

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Scienze Chirurgiche e Microbiologia Applicata

Ciclo XXIX

INTERAZIONE TRA VIRUS INFLUENZA E CELLULA OSPITE:
RUOLO DEL CITOSCHELETRO CELLULARE NELLA
DETERMINAZIONE DI UNA CONDIZIONE DI RESISTENZA
ALL'INFEZIONE VIRALE

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Luigi Roncoroni

Tutore:
Gent.ma Dott.ssa Flora De Conto

Dottoranda: Dott.ssa Alessandra Fazzi

INDICE

| | |
|---------------------------|----------|
| RIASSUNTO | pag. 2 |
| INTRODUZIONE | pag. 6 |
| SCOPO DELLA TESI | pag. 42 |
| MATERIALI E METODI | pag. 45 |
| RISULTATI | pag. 57 |
| DISCUSSIONE | pag. 103 |
| BIBLIOGRAFIA | pag. 114 |

RIASSUNTO

Il lavoro sperimentale oggetto di questa tesi è volto a mettere in luce l'intervento di una componente cellulare, il citoscheletro, nella regolazione dell'infezione sperimentale della linea cellulare LLC-MK2 (rene di scimmia) con stipiti di virus influenza A. Le cellule LLC-MK2 costituiscono un modello semi-permissivo per il virus influenza, nel caso si utilizzi un inoculo virale a bassa molteplicità, e, pertanto, sono funzionali a svelare meccanismi di resistenza cellulare all'infezione virale.

L'obiettivo principale è stato quello di appurare l'intervento di funzioni/componenti regolatorie dei sistemi citoscheletrici dei microtubuli e dei microfilamenti in corso di infezione con stipiti di virus influenza A (H1N1) nelle cellule LLC-MK2. L'attenzione è stata inizialmente focalizzata sul ruolo svolto dai proteasomi nella regolazione dei microtubuli e sulle ripercussioni esercitate sull'infezione virale.

I risultati ottenuti attestano una diminuzione di espressione di *alpha*-tubulina acetilata, principale componente dei microtubuli in assetto stabilizzato, a seguito dell'attivazione delle funzioni proteolitiche dei proteasomi con la sostanza IU1; viceversa, è stato appurato un aumento dell'espressione della suddetta proteina, in conseguenza dell'inibizione dei proteasomi con la sostanza MG132. Le suddette modificazioni di assetto dei microtubuli correlavano con modulazioni dell'infezione del virus influenza. Più precisamente, l'efficienza del ciclo replicativo virale dello stipite umano NWS/33 e dello stipite aviare Mallard/03 di virus influenza A aumentava in condizioni di attivazione dei proteasomi, mentre diminuiva in seguito all'inibizione dei proteasomi. Inoltre, mediante microscopia confocale, è stata dimostrata la parziale co-localizzazione dei proteasomi con la nucleoproteina virale e con componenti dei microtubuli stabili. In particolare, il segnale di co-localizzazione era di maggiore entità nelle cellule infettate, dove sono stati osservati dei rilevanti cambiamenti nella distribuzione citoplasmatica delle proteine *alpha*-tubulina e MAP4.

Tali risultati depongono per l'intervento dei proteasomi nella modulazione dei microtubuli nelle cellule LLC-MK2 infettate con il virus influenza, tuttavia l'azione regolatoria esercitata potrebbe essere di tipo indiretto e coinvolgere dei meccanismi di segnalazione intracellulare mediati dai microtubuli.

È, inoltre, stato appurato che la depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti con sostanze chimiche induce delle modificazioni reciproche dell'assetto di tali componenti, che "interagiscono" tra loro e svolgono un'azione sinergica, quali fattori di restrizione cellulare nei confronti di fasi precoci dell'infezione virale nelle cellule LLC-MK2.

L'attenzione è stata successivamente rivolta all'intervento della proteina omologa alla proteina diafano 1 di *Drosophila* (DIAPH1), che regola le funzioni dei microtubuli e dei microfilamenti. Nelle cellule LLC-MK2 sottoposte a silenziamento del gene che codifica per la proteina DIAPH1 ed infettate con il virus influenza A/NWS/33 è stato osservato un aumento della produttività dell'infezione virale, unitamente a modificazioni di assetto dei microtubuli, che erano contraddistinti da una diminuita espressione di *alpha*- e *beta*-tubulina ed un'estensione ad un'area citoplasmatica più ampia, e dei microfilamenti, che erano caratterizzati da una diminuita espressione dell'actina filamentosa.

L'osservazione di una localizzazione subcellulare e di un livello di espressione altamente variabili della proteina DIAPH1 in corso di infezione del virus NWS/33 nelle cellule LLC-MK2, depone per funzioni regolatorie svolte dalla proteina in specifici distretti subcellulari. Ulteriori modificazioni sono state osservate a seguito della depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti, che depongono per l'esistenza di "interazioni" tra la proteina DIAPH1 e tali componenti del citoscheletro.

L'analisi in microscopia confocale ha evidenziato, nelle cellule LLC-MK2 infettate, la parziale co-localizzazione della proteina DIAPH1 con actina, *alpha*-tubulina acetilata, *beta*-tubulina e la nucleoproteina virale. In particolare, la co-localizzazione con le componenti del citoscheletro era di entità maggiore, oltre che appannaggio di differenti aree citoplasmatiche, nelle cellule LLC-MK2 infettate, rispetto a quelle non infettate.

Infine, l'analisi è stata estesa a cellule dell'epitelio respiratorio umano positive per il virus influenza A, oppure per il virus respiratorio sinciziale; tali cellule derivavano da tamponi faringei e nasali di soggetti ricoverati od osservati ambulatorialmente e pervenuti presso l'Unità Operativa di Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma per la diagnosi di laboratorio di infezione da virus dell'apparato respiratorio. In particolare, nelle cellule positive per il virus influenza A, l'espressione della proteina DIAPH1 risultava accentuata e, al contrario, in quelle positive per il virus respiratorio sinciziale, era di scarsa entità.

I risultati conseguiti rendono ragione dell'elevata complessità del rapporto che intercorre tra virus influenza e cellula ospite e pongono l'accento sulla stretta correlazione con aspetti morfologico-funzionali della cellula infettata. Le osservazioni sperimentali ottenute rafforzano le conoscenze sul fatto che la stabilizzazione dei microtubuli e la polimerizzazione dei microfilamenti, alla cui regolazione partecipano i proteasomi e la formina DIAPH1, possa concorrere in maniera significativa alla modulazione dell'infezione del virus influenza A nelle cellule LLC-MK2.

INTRODUZIONE

IL VIRUS INFLUENZA

Il virus influenza è agente eziologico di sindromi respiratorie acute altamente contagiose. La malattia causata nell'uomo, l'influenza, è caratterizzata da sintomi variabili, che spaziano da lievi affezioni respiratorie, quali riniti o faringiti in presenza di tosse e febbre, a polmoniti dall'esito infausto. Il termine influenza deriva dalla parola latina *influentia*, che veniva utilizzata per indicare che la patologia poteva essere imputabile ad "influenze degli astri".

Le prime descrizioni di epidemie caratterizzate da sintomi simil-influenzali risalgono al V secolo a.C. in Grecia ed eventi analoghi si sono manifestati durante tutta l'era cristiana, attestando che l'influenza è presente da millenni nella popolazione umana.

Nel 1931, il Dottore Richard Shope dimostrò sperimentalmente che l'influenza suina poteva essere trasmessa da secrezioni respiratorie filtrate, evidenziando in tal modo che l'agente eziologico era un virus ¹. Nel 1933, il Dottore Wilson Smith e collaboratori isolarono il virus influenza da individui con sintomi respiratori ². Successivamente, numerosi laboratori di ricerca si dedicarono allo studio dei virus influenzali, allo scopo di creare una rete internazionale di esperti, coordinati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), che erano in grado di monitorare i cambiamenti antigenici dei diversi ceppi influenzali e favorire il controllo della diffusione dell'infezione.

L'influenza costituisce un rilevante problema di sanità pubblica, a causa dell'elevata morbilità e mortalità e della possibilità di generare epidemie o, addirittura, pandemie ³. I dati riportati dall'OMS stimano tra 250.000 e 500.000 i casi di morte all'anno nel mondo, conseguenti a complicanze associate all'influenza ⁴.

La grande rilevanza epidemiologica dei virus influenzali deriva sia dalla capacità di alcuni stipiti circolanti in ospiti aviari di emergere in maniera non prevedibile,

attraverso riassortimento genico o trasmissione diretta, e diffondere nella popolazione umana, sia dalla rapida insorgenza di caratteristiche antigeniche nuove, imputabili a mutazioni geniche intervenute nel corso della replicazione del genoma virale (Figura 1).

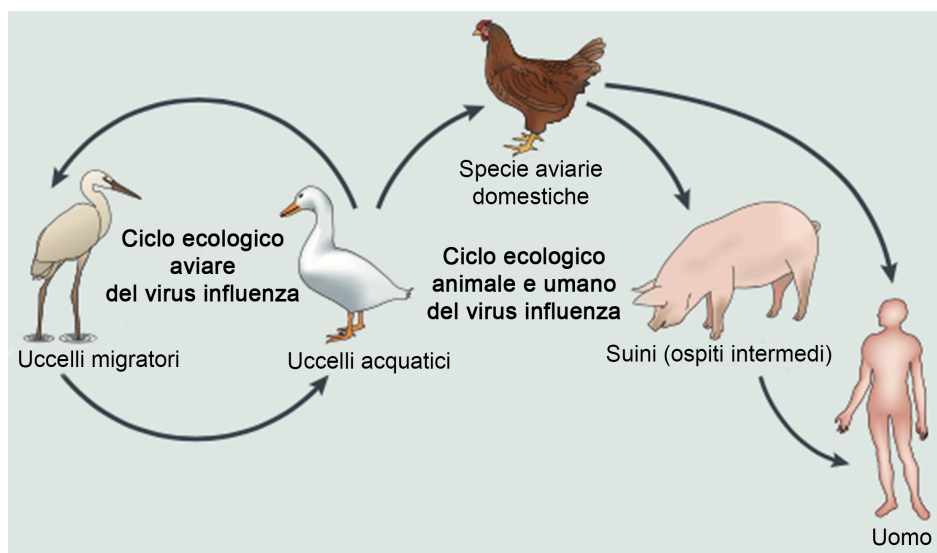


Figura 1. Rappresentazione del ciclo ecologico del virus influenza. Il ciclo ecologico del virus influenza può essere esclusivamente aviare, oppure può coinvolgere sia gli animali sia l'uomo. Per entrare nel ciclo ecologico animale ed umano, gli stipiti influenzali aviari devono prima infettare delle specie aviarie domestiche e, successivamente, i suini, che fungono da ospiti intermedi, facilitando il riassortimento genico dei virus influenzali A. È possibile, anche se rara, la trasmissione diretta di stipiti influenzali da specie aviarie domestiche all'uomo. Immagine modificata da: Shi *et al.* (2014) Nat. Rev. Microbiol. 12:822-831.

Classificazione

I virus influenzali appartengono alla famiglia *Orthomyxoviridae*, costituita dai generi: *Influenzavirus A* (specie: virus influenza A), *Influenzavirus B* (specie: virus influenza B), *Influenzavirus C* (specie: virus influenza C), *Thogotovirus* (specie: virus thogoto), *Isavirus* (specie: virus dell'anemia infettiva del salmone) e *Quaranzavirus* (specie: virus Quarafil e virus Johnston Atoll). I virus influenzali vengono distinti nei tipi A, B e C in base alle differenze antigeniche di due proteine strutturali, la proteina di matrice 1 (M1) e la nucleoproteina virale (NP) ⁵. Inoltre, in base alle caratteristiche antigeniche delle glicoproteine di superficie emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA), è possibile classificare i virus influenzali A in numerosi

































sottotipi, determinati dalle combinazioni delle 18 molecole di emoagglutinina (H1-H18) e delle 11 molecole di neuraminidasi (N1-N11) finora identificate ⁶.

Il virus influenza viene denominato secondo una nomenclatura standard, in base alla quale con la prima lettera viene indicato il tipo e, a seguire, la specie d'origine (nel caso di stipiti non umani), il luogo d'isolamento, il numero dell'isolato, l'anno dell'isolamento e, nel caso del virus influenza A, il sottotipo [ad esempio: A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1)].

Per i virus influenzali B e C, non sono stati identificati dei sottotipi, in quanto tali virus hanno delle caratteristiche antigeniche maggiormente omogenee ⁷.

I virus influenzali A presentano un ampio spettro d'ospite, in quanto numerose specie animali domestiche e selvatiche sono recettive all'infezione, incluso l'uomo. Alcuni studi condotti sul virus influenza A hanno dimostrato che il serbatoio naturale è rappresentato da alcune specie di uccelli acquatici appartenenti agli ordini *Anseriformes* (oche ed anatre) e *Charadriiformes* (trampolieri e gabbiani), sebbene numerose altre specie di uccelli possano essere infettate ^{8,9}. Ad eccezione dei sottotipi H17N10 e H18N11, recentemente isolati in America Latina da pipistrelli frugivori ⁶, tutti i sottotipi finora noti di virus influenzali sono stati isolati da uccelli acquatici (Tabella 1).

Emoagglutinina

| Sottotipo | Uomo | Specie aviarie | Suini | Pipistelli/ altre specie |
|-----------|---|---|---|---|
| H1 |  |  |  | |
| H2 |  |  |  | |
| H3 |  |  |  | Altre specie |
| H4 | |  |  | Altre specie |
| H5 |  |  |  | |
| H6 |  |  | | |
| H7 |  |  | | Altre specie |
| H8 | |  | | |
| H9 |  |  |  | |
| H10 |  |  | | |
| H11 | |  | | |
| H12 | |  | | |
| H13 | |  | | |
| H14 | |  | | |
| H15 | |  | | |
| H16 | |  | | |
| H17 | | | |  |
| H18 | | | |  |

Neuraminidasi

| Sottotipo | Uomo | Specie aviarie | Suini | Pipistelli/ altre specie |
|-----------|---|---|---|---|
| N1 |  |  |  | |
| N2 |  |  |  | |
| N3 | |  | | |
| N4 | |  | | |
| N5 | |  | | |
| N6 |  |  | | |
| N7 |  |  | | Altre specie |
| N8 |  |  | | Altre specie |
| N9 |  |  | | |
| N10 | | | |  |
| N11 | | | |  |

Tabella 1. Sottotipi del virus influenza A: sensibilità di specie. Immagine modificata dal sito web: <http://www.cdc.gov/flu/>. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2014.

Nella popolazione umana, in particolar modo durante il secolo scorso, hanno circolato ampiamente i virus influenzali A di sottotipo H1N1, H3N2, H2N2 e H1N2. Attualmente, sono maggiormente diffusi i sottotipi H1N1 e H3N2. Altri sottotipi, quali H5N1, H7N3, H7N7, H9N2, H7N9, H7N2 e, più recentemente, H6N1 e H10N8, hanno occasionalmente infettato l'uomo, ma non hanno generato infezioni a carattere epidemico, a causa della limitata capacità di trasmissione ¹⁰⁻¹³.

I sottotipi H1N1, H1N2 e H3N2 circolano con elevata frequenza nei suini, ed alcuni stipiti aviari, quali H5N1, H9N2, H4N6 e H3N3, sono stati occasionalmente isolati nei suini ^{14, 15}.

I virus influenzali B e C infettano prevalentemente l'uomo, sebbene i virus influenzali B siano stati anche isolati dalle foche ¹⁶ ed i virus influenzali C dai suini e dai cani ^{17,18}.

Struttura e morfologia

I virus influenzali si presentano all'osservazione al microscopio elettronico come particelle pleomorfe, a morfologia sferica o filamentosa, con un diametro compreso tra 80 e 120 nm ^{5,19} (Figura 2).

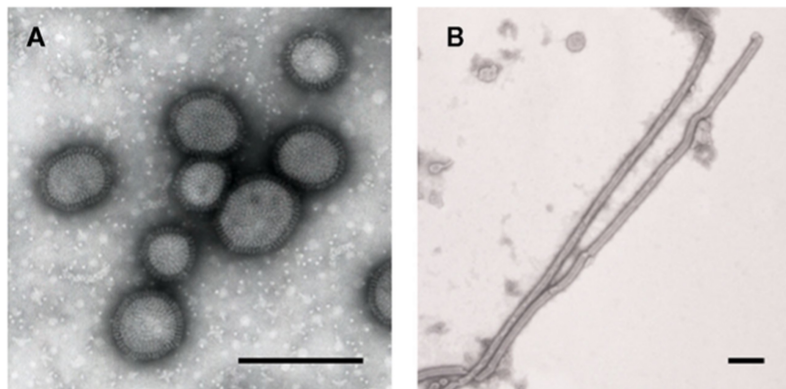


Figura 2. Virus influenzali visualizzati al microscopio elettronico. A) virioni sferici di virus influenza A/NWS/33 (H1N1); B) virioni filamentosi di virus influenza A/Udorn/307/72 (H3N2); barra = 200 nm. Immagine tratta da: Noda (2012) *Front. Microbiol.* 2:269.

Il capsid dei virus influenzali, a simmetria elicoidale, è rivestito da un pericapsid di 9-15 nm di spessore, costituito da un doppio strato lipidico, di derivazione cellulare, in cui sono inserite le glicoproteine emoagglutinina e neuraminidasi ²⁰ (Figura 3).

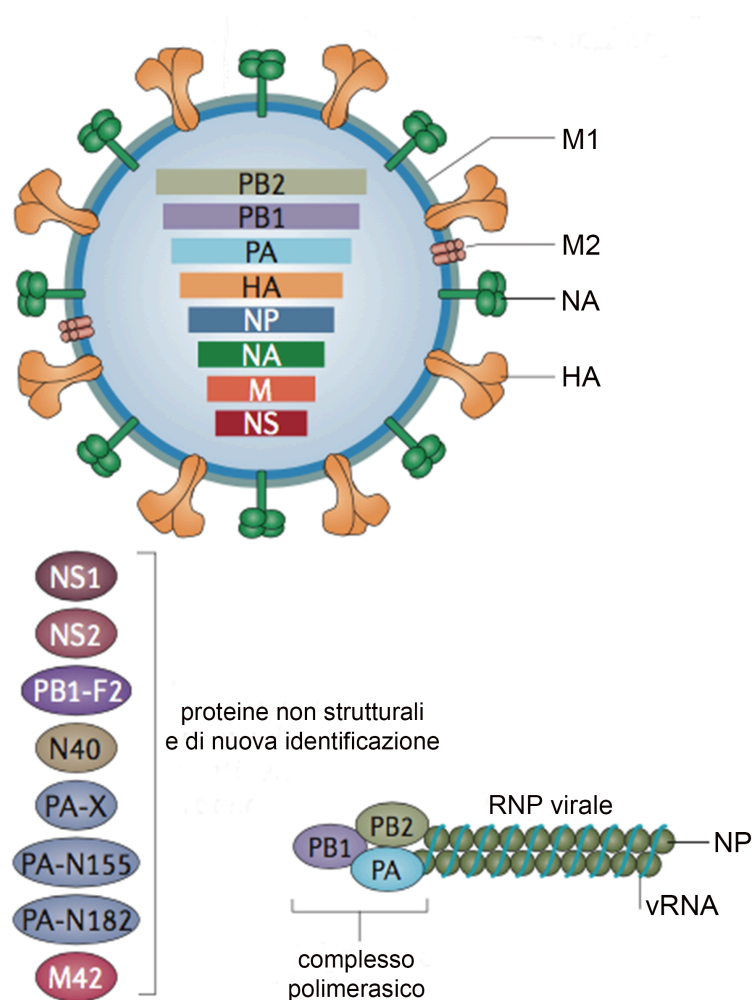


Figura 3. Rappresentazione della struttura del virus influenza A e delle relative proteine. Il genoma del virus influenza A è costituito da 8 segmenti di RNA a singolo filamento, che codificano per proteine strutturali e funzionali. All'interno del virione, ciascuno degli 8 segmenti del genoma forma un complesso ribonucleoproteico (RNP virale): l'RNA virale (vRNA) è associato a molecole di nucleoproteina (NP); questa struttura è, a sua volta, unita al complesso enzimatico RNA polimerasi RNA-dipendente. Immagine modificata da: Shi *et al.* (2014) Nat. Rev. Microbiol. 12:822-831.

L'emoagglutinina è la glicoproteina più abbondante del pericapside virale ed è il determinante antigenico responsabile del tropismo d'ospite, oltre che dell'attività anti-recettoriale ²¹. Tale proteina, che assume una forma di omotrimerico durante il processo di maturazione, è caratterizzata da una testa globulare, posta su uno stelo, dove è presente il sito di legame con il recettore cellulare ¹⁹. La testa dell'emoagglutinina è costituita dalla subunità HA1, mentre lo stelo dalla subunità HA2. Le due subunità presenti nella forma matura della proteina derivano da un precursore inattivo, denominato HA0 ²².

La neuraminidasi, che è il secondo più importante antigene di superficie del virione, è deputata a facilitare il rilascio e la diffusione dei virioni neoformati dalla cellula ospite, attraverso il taglio dei legami glicosidici che si esprimono con i recettori cellulari, rappresentati da residui di acido sialico ²².

La neuraminidasi assume la forma di omotetramero, composto da una testa e da un peduncolo localizzato nella regione amminotermine della proteina, che ne consente l'ancoraggio alla membrana cellulare. La testa è costituita da quattro subunità identiche, con quattro siti catalitici, che sono funzionali al rilascio delle particelle virali neoformate ²³.

Oltre alle suddette glicoproteine, nel pericapside virale si trova una proteina non glicosilata, la proteina di matrice 2 (M2), organizzata in omotetrameri, che funge da canale ionico transmembrana ²⁴.

Nei virus influenzali C è presente una sola glicoproteina di membrana, l'emoagglutinina, con funzione esterasica e fusogena (HEF) ⁵.

La superficie interna del pericapside virale è rivestita dalla proteina di matrice 1 (M1), che è in connessione con il core, costituito da complessi ribonucleoproteici, formati da segmenti di RNA monocatenario associati alla nucleoproteina ed al complesso enzimatico RNA polimerasi RNA-dipendente virale. Quest'ultimo è un eterotrimerico, formato da tre polipeptidi: la proteina acida polimerasica (PA), la proteina basica polimerasica 1 (PB1) e la proteina basica polimerasica 2 (PB2).

Il genoma virale è costituito da otto segmenti (sette per il virus influenza C) di RNA, a singolo filamento e a polarità negativa, che codificano per proteine strutturali e funzionali ²⁵.

Alle estremità di ciascun segmento di RNA virale si trovano delle sequenze nucleotidiche non codificanti. La regione all'estremità 5' di ciascun segmento di RNA virale è caratterizzata da una sequenza di 13 nucleotidi (5'-AGUAGAAACAAGG-3'),

che risulta conservata nei diversi segmenti del genoma virale, come anche nei diversi sottotipi del virus influenza A. Adiacenti ai suddetti nucleotidi si trovano 5 o 8 molecole di uridina, che fungono da segnale di poliadenilazione ²⁶⁻²⁸. Nella regione 3' di ciascun segmento di RNA virale è presente una regione altamente conservata, formata da 12 nucleotidi (3'-UCGUUUUCGUCC-5'), che costituiscono la sequenza promotore alla quale si lega l'enzima RNA polimerasi RNA-dipendente all'inizio dei processi di replicazione e trascrizione del genoma ²⁹. Le regioni non codificanti alle estremità 5' e 3' presentano una certa complementarità tra loro, che genera un ripiegamento dei segmenti di RNA virale ³⁰⁻³³ (Figura 4).

