

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Microbiologia e Virologia  
XVIII ciclo

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Carlo Chezzi

ALCUNI POSSIBILI MECCANISMI DI REGOLAZIONE  
DELL'ESPRESSIONE GENICA DI CITOMEGALOVIRUS UMANO  
IN UN MODELLO DI INFEZIONE LATENTE *IN VITRO*

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina Arcangeletti

Dottoranda:

Dott. ssa Federica Motta

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Microbiologia e Virologia  
XVIII ciclo

ALCUNI POSSIBILI MECCANISMI DI REGOLAZIONE  
DELL'ESPRESSIONE GENICA DI CITOMEGALOVIRUS UMANO  
IN UN MODELLO DI INFEZIONE LATENTE *IN VITRO*

Coordinatore:

Chiar.mo Prof. Carlo Chezzi

Tutore:

Chiar.ma Prof.ssa Maria Cristina Arcangeletti

Dottoranda:

Dott. ssa Federica Motta

*"Se le mie gioie future in una volta  
venissero ad invadermi quest'oggi,  
non potrebbero essere così grandi  
come questa che mi possiede adesso"*

*Emily Dickinson*

***A Gaia***

## INDICE

<b>1. RIASSUNTO</b>	Pag. 2
<b>2. PRESENTAZIONE DELLO STUDIO</b>	Pag. 4
<b>3. INTRODUZIONE</b>	Pag. 6
<b>3.1 CITOMEGALOVIRUS UMANO</b>	Pag. 6
3.1.1 CARATTERISTICHE GENERALI	Pag. 6
3.1.2 IL GENOMA VIRALE	Pag. 7
3.1.3 IL CICLO LITICO DI CITOMEGALOVIRUS	Pag. 15
3.1.4 L'INFEZIONE LATENTE DI CITOMEGALOVIRUS	Pag. 17
<b>3.2 L'ORGANIZZAZIONE DELLA CROMATINA NELLA CELLULA EUCARIOTA</b>	Pag. 24
<b>3.3 MECCANISMI DI REGOLAZIONE EPIGENETICA DELL'ESPRESSIONE GENICA IN CELLULE EUCARIOTE</b>	Pag. 26
<b>4. OBIETTIVI DELLA RICERCA</b>	Pag. 34
<b>5. MATERIALI E METODI</b>	Pag. 37
<b>6. RISULTATI</b>	Pag. 50
6.1 IL MODELLO SPERIMENTALE	Pag. 50
6.2 CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO SPERIMENTALE	Pag. 51
6.3 STUDIO DELLE MODIFICAZIONI EPIGENETICHE DELL'ISTONE H3 A LIVELLO DI LISINA IN POSIZIONE 9 (K9) IN DIFFERENTI REGIONI DEL GENOMA DI HCMV IN CONDIZIONI DI INFEZIONE LITICA O LATENTE DI CELLULE THP-1	Pag. 57
6.4 ANALISI DELLA PRESENZA DI SEQUENZE METILATE NELL'AMBITO DELLA REGIONE "ENHANCER" DEI GENI PRECOCISSIMI DI HCMV MEDIANTE L'APPLICAZIONE DEL METODO DI MODIFICAZIONE DELLA BASE CITOSINA CON BISOLFITO DI SODIO.	Pag. 62
6.5 ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI TRASCRITTI DI LATENZA	Pag. 70
<b>7. DISCUSSIONE</b>	Pag. 76
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	Pag. 82

## 1. RIASSUNTO

I monociti THP-1 possono essere infettati latentemente con lo stivite Towne di citomegalovirus umano (HCMV); tali cellule diventano permissive all'infezione litica da HCMV dopo induzione del differenziamento cellulare. Questo duplice modello di infezione è stato impiegato per studiare il possibile ruolo di meccanismi di regolazione epigenetica, quali modificazioni istoniche e metilazione del DNA, nella modulazione dell'espressione genica di HCMV. Lo studio della metilazione della regione "enhancer" dei geni virali IE non ha dato risultati conclusivi; d'altra parte, mediante un protocollo di immunoprecipitazione della cromatina è stata dimostrata un'associazione prevalente dei geni virali alle forme acetilata o dimetilata in lisina (K) 9 dell'istone H3 nei modelli di infezione litica e latente, rispettivamente. Per quanto attiene all'"enhancer" virale, esso è predominantemente associato ad H3 acetilato in K9 nel modello litico, mentre in corso di infezione latente è stata osservata una condizione intermedia, ossia assenza di significativa associazione ad H3 acetilato o dimetilato. È plausibile supporre che gli stessi tipi di modificazioni istoniche siano utilizzati per marcare i geni attivi o repressi nell'ambito sia della cromatina cellulare, sia del genoma virale.

L'analisi della compartimentalizzazione dei trascritti di latenza ha permesso di evidenziare una prevalenza di RNA antisenso nei nuclei di THP-1 infettate latentemente.

## SUMMARY

THP-1 monocytes can be latently infected by human cytomegalovirus (HCMV) Towne strain and switched to a lytic cycle upon differentiation. We used this dual cellular model to gain insights into the role of epigenetic mechanisms, like histone modifications and DNA methylation in the control of HCMV gene expression. While no final results were obtained in the study of viral IE genes enhancer methylation, by using a chromatin immunoprecipitation protocol we were able to demonstrate that HCMV genes were associated preferentially with acetylated histone H3 (K9 position) in lytically infected cells and with dimethylated K9-H3 during latency. As to HCMV enhancer, the association with acetylated K9-H3 largely prevailed in lytically infected THP-1 cells; conversely, a quite intermediate situation was observed during latent infection, in that the above region was associated with

neither acetylated, nor dimethylated H3. Taken together, these data suggest that, similarly to cellular chromatin, K9 methylation of H3 is involved in HCMV gene repression, while association with acetylated histones is likely to be necessary for active transcription.

The presence and sub-cellular compartmentalization of latency transcripts was also tested in this experimental model, and the presence of an anti-sense RNA was predominantly observed in nuclei of latently infected THP-1 cells.

## 2. PRESENTAZIONE DELLO STUDIO

Le cellule mononucleate del sangue periferico sono indicate come sedi di latenza di citomegalovirus umano (HCMV). In questo studio, la linea cellulare monocitara THP-1 è stata impiegata come modello di infezione latente da HCMV (ceppo Towne). L'induzione del differenziamento mediante trattamento con un estere del forbolo (12-*O*-tetradecanoilforbolo-13-acetato) rende le cellule THP-1 permissive all'infezione da HCMV (modello di infezione litica).

I suddetti sistemi sperimentali, latente e litico, sono stati utilizzati per verificare se meccanismi epigenetici di regolazione dei geni cellulari, quali la metilazione/acetilazione degli istoni (modificazioni a livello di specifici aminoacidi localizzati nelle "code" amino-terminali degli istoni "core" del nucleosoma) e la metilazione del DNA (aggiunta di un gruppo metile alla base citosina del dinucleotide citosina-guanina), potessero essere coinvolti anche nella regolazione dell'espressione genica di HCMV.

Per quel che riguarda il primo dei meccanismi epigenetici considerati, è stato utilizzato un protocollo di immunoprecipitazione della cromatina realizzato con l'ausilio di anticorpi in grado di riconoscere l'istone H3 acetilato o dimetilato a livello di lisina in posizione 9 (K9), tenendo in considerazione che l'acetilazione di K9 favorisce una condizione trascrizionalmente attiva della cromatina, mentre la metilazione dello stesso aminoacido ne induce la repressione. I dati ottenuti dimostrano che in cellule THP-1 non differenziate ed infettate con lo stipite virale Towne (infezione latente), l'"enhancer" dei geni precocissimi (IE) di HCMV non sembra essere significativamente associato alla forma acetilata o dimetilata dell'istone H3. Per quanto riguarda l'analisi relativa ai geni di HCMV codificanti per le proteine virali DNA polimerasi (precoce), pp65 (precoce-tardiva) e pp150 (tardiva), essi sono associati prevalentemente alla forma acetilata in K9 dell'istone H3 nel modello di infezione litica (cellule THP-1 differenziate), mentre durante l'infezione latente è stata osservata un'associazione significativa alla forma dimetilata dello stesso istone. Questi dati suggeriscono che la metilazione dell'istone H3 in posizione K9 sia coinvolta nella repressione genica di HCMV; al contrario, l'associazione dei geni virali ad H3 acetilato in K9 è verosimilmente necessaria per l'attività trascrizionale. È dunque plausibile supporre che gli stessi tipi di modificazioni istoniche siano utilizzati per marcare i geni attivi o repressi sia nell'ambito della cromatina cellulare, sia nel genoma di HCMV.

Per quel che riguarda la metilazione del DNA, che, di concerto con specifiche modificazioni istoniche, rappresenta uno dei principali meccanismi di silenziamento genico cellulare, il metodo impiegato in questo studio (che sfrutta la capacità del bisolfito di sodio di modificare la base citosina non metilata trasformandola in uracile) per valutare l'eventuale livello di metilazione della regione "enhancer"/promotore dei geni IE di HCMV non ha permesso di ottenere risultati facilmente interpretabili, probabilmente a causa della concomitante e preponderante presenza di DNA cellulare competitore rispetto al DNA virale, così come di una condizione intermedia di repressione/attivazione, verosimilmente presente a livello della suddetta regione genica virale.

Lo stato intermedio di attivazione/repressione osservato per l'"enhancer" dei geni IE di HCMV attraverso lo studio delle modificazioni dell'aminoacido lisina in posizione 9 dell'istone H3 (ed anche indirettamente dedotto dallo studio sulla metilazione del DNA), potrebbe riflettere la possibilità che durante l'infezione latente di cellule THP-1, la regione che comprende i geni UL123 e UL122 (codificanti per le proteine precocissime IE1 e IE2, rispettivamente) sia trascritta in entrambe le direzioni a sostegno dell'esistenza, descritta in letteratura, dei cosiddetti trascritti di latenza.

A completamento della ricerca, è stata verificata e confermata la presenza di tali trascritti di latenza (in senso ed in antisenso) nei modelli sperimentali adottati.

Inoltre, risultati preliminari ottenuti dallo studio sulla compartimentalizzazione dei suddetti trascritti di latenza nelle frazioni nucleare e citoplasmatica di cellule THP-1 infettate liticamente o latentemente, sembrano supportare l'ipotesi di una significativa segregazione nucleare del trascritto in antisenso nel modello di infezione latente.

### 3. INTRODUZIONE

#### 3.1 CITOMEGALOVIRUS UMANO

##### 3.1.1 CARATTERI GENERALI

Citomegalovirus umano (HCMV), appartenente alla famiglia *Herpesviridae*, sottofamiglia *Betaherpesvirinae*, possiede caratteristiche biologiche distintive, quali uno spiccato tropismo per le ghiandole salivari, uno spettro d'ospite ristretto ed una lenta crescita in coltura, che lo rendono il prototipo dei betaherpesvirus.

Nel corso dell'esistenza, dal 50% al 90% degli individui nei Paesi industrializzati e la quasi totalità degli individui nei Paesi in via di sviluppo, va incontro ad infezione da HCMV. La diffusione del virus nella popolazione è favorita dal fatto che l'infezione decorre nella maggior parte dei casi in modo asintomatico o paucisintomatico ed è seguita dall'eliminazione prolungata (per mesi e addirittura anni) del virus in diversi fluidi corporei (urina, saliva, lacrime, sperma, latte, secrezioni cervicali). Ciò giustifica la capacità del portatore sano di diffondere l'infezione sia verticalmente che orizzontalmente [Mocarski and Courcelle, 2001].

Nel corso degli ultimi anni, è stato riscontrato un notevole incremento del numero e della varietà di patologie da HCMV: infatti, se da un lato è cresciuta l'attenzione e la sensibilizzazione verso le infezioni sostenute da HCMV in particolari situazioni fisiologiche, quali la gravidanza, attraverso un monitoraggio volto a rivelare precocemente uno stato di infezione primaria nella donna gravida [Lazarotto *et al.*, 2007], al fine di valutare la possibilità di trasmissione del virus al feto, dall'altro sono aumentati i soggetti esposti a fattori di rischio. In particolare, nell'ambito delle categorie di individui in cui il sistema immunitario non risponde adeguatamente a stimoli antigenici, condizione altamente favorente l'instaurarsi di quadri patologici sostenuti da HCMV, quelle in cui il virus può divenire maggiormente aggressivo sono rappresentate da soggetti sottoposti a trapianto d'organo o di midollo (in trattamento terapeutico immunosoppressivo), come anche da individui con infezione da HIV [Gerna *et al.*, 2008; Baldanti *et al.*, 2008]. Quanto brevemente esposto rende ragione del fatto che HCMV venga ancora oggi considerato uno tra gli agenti eziologici più importanti nell'indurre anomalie congenite e/o sequele neurologiche tardive nel bambino [Revello and Gerna, 2004], ma ancora di più nel causare quadri patologici gravi ed anche mortali nei

trapiantati d'organo e nei malati di AIDS [Reinke *et al.*, 1999; Vancikova and Dvorak, 2001; Gerna *et al.*, 2006].

HCMV si replica *in vitro* in cellule fibroblastoidi con corredo cromosomico diploide e provenienti dalla specie ospite naturale *in vivo*, mentre le cellule indifferenziate, trasformate o aneuploidi non sono suscettibili all'infezione. D'altra parte, nell'infezione naturale non solo le cellule fibroblastoidi, ma anche le cellule epiteliali, muscolari lisce ed endoteliali sono in grado di sostenere un'infezione produttiva [Sinzger *et al.*, 1995].

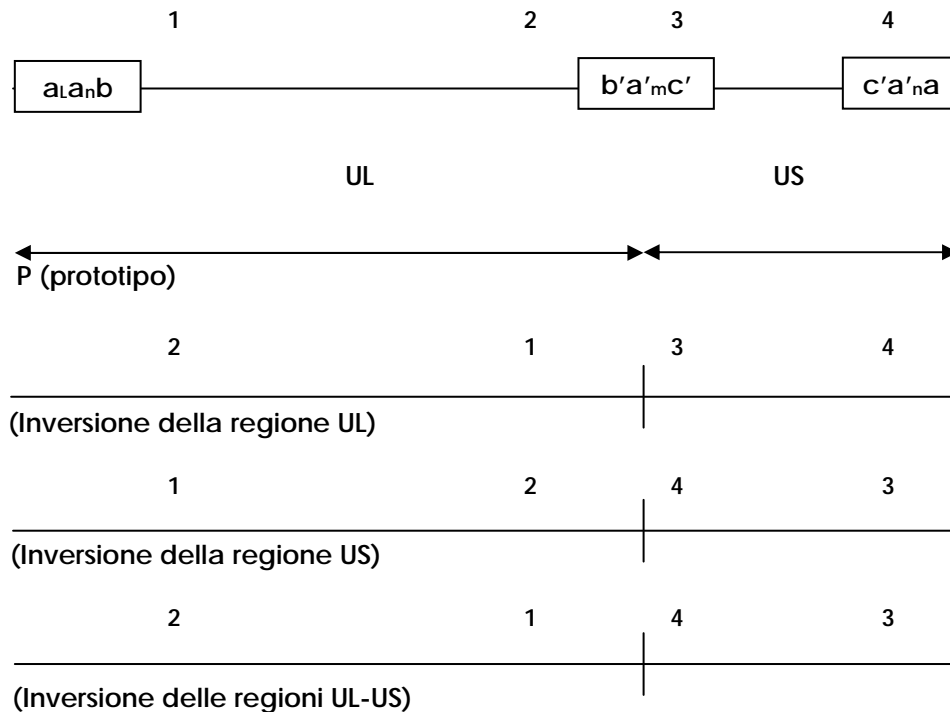
Il virione presenta forma rotondeggiante di dimensioni variabili (comprese tra 150 e 250 nm) ed è costituito da: un involucro pericapsidico ("envelope"), formato da un doppio strato fosfolipidico tipico delle membrane cellulari, da cui sporgono diversi tipi di glicoproteine virus-specifiche; un nucleocapside icosaedrico di circa 100 nm di diametro, costituito da 162 capsomeri prismatici e, interposto tra quest'ultimo e l'"envelope", da uno strato di materiale elettrondenso fibroso-granulare e di natura proteica, denominato tegumento.

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 defettive: i "Dense Bodies" (DB) e i "Non Infectious Envelope Particles" (NIEP) [Sarov and Abady, 1975; Irmiere and Gibson, 1983; Gibson, 1996]. 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 capsidico, tegumento e pericapside virale.

### 3.1.2 IL GENOMA VIRALE

Il genoma di HCMV, di lunghezza compresa tra 200 e 240 Kpb e di peso molecolare di  $150-155 \times 10^6$  daltons, è formato da due sequenze nucleotidiche di lunghezza diversa, UL ("Unique Long") e US ("Unique Short"), fiancheggiate da brevi sequenze di basi ripetute e invertite, indicate rispettivamente come *b* (TRL/IRL: "Terminal Repeats Long/Internal Repeats Long") e *c* (IRS/TRS: "Internal Repeats Short/Terminal Repeats Short") che consentono l'organizzazione del genoma stesso in quattro forme isomeriche (Figura 1). Una sequenza ripetuta ma non invertita, denominata sequenza *a*, si colloca alle estremità della molecola di DNA. La stessa sequenza, ma con orientamento invertito, si trova localizzata

anche nel punto di congiunzione tra le due sequenze UL ed US. Questa peculiare distribuzione della sequenza *a* promuove l'inversione genomica (Figura 1).



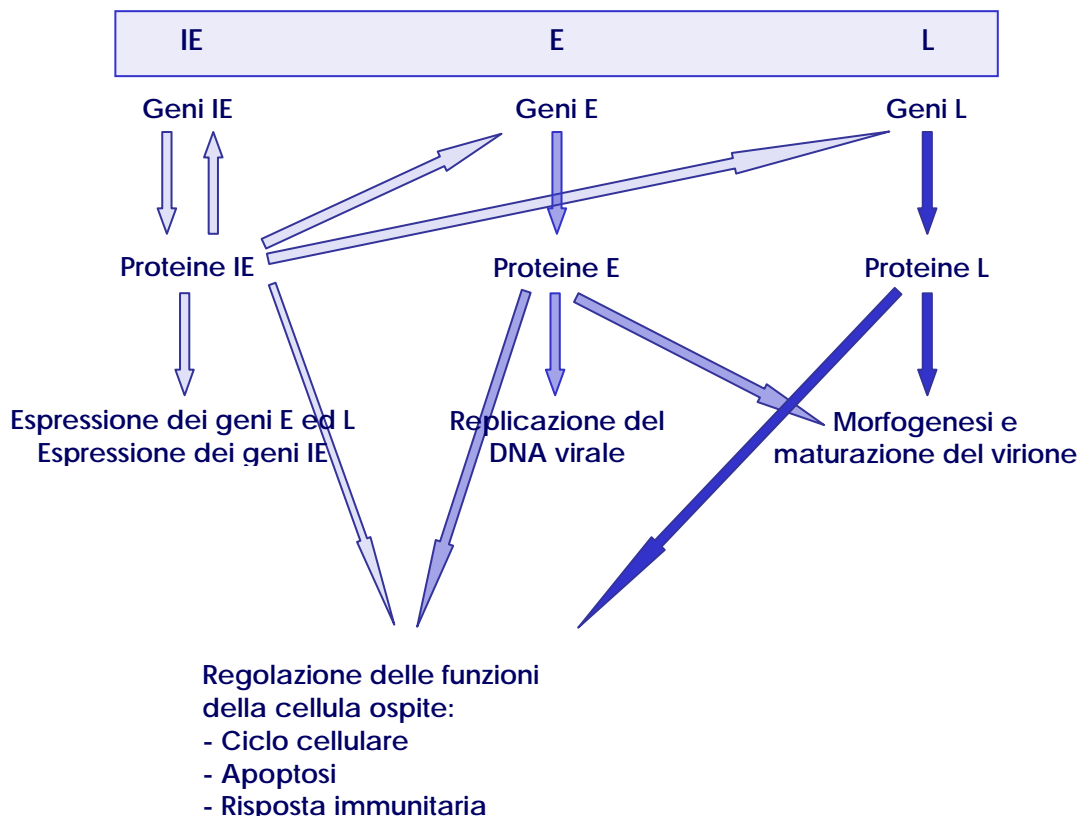
**Figura 1.** Rappresentazione schematica delle quattro forme isomeriche del genoma di HCMV. Immagine modificata da Pharmacology & Therapeutics. Vol. 98. Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., Lembo, D. (2003). The human cytomegalovirus. pp. 269-297. Copyright 2007. Con permesso Elsevier. [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).

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

Il virione maturo di HCMV, a differenza di altri virus a DNA, contiene, oltre alla molecola di DNA genomico, due classi di molecole di RNA. Un tipo di RNA forma strutture ibride RNA-DNA all'interno dell'origine di replicazione litica *oriLyt*, che potrebbero facilitare la replicazione dello stesso DNA virale [Prichard *et al.*, 1998]; la seconda classe di trascritti sembra essere invece localizzata a livello del tegumento virale; la sua traduzione avverrebbe subito dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite. Le proteine codificate da questi RNA hanno funzione sconosciuta [Bresnahan and Shenk, 2000].

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

Durante l'infezione produttiva, l'espressione del genoma virale avviene in modo sequenziale e temporalmente regolato. Sulla base di questo criterio, possono essere identificate tre classi di geni virali la cui espressione porta alla sintesi di tre categorie di prodotti proteici: proteine precocissime ("Immediate Early"/IE o  $\alpha$ ), precoci ("Early"/E o  $\beta$ ) e tardive ("late"/L o  $\gamma$ ) (Figura 2). L'espressione dei geni IE avviene immediatamente dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite ed è indipendente dall'espressione di altri geni virali. L'espressione dei geni E, al contrario, dipende dall'espressione dei geni IE; alla stessa stregua, la successiva espressione dei geni L è dipendente dai geni E (Figura 2).



**Figura 2.** Espressione genica di HCMV e funzione dei corrispettivi prodotti proteici in corso di infezione produttiva. Immagine modificata da Pharmacology & Therapeutics. Vol. 98. Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., Lembo, D. (2003). The human cytomegalovirus. pp. 269-297. Copyright 2007. Con permesso Elsevier. [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

La trascrizione dei geni virali dipende dall'enzima RNA polimerasi II cellulare e da altri fattori che fanno parte del complesso apparato trascrizionale della cellula

ospite, cooptata dal virus durante l'infezione attraverso la produzione di transattivatori virus-specifici, in grado di modulare l'espressione sia dei geni virali, sia dei geni cellulari [Fortunato and Spector, 1999; Mocarski and Courcelle, 2001].

### Le proteine virali

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

L'espressione genica relativa al ciclo di replicazione litico di HCMV vede, come atto iniziale, la sintesi di un esiguo numero di proteine definite precocissime o "immediate-early" (IE) o  $\alpha$ , prodotte nell'ambito della prima ora 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 ed hanno un profondo impatto sulla fisiologia della cellula ospite, dovuto alla loro capacità di regolare l'espressione di numerosi geni cellulari [Fortunato and Spector, 1999].

Le proteine precocissime maggiori (MIE) IEp72 e IEp86 sono codificate rispettivamente dai geni IE UL123 e UL122, 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 il fattore nucleare kB (NF-kB), la proteina AP-1 ("activator protein 1"), la proteina Sp1 (stimulatory protein 1) e il fattore che lega gli elementi di risposta all'AMP-ciclico (CREB/ATF) [Boshart *et al.*, 1985], attivati dall'infezione stessa con HCMV. Le proteine IEp72 ed IEp86 sono accomunate da una breve sequenza aminoacidica codificata dall'esone 2 e dall'esone 3 della suddetta regione. Recentemente è stato attribuito alla sequenza dell'esone 3 un ruolo di spicco nell'ambito della regolazione della trascrizione, dell'espressione dei geni virali precoci e nella modulazione di proteine, quali ad esempio le cicline, direttamente coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare [White and Spector, 2005].

IEp86 rappresenta la più importante proteina con funzioni regolatorie codificata dal virus [Spector, 1996; Stenberg, 1996]. Il ruolo più rilevante di questo prodotto proteico consiste nell'attivazione dell'espressione sia dei geni  $\beta$ , sia dei geni  $\gamma$ . Compito di IEp86 è, inoltre, quello di assicurare che l'espressione di tali geni, durante l'infezione, avvenga in modo sequenziale e temporalmente regolato [Fortunato and Spector, 1999], oltre che di garantire la repressione

dell'espressione dei geni  $\alpha$  IE1/IE2 e US3, nelle fasi tardive dell'infezione [Fortunato and Spector, 1999, Mocarski and Courcelle, 2001]. Questa proteina funziona quindi da attivatore trascrizionale, coadiuvata in questa funzione dal prodotto del gene IE1 che ne promuove ulteriormente l'attività.

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

Numerosi dati di letteratura mettono in evidenza che HCMV regola l'espressione dell'interferone  $\beta$  [Zhu *et al.*, 1998; Browne *et al.*, 2001; Browne and Shenk, 2003; Taylor and Bresnahan, 2005], di alcune chemochine, quali per esempio le chemochine definite come "regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted" (RANTES) [Zhu *et al.*, 1998; Browne *et al.*, 2001; Schroeder and Worthen 2001; Browne and Shenk, 2003; Abate *et al.*, 2004; Gravel and Servant, 2005], di monociti indotti dall'interferone  $\gamma$  ("monokine induced by interferon- $\gamma$ " o "MIG") [Browne *et al.*, 2001; Browne and Shenk, 2003; Abate *et al.*, 2004], delle proteine 1 e 2 di monociti chemiotattici (MCP-1 e -2) [Hirsch and Shenk, 1999; Browne and Shenk, 2003], della proteina  $1\alpha$  di macrofagi indotti dal processo infiammatorio (MIP- $1\alpha$ ) [Browne *et al.*, 2001; Abate *et al.*, 2004] e, infine, dell'interleuchina 8 [Craigien *et al.*, 1997; Randolph-Habecker *et al.*, 2002; Browne and Shenk, 2003; Compton *et al.*, 2003]. L'espressione delle suddette proteine risulta particolarmente pronunciata quando l'espressione dei geni virali di HCMV è arrestata, facendo pertanto supporre che una o più proteine virali di nuova sintesi possano bloccare attivamente l'espressione di questi geni [Zhu *et al.*, 1997; Hirsch and Shenk, 1999; Browne *et al.*, 2001; Schroeder and Worthen, 2001]. Studi recenti

hanno dimostrato che, in corso di infezione da HCMV, la proteina virale IEp86 è in grado di impedire l'induzione dell'interferone  $\beta$  [Taylor and Bresnahan, 2005], di intervenire nella soppressione dell'induzione trascrizionale delle citochine e, parallelamente, di causare un blocco dell'espressione dei geni che codificano per citochine e chemochine pro-infiammatorie [Taylor and Bresnahan, 2006].

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

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

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

#### - *Le proteine precoci (Early o $\beta$ )*

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

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

Le glicoproteine codificate dai geni US2 e US11 mediano invece l'evasione del virus dal sistema immune, legandosi alle catene pesanti delle molecole MHC di classe I e trasportandole nel citoplasma dove vengono degradate dal proteasoma [Shamu *et al.*, 1999; Story *et al.*, 1999]. La stessa funzione è svolta, mediante un meccanismo differente, dalle proteine codificate dai geni US27 e US28, omologhe a recettori per specifiche chemochine [Chee *et al.*, 1990]. In particolare US28, omologo al recettore per RANTES ed MCP-1, agisce sequestrando tali chemochine ed eludendo la risposta cellulo-mediata da esse attivata: in questo modo viene evitata l'eliminazione di cellule infettate da HCMV [Gao and Murphy, 1994; Bodaghi *et al.*, 1998].

#### - Le proteine tardive (*Late o $\gamma$* )

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

Il capsido 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 capsido stesso. Nell'ambito di queste ultime, la più rappresentata è la proteina "Assembly Protein" (AP), che deriva dalla scissione proteolitica del suo precursore, operata da una proteina virale con attività proteasica, detta assemblina [Welch *et al.*, 1991]. La proteina AP è presente solo nei capsidi virali privi di DNA (virus NIEP) e non nelle particelle virali mature contenenti l'acido nucleico [Robson and Gibson, 1989]; questo depone per un coinvolgimento attivo della stessa proteina nel processo di incapsidamento del DNA virale.

Il tegumento, o matrice, è costituito da 25 tipi diversi di proteine fosforilate, come sottolineato dal prefisso *pp* ("phosphoprotein") che le contraddistingue; tali proteine sono altamente immunogene. Le più rappresentate sono: ppUL83 (pp65), ppUL32 (pp150), ppUL99 (pp28), ppUL82 (pp71) e ppUL48 ("huge

tegument protein") [Bradshaw *et al.*, 1994; Gibson, 1996]. La funzione della maggior parte delle proteine che compongono il tegumento rimane ignota; è stato ipotizzato che molte di esse siano coinvolte nella regolazione dell'espressione genica come transattivatori trascrizionali [Liu and Stinski, 1992; Winkler *et al.*, 1995; Romanowski *et al.*, 1997].

Le due proteine del tegumento pp150 ("Basic Phosphoprotein" o BPP) e pp65 ("Lower Matrix Protein" o LMP), rappresentano le proteine più abbondantemente prodotte durante la replicazione virale. Nel loro insieme, le due proteine costituiscono il 35% dell'intera massa proteica del virione.

Già nell'ambito della prima ora di infezione, la proteina pp65 del virus parentale viene velocemente traslocata verso il nucleo cellulare grazie a specifici segnali di localizzazione nucleare. Il rapido trasporto verso il nucleo, unitamente alla dimostrata attività chinasi della stessa fosfoproteina, lasciano ipotizzare un coinvolgimento di pp65 nella regolazione della replicazione e dell'espressione genica virale. Inoltre, tale proteina è in grado di indurre una inibizione parziale dell'espressione di IFN  $\beta$  e di alcune chemochine in corso di infezione virale, mentre essa non sembra essere coinvolta nella regolazione delle citochine pro-infiammatorie, a differenza di quanto osservato per la proteina IEp86 [Browne and Shenk, 2003; Abate *et al.*, 2004; Taylor and Bresnahan, 2006].

