, Lyle JM, Greaves RF. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. PNAS. 1996;93:11321-6.

91. Meier JL and Pruessner JA. The human cytomegalovirus major immediate-early distal enhancer region is required for efficient viral replication and immediate-early gene expression. J Virol. 2000;74:1602-13.

92. Zhu H, Shen Y, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. J Virol. 1995;69:7960-70.

93. Muller S and Dejean A. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. J Virol. 1999;73:5137-43.

94. McElroy AK, Dwarakanath RS, Spector DH. 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. 2000;74:4192-206.

95. Jones TR, Wiertz EJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex complex class I heavy chains. PNAS. 1996;93:11327-33.

96. Liu W, Zhao Y, Biegalke B. Analysis of human cytomegalovirus US3 gene products. Virology. 2002;301:32-42.

97. Misaghi S, Sun ZY, Stern P, Gaudet R, Wagner G, Ploegh H. Structural and functional analysis of human cytomegalovirus US3 protein. J Virol. 2004;78:413-23.

98. Liu Z, Winkler M, Biegalke B. Human cytomegalovirus: host immune modulation by the viral US3 gene. Int J Biochem Cell Biol. 2009;41:503-6.

99. Chevalier MS, Daniels GM, Johnson DC. Binding of human cytomegalovirus US2 to major histocompatibility complex class I and II proteins is not sufficient for their degradation. J Virol. 2002 ;76:8265-75.

100. Chevalier MS and Johnson DC. Human cytomegalovirus US3 chimeras containing US2 cytosolic residues acquire major histocompatibility class I and II protein degradation properties. J Virol. 2003;77:4731-8.

101. Michelson S. Consequences of human cytomegalovirus mimicry. Hum Immunol. 2004;65:465-75.

102. Welch AR, Woods AS, McNally LM, Cotter RJ, Gibson W. A herpesvirus maturational proteinase, assemblin: identification of its gene, putative active site domain, and cleavage site. PNAS. 1991;88:10792-6.

103. Robson L and Gibson W. Primate cytomegalovirus assembly protein: genome location and nucleotide sequence. J Virol. 1989;63:669-76.

104. Gibson W. Structure and assembly of the virion. Intervirology. 1996;39:389-400.

105. Romanowski MJ, Garrido-Guerrero E, Shenk T. pIRS1 and pTRS1 are present in human cytomegalovirus virions. J Virol. 1997;71:5703-5.

106. Giesen K, Radsak K, Bogner E. 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. 2000;81:2231-44.

107. Nguyen NL, Loveland AN, Gibson W. 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. 2008;82:5381-9.

108. 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. Human cytomegalovirus proteins pp65 and IEp72 are targeted to distinct compartments in nuclei and nuclear matrices of infected human embryo fibroblasts. J Cell Biochem. 2003;90:1056-67.

109. Arcangeletti M, Rodighiero I, De Conto F. et al. Modulatory effect of rRNA syntesis and ppUL83 nucleolar compartmentalization on human cytomegalovirus gene expression in vitro. J Cell Biochem. 2009;108(2):415-23.

110. Arcangeletti M, Rodighiero I, Mirandola P. et al. 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. 2011;112(1):307-17

111. Nicholson IP, Sutherland JS, Chaudry TN, Blewett EL, Barry PA, Nicholl MJ, Preston CM. Properties of virion transactivator proteins encoded by primate cytomegaloviruses. Virol J. 2009;27:65.

112. Dal Monte P, Pignatelli S, Mach M, Landini MP. The product of human cytomegalovirus UL73 is a new polymorphic structural glycoprotein (gpUL73). J Hum Virol. 2001;4:26-34.

113. Mach M, Kropff B, Kryzaniak M, Britt W. Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects. J Virol. 2005. 79:2160-70.

114. Lehner R, Meyer H, Mach M. Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses. J Virol. 1989;63:3792-800.

115. Chou SW, Dennison KM. Analysis of interstrain variation in cytomegalovirus glycoprotein B sequences encoding neutralization-related epitopes. J Infect Dis. 1991;163:1229-34.

116. Navarro D, Paz P, Tugizov S, Topp K, La Vail J, Pereira L. Glycoprotein B of human cytomegalovirus promotes virion penetration into cells, transmission of infection from cell to cell, and fusion of infected cells. *Virol*. 1993;197:143-58.

117. Coaquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. Clin Infect Dis. 2004;39:155-61.

118. Paterson D, Dyer A, Milne R, Sevilla-Reyes E, Gompels U. A role for human cytomegalovirus glycoprotein O (gO) in cell fusion and a new hypervariable locus. Virology. 2002;293:281-94.

119. Pignatelli S, Dal Monte P, Landini M. gpUL73(gN) genomic variants of human cytomegalovirus (HCMV) isolates are clustered into four distinct genotypes. J Gen Virol. 2001;82:2777-84.

120. Rasmussen L, Geissler A, Cowan C, Chase A, and Winters M. The genes encoding the gCIII complex of human cytomegalovirus exist in highly diverse combinations in clinical isolates. Journal of virology.2002;76(21):10841-8.

121. Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) wild-type strains. Rev Med Virol. 2004;14:383-410.

122. Carraro E, Granato C. Single human cytomegalovirus gB genotype shed in multiple sites at the time of diagnosis in renal transplant recipients. J Med Virol. 2003;70(2):240-3.

123. Puchhammer-Stöckl E, Görzer I, Zoufaly A. et al. Emergence of multiple cytomegalovirus strains in blood and lung of lung transplant recipients. Transplantation. 2006;81(2):187-94.

124. Nogueira E, Ozaki K, Tomiyama H, Câmara N, Granato C. Clinical correlations of human cytomegalovirus strains and viral load in kidney transplant recipients. Int Immunopharmacol. 2009;9(1):26-31.

125. Lisboa L, Kumar D, Wilson L, Humar A. Clinical utility of cytomegalovirus cell-mediated immunity in transplant recipients with cytomegalovirus viremia. Transplantation. 2012;93(2):195-200.

126. Mattick C, Dewin D, Polley S, Sevilla-Reyes E, Pignatelli S, Rawlinson W. et al. Linkage of human cytomegalovirus glycoprotein gO variant groups identified from worldwide clinical isolates with gN genotypes, implications for disease associations and evidence for N-terminal sites of positive selection. Virology. 2004;318:582-97.

127. Bates M, Monze M, Bima H, Kapambwe M, Kasolo FC, Gompels UA. CIGNIS study group High human cytomegalovirus loads and diverse linked variable genotypes in both HIV-1 infected and exposed, but uninfected, children in Africa. Virology. 2008;382:28-36.

128. Hengel H, Brune W, Koszinowski UH. Immune evasion by cytomegalovirus- survival strategies of a highly adapted opportunist. Trends Microbiol. 1998;6:190-7.

129. Schrier RD, Nelson JA, Oldstone MB. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. Science. 1985;230:1048–51.

130. Gnann JW, Ahlmen J, Svalander C, Olding L, Oldstone MB, Nelson JA. Inflammatory cells in transplanted kidneys are infected by human cytomegalovirus. Am J Pathol. 1988;132:239–48.

131. Hendrix RMG, Wagenaar M, Slobbe RL, Bruggeman CA. Widespread presence of cytomegalovirus DNA in tissues of healthy trauma victims. J Clin Pathol. 1997; 50:59–63.

132. Taylor-Wiedeman J, Sissons JGP, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. J Gen Virol. 1991;72:2059–64.

133. Stanier P, Kitchen AD, Taylor DL, Tyms AS. Detection of human cytomegalovirus in peripheral mononuclear cells and urine samples using PCR. Mol Cell Probes. 1992;6: 51–8.

134. Mocarski ES, Shenk T, Pass RF. Cytomegalovirus. In: Fields Virology, 5th ed. Knipe D and Howley P (eds), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. 2007;2701-72.

135. Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. PNAS. 2002;99:16255–60.

136. Bolovan-Fritts CA, Mocarski ES, Wiedeman JA. Peripheral blood $CD14^+$ cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. Blood. 1999;93:394–8.

137. Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. PNAS. 1994;91:11879-83.

138. Beisser PS, Laurent L, Virelizier JL, Michelson S. Human cytomegalovirus chemokine receptor gene US28 is transcribed in latently infected THP-1 monocytes. J Virol. 2001;75:5949-57.

139. Slobedman B, Mocarski ES. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. J Virol. 1999;73:4806-12.

140. Roback JD, Hillyer CD, Drew WL, Laycock ME, Luka J, Mocarski ES, Slobedman B, Smith JW, Soderberg-Naucler C, Todd DS, Woxenius S, Busch MP. Multicenter evaluation of PCR methods for detecting CMV DNA in blood donors. Transfusion. 2001;41:1249-57.

141. Roback JD, Drew WL, Laycock ME, Todd D, Hillyer CD, Busch MP. CMV DNA is rarely detected in healthy blood donors using validated PCR assays. Transfusion. 2003;43:314-21.

142. Sinclair J, Sissons P. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. J Gen Virol. 2006;87:1763-79.

143. Taylor-Wiedeman J, Sissons P, Sinclair J. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. J Virol. 1994;68:1597-604.

144. Streblow DN, Nelson JA. Models of HCMV latency and reactivation. Trends Microbiol. 2003;11:293-5.

145. Reeves MB, MacAry PA, Lehner PJ, Sissons JG, Sinclair JH. Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. Proc Natl Acad Sci USA. 2005;102:4140-5.

146. Arcangeletti MC, Vasile Simone R, Rodighiero I, De Conto F, Medici MC, Maccari C, Chezzi C, Calderaro A. Human cytomegalovirus reactivation from latency: validation of a "switch" model in vitro. Virol J. 2016;13:179.

147. Sinclair JH, Baillie J, Bryant LA, Taylor-Wiedeman JA, Sissons JG. Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression in a monocytic cell line. J Gen Virol. 1992;73:433-5.