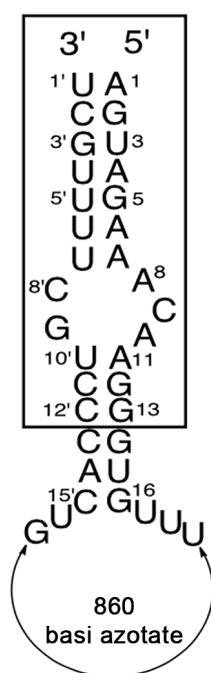


Figura 4. Rappresentazione delle sequenze terminali dei segmenti del genoma del virus influenza A. Le sequenze conservate di 12 e 13 nucleotidi presenti alle estremità 3' e 5', rispettivamente, di ciascun segmento di RNA virale sono indicate dal riquadro. La complementarità tra queste sequenze determina il ripiegamento dei segmenti di RNA virale. Immagine modificata da: Bae *et al.* (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 98:10602-10607.

Ciascun segmento di RNA virale codifica per una o più proteine ^{34, 35}. Più precisamente, il segmento 1 codifica per la proteina PB2 (759 aa) e il segmento 2 per le proteine PB1 (757 aa) e PB1-F2 (87-91 aa). Quest'ultima proteina sembra avere un ruolo importante nel determinare il grado di virulenza dei virus influenzali

A e nel promuovere l'insorgenza di infezioni secondarie batteriche ³⁶; inoltre, è stata dimostrata la sua interazione con due proteine della membrana mitocondriale, che ne aumentano la permeabilità, favorendo il rilascio del citocromo C e l'attivazione della cascata apoptotica ^{37 - 39}. Di recente scoperta è la proteina N40 (718 aa), anch'essa codificata dal gene PB1 e con funzione ancora non nota ^{40, 41}. Il segmento 3 codifica per la proteina PA (716 aa). Recentemente, è stato dimostrato che il segmento 3 codifica anche per la proteina PA-X, con funzione di repressore di geni cellulari. La sintesi della proteina PA-X (252 aa) avverrebbe tramite un processo alternativo di traduzione, che viene utilizzato da alcuni virus per regolare l'espressione genica, mediante un meccanismo di sovrapposizione delle regioni codificanti, che causa uno spostamento di lettura di uno o due nucleotidi ^{42, 43}. Inoltre, il segmento 3 codifica per le proteine PA-N155 (568 aa) e PA-N182 (535 aa), con funzione regolatoria sul ciclo replicativo virale ⁴³. Il segmento 4 codifica per l'emoagglutinina (560 aa), il segmento 5 per la nucleoproteina (498 aa), il segmento 6 per la neuraminidasi (465 aa) ed il segmento 7, tramite un differente processo di maturazione del trascritto primario ("splicing" alternativo), per le proteine di matrice M1 (252 aa) ed M2 (97 aa), oltre che per la proteina M42 (99 aa), che è correlata alla proteina M2 ^{44, 45}. Infine, il segmento 8, tramite un meccanismo di "splicing" alternativo, codifica per le proteine non strutturale 1 (NS1; 217 aa) e non strutturale 2 (NS2 o proteina di esporto nucleare, NEP; 121 aa) ⁴⁶.

Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo dei virus influenzali comprende le seguenti fasi: adsorbimento, ingresso nella cellula ospite, spoliatura, replicazione e trascrizione del genoma, assemblaggio e fuoriuscita della progenie virale dalla cellula ospite (Figura 5).

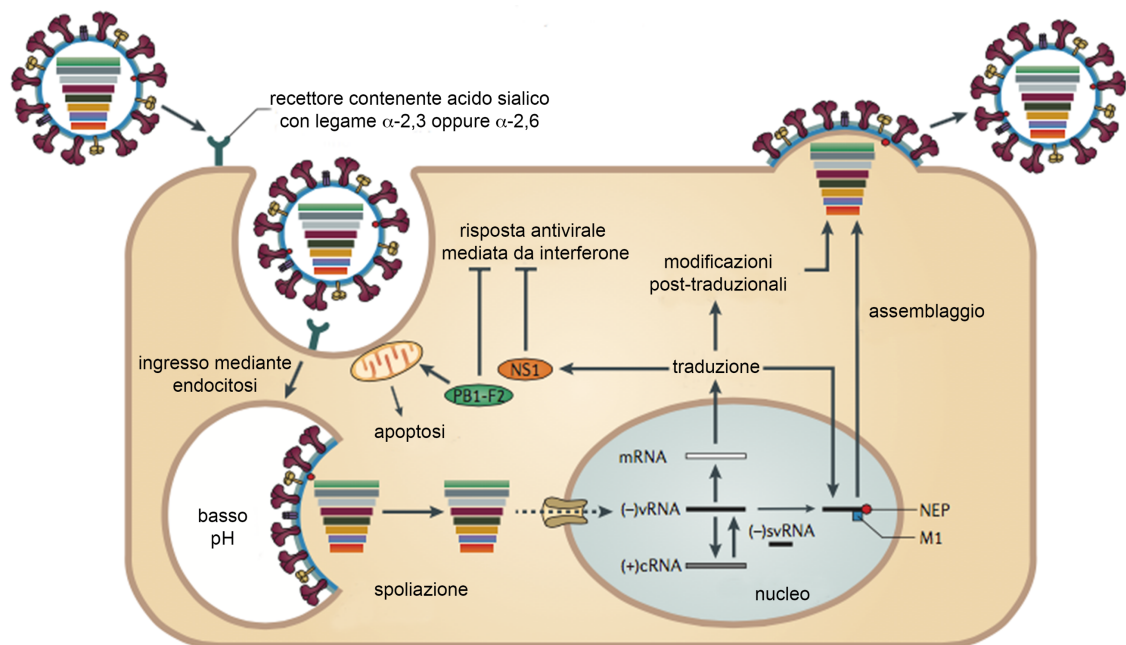


Figura 5. Rappresentazione del ciclo replicativo del virus influenza A. Il virus si lega al recettore cellulare ed entra nella cellula ospite per endocitosi, utilizzando vescicole rivestite di clatrina. Il basso pH dell'endosoma induce un cambiamento conformazionale dell'emoagglutina, che comporta l'esposizione del peptide di fusione presente nella subunità HA2 e la successiva spoliatura del virus. I complessi ribonucleoproteici vengono veicolati al nucleo, dove inizia la trascrizione del genoma virale e la replicazione dell'RNA virale a polarità negativa [(-)vRNA], dando origine a RNA complementari a polarità positiva [(+)cRNA], piccoli RNA virali a polarità negativa [(-)svRNA] ed RNA messaggeri virali (mRNA), che verranno esportati nel citoplasma per la traduzione. Le proteine virali neosintetizzate, necessarie per la replicazione e la trascrizione del genoma virale, vengono trasferite nel nucleo ed i complessi ribonucleoproteici virali neoforniti verranno esportati nel citoplasma per l'assemblaggio. Le proteine mature vengono veicolate all'apparato di Golgi per modificazioni post-traduzionali, ed, infine, trasportate verso la superficie apicale della membrana cellulare, dove avverrà la fuoriuscita dei virioni neoforniti. Immagine modificata da: Medina e García-Sastre (2011) Nat. Rev. Microbiol. 9:590-603.

Il virus influenza si lega, tramite l'emoagglutina, ai residui di acido sialico presenti sulla superficie della cellula ospite ^{47, 48}. L'acido sialico è un monosaccaride a nove atomi di carbonio presente comunemente sulla superficie cellulare e nei fluidi biologici di molte specie animali ^{49, 50}. Inoltre, l'acido sialico occupa le posizioni terminali delle catene oligosaccaridiche di molti glicocongiugati (glicoproteine e glicolipidi). L'acido N-acetilneuraminico e l'acido N-glicolilneuraminico (presente in tutti i mammiferi, tranne l'uomo), sono derivati dell'acido sialico che vengono utilizzati dai virus influenzali quali recettori cellulari ^{49 - 51}. In particolare, il D-galattosio e la N-acetil-D-galattosamina rappresentano, nella maggior parte dei casi, il penultimo residuo della catena oligosaccaridica alla quale è complessato l'acido

sialico. Più precisamente, il carbonio terminale in posizione 2 dell'acido sialico si può legare al carbonio in posizione 3 o al carbonio in posizione 6 del D-galattosio o della N-acetil-D-galattosamina, formando un legame α -2,3 oppure α -2,6. I suddetti legami portano all'insorgenza di specifiche conformazioni dei gruppi glucidici terminali, che modulano il tropismo dei virus influenzali ⁵¹ (Figura 6).

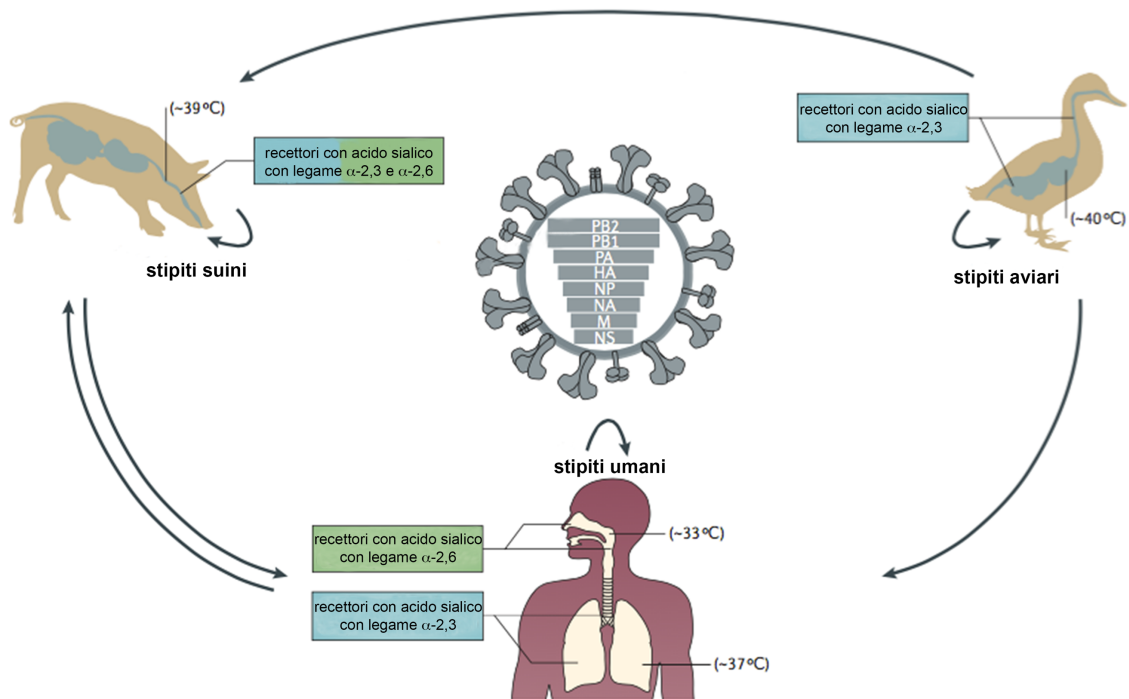


Figura 6. Tropismo del virus influenza A. Sulla superficie dell'epitelio della trachea dei suini sono presenti dei recettori contenenti acido sialico con legami α -2,3 ed α -2,6, che consentono l'adsorbimento di stipiti influenzali aviari ed umani. Gli stipiti influenzali aviari si legano preferenzialmente a recettori contenenti acido sialico con legame α -2,3, presenti nell'epitelio dell'intestino e dell'apparato respiratorio degli uccelli. Gli stipiti influenzali che si sono adattati all'uomo hanno un'elevata affinità per i recettori contenenti acido sialico con legame α -2,6, che sono maggiormente espressi nell'epitelio del tratto respiratorio superiore umano. Immagine modificata da: Medina e García-Sastre (2011) Nat. Rev. Microbiol. 9:590-603.

I virus influenzali aviari si legano preferenzialmente all'acido sialico complessato al D-galattosio con legame α -2,3, mentre gli stipiti umani all'acido sialico complessato al D-galattosio con legame α -2,6 ^{52 - 57}. Sulla superficie apicale delle cellule dell'epitelio respiratorio umano predomina il legame α -2,6, mentre il legame α -2,3 è maggiormente espresso nell'epitelio intestinale degli uccelli ^{52 - 55, 57}. L'epitelio respiratorio dei suini presenta recettori con entrambi i suddetti legami e, pertanto,

tali animali possono essere infettati sia da ceppi influenzali aviari sia da ceppi influenzali umani ^{52, 53}.

Durante la replicazione virale, l'emoagglutinina viene clivata nelle subunità funzionali HA1 e HA2, tramite l'azione di alcune serin-proteasi dell'ospite ⁵⁸.

In seguito al legame tra recettore cellulare e dominio HA1 dell'emoagglutinina, la particella virale viene internalizzata mediante endocitosi in vescicole rivestite di clatrina ⁵⁹⁻⁶¹. Dopo l'internalizzazione, il rivestimento di clatrina viene rimosso e le vescicole si fondono con endosomi primari, caratterizzati da un ambiente moderatamente acido, per poi progredire ad un pH nettamente acido, presente negli endosomi tardivi ^{62, 63}. Gli endosomi vengono trasportati nella regione perinucleare, mediante un meccanismo di traslocazione, mediato da dineina ⁶⁴.

Alcuni dati di letteratura attestano che i virus influenzali, durante il loro ingresso nella cellula ospite, possono anche sfruttare dei meccanismi differenti dall'endocitosi, che peraltro non implicherebbero, in alcuni casi, l'interazione con il recettore cellulare ⁶⁵⁻⁶⁸.

Qualora il virus influenza impieghi il meccanismo dell'endocitosi per entrare nella cellula ospite, il pH acido dell'endosoma è fondamentale per permettere al genoma del virus di liberarsi dal suo rivestimento ⁵¹. Infatti, l'acidificazione del lume dell'endosoma induce un cambiamento conformazionale dell'emoagglutinina, che determina l'esposizione del peptide di fusione presente nel dominio HA2 ²¹. Questo peptide si inserisce nella membrana della vescicola, provocandone la fusione con il pericapside virale. A seguire, l'attivazione dei canali ionici, costituiti dalla proteina di matrice 2, determinerà l'immissione di protoni all'interno del virione, causando la dissociazione tra la proteina di matrice 1 ed i complessi delle ribonucleoproteine virali. Tale processo consente la liberazione dei complessi ribonucleoproteici virali nel citoplasma della cellula ospite ⁶⁹⁻⁷¹, che verranno successivamente veicolati

all'interno del nucleo, utilizzando i segnali di localizzazione nucleare della nucleoproteina virale ^{21,72}.

La trascrizione e la replicazione del genoma virale avvengono nel nucleo, tramite l'azione del complesso enzimatico RNA polimerasi RNA-dipendente. Tale enzima utilizza i segmenti di RNA virale a polarità negativa come stampo per la sintesi di due tipi di RNA a polarità positiva: gli RNA messaggeri (mRNA), funzionali alla sintesi delle proteine virali, e gli RNA complementari (cRNA), che fungono da intermedi per la trascrizione di nuove molecole di RNA virale genomico ⁷³. In particolare, la proteina basica polimerasica 1 si lega sia agli RNA del virus parentale sia ai cRNA. Inoltre, tale proteina funge da subunità catalitica, in quanto contiene dei domini conservati, che sono responsabili dell'elongazione delle catene di mRNA nascenti.

Il complesso polimerasico dei virus influenzali non genera la struttura 5'-cap-metilata per gli mRNA, ma la sottrae agli mRNA cellulari neo-sintetizzati. A tal fine, durante il processo di trascrizione, la porzione 5'-terminale dei pre-mRNA cellulari viene clivata dall'attività endonucleasica della proteina acida polimerasica ("cap snatching") ⁷⁴.

La proteina basica polimerasica 2 è responsabile del riconoscimento e del legame con gli oligonucleotidi contenuti nella regione 5'-cap-metilata dei pre-mRNA cellulari, che vengono utilizzati come "innesco" per la sintesi degli mRNA virali.

L'elongazione delle catene nascenti di mRNA ha termine quando l'RNA polimerasi virale sintetizza una coda di poli A (segnale di poliadenilazione), che deriva dalla trascrizione di 5-7 residui di uracile presenti nel segmento di RNA virale a polarità negativa ⁷³. Gli mRNA virali vengono quindi trasportati nel citoplasma e successivamente tradotti ²¹.

La replicazione del genoma virale non necessita del riconoscimento di sequenze che fungono da innesco, a differenza della trascrizione. Infatti, a seguito della produzione delle prime proteine virali, avviene una transizione dall'attività polimerasica, rivolta alla sintesi degli mRNA, verso quella connessa alla replicazione del genoma virale ⁷³.

I segmenti di RNA virale neosintetizzati vengono trasportati nel citoplasma, grazie all'azione della proteina di matrice 1 e della proteina non strutturale 2. La proteina di matrice 1 permette l'interazione tra i complessi ribonucleoproteici e la nucleoproteina virale, consentendo la formazione di nuovi ribonucleocomplessi virali. Il legame tra proteina di matrice 1, complessi ribonucleoproteici virali, proteina non strutturale 2 e proteina cellulare di mantenimento della regione cromosomica (Crm1) crea un complesso che promuove l'esporto nucleare del genoma virale ⁷⁵.

In seguito ad interazioni con specifiche componenti del citoscheletro, il suddetto complesso verrà veicolato nella sede citoplasmatica di assemblaggio delle nuove particelle virali ⁷⁶.

La proteina di matrice 1 è la proteina più abbondante nei virus influenzali ed ha un ruolo centrale nel processo di gemmazione della progenie virale ⁷⁷, che avviene a livello della membrana plasmatica apicale delle cellule epiteliali (Figura 7).

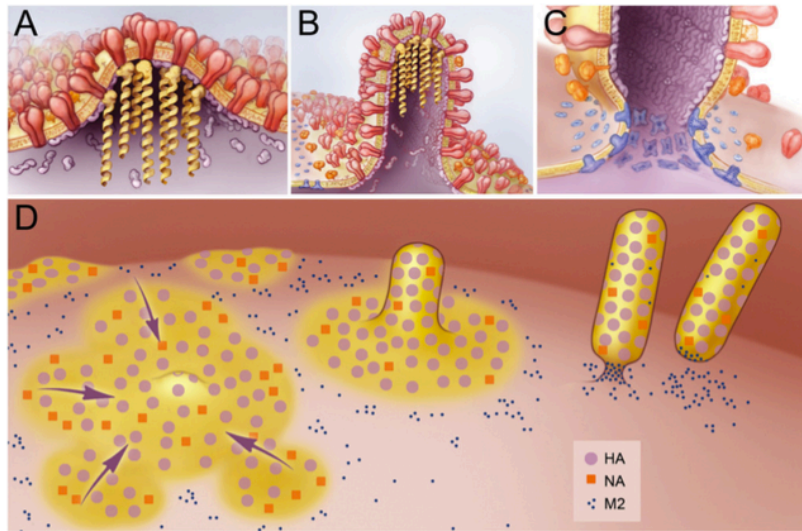


Figura 7. Gemmazione del virus influenza. A) l'emoagglutina (in rosso) e la neuraminidasi (in arancione) si inseriscono nel plasmalemma; la proteina di matrice 1 (in viola) è in connessione con le porzioni terminali dell'emoagglutina e della neuraminidasi e funge da sito di ancoraggio per le ribonucleoproteine virali (in oro); B) progressiva estroflessione del plasmalemma in seguito all'accumulo della proteina di matrice 1; C) reclutamento della proteina di matrice 2 (in blu), mediato dall'interazione con la proteina di matrice 1; D) visione d'insieme del processo di gemmazione. Immagine tratta da: Rossman e Lamb (2011) *Virology*. 411:229-236.

In particolare, la proteina di matrice 1 è responsabile del reclutamento delle componenti virali nel sito di assemblaggio, a seguito della sua interazione con l'emoagglutina, la neuraminidasi e la proteina di matrice 2. Successivamente, la proteina di matrice 1 interagisce con la membrana cellulare, causando un'alterazione strutturale della stessa. L'emoagglutina, la neuraminidasi e la proteina di matrice 2 hanno, nel dominio transmembrana, dei segnali che le veicolano, mediante esocitosi, verso la superficie apicale della membrana cellulare ⁷⁸. Inoltre, l'emoagglutina e la neuraminidasi posseggono delle sequenze segnale che ne consentono l'associazione con domini di membrana arricchiti in colesterolo e sfingolipidi ⁷⁵. Tale interazione prelude alla veicolazione verso la membrana cellulare delle rimanenti componenti virali ¹⁹.

In seguito, la neuraminidasi esplica l'attività sialidasica, tagliando i residui terminali di acido sialico dai gangliosidi e dalle glicoproteine presenti sulla superficie cellulare

e consentendo alle particelle virali neoformate di essere rilasciate dalla cellula ospite. La neuraminidasi rimuove anche i residui di acido sialico presenti sui virioni neoformati, in maniera tale da prevenire l'aggregazione tra diverse particelle virali ed il legame di queste a cellule già infettate ²¹.

Variabilità genetica

I virus influenzali sono molto variabili, in quanto presentano un tasso di mutazione genica che va da 1×10^3 a 8×10^3 sostituzioni nucleotidiche per anno ⁷⁹. L'alto tasso di mutazione porta alla comparsa di nuove varianti antigeniche, che acquisiscono un vantaggio selettivo ⁸⁰. Le proteine maggiormente interessate ai suddetti cambiamenti sono l'emoagglutinina e la neuraminidasi.

L'elevata variabilità dei virus influenzali è, in primo luogo, imputabile al fatto che il complesso polimerasico virale non è in grado di correggere gli errori che si verificano durante la replicazione del genoma virale, causando l'insorgenza di mutazioni puntiformi nei diversi segmenti genici virali e, in particolar modo, in quelli che codificano per le proteine emoagglutinina e neuraminidasi (deriva antigenica) (Figura 8). Questo fenomeno avviene in maniera più rilevante nei virus influenzali A.

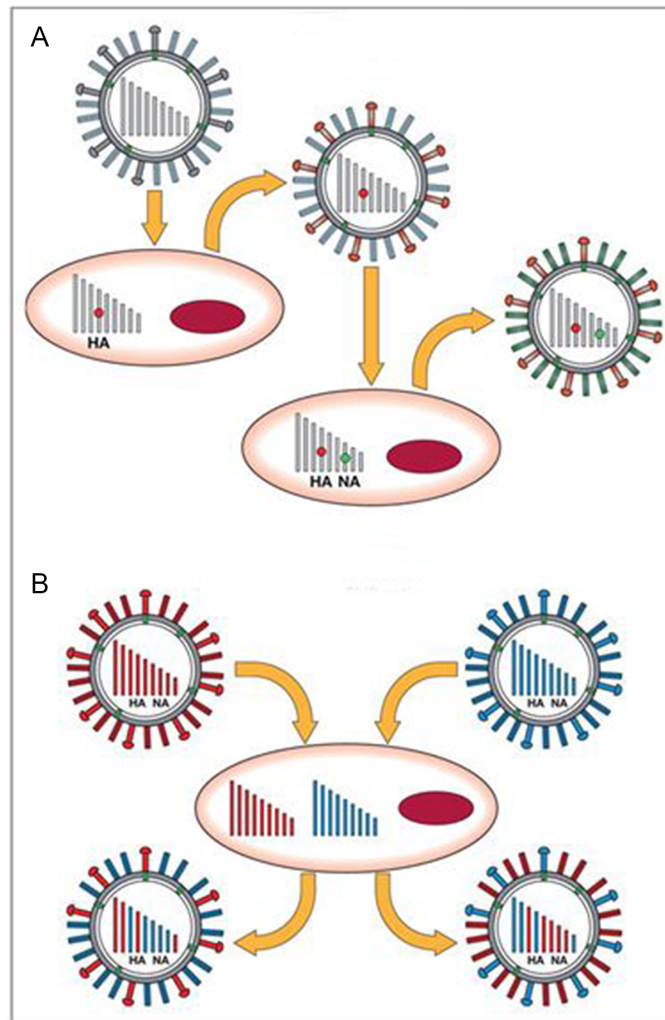


Figura 8. Meccanismi di variabilità genetica dei virus influenzali. A) deriva antigenica, dovuta a mutazioni puntiformi nei geni che codificano per l'emoagglutinina e la neuraminidasi; B) sostituzione antigenica, dovuta a riassortimento genico tra due stipti influenzali, che determina la comparsa di nuovi sottotipi. Immagine tratta da: Antonelli *et al.* (2008) *Principi di Microbiologia Medica*. Casa Editrice Ambrosiana.