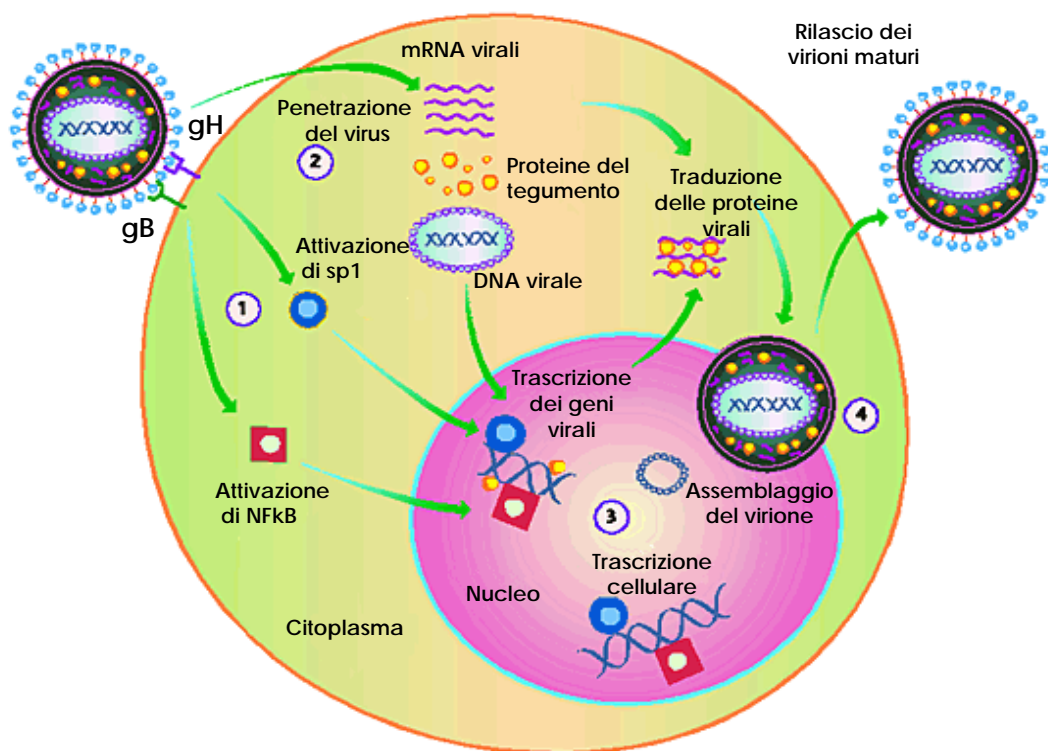
Un'altra abbondante fosfoproteina del tegumento è la proteina pp71 ("Upper Matrix Protein" o UMP), che costituisce un'importante transattivatore trascrizionale, in grado di attivare l'espressione del locus IE1/IE2 [Liu and Stinski, 1992].

Il pericapside virale è formato, come già accennato, da un doppio strato lipidico, tipico delle membrane cellulari, in cui sono inseriti complessi glicoproteici virus-specifici, che svolgono funzioni di rilievo in diversi processi, quali l'ingresso del virus nella cellula ospite o, ancora, la risposta immunitaria, in quanto siti di legame per gli anticorpi neutralizzanti. In particolare, sono due i principali complessi glicoproteici conservati in tutti i sottogruppi della famiglia *Herpesviridae* [Britt and Mach, 1996]. Uno di questi complessi viene codificato dal gene gB. Il gene gB viene trascritto in un mRNA codificante per una proteina che, dopo glicosilazione e trasporto nell'apparato del Golgi, subisce un taglio endoproteolitico che dà luogo ad un dimero della glicoproteina B (gB). Il secondo complesso glicoproteico è formato dai prodotti di tre geni distinti: gH, gL e gO. Il genoma di

HCMV codifica, inoltre, per numerose proteine con caratteristiche tipiche delle proteine transmembrinarie, come la proteina "integrate membrane protein" [Lehner *et al.*, 1989], che potrebbero quindi rappresentare costituenti minori del pericapside virale ed essere coinvolte nelle fasi di attacco e di ingresso del virus nella cellula ospite.

### 3.1.3 IL CICLO LITICO DI CITOMEGALOVIRUS

La prima fase del ciclo litico di HCMV (Figura 3) prevede l'attacco del virus alla superficie cellulare, mediato dal legame a bassa affinità degli antirecettori virali con le molecole di eparan-solfato dei proteoglicani di membrana [Compton *et al.*, 1993; Boyle and Compton, 1998]. Questo processo è rapido ed efficiente e suggerisce una vasta distribuzione dei recettori cellulari riconosciuti da HCMV sulla superficie cellulare.



**Figura 3.** Il ciclo replicativo litico di citomegalovirus umano. Immagine riprodotta da Nature Medicine, Vol. 6. Huang E-S and Johnson R.A., (2000). Human cytomegalovirus – no longer just a DNA virus. pp. 863-864. Copyright 2007. Con permesso Nature Publishing Group. [www.nature.com](http://www.nature.com)

A questa prima interazione tra virus e cellula ospite seguono le fasi di adsorbimento e la penetrazione del virus, mediate dalla fusione del pericapside virale con la membrana cellulare, processo che risulta indipendente dall'abbassamento del pH [Compton *et al.*, 1993] e che, probabilmente, coinvolge in prima istanza il complesso glicoproteico virale gH-gL-gO [Keay and Baldwin, 1991; Theiler and Compton, 2001].

Mentre gli antirecettori virali sono rappresentati, con ogni probabilità, dalle glicoproteine gB e gH/gL [Kinzler and Compton, 2005], i recettori cellulari, sebbene abbondantemente rappresentati, sono scarsamente caratterizzati.

Recentemente è stata dimostrata un'associazione delle glicoproteine gB e gH con le molecole "Toll-like receptor 2" (TLR-2) e "Toll-like receptor 1" (TLR-1), due recettori transmembrana la cui funzione è quella di mediare le fasi iniziali dell'immunità innata, ovvero attivare la cascata di eventi che culmina nell'attivazione del fattore nucleare kB (NF-kB), coattivatore della trascrizione coinvolto nella regolazione della risposta immunitaria e nella secrezione di citochine infiammatorie. L'associazione delle glicoproteine virali con TLR-2 e TLR-1 durante le fasi di attacco e penetrazione del virus nella cellula ospite potrebbe rappresentare un notevole vantaggio temporale per la risposta immune dell'ospite contro l'infezione virale [Boehme *et al.*, 2006].

Successivamente alla penetrazione nella cellula ospite, il nucleocapside virale si muove rapidamente verso il nucleo, dove il genoma virale circolarizza, grazie alla presenza delle strutture palindromiche alle sue estremità e viene trascritto, come precedentemente accennato, ad opera dell'enzima RNA polimerasi II cellulare e di altri fattori che fanno parte del complesso apparato trascrizionale della cellula ospite [Fortunato and Spector, 1999; Mocarski and Courcelle, 2001].

Come per la maggior parte dei virus a DNA, la replicazione del DNA virale di HCMV avviene a livello nucleare ad opera dell'enzima DNA polimerasi virale. Sempre a livello nucleare, il DNA replicato viene inserito nei capsidi preformati: in questo modo, le particelle sub-virali acquistano dimensioni tali da non potere abbandonare il nucleo se non attraverso la lamina nucleare, al fine di raggiungere la membrana nucleare interna. Questo processo richiede la depolimerizzazione della lamina nucleare stessa che, molto probabilmente, avviene per fosforilazione delle proteine che la compongono, in particolare in seguito all'attivazione di chinasi cellulari reclutate dal virus [Muranyi *et al.*, 2002].

Durante la successiva fase di gemmazione attraverso la membrana nucleare interna verso lo spazio perinucleare, le particelle sub-virali acquisiscono alcune proteine del tegumento ed un pericapside primario che, fondendosi con la membrana nucleare esterna, permette il rilascio del nucleocapside nel citoplasma. I nucleocapsidi "nudi" raggiungono in seguito il reticolo endoplasmatico e, infine, l'apparato del Golgi, acquisendo addizionali proteine del tegumento ed il loro pericapside maturo. I virioni sono infine trasportati verso la membrana citoplasmatica in vescicole derivate dall'apparato del Golgi e vengono liberati all'esterno della cellula ospite per esocitosi [Sanchez and Spector, 2002].

#### 3.1.4 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 [Hengel *et al.*, 1998] in una condizione di latenza da cui può sporadicamente riattivarsi [Sissons *et al.*, 2002]. Nell'individuo immunocompetente la riattivazione virale, come l'infezione primaria, è generalmente ben controllata dalla risposta immunitaria cellulo-mediata [Jonjic *et al.*, 1990; Polic *et al.*, 1996; Hengel *et al.*, 1998]. Al contrario, quando l'infezione primaria o la riattivazione si verificano in pazienti immunodepressi, quali individui con AIDS o pazienti sottoposti a trapianto d'organo o di midollo, la replicazione di HCMV può divenire incontrollata e portare a livelli elevati di morbilità e di mortalità [Reinke *et al.*, 1999; Vancikova and Dvorak, 2001].

I dati relativi all'infezione latente da HCMV sono ancora frammentari: tuttavia, in accordo con i meccanismi di mantenimento della latenza di altri herpesvirus, come ad esempio il virus di Epstein-Barr (EBV) e/o l'herpes simplex virus di tipo 1 (HSV1), sembra che ciò che determina la riattivazione dalla latenza di HCMV sia la piena espressione dei geni virali IE [Speck *et al.*, 1997; Everett, 2000; Halford and Schaffer, 2001; Sinclair, 2003; Amon and Farrell, 2005].



cellulare una condizione di persistenza virale, dovuta ad un basso livello di infezione produttiva, in assenza di un effetto citopatico evidente [Streblow and Nelson, 2003].

#### Espressione genica in corso di infezione latente da HCMV

Durante l'infezione latente il DNA di HCMV rimane nel nucleo delle cellule infettate in forma episomale (Bolovan-Fritts *et al.*, 1999), in assenza di livelli rilevabili 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 ("citomegalovirus latency transcripts" – CLTs) [Kondo *et al.*, 1994].

I primi trascritti di latenza sono stati identificati in colture cellulari sperimentali di progenitori dei granulociti-macrofagi (GMPs), infettate con HCMV [Kondo *et al.*, 1994; Kondo and Mocarski, 1995]. Tali trascritti, prodotti a partire da entrambi i filamenti di DNA nella regione che codifica per i geni precocissimi IE1 ed IE2, mostrano un orientamento "in senso" o "in antisenso": in particolare, i CLTs "in senso" derivano dallo "splicing" di trascritti complementari a sequenze localizzate nella regione promotore-"enhancer" dei geni IE ed i loro siti di inizio, LSS-1 ed LSS-2 (LSS: "Latency Start Site"), si collocano 354 e 292 nucleotidi a monte del sito di inizio della trascrizione dell'infezione produttiva (PSS: "Productive Start Site") [Kondo *et al.*, 1996; Lunetta and Wiedeman, 2000]; il trascritto "antisenso", invece, è complementare ad una regione compresa tra l'esone 4 e il primo introne del gene IE ed ha la caratteristica di essere omogeneo e non sottoposto a processo di "splicing" [Kondo *et al.*, 1996]. Questi CTLs, rilevati in rari casi in individui sani e sieropositivi per HCMV [Kondo and Mocarski, 1995; Kondo *et al.*, 1996; Hahn *et al.*, 1998], includono "open reading frames" (ORFs) che sembrano codificare per proteine riconosciute da anticorpi sierici di portatori sani [Landini *et al.*, 2000]. Tuttavia, il ruolo che tali trascritti rivestono nell'instaurare e mantenere una condizione di latenza deve essere ancora chiarito.

Nel suddetto modello sperimentale di GMPs è stato individuato anche un altro trascritto [Jenkins *et al.*, 2004], complementare alla regione del genoma virale UL111.5A, che codifica un omologo dell'IL-10 (vIL-10), una citochina in grado di modulare, con prevalente effetto inibitorio, la risposta immunitaria [Jenkins *et al.*, 2004]. Tuttavia, il ritrovamento di questo trascritto in monociti ottenuti da individui sieronegativi per HCMV rende la sua funzione di difficile interpretazione.

Recentemente, l'analisi di RNA purificati da monociti di individui sani, sieropositivi per HCMV, ha permesso di isolare un trascritto virale "antisenso" [Bego *et al.*, 2005], complementare alla regione UL81-82 del genoma virale che codifica per la proteina del tegumento virale pp71, riconosciuta come attivatore trascrizionale del promotore dei geni precocissimi IE1 e IE2. Il trascritto include una ORF di 133 aminoacidi che può essere identificata durante l'infezione litica di fibroblasti mediante analisi in Western blot; è stato ipotizzato che il trascritto stesso o il suo prodotto proteico possano essere coinvolti nel limitare l'espressione dei geni precocissimi e di conseguenza nel mantenere la condizione di latenza (Bego *et al.*, 2005).

Il ritrovamento di RNA virali associati alla latenza lascia supporre che essi siano direttamente coinvolti nel mantenimento del genoma virale in forma latente o che modulino il profilo di espressione genica della cellula ospite al fine di renderlo più favorevole alla "conservazione" del virus in assenza di produzione di progenie infettante [Sinclair and Sisson, 2006].

#### La riattivazione dell'infezione produttiva da HCMV

Come già precedentemente sottolineato, HCMV risiede latentemente nei monociti del sangue periferico e nei loro progenitori CD34+ del midollo [Taylor-Wiedeman *et al.*, 1994; Mendelson *et al.*, 1996]; è stato anche descritto come il differenziamento di colture di cellule mononucleate del sangue periferico, indotto dalla presenza nel terreno di coltura di citochine prodotte dalla stimolazione allogenica di cellule T, porti alla riattivazione del virus con innesco del ciclo replicativo litico e produzione di virus infettante [Söderberg-Nauclér *et al.*, 1997]. Sembrerebbe quindi plausibile affermare che il passaggio dalla condizione di latenza all'infezione produttiva possa essere collegato al processo di differenziamento cellulare [Taylor-Wiedeman *et al.*, 1994].

Le cellule in cui HCMV si riattiva presentano marcatori di superficie tipici dei macrofagi e delle cellule dendritiche (DC). Queste ultime, in particolare, sono cellule immunitarie altamente specializzate nella presentazione dell'antigene ai linfociti T e in grado di giocare un ruolo chiave nell'induzione della risposta immunitaria cellulo-mediata. Esistono almeno due tipi di DC derivanti da cellule della linea mieloide: le cellule dendritiche del Langerhans, che si trovano nell'epitelio, dove fungono da barriera rispetto all'ambiente circostante, e le DC

interstiziali, che risiedono nei tessuti profondi dove agiscono come "sentinelle" nei confronti degli agenti patogeni con cui l'organismo entra in contatto (Banchereau *et al.*, 2000).

La stimolazione allogenica di colture cellulari *in vitro* di progenitori CD34+ del midollo osseo, infettate naturalmente con HCMV, porta alla produzione di DC fenotipicamente riferibili a cellule DC del Langerhans [Reeves *et al.*, 2005].

Il dato che maggiormente supporta la correlazione tra differenziamento cellulare ed infezione produttiva è relativo alla elevata frequenza con cui si è osservata la riattivazione del virus dalle sedi cellulari di latenza, quando queste ultime andavano incontro al suddetto processo [Sinclair and Sisson, 2006]. Il differenziamento e sviluppo delle cellule del sistema ematopoietico *in vivo* rappresenta un evento piuttosto rapido: le cellule progenitrici CD34+ dopo due/tre giorni di permanenza nel midollo osseo lasciano la loro sede e si differenziano in monociti. Tali cellule rimangono a loro volta nel circolo sanguigno per 6 giorni, trascorsi i quali divengono dapprima macrofagi immaturi circolanti e successivamente macrofagi tissutali [Strobl, 2003]. Di conseguenza, è verosimile che la riattivazione di HCMV in individui sieropositivi sani avvenga routinariamente senza costituire tuttavia un reale problema, vista la forte risposta immunitaria al virus attuata dai linfociti T citotossici [Jonjic *et al.*, 1990; Hengel *et al.*, 1998; Sylwester *et al.*, 2005]. A sostegno di tale affermazione, l'analisi di cellule effettrici del sistema immune, ottenute da individui sani infettati latentemente con HCMV, ha mostrato un'alta frequenza di linfociti T citotossici in grado di riconoscere un numero relativamente ristretto di epitopi virali, alcuni dei quali derivanti da proteine strutturali del virus. Tale riconoscimento implicherebbe una continua ristimolazione della risposta immunitaria nei confronti di HCMV [McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996; Kern *et al.*, 2002; Sylwester *et al.*, 2005], verosimilmente mediata da episodi di riattivazione subclinica.

#### Meccanismi di regolazione dell'espressione genica virale

È noto come cellule monocitarie del sangue periferico ed i loro progenitori CD34+ non siano permissive all'infezione sperimentale con HCMV [Rice *et al.*, 1984]; al contrario cellule con fenotipo riconducibile a macrofagi o DC mature risultano totalmente permissive all'infezione [Ibanez *et al.*, 1991; Riegler *et al.*, 2000; Hertel *et al.*, 2003]. Questo blocco della permissività all'infezione produttiva da HCMV

sembra legato all'incapacità di alcuni tipi cellulari di sostenere l'espressione dei geni virali IE [Riegler *et al.*, 2000; Hertel *et al.*, 2003]. Come precedentemente accennato in questa sezione introduttiva, l'espressione dei geni IE1 e IE2 e delle proteine da essi codificate, è controllata da un complesso elemento regolatore formato dall'"enhancer" e dal promotore dei geni maggiori IE ("Major immediate-early promoter/enhancer" - MIEP), localizzato 500 pb a monte del TATA box. Tale elemento regolatore contiene una serie di elementi ripetuti di 17, 18, 19 e 21 pb ed un "modulatore", caratterizzato da una simmetria imperfetta [Boshart *et al.*, 1985; Lubon *et al.*, 1989; Meier and Stinski, 1996]. Per lungo tempo è stato ipotizzato che il legame di diversi fattori cellulari all'"enhancer" virale potesse svolgere un ruolo importante nel determinare la permissività delle cellule all'espressione dei geni IE di HCMV [Lubon *et al.*, 1989; Ghazal *et al.*, 1990; Nelson *et al.*, 1990].

Saggi di trasfezione e analisi basate sulla mobilità elettroforetica delle proteine hanno permesso di individuare una serie di fattori, nell'ambito dell'apparato trascrizionale cellulare, capaci di regolare positivamente l'espressione dei principali trascritti IE di HCMV [Meier and Stinski, 1996]. In particolare, NF-kB [Sambucetti *et al.*, 1989], CREB [Hunninghake *et al.*, 1989] e Sp1 [Lang *et al.*, 1992], sono in grado di attivare l'"enhancer" virale, legandosi alle sequenze virali ripetute di 18 (NF-kB) e 19 (CREB e SP1) pb.

D'altra parte, nella regione promotore/"enhancer" dei geni IE di HCMV sono anche presenti siti di legame per fattori cellulari che agiscono come repressori della trascrizione: questi includono proteine che legano il modulatore [Shelbourn *et al.*, 1989; Kothari *et al.*, 1991], Yin Yang 1 (YY1) [Liu *et al.*, 1994], proteine che legano il DNA metilato [Zhang *et al.*, 1991], un fattore di riconoscimento del modulatore [Huang *et al.*, 1996], il fattore di crescita indipendente-1 (Gfi-1) [Zweidler-McKay *et al.*, 1996] e il fattore di repressione di Ets-2 (ERF) [Bain *et al.*, 2003].

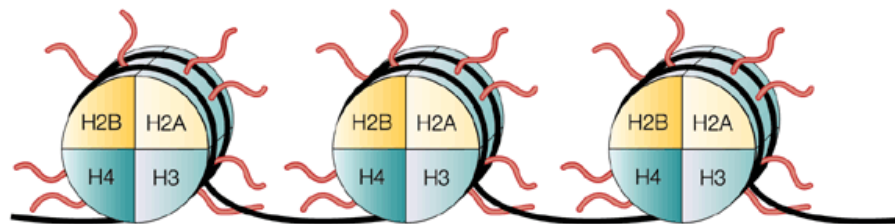
Le modalità con cui i fattori YY1 ed ERF possono reprimere l'attività del MIEP virale sembrano legate alla capacità di queste proteine di reclutare enzimi in grado di modificare la cromatina nell'ambito della suddetta regione [Wright *et al.*, 2005]; in generale, il fattore YY-1 agisce richiamando l'enzima istone deacetilasi (HDACs), che rimuove i gruppi acetile dalle "code" amino-terminali delle proteine istoniche associate al DNA, portando ad una conformazione chiusa (ovvero non

trascrivibile) della cromatina [Murphy *et al.*, 2002; Wright *et al.*, 2005]. Questa modificazione post-traduzionale delle proteine avviene tipicamente nelle cellule eucariote e si annovera nell'ambito di meccanismi di regolazione epigenetica, in grado di modulare l'espressione genica cellulare. Inoltre, è stato anche dimostrato che il trattamento di cellule non permissive all'infezione litica di HCMV con inibitori degli enzimi istone deacetilasi rende le cellule stesse permissive all'infezione virale [Murphy *et al.*, 2002]. In linea con le suddette osservazioni, è stato suggerito che l'espressione di geni virali con funzioni chiave, nell'ambito di un ampio numero di virus, sia verosimilmente regolata da cambiamenti di struttura della cromatina: tali cambiamenti nel caso di HSV1 e EBV sembrano coinvolti nel controllo della riattivazione di questi herpesvirus dalla latenza [Jenkins *et al.*, 2000; Arthur *et al.*, 2001; Kubat *et al.*, 2004; Amon and Farrell, 2005].

Quanto sopra affermato è reso anche maggiormente plausibile da numerosi dati di letteratura che dimostrano che, una volta penetrato nel nucleo cellulare, il genoma di tutti i virus erpetici, compreso quello di HCMV, si associa a proteine istoniche, organizzandosi in una struttura bipartita simile a quella del nucleosoma [Kierszenbaum and Huang, 1978; St Jeor *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1997]; è pertanto verosimile ipotizzare che le modificazioni epigenetiche, caratteristiche delle cellule eucariote, possano giocare un ruolo critico anche nella regolazione dell'espressione genica virale.

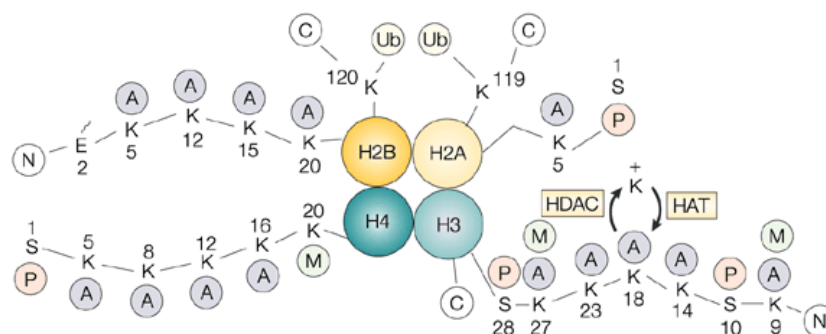
### 3.2 L'ORGANIZZAZIONE DELLA CROMATINA NELLA CELLULA EUCARIOTA

Nei nuclei di cellule eucariote, il DNA genomico è ripiegato in una struttura molto compatta, ottenuta dall'associazione dell'acido nucleico a proteine istoniche e non istoniche, a formare un polimero più o meno dinamico chiamato cromatina. L'unità di base della cromatina è rappresentata dal nucleosoma che consiste in una porzione di DNA (circa 165 pb) doppiamente avvolto attorno ad un "core" proteico formato da un tetramero di istoni H3-H4 e due dimeri H2A-H2B [Luger *et al.*, 1997] (Figura 5).



**Figura 5.** Rappresentazione schematica della struttura del nucleosoma (tre di tali complessi sono visibili nella figura). Immagine riprodotta da Nature Rev. Cancer, Vol. 1. Marks PA, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, (2001). Histone deacetylase and cancer: causes and therapies. pp. 194-202. Copyright 2007. Con permesso Nature Publishing Group. [www.nature.com](http://www.nature.com)

Gli istoni sono piccole proteine basiche con peso molecolare compreso tra 11 e 16 kDa, formate da un dominio globulare e da una estremità amino-terminale flessibile ("coda" istonica), che sporge dal nucleosoma (Figura 6).

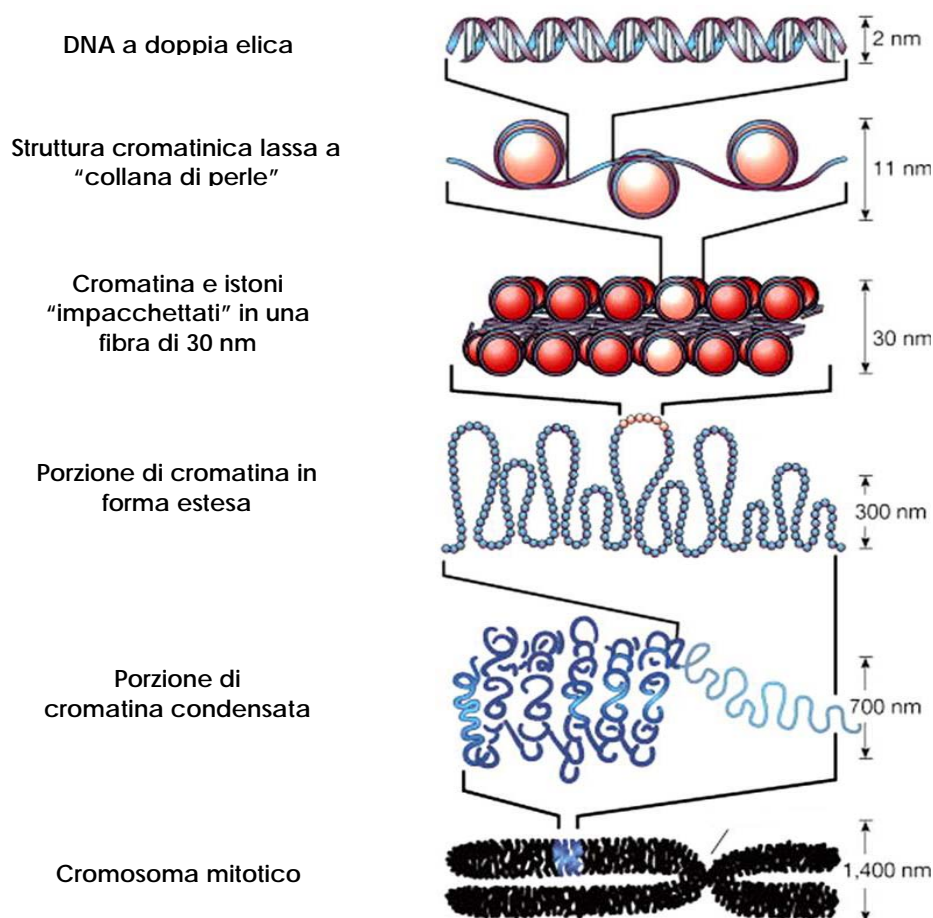


**Figura 6.** Rappresentazione schematica delle estremità amino-terminali delle proteine istoniche. Immagine riprodotta da Nature Rev Cancer, Vol. 1. Marks PA, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, (2001). Histone deacetylase and cancer: causes and therapies. pp. 194-202. Copyright 2007. Con permesso Nature Publishing Group. [www.nature.com](http://www.nature.com)

I residui aminoacidici (K, lisina; E, acido glutammico; S, serina) presenti alle estremità amino-terminali degli istoni H2A, H2B, H3, H4 rappresentano potenziali siti di modificazione epigenetica (aggiunta di un gruppo acetile, metile, fosfato o ubiquitina). A, gruppo acetile; C, estremità carbossi-terminale; M, gruppo metile; N, estremità amino-terminale; P, gruppo fosfato; Ub, ubiquitina.

Mentre in passato le proteine istoniche erano ritenute semplici componenti strutturali del nucleosoma, oggi esse sono considerate elementi chiave nella regolazione dell'espressione genica cellulare.

Nucleosomi adiacenti, separati da una corta porzione di DNA "linker", vengono stabilizzati dalla proteina istonica H1, che porta all'avvolgimento del filamento di cromatina in una fibra di 30 nm, formata da sei nucleosomi per giro di elica (Thoma *et al.*, 1979). Tale fibra di 30 nm si ripiega, portando alla formazione di anse organizzate attorno ad una struttura centrale ("scaffold") formata da circa trenta proteine non istoniche. [Mirkovitch *et al.*, 1984] (Figura 7).



**Figura 7.** Organizzazione della doppia elica di DNA nel cromosoma. Immagine riprodotta da Nature Rev Cancer, Vol. 421. Felsenfeld G and Groudine M., (2003). Controlling the

double helix. pp. 448–453. Copyright 2007. Con permesso Nature Publishing Group, [www.nature.com](http://www.nature.com)

### 3.3 MECCANISMI DI REGOLAZIONE EPIGENETICA DELL'ESPRESSIONE GENICA IN CELLULE EUCARIOTE

Il termine epigenetica, coniato da Conrad Waddington nel 1942, si riferisce allo studio di quei cambiamenti nell'espressione genica, ereditabili dalle cellule durante la divisione mitotica o meiotica, che non possono essere spiegati da modificazioni interne alla sequenza di DNA [Russo *et al.*, 1996].

I meccanismi epigenetici possono sia attivare, sia reprimere l'espressione genica e si estrinsecano generalmente attraverso la metilazione del DNA e la modificazione post-traduzionale delle proteine istoniche ad esso associate [Woodcock, 2006].