148. Saffert RT, Kalejta RF. Human cytomegalovirus gene expression is silenced by Daxx-mediated intrinsic immune defense in model latent infections established in vitro. J Virol. 2007;81:9109-20.

149. Abraham CG, Kulesza CA. Polycomb repressive complex 2 silences human cytomegalovirus transcription in quiescent infection models. J Virol. 2013;87:13193-205.

150. Shen ZZ, Pan X, Miao LF, Ye HQ, Chavanas S, Davrinche C, McVoy M, Luo MH. Comprehensive analysis of human cytomegalovirus microRNA expression during lytic and quiescent infection. PLoS One. 2014;9:e88531.

151. Meier JL, Stinski MF. Effect of a modulator deletion on transcription of the human cytomegalovirus major immediate-early genes in infected undifferentiated and differentiated cells. J Virol. 1997;71:1246-55.

152. Sanchez V, Dong J, Battley J, Jackson K, Dykes B. Human cytomegalovirus infection of THP-1 derived macrophages reveals strain-specific regulation of actin dynamics. Virology. 2012;433:64-72.

153. Duan Y, Ye H, Zavala A. et al. Maintenance of large numbers of virus genomes in human cytomegalovirus-infected T98G glioblastoma cells. J Virol. 2014;88:3861-73.

154. Lee CH, Lee GC, Chan YJ, Chiou CJ, Ahn JH. Hayward GS. Factors affecting human cytomegalovirus gene expression in human monocyte cell lines. Mol Cells. 1999;9:37-44.

155. Keyes LR, Bego MG, Soland M, St Jeor S. Cyclophilin A is required for efficient human cytomegalovirus DNA replication and reactivation. J Gen Virol. 2012;93:722-32.

156. Wagenknecht N, Reuter N, Scherer M, Reichel A, Müller R, Stamminger T. Contribution of the Major ND10 Proteins PML, hDaxx and Sp100 to the Regulation of Human Cytomegalovirus Latency and Lytic Replication in the Monocytic Cell Line THP-1. Viruses. 2015;7:2884-907.

157. Grey F, Tirabassi R, Meyers H, Wu G, McWeeney S, Hook L, Nelson JA. A viral microRNA down-regulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs. PLoS Pathog. 2010;24:6(6).

158. Zhu Y, Lu Y, Zhang Q, Liu JJ, Li TJ, Yang JR. et al. MicroRN A-26a/b and their host genes cooperate to inhibit the G1/S transition by activating the pRb protein. Nucleic Acids Res. 2011;40:4615-25.

159. Jin H, Wang X, Li S. Human cytomegalovirus glycoprotein B genotype correlates with different symptoms of infected infants. Intervirology. 2007;50(3):219-23.

160. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol. 2013;30:2725-9.

161. Olink-Coux M, Arcangeletti C, Pinardi F, Minisini R, Huesca M, Chezzi C, Scherrer K. Cytolocation of prosome antigens on intermediate filament subnetworks of cytokeratin, vimentin and desmin type. J Cell Sci. 1994;107:353-66.

162. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72:248-54.

163. Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg H. Microbiology. 4th Ed.Lippincott Williams and Wilkins Philadelphia:1990;789.

164. Paixão P, Almeida S, Videira PA, Ligeiro D, Marques T. Screening of congenital cytomegalovirus infection by real-time PCR in urine pools. Eur J Pediatr. 2012;17:125-9.

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questi tre anni di Dottorato desidero ringraziare tutte le persone che a vario titolo mi hanno accompagnata in questo percorso.

Ringrazio la Prof.ssa Adriana Calderaro per avermi permesso di frequentare l'Unità Operativa di Microbiologia e Virologia per lo svolgimento del Dottorato di Ricerca, dandomi l'opportunità di realizzare questo lavoro di tesi.

Ringrazio in particolare la Prof.ssa Maria Cristina Arcangeletti per il suo aiuto e per i suoi preziosi insegnamenti. Grazie per avermi trasmesso la passione per la ricerca e per avermi guidata fino a questo traguardo.

Desidero ringraziare la Prof.ssa Maria Cristina Medici per la collaborazione e l'infinita disponibilità.

Ringrazio di cuore il Prof. Carlo Chezzi per la sua costante presenza e per i suoi preziosi suggerimenti.

Grazie al Prof. Luigi Roncoroni per la cortesia e l'interesse mostrati.

Ringrazio tutti i colleghi, i docenti, il personale tecnico e il personale laureato strutturato dell'Unità Operativa di Microbiologia e Virologia per avermi sostenuta con il loro affetto durante questi anni.

Un ringraziamento particolare va ad Alessandra e Clara, compagne di avventura, che con un semplice sorriso hanno reso più leggere le lunghe giornate.

Infine, ma non per ordine di importanza, ringrazio Giuseppe e tutti i miei familiari per il sostegno morale e l'infinita pazienza, dandomi così la forza di superare anche i momenti più difficili.