Inoltre, vi è un secondo tipo di variazione antigenica, definita sostituzione antigenica, che si può verificare solo nei virus influenzali A. Tale evento consiste nella comparsa di un nuovo ceppo virale con emoagglutinina e/o neuraminidasi di sottotipo diverso da quello circolante. Il fenomeno di sostituzione antigenica è, nella maggior parte dei casi, imputabile ad eventi di riassortimento genico tra ceppi umani ed animali (aviari o suini). Dal momento che il virus influenza possiede un genoma segmentato, la co-infezione di una stessa cellula con due ceppi virali differenti può portare alla formazione di una progenie virale, contenente segmenti

genomici di entrambi i virus parentali. L'animale che consente il suddetto fenomeno è il suino, in quanto, come sopra accennato, possiede, sulla superficie delle cellule dell'epitelio respiratorio, dei residui terminali di acido sialico con legami α -2,3 ed α -2,6 ^{52, 53} (Figura 9).

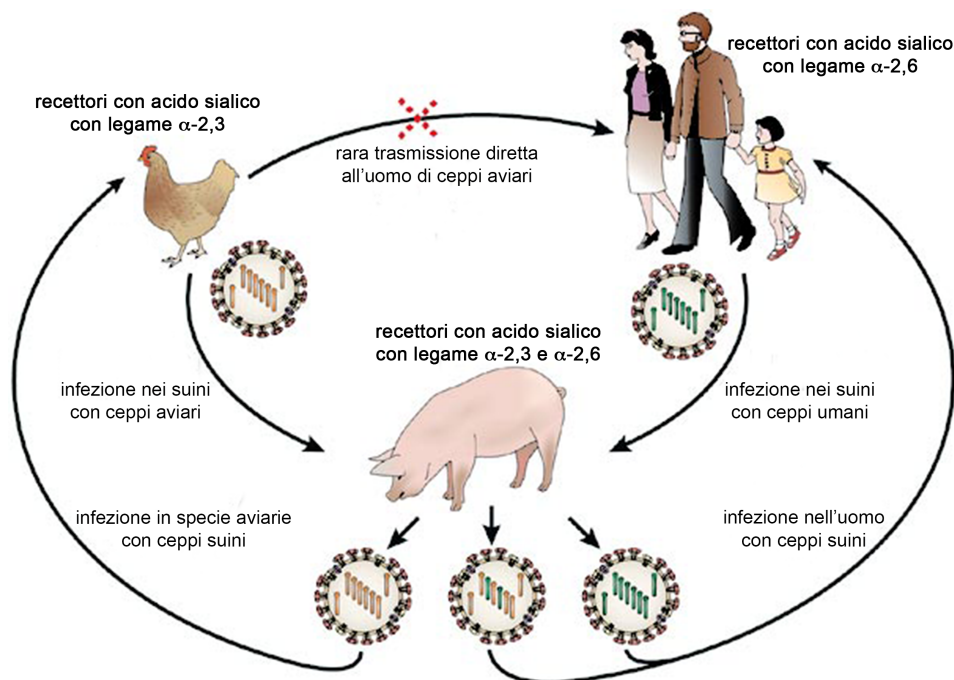


Figura 9. Rappresentazione del meccanismo di riassortimento genico dei virus influenzali. Il riassortimento genico dei virus influenzali si verifica quando stipiti umani ed animali co-infettano la stessa cellula ospite, scambiando tra loro segmenti genici. La comparsa di stipiti influenzali riassortanti con geni provenienti sia da ceppi aviari sia da ceppi umani può avvenire nei suini, in quanto tali ospiti presentano recettori contenenti acido sialico con legami α -2,3 ed α -2,6. Immagine modificata da: Stevens *et al.* (2006) Nat. Rev. Microbiol. 4:857-864.

Il riassortimento fra ceppi che infettano specie differenti è ritenuto responsabile delle pandemie influenzali verificatesi fino ad oggi. Tali pandemie si sono manifestate nel 1918 (influenza spagnola, sottotipo H1N1), nel 1957 (influenza asiatica, sottotipo H2N2) e nel 1968 (influenza di Hong Kong, sottotipo H3N2). In particolare, la pandemia del 1918 ha provocato fino a 50 milioni di morti ⁸¹. Un esempio più recente di pandemia è quella del 2009, sostenuta da uno stipite di virus influenza A di sottotipo H1N1, protagonista di numerosi eventi di riassortimento genico ⁸² e responsabile di più di 500.000 morti ⁸³.

L'alto tasso di mutazione, la possibilità di riassortimento genico e l'ampia varietà di virus influenzali circolanti, rendono ragione della capacità dei virus influenzali di superare le barriere indotte da risposte immunitarie pregresse ⁸⁰. Inoltre, l'elevata variabilità del virus influenza limita l'efficacia della terapia antivirale, a causa della possibile comparsa di fenomeni di farmaco-resistenza. La vaccinazione rappresenta, quindi, la migliore strategia per prevenire/ridurre le possibilità di infezione da parte dei virus influenzali. Tuttavia, le strategie impiegate per lo sviluppo di vaccini proteggenti e capaci di stimolare una risposta immunitaria di lunga durata, non sono risultate, a tutt'oggi, efficaci ⁸⁰. Infatti, la composizione del vaccino anti-influenzale prodotto nel nostro distretto geografico deve essere rimodulata tutti gli anni, sulla base delle caratteristiche antigeniche dei ceppi che hanno avuto maggiore diffusione nel periodo epidemico dell'emisfero meridionale.

IL CITOSCHELETRO CELLULARE

Tra le numerose componenti cellulari implicate nello svolgimento del ciclo replicativo dei virus influenzali è di notevole interesse il citoscheletro cellulare.

Tre sono i principali sistemi citoscheletrici citoplasmatici delle cellule eucariote: i microtubuli, formati prevalentemente da tubulina ed in grado di determinare la posizione degli organelli e dirigere il trasporto intracellulare, i filamenti intermedi, variabili da un tipo cellulare ad un altro ed in grado di fornire un supporto strutturale e resistenza meccanica alla cellula, ed, infine, i microfilamenti, costituiti principalmente da actina e da numerose proteine ad essa correlate, in grado di determinare la morfologia e la motilità cellulare ⁸⁴.

La dinamica di questi sistemi e le loro interazioni risultano di fondamentale importanza per l'espressione di funzioni cellulari già classicamente riconosciute come, ad esempio, la contrazione muscolare, la divisione cellulare e l'ancoraggio della cellula ad un substrato. Oltre a funzioni connesse all'organizzazione architetturale della matrice citoplasmatica, al citoscheletro compete anche la trasduzione di segnali ad attività regolatoria sull'espressione genica, sulla sintesi di RNA e proteine, sulla modulazione del livello intracellulare degli ioni calcio ed, infine, sulla proliferazione cellulare ^{85 - 87}.

I microtubuli

I microtubuli sono formati dalle subunità proteiche *alpha-* (α) e *beta-* (β) tubulina (55 kDa), unite da legami non covalenti (Figura 10).

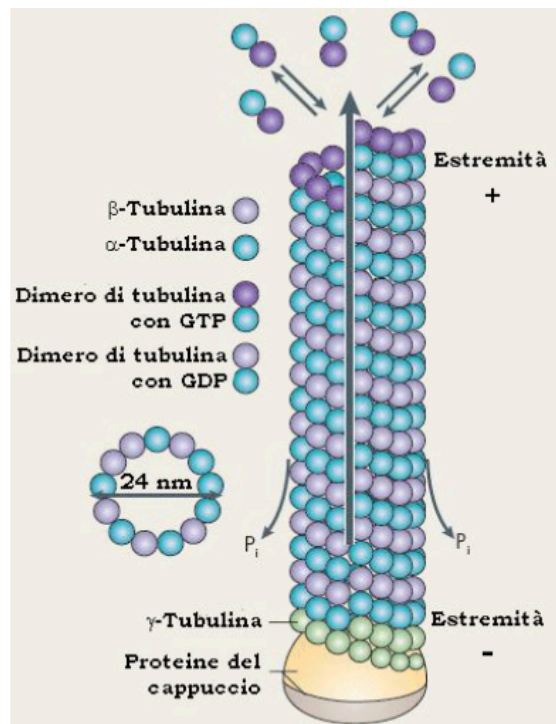


Figura 10. Rappresentazione della struttura dei microtubuli. La subunità di ciascun protofilamento è un eterodimero, formato da monomeri di α - e β -tubulina. La molecola di GTP nel monomero di α -tubulina è legata saldamente e si può considerare parte integrante della proteina, mentre nel monomero di β -tubulina è legata meno stabilmente. Ciascun protofilamento è composto da numerose subunità, adiacenti tra loro e con un orientamento analogo, che si dispongono attorno ad un cilindro cavo. L'estremità negativa di ciascun microtubulo presenta un anello di γ -tubulina, che assicura il corretto assemblaggio dei microtubuli. Immagine modificata da: Conde e Cáceres (2009) Nat. Rev. Neurosci. 10:319-332.

Ciascun monomero di α - o β -tubulina ha un sito di legame per una molecola di guanositri-fosfato (GTP). Il GTP associato al monomero di α -tubulina è localizzato sull'interfaccia del dimero di α - e β -tubulina e non viene mai idrolizzato a guanosindifosfato (GDP), pertanto, può essere considerato parte integrante della struttura dell'eterodimero di tubulina. Invece, il nucleotide GTP associato a β -tubulina può essere anche nella forma idrolizzata (GDP).

I microtubuli sono strutture cilindriche polarizzate, costituite da 13 protofilamenti paralleli, ciascuno dei quali composto da molecole di α - e β -tubulina, e presentano

un diametro esterno di 24 nm. La polarità dei microtubuli è indotta dall'orientamento parallelo delle diverse subunità che li costituiscono. Infatti, questo tipo di orientamento differenzia le estremità di ciascun polimero, consentendo di distinguere un'estremità positiva, dove i processi di polimerizzazione e depolimerizzazione avvengono velocemente, ed un'estremità negativa. Nei microtubuli, le subunità di α -tubulina sono esposte all'estremità negativa e le subunità di β -tubulina all'estremità positiva.

Oltre alle molecole di α - e β -tubulina, è presente, in esigue quantità, γ -tubulina, che costituisce un complesso ad anello (" γ -tubulin ring complex", γ -TuRC), coinvolto nei processi di nucleazione ed assemblaggio dei microtubuli ⁸⁸.

La polimerizzazione dei microtubuli è resa possibile dalla funzione di nucleazione dei centri di organizzazione dei microtubuli (MTOCs), costituiti dai centrosomi e dai corpi basali. I MTOC svolgono funzioni di controllo sul numero dei microtubuli e dei protofilamenti presenti nella cellula, come anche sulla loro polarità.

La crescita dei microtubuli non è un processo continuo e lineare, in quanto il filamento va incontro a fasi alternate di rapida crescita e sfaldamento. Questo processo viene definito "instabilità dinamica" ed è fortemente influenzato dalla specifica funzione che i microtubuli stanno svolgendo all'interno della cellula; per esempio, durante la mitosi, l'instabilità dei microtubuli aumenta, al fine di garantire la formazione del fuso mitotico ⁸⁹ (Figura 11).

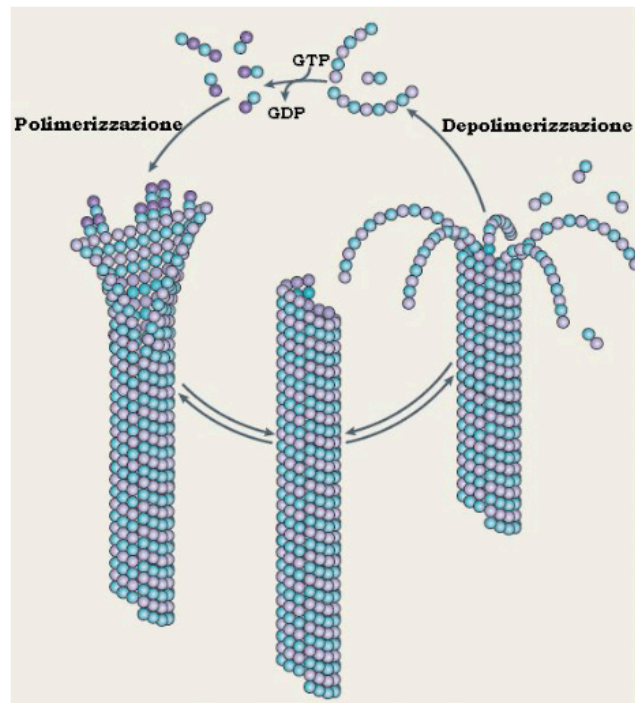


Figura 11. Instabilità dinamica dei microtubuli. Alternanza dei processi di polimerizzazione e depolimerizzazione GTP-dipendenti dei microtubuli. Immagine modificata da: Conde e Cáceres (2009) Nat. Rev. Neurosci. 10:319-332.

Le proteine associate ai microtubuli (“microtubule-associated proteins”, MAPs) svolgono un ruolo di rilievo nel favorirne la polimerizzazione e stabilizzazione, unitamente alle modificazioni post-traduzionali che si esprimono a carico di α - e β -tubulina ⁸⁶.

Tra le molecole associate ai microtubuli figurano le proteine MAP1, MAP2, MAP4 e tau, che sono coinvolte nei processi di polimerizzazione e stabilizzazione dei microtubuli, in quanto ne consentono l’allungamento, diminuendo il disassemblaggio delle molecole di tubulina alle loro estremità.

Tra le proteine MAP, alcune sono in grado di mediare l’interazione dei microtubuli con altre componenti cellulari. Ad esempio, tali proteine sono rilevanti nei neuroni, dove fasci stabilizzati di microtubuli formano il nucleo degli assoni e dei dendriti, che si estendono dal corpo cellulare. Esse hanno un dominio che si lega alla superficie dei microtubuli ed un altro che sporge all’esterno del filamento

citoscheletrico. La lunghezza del dominio sporgente regola le interazioni dei microtubuli con altri microtubuli.

Le cellule che sovraesprimono la proteina MAP2, che presenta un lungo dominio sporgente, formano dei fasci di microtubuli stabili, che sono distanziati tra loro in maniera proporzionale all'estensione laterale di tale proteina ⁹⁰. Al contrario, le cellule che sovraesprimono la proteina tau, caratterizzata da un dominio sporgente corto, formano dei fasci di microtubuli più compatti (Figura 12).

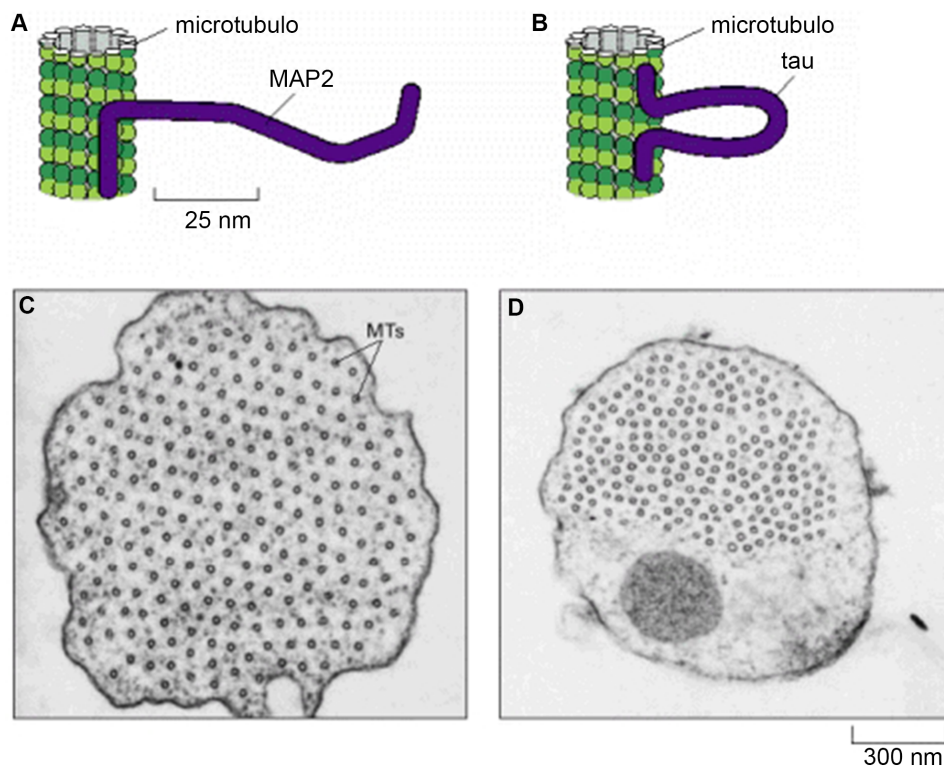


Figura 12. Rappresentazione dell'organizzazione dei fasci di microtubuli da parte delle proteine MAP. A) la proteina MAP2 si lega lungo la superficie dei microtubuli ed estende un lungo dominio, che sporge all'esterno; B) la proteina tau si lega alle estremità N- e C-terminali del microtubulo, formando una corta ansa sporgente. Immagine modificata da: Alberts *et al.* (2011) *Biologia molecolare della cellula*. Garland Science; C) visualizzazione al microscopio elettronico di una sezione trasversale di un fascio di microtubuli in una cellula che sovraesprime la proteina MAP2. La spaziatura regolare dei microtubuli (MTs) dipende dalla lunghezza dei domini sporgenti della proteina MAP2; D) visualizzazione al microscopio elettronico di una sezione trasversale di un fascio di microtubuli in una cellula che sovraesprime la proteina tau. In quest'ultimo caso, i microtubuli sono meno spazati a causa del dominio sporgente ridotto della proteina tau. Immagine modificata da: Chen *et al.* (1992) *Nature*. 360:674-677.

Il dominio delle proteine MAP che si lega ai microtubuli, comprende copie multiple di una sequenza amminoacidica in grado di legarsi a tubulina. Quando queste proteine sono aggiunte ad una soluzione di tubulina pura non polimerizzata, accelerano di molto la nucleazione della stessa, in quanto verosimilmente stabilizzano gli oligomeri di tubulina che si formano precocemente durante la fase di polimerizzazione.

Mentre le proteine MAP2 e tau sono presenti in poche tipologie di cellule dei vertebrati, altre proteine MAP sembrano avere un ruolo centrale nella dinamica dei microtubuli di quasi tutte le cellule eucariotiche.

In particolare, la proteina MAP4 è la principale componente in cellule epiteliali ⁹¹⁻⁹³. Tale proteina è codificata da un singolo gene e possiede tre distinti domini funzionali: un dominio di proiezione (zona N-terminale; aa 1-575), che è in grado di regolare i rapporti tra i diversi microtubuli e quelli dei microtubuli con altre molecole o componenti cellulari ^{94,95}, un dominio ricco di proline (aa 645-895), ed, infine, un dominio che ne rende possibile il legame al microtubulo (porzione C-terminale; aa 902-1090). La proteina MAP4 ha la capacità di contrastare efficacemente la dinamicità dei microtubuli, dal momento che ne favorisce la polimerizzazione e stabilizzazione ⁹⁶.

Dal punto di vista funzionale, i microtubuli svolgono un ruolo di supporto strutturale della cellula, presiedono alla formazione del fuso mitotico, partecipano alla secrezione di ormoni e consentono il trasporto citoplasmatico di organuli e vescicole. In quest'ultima accezione, le proteine motrici associate ai microtubuli, quali le chinesine e le dineine, regolano l'efficienza e la direzionalità delle funzioni di trasporto citoplasmatico. Inoltre, i microtubuli possono supportare le fasi precoci dell'infezione virale, dal momento che vengono cooptati dai virus ai fini del raggiungimento dei siti di replicazione ⁹⁷⁻¹⁰⁷ (Figura 13).

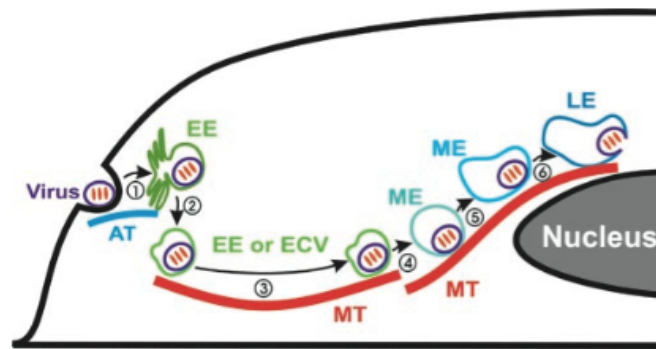


Figura 13. Rappresentazione del trasporto intracellulare dei virus influenzali mediato dai microtubuli. EE: endosoma precoce; AT: actina; MT: microtubuli; ME: endosoma maturo; LE: endosoma tardivo. Immagine tratta da: Lakadamyali *et al.* (2003) PNAS. 100:9280-9285.

I microfilamenti

I microfilamenti sono polimeri elicoidali, a due filamenti, della proteina actina, un polipeptide globulare di peso molecolare pari a 43 kDa (Figura 14).

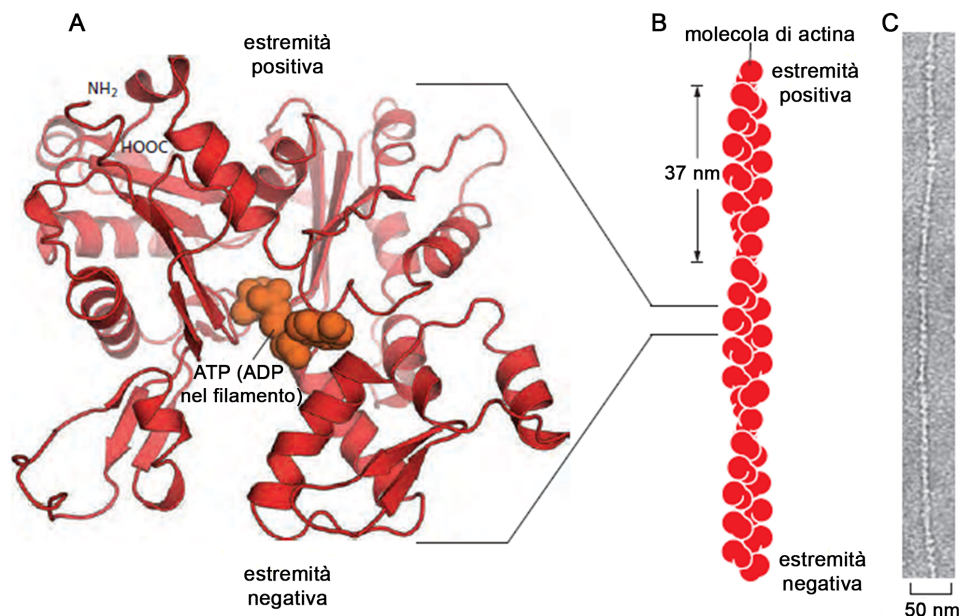


Figura 14. Rappresentazione della struttura dei microfilamenti. A) il monomero di actina è associato ad un nucleotide (ATP o ADP) nel centro della molecola; B) ogni subunità di actina (actina globulare) si può legare ad altre due subunità, formando un polimero lineare. Due polimeri sono avvolti tra loro, come filamenti paralleli di un'elica, con un giro che si ripete ogni 37 nm, e danno origine ad un microfilamento, caratterizzato da un diametro di circa 7 nm (actina filamentosa). Tutte le subunità di actina presenti in un filamento hanno lo stesso orientamento; C) visualizzazione al microscopio elettronico di un microfilamento, previa colorazione negativa. Immagine modificata da: Alberts *et al.* (2011) Biologia molecolare della cellula. Garland Science.