#### La metilazione del DNA

Nelle cellule eucariote la metilazione del DNA, legata ad un ridotto livello di trascrizione genica [Razin and Cedar, 1991], interessa la base citosina nell'ambito del dinucleotide citosina – guanina ("CpG"). Dal punto di vista biochimico, questa modificazione consiste nella sostituzione, operata dall'enzima DNA metiltransferasi (DNMT), dell'atomo di ossigeno legato al carbonio in posizione 5 della base citosina con un gruppo metile, con formazione di 5-metilcitosina. Circa l'80% dei dinucleotidi CpG presenti nel genoma dei mammiferi sono metilati [Cheung and Lau, 2005], mentre il restante 20% risulta non metilato e prevalentemente situato, con elevata densità ("CpG Island"), nelle regioni promotrici di geni costitutivi o inducibili.

Il fatto che ogni potenziale sito di metilazione nel genoma sia simmetrico implica l'ereditabilità di tale modificazione: infatti, quando viene metilata la base citosina su uno dei due filamenti di DNA, viene metilata anche la stessa base sul filamento complementare. Dopo la duplicazione dell'acido nucleico, DNMT specifiche ricreano il profilo di metilazione del filamento di DNA parentale in quello neo-sintetizzato.

Questa modificazione epigenetica è stata implicata in molti processi, quali la regolazione trascrizionale, la modulazione della struttura della cromatina e l'inattivazione del cromosoma X. Inoltre, essa esercita un effetto stabilizzante che

promuove e garantisce l'integrità del genoma, oltre ad una corretta espressione temporale e spaziale dei geni durante lo sviluppo [Song *et al.*, 2005].

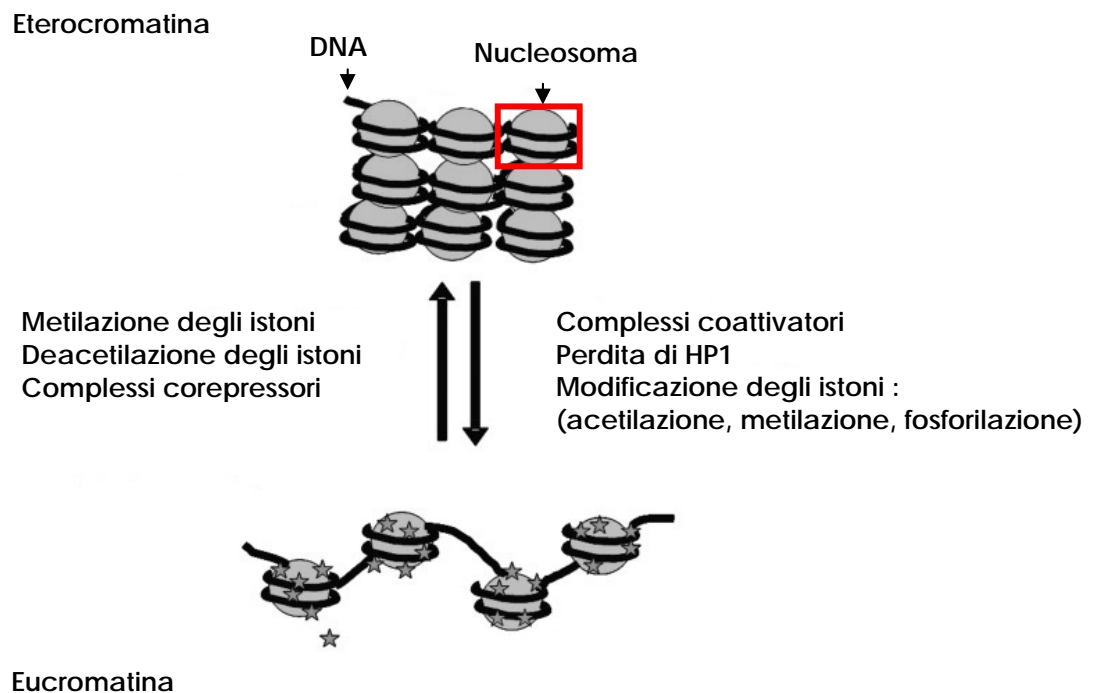
La metilazione del DNA può reprimere la trascrizione mediante meccanismi diretti (tra cui l'inibizione di fattori della trascrizione che legano il DNA) o indiretti, dovuti essenzialmente agli effetti di proteine che si legano alla base citosina metilata nell'ambito del dinucleotide CG: ad esempio, le proteine MeCP2 e MBDs si legano a CpG metilate e reprimono la trascrizione grazie all'interazione con l'enzima istone deacetilasi (HDAC); a sua volta, quest'ultimo deacetila specifici residui aminoacidici localizzati all'estremità amino-terminale delle proteine istoniche, portando ad un rimodellamento della cromatina che risulta meno accessibile agli enzimi della trascrizione, con conseguente repressione dell'espressione genica [Jaenisch and Bird, 2003].

#### Modificazione delle proteine istoniche

Nel nucleo interfase le regioni cromatiniche trascrizionalmente inattive si presentano come zone altamente condensate, note come eterocromatina [Brown, 1966]: in queste regioni, il legame tra DNA ed istoni costituisce una barriera impenetrabile per l'enzima RNA polimerasi II. Nell'ambito dell'eterocromatina si può distinguere un'eterocromatina costitutiva, priva di valore genetico perché non codificante, ed un'eterocromatina facoltativa, così denominata perché in particolari condizioni, sia naturali sia sperimentali, è in grado di trasformarsi in eucromatina, materiale genetico con struttura meno compatta, sede di processi trascrizionali per la sintesi di RNA messaggero (mRNA) e di trasferimento (tRNA).

Come precedentemente accennato, l'elemento costitutivo di base della fibra di cromatina è rappresentato da DNA avvolto attorno ad un ottamero di proteine istoniche (nucleosoma). Una delle modificazioni chiave per la decondensazione delle strutture complesse della cromatina e per il rilassamento della doppia elica di DNA avvolto attorno al "core" istonico è rappresentata dall'acetilazione di singoli residui aminoacidici localizzati nell'estremità amino-terminale delle proteine istoniche, che sporgono dal nucleosoma [Urnov and Wolffe, 2001]. Alcune proteine con funzione di coattivatori trascrizionali, quali CREB, la proteina che lega CREB (CBP), p300 e PCAF (fattore associato a p300/CBP) [Urnov and Wolffe,

2001] presentano un'attività acetiltransferasica (HAT) intrinseca, che consente loro di controllare la trascrizione genica (Figura 8).



**Figura 8.** Rappresentazione schematica del processo di decondensazione/condensazione della cromatina. Immagine modificata da ref. 2. [www.respiratory-research.com](http://www.respiratory-research.com)  
L'eterocromatina rappresenta lo stato condensato, "chiuso", della cromatina ed è associata al silenziamento genico. Il rimodellamento della cromatina, che porta ad una forma più "aperta" della stessa (ovvero trascrizionalmente attiva), è regolata da modificazioni delle proteine istoniche del nucleosoma, operate da specifici complessi proteici coattivatori della trascrizione, contenenti enzimi in grado di acetilare, fosforilare o metilare singoli residui aminoacidici localizzati all'estremità amino-terminale delle "code" istoniche. Importanti processi in questo senso sono la rimozione della proteina eterocromatinica 1 (HP1) ed i cambiamenti nello stato di metilazione del DNA. Questo processo è reversibile e l'intervento di complessi corepressori, che comprendono gli enzimi istone deacetilasi (HDACs) e istone metilasi, porta al silenziamento genico.

Mentre l'acetilazione degli istoni è associata all'espressione genica, la rimozione dei gruppi acetile da parte dell'enzima istone deacetilasi (HDAC) è generalmente associata alla condensazione della cromatina ed al conseguente silenziamento genico [Gao *et al.*, 2002].

Altre modificazioni post-traduzionali che interessano i residui aminoacidici localizzati a livello delle "code" amino-terminali delle proteine istoniche sono la fosforilazione, la metilazione, e l'ubiquitinazione (Figura 9). In particolare la

fosforilazione, come l'acetilazione, è una modificazione reversibile e dinamica, associata con l'induzione dell'espressione genica; al contrario, la metilazione è una modificazione più stabile e spesso coinvolta nel silenziamento genico a lungo termine.



**Figura 9.** Modificazioni epigenetiche degli istoni. Immagine ottenuta da ref. 2. [www.respiratory-research.com](http://www.respiratory-research.com)

La figura mostra le modificazioni post-traduzionali che interessano le “code” amino-terminali degli istoni H2A, H2B, H3 e H4, rappresentate da acetilazione (bandiera arancione), fosforilazione (cerchio rosso), ubiquitinazione (stella blu) e metilazione (bandiera verde). Le posizioni aminoacidiche coinvolte nelle modificazioni sono indicate dai numeri riportati sotto i singoli aminoacidi (K, lisina; R, arginina ; S, serina; T, treonina).

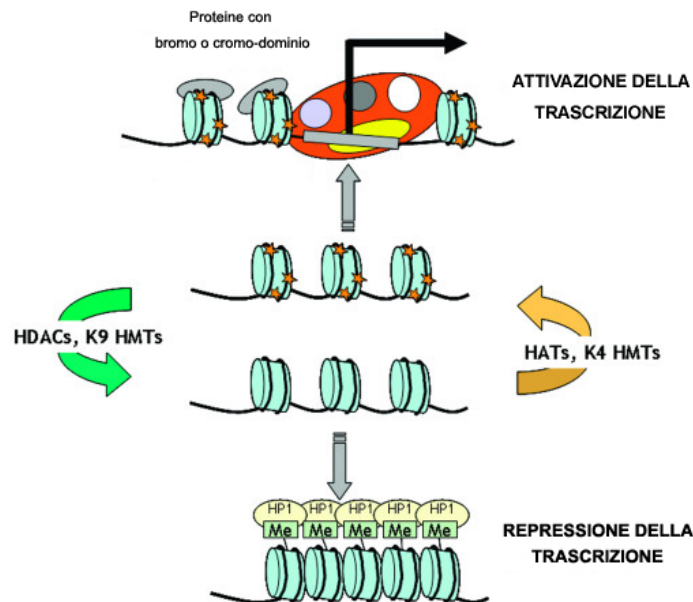
Poiché le suddette modificazioni si possono verificare contemporaneamente a livello di più residui aminoacidici specifici, è stato suggerito che gli istoni modificati possano funzionare come marcatori integrati in percorsi di segnalazione per ottenere la giusta risposta ad un determinato stimolo, dando vita ad un vero e proprio “codice istonico” [Turner, 2007; Razin *et al.*, 2007].

Il reclutamento di un enzima che modifichi un residuo aminoacidico di una “coda” istonica al momento più opportuno è solo il primo evento per la creazione di una combinazione di segnali in grado di portare ad un risultato biologico. Di fondamentale importanza è infatti la specificità dell’enzima nei confronti di singoli residui aminoacidici in specifiche “code” istoniche [Urnov and Wolffe, 2001]. Per

esempio, PCAF, coattivatore della trascrizione con attività acetiltrasferasica intrinseca, acetila preferenzialmente gli aminoacidi lisina in posizione 9 e 14 della "coda" amino-terminale dell'istone H3, mentre il complesso acetiltrasferasico NuA4 acetila preferenzialmente gli aminoacidi lisina 4, 8, 12 e 16 dell'istone H4 [Peterson and Laniel, 2004]. Attualmente si conoscono cinque famiglie di enzimi Istone acetilasi (HATs).

In passato era diffusa l'idea che l'acetilazione degli istoni fosse, di per sè, sufficiente per modificare le interazioni elettrostatiche tra proteine e DNA nell'ambito del nucleosoma, portando ad una struttura "aperta" della cromatina. Tuttavia, nella migliore delle ipotesi, la completa acetilazione dell'istone H3 porterebbe ad una diminuzione di circa il 10-30% della carica positiva totale ed è improbabile che tale evento influenzi le suddette interazioni [Peterson and Laniel, 2004].

Il principale ruolo dell'acetilazione degli istoni è, in realtà, quello di dirigere il legame di complessi proteici coattivatori della trascrizione, attraverso l'interazione con il bromodominio in essi contenuto ed in grado di riconoscere l'aminoacido lisina acetilato: tale legame porta ad un cambiamento di conformazione della cromatina con conseguente attivazione dell'espressione genica cellulare (Figura 10).

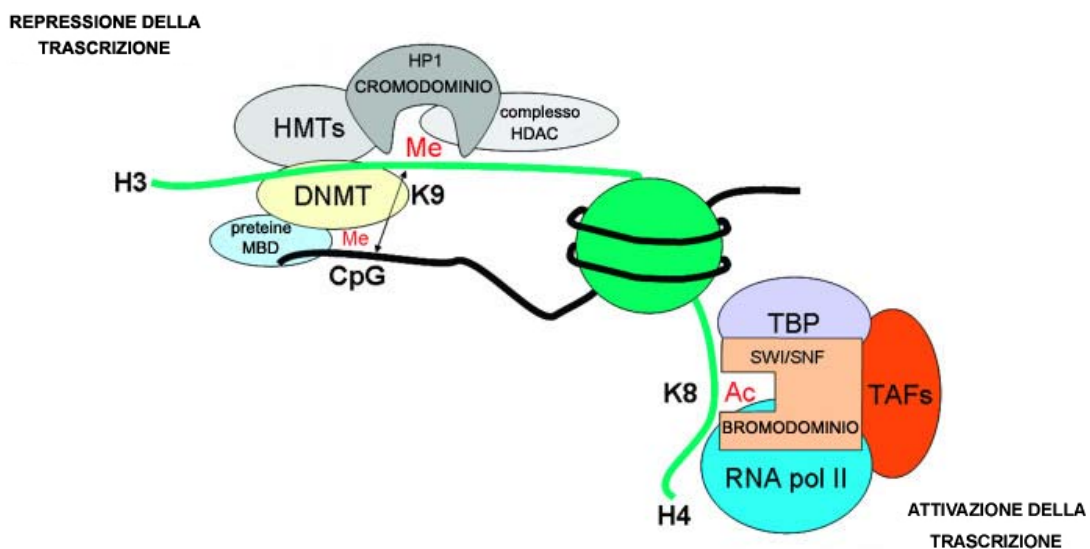


**Figura 10.** Meccanismi di rimodellamento della cromatina. Immagine modificata da ref.2 [www.respiratory-research.com](http://www.respiratory-research.com)

Le modificazioni delle proteine istoniche, operate dagli enzimi istone metilasi (HMTs), istone acetiltransferasi (HATs) e istone deacetilasi (HDACs), danno vita ad un codice che viene

“letto” da complessi proteici contenenti bromodomini o cromodomini, in grado di riconoscere gli aminoacidi lisina acetilati o metilati, rispettivamente. Queste interazioni portano ad un rimodellamento della cromatina attraverso un meccanismo ATP-dipendente, che consente l'apertura dei promotori ed il legame dei fattori della trascrizione. La deacetilazione, spesso seguita da metilazione degli istoni, rappresenta un evento fondamentale per la formazione di una struttura altamente repressa, come l'eterocromatina.

Ad esempio, l'acetilazione dell'aminoacido lisina 8 dell'istone H4 rappresenta un segnale di legame per il bromodominio localizzato nella subunità Brg1 dell'enzima SWI/SNF, che rimodella la cromatina mediante un meccanismo ATP-dipendente [Peterson and Lanier, 2004] (Figura 11).



**Figura 11.** Meccanismi epigenetici coinvolti nell'espressione genica. Immagine modificata da ref.2. [www.respiratory-research.com](http://www.respiratory-research.com)

Le modificazioni a carico degli istoni agiscono come marcatori necessari per l'interazione tra una precisa sequenza genica ed i complessi proteici coattivatori e corepressori della trascrizione contenenti rispettivamente un bromodominio (in grado di riconoscere i residui di lisina acetilata) o un cromodominio (in grado di riconoscere i residui di lisina metilata). Il legame del cromodominio di HP1 a residui lisinici metilati porta al reclutamento dell'enzima DNA metiltrasferasi (DNMTs) che metila il DNA. Tale modificazione richiama sia gli enzimi istone metiltrasferasi, sia gli enzimi istone deacetilasi (HDAC) e l'insieme di tutti questi eventi porta alla repressione dell'espressione genica. L'attivazione genica, al contrario, richiede il reclutamento di complessi di attivazione trascrizionale, quali "TATA binding protein" (BDT) ed i fattori ad essa associati (TAFs), fattori di rimodellamento della cromatina e l'RNA polimerasi II (RNA pol II).

L'acetilazione delle proteine istoniche è un processo reversibile e dinamico: la rimozione del gruppo acetile è operato dagli enzimi istone deacetilasi (HDACs).

Questi enzimi sono raggruppati in quattro classi: gli enzimi appartenenti alla classe I sono quelli più ampiamente espressi e risiedono stabilmente nel nucleo cellulare. La diversità degli enzimi HDACs, analogamente alle HATs, riflette la loro capacità di riconoscere specifici profili di acetilazione, con conseguente regolazione di determinati geni [Peterson, 2002]. Il meccanismo d'azione delle HDACs prevede l'interazione di tali enzimi con complessi proteici che reprimono la trascrizione, quali ad esempio il corepressore del recettore nucleare (NCoR), il corepressore ligando-dipendente (LCoR), il fattore di rimodellamento dei nucleosomi (NuRD): tali corepressori determinano la specificità delle HDACs, legandosi alle sequenze geniche che devono essere deacetilate [de Ruijter *et al.*, 2003].

La deacetilazione dell'aminoacido lisina è spesso seguita dalla metilazione degli stessi residui aminoacidici e/o di residui ad essi adiacenti. Questo evento porta alla formazione di una struttura cromatinica chiusa ovvero trascrizionalmente repressa (Figura 10).

La metilazione degli istoni coinvolge essenzialmente i residui di lisina (K) o arginina (R): i residui di lisina possono essere mono-, di- o tri-metilati, mentre l'aminoacido arginina può essere mono o dimetilato [Bannister and Kouzarides, 2005]. Attualmente, sono noti 17 residui di lisina e 7 residui di arginina soggetti a metilazione e ciò suggerisce l'esistenza di un cospicuo numero di combinazioni. In particolare le forme metilate dei residui lisinici 9, 27, e 79 dell'istone H3 e del residuo di lisina 20 dell'istone H4 sono associate all'eterocromatina.

Analogamente all'acetilazione, il meccanismo d'azione della metilazione degli istoni prevede che specifici residui lisinici metilati agiscano come "marcatori", in grado di indirizzare i complessi proteici coinvolti nella repressione della trascrizione: tali complessi possiedono un cromodominio in grado di riconoscere in modo specifico i residui di lisina metilati. Ad esempio, i residui di lisina 9 e 27 dell'istone H3 metilati sono riconosciuti dalla proteina HP1 (Figura 11) che porta ad una conformazione chiusa e quindi non trascrivibile della cromatina.

Una caratterizzazione estensiva dell'istone H3 ha dimostrato la presenza di varianti istoniche, ciascuna soggetta a specifici processi di modificazione post-trascrizionale. Da ciò è derivata l'ipotesi del "codice a barre" [Hake and Hallis, 2006], secondo la quale la presenza delle varianti istoniche in una data regione sarebbe indice dello stato trascrizionale della cromatina: nel caso dell'istone H3, ad esempio, la variante H3.3 indicherebbe la presenza di cromatina

trascrizionalmente attiva (eucromatina), la variante H3.1 di eterocromatina costitutiva e la variante H3.2 di eterocromatina facoltativa [Loyola and Almouzni, 2007].

#### 4. OBIETTIVI DELLA RICERCA

Il progetto di ricerca sviluppato durante i quattro anni di dottorato è basato sull'analisi dei possibili meccanismi che regolano l'espressione genica di citomegalovirus umano in corso di infezione litica o di infezione latente. Il dato di letteratura da cui si è partiti per affrontare questo studio è rappresentato dalla recente definizione delle sedi di latenza di citomegalovirus *in vivo*, rappresentate fondamentalmente da cellule progenitrici CD34+ della linea mieloide e da monociti del sangue periferico. In queste cellule sembra esistere una stretta correlazione tra riattivazione dallo stato di latenza e differenziamento cellulare: in particolare lo stadio post-mitotico che avvia il processo di differenziamento cellulare da monocita immaturo a macrofago, sembra in grado di influenzare in senso positivo l'espressione genica virale, portando all'infezione produttiva. Le differenti modalità di interazione tra HCMV e cellula ospite, cioè l'infezione latente o, alternativamente, litica, sembrano essere infatti il risultato dell'espressione selettiva e differenziata, nelle suddette condizioni, di geni virali e cellulari.

Nelle cellule eucariote il controllo dell'espressione genica è affidato a meccanismi di regolazione epigenetica che consistono in modificazioni post-replicative del genoma, quali la metilazione del DNA e l'acetilazione/metilazione delle proteine istoniche ad esso associate, in grado di modularne l'accessibilità da parte dell'apparato trascrizionale. In particolare la metilazione del DNA, a livello della base citosina, nell'ambito del dinucleotide CG, favorisce la formazione di complessi con proteine in grado di reclutare enzimi che deacetilano/metilano specifici residui aminoacidici localizzati nelle "code" aminoterminali delle proteine istoniche, portando alla formazione di cromatina trascrizionalmente repressa. Al contrario, l'acetilazione dei suddetti residui aminoacidici porta alla formazione di cromatina trascrizionalmente attiva. In particolare, è stato dimostrato che la metilazione dell'aminoacido lisina in posizione 9 (K9) dell'istone H3 contribuisce in modo significativo a creare un dominio cromatinico "chiuso", ossia inattivo, mentre l'acetilazione di H3-K9 dà luogo alla formazione di una struttura cromatinica "aperta". In altri termini, la metilazione/acetilazione dell'istone H3 a livello di K9 rappresenta un interruttore molecolare in grado di modulare la trascrizione di specifiche regioni di DNA.

E' inoltre noto che durante l'infezione il genoma di HCMV, così come quello di altri virus a DNA a replicazione nucleare, sia complessato con proteine istoniche ed

assuma un'organizzazione simil-nucleosomica, analogamente a quanto osservato per il genoma delle cellule eucariote. Quanto descritto avvalorava l'ipotesi secondo la quale HCMV potrebbe utilizzare almeno alcuni dei meccanismi (quali quelli epigenetici) messi in atto dalla cellula ospite per la regolazione dell'espressione genica.

Quanto brevemente esposto definisce sinteticamente i criteri di fattibilità e le linee guida del progetto svolto, rappresentati essenzialmente dagli aspetti innovativi di tale campo di indagini e dal fatto che, mentre esiste a tutt'oggi un bagaglio di conoscenze cospicue sull'organizzazione spaziale e funzionale del DNA e dei complessi molecolari ad esso associati in cellule non infettate, sono disponibili solo dati frammentari ed incompleti relativi alla definizione delle strategie adottate dai diversi virus per cooptare a proprio vantaggio domini e funzioni cellulari. L'approfondimento delle conoscenze relative a tali aspetti risulta particolarmente rilevante per un virus quale citomegalovirus che, analogamente agli altri virus erpetici, ha la capacità di stabilire diversi tipi di interazione con l'ospite, dando luogo, dopo un'infezione produttiva, ad una condizione di latenza, dalla quale può, periodicamente, riattivarsi.

Due sono gli obiettivi principali che ci si è prefissi di realizzare nell'ambito di questo progetto di ricerca:

- Il primo obiettivo è basato sull'allestimento di un modello cellulare per lo studio dell'infezione latente da citomegalovirus *in vitro* che ricalcasse, essenzialmente, le caratteristiche note delle cellule infettate latentemente *in vivo*.
- Il secondo obiettivo si è focalizzato sullo studio dei possibili meccanismi molecolari utilizzati da citomegalovirus per "silenziare" i propri geni, nell'ambito dell'infezione latente, verificando la possibilità che il virus sfrutti alcuni dei meccanismi principali utilizzati dalla cellula eucariota per reprimere/attivare la propria espressione genica, quali quelli epigenetici sopra riportati; in particolare, sono state applicate metodologie sperimentali volte a verificare:
  - a. l'associazione di specifici geni virali rappresentativi della diverse fasi del ciclo litico di HCMV all'istone H3, acetilato o dimetilato in posizione K9, in corso di infezione litica o latente;

b. la presenza di sequenze metilate a livello della regione “enhancer” dei geni precocissimi di HCMV.

## 5. MATERIALI E METODI

### Colture cellulari

- *MRC5: fibroblasti embrionali umani* (ATCC).

I monostrati di cellule MRC5 [Jacobs J.P. *et al.*, 1970] sono stati coltivati in terreno di coltura "Minimum Essential Medium" (MEM, Invitrogen), modificato con sali di Earle ed addizionato di siero fetale di vitello (10%), sodio piruvato (1%), amminoacidi non essenziali (1%), L-glutamina (1%) ed antibiotici (penicillina 10.000 unità/ml e streptomina 10.000 µg/ml).

- *THP-1: cellule monocitarie derivanti da leucemia umana acuta* (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna).

Le cellule THP-1 [Tsuchiya *et al.*, 1980] sono state mantenute in coltura in sospensione in terreno RPMI 1640 (Invitrogen) addizionato di siero fetale di vitello (10%), L-glutamina (1%), sodio piruvato (1%), antibiotici (penicillina 10.000 unità/ml e streptomina 10.000 µg/ml) e β-mercaptoetanololo (50 µM; Sigma-Aldrich). Il differenziamento cellulare è stato ottenuto mediante trattamento delle cellule con un estere del forbolo, il 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA) (Sigma-Aldrich), per 48 ore.

### Virus

Lo stipite virale scelto per l'infezione sperimentale dei due diversi tipi cellulari è rappresentato dal ceppo umano Towne di HCMV (ATCC VR-977), riprodotto in fibroblasti embrionali umani (MRC5) e titolato 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 (IEp72/IEp86) di citomegalovirus.

### Infezione di fibroblasti embrionali umani (MRC5) con il ceppo Towne di HCMV

Per l'infezione dei monostrati di cellule MRC5 è stato impiegato il ceppo Towne di HCMV alla molteplicità di infezione (m.o.i.) di 0,1 o, alternativamente di 1 ufp/cellula, dipendentemente dalla tipologia di esperimento. Le cellule sono state coltivate per 48 ore a bassa densità iniziale, fino al raggiungimento della semi-

confluenza. I monostrati cellulari sono stati fatti crescere su vetrino (provette con vetrino sul fondo: "shell vials"; Sterilin Ltd,UK) oppure in bottiglie per colture cellulari con superficie da 75 cm<sup>2</sup> o 175 cm<sup>2</sup> (BD - Falcon <sup>TM</sup>).

Dopo un lavaggio con MEM privo di siero fetale di vitello, le cellule sono state infettate con l'opportuna diluizione di sospensione virale, allestita in terreno (MEM) privo di siero ed incubate per 60 minuti a 37°C. Al termine dell'adsorbimento, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito con terreno di coltura addizionato di siero fetale di vitello al 10%. I monostrati infettati sono stati infine incubati per i tempi prestabiliti a 37°C.

### **Infezione di cellule THP-1 con il ceppo Towne di HCMV**

Per l'infezione di cellule THP-1 è stato impiegato il ceppo Towne di HCMV, utilizzando una m.o.i. di 1 ufp/cellula.

#### *- Infezione di cellule THP-1 differenziate - Modello di infezione litica*

Aliquote a concentrazione nota di cellule THP-1 sono state inoculate in provetta "shell-vial", oppure in piastra a 6 pozzetti (Corning) o in fiasca da 25 cm<sup>2</sup> (BD-Falcon <sup>TM</sup>), in presenza di TPA (80nM) per indurne il differenziamento. Le cellule sono state incubate per 48 ore a 37°C. Dopo un lavaggio con MEM privo di siero fetale di vitello i monostrati sono stati infettati con l'opportuna diluizione di sospensione virale, allestita in terreno (MEM) privo di siero e centrifugati a 1400 rpm (centrifuga ALC – 4233R ECT) per 45 minuti. Al termine della centrifugazione le cellule infettate sono state incubate a 37°C per un ulteriore periodo di 75 minuti (periodo di adsorbimento=2 ore). Al termine dell'adsorbimento, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito con RPMI 1640 addizionato di siero fetale di vitello al 10%. I monostrati infettati sono stati infine incubati a 37°C per i tempi prestabiliti.

#### *- Infezione di cellule THP-1 non differenziate – Modello di infezione latente.*

Aliquote a concentrazione nota di cellule THP-1 sono state centrifugate per 10 minuti a 1000 rpm (Centrifuga Heraeus Labofuge 6000) . Dopo un lavaggio con MEM privo di siero fetale di vitello, il sedimento cellulare è stato risospeso nell'opportuna diluizione di sospensione virale, allestita in terreno (MEM) privo di siero. La sospensione cellulare infettata è stata posta in piastra a 6 pozzetti, centrifugata per 45 minuti a 1400 rpm (centrifuga ALC–4233R ECT) e successivamente incubata a 37°C per 75 minuti. Al termine del periodo di

adsorbimento (2 ore) le cellule sono state sottoposte a due lavaggi successivi con terreno RPMI, addizionato di siero fetale di vitello al 10%, al fine di allontanare l'inoculo virale. Il sedimento cellulare è stato infine risospeso in terreno di mantenimento e trasferito in fiasca da 25 cm<sup>2</sup> o in piastra a 6 pozzetti ed incubato a 37°C per i tempi prestabiliti.

### **Allestimento di preparati di cellule THP-1 non differenziate per l'osservazione microscopica**

Aliquote a concentrazione nota di cellule THP-1, infettate con il ceppo Towne di HCMV a m.o.i.=1 per i tempi prestabiliti, sono state sottoposte a citocentrifugazione a 1000 rpm (Shandon Cytospin® Cyto centrifuge) per 5 minuti. Gli "spots" cellulari ottenuti su vetrino sono stati lasciati asciugare all'aria per 10 minuti e successivamente predisposti per la reazione di immunofluorescenza.