I microfilamenti sono strutture flessibili, con un diametro di 5-9 nm, organizzate in fasci o reti bi- e tri-dimensionali. Essi si concentrano, in particolar modo, a ridosso della membrana plasmatica, formando la cosiddetta “corteccia cellulare”.

Ciascuna subunità di actina ha un sito di legame per il nucleotide adenosintrifosfato (ATP), oppure per il nucleotide adenosindifosfato (ADP). Le subunità di actina si assemblano con un orientamento testa-coda per generare dei filamenti a polarità distinta.

L'assemblaggio dei microfilamenti è strettamente dipendente dalle condizioni dell'ambiente intracellulare, ed, in particolare, dalle tipologie e concentrazioni di ioni, come anche dal legame con l'ATP. I monomeri di actina legati ad ATP tendono ad associarsi con maggiore facilità al filamento in crescita, rispetto ai monomeri in cui l'ATP è stato idrolizzato ad ADP. La presenza nel filamento di actina legata ad ATP identifica l'estremità positiva dello stesso, mentre le molecole di actina legate ad ADP ne costituiscono l'estremità negativa.

Tra i meccanismi che regolano la formazione dei polimeri di actina, predomina il fenomeno del “treadmilling”, ovvero il processo in base al quale un microfilamento è mantenuto ad una lunghezza costante mediante l'aggiunta di subunità di actina ad un'estremità e la simultanea perdita di subunità di actina dall'altra (Figura 15).

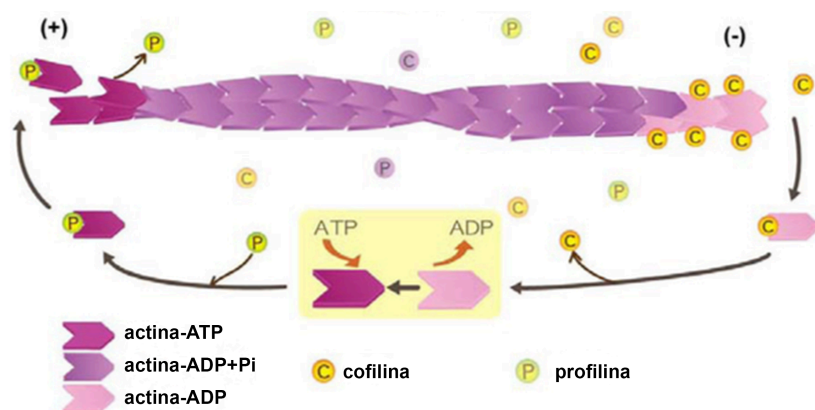


Figura 15. Rappresentazione del processo di assemblaggio dei microfilamenti. Tramite un meccanismo ATP-dipendente (“treadmilling”), le subunità di actina si assemblano all'estremità positiva del filamento (+), mentre si disassemblano da quella negativa (-); il polimero mantiene, in tal modo, una lunghezza costante. Immagine modificata da: Lee e Dominguez (2010) Mol. Cells. 29:311-325.

Esistono diverse proteine deputate alla regolazione dei microfilamenti. Nello specifico, tali proteine sono in grado di depolimerizzare i microfilamenti, di legare i monomeri di actina (per ridurre la concentrazione, e, quindi, la tendenza a formare dei polimeri) e di “incappucciare” l'estremità in crescita dei microfilamenti, allo scopo di evitarne un ulteriore allungamento ¹⁰⁸. Inoltre, vi sono proteine che favoriscono la formazione dei microfilamenti, tra cui profilina, che si lega ai monomeri di actina, oppure proteine che ostacolano la polimerizzazione di actina, tra cui severina, timosina e gelsolina. In aggiunta, vi sono proteine che organizzano i microfilamenti in fasci paralleli, quali fimbrina, α -actinina, tropomiosina, fodrina e villina, ed in reticoli, quale filamina. Infine, vi sono proteine che collegano i microfilamenti alla membrana plasmatica, quali spettrina, distrofina, vinculina, talina e tensina, e proteine che si spostano lungo i microfilamenti, quale miosina. I microfilamenti possono partecipare al sostegno strutturale della cellula, garantendone la forma e la resistenza meccanica, oltre che a funzioni di contrazione, adesione e movimento cellulare. Inoltre, i microfilamenti intervengono nell'apoptosi ed in altri meccanismi che controllano il danno tessutale ¹⁰⁸.

Principali meccanismi di regolazione del citoscheletro

I proteasomi

I proteasomi 26S sono dei complessi multi-enzimatici ad elevato peso molecolare (circa 2.000 kDa), caratterizzati da una struttura quaternaria altamente conservata. Essi costituiscono il principale sistema di degradazione proteica presente nelle cellule eucariote, sia a livello del nucleo sia del citoplasma.

Il proteasoma è costituito da un cilindro cavo centrale (proteasoma 20S) di 14,8 nm di lunghezza e 11,3 nm di diametro, formato da quattro anelli sovrapposti, ciascuno dei quali costituito da sette subunità proteiche ^{109 - 111} (Figura 16).

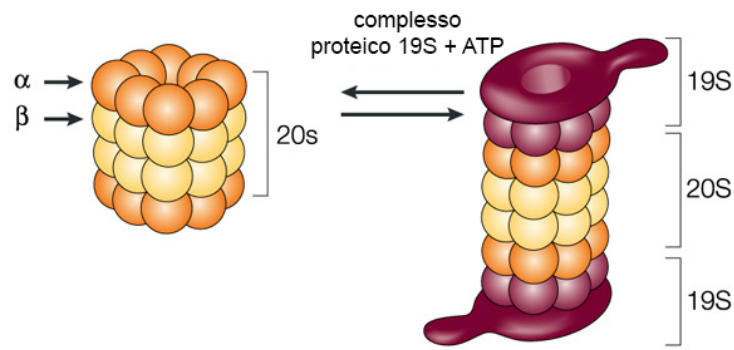


Figura 16. Rappresentazione della struttura del proteasoma. Il cilindro centrale 20S del proteasoma è associato ad un cappuccio 19S a ciascuna estremità. Il cappuccio 19S lega selettivamente le proteine marcate con ubiquitina ai fini della successiva degradazione. Le subunità ATPasiche del cappuccio 19S inducono la perdita della struttura secondaria e terziaria della proteina che deve essere degradata, al fine di facilitarne l'ingresso nella cavità del cilindro 20S, dove è presente il sito catalitico. Immagine modificata da: Adams J. (2004) Nat. Rev. Cancer. 4:349-360.

Alcune subunità proteiche dei proteasomi sono enzimi a funzione proteasica, con siti attivi che si affacciano alla camera interna del cilindro.

Ciascuna estremità del cilindro è normalmente associata ad un complesso proteico (cappuccio 19S), composto da circa venti diversi polipeptidi. Le subunità del cappuccio includono almeno sei proteine che idrolizzano l'ATP, inducendo la perdita della struttura secondaria e terziaria delle proteine da degradare e favorendone la veicolazione nella camera interna del proteasoma.

Con poche eccezioni, i proteasomi agiscono su proteine "marcate" per la degradazione, grazie all'addizione, mediante legami covalenti, di copie multiple di ubiquitina.

L'intervento dei proteasomi nella regolazione di funzioni cellulari in condizioni fisiologiche è supportato da numerosi dati di letteratura ¹¹²⁻¹¹⁴. Alcuni Autori hanno riportato che i proteasomi svolgono un ruolo cruciale nella regolazione dell'assetto del sistema citoscheletrico, regolando la sintesi e la dinamicità dei microtubuli e l'organizzazione del sistema citoscheletrico dei microfilamenti ¹¹⁵⁻¹¹⁹. Ancora aperte e del tutto incomplete rimangono, invece, le conoscenze sull'intervento dei

proteasomi in eventi che comportino un'alterazione del normale equilibrio omeostatico cellulare, quale l'infezione virale. A tal riguardo, recenti dati di letteratura hanno evidenziato che i proteasomi hanno un ruolo regolatorio in fasi precoci e tardive del ciclo replicativo di diversi virus ^{120 - 123}. In particolare, è stato dimostrato l'intervento dei proteasomi durante il processo di internalizzazione dei virus influenzali nella cellula ospite ¹²⁴.

Le formine

Sebbene ai microtubuli e ai microfilamenti competano specifiche funzioni, è stato messo in evidenza che tra tali sistemi citoscheletrici, apparentemente distinti tra di loro, esistono delle interazioni ^{125 - 128}, soprattutto nell'ambito di processi biologici che portano ad una rapida riorganizzazione cellulare in risposta a stimoli esterni, quale l'infezione virale ^{129, 130}. In particolare, un crescente numero di osservazioni sperimentali ha messo in luce che i microtubuli e i microfilamenti cooperano durante una grande varietà di processi cellulari, comprendenti la migrazione cellulare, il trasporto di membrana e la divisione cellulare ^{129, 131, 132}. Inoltre, è stato evidenziato che l'alterazione strutturale di uno dei due sistemi citoscheletrici può avere ripercussioni sull'organizzazione dell'altro ¹³². L'insieme di tali evidenze suggerisce che i microtubuli e i microfilamenti possono interagire sia fisicamente sia funzionalmente, sebbene i meccanismi molecolari che regolano tali interazioni non siano completamente noti ¹³³.

Numerosi studi hanno dimostrato che le formine svolgono un ruolo fondamentale nel rimodellamento del citoscheletro, in quanto sono coinvolte nella polimerizzazione dell'actina e nella stabilizzazione dei microtubuli ^{134 - 138}.

Le formine sono delle grandi proteine (120-220 kDa), altamente conservate e codificate da 15 geni ¹³⁰. Tra queste, spiccano le formine di mammifero omologhe alla

proteina diafano di *Drosophila* (DIAPH), caratterizzate dai seguenti domini: omologia formina 2 (FH2), omologia formina 1 (FH1), diafano inibitorio amminoterminale (DID) e diafano autoregolatorio carbossiterminale (DAD). Inoltre, le formine DIAPH presentano un sito di ancoraggio per l'enzima GTPasi, con funzione regolatoria ¹³⁹⁻¹⁴⁶ (Figura 17).

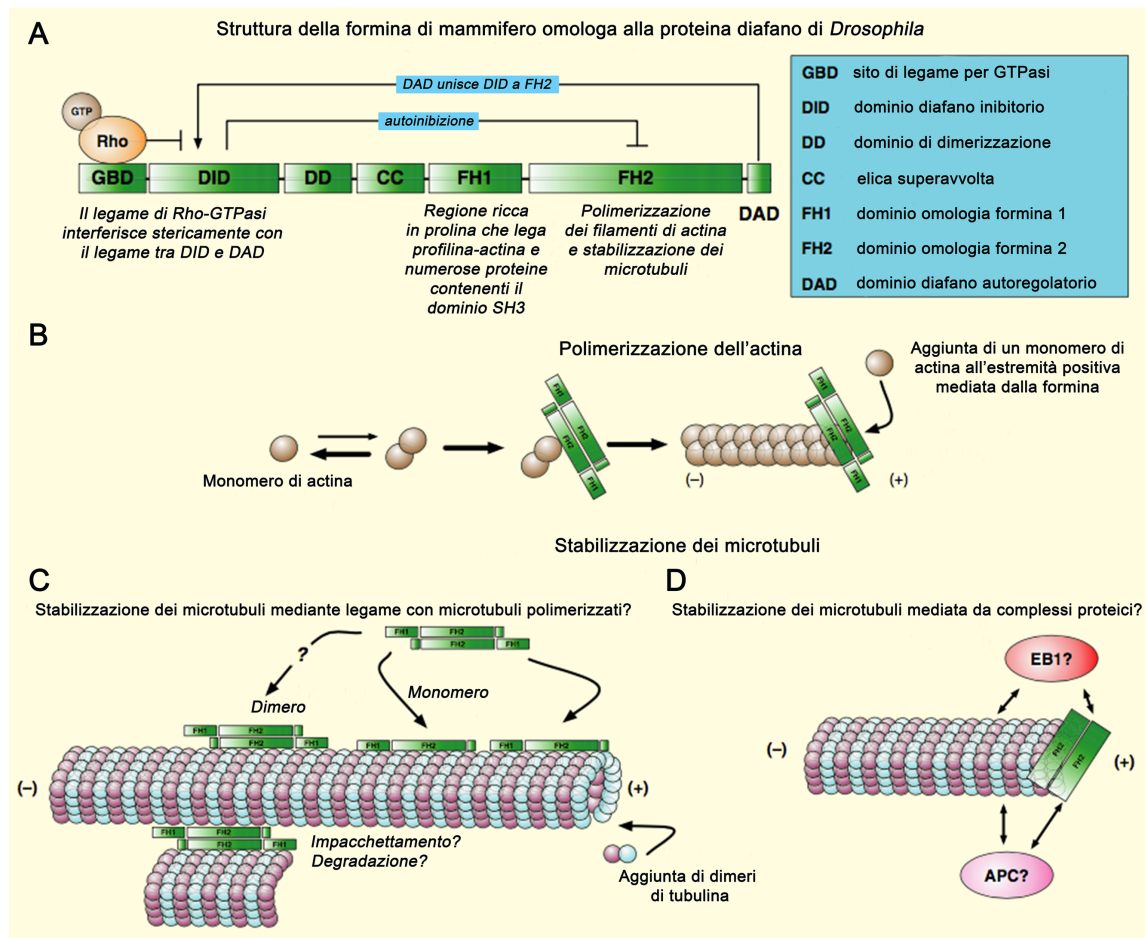


Figura 17. Struttura e meccanismo d'azione delle formine di mammifero omologhe alla proteina diafano di *Drosophila*. A) rappresentazione della struttura della formina di mammifero omologa alla proteina diafano di *Drosophila*; B) le formine sono responsabili della polimerizzazione dei microfilamenti, promuovendo l'aggiunta di monomeri di actina all'estremità positiva (+); C) rappresentazione del meccanismo di stabilizzazione dei microtubuli mediato dalla formina DIAPH2, che si lega direttamente ai filamenti; D) rappresentazione del meccanismo di stabilizzazione dei microtubuli mediato dalla formina DIAPH2, che si associa alle proteine EB1 e APC. Immagine modificata da: DeWard e Alberts (2008) Curr. Biol. 18:605-608.

Le formine esistono normalmente in uno stato inattivo autoinibito, mediato dall'interazione tra i domini DID e DAD ^{139, 143}. L'attivazione delle formine è indotta dall'interazione con l'enzima GTPasi associato a Rho (Rho-GTPasi), che degrada il legame tra DID e DAD ¹³⁷. Questo meccanismo di attivazione consente una precisa

regolazione spaziale e temporale del rimodellamento citoscheletrico mediato dalle formine.

Ad oggi, sono state descritte tre isoforme delle formine di mammifero omologhe alla proteina diafano di *Drosophila*: DIAPH1, DIAPH2 e DIAPH3 ¹⁴⁷. Dati di letteratura riportano che la formina DIAPH1 svolge un ruolo centrale nell'assemblaggio dei monomeri di actina, nella stabilizzazione dei microtubuli e nell'orientamento del fuso mitotico e del centrosoma ^{137, 138, 148 - 153}, mentre le formine DIAPH2 e DIAPH3 sono principalmente coinvolte nella stabilizzazione dei microtubuli ^{134, 154 - 157}.

Il meccanismo di nucleazione ed allungamento dei microfilamenti, attuato dalla formina DIAPH1, è mediato dal dominio FH2, che assembla i nuovi monomeri di actina all'estremità positiva del filamento in crescita ¹³⁸.

Con particolare riferimento al meccanismo di stabilizzazione dei microtubuli attuato dalle formine, è stato evidenziato che, per la proteina DIAPH2, il dominio FH2 si lega direttamente ai microtubuli, riducendone la depolimerizzazione ¹⁵⁷. Altri studi hanno dimostrato che la formina DIAPH2 può associarsi anche indirettamente ai microtubuli, mediante il legame con le proteine EB1 (proteina 1 legata all'estremità, "end-binding protein 1") ed APC (proteina "adenomatous polyposis coli") ^{154, 157}. La proteina EB1 è in grado di legare sia il dominio carbossiterminale della proteina APC ¹⁵⁸ sia l'estremità positiva dei microtubuli, condizionando, in tal modo, il successivo legame a questi della proteina APC ^{159 - 161}. In particolare, è stato descritto che il dominio carbossiterminale della proteina APC interagisce funzionalmente con la proteina EB1 per stabilizzare i microtubuli ¹⁶².

Dal momento che le formine giocano un ruolo centrale nella regolazione delle dinamiche dei microtubuli e dei microfilamenti ¹⁶³ e, in assenza di segnali in grado di promuovere una riorganizzazione del citoscheletro, rimangono inattive e generalmente localizzate in maniera diffusa nel citoplasma ^{164 - 166}, è verosimile

ipotizzare un loro ruolo in corso di infezione virale. A tutt'oggi, sussistono dati parziali ed incompleti, relativi alla partecipazione delle formine alla regolazione del ciclo replicativo virale ^{130, 167, 168}.

Modificazioni post-traduzionali dei microtubuli e dei microfilamenti

Le proprietà dei microtubuli e dei microfilamenti sono strettamente correlate all'interazione degli stessi con numerose molecole, come anche all'insorgenza di modificazioni post-traduzionali.

Tra le modificazioni post-traduzionali che si verificano a carico dei microtubuli, spiccano l'acetilazione, processo in cui l'enzima acetiltransferasi lega un gruppo acetile alla subunità lisina 40 di α -tubulina, la detirosinazione, processo in cui l'enzima carbossipeptidasi rimuove il residuo di tirosina di α -tubulina, inducendo la stabilizzazione dei microtubuli, la poliglutamilazione, che consiste nell'aggiunta di catene di glutammati ai residui di glutammina presenti nelle molecole di α - e β -tubulina, ed, infine, la poliglicilazione, che prevede l'aggiunta di residui di glicina alle molecole di α - e β -tubulina, determinando un'alterazione del legame dei microtubuli ad altre proteine (Figura 18).

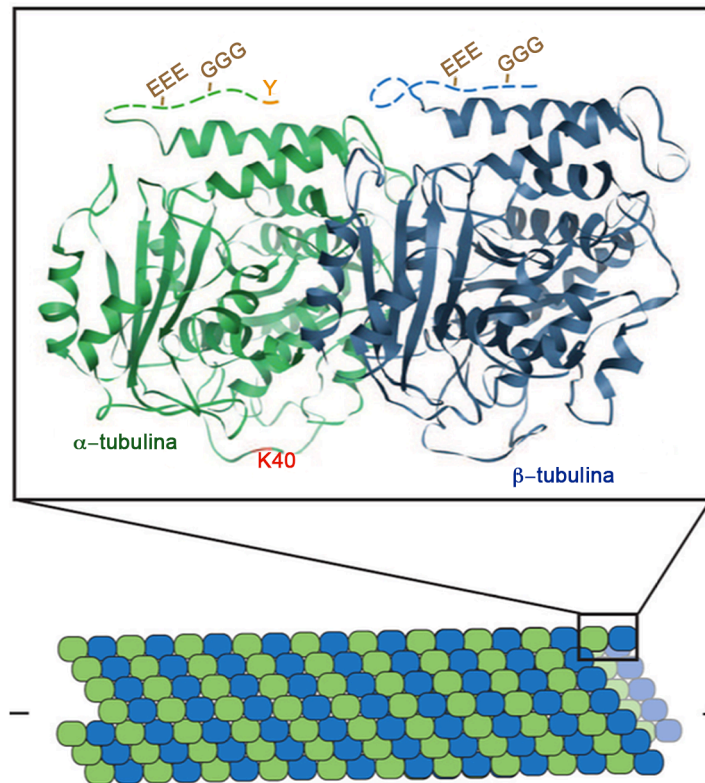


Figura 18. Rappresentazione della localizzazione delle modificazioni post-traduzionali che si esprimono a carico dei microtubuli. Il residuo di tirosina (Y) viene rimosso dalla molecola di α -tubulina in seguito a detirosinazione. La poliglutamilazione (EEE) e la poliglicilazione (GGG) avvengono alle estremità C-terminali di α - e β -tubulina. L'acetilazione prevede l'aggiunta di un gruppo acetile alla subunità lisina 40 (K40) di α -tubulina. Immagine modificata da: Hammond *et al.* (2008) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 20:71-76.

Le modificazioni post-traduzionali più rilevanti dei microfilamenti sono l'arginilazione, la glutationilazione e la fosforilazione.

L'arginilazione è mediata dall'enzima arginiltransferasi e consiste nell'aggiunta di un'arginina all'estremità N-terminale del microfilamento ^{169, 170}, che favorisce la polimerizzazione e l'organizzazione dell'actina in microfilamenti compatti e strettamente interconnessi tra loro ^{170, 171}.

La glutationilazione consiste nell'aggiunta di molecole di glutatione ai residui di cisteina dell'actina, che proteggono tale proteina dallo stress ossidativo ^{172 - 174}. In condizioni di stress ossidativo, la glutationilazione aumenta, diminuendo la

polimerizzazione dell'actina e, quindi, i livelli di microfilamenti presenti nella cellula ^{175, 176}, come anche la riorganizzazione degli stessi ^{174, 177}.

La fosforilazione consiste nell'aggiunta di un gruppo fosfato ai residui di tirosina dell'actina e può avere effetti regolatori sulla polimerizzazione dell'actina ¹⁷⁵ (Figura 19).

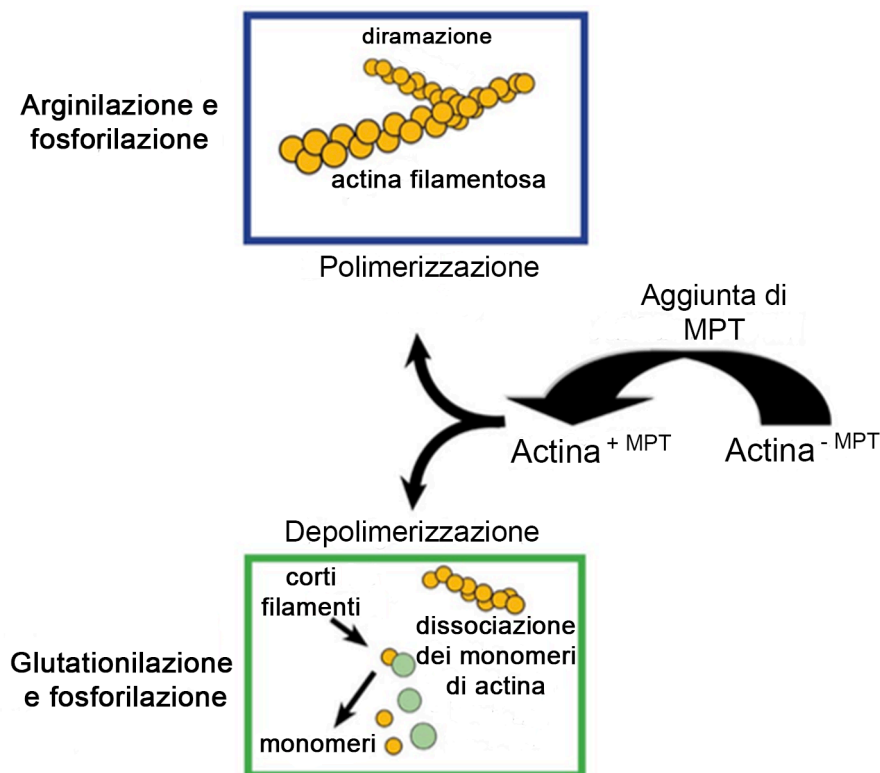


Figura 19. Rappresentazione delle modificazioni post-traduzionali che si esprimono a carico dei microfilamenti. L'arginilazione promuove la polimerizzazione dell'actina, mentre la glutationilazione la riduce. La fosforilazione, invece, può aumentare o diminuire la polimerizzazione dell'actina. MPT: modificazione post-traduzionale. Immagine modificata da: The Protein Experts (2013) Cytoskeleton News, disponibile al sito web: www.cytoskeleton.com/distributors/.