### **Anticorpi**

#### *- Immunofluorescenza indiretta*

Per lo studio in immunofluorescenza dell'espressione dei geni virali precocissimi di HCMV e per l'analisi della produzione di progenie virale infettante, è stato impiegato un anticorpo monoclonale (mAb; clone E13 - Argene) in grado di riconoscere le proteine virali IE (IEp72 – IEp86) di HCMV; tale anticorpo è stato utilizzato alla diluizione di 1:30 in sieroalbumina bovina (BSA) allo 0,2% in tampone salino fosfato [PBS: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM, pH 7,4; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,4; NaCl 135 mM; KCl 2,7 mM]. Per la rivelazione dell'anticorpo primario anti-proteine virali IE è stato utilizzato un anticorpo anti-IgG di tipo murino, coniugato con isotiocianato di tetrametilrodamina (TRITC) (EuroClone), diluito 1:100 in BSA allo 0,2% in PBS.

#### *- Immunoprecipitazione della cromatina*

L'immunoprecipitazione della cromatina (ChIP) è stata condotta utilizzando anticorpi policlonali di coniglio in grado di riconoscere l'istone H3 dimetilato in posizione K9 (H3 dimethyl-K9 – Abcam) o alternativamente l'istone H3 acetilato alla stessa posizione (H3 acethyl-K9 – Abcam).

### **Immunofluorescenza indiretta**

Per la reazione di immunofluorescenza, la linea cellulare THP-1, utilizzata come modello di infezione litica, o, alternativamente, latente, e le cellule MRC5 sono state sottoposte ad un delicato lavaggio in PBS e fissate in metanolo freddo per 10 minuti a -20°C. Dopo tre lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS, i siti immunoreattivi non specifici sono stati saturati con BSA all'1% in PBS per 15 minuti; le cellule sono state nuovamente lavate con PBS prima di deporre l'anticorpo primario anti-proteine virali IE.

Per favorire l'immunoreazione, le cellule sono state incubate per 1 ora a 37°C, in camera umida. Dopo tre lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS, i preparati cellulari sono stati incubati con lo specifico anticorpo secondario per 45 minuti a 37°C, in camera umida. Al termine del periodo di incubazione le cellule sono state lavate con PBS (tre lavaggi di 5 minuti ciascuno) e montate con liquido di montaggio (DakoCytomation). I preparati sono stati osservati mediante microscopio a fluorescenza (Leica DM LB).

### **Frazionamento delle cellule mediante lisi ipotonica**

Per ottenere la separazione dei nuclei dal citoplasma cellulare, le cellule THP-1 ed MRC5 infettate con HCMV (ceppo Towne) nelle condizioni descritte nei precedenti paragrafi, sono state raccolte e centrifugate a 1000 rpm (centrifuga Heraeus Labofuge 6000) per 10'. Dopo 3 lavaggi successivi in PBS i sedimenti cellulari sono stati risospesi in 8 volumi di tampone ipotonico di lisi TEK-M2 [TEA 10 mM; KCl 10 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; MnCl<sub>2</sub> 1 mM; β-mercaptoetanol 5 mM] e incubati in ghiaccio per un periodo pari a 4 minuti, durante il quale le cellule sono state sottoposte a rottura meccanica mediante "dounce" e osservazione microscopica per verificare lo stato di frazionamento cellulare. Al termine del periodo di incubazione è stata ripristinata l'isotonicità aggiungendo ai campioni una soluzione 2M di saccarosio in ragione di 1/7 del volume finale della sospensione cellulare (concentrazione finale di saccarosio: 0,25 M). I campioni sono stati quindi centrifugati a 4000 rpm (centrifuga Eppendorf 5415R) per 10 minuti a 4°C, al fine di separare nuclei (sedimento) e citoplasma.

## **Purificazione del DNA**

Il DNA è stato purificato utilizzando il sistema "Elute gene mammalian Kit" (Sigma-Aldrich), seguendo il protocollo della ditta produttrice. Questo metodo si basa sull'uso di colonne dotate di una membrana a matrice silicea che, in presenza di alte concentrazioni di sali, lega selettivamente il DNA presente nel campione, lasciando passare le restanti componenti attraverso la colonna. I campioni rappresentati da nuclei di cellule THP-1 ed MRC5 infettati con HCMV ceppo Towne nelle condizioni precedentemente descritte, sono stati risospesi in 200 µl di apposito tampone di risospensione. La lisi è stata ottenuta incubando i campioni a 70°C per 15 minuti in presenza di 20 µl proteinasi K e 200 µl di tampone di lisi, contenente sali caotropici. Al termine del periodo di incubazione, a ciascun campione sono stati aggiunti 200 µl di etanolo assoluto per favorire il legame del DNA alla membrana a matrice silicea presente nelle colonne per la purificazione dell'acido nucleico. I campioni sono stati quindi sottoposti a 2 lavaggi successivi con 500 µl di tampone di lavaggio, seguiti da centrifugazione per eliminare le tracce di sostanze contaminanti ed infine eluiti in 200 µl di tampone di eluizione a base di TRIS-HCl ed EDTA. L'acido nucleico purificato da ciascun campione è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica (lunghezza d'onda=260 nm) e conservato a -20°C.

## **Purificazione dell'RNA totale**

Per la purificazione dell'RNA totale è stato utilizzato il sistema "Nucleospin RNA II Kit" (Macherey-Nagel), seguendo il protocollo della ditta produttrice. Analogamente al sistema utilizzato per l'estrazione del DNA da cellule/nuclei cellulari, anche questo metodo si basa sull'uso di colonne dotate di membrana a matrice silicea che, in presenza di alte concentrazioni di sali, lega selettivamente l'RNA. I campioni costituiti da frazioni cellulari o cellule THP-1 e/o MRC5 infettate con il ceppo virale Towne di HCMV nelle condizioni descritte nei precedenti paragrafi, sono stati risospesi in 350 µl di tampone di lisi RA1 (questo passaggio è stato omesso nel caso di purificazione di RNA da frazioni citoplasmatiche) in presenza di 3,5 µl di β-mercaptoetanololo. I campioni sono stati successivamente filtrati per ridurre la viscosità, addizionati di 350 µl di etanolo al 70%, trasferiti in una colonna per la purificazione dell'acido nucleico fornita dal sistema e centrifugati per favorire il legame tra acido nucleico e membrana a matrice silicea. Dopo

un'incubazione di 15 minuti a temperatura ambiente con 90 µl di DNAsi per rimuovere ogni traccia di DNA contaminante, i campioni sono stati sottoposti ad un primo lavaggio utilizzando 200 µl di tampone RAll, seguito da due ulteriori lavaggi con 600 µl e 250 µl di tampone RA III. Infine, i campioni sono stati eluiti in 60 µl di acqua ultrapura priva di RNAsi. L'acido nucleico purificato da ciascun campione è stato quantificato mediante lettura spettrofotometrica (lunghezza d'onda=260 nm) e conservato a -20°C.

### **Retrotrascrizione**

La reazione di retrotrascrizione dell'RNA totale è stata condotta utilizzando il sistema "AMV first-strand cDNA Synthesis Kit" (Invitrogen) seguendo il protocollo della ditta produttrice. Ciascun campione di RNA da retrotrascrivere è stato trasferito in provetta da PCR in presenza di acqua trattata con dietilpirocarbonato (DEPC), dNTP 10 mM e "primers" oligo(dT) o "random primers". Dopo una denaturazione iniziale a 65°C per 5 minuti, seguita da incubazione in ghiaccio, a ciascun campione sono stati aggiunti il tampone di reazione (5x), ditiotreitolo 0,1 M, acqua trattata con DEPC e l'enzima trascrittasi inversa in ragione di 15 unità/µl. La reazione di retrotrascrizione è stata condotta a 50°C per 60 minuti e, nel caso in cui siano stati utilizzati "random primers", è stata preceduta da una incubazione a 25°C per 10 minuti. Al termine del periodo di incubazione, i campioni sono stati sottoposti ad un ciclo di riscaldamento a 85°C per 5 minuti per inattivare l'enzima. Il cDNA ottenuto è stato utilizzato per le successive reazioni di PCR.

### **Amplificazione mediante PCR**

Aliquote di DNA o di cDNA, ottenute come descritto nei paragrafi precedenti, sono state sottoposte ad amplificazione utilizzando le coppie di "primers" riportate in Tabella 1. Ciascuna reazione di PCR è stata condotta aggiungendo 5µl di DNA o 2µl di cDNA a 45/48 µl di miscela di reazione ["dNTP mix" 0,2 mM (Fermentas); "GoTaq DNA polimerase buffer" 1x; "GoTaq DNA polimerase" 2,5U (Promega); "primers" 1 µM; H<sub>2</sub>O]. Dopo una denaturazione iniziale di 2 minuti a 94°C, i campioni sono stati sottoposti ad una serie di cicli di denaturazione (94°C per 30 secondi), appaiamento dei "primers" ("temperatura di annealing" per 30

secondi) ed estensione dell'amplificato (72°C per 30 secondi), per un numero di cicli variabile in relazione all'esperimento.

I prodotti di amplificazione sono stati rivelati mediante migrazione elettroforetica in gel d'agarosio all'1,5%, in tampone TAE 1X (Tris-acidoacetico-EDTA) addizionato di bromuro di etidio.

### **Immunoprecipitazione della cromatina (ChIP)**

Questa metodologia permette di precipitare frammenti di DNA associato a proteine utilizzando specifici anticorpi in grado di riconoscere la proteina stessa. Il protocollo sperimentale prevede le seguenti fasi: 1 – la fissazione delle proteine istoniche al DNA mediante l'uso di formaldeide; 2 – la rottura del DNA in frammenti di piccole dimensioni (da 500 a 2000 pb) mediante sonicazione; 3 – l'immunoprecipitazione dei complessi DNA – proteine istoniche mediante l'utilizzo di anticorpi specifici in grado di riconoscere le suddette proteine; 4 – la separazione dei frammenti di DNA immunoprecipitati dalle proteine istoniche ad essi associate e la digestione delle proteine stesse; 5 – la purificazione dei frammenti di DNA da sottoporre a successiva PCR.

I campioni, rappresentati da  $5 \times 10^7$  cellule THP-1 differenziate e non differenziate (modelli idonei per infezione litica e latente, rispettivamente) ed infettate con HCMV ceppo Towne nelle condizioni descritte nei precedenti paragrafi, sono stati raccolti, lavati 2 volte in PBS e centrifugati a 1000 rpm (centrifuga Heraeus Labofuge 6000) per 10 minuti a temperatura ambiente. I sedimenti cellulari corrispondenti ai due modelli, sono stati risospesi in 10 ml di PBS, addizionati di 1ml di tampone di fissazione [NaCl 0,1 M; EDTA 1 mM pH=8; EGTA 0,5 mM pH=8; Hepes 50 mM; H<sub>2</sub>O; Formaldeide 11%] ed incubati per 10 minuti a temperatura ambiente al fine di favorire la reazione di fissazione delle proteine al DNA. Al termine del periodo di incubazione, la reazione di fissazione è stata bloccata incubando le due sospensioni in ghiaccio per 5 minuti in presenza di 750 µl di glicina 2,5 M. I sedimenti cellulari ottenuti mediante centrifugazione a 1500 rpm (centrifuga Beckman J6 MC) per 10 minuti a 4°C, sono stati lavati 2 volte con PBS freddo e successivamente risospesi in 1 ml di tampone di lisi [SDS 1%; EDTA 5 mM; Tris-HCl 50 mM pH=8; set di inibitori delle proteasi (1 compressa/10ml; Roche); set di inibitori delle fosfatasi diluito 1:100 (Calbiochem); sodio butirato 10 mM]. Dopo 36 cicli di sonicazione (1 ciclo= 20 secondi ad una potenza del 20%) mediante sonicatore

Sonopuls HD 2070 (Bandelin), le sospensioni sono state centrifugate a 10000 rpm (centrifuga Eppendorf 5415R) per 10 minuti a 4°C ed i due soprannatanti sono stati trasferiti, in ragione di 500 µl l'uno, in nuove provette: **I)** 50µl di ciascun soprannatante (frazione "input" contenente tutti i frammenti di DNA derivati dalla sonicazione) sono stati prelevati e congelati a -20°C; **II)** 10µl di ciascuna frazione "input" sono stati utilizzati per determinare l'idoneità del grado di frammentazione mediante corsa elettroforetica in gel d'agarosio all'1% in tampone TAE addizionato di bromuro di etidio; **III)** il soprannatante rimanente (circa 450 µl/campione) per ognuno dei due campioni, è stato diluito in rapporto di 1:10 in tampone di diluizione [Triton-X100 1%; EDTA 2 mM pH=8; Tris-HCl 20 mM pH=8; NaCl 150 mM; set di inibitori delle proteasi (1 compressa/10ml); set di inibitori delle fosfatasi diluito 1:100; sodio butirato 10 mM] e successivamente suddiviso in 3 aliquote: a ciascuna aliquota di cromatina (circa 1 ml) sono stati aggiunti 50 µl di siero preimmune di topo (Sigma-Aldrich) e 50 µl di proteina "A/G sepharose" (Santa Cruz Biotechnology) per eliminare componenti aspecifiche eventualmente presenti nei due campioni. Dopo un'incubazione di 2 ore a 4°C in agitazione, tutte le sospensioni sono state centrifugate a 2000 rpm (centrifuga Eppendorf 5415R) per 5 minuti a 4°C per rimuovere la proteina "A/G sepharose". Ai sei soprannatanti (tre per ognuno dei due campioni) ottenuti in questa fase sono stati aggiunti, rispettivamente: anticorpi specifici in grado di riconoscere l'istone H3 acetilato, anticorpi specifici in grado di riconoscere l'istone H3 dimetilato in posizione K9 [concentrazione finale = 5 µg/ml] e 10 mg/ml di "Salmon Sperm DNA", siero preimmune di topo (controllo). I campioni sono stati quindi incubati a 4°C per 24 ore in agitazione. Il giorno successivo, a ciascun campione sono stati aggiunti 20µl di proteina "A/G sepharose". Al termine del periodo di incubazione (30 minuti a 4°C in agitazione), gli immunocomplessi DNA-istone-anticorpo specifico (o DNA-istone-siero pre-immune) presenti in ciascun campione, legati alla proteina "A/G sepharose", sono stati sedimentati mediante centrifugate a 2000 rpm (centrifuga Eppendorf 5415R) per 5 minuti e sottoposti a lavaggio (5 minuti/lavaggio) con i seguenti tamponi: **tampone I** [SDS 0,1%; Triton X-100 1%; EDTA 2 mM pH=8; NaCl 150 mM; Tris-HCl 20 mM pH=8; set di inibitori delle proteasi (1 compressa/10ml); set di inibitori delle fosfatasi diluito 1:100; sodio butirato 10 mM], **tampone II** [SDS 0,1%; Triton X-100 1%; EDTA 2 mM pH=8; NaCl 500 mM; Tris-HCl 20 mM pH=8; set di inibitori delle proteasi (1 compressa/10ml); set di inibitori

delle fosfatasi diluito 1:100; sodio butirrato 10 mM], **tampone III** [LiCl 0,25 M; NP-40 1%; Sodio Desossicolato 1%; EDTA 1 mM pH=8; Tris-HCl 10 mM pH=8; set di inibitori delle proteasi (1 compressa/10ml); set di inibitori delle fosfatasi diluito 1:100; sodio butirrato 10 mM]. Infine sono stati eseguiti 3 lavaggi (2 minuti/lavaggio) con tampone TE [Tris-HCl 10 mM pH=8; EDTA 1 mM pH=8; con aggiunta di un set di inibitori delle proteasi (1 compressa/10ml); un set di inibitori delle fosfatasi diluito 1:100; sodio butirrato 10 mM]. Ad ogni lavaggio, gli immunocomplessi legati alla proteina "A/G sepharose" sono stati sedimentati mediante centrifugazione a 2000 rpm (centrifuga Eppendorf 5415R) per 2 minuti e, al termine dei lavaggi, ad ogni sedimento ottenuto sono stati aggiunti 150 µl di soluzione di recupero [SDS 1%; NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M]. Dopo incubazione per 20 minuti in agitazione, i campioni sono stati centrifugati a 2000 rpm (centrifuga Eppendorf 5415R) a temperatura ambiente per 5 minuti ed i sopranatanti (contenenti gli immunocomplessi DNA-istone-anticorpo specifico, o DNA-istone-siero pre-immune), sono stati trasferiti in nuove provette. Parallelamente, la soluzione di recupero è stata aggiunta alla frazione "input" congelata a -20°C. Ad ogni sopranatante è stata addizionata proteinasi K (0,2 µg/µl) e le miscele sono state incubate a 65°C per 16-24 ore per favorire la separazione dei frammenti di DNA dalle proteine istoniche formanti gli immunocomplessi.

*- Purificazione dei frammenti di DNA immunoprecipitati*

Per la purificazione dei frammenti di DNA immunoprecipitati è stato utilizzato il sistema "QIAquick PCR purification Kit" (Qiagen) che, analogamente ai sistemi di purificazione degli acidi nucleici descritti nei precedenti paragrafi, si basa sull'uso di colonne dotate di una membrana a matrice silicea che, in presenza di alte concentrazioni di sali, lega selettivamente il DNA presente nel campione. Dopo aver aggiunto 5 volumi di tampone PB I (contenente guanidina idrocloruro e isopropanolo) ad 1 volume di ciascun campione, le miscele sono state trasferite nelle colonne per la purificazione di frammenti di DNA, fornite dal sistema. I campioni sono stati quindi centrifugati per 1 minuto a 13000 rpm (centrifuga Eppendorf 5415R) e successivamente sottoposti ad un lavaggio con 750 µl di tampone PE (contenente etanolo). I frammenti di DNA sono stati infine eluiti da ciascun campione aggiungendo 50 µl di acqua ultrapura al centro della colonna e centrifugando, dopo 1 minuto di incubazione a temperatura ambiente, a 13000 rpm (centrifuga Eppendorf 5415R).

### *-Amplificazione mediante PCR dei frammenti immunoprecipitati*

L'amplificazione dei frammenti di DNA immunoprecipitati è stata condotta aggiungendo 5 µl di campione a 15µl di miscela di amplificazione ["dNTP mix" 0,2 mM, <sup>32</sup>P α-dCTP 10 mCi/ml (Amersham Biosciences), "GoTaq DNA polimerase buffer" 5X, "GoTaq DNA polimerase" 2,5 U, "primers" 1 µM (Tabella 1), H<sub>2</sub>O]. Dopo una denaturazione iniziale di 2 minuti a 94°C, i campioni sono stati sottoposti a 35 cicli di denaturazione (30 secondi a 94°C), appaiamento dei "primers" ("temperatura annealing" per 30 secondi) ed estensione dell'amplificato (30 secondi a 72°C). I prodotti di amplificazione sono stati rivelati mediante migrazione elettroforetica in gel d'agarosio al 2% in tampone TAE addizionato di bromuro di etidio. Dopo disidratazione mediante "gel Drying system" i gel essiccati montati su carta Watman 3MM (Amersham Biosciences) e protetti con pellicola, sono stati messi a contatto con una lastra autoradiografica (Hyperfilm, Amersham Biosciences) in una cassetta contenente uno schermo intensificatore. Le lastre sono state incubate a -70°C per 45 minuti e quindi sviluppate. I gel sono stati successivamente esposti anche per tempi più brevi (15 minuti), al fine di ottimizzare l'intensità del segnale e consentire una migliore interpretazione dei risultati ottenuti.

### **Analisi quantitativa dei dati ottenuti mediante immunoprecipitazione della cromatina.**

I gel con i prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando come DNA stampo i frammenti isolati mediante ChIP, sono stati sottoposti ad analisi digitale mediante scannerizzazione e l'intensità del segnale è stata determinata utilizzando il software "TotalLab" (Nonlinear USA Inc.). Il valore più alto di intensità del segnale è stato assunto come 100% e gli altri risultati sono stati normalizzati di conseguenza.

### **Modificazione del DNA mediante "CpG genome modification kit".**

Il sistema "CpG genome modification kit" (Chemicon International) permette di determinare l'eventuale stato di metilazione della base citosina nell'ambito del dinucleotide CG in una sequenza di DNA, sfruttando la capacità del bisolfito di sodio di convertire tutte le basi citosina non metilate in uracile, mentre le basi citosina metilate rimangono tali. Il sistema prevede inoltre la successiva

amplificazione dei campioni sottoposti a trattamento con bisolfito di sodio con coppie di "primers" specifiche per il DNA modificato che permettano di discriminare la presenza nei suddetti campioni di sequenze metilate. In particolare, è prevista l'amplificazione con 4 coppie di "primers" (Tabella 2): due coppie definite "U" ("Unmethylated") ed "M" ("Methylated") disegnate sulla sequenza di interesse modificata con bisolfito di sodio, nell'ipotesi che questa sia non metilata o metilata rispettivamente; una coppia definita "W" ("Wild-type"), che permetta di distinguere il DNA originale da quello modificato; una coppia definita "Cmod" (controllo di modificazione), che permetta di verificare la presenza di DNA modificato nel campione sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio.

Questo metodo è stato applicato ad 1 µg di DNA purificato da nuclei di cellule THP-1 differenziate e non differenziate e da nuclei cellule MRC5, previa infezione con HCMV ceppo Towne secondo le modalità riportate nei paragrafi precedenti. I campioni da sottoporre a modificazione sono stati risospesi in 93 µl di acqua, addizionati di 7 µl di NaOH 3M ed incubati a 50°C per 10 minuti per favorire l'apertura della doppia elica del DNA (solo il DNA a singola elica viene modificato). Dopo aver aggiunto a ciascun campione 550 µl di reagente di modificazione I, si procede ad una ulteriore incubazione a 50°C per 4-16 ore. Al termine del periodo di incubazione 5 µl di reagente di modificazione III e 750 µl di reagente di modificazione II sono stati addizionati ai campioni. Dopo 10 minuti di incubazione a temperatura ambiente, i campioni sono stati centrifugati a 7500 rpm (centrifuga Eppendorf 5415R). Il sedimento (di colore bianco) al fondo di ciascuna provetta, rappresentato da DNA legato al reagente III, è stato lavato 3 volte in EtOH al 70%, risospeso in 50 µl di una soluzione 20 mM NaOH/EtOH 90% ed incubato per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo 2 lavaggi con EtOH al 90%, ogni sedimento di DNA è stato risospeso in TE [10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,5] ed incubato a 50-60°C per 15 minuti per favorire l'eluizione dell'acido nucleico dal reagente III. Al termine del periodo di incubazione, i campioni sono stati centrifugati a velocità massima e i sopranatanti contenenti il DNA modificato sono stati trasferiti in una nuova provetta e conservati a -20°C fino al momento dell'uso.

**Tabella 1. Coppie di "primers" per l'amplificazione di geni cellulari e di geni di HCMV.**

"Primers"	Sequenza nucleotidica	Temperatura di "annealing"	Dimensioni prodotto
GAPDH (cellulare) "F" GAPDH (cellulare) "R"	5'- AAG GCT GTG GGC AAG GTC AT - 3' 5'- GAG GAG TGG GTG TCG CTG TT - 3'	56 °C	236 pb
Lattoferrina (cellulare) "F" Lattoferrina (cellulare) "R"	5'- AGG CAG AGG AGA AAG AGG GC - 3' 5'- CAT CAA GGG TCA CAG CAT CG - 3'	56°C	267 pb
IACT - 1 "F" IACT- 1 "R"	5'-GCCCTTCTCACTGGTTC-3' 5'-GTGCGCCTACTTTAATACAC-3'	44.5 °C	242 pb
HCMV IE "Enhancer" "F" HCMV IE "Enhancer" "R"	5'- TGA GTC AAA CCG CTA TCC AC - 3' 5'- TTC CCA TAG TAA CGC CAA TA - 3'	53 °C	275 pb
HCMV IE1 "F" HCMV IE1 "R"	5'- TAA GAC ATA GCA GCA CAG CA - 3' 5'- AAG AAC TCA GCC TTC CCT AA - 3'	56 °C	303 pb
HCMV IE2 "F" HCMV IE2 "R"	5'- ATA CTG GGA ATC GTG AAG GG- 3' 5'- AGT CCG AGG AGA TGA AAT GC - 3'	58 °C	343 pb
HCMV DNA pol. (UL54) "F" HCMV DNA pol. (UL54) "R"	5'- GAC AGT AAC GGC CTA CCT GG - 3' 5'- CCT CGG CTT CTC ACA ACA AT- 3'	55 °C	237 pb
HCMV pp65 (UL83) "F" HCMV pp65 (UL83) "R"	5'- CCC TGA ACC GTA GCC ACC AT - 3' 5'- CCG CAA ACG CAA ATC AGC AT- 3'	59 °C	213 pb
HCMV pp150 (UL32) "F" HCMV pp150 (UL32) "R"	5'- TCTCGGTATCCGTGATGTCC- 3' 5'- GGCTTTCAGTCTCGTCTCCC- 3'	57 °C	206 pb
HCMV LA 1 "F" HCMV LA 1 "R"	5' - TGT TACGACATTTGGAAAG- 3' 5' - AGTACATGACCT TATGGGAC- 3'	56 °C	206 pb
HCMV LA 2 "F" HCMV LA 2 "R"	5' - TGTTACGACATTTGGAAAG- 3' 5' - TGTTACGACATTTGGAAAG - 3'	58 °C	501 pb
HCMV ANTI-CLT "F" HCMV ANTI-CLT "R"	5'-ACTCATGGTCGCTCGGCAGCTCCTTGCTC-3' 5'-AAATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGG-3'	70 °C	469 pb

**Tabella 2. Coppie di "primers" per l'amplificazione di geni di HCMV a partire da DNA sottoposto a modificazione con bisolfito di sodio.**

	"Primers"	Sequenza	Temperatura di "annealing"	Dimensione prodotto
W*	HCMV IE "Enhancer" "F" HCMV IE "Enhancer" "R"	5'-TGAGTCAAACCGCTATCCAC- 3' 5'-TTCCCATAGTAACGCCAATA- 3'	53 °C	238 pb
M#1	Enhlow A "F" Enhlow A "R"	5'-GTTGGTATATGGTAATG- 3' 5'-ACACTTAATATACTACC- 3'	42 °C	421 pb
M#2	Enhlow B "F" Enhlow B "R"	5'-GGGTGGAGTATTACGG- 3' 5'-CACTAAACAAACTCTAC- 3'	46 °C	394 pb
U°1	Enhupp A "F" Enhupp A "R"	5'-TATGGAGGT TAAAATAG- 3' 5'- CCCATATATAAAAATCC - 3'	42 °C	583 pb
U°2	Enhupp B "F" Enhupp B "R"	5'-GATGATTAATATGTAGATG- 3' 5'-CTAACACATAACCAATAC- 3'	42 °C	542 pb
Cmod	Controllo di Mod. "F" Controllo di Mod. "R"	5'-GAGGTTGGATTGGTTT- 3' 5'-ACAAAAATTCCAAATC- 3'	40 °C	238 pb

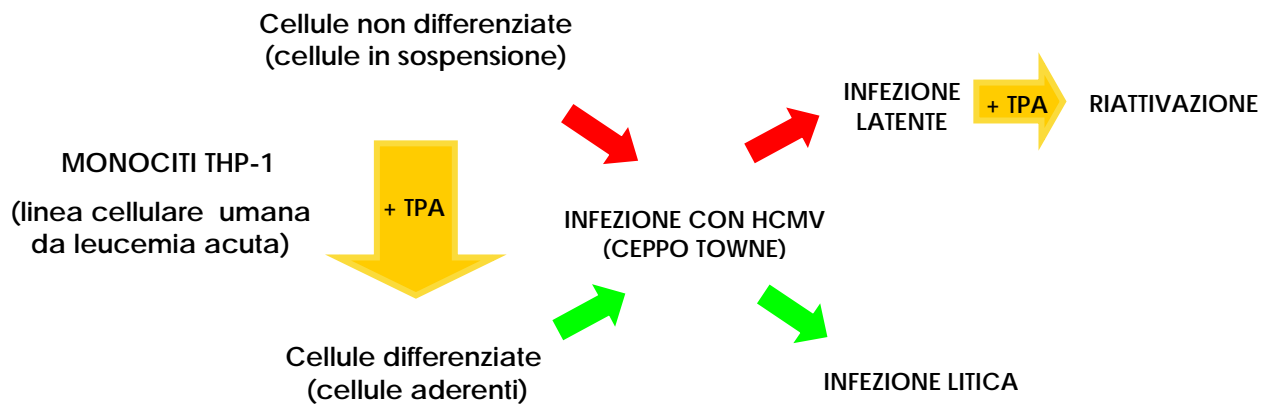
## 6. RISULTATI

In questa sezione vengono descritti i risultati relativi allo studio dei meccanismi di regolazione dell'espressione genica di citomegalovirus in corso di infezione litica o latente in un modello sperimentale "*in vitro*". Il dato di letteratura su cui si è basata la scelta del suddetto modello riguarda l'identificazione dei monociti del sangue periferico e dei loro progenitori CD34+ come sedi di latenza e disseminazione virale. Come già accennato nelle precedenti sezioni, in queste cellule la riattivazione del virus dalla latenza sembra essere profondamente correlata al grado di differenziamento cellulare. Solo una volta completato il differenziamento, con transizione da monocita a macrofago, il livello di espressione del genoma di HCMV diventerebbe rilevante, con produzione di progenie virale.

### 6.1 IL MODELLO SPERIMENTALE

Il modello sperimentale allestito per lo studio in oggetto è rappresentato dal ceppo Towne di citomegalovirus umano e da cellule monocitarie THP-1. Tali cellule, derivate da leucemia mieloide acuta, non sono permissive nei confronti dell'infezione da HCMV. Il blocco alla permissività viene superato in seguito a differenziamento cellulare da monocita immaturo a macrofago, indotto dal trattamento delle cellule con un estere del forbolo, il 2-O-tetradecanoilforbolo 13-acetato (TPA) (Figura 12). La presenza dell'estere del forbolo non è necessaria per il mantenimento dello stato di differenziamento, come appare dal confronto tra cellule sottoposte a più giorni di trattamento e cellule trattate per 18-24 ore (dati non mostrati).