SCOPO DELLA TESI

Le conoscenze sulle strategie messe in atto dai virus influenzali per utilizzare a proprio vantaggio strutture e funzioni vitali della cellula ospite, quali i recettori di superficie, il citoscheletro, le attività endocitiche, il complesso corredo enzimatico e, soprattutto, l'elaborata macchina biosintetica, sono tutt'altro che complete.

In tale ottica, lo svolgimento di un progetto di ricerca volto a mettere in luce l'intervento del citoscheletro cellulare nella modulazione del ciclo replicativo del virus influenza A in cellule di mammifero, potrebbe favorire l'acquisizione di nuove conoscenze sul complesso rapporto che intercorre tra virus e cellula ospite, e, al contempo, costituire un'utile premessa all'individuazione di "interruttori" cellulari, che sono determinanti nell'instaurare una condizione di resistenza o, alternativamente, di sensibilità all'infezione. I risultati ottenuti potrebbero, inoltre, fornire lo spunto per la formulazione di nuovi farmaci ad azione antivirale, anche alla luce del fatto che quelli attualmente disponibili hanno, in alcuni casi, dato luogo a resistenze virali, ed i vaccini prodotti annualmente hanno una distribuzione geografica limitata.

Precedenti risultati del gruppo di ricerca in cui sono stata inserita ai fini dello svolgimento dello studio oggetto della tesi hanno evidenziato che i microfilamenti ed i microtubuli in assetto polimerizzato e stabile ostacolano l'evoluzione del ciclo replicativo dello stipite umano NWS/33 di virus influenza A (H1N1) in cellule LLC-MK2 di rene di scimmia ^{178, 179}. Nello specifico, tali cellule costituiscono un modello semi-permissivo per il virus influenza A/NWS/33, qualora l'infezione sperimentale venga condotta a bassa molteplicità. Inoltre, è stato dimostrato che l'internalizzazione del suddetto stipite influenzale avviene in maniera assai differente, dipendentemente dal modello cellulare coinvolto ⁶⁸.

Sulla base di tali premesse, l'obiettivo principale di questa tesi consiste nel valutare il ruolo svolto da specifici meccanismi di regolazione del citoscheletro cellulare

(microtubuli e microfilamenti) nell'espletamento del ciclo replicativo di stipiti umani ed aviari di virus influenza A (H1N1) nel modello cellulare LLC-MK2. L'attenzione verrà, in particolar modo, focalizzata sul ruolo svolto dai proteasomi e dalla formina omologa alla proteina diafano 1 di *Drosophila* (DIAPH1).

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

I monostrati delle cellule LLC-MK2 (cellule simil-epiteliali in linea continua di rene di scimmia) e MDCK (cellule simil-epiteliali in linea continua di rene di cane) venivano coltivati in terreno Minimum Essential Medium Eagle (E-MEM), contenente L-glutamina (2 mM), antibiotici (penicillina 100 U/ml; streptomina 100 µg/ml) e siero di vitello fetale (10%: terreno di crescita; 1%: terreno di mantenimento) (PAA-The cell culture company). Le colture cellulari venivano incubate a 37°C, in presenza di CO₂ al 5%.

Allestimento di sedimenti cellulari su vetrino portaoggetto

I tamponi nasali e faringei, prelevati da soggetti ricoverati od osservati ambulatorialmente presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e conservati a 4°C in terreno di trasporto per virus [soluzione salina bilanciata di Hank; sieroalbumina bovina (BSA) 0,5%; fungizone 0,005 mg/ml; penicillina 200 U/ml; streptomina 0,2 mg/ml], venivano sottoposti ad agitazione meccanica e trasferiti in provette, prima di essere centrifugati a 1.000 rpm, per 10 minuti a 4°C. Il sedimento cellulare ottenuto veniva risospeso in 5 ml di tampone fosfato salino (PBS) (pH = 7,4) [Na₂HPO₄ (2H₂O) 137 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM; NaCl 135 mM; KCl 2,7 mM], prima della centrifugazione a 1.000 rpm, per 10 minuti a 4°C.

Dopo aver eliminato il soprannatante, il sedimento cellulare veniva nuovamente risospeso in 0,2 ml di PBS e trasferito su vetrino portaoggetto, mediante citocentrifugazione a 1.000 rpm, per 5 minuti a temperatura ambiente. Il preparato ottenuto veniva fissato in acetone, per 10 minuti a -20°C, lasciato asciugare e poi conservato a -20°C, prima di essere sottoposto ad immunofluorescenza indiretta.

Virus

Per le infezioni previste dal protocollo sperimentale, venivano impiegati lo stipite umano NWS/33 (ATTC N°VR-219) e lo stipite aviare Mallard/Italy/303394-11/03 (Istituto Zooprofilattico di Brescia) di virus influenza A, entrambi di sottotipo H1N1. Tali stipiti erano stati precedentemente propagati in uova embrionate di pollo, titolati mediante metodo delle placche e, infine, conservati a -80°C.

Anticorpi

Per il saggio di immunofluorescenza indiretta, venivano impiegati degli anticorpi monoclonali di topo anti-*beta*-tubulina (Sigma-Aldrich; diluizione 1:200), anti-*alpha*-tubulina acetilata (Santa Cruz Biotechnology; diluizione 1:50), anti-subunità *alpha* 1/p27 del proteasoma 20S [donato dal Prof. K. Scherrer (Francia); diluizione 1:10], anti-nucleoproteina virale (NP) del virus influenza A (Argene; diluizione 1:30) ed, infine, anti-subunità F0 e F1 della proteina di fusione del virus respiratorio sinciziale (BioMérieux; diluizione 1:30). Inoltre, venivano impiegati degli anticorpi policlonali di pecora anti-emoagglutinina (HA) del virus influenza A (National Institute for Biological Standards and Control, UK; diluizione 1:35) ed anticorpi policlonali di coniglio anti-proteasoma 20S umano [donato dal Prof. B. Dahlmann (Germania); diluizione 1:100], anti-proteina 4 associata ai microtubuli (MAP4; Millipore; diluizione 1:470) ed anti-proteina di mammifero omologa alla proteina diafano 1 di *Drosophila* (DIAPH1; Sigma-Aldrich; diluizione 1:45).

L'immunoreazione veniva rivelata utilizzando degli anticorpi anti-immunoglobuline di topo, coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC) (Molecular Probes; diluizione 1:470), oppure con isotiocianato di rodamina (RITC) (Molecular Probes; diluizione 1:470). In alternativa, venivano impiegati degli anticorpi anti-

immunoglobuline di coniglio (Li StarFish; diluizione 1:90) oppure anti-immunoglobuline di pecora (ThermoSCIENTIFIC; 1:500), coniugati con FITC.

Inoltre, venivano impiegate le sostanze falloidina, coniugata con FITC oppure RITC (Sigma-Aldrich; diluizione 1:260), per rilevare i microfilamenti, e 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI; 2,5 µg/ml), per il marcaggio della cromatina nucleare, funzionale ad appurare il numero di cellule presenti nel campo microscopico.

Per il saggio di Western blotting, venivano utilizzati degli anticorpi monoclonali di topo anti-*alpha*-tubulina acetilata (Santa Cruz Biotechnology; diluizione 1:150) ed anticorpi policlonali di coniglio anti-MAP4 (Millipore; diluizione 1:1.400), anti-DIAPH1 (Sigma-Aldrich; diluizione 1:170) ed anti-gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH; Sigma-Aldrich; diluizione 1:5.000). Per rivelare l'immunoreazione, venivano utilizzati degli anticorpi anti-immunoglobuline di topo (Sigma-Aldrich; diluizione 1:9.000), oppure anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio, coniugati con fosfatasi alcalina (Sigma-Aldrich; diluizione 1:5.000).

Infezione di monostrati cellulari

Le cellule LLC-MK2 venivano coltivate per 48 ore in "shell vials" o in piastre di Petri a bassa densità iniziale (2×10^5 cellule/"shell vial" e 8×10^5 cellule/piastra di Petri), fino al raggiungimento della confluenza. Dopo aver effettuato due lavaggi con E-MEM senza siero di vitello fetale (E-MEM-S), le cellule venivano infettate con una sospensione virale allestita in E-MEM-S e calcolata in funzione della molteplicità di infezione (unità formanti placca, u.f.p./cellula; m.o.i.) impiegata. Le cellule venivano centrifugate in presenza dell'inoculo virale a 1.000 rpm, per 45 minuti a 4°C, e poi incubate per 25 minuti a 4°C, allo scopo di consentire l'adsorbimento del virus ai recettori cellulari. L'inoculo virale veniva quindi eliminato e sostituito con terreno

E-MEM-S ed i monostrati cellulari venivano incubati per i tempi prestabiliti di infezione.

Trattamento con sostanze

I monostrati di cellule LLC-MK2 venivano sottoposti a trattamento con le sostanze chimiche di seguito elencate.

- Aldeide peptidica Cbz-leu-leu-leucinal (MG132; Sigma-Aldrich), sostanza con azione inibitoria sull'attività proteolitica dei proteasomi, che veniva impiegata alla concentrazione 8 μ M. Le cellule LLC-MK2 venivano pre-trattate o non trattate con MG132 per 30 minuti e poi sottoposte ad infezione sperimentale. Dopo aver eliminato l'inoculo virale, le cellule venivano nuovamente incubate in presenza di MG132. Due ore dopo l'inizio dell'infezione, le cellule venivano lavate con E-MEM-S e mantenute nel medesimo terreno di coltura, in assenza di MG132, per l'intero periodo di infezione. Alternativamente, la sostanza veniva aggiunta 4 ore dopo l'inizio dell'infezione e mantenuta per il periodo previsto dal protocollo sperimentale;
- 1-[1-(4-Fluoro-phenyl)-2,5-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl]-2-pyrrolidin-1-yl-ethanone (IU1; Sigma-Aldrich), sostanza attivatrice dei proteasomi attraverso l'inibizione della deubiquitinazione mediata dall'enzima USP14, che veniva impiegata alla concentrazione 50 μ M. La sostanza IU1 veniva applicata a monostrati di cellule LLC-MK2 per 4 ore e, dopo aver lavato tali monostrati con E-MEM-S, le cellule venivano mantenute nel medesimo terreno di coltura, in assenza di IU1, e processate secondo il protocollo sperimentale previsto;
- $C_{14}H_{11}N_3O_3S$ (nocodazolo; Calbiochem), sostanza in grado di depolimerizzare i microtubuli, che veniva impiegata alla concentrazione 2 μ M. Nocodazolo veniva applicato a monostrati di cellule LLC-MK2 per 2 o 5 ore. Dopo aver lavato tali

monostrati con E-MEM-S, le cellule venivano sottoposte o meno ad infezione sperimentale e mantenute in E-MEM-S, in assenza di nocodazolo, per i tempi previsti. Successivamente, veniva eliminato l'inoculo virale e le cellule venivano mantenute in E-MEM-S per il periodo previsto dal protocollo sperimentale;

- $C_{29}H_{37}NO_5$ (citocalasina B; Sigma-Aldrich), sostanza in grado di depolimerizzare i microfilamenti, che veniva impiegata alla concentrazione 3,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Citocalasina B veniva applicata a monostrati di cellule LLC-MK2 per 2 o 5 ore. Dopo aver lavato tali monostrati con E-MEM-S, le cellule venivano sottoposte o meno ad infezione sperimentale e mantenute in E-MEM-S, in assenza di citocalasina B, per i tempi previsti. Successivamente, veniva eliminato l'inoculo virale e le cellule venivano mantenute in E-MEM-S per il periodo previsto dal protocollo sperimentale.

Immunofluorescenza indiretta

Le cellule LLC-MK2 venivano coltivate in "shell vials", fino al raggiungimento della confluenza. Dopo aver effettuato l'infezione sperimentale e/o i trattamenti con sostanze, i monostrati cellulari venivano lavati con PBS ed, in seguito, fissati/estratti con metanolo, per 10 minuti a -20°C . Per l'osservazione delle componenti del citoscheletro, le cellule venivano lavate con PBS e fissate/estratte con una miscela di acetone e metanolo (1:1), per 10 minuti a -20°C . In alternativa, le cellule venivano lavate con tampone citoscheletro (CSK-B) (pH = 6,9) [NaCl 100 mM; MgCl_2 3 mM; 1,4-piperazine-bis-ethane sulfonic acid (pH = 6,9) 10 mM; saccarosio 300 mM] a 37°C , fissate con paraformaldeide al 2%, per 20 minuti a 37°C , e, successivamente, permeabilizzate con Triton X-100 allo 0,5% in CSK-B, per 15 minuti a 37°C . In seguito, i monostrati cellulari venivano reidratati con PBS, saturati con BSA (pH = 8,0) all'1% in PBS e, successivamente, incubati, per 1 ora a 37°C , in camera umida, in presenza degli anticorpi primari, diluiti in BSA allo 0,2% in PBS. Venivano

poi effettuati tre lavaggi con PBS (5 minuti/lavaggio). L'immunoreazione veniva rivelata con anticorpi secondari, diluiti in BSA allo 0,2% in PBS, in presenza di DAPI. Gli anticorpi secondari venivano lasciati in incubazione per 45 minuti a 37°C, in camera umida. I monostrati cellulari venivano, in seguito, lavati con PBS per tre volte (5 minuti/lavaggio, effettuato al riparo dalla luce) e montati con liquido di montaggio su vetrino portaoggetto.

I sedimenti cellulari allestiti su vetrino portagetto, dopo essere stati scongelati e delimitati con DakoPen (Dako), venivano sottoposti ad immunofluorescenza indiretta, secondo il protocollo sopra riportato, oppure ad una doppia immunoreazione, qualora gli anticorpi primari fossero dello stesso tipo (entrambi monoclonali o policlonali). In quest'ultimo caso, il sedimento cellulare veniva reidratato con PBS e poi saturato con BSA all'1% in PBS. Successivamente, il sedimento cellulare veniva incubato per 45 minuti a 37°C, in camera umida, in presenza degli anticorpi primari, diluiti in BSA allo 0,2% in PBS. Venivano, in seguito, effettuati due lavaggi con PBS (5 minuti/lavaggio). L'immunoreazione veniva rivelata con anticorpi secondari, diluiti in BSA allo 0,2% in PBS, e lasciati in incubazione, per 35 minuti a 37°C, in camera umida. Venivano poi effettuati due lavaggi con PBS (5 minuti/lavaggio, effettuato al riparo dalla luce) ed il sedimento cellulare veniva nuovamente saturato con BSA all'1% in PBS ed incubato per un'ora a 37°C, in camera umida, in presenza degli anticorpi primari, diluiti in BSA allo 0,2% in PBS. Venivano, in seguito, effettuati due lavaggi con PBS (5 minuti/lavaggio, effettuato al riparo dalla luce). L'immunoreazione veniva rivelata con anticorpi secondari, diluiti in BSA allo 0,2% in PBS, e lasciati in incubazione, per 45 minuti a 37°C, in camera umida. Successivamente, venivano effettuati due lavaggi con PBS (5 minuti/lavaggio, effettuato al riparo dalla luce) ed i sedimenti cellulari venivano lasciati asciugare al riparo dalla luce.

Infine, sui sedimenti cellulari veniva dispensata una goccia di liquido di montaggio e posizionato un vetrino coprioggetto.

I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (Leica-DMLB), impiegando un obiettivo 20X a secco, oppure un obiettivo 50X ad immersione.

I reagenti chimici impiegati provenivano dalle ditte: PAA-The Cell Culture Company, Carlo Erba, Fluka Biochemika, Argene, Dako e Sigma-Aldrich.

Silenziamento genico

Per gli esperimenti di silenziamento genico, le cellule LLC-MK2 venivano coltivate per 24 ore in "shell vials", oppure in piastre di Petri a bassa densità iniziale ($1,1 \times 10^5$ cellule/"shell vial"; $5,1 \times 10^5$ cellule/piastra di Petri), fino al raggiungimento del 75% di confluenza. Successivamente, le cellule venivano trattate con i seguenti due tipi di RNA interferenti (siRNA), a doppio filamento e di 19 nucleotidi ciascuno, diretti contro il gene che codifica per la proteina DIAPH1:

DIAPH1a senso: GCAAACAUUUGGUGCUGAA[dt][dt];

DIAPH1a antisenso: UUCAGCACCAAUGUUUGC[dt][dt];

DIAPH1b senso: GCUUCAAGAUCUUCAGGGA[dt][dt];

DIAPH1b antisenso: UCCCUGAAGAUCUUGAAGC[dt][dt].

I suddetti siRNA venivano impiegati alle concentrazioni 20-40 nM per la trasfezione delle cellule LLC-MK2 con il sistema N-TER™ Nanoparticle siRNA Transfection System.

Le cellule trasfettate per 48 ore con i siRNA venivano infettate o non infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione), in terreno E-MEM allo 0,5% di siero e senza antibiotici.

I reagenti impiegati provenivano dalla ditta Sigma-Aldrich.

Valutazione dell'infettività virale mediante titolazione della dose infettante il 50% delle colture di saggio

Allo scopo di valutare l'infettività della progenie virale, il mezzo di coltura dei monostrati cellulari veniva impiegato per la titolazione della dose infettante il 50% delle colture di saggio (TCDI₅₀). A tal fine, venivano allestite in E-MEM-S delle diluizioni seriali in base dieci dei campioni da titolare. Veniva quindi utilizzata una piastra da 96 pozzetti, nella quale, per ciascuna diluizione, venivano distribuiti 100 µl in quattro pozzetti. Inoltre, nella suddetta piastra venivano riservati due pozzetti per il controllo cellule, in cui venivano dispensati 100 µl di E-MEM-S, e due pozzetti per il controllo infezione, nei quali venivano dispensati 100 µl del mezzo di coltura dei monostrati infettati non sottoposti a diluizione. Infine, ad ogni pozzetto venivano aggiunti 100 µl di una sospensione di cellule MDCK ($2,2 \times 10^5$ cellule/ml), allestita in terreno E-MEM al 2,5% di siero, scomplementato a 56°C per 30 minuti. La piastra veniva, successivamente, incubata in termostato a 37°C ed osservata quotidianamente, per 4-5 giorni, al fine di valutare la comparsa dell'effetto citopatico e determinare la dose infettante il 50% delle colture di saggio.

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

Le cellule LLC-MK2, cresciute a confluenza in piastre di Petri, venivano sottoposte o meno a trattamenti con sostanze chimiche, oppure a trasfezione con siRNA per 24-48 ore, ed infettate o meno per i tempi prescelti. Le cellule venivano, in seguito, raccolte in PBS con uno "scraper" e, successivamente, centrifugate a $4.000 \times g$, per 10 minuti a 25°C. Dopo aver aspirato il soprannatante, il sedimento cellulare veniva risospeso in tampone di Laemmli (pH = 6,8) [Tris-HCl (pH = 6,8) 1 M; saccarosio 12%; β-mercaptoetanololo 2%; dodecilsolfato di sodio (SDS) 2%; tracce di blu di

bromofenolo] e, successivamente, sottoposto per 5 minuti a 95°C. Infine, i campioni venivano conservati a -20°C, prima dell'analisi elettroforetica.

L'elettroforesi veniva effettuata con il sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad), sfruttando la combinazione di un gel di impacchettamento ("stacking gel") [acrilammide 4%; bis-acrilammide 0,1%; Tris-HCl (pH = 6,8) 0,12 M; SDS 0,1%; persolfato di ammonio (APS) 0,12%; N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 0,13%] ed un gel di separazione ("running gel") [per la proteina DIAPH1: acrilammide 10%; bis-acrilammide 0,25%; Tris-HCl (pH = 8,7) 0,4 M; SDS 0,1%; APS 0,05%; TEMED 0,06%; per le proteine GAPDH e *alpha*-tubulina acetilata: acrilammide 13%; bis-acrilammide 0,3%; Tris-HCl (pH = 8,7) 0,4 M; SDS 0,1%; APS 0,05%; TEMED 0,06%]. Nei pozzetti preformati del gel di "stacking", venivano caricate uguali quantità di proteine (20 µg) per ciascun campione. Inoltre, un pozzetto del gel veniva utilizzato per caricare una miscela di proteine a peso molecolare noto (14,4-116 kDa; Ustained Protein Molecular Weight Marker, Fermentas, ThermoSCIENTIFIC). La migrazione elettroforetica avveniva in apposito tampone (Tris 37,5 mM; glicina 0,3 M; SDS 0,1%), a 100 V costanti, per circa 2 ore.

Western blotting

Una volta terminata la migrazione elettroforetica, le proteine venivano trasferite elettroforeticamente su una membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad) in apposito tampone (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,35 mM; metanolo 20%), mediante l'utilizzo del sistema Mini Trans Blot Cell (Bio-Rad), a 20 V costanti, per 15-18 ore a 4°C. Dopo il trasferimento, la membrana di nitrocellulosa veniva saturata per 30 minuti con latte magro, mantenendola in agitazione costante a temperatura ambiente. In seguito, la membrana veniva incubata con anticorpi primari diluiti in latte magro, per 1 ora e 30 minuti, in agitazione costante a temperatura ambiente.

La membrana veniva lavata per tre volte con PBS (10 minuti/lavaggio) e, successivamente, incubata per 1 ora in PBS, in agitazione costante a temperatura ambiente, in presenza di anticorpi secondari. Una volta terminato il periodo di incubazione, la membrana veniva lavata per tre volte con PBS (10 minuti/lavaggio) ed, in seguito, sottoposta a rivelazione, mediante impiego del substrato dell'enzima fosfatasi alcalina (Sigma fast BCIP/NBT tablet; Sigma-Aldrich) e fino allo sviluppo di una reazione colorimetrica.

Analisi densitometrica

L'analisi quantitativa dei valori di densità ottica delle proteine oggetto di studio veniva condotta utilizzando lo strumento GelDoc XR (Bio-Rad), mediante il programma informatico Quantity One.

La proteina costitutiva GAPDH veniva rilevata parallelamente alle proteine oggetto di studio nel saggio di Western blotting, allo scopo di verificare la correttezza del caricamento di isoquantità di proteine.

I valori di densità ottica delle proteine oggetto di studio, calcolati dal programma Quantity One, venivano, innanzitutto, rapportati ai corrispondenti valori di densità ottica della proteina GAPDH (*i.e.* normalizzazione). Al valore normalizzato corrispondente alla condizione sperimentale di controllo (*i.e.* cellule non trattate e/o infettate) veniva assegnato un valore pari ad 1. A partire da tale valore, venivano proporzionalmente calcolati quelli relativi alle altre condizioni sperimentali esaminate.

Microscopia confocale

In seguito ad immunofluorescenza indiretta, veniva valutata la localizzazione subcellulare di proteine virali e cellulari nelle cellule LLC-MK2, mediante l'impiego

di un microscopio confocale invertito Zeiss LSM 510 e con un obiettivo ad immersione 63x. I fluorocromi FITC e RITC venivano eccitati da laser argon, nella lunghezza d'onda di 488 nm, e da laser elio-neon, nella lunghezza d'onda di 543 nm. Ciascun monostrato cellulare veniva analizzato, allestendo una serie di piani focali dello spessore di 0,38 μm ciascuno.

I controlli negativi, nei quali gli anticorpi primari venivano sostituiti da BSA allo 0,2%, venivano esaminati parallelamente, per valutare la specificità dei segnali osservati.