Questo processo mimerebbe, essenzialmente, quanto accade *in vivo* durante il passaggio dall'infezione latente a quella produttiva.



**Figura 12.** Rappresentazione schematica del modello sperimentale scelto per lo studio dei meccanismi che regolano l'espressione genica in corso di infezione latente da citomegalovirus. Cellule THP-1 non differenziate sono state mantenute in coltura in sospensione. Il trattamento con TPA provoca l'adesione delle cellule a substrati di vetro e/o plastica ed innesca il processo di differenziamento che porta ad un blocco della proliferazione cellulare, oltre a modificazioni della morfologia della cellula stessa.

## 6.2 CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO SPERIMENTALE

6.2.1) ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI PROTEINE PRECOCISSIME DI HCMV E DELLA PRESENZA DI PROGENIE VIRALE IN CELLULE THP-1 DIFFERENZIATE (MODELLO DI INFEZIONE LITICA) E NON DIFFERENZIATE (MODELLO DI INFEZIONE LATENTE).

### A - Analisi del profilo di espressione della proteina IEp72

Per verificare l'idoneità del modello virus-cellula scelto è stato dapprima analizzato il profilo di espressione delle proteine virali precocissime IEp72 e IEp86 in cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica) a confronto con cellule MRC5, ed in cellule THP-1 non differenziate (modello di infezione latente). Per indurre il processo di differenziamento, aliquote a concentrazione nota di cellule THP-1 sono state coltivate in provetta "shell-vial", in presenza di TPA (80 nM) per 48 ore. Al termine di questo periodo, le cellule sono state inoculate con HCMV Towne a molteplicità di infezione di 1 ufp/cellula (m.o.i.=1), centrifugate a 1400 rpm per 45 minuti al fine di favorire il contatto tra virus e cellula, ed incubate per 1 ora e 15 minuti a 37°C (periodo di adsorbimento = 2 ore). Parallelamente, monostrati di fibroblasti embrionali umani MRC5 (modello per eccellenza di infezione litica) cresciuti in "shell-vial" sono stati infettati con HCMV ceppo Towne a m.o.i.=0,1. Al termine del periodo di adsorbimento, l'inoculo è stato allontanato e sostituito con

terreno di mantenimento. I monostrati di cellule THP-1 ed MRC5 sono stati incubati a 37°C per i tempi prestabiliti.

Dal momento che le cellule THP-1 non differenziate (contrariamente a quelle differenziate) crescono in sospensione, la procedura sperimentale adottata in questo caso è stata parzialmente modificata. In particolare, aliquote a concentrazione nota di cellule THP-1 non differenziate sono state centrifugate ed il sedimento cellulare è stato risospeso nell'inoculo virale a molteplicità di infezione di 1 ufp/cellula. La sospensione cellulare è stata quindi distribuita in piastra a 6 pozzetti in ragione di  $3 \times 10^6$  cellule/pozzetto, centrifugata a 1400 rpm per 45 minuti ed incubata a 37°C per 1 ora e 15 minuti. Al termine del periodo di adsorbimento le cellule sono state sottoposte a due lavaggi successivi per allontanare l'inoculo virale ed il sedimento cellulare è stato risospeso in terreno di mantenimento, trasferito in fiasca da 25 cm<sup>2</sup> ed incubato a 37°C. Ai tempi prestabiliti, aliquote a concentrazione nota di cellule (circa  $2 \times 10^5$  cellule) sono state prelevate ed utilizzate per l'allestimento di "spots" cellulari. Tutti i preparati sono stati fissati in metanolo freddo e sottoposti ad immunoreazione con un anticorpo monoclonale in grado di riconoscere un epitopo comune alle 2 proteine precocissime maggiori di HCMV: IEp72 e IEp86.

In Tabella 3 sono riportati i valori medi dei risultati ottenuti in due distinti esperimenti di infezione, nelle condizioni sopra descritte. In cellule THP-1 differenziate e successivamente infettate (modello di infezione litica) è stata rilevata una percentuale di positività per IEp72/IEp86 pari al 30% dopo 24 ore di infezione. Tale percentuale è visibilmente inferiore a quella ottenuta in cellule MRC5 infettate a m.o.i.=10 volte inferiore, e non sembra subire aumenti rilevanti dopo 48-72 ore di infezione.

Al contrario, i dati riportati in Tabella 3 relativamente a cellule THP-1 non differenziate ed infettate (modello di infezione latente) mostrano come la percentuale di positività dopo 24 ore di infezione sia verosimilmente trascurabile (0,045% di cellule positive); è possibile che tale positività sia dovuta ad un esiguo numero di cellule che si differenziano spontaneamente e che diventano pertanto permissive all'infezione virale.

**Tabella 3.** Profilo di espressione delle proteine virali IEp72/IEp86 di HCMV (ceppo Towne) in cellule THP-1 differenziate prima dell'infezione (modello di infezione litica) e non differenziate (modello di infezione latente), a confronto con cellule MRC5.

Ore p.i.	Cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica)	Cellule THP-1 non differenziate (modello di infezione latente)	MRC5
	m.o.i.=1	m.o.i.=1	m.o.i.=0,1
24h p.i.	30%	0,045%	100%
48h p.i.	40%	0,04%	100%
72h p.i.	40%	0,038%	monostrato distrutto

#### B - Analisi della produzione di progenie virale

I dati relativi all'analisi della progenie virale nell'ambito dei modelli sperimentali prescelti sono riportati in Tabella 4, in cui appaiono i valori medi dei risultati ottenuti in due distinti esperimenti. Cellule THP-1 coltivate in fiasca da 25 cm<sup>2</sup> in presenza di TPA (80 nM) per 48 ore sono state infettate con HCMV Towne (modello di infezione litica), come descritto nel paragrafo precedente. Parallelamente, anche cellule THP-1 non differenziate sono state infettate (modello di infezione latente) e mantenute in coltura in fiasca da 25 cm<sup>2</sup>. La presenza e la valutazione quantitativa della progenie virale sono state determinate prelevando sistematicamente il soprannatante dalle suddette colture ai tempi indicati in Tabella 4 ed utilizzandolo per infettare monostrati di fibroblasti embrionali umani MRC5, previa centrifugazione a 1400 rpm per 10 minuti, ripetuta due volte. La presenza di virus infettante nelle aliquote di soprannatante è stata poi stabilita attraverso l'analisi dell'espressione dei prodotti dei geni precocissimi IE1 e IE2 (proteine IEp72/IEp86) mediante reazione di immunofluorescenza. In cellule THP-1 differenziate sono stati riscontrati valori di positività irrilevanti per IEp72 e IEp86 nel periodo compreso tra il primo ed il quarto giorno dopo l'inizio dell'infezione. Questo risultato rende plausibile l'ipotesi che tale percentuale di positività sia imputabile a virus infettante eventualmente rimasto ancorato alle cellule ma non internalizzato, piuttosto che a progenie virale neo-prodotta. I dati rilevati invece a partire dal quinto/sesto giorno dopo l'inizio dell'infezione, in continuo aumento fino al nono giorno, sembrano supportare una attiva produzione di progenie virale da parte di cellule THP-1

differenziate. Al contrario, in cellule THP-1 infettate e non differenziate non è stato rilevato alcun valore significativo relativo alla produzione di progenie virale nell'ambito dei tempi di infezione considerati.

**Tabella 4.** Cinetica di inattivazione – produzione di virus infettante in cellule THP-1 differenziate o non differenziate ed infettate con lo stipite Towne di HCMV.

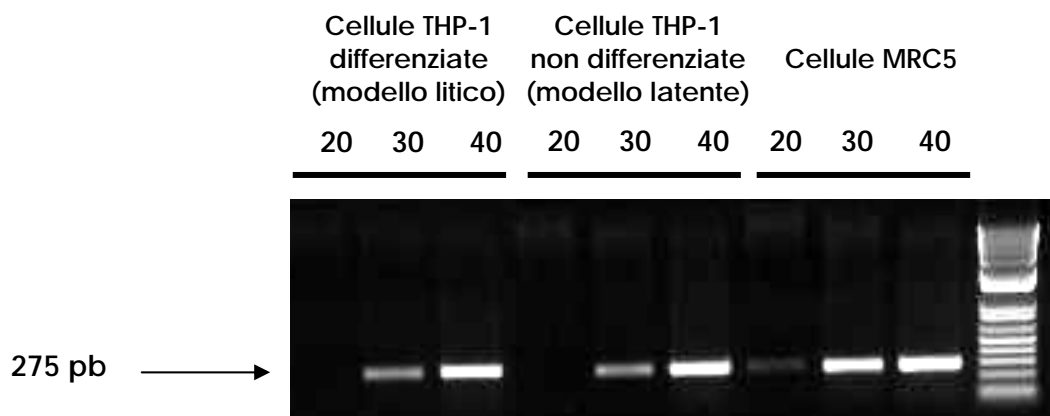
giorni p.i	THP-1 differenziate (modello di infezione litica)	THP-1 non differenziate (modello di infezione latente)
1	0.083	0.14
2	0.055	0.051
3	0.045	0.018
4	1.15	0.007
5	4.54	Non rilevabile
6	10.73	“
7	19.40	“
8	26.16	“
9	22.85	“

#### 6.2.2 ANALISI MOLECOLARE DEL MODELLO SPERIMENTALE

A - Analisi comparativa del contenuto di DNA virale presente nei nuclei di cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica) e non differenziate (modello di infezione latente)

Il tipo di analisi descritto nei precedenti paragrafi non dà informazioni conclusive sul numero di cellule infettate latentemente da HCMV e che albergano quindi il DNA virale nel loro nucleo. Per determinare il numero di cellule infettate latentemente da HCMV, è stata effettuata un'analisi comparativa del contenuto di DNA virale presente nei nuclei di cellule THP-1 utilizzate come modello litico o come modello di latenza. Allo scopo, il DNA, purificato da un uguale numero di nuclei di cellule THP-1 differenziate o, alternativamente, non differenziate ed infettate per 30 ore con HCMV Towne a m.o.i.=1, a confronto anche con cellule MRC5 infettate con HCMV a m.o.i = 0,1, è stato sottoposto a 20, 30 e 40 cicli di amplificazione in PCR, utilizzando una coppia di “primers” in grado di riconoscere la regione corrispondente all’“enhancer” dei geni virali IE1 e IE2 (“HCMV

“enhancer” “F” e “R” – Tabella 1, Materiali e Metodi). I prodotti di amplificazione di 275 pb, rivelati mediante migrazione elettroforetica in gel d'agarosio, hanno dimostrato, per entrambi i modelli di infezione considerati in THP-1, una uguale intensità delle bande sia dopo 30 che 40 cicli di amplificazione, verosimilmente equivalente ad una quantità di DNA virale paragonabile nei due modelli sopracitati (Figura 13). Tale quantità risulta inferiore a quella riscontrata in cellule MRC5, dove un prodotto di amplificazione è visibile già dopo 20 cicli di PCR (Figura 13); tale risultato appare tuttavia in linea con quello ottenuto dall'analisi delle percentuali di espressione della proteina IEp72 (si veda Tabella 3) in cellule MRC5 infettate a m.o.i.=0,1 (100% già dopo 24 ore), a confronto con quelle ottenute in cellule THP-1 differenziate ed infettate a molteplicità dieci volte superiore (30%). I dati riportati in Figura 13, in particolare quelli relativi a cellule THP-1, permettono di concludere che HCMV Towne sembra essere in grado di infettare entrambi i modelli allo studio (THP-1 non differenziate e differenziate, utilizzate per l'infezione latente o litica, rispettivamente) con la stessa efficacia.



**Figura 13.** Analisi comparativa del contenuto di DNA virale presente in nuclei di cellule THP-1 utilizzate come modello di infezione litica (cellule differenziate) o come modello di infezione latente (cellule non differenziate), a confronto con cellule MRC5. Il prodotto di amplificazione di 275 pb, corrispondente ad una regione dell'“enhancer” dei geni precocissimi di HCMV, è stato ottenuto in PCR utilizzando come “stampo” DNA purificato da un ugual numero di nuclei di cellule THP-1 non differenziate (pozzetti 1-3), o differenziate (pozzetti 4-6) e da cellule MRC5 (pozzetti 8-10), infettate per 30 ore con HCMV Towne a m.o.i.=1 (THP-1) e m.o.i.=0,1 (MRC5).

B - Analisi dell'espressione di trascritti virali, caratteristici delle varie fasi dell'infezione litica, in cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica) e non differenziate (modello di infezione latente).

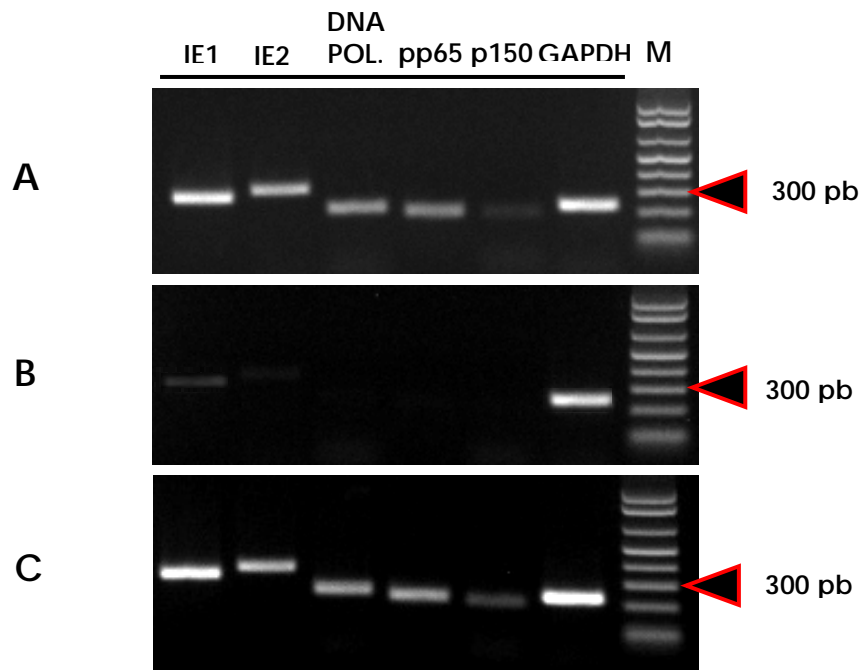
La caratteristica fondamentale della condizione di latenza virale e, nello specifico, dell'infezione latente da HCMV, è l'assenza di fattori che favoriscano la replicazione del virus; di conseguenza, i trascritti associati al programma di espressione litica non dovrebbero essere rilevabili in cellule infettate latentemente, con particolare riferimento al trascritto per l'enzima DNA polimerasi. Com'è noto, infatti, nell'ambito dei trascritti dei geni  $\beta$  di HCMV quello per la suddetta proteina è cruciale in quanto media la replicazione del genoma virale e l'avvio della fase di trascrizione dei geni tardivi.

Per ottenere informazioni circa l'espressione genica di HCMV durante l'infezione litica (cellule THP-1 differenziate) e latente (cellule THP-1 non differenziate) nel modello sperimentale descritto, è stata condotta una reazione di RT-PCR sull'RNA totale purificato da un uguale numero di cellule THP-1 differenziate e non differenziate, infettate con il ceppo virale Towne a m.o.i.=1 per 30 ore, anche a confronto con cellule MRC5 infettate a m.o.i.=0,1 (Figura 14).

In particolare, per la reazione di amplificazione sono state utilizzate coppie di "primers" in grado di mettere in evidenza la presenza dei trascritti dei geni precocissimi IE1 e IE2 (UL123 e UL122), del trascritto precoce per l'enzima DNA-polimerasi (UL54), quello per la fosfoproteina precoce-tardiva pp65 (UL83) ed infine quello per la proteina tardiva pp150 (UL32). Come controllo, è stata utilizzata una coppia di "primers" in grado di riconoscere il gene codificante per la gliceraldeide fosfato deidrogenasi (GAPDH), proteina costitutivamente espressa in tutte le tipologie cellulari.

Come atteso, la rivelazione dei prodotti di amplificazione, previa migrazione elettroforetica in gel d'agarosio all'1,5%, ha dimostrato la presenza di tutti i trascritti presi in esame in cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica) (Figura 14, A) ed in cellule MRC5 (Figura 14, C), mentre tali trascritti sono assenti in cellule THP-1 non differenziate, ad eccezione di quelli relativi ai geni precocissimi IE1 e IE2 (Figura 14, B). Tuttavia, le quantità di tali trascritti appaiono notevolmente inferiori (in particolare, IE2) a quelle ottenute in cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica) e in cellule MRC5 e sono in linea con i risultati ottenuti in

immunofluorescenza relativamente all'analisi dell'espressione delle proteine precocissime IEp72/IEp86, precedentemente descritta (si veda Tabella 3).



**Figura 14.** Analisi mediante RT-PCR del profilo di espressione di RNA messaggeri specifici di HCMV in: A - cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica); B - cellule THP-1 non differenziate (modello di infezione latente); C - fibroblasti MRC5. I trascritti virali e cellulari presi in esame in questa serie di esperimenti sono riportati nella parte superiore del pannello.

I risultati ottenuti confermano nel complesso la validità del modello prescelto per lo studio dei meccanismi che regolano l'espressione di HCMV in corso di infezione litica e latente *in vitro*.

### 6.3 STUDIO DELLE MODIFICAZIONI EPIGENETICHE DELL'ISTONE H3 A LIVELLO DI LISINA IN POSIZIONE 9 (K9) IN DIFFERENTI REGIONI DEL GENOMA DI HCMV IN CONDIZIONI DI INFEZIONE LITICA O LATENTE DI CELLULE THP-1

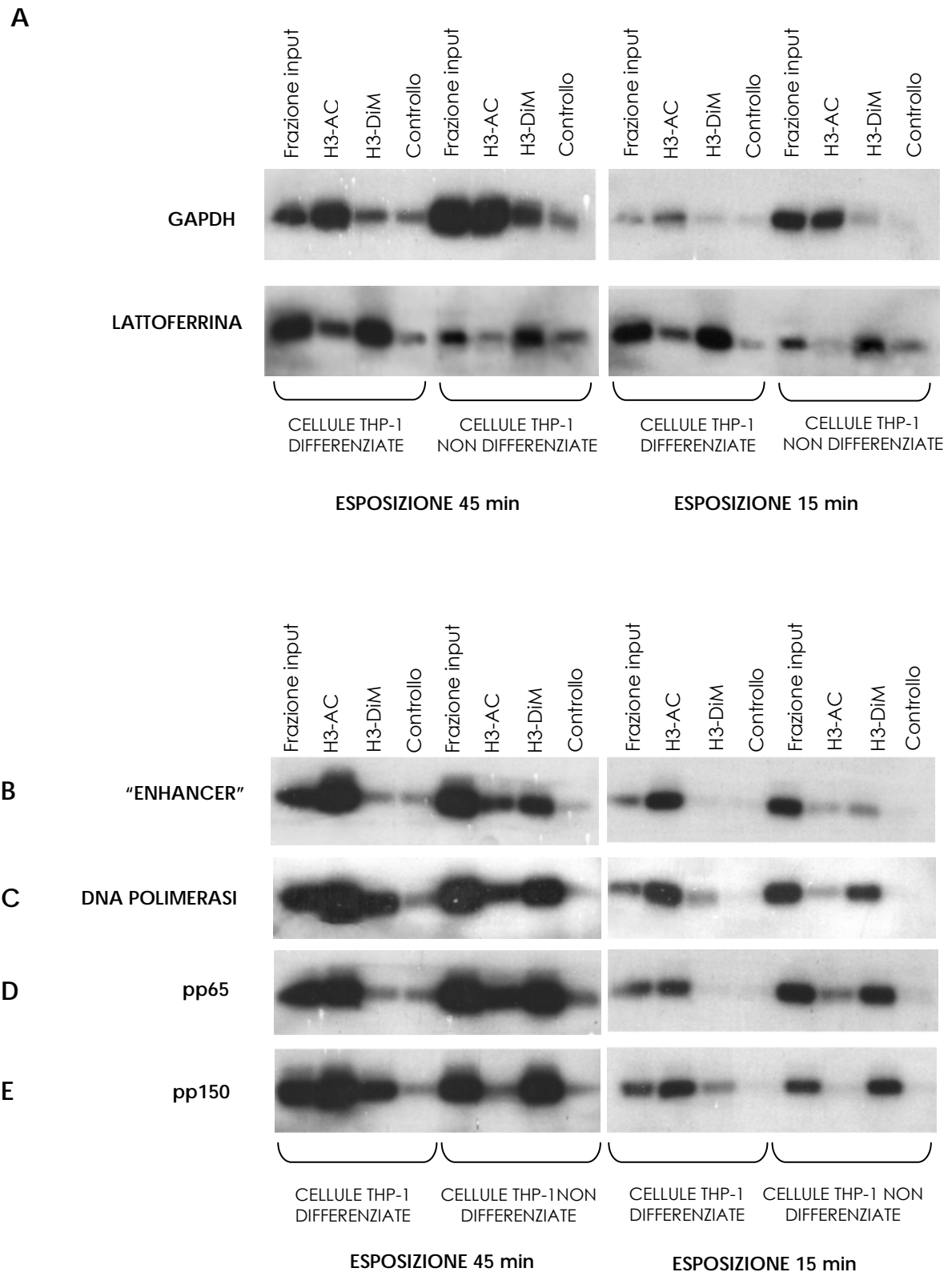
Come già accennato nella sezione introduttiva, nell'ambito delle cellule eucariote l'espressione genica è principalmente regolata da modificazioni post-replicative del genoma, quali la metilazione del DNA, come anche da modificazioni delle proteine istoniche ad esso legate (quali acetilazione e metilazione), in grado di modulare il funzionamento genico. In particolare la modificazione di singoli aminoacidi localizzati nella porzione amino-terminale

delle proteine istoniche costituisce un segnale fondamentale per la formazione di una cromatina trascrizionalmente attiva o repressa. E' noto come la metilazione dell'aminoacido lisina localizzato in posizione 9 (K9) dell'estremità N-terminale dell'istone H3 crei un sito di legame per la proteina HP1 che favorisce una conformazione "chiusa" della cromatina, con conseguente silenziamento genico; al contrario, l'acetilazione dell'istone H3 nella stessa posizione favorisce la formazione di una cromatina trascrizionalmente attiva. Poiché il DNA di citomegalovirus, analogamente agli altri herpesvirus, è organizzato in nucleosomi nelle cellule infettate, le suddette modificazioni istoniche potrebbero incidere anche sulla regolazione dei geni virali. Per verificare tale ipotesi, è stata condotta un'analisi qualitativa e quantitativa dell'eventuale associazione tra geni virali, rappresentativi delle diverse fasi (precocissima, precoce, tardiva) del ciclo litico di HCMV (ceppo Towne), e le forme dimetilata e/o acetilata alla posizione amino-terminale K9 dell'istone H3, in condizioni di infezione latente o litica *in vitro*, mediante l'applicazione di un protocollo di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP). In realtà, per quanto riguarda la fase precocissima dell'infezione virale, non è stato scelto uno dei geni precocissimi maggiori di HCMV, quanto piuttosto una sequenza specifica nell'ambito della regione "enhancer" dei suddetti geni virali. Nel protocollo sperimentale sono inoltre stati inseriti il gene precoce UL54 codificante l'enzima DNA polimerasi virale, il gene UL83 codificante la fosfoproteina pp65, maggiore componente del tegumento virale ed il gene UL32 codificante la proteina tardiva pp150, anch'essa componente importante del tegumento virale. Come controlli, sono stati scelti due geni cellulari: il gene codificante GAPDH, proteina costitutivamente espressa in tutte le tipologie cellulari (quindi anche in THP-1) e il gene codificante la lattoferrina, non espressa in cellule THP-1.

I frammenti di DNA da analizzare in PCR con coppie di "primers" in grado di riconoscere i suddetti geni virali e cellulari, sono stati ottenuti da un uguale numero di cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica) e non differenziate (modello di infezione latente), infettate con HCMV (ceppo Towne) a m.o.i.=1, mediante ChIP, come descritto nella sezione "Materiali e Metodi." I risultati di tali esperimenti sono mostrati in Figura 15.

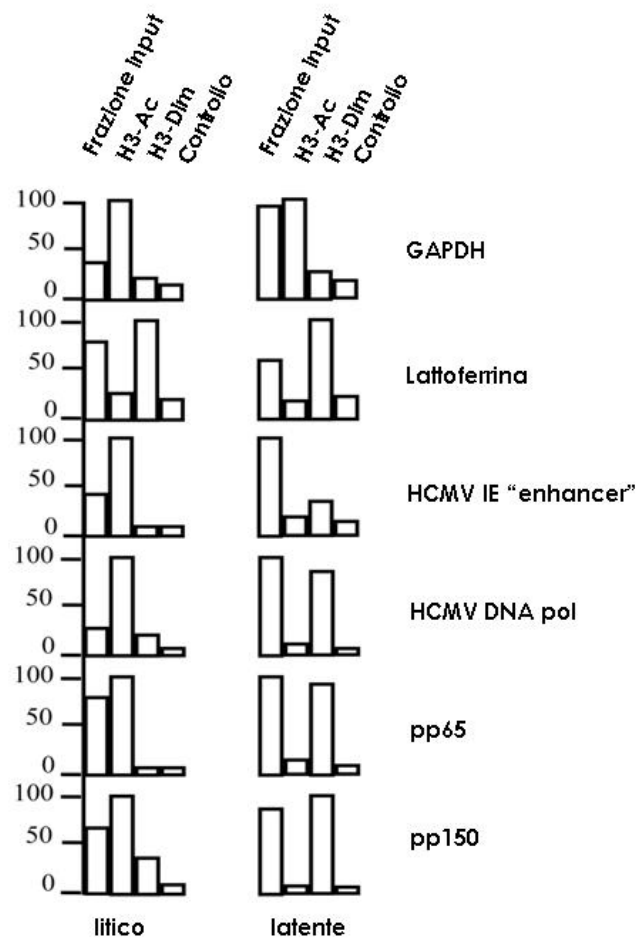
Per quel che riguarda i geni cellulari, come atteso, sia in cellule THP-1 differenziate sia in cellule non differenziate, si può osservare una stretta associazione del gene

per la lattoferrina alla forma dimetilata in K9 dell'istone H3 (Figura 15, A). Tenendo in considerazione che il 10% della frazione input originale (non sottoposta ad immunoprecipitazione) è stata utilizzata per l'amplificazione in PCR di tutti i geni considerati, si può concludere che più del 10% dei frammenti della frazione input sono associati con H3 dimetilato in K9 (si veda anche Figura 16, relativa all'analisi quantitativa dei segnali ottenuti). Al contrario, il gene per l'enzima GAPDH è risultato maggiormente associato alla forma acetilata dello stesso istone (Figura 15, A). Anche per quanto riguarda i geni virali, sono state osservate differenze sostanziali nei due modelli. In particolare, nel modello di infezione litica tutti i geni analizzati sono associati prevalentemente alla forma acetilata in K9 dell'istone H3 (Figura 15, B-E). Per i geni UL54 (DNA polimerasi virale) e UL32 (proteina tardiva pp150) è stata riscontrata, seppure in misura minoritaria (minore del 10%), un'associazione dei rispettivi frammenti di DNA anche con la forma dimetilata in K9 dell'istone H3 (Figura 15, C-E). Queste osservazioni sarebbero in assonanza con il tempo di infezione considerato (30 ore), verosimilmente troppo breve perché si abbia, in questo particolare modello, l'espressione dei geni considerati in tutte le cellule del monostrato. Inoltre tali dati si accordano perfettamente con quelli riguardanti l'emergenza tardiva di progenie virale da tale modello sperimentale, ottenuti precedentemente (si veda Tabella 4). Per quanto riguarda il modello di infezione latente, tutti i geni virali analizzati risultano associati prevalentemente all'istone H3 dimetilato in posizione K9; fa eccezione l'"enhancer" dei geni IE, che non sembra essere significativamente associato né ad H3 acetilato, né ad H3 dimetilato (Figura, 15 B), ma sembra piuttosto trovarsi in una situazione intermedia di attivazione/repressione.



**Figura 15.** Analisi autoradiografica, previa immunoprecipitazione della cromatina, dell'associazione tra differenti frammenti genici virali (Fig. 15, B-E) e la forma acetilata o dimetilata di K9 dell'istone H3, durante l'infezione litica o latente di cellule THP-1 con il ceppo Towne di HCMV (m.o.i.=1; 30 ore p.i.). Due geni cellulari (Fig. 15, A) sono stati

utilizzati come controlli positivo (cromatina attiva: GAPDH) e negativo (cromatina inattiva: lattoferrina). I pannelli mostrano i risultati significativi derivanti da tre esperimenti indipendenti. Nelle parti superiori delle autoradiografie sono indicati da sinistra verso destra: "Frazione input" (10% del DNA totale ottenuto dopo sonicazione in un esperimento di immunoprecipitazione); "H3-AC" (amplificazione di frammenti di DNA precipitati con anticorpi diretti contro l'istone H3 acetilato in K9); "H3-Dim" (amplificazione di frammenti di DNA precipitati con anticorpi diretti contro l'istone H3 dimetilato in K9); "Controllo" (amplificazione di frammenti di DNA precipitati con siero pre-immunizzato, come controllo per reazioni aspecifiche). Sono mostrati due differenti tempi di esposizione al fine di valutare in maniera ottimale l'intensità dei segnali. A sinistra sono riportati i prodotti cellulari e virali dei geni analizzati.