Analisi statistica

La significatività delle differenze tra i risultati ottenuti nelle diverse condizioni sperimentali esaminate, veniva appurata impiegando il test *t* di Student a due code. L'analisi statistica veniva condotta con il programma informatico GraphPad Prism (versione 5.0 per Windows). Il valore $P < 0,005$ veniva statisticamente considerato molto significativo, $P < 0,05$ significativo e $P > 0,05$ non significativo.

RISULTATI

**1. RUOLO REGOLATORIO DEI PROTEASOMI SUL SISTEMA CITOSCHELETRICO
DEI MICROTUBULI E SUL CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS INFLUENZA A (H1N1)
NELLE CELLULE LLC-MK2**

Nell'ambito delle componenti e delle funzioni cellulari che svolgono un ruolo regolatorio sul citoscheletro, l'attenzione è stata inizialmente focalizzata sui proteasomi.

Precedenti dati di letteratura del gruppo di ricerca in cui sono stata inserita ai fini dello svolgimento dello studio oggetto di questa tesi hanno dimostrato che i microtubuli in assetto stabilizzato ostacolano lo svolgimento di fasi precoci dell'infezione del virus influenza A/NWS/33 ¹⁷⁹. Inoltre, altri Autori hanno attestato l'intervento dei proteasomi nella regolazione delle fasi precoci dell'infezione del virus influenza ¹²⁴.

1.1. Analisi degli effetti indotti dall'inibizione dell'attività proteolitica dei proteasomi sull'assetto dei microtubuli e sul ciclo replicativo di stipiti di virus influenza A (H1N1) nelle cellule LLC-MK2

Le fasi iniziali dell'attività sperimentale sono state rivolte all'analisi degli effetti indotti dall'inibizione dell'attività proteolitica dei proteasomi sull'assetto dei microtubuli nelle cellule LLC-MK2 non infettate, oppure infettate con i virus influenzali A/NWS/33 ed A/Mallard/03 (m.o.i. = 1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione). Nello specifico, l'inibitore MG132 è stato applicato ai monostrati cellulari dalla quarta alla ventiquattresima ora di infezione virale (trattamento tardivo), allo scopo di garantire sia il corretto svolgimento delle fasi precoci del ciclo replicativo virale, sia l'espressione di modificazioni dell'assetto dei microtubuli, conseguenti al trattamento prolungato con la sostanza.

Mediante saggio di Western blotting, è stata valutata l'espressione di marcatori dei microtubuli in assetto stabilizzato (*i.e.* *alpha*-tubulina acetilata: modificazione post-traduzionale; proteina 4 associata ai microtubuli, MAP4: componente costitutiva dei microtubuli), a confronto con quella della proteina costitutiva gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH; Figura 20).

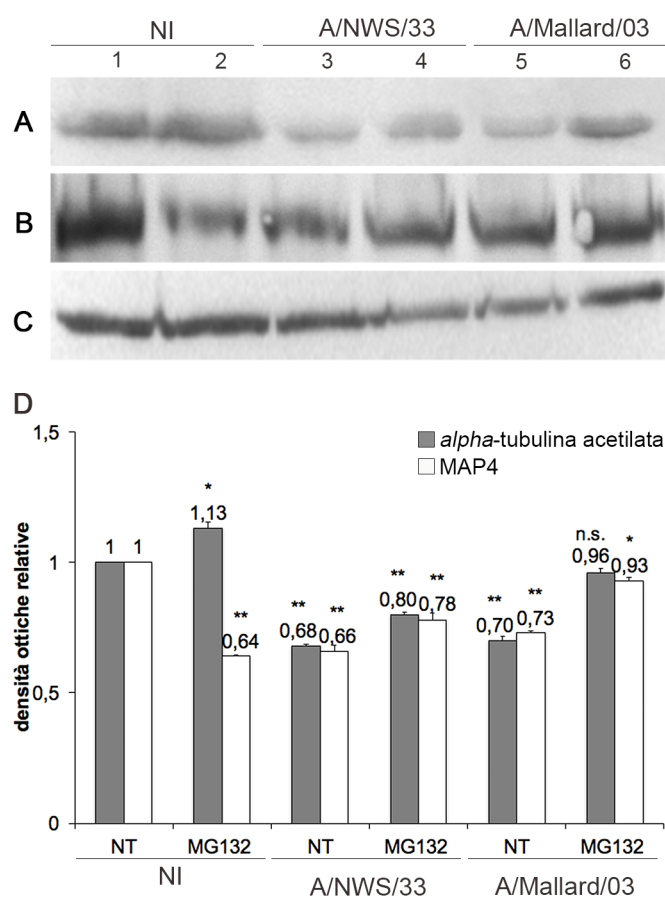


Figura 20. Analisi dell'espressione di marcatori di microtubuli stabilizzati nelle cellule LLC-MK2 sottoposte ad inibizione dell'attività proteolitica dei proteasomi. Le cellule LLC-MK2 venivano (NI) non infettate, (A/NWS/33) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 1 u.f.p./cellula; 24 ore) per 4 ore e (A/Mallard/03) infettate con il virus influenza A/Mallard/03 (m.o.i. = 1 u.f.p./cellula; 24 ore) per 4 ore. Successivamente, le cellule venivano (1, 3, 5) non trattate, oppure (2, 4, 6) trattate con la sostanza MG132 (8 μ M) per il rimanente periodo di infezione (20 ore). In seguito, le cellule venivano analizzate mediante saggio di Western blotting, impiegando degli anticorpi (A) anti-*alpha*-tubulina acetilata, (B) anti-MAP4 e (C) anti-GAPDH, rivelati con (A) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con fosfatasi alcalina e (B, C) anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con fosfatasi alcalina. Nel grafico (D) sono riportati i valori di densità ottica delle proteine *alpha*-tubulina acetilata e MAP4, ottenuti per (NI) le cellule non infettate, (A/NWS/33) le cellule infettate con il virus influenza A/NWS/33 e (A/Mallard/03) le cellule infettate con il virus influenza A/Mallard/03, che venivano (NT) non trattate, oppure (MG132) trattate con la sostanza MG132. I valori di densità ottica riportati corrispondono alla media aritmetica di tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore si riferiscono alle relative deviazioni standard. I valori di significatività (** = $P < 0,005$; * = $P < 0,05$; non significativo, n.s. = $P > 0,05$) sono stati calcolati con il test *t* di Student a due code, rispetto ai relativi controlli.

I risultati ottenuti hanno, innanzitutto, evidenziato la cospicua espressione delle proteine *alpha*-tubulina acetilata e MAP4 nelle cellule LLC-MK2 non trattate con la sostanza MG132 e non infettate (Figura 20A e B: banda proteica 1). Tale osservazione attesta la presenza di microtubuli in assetto fortemente stabilizzato nel modello cellulare oggetto di studio.

L'inibizione dell'attività proteolitica dei proteasomi determinava un lieve aumento dell'espressione di *alpha*-tubulina acetilata ($P < 0,05$) e, al contrario, una rilevante diminuzione ($P < 0,005$) dell'espressione della proteina MAP4 (Figura 20A e B: banda proteica 2 vs 1).

Nelle cellule LLC-MK2 infettate con i virus influenzali oggetto di studio si osservava una diminuzione dell'espressione delle proteine *alpha*-tubulina acetilata e MAP4 ($P < 0,005$), rispetto alle cellule non infettate (Figura 20A e B: bande proteiche 3 e 5 vs 1). In condizioni di inibizione dell'attività proteolitica dei proteasomi, l'espressione delle suddette proteine aumentava nelle cellule infettate, senza però eguagliare quella osservata nelle cellule non infettate e non trattate con la sostanza MG132 (Figura 20A e B: bande proteiche 4 e 6 vs 1).

In parallelo, sono stati valutati gli effetti indotti dall'inibizione dei proteasomi sul ciclo replicativo virale. Inizialmente, l'attenzione è stata focalizzata sulle fasi precoci del ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 6 e 24 ore di infezione) nelle cellule LLC-MK2 (Figura 21). Tramite reazione di immunofluorescenza indiretta, è stata osservata una diminuzione estremamente rilevante ($P < 0,005$ e $P < 0,05$) dell'espressione della nucleoproteina virale (NP), qualora la sostanza MG132 venisse applicata prima dell'infezione virale e mantenuta durante le prime due ore della stessa (trattamento precoce) (Figura 21: MG132 vs NT).

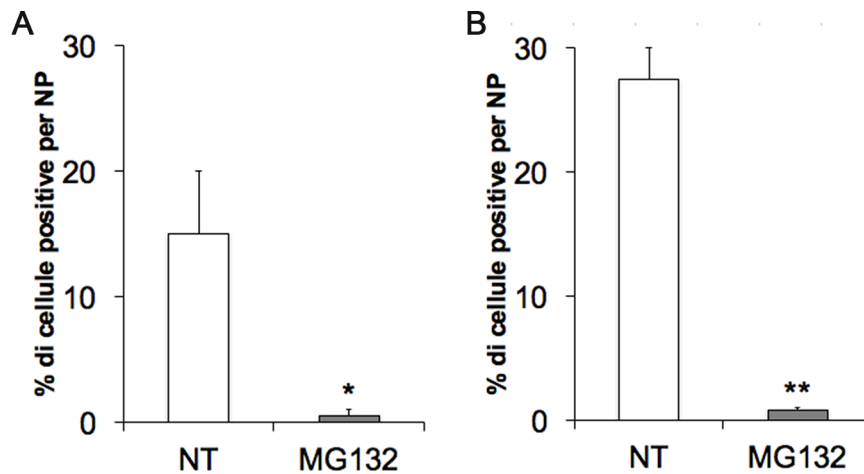


Figura 21. Analisi dell'espressione della nucleoproteina virale nelle cellule LLC-MK2 sottoposte ad inibizione dell'attività proteolitica dei proteasomi in fasi precoci dell'infezione virale. Le cellule LLC-MK2 venivano (NT) non trattate, oppure (MG132) pretrattate per 30 minuti con la sostanza MG132 (8 μ M) e, successivamente, infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula) per (A) 6 ore e (B) 24 ore, (NT) in assenza, oppure (MG132) in presenza dell'inibitore dei proteasomi per le prime due ore dell'infezione virale. Le cellule venivano, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi anti-NP, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina. Nei grafici (A, B) è rappresentata la percentuale di cellule positive per l'espressione della NP, rispetto alla popolazione cellulare totale. I valori riportati rappresentano la media aritmetica di tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore le relative deviazioni standard. I valori di significatività (** = $P < 0,005$ e * = $P < 0,05$) sono stati calcolati con il test *t* di Student a due code, rispetto ai relativi controlli.

I risultati ottenuti attestano il ruolo regolatorio svolto dai proteasomi in fasi precoci dell'infezione virale nelle cellule LLC-MK2. Infatti, l'esigua espressione della nucleoproteina virale osservata nelle cellule trattate con la sostanza MG132 depone per un blocco pressoché totale del ciclo replicativo virale, conseguente all'inibizione dei proteasomi.

Successivamente, il trattamento con la sostanza MG132 è stato dilazionato alla quarta ora di infezione e protratto fino alla ventiquattresima ora della stessa (trattamento tardivo), allo scopo di consentire l'espletamento delle fasi precoci dell'infezione e valutare gli effetti dell'inibizione dei proteasomi sulle fasi tardive della stessa. Inoltre, allo scopo di generalizzare i risultati ottenuti, l'analisi è stata anche rivolta al ciclo replicativo dello stipite aviare A/Mallard/03 (Figura 22).

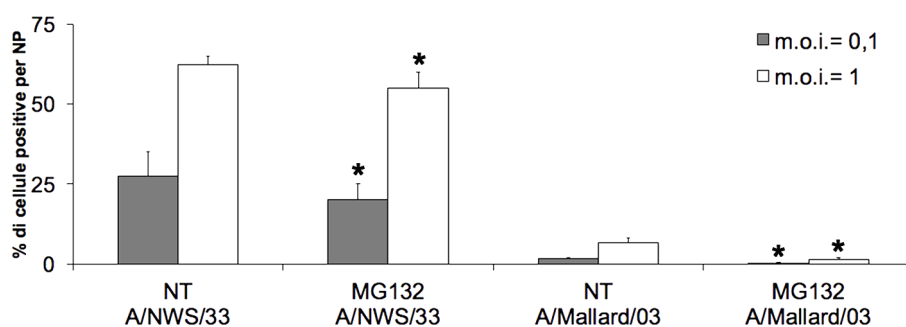


Figura 22. Analisi dell'espressione della nucleoproteina virale nelle cellule LLC-MK2 sottoposte ad inibizione dell'attività proteolitica dei proteasomi in fasi tardive dell'infezione virale. Le cellule LLC-MK2 venivano (A/NWS/33) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 o 1 u.f.p./cellula), oppure (A/Mallard/03) con il virus influenza A/Mallard/03 (m.o.i. = 0,1 o 1 u.f.p./cellula) per 4 ore e, successivamente, (NT) non trattate, oppure (MG132) trattate con la sostanza MG132 (8 μ M) per il rimanente periodo di infezione (20 ore). Le cellule venivano, in seguito, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi anti-NP, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di topo, coniugati con isotiocianato di rodamina. Nel grafico è rappresentata la percentuale di cellule positive per l'espressione della nucleoproteina virale, rispetto alla popolazione cellulare totale. I valori riportati rappresentano la media aritmetica di tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore si riferiscono alle relative deviazioni standard. I valori di significatività (* = $P < 0,05$) sono stati calcolati con il test *t* di Student a due code, rispetto ai relativi controlli.

Dall'analisi in immunofluorescenza, è emerso che il trattamento tardivo con la sostanza MG132 in corso d'infezione con i virus influenzali A/NWS/33 e A/Mallard/03 (m.o.i. = 0,1 e 1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione) aveva delle ripercussioni negative sull'espressione della nucleoproteina virale, che diminuiva in maniera significativa ($P < 0,05$), sebbene gli effetti riscontrati fossero di entità meno rilevante rispetto a quelli osservati in condizioni di trattamento precoce (Figura 22 vs Figura 21).

In parallelo, sono stati determinati, mediante titolazione della dose infettante il 50% delle colture di saggio (TCID₅₀), i titoli della progenie virale emersa dalle cellule LLC-MK2 infettate con i virus influenzali A/NWS/33 e A/Mallard/03 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione), applicando il trattamento tardivo con la sostanza MG132 (Figura 23). I dati ottenuti erano in accordo con gli esiti di immunofluorescenza.

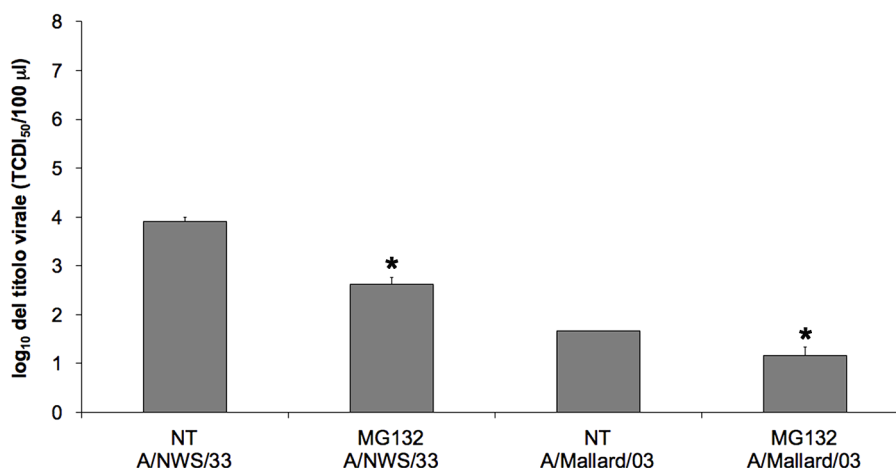


Figura 23. Analisi dei titoli della progenie virale emersa nelle cellule LLC-MK2 sottoposte ad inibizione dell'attività proteolitica dei proteasomi in fasi tardive dell'infezione virale. Le cellule LLC-MK2 venivano (A/NWS/33) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula), oppure (A/Mallard/03) con il virus influenza A/Mallard/03 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula) per 4 ore e, successivamente, (NT) non trattate, oppure (MG132) trattate con la sostanza MG132 (8 µM) per il rimanente periodo di infezione (20 ore). Nel grafico sono rappresentati i logaritmi dei titoli della progenie virale emersa nelle suddette condizioni sperimentali, determinati mediante saggio TCDI₅₀. I valori riportati rappresentano la media aritmetica di tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore si riferiscono alle relative deviazioni standard. I valori di significatività (* = $P < 0,05$) sono stati calcolati con il test *t* di Student a due code, rispetto ai relativi controlli.

In conclusione, i risultati ottenuti attestano che l'inibizione dell'attività proteolitica dei proteasomi in fasi tardive dell'infezione consente la prosecuzione del ciclo replicativo virale, sebbene questo presenti una minore efficienza, rispetto a quello espletato nelle cellule LLC-MK2 non trattate con la sostanza MG132. Inoltre, a differenza del trattamento precoce con MG132, che, per la sua breve durata, non consente l'espressione di modificazioni dell'assetto dei microtubuli (dati non mostrati) e determina un blocco pressoché totale dell'infezione virale, il trattamento tardivo è funzionale ad aumentare la stabilizzazione dei microtubuli nel modello cellulare oggetto di studio e a valutarne le ripercussioni sull'espletamento del ciclo replicativo virale.

1.2. Analisi degli effetti indotti dall'attivazione delle funzioni proteolitiche dei proteasomi sull'assetto dei microtubuli e sul ciclo replicativo di stipiti di virus influenza A (H1N1) nelle cellule LLC-MK2

Allo scopo di approfondire il ruolo regolatorio dei proteasomi sull'assetto dei microtubuli e sull'infezione virale, è stata successivamente impiegata la sostanza IU1, che è in grado di aumentare l'efficienza delle funzioni proteolitiche dei proteasomi, inibendo i processi di deubiquitinazione delle proteine.

Mediante saggio di Western blotting, è stata esaminata l'espressione delle proteine *alpha*-tubulina acetilata e MAP4 nelle cellule LLC-MK2 sottoposte al trattamento con la sostanza IU1 per 4, 6, 8 e 15 ore, rispettivamente (Figura 24: IU1). I risultati ottenuti hanno evidenziato che l'attivazione delle funzioni proteolitiche dei proteasomi per 4-8 ore determina una significativa diminuzione ($P < 0,005$) dell'espressione di *alpha*-tubulina acetilata (Figura 24A: IU1 4-8 ore vs NT). Al contrario, in caso di trattamento per 15 ore con la sostanza IU1, è stata osservata un'espressione della proteina *alpha*-tubulina acetilata di entità paragonabile a quella delle cellule non trattate (Figura 24A: IU1 15 ore vs NT); tale osservazione depone, verosimilmente, per la cessazione dell'attività della sostanza, imputabile al trattamento prolungato.

Il livello di espressione della proteina MAP4, a parità delle condizioni sperimentali sopra riportate, rimaneva invece invariato (Figura 24B: IU1 4-15 ore vs NT).

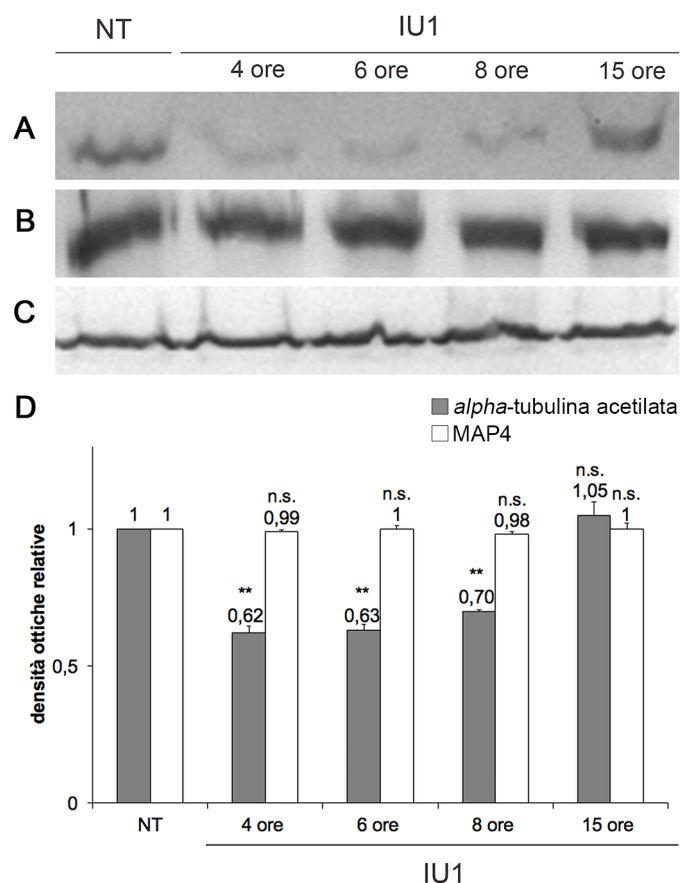


Figura 24. Analisi degli effetti indotti dall'attivazione delle funzioni proteolitiche dei proteasomi sull'espressione di marcatori di microtubuli stabilizzati nelle cellule LLC-MK2. Le cellule LLC-MK2 venivano (NT) non trattate, oppure (IU1) trattate con la sostanza IU1 (50 μ M) per 4, 6, 8 e 15 ore, rispettivamente. In seguito, le cellule venivano analizzate mediante saggio di Western blotting, impiegando degli anticorpi (A) anti-*alpha*-tubulina acetilata, (B) anti-MAP4 e (C) anti-GAPDH, rivelati con (A) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con fosfatasi alcalina e (B, C) anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con fosfatasi alcalina. Nel grafico (D) sono riportati i valori di densità ottica delle proteine *alpha*-tubulina acetilata e MAP4, ottenuti nelle cellule (NT) non trattate, oppure (IU1) nelle cellule trattate con la sostanza IU1 per diversi tempi. I valori riportati corrispondono alla media aritmetica di tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore si riferiscono alle relative deviazioni standard. I valori di significatività (** = $P < 0,005$ e n.s. = $P > 0,05$) sono stati calcolati con il test *t* di Student a due code, rispetto ai relativi controlli.

In parallelo, sono state valutate le ripercussioni indotte dall'attivazione delle funzioni proteolitiche dei proteasomi sul ciclo replicativo virale. A tale fine, le cellule LLC-MK2 venivano pre-trattate per 4 ore con la sostanza IU1, dal momento che tale condizione sperimentale era sufficiente a diminuire l'espressione di *alpha*-tubulina acetilata, come sopra descritto. Successivamente, le cellule venivano infettate con i virus influenzali A/NWS/33 e A/Mallard/03 (m.o.i = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione), in assenza della sostanza IU1 (Figura 25).

Dall'analisi in immunofluorescenza, è stato possibile osservare un significativo aumento ($P<0,005$ e $P<0,05$) dell'espressione della nucleoproteina virale di entrambi gli stipti virali nelle cellule trattate con la sostanza IU1, rispetto alle cellule non trattate (Figura 25A IU1 vs NT).

I titoli della progenie virale emersa in analoghe condizioni sperimentali risultavano in linea con gli esiti di immunofluorescenza (Figura 25B).