**Figura 16. Analisi quantitativa dei dati ottenuti mediante ChIP**

Analisi quantitativa dei dati ottenuti in tre esperimenti indipendenti di immunoprecipitazione della cromatina. I gel recanti il profilo elettroforetico dei prodotti di amplificazione ottenuti utilizzando come DNA stampo i frammenti ricavati mediante ChIP, sono stati digitalizzati mediante scansione e l'intensità del segnale è stata determinata utilizzando il software "TotalLab" (Nonlinear USA Inc.). Il valore più alto di intensità del segnale è stato assunto come 100% e gli altri risultati sono stati normalizzati di conseguenza. Le proteine cellulari e virali codificate dai geni presi in esame sono riportate a destra. Nella parte superiore dello schema sono indicate da sinistra verso destra:

“Frazione input” (10% del DNA totale ottenuto dopo sonicazione in un esperimento di immunoprecipitazione); “H3-AC” (amplificazione di frammenti di DNA precipitati con anticorpi diretti contro l’istone H3 acetilato in K9); “H3-Dim” (amplificazione di frammenti di DNA precipitati con anticorpi diretti contro l’istone H3 dimetilato in K9); “Controllo” (amplificazione di frammenti di DNA precipitati con siero pre-immunizzato, come controllo per reazioni aspecifiche).

#### **6.4 ANALISI DELLA PRESENZA DI SEQUENZE METILATE NELL’AMBITO DELLA REGIONE “ENHANCER” DEI GENI PRECOCISSIMI DI HCMV MEDIANTE L’APPLICAZIONE DEL METODO DI MODIFICAZIONE DELLA BASE CITOSINA CON BISOLFITO DI SODIO.**

Nei vertebrati, la metilazione del DNA interessa zone ricche di citosina, mentre quelle povere di citosina-guanina sono solitamente non metilate. Nel genoma degli eucarioti generalmente solo la base citosina, nell’ambito del dinucleotide citosina-guanina (“CpG”), viene metilata: l’enzima citosina-metiltrasferasi aggiunge un gruppo metile al carbonio in posizione 5' della base citosina, con formazione di 5-metilcitosina. La presenza di sequenze “CpG”, sotto-rappresentate nel genoma, ma abbondanti nelle regioni promotrici dei geni, è collegata ai possibili effetti della metilazione sulla repressione/attivazione genica. In particolare, i geni sono potenzialmente trascrivibili se ipometilati, mentre l’ipermetilazione dei promotori è solitamente correlata ad una inattivazione degli stessi.

Per verificare la presenza di sequenze metilate nella regione “enhancer”/promotore dei geni precocissimi di HCMV, nell’ambito dei modelli cellulari per lo studio dell’infezione litica e/o latente, è stato scelto un metodo che sfrutta la capacità del bisolfito di sodio di modificare la base citosina non metilata in uracile (che nel processo di amplificazione verrà sostituita dalla base timina), mentre le basi rappresentate da citosina metilata rimangono invariate: quindi, come mostrato nello schema riportato di seguito, nel caso in cui la sequenza di interesse sia metilata, le basi rappresentate da citosina nell’ambito del dinucleotide CG rimarranno tali, mentre tutte le restanti C della sequenza diverranno Uracile; al contrario, se la sequenza di interesse non è metilata tutte le basi C, comprese quelle dei dinucleotidi CG, diverranno U.

## Prima del trattamento con bisolfito di sodio

DNA "Wild type"      5' ...G **C G G A C C G C G** A T T A G G **C C T C G T A C C G T**...3'

## Dopo il trattamento con bisolfito di sodio

DNA metilato      5' ...G <sup>M</sup>**C** G G A <sup>M</sup>**U** <sup>M</sup>**C** G **C** G A T T A G G **U U T** <sup>M</sup>**C** G T A <sup>M</sup>**U** **C** G T...3'

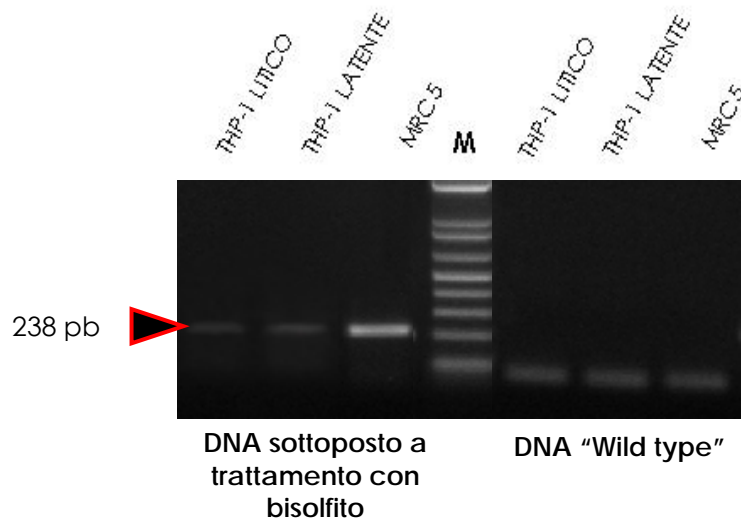
DNA non metilato      5' ...G **U G G A U U G U G** A T T A G G **U U T U G T A U U G T**...3'

La presenza di citosine metilate (C) o non metilate (U) a livello del dinucleotide CG, ovvero di sequenze metilate o non metilate, rispettivamente, nell'ambito del DNA sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio, viene rivelata sottoponendo i campioni modificati a reazione di amplificazione con coppie di "primers" "M" ("methylated") o coppie di "primers" "U" (unmethylated). Qualora le coppie di "primers" "M" ed "U" diano un prodotto di amplificazione, solo la successiva reazione di sequenziamento potrà dare informazioni conclusive sulla percentuale di basi citosina metilate presenti nella sequenza di interesse.

Altre 2 coppie di "primers", oltre a quelle citate, sono necessarie come controlli: una coppia definita "CMod" (controllo di modificazione) dovrebbe essere utilizzata per confermare la presenza di DNA modificato nel campione sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio, indice di idoneità dello stesso per le reazioni di amplificazione con i "primers" "U" ed "M"; una seconda coppia "W" ("Wild type") dovrebbe invece essere usata per verificare la qualità del campione, ovvero per definire il grado di modificazione dell'acido nucleico dopo trattamento con bisolfito di sodio; in altre parole, caratteristica della coppia di "primers" "W" è quella di riconoscere il DNA non sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio, ovvero "wild type", la cui presenza in un campione modificato indica una parziale modificazione dell'acido nucleico stesso.

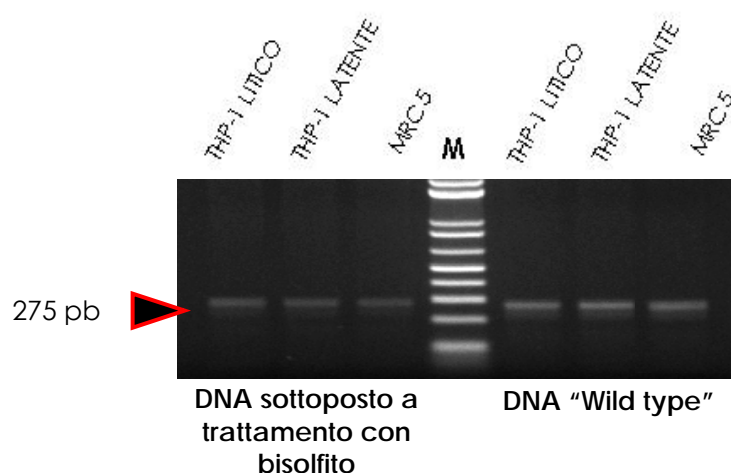
Il metodo descritto è stato applicato per modificare 1 µg di DNA purificato a partire da nuclei di cellule THP-1 differenziate e non differenziate o di cellule MRC5, infettate con HCMV ceppo Towne per 30 ore.

Come fase preliminare di controllo, finalizzata a verificare l'efficacia del trattamento con bisolfito di sodio, 100 ng di ciascun campione a cui è stato applicato il suddetto trattamento sono stati sottoposti a PCR (40 cicli di amplificazione) con la coppia di "primers" "CMod" (controllo di modificazione nell'ambito della regione "enhancer"-promotore dei geni IE di HCMV), in grado di distinguere, nei campioni di DNA sottoposti a trattamento con bisolfito di sodio, l'effettiva presenza di DNA modificato. L'elettroforesi in gel d'agarosio all'1,5% ha mostrato la presenza di un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese in corrispondenza di ciascun campione sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio (Figura 17, a sinistra). Tuttavia la quantità di DNA modificato appare molto esigua nel caso di cellule THP-1 differenziate e non differenziate rispetto a cellule MRC5. Nessun prodotto di amplificazione è invece visibile in corrispondenza di campioni non sottoposti a trattamento con bisolfito di sodio, a conferma dell'idoneità dei "primers" utilizzati (Figura 17, a destra)



**Figura 17.** Analisi mediante PCR dell'avvenuta modificazione del DNA purificato da nuclei di cellule THP-1, utilizzate come modello di infezione litica o come modello di infezione latente, e di cellule MRC5 sottoposte a trattamento con bisolfito di sodio. A sinistra: il prodotto di amplificazione di 238 pb è stato ottenuto con la coppia di "primers" "Cmod", utilizzando come stampo DNA purificato da un uguale numero di nuclei di cellule THP-1 differenziate (pozzetto 1) o non differenziate (pozzetto 2) e da cellule MRC5 (pozzetto 3), infettate per 30 ore con HCMV Towne a m.o.i.=1 (THP-1) e m.o.i.=0,1 (MRC5) e sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio. A destra: reazione di amplificazione condotta con la coppia di "primers" "Cmod", utilizzando come stampo DNA "wild-type" (non sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio) purificato da un uguale numero di nuclei di cellule THP-1 differenziate (pozzetto 5) o non differenziate (pozzetto 6) e da cellule MRC5 (pozzetto 7), infettate per 30 ore con HCMV Towne a m.o.i.=1 (THP-1) e m.o.i.=0,1 (MRC5).

Un'ulteriore reazione di PCR è stata eseguita sui suddetti campioni con la coppia di "primers" "W", in grado di riconoscere il DNA non sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio, ovvero "Wild type" per verificarne il grado di modificazione (Figura 18). Contrariamente all'atteso (ovvero presenza della banda di interesse solo a livello dei campioni di DNA virale "wild type" nei tre modelli di infezione), il prodotto di amplificazione di 275 pb è stato osservato anche nei campioni sottoposti a trattamento con bisolfito di sodio.



**Figura 18.** Analisi mediante PCR del grado di modificazione del DNA purificato da nuclei di cellule THP-1, utilizzate come modello di infezione litica o come modello di infezione latente, e da cellule MRC5 sottoposte a trattamento con bisolfito di sodio. A destra: il prodotto di amplificazione di 275 pb è stato ottenuto con la coppia di "primers" "W" utilizzando come stampo DNA "wild-type" (non sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio) purificato da un ugual numero di nuclei di cellule THP-1 differenziate (pozzetto 5) o non differenziate (pozzetto 6) e da cellule MRC5 (pozzetto 7), infettate per 30 ore con HCMV Towne a m.o.i.=1 (THP-1) e m.o.i.=0,1 (MRC5). A sinistra: diversamente dall'atteso, il prodotto di amplificazione di 275 pb è stato ottenuto con la coppia di "primers" "W" utilizzando come stampo DNA purificato da un ugual numero di nuclei di cellule THP-1 differenziate (pozzetto 1) e non differenziate (pozzetto 2) e da cellule MRC5 (pozzetto 3), infettate per 30 ore con HCMV Towne a m.o.i.=1 (THP-1) e m.o.i.=0,1 (MRC5). (pozzetto 6) e da cellule MRC5 (pozzetto 7), infettate per 30 ore con HCMV Towne a m.o.i.=1 (THP-1) e m.o.i.=0,1 (MRC5) e sottoposte a trattamento con bisolfito di sodio.

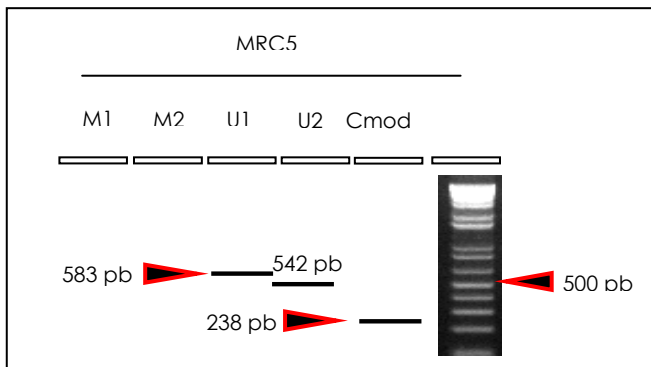
Nonostante il risultato sottolinei la presenza, nei campioni sottoposti a modificazione mediante trattamento con bisolfito di sodio, di DNA "wild type" – indice di una modificazione soltanto parziale dell'acido nucleico - gli stessi sono stati ritenuti idonei per le successive reazioni di amplificazione con coppie di

“primers” “M”, in grado di riconoscere la sequenza di interesse eventualmente metilata, ed “U”, in grado di riconoscere la sequenza di interesse non metilata.

In un primo momento è stato verificato lo stato di eventuale metilazione del DNA purificato da cellule MRC5 infettate con lo stipite Towne di HCMV a m.o.i.=0,1 e sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio, a confronto con il corrispettivo DNA non trattato (“wild type”). A tale scopo, i suddetti campioni sono stati amplificati mediante PCR, in ragione di 100 ng DNA/reazione, utilizzando 4 coppie di “primers” denominate “M1/M2” ed “U1/U2”; le coppie “M1” e “U1” sono entrambe in grado di riconoscere una porzione della sequenza dell’“enhancer” virale, mentre le coppie “M2” e “U2” riconoscono una porzione diversa dalla prima, a completamento della regione genica considerata. Nell’ipotesi che l’“enhancer” di HCMV sia metilato, le porzioni considerate dovrebbero essere amplificate utilizzando le coppie di “primers” “M1” e “M2”; viceversa, in caso esso non sia metilato, l’amplificazione delle stesse sarebbe possibile utilizzando le coppie “U1” e “U2”.

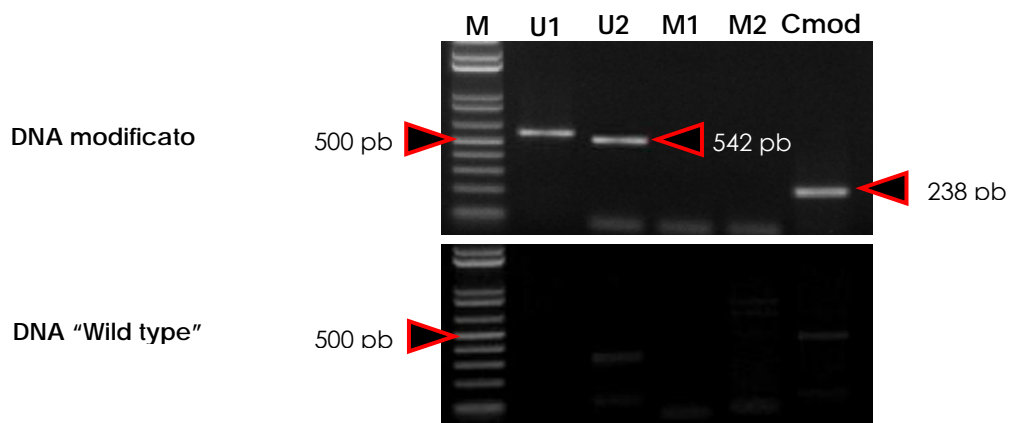
Dal momento che le cellule MRC5 rappresentano il modello d’elezione per lo studio dell’infezione produttiva da HCMV, la regione “enhancer” dei geni virali precocissimi dovrebbe essere trascrizionalmente attiva (vista l’abbondante produzione di proteine precocissime IEp72 e IEp86 in corso di infezione litica), ovvero non metilata; pertanto, per quanto riguarda il campione di DNA sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio, è attesa la presenza di due prodotti di 583 e 542 pb, relativi all’amplificazione della regione di interesse con le coppie di “primers” “U1” e “U2” (sequenza non metilata), mentre nessun prodotto dovrebbe essere presente nel caso in cui lo stesso campione venga amplificato con le coppie di “primers” “M1” ed “M2” (sequenza metilata).

I risultati attesi sono riassunti nello schema rappresentato in Figura 19.



**Figura 19.** Rappresentazione schematica dei risultati attesi dalla reazione di amplificazione con le coppie di "primers" "M1/M2", "U1/U2", utilizzando come stampo DNA purificato da nuclei di cellule MRC5 infettate con HCMV ceppo Towne a m.o.i.=0,1 e sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio.

La rivelazione dei prodotti di amplificazione in gel d'agarosio all'1,5% (Figura 20) mostra la presenza dei due prodotti di amplificazione di 583 pb (coppia di "primers" U1) e di 542 pb (coppia di "primers" U2), corrispondenti alle due porzioni della regione "enhancer" dei geni precocissimi virali sopra citate. Il risultato è in linea con l'atteso, ed è convalidato sia dalla mancanza di un prodotto di PCR in corrispondenza delle reazioni condotte con le coppie di "primers" "M", sia dal fatto che nessun prodotto di dimensioni attese è stato ottenuto amplificando il corrispettivo DNA "wild type" con le stesse coppie di "primers".



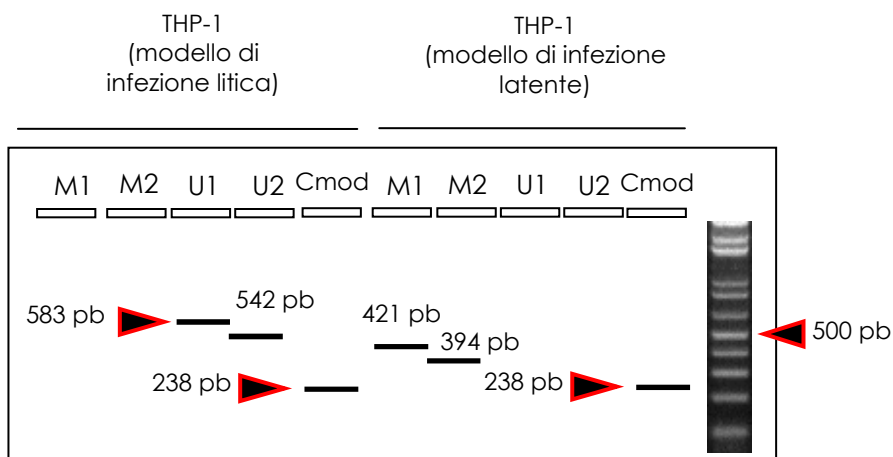
**Figura 20.** Analisi mediante PCR della presenza di sequenze metilate/non metilate nella regione "enhancer" dei geni precocissimi di HCMV a partire da DNA purificato da nuclei di cellule MRC5 infettate e sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio. In alto: i prodotti di amplificazione di 583 e 542 pb rispettivamente (pozzetti 1 e 2) sono stati ottenuti con le coppie di "primers" "U1/U2", utilizzando come stampo DNA purificato da

nuclei di cellule MRC5 infettate per 30 ore con HCMV Towne a m.o.i = 0,1 e sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio. Pozzetti M1-M2: reazione di amplificazione condotta con le coppie di "primers" "M1/M2", utilizzando come stampo DNA purificato da nuclei di cellule MRC5 infettate nelle suddette condizioni e sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio. In basso: reazione di amplificazione condotta con le coppie di "primers" "U1/U2", "M1/M2" utilizzando come stampo DNA "Wild-Type" purificato da nuclei di cellule MRC5 infettate con HCMV Towne a m.o.i.=1 per 30 ore.

La reazione di amplificazione descritta è stata in seguito condotta, mantenendo le stesse condizioni sperimentali, sul DNA purificato da nuclei di cellule THP-1 differenziate o non differenziate (ed infettate con HCMV) e sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio.

Analogamente a quanto osservato per cellule MRC5, anche nel caso di cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica), la regione "enhancer" dovrebbe essere trascrizionalmente attiva, cioè non metilata: è quindi attesa anche in questo caso la presenza di due prodotti di PCR (583 e 542 pb) in corrispondenza del campione modificato ed amplificato con le coppie di "primers" "U1/U2". Al contrario, in cellule THP-1 non differenziate (modello di infezione latente), la regione "enhancer" dei geni precocissimi dovrebbe trovarsi in uno stato intermedio di attivazione/repressione; in particolare, il rilevamento di due prodotti (421 e 394 pb) in corrispondenza del campione modificato ed amplificato con le coppie di "primers" "M1" ed "M2" indicherebbe la presenza di sequenze potenzialmente metilate nella regione in esame.

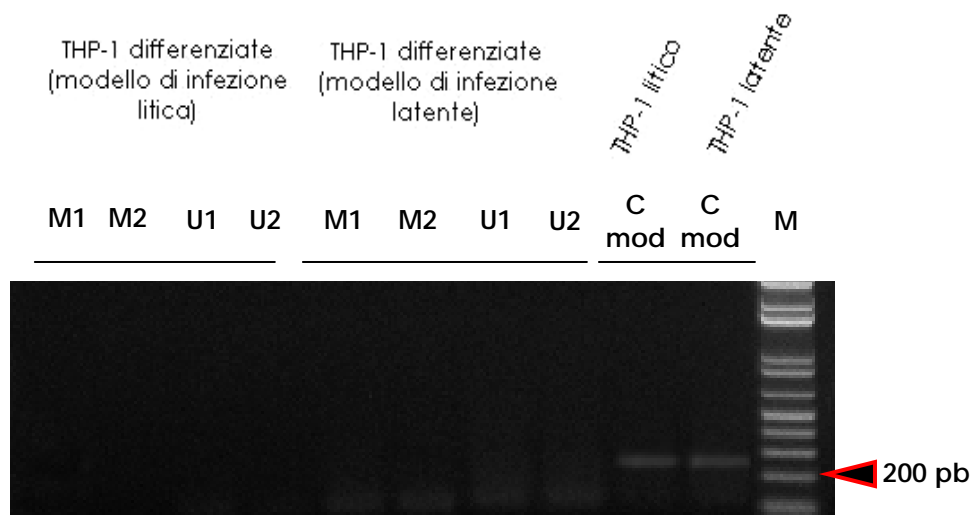
In Figura 21 sono riportati schematicamente i risultati attesi.



**Figura 21.** Rappresentazione schematica dei risultati attesi dalla reazione di amplificazione con le coppie di "primers" "M1/M2", "U1/U2", utilizzando come stampo DNA purificato da

un uguale numero di nuclei di cellule THP-1 differenziate o non differenziate infettate per 30 ore con HCMV Towne a m.o.i.=1 (THP-1) e sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio.

La rivelazione dei prodotti di amplificazione in gel d'agarosio all'1,5% (Figura 22) non ha mostrato nessuno dei prodotti attesi, ad eccezione di due bande debolmente espresse, corrispondenti all'amplificazione dei campioni con la coppia di "primers" "Cmod".



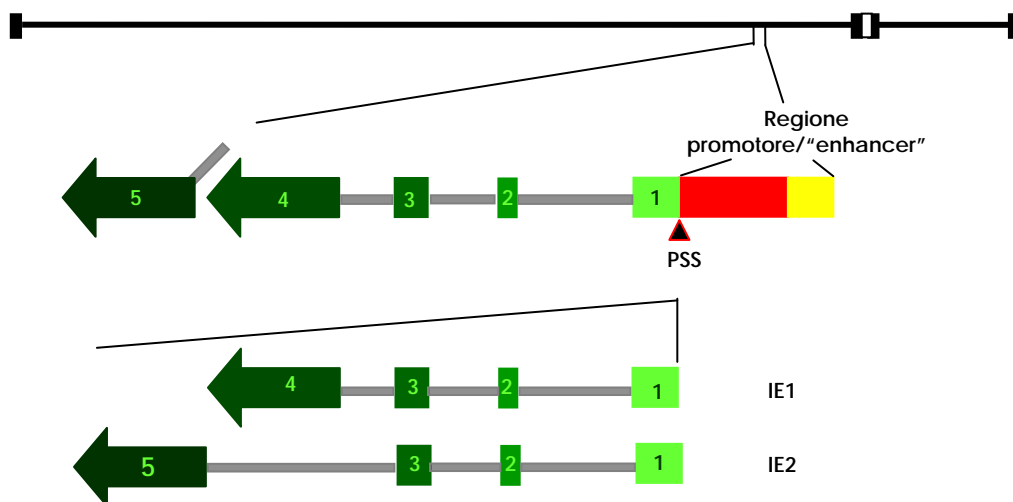
**Figura 22.** Analisi mediante PCR della presenza di sequenze metilate/non metilate nella regione "enhancer" dei geni precocissimi IE di HCMV a partire da DNA purificato da nuclei di cellule THP-1 differenziate o non differenziate e sottoposto a trattamento con bisolfito di sodio. La reazione di amplificazione è stata condotta con le coppie di "primers" "U1/U2" ed "M1/M2", utilizzando come stampo DNA purificato da un uguale numero di nuclei di cellule THP-1 differenziate e non differenziate, infettate per 30 ore con HCMV Towne a m.o.i.=1 e sottoposte a trattamento con bisolfito di sodio.

La reazione di amplificazione, ripetuta più volte su diversi preparati di DNA ottenuti a partire da nuclei di cellule THP-1 differenziate e non differenziate ed infettate con HCMV per 30 ore, variando anche i parametri di PCR, ha confermato il risultato negativo. La mancanza di prodotti di amplificazione potrebbe essere imputabile alla quantità troppo esigua di DNA virale modificato nei campioni sottoposti a PCR e/o ad un'azione "di competizione" esercitata da sequenze di DNA genomico, proporzionalmente preponderante rispetto al DNA virale nei campioni esaminati.

## 6.5 ANALISI MEDIANTE RT-PCR DELL'ESPRESSIONE DI TRASCritti DI LATENZA IN CELLULE THP-1 INFETTATE CON HCMV

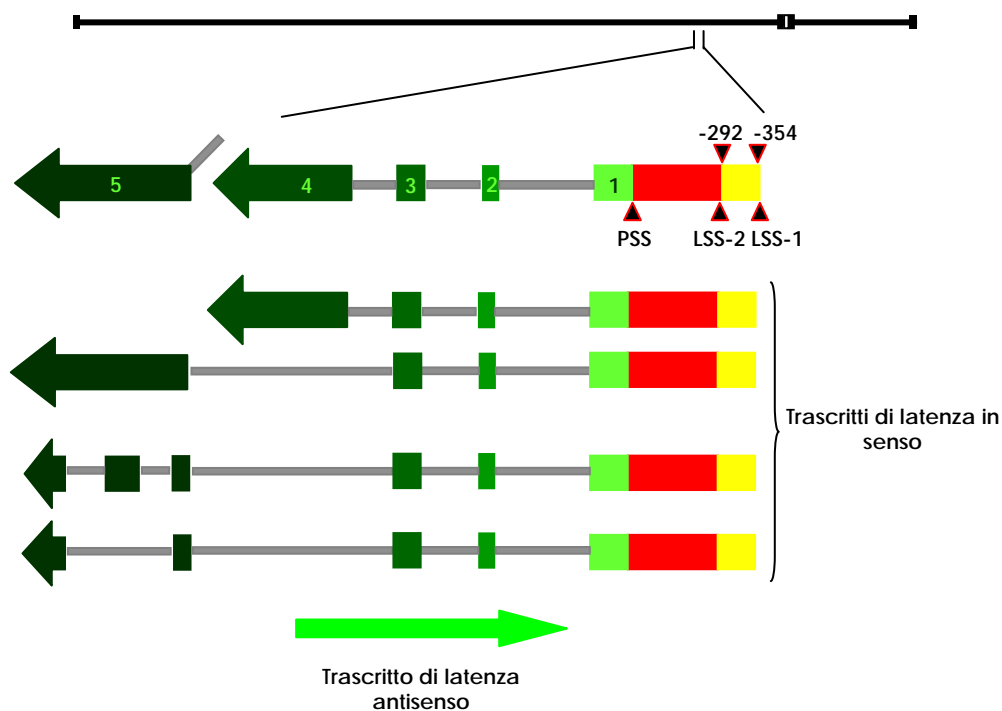
L'analisi delle modificazioni epigenetiche della cromatina, in particolare quelle riferibili, nell'ambito del cosiddetto "codice istonico", alla metilazione/acetilazione dell'istone H3-K9, hanno mostrato una situazione intermedia di attivazione/repressione dell'"enhancer" dei geni precocissimi virali in condizione di infezione latente di cellule THP-1.

E' plausibile ritenere che tale stato intermedio rifletta la possibilità che durante l'infezione latente di cellule THP-1, la regione che comprende i geni UL123 (IE1) e UL122 (IE2) (Figura 23) venga trascritta in entrambe le direzioni, a sostegno dell'esistenza dei cosiddetti trascritti di latenza ("Cytomegalovirus Latency Transcripts", CLTs) (Kondo et al., 1996).



**Figura 23.** Rappresentazione schematica dei trascritti IE1 e IE2 di HCMV; le regioni introniche sono rappresentate in grigio; PSS: "Productive Start Site".

Tali trascritti di latenza (Figura 24) possono avere un orientamento in senso (ovvero prodotti a partire dal filamento di DNA utilizzato normalmente come stampo per la trascrizione) o in "antisenso" (ovvero prodotti a partire dal filamento di DNA complementare a quello utilizzato come stampo per la trascrizione).