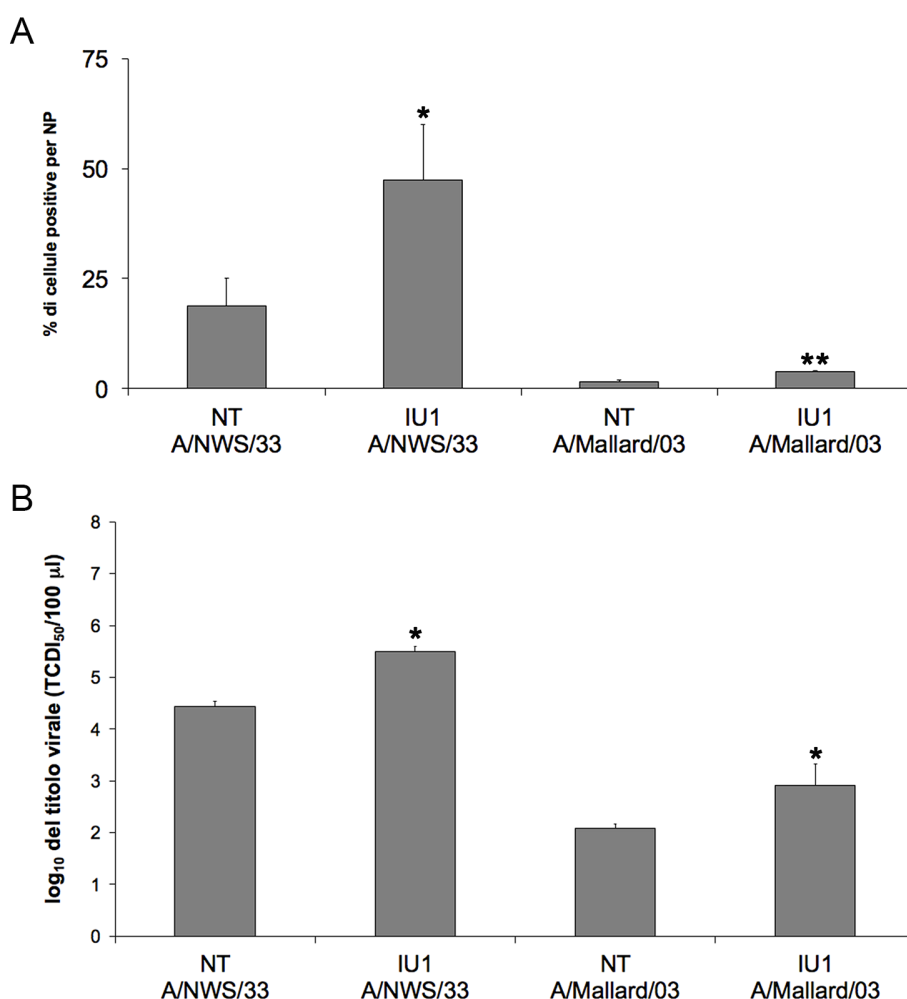


Figura 25. Analisi degli effetti indotti dall'attivazione delle funzioni proteolitiche dei proteasomi sul ciclo replicativo di stipti di virus influenza A nelle cellule LLC-MK2. (A, B) Le cellule LLC-MK2 venivano (NT) non trattate, oppure (IU1) pre-trattate con la sostanza IU1 (50 µM) per 4 ore e, successivamente, (A/NWS/33) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore), oppure (A/Mallard/03) con il virus influenza A/Mallard/03 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore) in assenza della sostanza IU1. Le cellule venivano, in seguito, sottoposte a: (A) reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi anti-NP, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina; (B) determinazione della progenie virale emersa, mediante saggio TCID₅₀. Nei grafici sono rappresentati: (A) la percentuale di cellule positive per la NP, rispetto alla popolazione cellulare totale; (B) i logaritmi dei titoli della progenie virale emersa. I valori riportati rappresentano la media aritmetica di tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore si riferiscono alle relative deviazioni standard. I valori di significatività (** = $P<0,005$ e * = $P<0,05$) sono stati calcolati con il test *t* di Student a due code, rispetto ai relativi controlli.

In conclusione, i risultati ottenuti evidenziano che l'attivazione delle funzioni proteolitiche dei proteasomi all'inizio dell'infezione del virus influenza aumenta la dinamicità del sistema citoscheletrico dei microtubuli e l'efficienza replicativa del virus.

1.3. Analisi della localizzazione subcellulare del proteasoma 20S e della nucleoproteina virale nelle cellule LLC-MK2 infettate con stipiti di virus influenza A (H1N1)

Nell'ottica di valutare la co-localizzazione della nucleoproteina dei virus influenzali A/NWS/33 e A/Mallard/03 con il proteasoma 20S, è stata condotta un'analisi in microscopia confocale, previa reazione di immunofluorescenza, nelle cellule LLC-MK2 infettate con i suddetti virus (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula; 14 ore di infezione; Figura 26). In particolare, il periodo di infezione prescelto era funzionale ad osservare una prevalente localizzazione citoplasmatica della nucleoproteina virale, come anche la comparsa di modificazioni strutturali del citoscheletro.

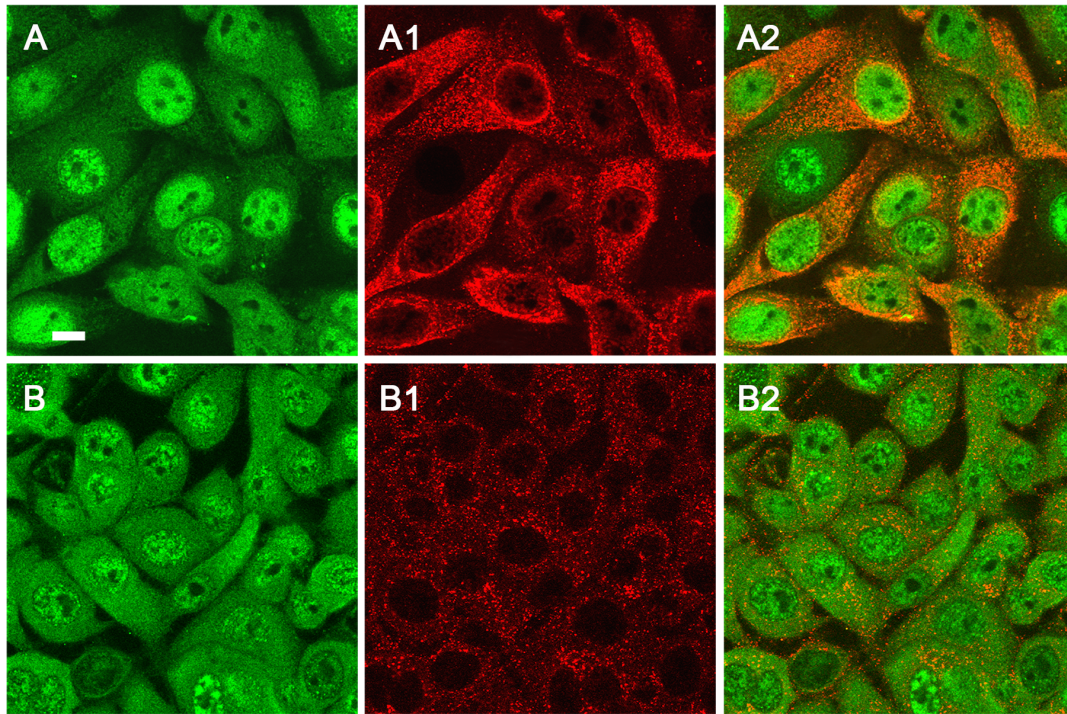


Figura 26. Localizzazione subcellulare del proteasoma 20S e della nucleoproteina virale nelle cellule LLC-MK2 infettate con stipiti di virus influenza A. Le cellule LLC-MK2 venivano (A-A2) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula; 14 ore), oppure (B-B2) con il virus influenza A/Mallard/03 (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula; 14 ore), e, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A, B) anti-proteasoma 20S e (A1, B1) anti-NP, rivelati con (A, B) anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina e (A1, B1) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina. I piani focali mostrati in figura sono rappresentativi della localizzazione subcellulare del proteasoma 20S (in verde) e della nucleoproteina virale (in rosso). Le aree di co-localizzazione appaiono in colore giallo/arancione. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. Barra = 10 μ m.

I risultati ottenuti nelle cellule LLC-MK2 hanno evidenziato che la nucleoproteina virale aveva una distribuzione citoplasmatica di tipo granulare (Figura 26A1 e B1), con un'entità di espressione maggiore nelle cellule infettate con lo stipite NWS/33. Al contrario, il proteasoma 20S presentava una prevalente localizzazione nucleare ed un'esigua espressione nel citoplasma (Figura 26A e B).

La nucleoproteina virale, anche se con un'intensità di segnale più debole per lo stipite A/Mallard/03, co-localizzava parzialmente con il proteasoma 20S nel citoplasma delle cellule LLC-MK2 (Figura 26A2 e B2).

1.4. Analisi della localizzazione subcellulare del proteasoma 20S e dei marcatori dei microtubuli stabilizzati nelle cellule LLC-MK2 non infettate ed infettate con stipiti di virus influenza A (H1N1)

Nell'ottica di approfondire i precedenti risultati, è stata successivamente esaminata la localizzazione, mediante microscopia confocale, del proteasoma 20S, a confronto con quella dei marcatori dei microtubuli in assetto stabilizzato nelle cellule LLC-MK2 non infettate, oppure infettate con i virus influenzali A/NWS/33 ed A/Mallard/03 (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula; 14 ore di infezione).

In seguito ad infezione virale, in particolar modo con lo stipite A/NWS/33, i filamenti di *alpha*-tubulina acetilata risultavano addensati e prevalentemente espressi nella regione perinucleare delle cellule, rispetto a quanto osservato nelle cellule non infettate (Figura 27B1 e C1 vs A1).

I segnali di co-localizzazione tra il proteasoma 20S ed *alpha*-tubulina acetilata nelle cellule LLC-MK2 infettate erano di intensità maggiore e venivano principalmente rilevati nella regione perinucleare delle cellule, a differenza di quelle non infettate, dove erano invece appannaggio di un'area citoplasmatica più ampia, sebbene di entità meno rilevante (Figura 27B2 e C2 vs A2).

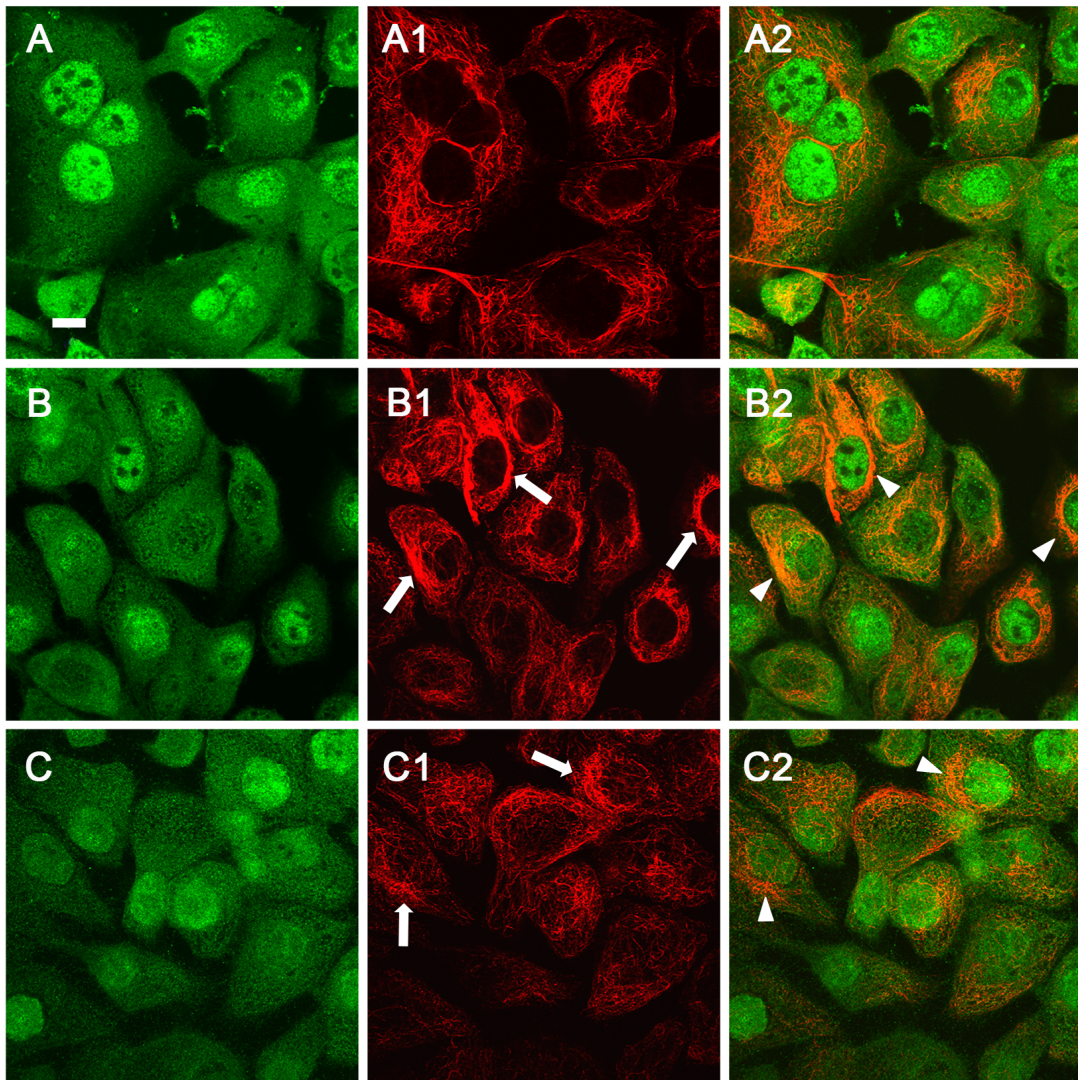


Figura 27. Localizzazione subcellulare del proteasoma 20S e di *alpha*-tubulina acetilata nelle cellule LLC-MK2 non infettate ed infettate con stipiti di virus influenza A. Le cellule LLC-MK2 venivano (A-A2) non infettate, (B-B2) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula; 14 ore), oppure (C-C2) con il virus influenza A/Mallard/03 (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula; 14 ore). Le cellule venivano, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A, B, C) anti-proteasoma 20S e (A1, B1, C1) anti-*alpha*-tubulina acetilata, rivelati con (A, B, C) anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina e (A1, B1, C1) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina. I piani focali mostrati in figura sono rappresentativi della localizzazione subcellulare del proteasoma 20S (in verde) e di *alpha*-tubulina acetilata (in rosso). Le frecce nelle figure B1 e C1 indicano le modificazioni di *alpha*-tubulina acetilata indotte dall'infezione virale ed i triangoli nelle figure B2 e C2 le aree di co-localizzazione tra le componenti cellulari oggetto di studio. Le aree di co-localizzazione appaiono in colore giallo/arancione. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. Barra = 10 μ m.

In una fase successiva, è stata valutata la co-localizzazione tra la proteina MAP4 ed il proteasoma 20S, rivelato mediante l'impiego di un anticorpo in grado di riconoscere la subunità *alpha* 1/p27. L'espressione della proteina MAP4, dopo infezione virale, era meno pronunciata, rispetto a quella osservata nelle cellule non infettate (Figura 28B1 e C1 vs A1). L'espressione del proteasoma 20S, al contrario, risultava maggiormente accentuata, soprattutto nella regione perinucleare delle cellule LLC-MK2.

I segnali di co-localizzazione tra il proteasoma 20S e la proteina MAP4 nelle cellule infettate con i virus influenzali A/NWS/33 ed A/Mallard/03 (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula; 14 ore di infezione) erano di entità maggiore e appannaggio di un'ampia regione citoplasmatica, rispetto a quelli riscontrati nelle cellule non infettate, dove erano pressoché esclusivamente confinati alla regione perinucleare (Figura 28B2 e C2 vs A2).

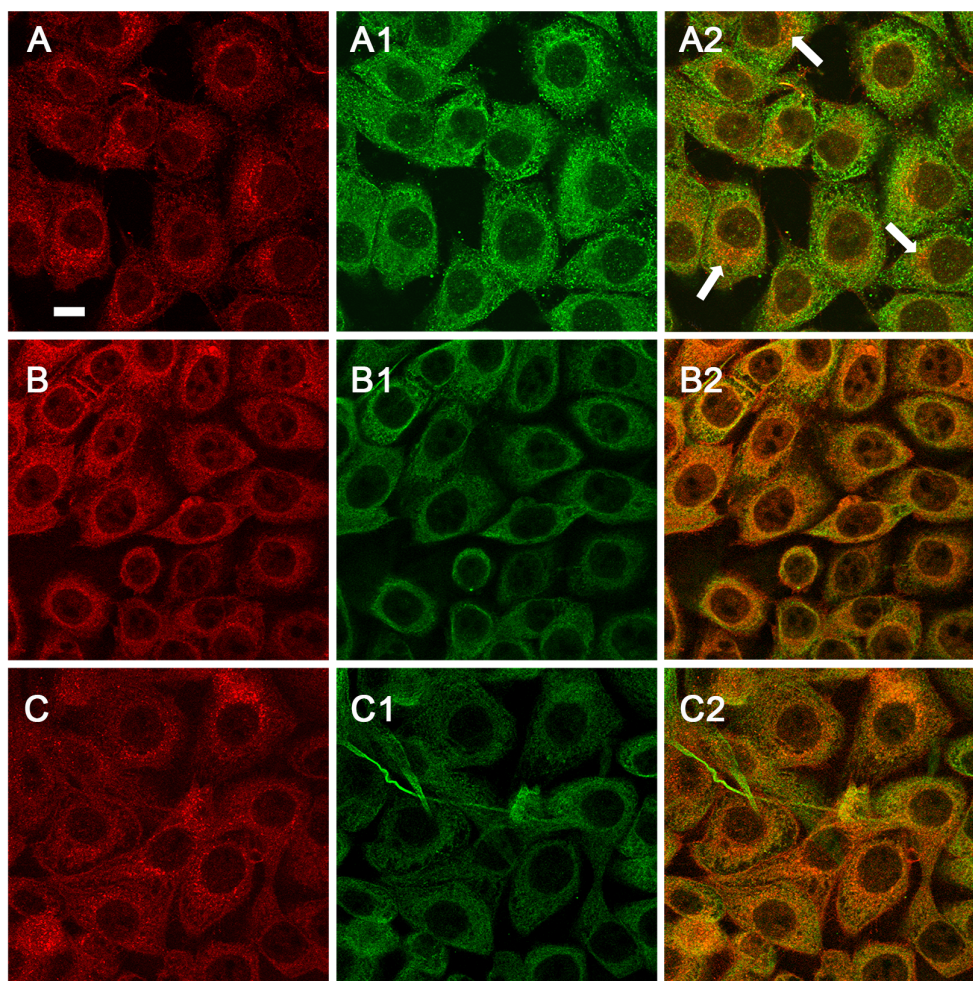


Figura 28. Localizzazione subcellulare del proteasoma 20S e di MAP4 nelle cellule LLC-MK2 non infettate ed infettate con stipiti di virus influenza A. Le cellule LLC-MK2 venivano (A-A2) non infettate, (B-B2) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula; 14 ore), oppure (C-C2) con il virus influenza A/Mallard/03 (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula; 14 ore). Le cellule venivano, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A, B, C) anti-subunità *alpha* 1/p27 del proteasoma 20S e (A1, B1, C1) anti-MAP4, rivelati con (A, B, C) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina ed (A1, B1, C1) anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina. I piani focali mostrati in figura sono rappresentativi della localizzazione subcellulare della subunità *alpha* 1/p27 del proteasoma 20S (in rosso) e della proteina MAP4 (in verde). Le aree di co-localizzazione appaiono in colore giallo/arancione. Le frecce nella figura A2 indicano le aree di co-localizzazione tra le proteine oggetto di studio. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. Barra = 10 μ m.

In conclusione, l'analisi in microscopia confocale attesta la presenza di una parziale co-localizzazione tra il proteasoma 20S e la nucleoproteina virale nelle cellule LLC-MK2 infettate con gli stipiti di virus influenza A oggetto di studio. Inoltre, in condizioni di infezione sperimentale, il proteasoma 20S co-localizza parzialmente con marcatori dei microtubuli in assetto stabilizzato e l'entità del segnale osservato risulta maggiore, rispetto alle cellule non infettate.

2. RUOLO REGOLATORIO DEI SISTEMI CITOSCHELETRICI DEI MICROTUBULI E DEI MICROFILAMENTI SUL CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS INFLUENZA A (H1N1) NELLE CELLULE LLC-MK2

In una fase successiva del percorso sperimentale, è stata sondata la presenza di eventuali “interazioni” sussistenti tra microtubuli e microfilamenti del citoscheletro delle cellule LLC-MK2, nell’ottica di mettere in luce il contributo sinergico di tali sistemi alla regolazione del ciclo replicativo dello stipite NWS/33 di virus influenza A (H1N1) nel suddetto modello. Tale obiettivo sperimentale trae le premesse da osservazioni precedenti ^{178, 179} del gruppo di ricerca in cui sono stata inserita ai fini dello svolgimento dello studio oggetto di questa tesi, come anche dai risultati riportati nella sezione precedente, che sono stati oggetto di una pubblicazione scientifica ¹⁸⁰.

2.1. Analisi delle “interazioni” tra microtubuli e microfilamenti nelle cellule LLC-MK2

Al fine di appurare l’esistenza di eventuali “interazioni” tra microtubuli e microfilamenti nel modello LLC-MK2, sono stati valutati gli effetti indotti da sostanze in grado di depolimerizzare tali componenti del citoscheletro cellulare. Più precisamente, le cellule sono state trattate con nocodazolo, per la depolimerizzazione dei microtubuli, e con citocalasina B, per la depolimerizzazione dei microfilamenti.

I risultati ottenuti nelle cellule LLC-MK2 trattate con nocodazolo per 2 e 5 ore e, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza, allo scopo di analizzare l’espressione di *beta*-tubulina, hanno attestato la depolimerizzazione dei microtubuli, che era di entità più rilevante in condizioni di trattamento prolungato con la sostanza (Figura 30C vs B).

I risultati ottenuti nelle cellule LLC-MK2 trattate con citocalasina B per 2 e 5 ore e, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza, allo scopo di analizzare l'espressione di actina, hanno attestato la depolimerizzazione dei microfilamenti, che, analogamente a quanto sopra riportato, era di entità maggiore in caso di trattamento prolungato (Figura 30C1 vs B1). Inoltre, le cellule trattate con citocalasina B presentavano delle protrusioni di actina a livello della membrana citoplasmatica, non osservate in assenza della sostanza (Figura 30B1 e C1 vs A1).