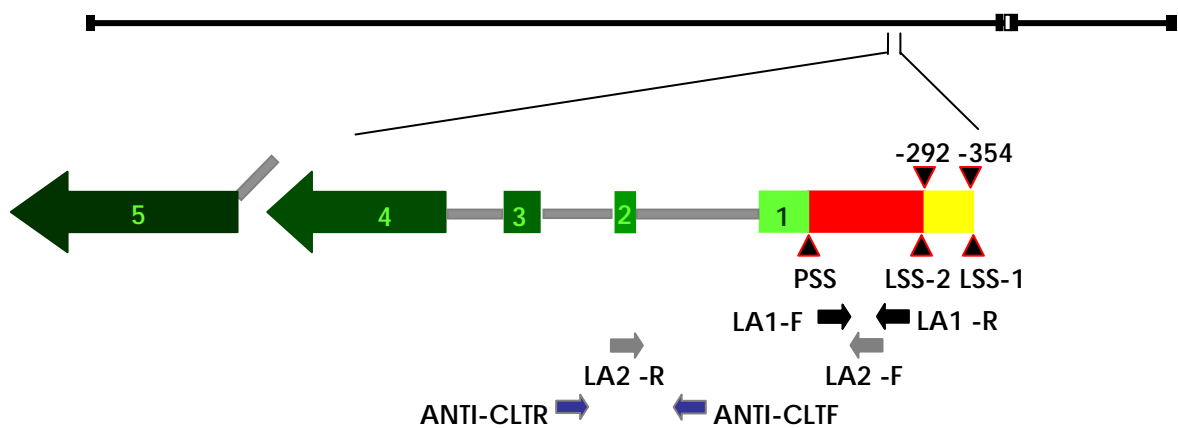
**Figura 24.** Rappresentazione schematica dei principali trascritti di latenza in senso (CLTs) di HCMV, prodotti a partire dai siti LSS1 (“Latency Start Site” 1) e LSS2, localizzati nella regione promotore/“enhancer” dei geni IE, e del trascritto antisenso; le regioni introniche sono rappresentate in grigio. PSS: “Productive Start Site”.

I siti di inizio (“Latency Start Site”, LSS-1 ed LSS-2) dei trascritti di latenza in senso di HCMV si collocano nell'area “enhancer”/promotore dei geni precocissimi, rispettivamente 354 e 292 nucleotidi a monte del sito di inizio della trascrizione dei geni IE (“Productive Start Site”, PSS), mentre il trascritto “antisenso” è complementare ad una regione compresa tra l'esone 4 e il primo introne dei suddetti geni.

Ovviamente, è plausibile ipotizzare che un dominio cromatinico (che di solito supera la dimensione di un gene trascritto e, nel caso di trascritti di latenza, include l'intero “enhancer”) non sia trascrizionalmente “chiuso”, qualora contenga un gene attivo.

Pertanto, al fine di verificare lo stato di attivazione/inattivazione della regione promotore/“enhancer” dei geni precocissimi virali, è stata analizzata la presenza dei suddetti trascritti nei modelli prescelti per lo studio di infezione litica e latente da HCMV. A tale scopo, l'RNA totale purificato da un uguale numero di cellule THP-1 non differenziate ed infettate con lo stivite Towne di HCMV a m.o.i.=1 per 30 ore (modello di infezione latente), a confronto con cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica) e cellule MRC5 infettate nelle stesse condizioni, è stato

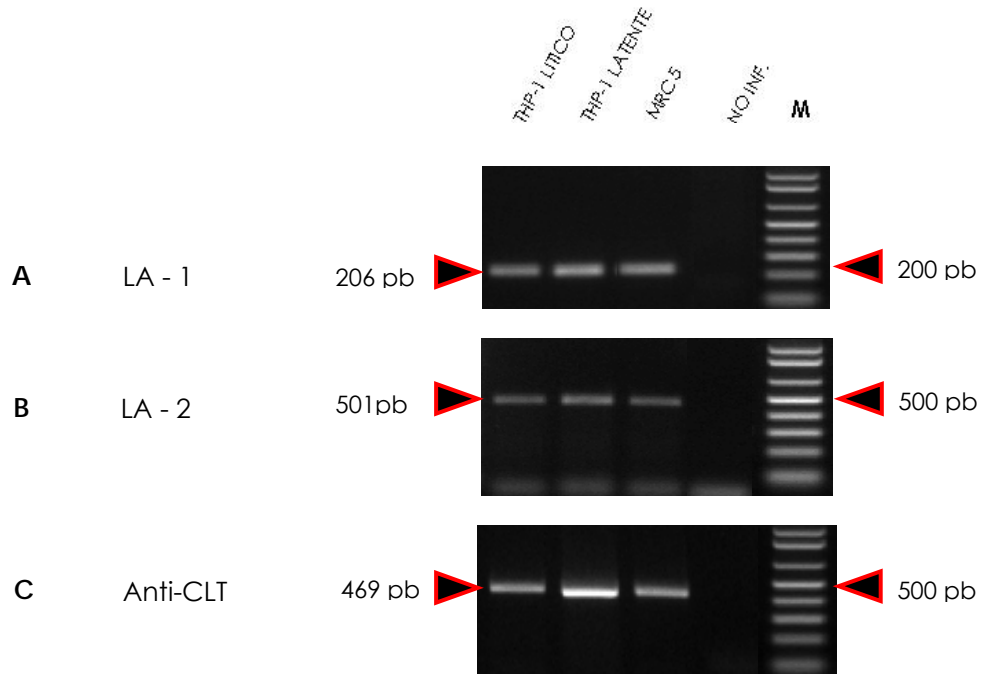
sottoposto a RT-PCR utilizzando due coppie di “primers” denominate “LA1” e “LA2”, in grado di amplificare una regione comune ai trascritti di latenza in senso. In particolare, i “primers” “LA1 forward” e “reverse” sono complementari alla regione promotore -“enhancer” compresa tra il sito LSS-2 e PSS (prodotto di amplificazione atteso: 206 pb); i “primers” LA2 “forward” e “reverse” derivano invece dalla sequenza nucleotidica compresa tra il LSS-2 e l'esone 2 (prodotto di amplificazione atteso: 501 pb). Per l'amplificazione del trascritto antisenso sono stati invece utilizzati i “primers” “ANTI-CLT forward” e “ANTI-CLT reverse” (prodotto di amplificazione atteso: 469 pb), che riconoscono sequenze localizzate nel primo e nel secondo introne, rispettivamente, dei geni IE (Figura 25).



**Figura 25:** Rappresentazione schematica della localizzazione delle coppie di “primers” utilizzate per l’amplificazione dei trascritti di latenza di HCMV. PSS: “Productive Start Site”; LSS: “Latency Start Site”; LA1F-R e LA2F-R: posizione dei “primers” per i trascritti di latenza in senso; ANTI-CLF e ANTI-CLR : posizione dei “primers” per il trascritto di latenza in antisenso.

Per quel che riguarda l’analisi dei trascritti di latenza in senso, dopo 35 cicli di amplificazione nelle condizioni sperimentali riportate nella sezione “Materiali e Metodi”, il rilevamento di due amplificati di dimensioni corrette per “LA1” e “LA2”, rivelati mediante migrazione elettroforetica in gel d’agarosio all’1,5%, ha dimostrato la presenza di tali trascritti in quantità paragonabili sia in cellule THP-1 infettate latentemente, sia in cellule THP-1 infettate lificamente e in MRC5 (Figura 26, A e B). I risultati ottenuti sono in linea con dati di letteratura, che dimostrano l’espressione di trascritti di latenza in senso sia durante l’infezione lifica, sia durante la latenza “in vitro”. Un risultato inedito (Figura 26, C) è stato invece ottenuto per il trascritto di latenza in antisenso, descritto in letteratura solo in cellule sedi di

latenza da HCMV ed evidenziato in questo studio nei modelli di infezione litica analizzati, anche se in quantità significativamente minore rispetto al prodotto rilevato in THP-1 infettate latentemente.



**Figura 26.** Espressione dei trascritti di latenza in cellule THP-1 differenziate e non differenziate, infettate con HCMV, a confronto con cellule MRC5. I prodotti di amplificazione delle dimensioni attese sono stati ottenuti con le coppie di "primers" riportate a sinistra in figura, utilizzando come stampo cDNA retrotrascritto dall'RNA purificato da un ugual numero di cellule THP-1 differenziate e non differenziate e di cellule MRC5 infettate con HCMV Towne a m.o.i.=1 per 30 ore.

#### 6.5.1 STUDIO DELLA DISTRIBUZIONE NUCLEARE E CITOPLASMATICA DEI TRASCritti DI LATENZA IN SENSO ED IN ANTISENTO IN CELLULE THP-1, IN CORSO DI INFEZIONE LITICA O LATENTE DA HCMV.

Al fine di rilevare eventuali diversificazioni nell'ambito della distribuzione cellulare dei trascritti di latenza di HCMV in senso ed in antisense nei modelli di infezione litica e di latenza considerati, è stata analizzata la presenza di tali trascritti nei compartimenti nucleare e citoplasmatico di cellule THP-1 differenziate (infezione litica) e non differenziate (infezione latente), infettate con HCMV ceppo Towne a m.o.i.=1 per 30 ore, a confronto con MRC5 infettate nelle stesse condizioni.

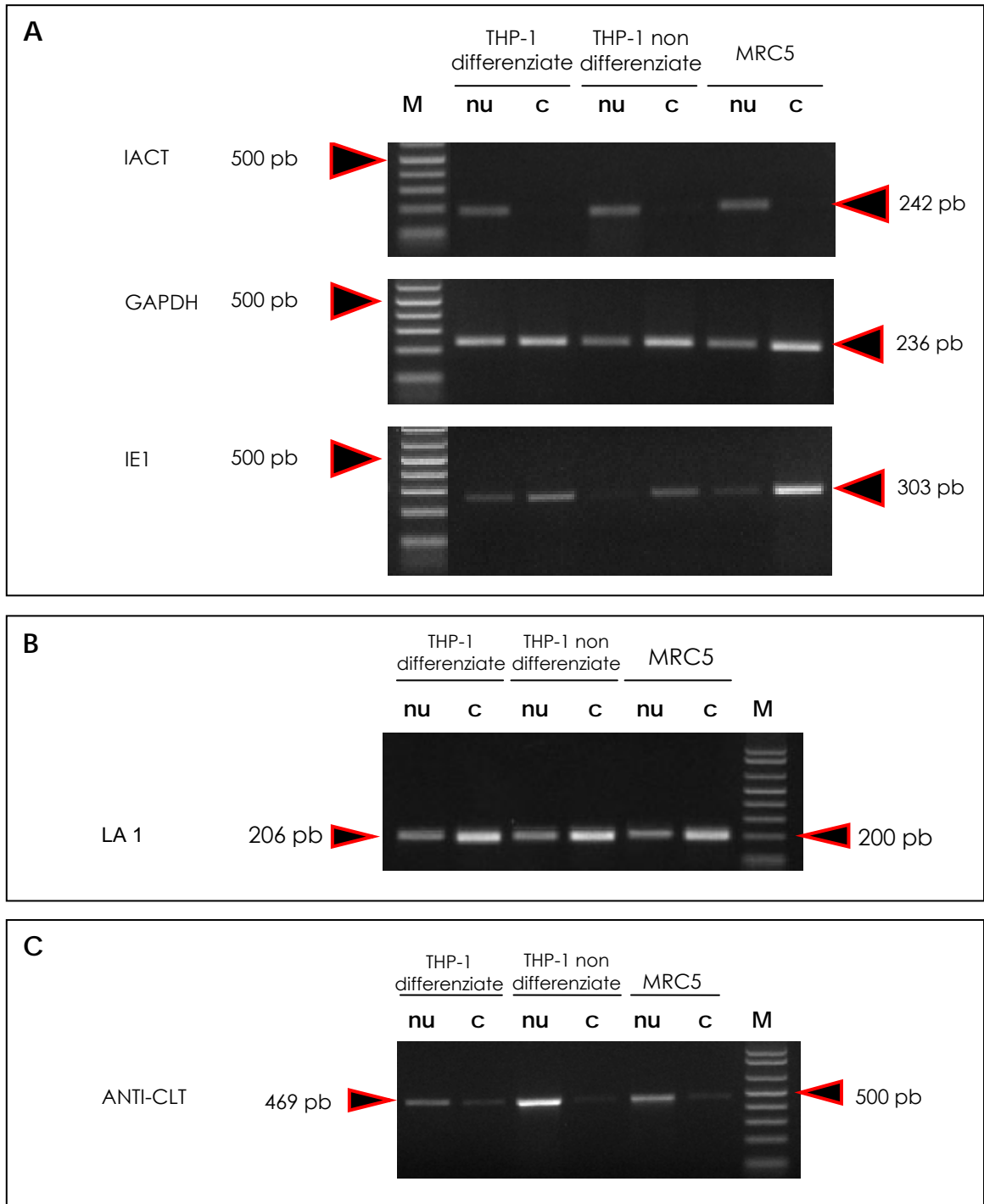
Dopo la lisi ipotonica delle cellule, la separazione dei nuclei mediante centrifugazione differenziale e l'estrazione di RNA, come dettagliato nella sezione

“Materiali e Metodi”, sono state effettuate reazioni di RT-PCR con “primers” specifici in grado di riconoscere i trascritti di latenza in senso e in antisenso, dopo avere preventivamente controllato la correttezza della separazione nucleo (nu)/citoplasma (c) effettuata (Figura 27).

Nello specifico, in Figura 27 A è mostrata la corretta ripartizione del trascritto primario di beta-actina, che è esclusivamente nucleare (pannello A, IACT), quella dell'mRNA per l'enzima GAPDH che, come atteso è sia nucleare che citoplasmatica, con maggiore quantità nel citoplasma (pannello A, GAPDH) ed infine la ripartizione nei suddetti compartimenti del trascritto virale precocissimo IE1 (pannello A, IE1), anch'esso maggiormente rappresentato nella frazione citoplasma, soprattutto in MRC5.

L'analisi della compartimentalizzazione dei trascritti di latenza in senso è mostrata in Figura 27 B, in cui si nota come la distribuzione di tali trascritti sia rilevabile sia nel nucleo, sia nel citoplasma, dove appare prevalente e, almeno per THP-1 utilizzate come modello di infezione litica o latente è presente in quantità apparentemente paragonabili al tempo di infezione considerato (30 ore).

Diverso è il profilo di distribuzione del trascritto in antisenso (Figura 27 C), che non solo sembra essere maggiormente espresso nel modello di latenza, ma appare anche “sequestrato” prevalentemente nel distretto nucleare.



**Figura 27.** Analisi comparativa della compartimentalizzazione nucleare (nu) e citoplasmatica (c) dei trascritti di latenza di HCMV presenti in cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica) e non differenziate (modello di infezione latente) e in cellule MRC5. I prodotti di amplificazione delle dimensioni attese sono stati ottenuti con le coppie di "primers" riportate nella parte sinistra dei pannelli A, B e C, utilizzando come stampo cDNA retrotrascritto dall'RNA purificato da un ugual numero di cellule THP-1 differenziate e non differenziate e di cellule MRC5 infettate con HCMV Towne a m.o.i.=1 per 30 ore. Nella parte superiore di ogni pannello, da sinistra verso destra, sono indicate le due frazioni cellulari per ciascun modello utilizzato.

## 7. DISCUSSIONE

Questo lavoro di ricerca si è basato sullo studio di alcuni possibili meccanismi di regolazione dell'espressione genica di citomegalovirus umano in corso di infezione sperimentale litica o latente della linea monocitaria umana THP-1 con il ceppo virale Towne.

I suddetti modelli di infezione da HCMV sono stati utilizzati per studiare se meccanismi epigenetici di regolazione dei geni cellulari, quali specifiche modificazioni degli istoni "core" del nucleosoma e la metilazione del DNA, potessero essere coinvolti anche nella regolazione dell'espressione genica di HCMV.

Come già sottolineato nelle precedenti sezioni, diverse considerazioni, che sempre più numerose emergono in letteratura, hanno fornito lo spunto per intraprendere questo lavoro di ricerca.

Innanzitutto è noto come nell'ambito delle modificazioni epigenetiche della cromatina di cellule eucariote, quelle che costituiscono il cosiddetto "codice istonico" rappresentino uno dei più rilevanti sistemi di regolazione dell'espressione genica [Imhof, 2003; Vermaak *et al.*, 2003; Khan and Krishnamurty, 2005; Margueron *et al.*, 2005; Turner, 2007; Razin, 2007]. Studi recenti sul silenziamento genico mediato da modificazioni della cromatina cellulare hanno dimostrato un ruolo chiave svolto dall'acetilazione/metilazione di specifici residui aminoacidici localizzati a livello delle "code" amino-terminali delle proteine istoniche associate al DNA [Dillon and Festenstein, 2002; Richards and Elgin, 2002; Adcock *et al.*, 2006]. In particolare la metilazione dell'aminoacido lisina in posizione 9 (K9) dell'istone H3 innesca il legame con l'"heterochromatin protein 1" (HP1) e richiama gli enzimi istone metilasi e istone deacetilasi che, a loro volta, deacetilano e metilano i residui aminoacidici adiacenti a K9, portando alla formazione di un dominio trascrizionalmente represso [Stewart *et al.*, 2005; Loyola and Almouzni, 2007]. Come già ricordato nella sezione introduttiva, il meccanismo d'azione della metilazione degli istoni (analogamente a quanto avviene nell'ambito dell'acetilazione per l'attivazione della trascrizione) prevede che specifici residui lisinici metilati agiscano come "marcatori", in grado di indirizzare i complessi proteici coinvolti nella repressione della trascrizione, che, a loro volta, portano ad un rimodellamento della cromatina, determinandone una conformazione chiusa e quindi non trascrivibile [Adcock *et al.*, 2006].

Le strategie messe a punto da diversi virus per compiere il proprio ciclo replicativo litico si esplicano, fondamentalmente, sia attraverso la soppressione dei sistemi di regolazione della cellula ospite, sia operando un'azione di controllo sui circuiti metabolici cellulari. D'altra parte, per quei virus in grado di instaurare diverse tipologie di interazione con la cellula infettata, tra cui, in particolare, una condizione di latenza, è plausibile ipotizzare che i suddetti meccanismi di regolazione e controllo siano differenziati rispetto a quelli messi in atto durante il ciclo litico, dal momento che, in caso di infezione latente, la maggior parte del genoma virale non è espresso ed il metabolismo cellulare rimane praticamente invariato. Quindi, è ragionevole affermare che in cellule infettate latentemente l'attività dei geni virali potrebbe essere soppressa dagli stessi meccanismi che agiscono in tal senso sui geni cellulari [Chan *et al.*, 1996; Bain *et al.*, 2003; Chao *et al.*, 2004; Sinclair and Sisson, 2006]. In linea con la suddetta ipotesi, è noto che, una volta penetrato nel nucleo cellulare, il genoma di tutti i virus erpetici, compreso quello di HCMV, si associa a proteine istoniche, organizzandosi in una struttura bipartita simile a quella del nucleosoma [Kierszenbaum and Huang, 1978; St Jeor *et al.*, 1982; Chen *et al.*, 1997] è pertanto verosimile ipotizzare che le modificazioni delle proteine istoniche e/o la metilazione del DNA possano giocare un ruolo critico anche nella regolazione dell'espressione genica virale [Murphy *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 2005]. È stato infatti dimostrato che le regioni attivamente trascritte del genoma di diversi herpesvirus sono associate a proteine istoniche acetilate [Chang e Liu, 2000; Jenkins *et al.*, 2000; Alazard *et al.*, 2003; Murphy *et al.*, 2002; Kubat *et al.*, 2004]. Questa osservazione non appare sorprendente, in quanto è noto come in cellule eucariote l'acetilazione degli istoni sia necessaria per rendere accessibile la cromatina all'enzima RNA polimerasi II ed ai vari fattori della trascrizione. Tuttavia, sono ancora frammentarie ed incomplete le informazioni relative ai meccanismi di repressione della trascrizione genica virale messi in atto in caso di infezione latente.

Il principale interesse di questo studio è stato pertanto quello di verificare innanzitutto la presenza di domini cromatinici repressi nell'ambito del genoma virale e se questi potessero svolgere un ruolo nel silenziamento genico, analogamente a quanto è ampiamente riconosciuto per simili strutture cromatiniche cellulari.

Per verificare questa ipotesi, è stata dapprima studiata l'associazione di specifici geni virali, rappresentativi delle diverse fasi del ciclo litico, all'istone H3 acetilato o dimetilato a livello di lisina in posizione 9 (K9), in corso di infezione litica o latente, mediante l'applicazione di un protocollo di immunoprecipitazione della cromatina.

Per quanto riguarda cellule THP-1 differenziate (modello di infezione litica), i risultati ottenuti hanno messo in evidenza un'associazione di tutti i geni studiati, così come della regione dell'"enhancer" dei geni IE, all'istone H3 acetilato in K9 [Loudinkova *et al.*, 2006]. In linea con questi dati, un'associazione tra l'"enhancer" virale e l'istone H4 acetilato, è stata precedentemente descritta in cellule NT2-D1 (stabilizzate da una forma neoplastica testicolare teratogena), rese permissive all'infezione virale da HCMV mediante differenziamento con acido retinoico [LaFemina and Hayward, 1986; Murphy *et al.*, 2002].

Contrariamente a quanto osservato in cellule THP-1 differenziate, i dati ottenuti nel presente studio relativamente a cellule non differenziate (modello di infezione latente), hanno rivelato l'esistenza di una stretta associazione tra i geni presi in esame e l'istone H3 dimetilato in K9 [Loudinkova *et al.*, 2006]. Questo risultato è a sua volta in accordo con dati precedentemente pubblicati da altri Autori, i quali hanno dimostrato che, in corso di infezione latente, particolari regioni del genoma di HCMV sono associate ad HP1 [Murphy *et al.*, 2002], proteina che favorisce la formazione di cromatina trascrizionalmente repressa, interagendo con la forma metilata dell'istone in oggetto [Eberharter and Becker, 2002; Vermaak *et al.*, 2003].

Inatteso è stato invece il risultato relativo allo stato di acetilazione/metilazione di H3 nell'ambito della regione dell'"enhancer" virale, ottenuto nel modello di infezione latente: contrariamente ai geni virali saggiati, il suddetto tratto di DNA di HCMV non è risultato associato in modo preponderante né alla forma acetilata, né a quella metilata dell'istone H3 [Loudinkova *et al.*, 2006], testimoniando, apparentemente, uno stato "intermedio" di chiusura/apertura della cromatina virale.

Nel tentativo di acquisire ulteriori informazioni circa lo stato di attività trascrizionale di questa importante regione del genoma virale, ci si è prefissi di verificare se il suddetto tratto di DNA fosse metilato, dal momento che, com'è noto, la metilazione del DNA rappresenta, di concerto con specifiche

modificazioni istoniche, uno dei principali meccanismi di silenziamento genico cellulare [Jaenisch and Bird, 2003; Adcock *et al.*, 2006]. I risultati ottenuti mediante l'utilizzo del bisolfito di sodio, incoraggianti quando tale tecnica è stata applicata a fibroblasti di polmone embrionale umano (che rappresentano il modello di infezione litica da HCMV per eccellenza, *in vitro*), sono stati invece deludenti relativamente al modello di infezione latente considerato, non permettendo di arrivare ad alcun risultato conclusivo. Una possibile spiegazione potrebbe, in un certo senso, essere legata ai potenziali limiti del metodo impiegato. È infatti da sottolineare che da un lato, la tecnica del bisolfito di sodio è principalmente e proficuamente utilizzata per l'analisi dello stato di metilazione del DNA cellulare e che, dall'altro, quest'ultimo è presente in maniera quantitativamente preponderante rispetto al DNA virale nel modello di infezione latente allo studio e può, pertanto, rappresentare un possibile competitore e/o interferente nell'ambito di questa tipologia di indagine. Inoltre, è anche verosimile che l'utilizzo della suddetta metodologia divenga ottimale soprattutto nell'ambito di analisi di tratti di DNA che si trovino in uno stato di franca metilazione o di assenza della stessa (come è probabile che sia, ad esempio, quella riscontrabile in fibroblasti umani infettati con HCMV, in cui il genoma virale risulta totalmente trascrivibile). D'altra parte, è invece probabile che la regione dell'"enhancer" dei geni IE di HCMV in cellule THP-1 infettate latentemente si trovi in una condizione "intermedia" di repressione/attivazione (e quindi, probabilmente, in una situazione intermedia di metilazione del DNA), come sembrano attestare i dati sulla acetilazione/metilazione dell'istone H3.

Tale stato di moderata apertura/chiusura della cromatina a livello dell'"enhancer" virale potrebbe riflettere il fatto che nel corso dell'infezione latente, la regione che comprende i geni UL123 e UL122 (che codificano per le principali proteine precocissime IEp72 e IEp86, rispettivamente) sia trascritta in entrambe le direzioni, dando origine ai cosiddetti trascritti di latenza ("Cytomegalovirus Latency Transcripts", CLTs) [Kondo *et al.*, 1996]. Tali trascritti possono avere un orientamento "in senso" o in "antisenso" e vengono prodotti a partire da due siti localizzati nell'area "enhancer"/promotore dei geni IE, a monte del sito di inizio della trascrizione dei geni precocissimi [Lunetta and Wiedeman, 2000].

Ovviamente, un dominio cromatinico (che di solito supera la dimensione di un gene trascritto e, nel caso di trascritti di latenza, include l'intero "enhancer") non può essere "chiuso", qualora contenga un gene attivo.

Al fine di verificare lo stato trascrizionale della regione promotore/"enhancer" dei geni precocissimi virali, è stata analizzata la presenza dei suddetti trascritti nei modelli prescelti per lo studio dell'infezione litica e latente da HCMV (linea cellulare THP-1 differenziata o non differenziata, rispettivamente), a confronto con i fibroblasti di polmone embrionale umano, sistema permissivo per eccellenza. Le reazioni di amplificazione in PCR hanno permesso di rivelare la presenza dei trascritti attesi, in quantità paragonabili in cellule THP-1 infettate latentemente, in quelle infettate liticamente ed anche in fibroblasti umani.

I risultati ottenuti sono in linea con dati di letteratura, che dimostrano l'espressione di trascritti di latenza "in senso" sia durante l'infezione litica, sia durante la latenza "in vitro" [Lunetta and Wiedeman, 2000; Kondo *et al.*, 1996]. Un risultato inedito è stato invece ottenuto per il trascritto di latenza in antisenso, evidenziato non solo in cellule sedi di latenza da HCMV, come descritto in letteratura [Kondo *et al.*, 1996] ma, sebbene apparentemente in misura minore, anche nei modelli di infezione litica analizzati (cellule THP-1 differenziate, fibroblasti umani).

Gli aspetti funzionali relativi alla presenza di trascritti di latenza da HCMV, soprattutto in cellule che albergano il virus latente, sono a tutt'oggi ancora dibattuti e non delucidati. In particolare, i prodotti proteici relativi a tali trascritti, contro i quali sarebbero diretti anticorpi rilevati, in alcuni casi, in soggetti sieropositivi per HCMV [Kondo *et al.*, 1996; Landini *et al.*, 2000], non sembrano, apparentemente, avere un ruolo nel mantenimento della condizione di latenza.

In relazione a quanto sopra esposto, anche considerando che esistono sempre maggiori evidenze scientifiche che supportano una stretta associazione tra funzioni espletate da specifici complessi molecolari e la loro localizzazione spaziale (spesso dinamica nel tempo), un ulteriore ed interessante aspetto di questo complesso filone di studi riguarda la compartimentalizzazione di tali trascritti, con particolare riguardo alla distribuzione nucleare e citoplasmatica degli stessi.

Al fine di rilevare eventuali diversificazioni nell'ambito dei trascritti di latenza di HCMV in senso ed in antisenso nei modelli di infezione litica e di latenza considerati, è stato intrapreso uno studio volto ad evidenziare la loro distribuzione

nei compartimenti nucleare e citoplasmatico di cellule THP-1 differenziate (infezione litica) e non differenziate (infezione latente), a confronto con fibroblasti umani. L'analisi della compartimentalizzazione dei trascritti di latenza in senso ha mostrato come i suddetti trascritti siano rilevabili sia nel nucleo, sia nel citoplasma dei modelli analizzati: essi sembrano essere prevalentemente concentrati in quest'ultimo distretto cellulare e, almeno per la linea cellulare THP-1, utilizzata come modello di infezione litica o di infezione latente, essi sono presenti in quantità apparentemente paragonabili al tempo di infezione considerato.

Diverso appare il profilo di distribuzione del trascritto in antisenso, che non solo sembra essere maggiormente espresso nel modello di latenza, ma appare anche "sequestrato" prevalentemente nel distretto nucleare.

Quest'ultima osservazione potrebbe supportare l'ipotesi secondo la quale non sarebbero gli eventuali prodotti proteici relativi a tale trascritto ad avere una specifica funzione legata al mantenimento dello stato di latenza (peraltro mai dimostrata per alcun trascritto di latenza, compresi quelli in senso) [Beisser *et al.*, 2001; Bego *et al.*, 2005], quanto piuttosto il trascritto stesso. In effetti, la cospicua concentrazione del trascritto in antisenso in sede nucleare avvalorerebbe l'attribuzione di sue putative funzioni di effettore di attività modulatore e/o interferente sull'espressione di trascritti eventualmente connessi al programma di espressione litica.

Ulteriori approfondimenti relativi, in particolare, agli aspetti funzionali della compartimentalizzazione nucleare del suddetto trascritto in antisenso nel modello cellulare studiato per l'infezione latente da HCMV, potranno auspicabilmente essere di supporto alla comprensione di un suo ipotetico ruolo nel mantenimento dello stato di latenza virale.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. Abate, D.A., Watanabe, S. and Mocarski, E.S. (2004). Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J. Virol.*, 78: 10995-11006.
2. Adcock, I.M., Ford, P., Barnes, P.J., Ito, K. (2006). Epigenetics and airways disease. *Respiratory Res.*, 7: 21-40
3. Adler, S. P. (1983). Transfusion-associated cytomegalovirus infections. *Rev. Infect. Dis.*, 5: 977-993.
4. Ahn, J.H. and Hayward, G.S. (1997). The major immediate-early proteins IE1 and IE2 of human cytomegalovirus colocalize with and disrupt PML-associated nuclear bodies at very early times in infected permissive cells. *J. Virol.*, 71: 4599-4613.
5. Alazard, N., Gruffat, H., Hiriart, E., Sergeant, A., Manet, E., (2003). Differential hyperacetylation of histones H3 and H4 upon promoter-specific recruitment of EBNA2 in Epstein-Barr virus chromatin. *J. Virol.*, 77: 8166-8172.
6. Amon, W. and Farrell, P.J. (2005). Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev. Med. Virol.*, 15:149-156.
7. Arthur, J.L., Scarpini, C.G., Connor, V., Lachmann, R.H., Tolkovsky, A.M., Efstathiou, S. (2001). Herpes simplex virus type 1 promoter activity during latency establishment, maintenance, and reactivation in primary dorsal root neurons in vitro. *J. Virol.*, 75: 3885-3895.
8. Bain, M., Mendelson, M., Sinclair, J. (2003). Ets-2 Repressor Factor (ERF) mediates repression of the human cytomegalovirus major immediate-early promoter in undifferentiated non-permissive cells. *J. Gen. Virol.*, 84: 41-49.
9. Baldanti, F., Lilleri, D., Gerna, G. (2008). Monitoring human cytomegalovirus infection in transplant recipients. *J. Clin. Virol.*

10. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.-J., Pulendran, B., Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 18: 767–811.
11. Bannister, A.J., Zegerman, P., Partridge, J.F., Miska, E.A., Thomas, J.O., Allshire, R.C., Kouzarides, T. (2001). Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*, 410: 120–124.
12. Bego, M., Maciejewski, J., Khaiboullina, S., Pari, G., St Jeor, S. (2005). Characterization of an antisense transcript spanning the UL81-82 locus of human cytomegalovirus. *J. Virol.*, 79: 11022–11034.
13. Beisser, P.S., Laurent, L., Virelizier, J.L., Michelson, S. (2001). Human cytomegalovirus chemokine receptor gene US28 is transcribed in latently infected THP-1 monocytes. *J. Virol.*, 75: 5949–5957.
14. Bodaghi, B., Jones, T.R., Zipeto, D., Vita, C., Sun, L., Laurent, L., Arenzana-Seisdedos, F., Virelizier, J.L., Michelson, S. (1998). Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus-infected cells. *J. Exp. Med.*, 188: 855-866.
15. Boehme, K.W., Guerrero, M., Compton, T. (2006). Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J. Immunol.*, 177: 7094-7102.
16. Bolovan-Fritts, C.A., Mocarski, E.S., Wiedeman, J.A. (1999). Peripheral blood CD14<sup>+</sup> cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood*, 93: 394–398.
17. Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein, B., Schaffner, W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 41: 521–530.
18. Boyle, K.A. and Compton, T. (1998). Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J. Virol.*, 72: 1826-1833.

19. Bradshaw, P.A., Duran-Guarino, M.R., Perkins, S., Rowe, J.I., Fernandez, J., Fry, K.E., Reyes, G.R., Young, L., Fong, S.K.H. (1994). Localization of antigenic sites on human cytomegalovirus virion structural proteins encoded by UL48 and UL56. *Virology*, 205: 321-328.
20. Bresnahan, W.A. and Shenk, T. (2000). A subset of viral transcripts packaged within viral particles. *Science*, 288: 2373-2376.
21. Bresnahan, W.A., Boldogh, I., Thompson, E.A., Albrecht, T. (1996). Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology*, 224: 150-160.
22. Britt, W.J. and Mach, M. (1996). Human cytomegalovirus glycoproteins. *Intervirology*, 39: 401-412.
23. Browne, E.P. and Shenk, T. (2003). Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100: 11439-11444.
24. Browne, E.P., Wing, B., Coleman, D., Shenk T. (2001). Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J. Virol.*, 75: 12319-12330.
25. Brown, S.W. (1966). Heterochromatin. *Science*, 151: 417-25.
26. Chan, Y.J., Tseng, W.P., Hayward, G.S., (1996). Two distinct upstream regulatory domains containing multicopy cellular transcription factor binding sites provide basal repression and inducible enhancer characteristics to the immediate-early IES (US3) promoter from human cytomegalovirus. *J. Virol.*, 70: 5312-5328.
27. Chang, L.K. and Liu, S.T. (2000). Activation of the BRLF1 promoter and lytic cycle of Epstein-Barr virus by histone acetylation. *Nucleic Acids Res.*, 28: 3918-3925.
28. Chao, S.H., Harada, J.N., Hyndman, F., Gao, X., Nelson, C.G., Chanda, S.K., Caldwell, J.S. (2004). PDX1, a cellular homeoprotein, binds to and regulates the activity of human cytomegalovirus immediate early promoter. *J. Biol. Chem.*, 279: 16111-16120.

29. Chee, M.S., Satchwell, S.C., Preddie, E., Weston, K.M., Barrell, B.G. (1990) Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature*, 344:774-777.
30. Chen, W.Y., Bailey, E.C., McCune, S.L., Dong, J.Y., Townes, T.M. (1997). Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94: 5798–5803.
31. Cheung, P. and Lau, P. (2005). Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol. Endocrinol.*, 19: 563-573.
32. Compton, T., Kurt-Jones, E.A., Boehme, K.W., Belko, J., Latz E., Golenbock, D.T., Finberg R.W. (2003). Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J. Virol.*, 77: 4588-4596.
33. Compton, T., Nowlin, D.M., Cooper, N.R. (1993). Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparin sulfate. *Virology*, 193: 834-841.
34. Craigen, J.L., Yong, K.L., Jordan, N.J., MacCormac, L.P., Westwick, J., Akbar, A.N., Grundy, J.E. (1997). Human cytomegalovirus infection up-regulates interleukin-8 gene expression and stimulates neutrophil transendothelial migration. *Immunology*, 92: 138-145.
35. de Graan-Hentzen, Y.C., Gratama, J.W., Mudde, G.C. and 7 other authors (1989). Prevention of primary cytomegalovirus infection in patients with hematologic malignancies by intensive white cell depletion of blood products. *Transfusion*, 29: 757–760.
36. de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem. J.*, 370: 737-749.
37. Dillon, N., and Festenstein, R. (2002). Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.*, 18, 252–258.
38. Dittmer, D. and Mocarski, E.S. (1997). Human cytomegalovirus infection inhibits G<sub>1</sub>/S transition. *J. Virol.*, 71: 1629-1634.

39. Eberharter, A. and Becker, P.B. (2002). Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. *EMBO Rep.*, 3: 224–229.
40. Everett, R.D. (2000). ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays*, 22: 761–770.
41. Fortunato, E.A. and Spector, D.H. (1999). Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv. Virus Res.*, 54: 61-128.
42. Fortunato, E.A., McElroy, A.K., Sanchez, I., Spector, D.H. (2000). Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol.*, 8: 111–119.
43. Gao, J.L. and Murphy, P.M. (1994). Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor. *Biol. Chem.*, 269: 28539-28542.
44. Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F., Atadja, P. (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J. Biol. Chem.*, 277: 25748-25755.
45. Gerna, G., Lilleri, D., Caldera, D., Furione, M., Zenone Bragotti, L., Alessandrino, E.P. (2008). Validation of a DNAemia cut-off for preemptive therapy of cytomegalovirus infection in adult hematopoietic stem cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant*.
46. Gerna, G. and Lilleri, D. (2006). Monitoring transplant patients for human cytomegalovirus: Diagnostic update. *Herpes*, 13: 4-11.
47. Ghazal, P., Lubon, H., Reynolds-Kohler, C., Hennighausen, L., Nelson, J.A. (1990). Interactions between cellular regulatory proteins and a unique sequence region in the human cytomegalovirus major immediate-early promoter. *Virology*, 174: 18–25.
48. Gibson, W. (1996). Structure and assembly of the virion. *Intervirology*, 39: 389-400.
49. Gnann, J.W. Jr, Ahlmen, J., Svalander, C., Olding, L., Oldstone, M.B., Nelson, J.A. (1988). Inflammatory cells in transplanted kidneys are infected by human cytomegalovirus. *Am. J. Pathol.*, 132: 239–248.

50. Goodrum, F.D., Jordan, C.T., High, K., Shenk, T. (2002). Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 99: 16255–16260.
51. Gravel, S.P. and Servant, M.J. (2005). Roles of an Ikappa B kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions. *J. Biol. Chem.*, 280: 7477-7486.
52. Hahn, G., Jores, R., Mocarski, E.S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 3937–3942.
53. Hake, S.B. and Hallis, C.D. (2006). Histone H3 variants and their potential role in indexing mammalian genomes: the 'H3 barcode hypothesis'. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103: 6428–6435.
54. Halford, W.P. and Schaffer, P.A. (2001). ICP0 is required for efficient reactivation of herpes simplex virus type 1 from neuronal latency. *J. Virol.*, 75: 3240–3249.
55. Hendrix, R.M.G., Wagenaar, M., Slobbe, R.L., Bruggeman, C.A. (1997). Widespread presence of cytomegalovirus DNA in tissues of healthy trauma victims. *J. Clin. Pathol.*, 50: 59–63.
56. Hengel, H., Brune, W., Koszinowski, U.H. (1998). Immune evasion by cytomegalovirus: survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol.*, 6:190-197.
57. Hertel, L., Lacaille, V.G., Strobl, H., Mellins, E.D., Mocarski, E.S. (2003). Susceptibility of immature and mature Langerhans cell-type dendritic cells to infection and immunomodulation by human cytomegalovirus. *J. Virol.*, 77: 7563–7574.
58. Hirsch, A.J. and Shenk, T. (1999). Human cytomegalovirus inhibits transcription of the CC chemokine MCP-1 gene. *J. Virol.*, 73: 404-410.

59. Huang, T. H., Oka, T., Asai, T., Okada, T., Merrills, B.W., Gertson, P.N., Whitson, R.H., Itakura, K. (1996). Repression by a differentiation-specific factor of the human cytomegalovirus enhancer. *Nucleic Acids Res.*, 24: 1695–1701.
60. Hunninghake, G.W., Monick, M.M., Liu, B. and Stinski, M.F. (1989). The promoter-regulatory region of the major immediate-early gene of human cytomegalovirus responds to T-lymphocyte stimulation and contains functional cyclic AMP-response elements. *J. Virol.*, 63: 3026–3033.
61. Ibanez, C.E., Schrier, R., Ghazal, P., Wiley, C., Nelson, J.A. (1991). Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J. Virol.*, 65: 6581–6588.
62. Imhof, A. (2003). Histone modifications: an assembly line for active chromatin. *Curr. Biol.*, 13: R22-24.
63. loudinkova, E., Arcangeletti, M.C., Rynditch, A., De Conto, F., Motta, F., Covan, S., Pinardi, F., Razin, S.V., Chezzi, C. (2006). Control of human cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line. *Gene*, 384:120-128.
64. Irmiere, A. and Gibson, W. (1983). Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*, 130: 118-133.
65. Jacobs, J.P., Jones, C.M., Baille, J.P. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*, 227:168-170.
66. Jaenisch, R. and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.*, 33 Suppl.: 245-254.
67. Jarvis, M.A. and Nelson, J.A., (2002). Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr. Opin. Microbiol.*, 5: 403-407.

68. Jault, F.M., Jault, J.M., Ruchti, F., Fortunato, E.A., Clark, C., Corbeil, J., Richman, D.D., Spector, D.H. (1995). Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated RB, and p53, leading to cell cycle arrest. *J. Virol.*, 69: 6697-6704.
69. Jenkins, C., Abendroth, A., Slobedman, B. (2004). A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *J. Virol.*, 78: 1440–1447.
70. Jenkins, P.J., Binné, U.K., Farrell, P.J. (2000). Histone acetylation and reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *J. Virol.*, 74: 710–720.
71. Jones T.R., Wiertz E.J., Sun L., Fish K.N., Nelson J.A., Ploegh, H.L. (1996). Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93: 11327-11333.
72. Jonjić, S., Pavić, I., Lucin, P., Rukavina, D., Koszinowski, U.H. (1990). Efficacious control of cytomegalovirus infection after long-term depletion of CD8+ T lymphocytes. *J. Virol.*, 64: 5457-5464.
73. Kalejta, R.F. and Shenk, T. (2002). Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus. *Front. Biosci.*, 7: D295-306.
74. Keay, S. and Baldwin, B. (1991). Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. *J. Virol.*, 65: 5124-5128.
75. Kern, F., Bunde, T., Faulhaber, N. and 10 other authors (2002). Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J. Infect. Dis.*, 185: 1709–1716.
76. Khan, A.U. and Krishnamurthy, S., (2005). Histone modifications as key regulators of transcription. *Front. Biosci.*, 10: 866–872.;
77. Kierszenbaum, A.L. and Huang, E.S. (1978). Chromatin pattern consisting of repeating bipartite structures in WI-38 cells infected with human cytomegalovirus. *J. Virol.*, 28: 661-64.

78. Kinzler, E.R. and Compton, T. (2005). Characterization of Human Cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J. Virol.*, 79: 7827-7837.
79. Kondo, K., Xu, J. and Mocarski, E.S. (1996). Human cytomegalovirus latent gene expression in granulocytemacrophage progenitors in culture and in seropositive individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93:11137-11142.
80. Kondo, K. and Mocarski, E.S. (1995). Cytomegalovirus latency and latency-specific transcription in hematopoietic progenitors. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, 99: 63–67.
81. Kondo, K., Kaneshima, H., Mocarski E.S. (1994). Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91: 11879-11883.
82. Kothari, S., Baillie, J., Sissons, J.G.P., Sinclair, J.H. (1991). The 21bp repeat element of the human cytomegalovirus major immediate early enhancer is a negative regulator of gene expression in undifferentiated cells. *Nucleic Acids Res.*, 19: 1767–1771.
83. Kubat, N.J., Tran, R.K., McAnany, P., Bloom, D.C. (2004). Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. *J. Virol.*, 78: 1139–1149.
84. LaFemina, R. and Hayward, G.S. (1986). Constitutive and retinoic acid-inducible expression of cytomegalovirus immediate-early genes in human teratocarcinoma cells. *J. Virol.*, 58: 434–440.
85. Landini, M.P., Lazzarotto, T., Xu, J., Geballe, A.P. & Mocarski, E.S. (2000). Humoral immune response to proteins of human cytomegalovirus latency-associated transcripts. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 6: 100–108.
86. Lang, D., Fickenscher, H., Stamminger, T. (1992). Analysis of proteins binding to the proximal promoter region of the human cytomegalovirus IE-1/2 enhancer/promoter reveals both consensus and aberrant recognition sequences for transcription factors Sp1 and CREB. *Nucleic Acids Res.*, 20: 3287–3295.

87. Larsson, S., Söderberg-Nauclér, C., Wang, F.Z., Moller, E. (1998). Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion*, 38: 271–278.
88. Lazzarotto, T., Guerra, B., Lanari, M., Gabrielli, L., Landini, M.P. (2007). New advances in the diagnosis of congenital cytomegalovirus infection. *J. Clin. Virol.*
89. Lehner, R., Meyer, H., Mach, M. (1989). Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesvirus. *J. Virol.*, 63: 3792-3800.
90. Liu, B. and Stinski, M.F. (1992). Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J. Virol.*, 66: 4434-4444.
91. Liu, W., Zhao, Y., Biegelke, B.J. (2002). Analysis of human cytomegalovirus US3 gene products. *Virology*, 301: 32-42.
92. Liu, R., Baillie, J., Sissons, J.G.P., Sinclair, J.H. (1994). The transcription factor YY1 binds to negative regulatory elements in the human cytomegalovirus major immediate early enhancer/promoter and mediates repression in non-permissive cells. *Nucleic Acids Res.*, 22: 2453–2459.
93. Loyola, A. and Almouzni, G. (2007). Marking histone H3 variants: how, when and why? *Trends Biochem. Sci.* 32: 425 – 33
94. Lu, M. and Shenk, T. (1996). Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G<sub>1</sub> to S. *J. Virol.*, 70: 8850-8857.
95. Lubon, H., Ghazal, P., Hennighausen, L., Reynolds-Kohler, C., Lockshin, C., Nelson, J. (1989). Cell-specific activity of the modulator region in the human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Mol. Cell. Biol.*, 9: 1342–1345.
96. Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389: 251-260.

97. Lunetta, J.M. and Wiedeman, J.A. (2000). Latency-associated sense transcripts are expressed during in vitro human cytomegalovirus productive infection. *Virology*, 278: 467–476.
98. Margueron, R., Trojer, P., Reinberg, D., (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 15: 163–176.
99. McElroy, A.K., Dwarakanath, R.S., Spector, D.H. (2000). Dysregulation of cyclin E gene expression in human cytomegalovirus-infected cells requires viral early gene expression and is associated with changes in the Rb-related protein p130. *J. Virol.*, 74: 4192-4206.
100. McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S.J., Tanamachi, B., Li, C.R., Zaia, J.A., Greenberg, P.D., Riddell, S.R. (1994). Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Med. Virol.*, 43: 103–110.
101. McVoy, M.A., Nixon, D.E., Adler, S.P., Mocarski E.S. (1998). Sequences within the herpesvirus-conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J. Virol.*, 72: 48-56.
102. Meier, J.L. and Stinski, M.F. (1996). Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology*, 39: 331–342.
103. Mendelson, M., Monard, S., Sissons, P., Sinclair, J. (1996). Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34+ bone marrow progenitors. *J. Gen. Virol.*, 77: 3099–3102.
104. Mirkovitch, J., Mirault, M.E., Laemmli, U.K. (1984). Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell*, 39: 223-32.
105. Mocarski, E.S., Shenk, T., Pass, R.F., (2007). Cytomegalovirus. In Knipe D. and Howley P. (Eds), *Fields Virology*, 5<sup>th</sup> ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 2701-72.

106. Mocarski, E.S., Kemble, G.W., Lyle, J.M., Greaves, R.F. (1996). A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93:11321-11326.
107. Mokarski, E.S. and Courcelle, C.T. (2001). Cytomegalovirus and their replication. In: *Fields Virology*, Knipe, D. and Howley, P., Editors. Lippincott-Raven, Philadelphia, pp. 2629–73.
108. Muller, S. and Dejean, A. (1999). Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption *J. Virol.*, 73: 5137-5143.
109. Muranyi, W., Haas, J., Wagner, M., Krohne, G., Koszinowski, U.H. (2002). Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. *Science*, 297: 854-857.
110. Murphy, J.C., Fischle, W., Verdin, E., Sinclair, J.H. (2002). Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J.*, 21: 1112–1120.
111. Nelson, J.A., Gnann, J.W. Jr, Ghazal, P. (1990). Regulation and tissue-specific expression of human cytomegalovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 154: 75–100.
112. Peterson, C.L., Laniel, M.A. (2004). Histones and histone modifications. *Curr. Biol.*, 14: R546-R551.
113. Peterson, C.L. (2002). HDAC's at work: everyone doing their part. *Mol. Cell*, 9: 921-922.
114. Polić, B., Jonjić, S., Pavić, I., Crnković, I., Zorica, I., Hengel, H., Lucin, P., Koszinowski U.H. (1996). Lack of MHC class I complex expression has no effect on spread and control of cytomegalovirus infection in vivo. *J. Gen. Virol.*, 77: 217-25.
115. Prichard, M.N., Jairath, S., Penfold, M.E., St. Jeor, S., Bohlman, M.C., Pari, G.S. (1998). Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus. *J. Virol.*, 72: 6997-7004.

116. Quirici, N., Soligo, D., Caneva, L., Servida, F., Bossolasco, P. and Deliliers, G. L. (2001). Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133<sup>+</sup> cells. *Br. J. Haematol.*, 115: 186–194.
117. Randolph-Habecker, J.R., Rahill, B., Torok-Storb, B., Vieira, J., Kolattukudy, P.E., Rovin, B.H., Sedmak, D.D. (2002). The expression of the cytomegalovirus chemokine receptor homolog US28 sequesters biologically active CC chemokines and alters IL-8 production. *Cytokine*, 19: 37-46.
118. Razin, A. and Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiol. Rev.*, 55: 451-58.
119. Razin, S.V., Iarovaia, O.V., Sjakste, N., Sjakste, T., Bagdoniene, L., Rynditch, A.V., Eivazova, E.R., Lipinski, M., Vassetzky, Y.S. (2007). Chromatin domains and regulation of transcription. *J. Mol. Biol.*, 369: 597-607.
120. Reeves, M.B., MacAry, P.A., Lehner, P.J., Sissons, J.G.P., Sinclair, J.H. (2005). Latency, chromatin remodeling, and reactivation of human cytomegalovirus in the dendritic cells of healthy carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 4140–4145.
121. Reinke, P., Prösch, S., Kern, F., Volk, H.D. (1999). Mechanisms of human cytomegalovirus (HCMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl. Infect. Dis.*, 1: 157-64.
122. Revello, M.G., and Gerna, G., (2004). Pathogenesis and prenatal diagnosis of human cytomegalovirus infection. *J. Clin. Virol.*, 29: 71-83.
123. Rice, G.P.A., Schrier, R.D., Oldstone, M.B.A. (1984). Cytomegalovirus infects human lymphocytes and monocytes: virus expression is restricted to immediate-early gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 81: 6134–6138.
124. Richards, E.J. and Elgin, S.C., (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108: 489–500.
125. Riegler, S., Hebart, H., Einsele, H., Brossart, P., Jahn, G., Sinzger, C. (2000). Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.*, 81: 393–399.

126. Robson, L., and Gibson, W. (1989). Primate cytomegalovirus assembly protein: genome location and nucleotide sequence. *J. Virol.*, 63: 669-676.
127. Romanowski, M.J., Garrido-Guerrero, E., Shenk T. (1997). pIRS1 and pTRS1 are present in human cytomegalovirus virions. *J. Virol.*, 71: 5703-5705.
128. Russo, V.E.A., Martienssen, R.A., Riggs, A.D. (1996). Epigenetic mechanisms of gene regulation. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
129. Salvant B.S., Fortunato E.A., Spector D.H. (1998). Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J. Virol.*, 72: 3729-3741.
130. Sambucetti, L.C., Cherrington, J.M., Wilkinson, G.W.G., Mocarski, E.S. (1989). NF- $\kappa$ B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J.*, 8: 4251-4258.
131. Sanchez, V. and Spector, D.H. (2002). CMV makes a timely exit. *Science*, 297: 778-779.
132. Sarov, I. and Abady, I. (1975). The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirus and dense bodies. *Virology*, 66: 464-473.
133. Schrier, R.D., Nelson, J.A., Oldstone, M.B. (1985). Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science*, 230: 1048-1051.
134. Schroeder, M.B. and Worthen, G.S. (2001). Viral regulation of RANTES expression during human cytomegalovirus infection of endothelial cells. *J. Virol.*, 75: 3383-3390.
135. Shamu, C.E., Story, C.M., Rapoport, T.A., Ploegh, H.L. (1999). The pathway of US11-dependent degradation of MHC class I heavy chains involves a ubiquitin-conjugated intermediate. *Cell Biol.*, 147: 45-58.
136. Shelbourn, S.L., Kothari, S.K., Sissons, J.G., Sinclair, J.H. (1989). Repression of human cytomegalovirus gene expression associated with a novel immediate early regulatory region binding factor. *Nucleic Acids Res.*, 17: 9165-9171.

137. Sinclair, J. and Sisson P., (2006). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Gen. Virol.*, 87: 1763-1779.
138. Sinclair, A. J. (2003). bZIP proteins of human gammaherpesviruses. *J. Gen. Virol.*, 84: 1941–1949.
139. Sinzger, C., Grefte, A., Plachter, B., Gouw, A.S., The, T.H., Jahn, G. (1995). Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J. Gen. Virol.*, 76: 741-50.
140. Sissons, J.G., Bain, M., Wills, M.R. (2002). Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J. Infect.*, 44: 73-7.
141. Söderberg-Nauclér, C., Fish, K.N., Nelson, J.A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell*, 91: 119–126.
142. Song, F., Smith, J.F., Kimura, M.T., Morrow, A.D., Matsuyama, T., Nagase, H., Held, W.A. (2005). Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 102: 3336-3341.
143. Speck, S.H., Chatila, T., Flemington, E. (1997). Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol.*, 5: 399–405.
144. Spector, D.H. (1996). Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology*, 39: 361-377.
145. St Jeor, S., Hall, C., McGaw, C., Hall, M., (1982). Analysis of human cytomegalovirus nucleoprotein complexes. *J. Virol.*, 41: 309–312.
146. Stanier, P., Kitchen, A.D., Taylor, D.L., Tyms, A.S. (1992). Detection of human cytomegalovirus in peripheral mononuclear cells and urine samples using PCR. *Mol. Cell Probes*, 6: 51–58.
147. Stasiak, P.C. and Mocarski, E.S. (1992). Transactivation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the alpha gene product TRS1 in addition to IE1 and IE2. *J. Virol.*; 66:1050-1058.

148. Stenberg, R.M. (1996). The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology*, 39: 343-349.
149. Stewart, M.D., Li, J., Wong, J., (2005). Relationship between histone H3 lysine 9 methylation, transcription repression, and heterochromatin protein 1 recruitment. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 2525–2538.
150. Story, C.M., Furman, M.H., Ploegh, H.L. (1999). The cytosolic tail of class I MHC heavy chain is required for its dislocation by the human cytomegalovirus US2 and US11 gene products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 96: 8516-21.
151. Streblow, D.N. and Nelson, J.A. (2003). Models of HCMV latency and reactivation. *Trends in Microbiology*, 11: 293–295.
152. Strobl, H. (2003). Molecular mechanisms of dendritic cell sublineage development from human hematopoietic progenitor/stem cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 131: 73–79.
153. Sylwester, A.W., Mitchell, B.L., Edgar, J.B. and 9 other authors (2005). Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J. Exp. Med.*, 202: 673–685.
154. Taylor, R.T. and Bresnahan, W.A. (2005). Human Cytomegalovirus immediate-early 2 gene expression blocks virus-induced beta interferon production. *J. Virol.*, 79: 3873-3877.
155. Taylor, R.T. and Bresnahan, W.A. (2006). Human Cytomegalovirus immediate-early 2 protein IE86 blocks virus-induced chemokine expression. *J. Virol.*, 80: 920-928.
156. Taylor-Wiedeman, J., Sissons, J.G.P., Borysiewicz, L.K., Sinclair, J.H. (1991). Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J. Gen. Virol.*, 72: 2059–2064.
157. Taylor-Wiedeman, J., Sissons, P., Sinclair, J. (1994). Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J. Virol.*, 68: 1597–1604.

158. Theiler, R.N. and Compton, T. (2001). Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O. *J. Biol. Chem.*, 276: 39226-39231.
159. Thoma, F., Koller, T., Klug, A. (1979). Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J. Cell. Biol.*, 83: 403-427.
160. Tolpin, M.D., Stewart, J.A., Warren, D. & 7 other authors (1985). Transfusion transmission of cytomegalovirus confirmed by restriction endonuclease analysis. *J. Pediatr.*, 107: 953-956.
161. Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K., (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line(THP-1). *Int. J. Cancer*, 26:171-176
162. Turner, B.M. (2007). Defining an epigenetic code. *Nat. Cell. Biol.*, 9: 2-6.
163. Urnov, F.D., Wolffe, A.P. (2001). Chromatin remodeling and transcriptional activation: the cast (in order of appearance). *Oncogene*, 20: 2991-3006.
164. Vancikova, Z. and Dvorak, P. (2001). Cytomegalovirus infection in immunocompetent and immunocompromised individuals - a review. *Curr. Drug Targets Immune Endocr. Metabol. Desord.*, 1: 179-187.
165. Vermaak, D., Ahmad, K., Henikoff, S. (2003). Maintenance of chromatin states: an open-and-shut case opinion. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15: 266-274.
166. Welch, A.R., Woods, A.S., McNally, L.M., Cotter, R.J., Gibson, W. (1991). A herpesvirus maturational proteinase, assemblin: identification of its gene, putative active site domain, and cleavage site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88: 10792-10796.
167. White, E.A. and Spector, D.H. (2005). Exon 3 of the Human Cytomegalovirus major immediate-early region is required for efficient viral gene expression and for cellular cyclin modulation. *J. Virol.*, 79: 7438-7452.

168. Wills, M.R., Carmichael, A.J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M.P., Plachter, B., Sissons, J.G.P. (1996). The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J. Virol.*, 70: 7569–7579.
169. Winkler, M., Schmolke, S., Plachter, B., Stamminger, T. (1995). The pUL69 protein of human cytomegalovirus (HCMV), a homologue of the herpes simplex virus ICP27, is contained within the tegument of virions and activates the major immediate early enhancer of HCMV in synergy with the tegument protein pp71 (ppUL82). *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.*, 99: 8-9.
170. Woodcock, CL. (2006). Chromatin architecture. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 16: 213-220.
171. Wright, E., Bain, M., Teague, L., Murphy, J., Sinclair, J. (2005). Ets-2 repressor factor recruits histone deacetylase to silence human cytomegalovirus immediate-early gene expression in non-permissive cells. *J. Gen. Virol.*, 86: 535–544.
172. Yeager, A.S., Grumet, F.C., Hafleigh, E.B., Arvin, A.M., Bradley, J.E., Prober, C.G. (1981). Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infections in newborn infants. *J. Pediatr.*, 98: 281–287.
173. Zhang, X.Y., Inamdar, N.M., Supakar, P.C., Wu, K., Ehrlich, K.C., Ehrlich, M. (1991). Three MDBP sites in the immediate-early enhancer-promoter region of human cytomegalovirus. *Virology*, 182: 865–869.
174. Zhu, H., Cong, J.P., Shen, T. (1997). Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of interferon-responsive RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94: 13985-13990.
175. Zhu, H., Cong, J.P., Mamtora, G., Gingeras, T., Shen T. (1998). Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95: 14470-14475.
176. Zhu, H., Shen, Y., Shen T. (1995). Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J. Virol.*, 69: 7960-7970.

177. Zweidler-McKay, P.A., Grimes, H.L., Flubacher, M.M., Tschlis, P.N. (1996). Gfi-1 encodes a nuclear zinc finger protein that binds DNA and functions as a transcriptional repressor. *Mol. Cell Biol.*, 16: 4024–4034.