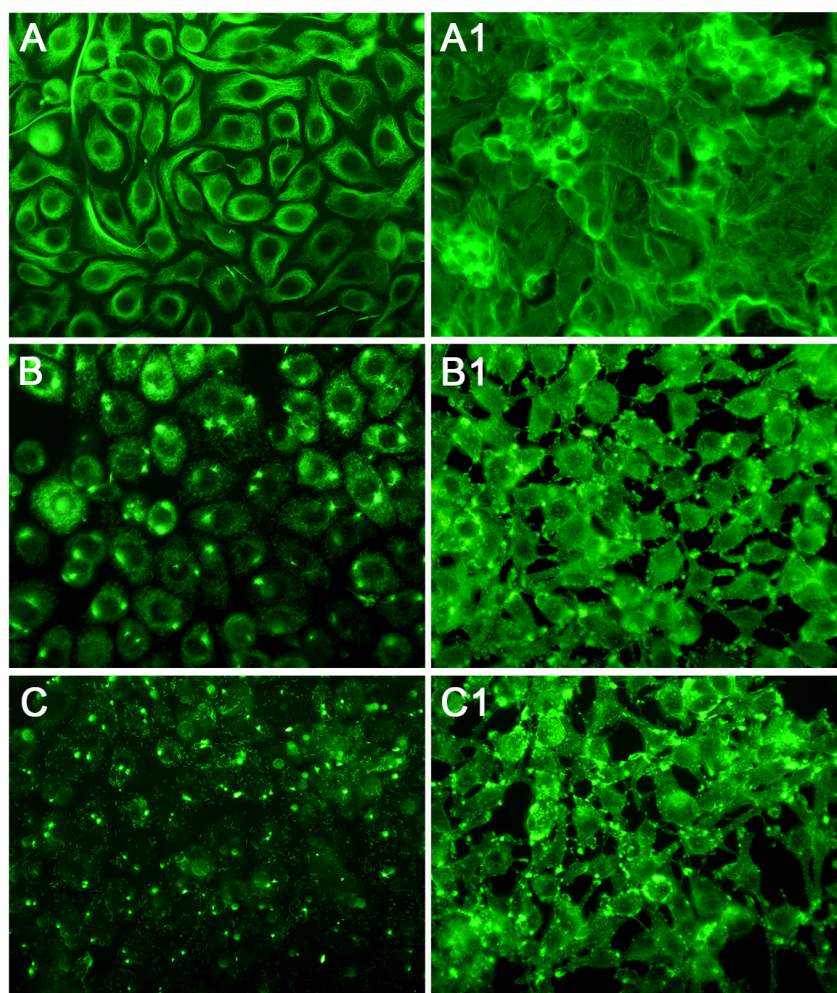


Figura 30. Analisi della depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti mediante l'impiego di sostanze chimiche nelle cellule LLC-MK2. Le cellule LLC-MK2 venivano (A, A1) non trattate, (B, C) trattate con nocodazolo ($2 \mu\text{M}$), oppure (B1, C1) con citocalasina B ($3,5 \mu\text{g/ml}$), per (B, B1) 2 ore e (C, C1) 5 ore, rispettivamente. Le cellule venivano, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A, B, C) anti-*beta*-tubulina, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di fluoresceina, oppure (A1, B1, C1) la sostanza falloidina coniugata con isotiocianato di fluoresceina. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (ingrandimento: 500x).

In una fase successiva, sono state valutate eventuali ripercussioni reciproche della depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti.

Mediante analisi in immunofluorescenza, è stato osservato che la depolimerizzazione dei microfilamenti induceva una riorganizzazione dei microtubuli, in quanto si osservava la perdita della consueta distribuzione radiale e la comparsa di addensamenti citoplasmatici di *beta*-tubulina (Figura 31B vs A).

La depolimerizzazione dei microtubuli determinava, invece, la comparsa di filamenti compatti di actina (“stress fibers”) ed un aumento della componente corticale della stessa, in prossimità della membrana cellulare; inoltre, l’espressione dei microfilamenti a livello citoplasmatico era di entità inferiore, rispetto alle cellule non trattate con nocodazolo (Figura 31B1 vs A1).

Infine, l’applicazione simultanea delle sostanze citocalasina B e nocodazolo induceva una drammatica riorganizzazione dell’assetto di entrambe le componenti citoscheletriche nel modello cellulare esaminato, unitamente ad una rilevante diminuzione dell’espressione delle proteine actina e *beta*-tubulina, rivelate in immunofluorescenza (Figura 31C vs A e C1 vs A1).

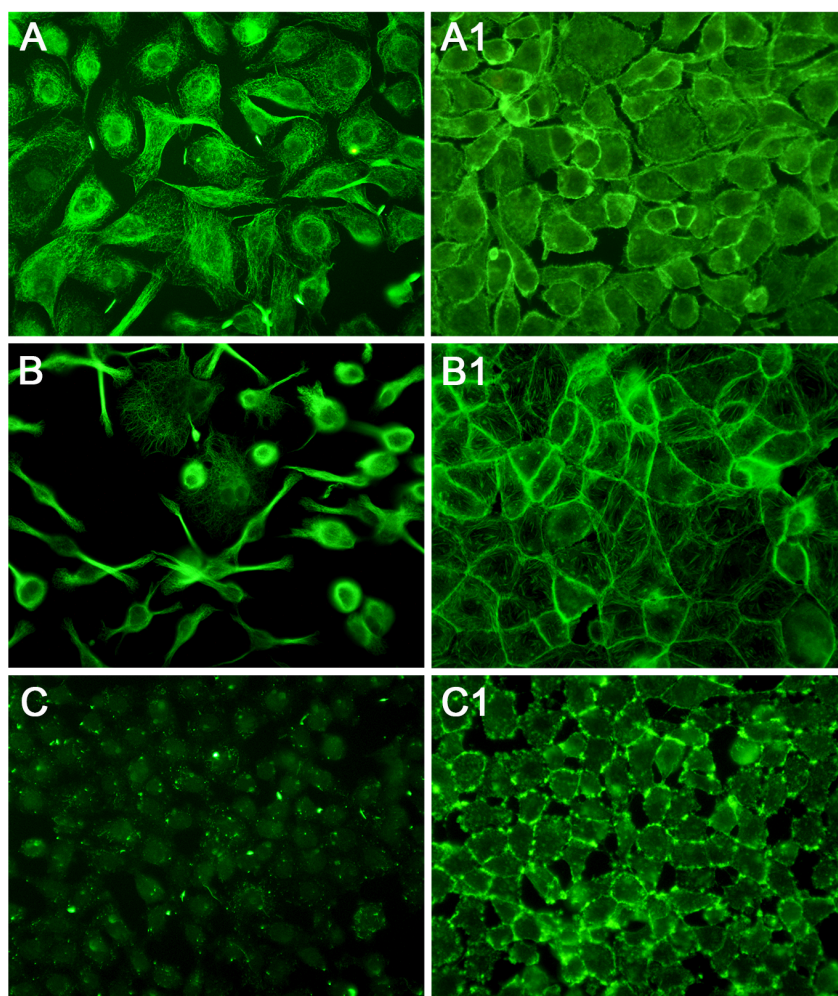


Figura 31. Analisi delle ripercussioni reciproche della depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti mediante l'impiego di sostanze chimiche nelle cellule LLC-MK2. Le cellule LLC-MK2 venivano (A, A1) non trattate, oppure trattate per 5 ore con (B) citocalasina B (3,5 µg/ml), (B1) nocodazolo (2 µM) e (C, C1) citocalasina B (3,5 µg/ml) e nocodazolo (2 µM). Le cellule venivano, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A, B, C) anti-*beta*-tubulina, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di fluoresceina, oppure (A1, B1, C1) la sostanza falloidina coniugata con isotiocianato di fluoresceina. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (ingrandimento: 500x).

In conclusione, l'analisi in immunofluorescenza depone per l'esistenza di una "comunicazione" tra i sistemi citoscheletrici dei microtubuli e dei microfilamenti nel modello LLC-MK2, dal momento che l'alterazione strutturale, indotta da sostanze chimiche, di una delle due componenti ha ripercussioni anche sull'altra.

2.2. Analisi degli effetti indotti dalla depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti sul ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2

Sulla base delle precedenti osservazioni sperimentali, l'attenzione è stata focalizzata sull'analisi del ruolo regolatorio svolto dai microtubuli e dai microfilamenti sul ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2. A tal fine, sono state esaminate le ripercussioni della depolimerizzazione delle suddette componenti citoscheletriche sull'espletamento del ciclo replicativo virale.

Mediante reazione di immunofluorescenza, è stata valutata l'espressione della nucleoproteina virale nelle cellule LLC-MK2 infettate con il virus influenza A/NWS/33 per diversi tempi (m.o.i = 2 u.f.p/cellula; 2 ore 30' - 5 ore 30' di infezione). Le cellule venivano non trattate, oppure trattate per 5 ore, prima dell'inizio dell'infezione virale, con sostanze chimiche funzionali ad indurre la depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti (Figura 32).

I risultati ottenuti attestano che la depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti favorisce l'espletamento dell'infezione virale, in quanto il virus influenza A/NWS/33 è in grado di infettare un numero maggiore di cellule e raggiungere più rapidamente la sede nucleare di replicazione (Figura 32B-B3, C-C3 e D-D3 vs A-A3).

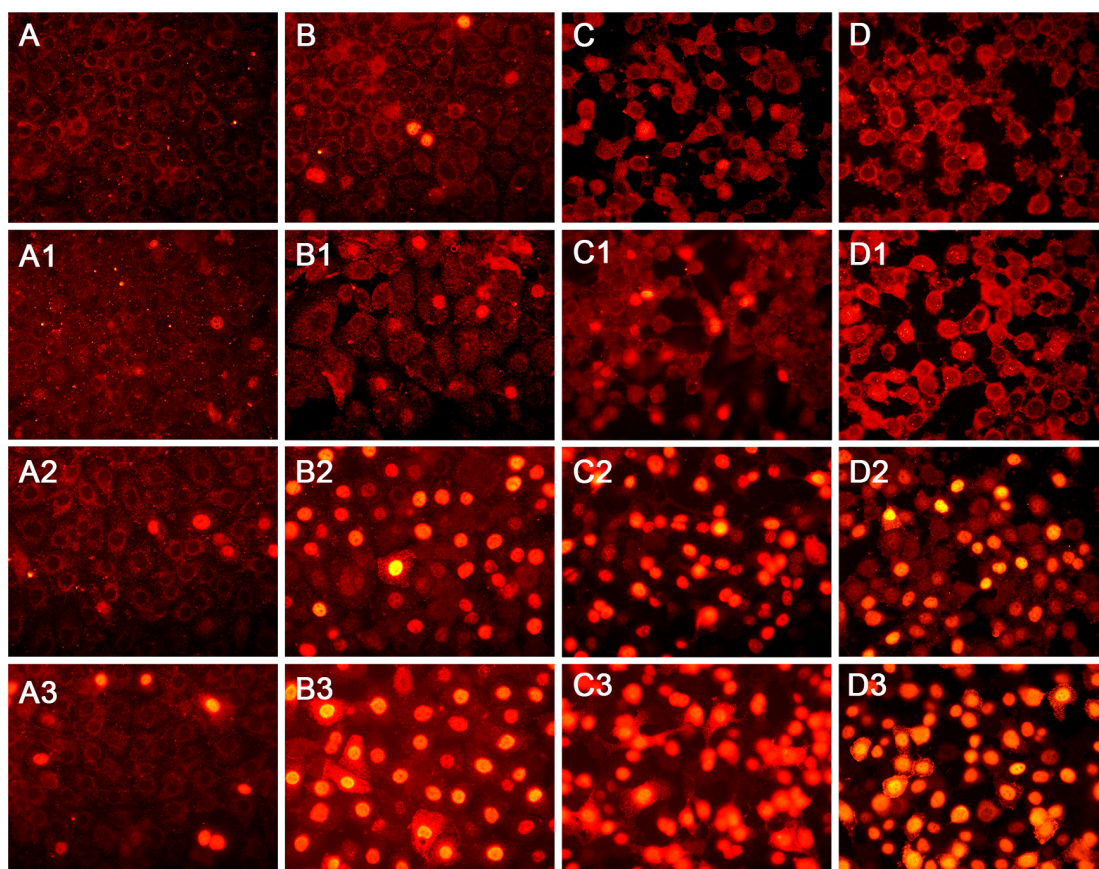


Figura 32. Analisi degli effetti della depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti sull'espletamento di fasi precoci dell'infezione del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2. Le cellule LLC-MK2 venivano (A-A3) non trattate, oppure trattate per 5 ore con (B-B3) nocodazolo (2 μ M), (C-C3) citocalasina B (3,5 μ g/ml) e (D-D3) citocalasina B (3,5 μ g/ml) e nocodazolo (2 μ M). Le cellule venivano, successivamente, infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i = 2 u.f.p./cellula) per (A, B, C, D) 2 ore 30', (A1, B1, C1, D1) 3 ore 30', (A2, B2, C2, D2) 4 ore 30' e (A3, B3, C3, D3) 5 ore 30', rispettivamente, prima di essere sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi anti-NP, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (ingrandimento: 500x).

In conclusione, l'analisi in immunofluorescenza attesta che i sistemi dei microtubuli e dei microfilamenti rappresentano un fattore di restrizione cellulare nei confronti dell'espletamento delle fasi precoci dell'infezione del virus NWS/33 nelle cellule LLC-MK2.

3. RUOLO REGOLATORIO DELLA PROTEINA DI MAMMIFERO OMOLOGA ALLA PROTEINA DIAFANO 1 DI *DROSOPHILA* (DIAPH1) SUL CITOSCHELETRO (MICROTUBULI E MICROFILAMENTI) E SUL CICLO REPLICATIVO DEL VIRUS INFLUENZA A (H1N1) NELLE CELLULE LLC-MK2

Sulla base dei risultati precedenti, che attestano l'intervento dei microtubuli e dei microfilamenti nella regolazione del ciclo replicativo virale del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2, è stato successivamente valutato il ruolo svolto dalla proteina DIAPH1, dal momento che diversi dati di letteratura attestano la sua partecipazione ai meccanismi di polimerizzazione dell'actina e di stabilizzazione dei microtubuli ^{137, 138, 148 - 153}.

3.1. Analisi degli effetti indotti dal silenziamento del gene che codifica per la proteina DIAPH1 sul ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2

Nell'ottica di valutare il possibile intervento della forma DIAPH1 nella regolazione del ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2, sono stati condotti degli esperimenti di silenziamento genico, impiegando degli RNA interferenti (siRNA) rivolti contro l'espressione del gene DIAPH1.

Mediante saggio di Western blotting, è stata valutata l'espressione della proteina DIAPH1 nelle cellule LLC-MK2 non sottoposte a silenziamento genico, oppure trasfettate con i siRNA per 24 e 48 ore, rispettivamente (Figura 33A).

I risultati ottenuti hanno confermato che il silenziamento genico diminuisce l'espressione della proteina DIAPH1 nelle cellule LLC-MK2 (Figura 33A: siRNA DIAPH1a vs CC).

In seguito, sono stati esaminati gli effetti del silenziamento genico sul ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore di

infezione) nelle cellule LLC-MK2. Mediante reazione di immunofluorescenza, è stato appurato che il silenziamento genico induceva un aumento del numero di cellule positive per la nucleoproteina virale, che era di entità direttamente proporzionale alla molarità dei siRNA impiegata (Figura 33D, E, F vs B).

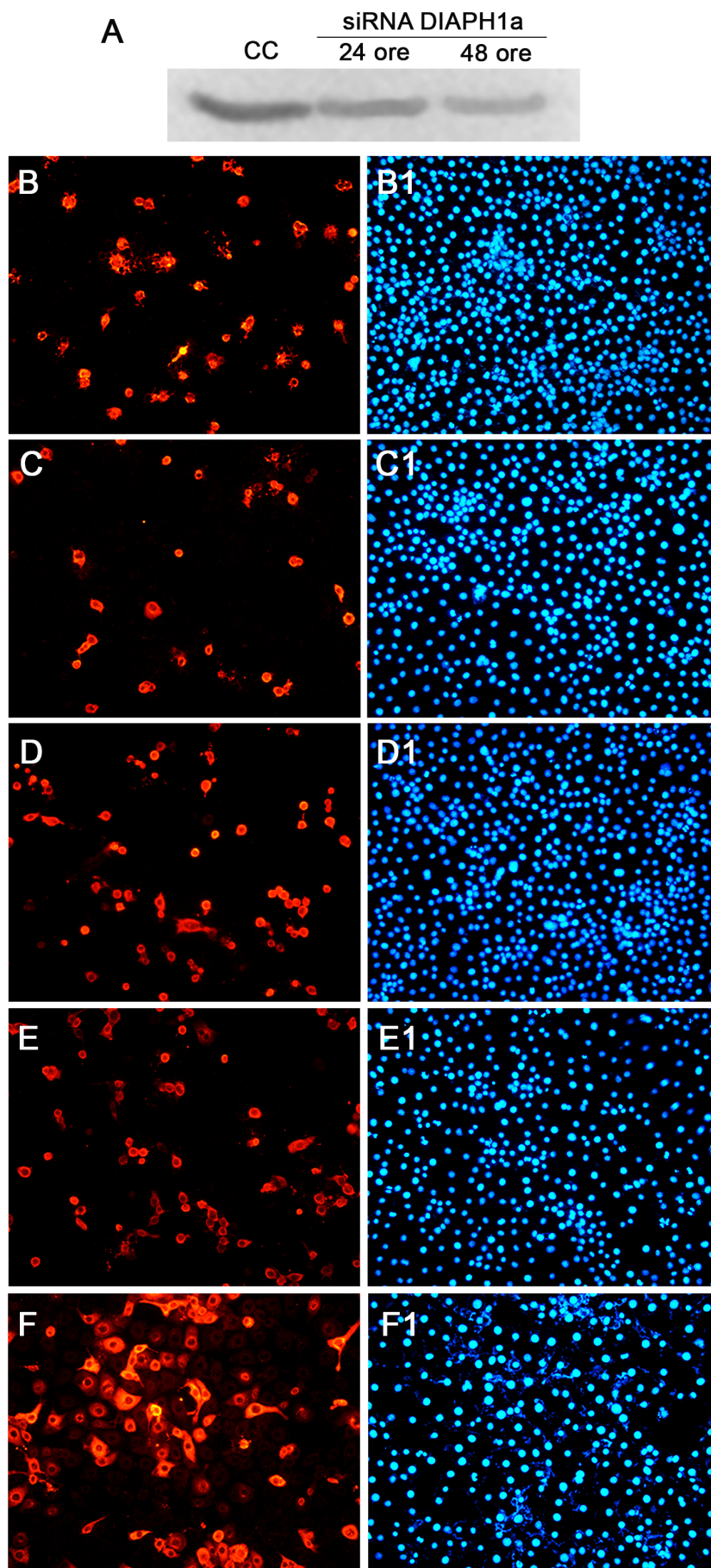


Figura 33. Analisi degli effetti del silenziamento del gene DIAPH1 sull'espressione della nucleoproteina del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2. (A) Le cellule LLC-MK2 venivano (CC) non

sottoposte a silenziamento genico, oppure (siRNA DIAPH1a) trasfettate con siRNA rivolti contro l'espressione del gene DIAPH1 (40 nM) per 24 e 48 ore, rispettivamente. Le cellule venivano, successivamente, analizzate mediante saggio di Western blotting, impiegando degli anticorpi anti-DIAPH1, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con fosfatasi alcalina. In parallelo, le cellule LLC-MK2 venivano (B, B1) non sottoposte a silenziamento genico, (C, C1) trattate con il solo mezzo di trasfezione, oppure trasfettate per 48 ore con siRNA rivolti contro l'espressione del gene DIAPH1, impiegati alle molarità (D, D1) 20 nM, (E, E1) 30 nM e (F, F1) 40 nM, rispettivamente. In seguito, le cellule venivano infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore) e sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (B, C, D, E, F) anti-NP, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina, oppure (B1, C1, D1, E1, F1) la sostanza 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI). I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (ingrandimento: 200x).

In una fase successiva, sono stati determinati i titoli della progenie virale emersa nelle cellule LLC-MK2 non trasfettate, oppure sottoposte a silenziamento genico per 48 ore e, successivamente, infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione; Figura 34). I dati ottenuti risultavano in linea con gli esiti di immunofluorescenza.

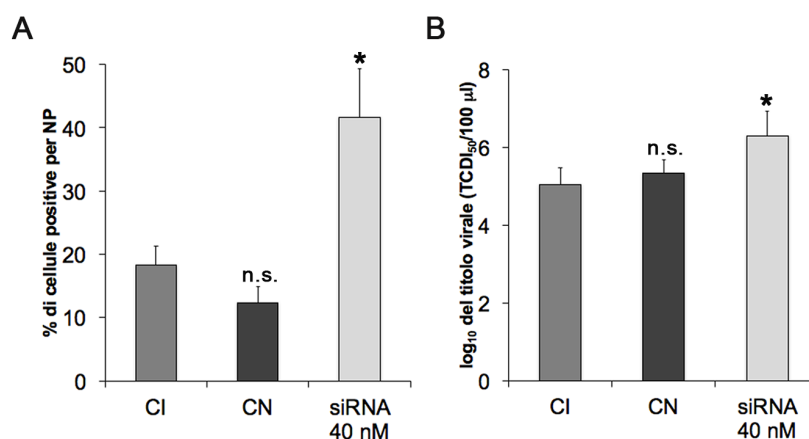


Figura 34. Analisi degli effetti del silenziamento del gene DIAPH1 sul ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2. Le cellule LLC-MK2 venivano (CI) non sottoposte a silenziamento genico, (CN) trattate con il solo mezzo di trasfezione, oppure (siRNA 40 nM) trasfettate con siRNA rivolti contro l'espressione del gene DIAPH1 (siRNA DIAPH1a, 40 nM) per 48 ore. Le cellule venivano, successivamente, infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore) e sottoposte a (A) reazione di immunofluorescenza, oppure (B) alla determinazione dei titoli della progenie virale emersa, mediante saggio TCDI₅₀. (A) la reazione di immunofluorescenza è stata condotta impiegando anticorpi anti-NP, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina. Nei grafici sono rappresentati: (A) la percentuale di cellule positive per la nucleoproteina virale, rispetto alla popolazione cellulare totale; (B) i logaritmi dei titoli della progenie virale emersa. I valori riportati rappresentano la media aritmetica di tre esperimenti indipendenti e le barre d'errore corrispondono alle relative deviazioni standard. I valori di significatività (* = $P < 0,05$ e n.s. = $P > 0,05$) sono stati calcolati con il test *t* di Student a due code, rispetto ai relativi controlli.

In conclusione, i risultati ottenuti rendono ragione del fatto che la proteina DIAPH1 costituisca un fattore di restrizione cellulare nei confronti dell'infezione del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2, dal momento che la diminuzione della sua espressione, conseguente al silenziamento genico, induce un aumento dell'efficienza replicativa virale.

3.2. Analisi degli effetti indotti dal silenziamento del gene che codifica per la proteina DIAPH1 sulla stabilizzazione dei microtubuli nelle cellule LLC-MK2

Allo scopo di appurare se il silenziamento del gene DIAPH1 comporta un aumento della dinamicità dei microtubuli nel modello LLC-MK2, è stata valutata l'espressione della proteina *alpha*-tubulina acetilata, a confronto con quella della proteina costitutiva GAPDH.

Mediante saggio di Western blotting, è stata osservata una diminuzione dell'espressione della proteina *alpha*-tubulina acetilata nelle cellule trasfettate con siRNA rivolti contro l'espressione del gene DIAPH1, rispetto alle cellule non sottoposte a trasfezione (Figura 35B: siRNA DIAPH1a e siRNA DIAPH1b vs CC).

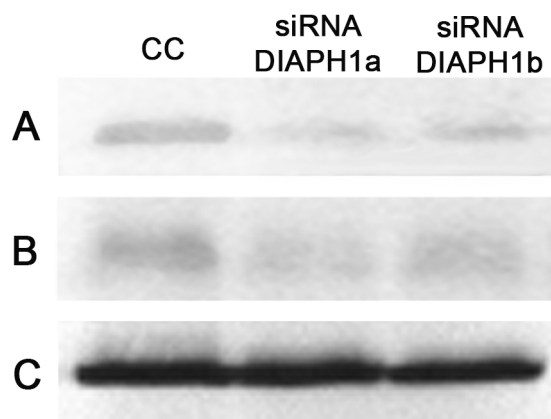


Figura 35. Analisi degli effetti del silenziamento del gene DIAPH1 sull'espressione della proteina *alpha*-tubulina acetilata nelle cellule LLC-MK2. Le cellule LLC-MK2 venivano (CC) non sottoposte a silenziamento genico, oppure (siRNA DIAPH1a e siRNA DIAPH1b) trasfettate con siRNA rivolti contro l'espressione del gene DIAPH1 (40 nM) per 48 ore. Le cellule venivano, successivamente, analizzate mediante saggio di Western blotting, impiegando degli anticorpi (A) anti-DIAPH1, (B) anti-*alpha*-tubulina acetilata e (C) anti-GAPDH, rivelati con (B) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con fosfatasi alcalina e (A, C) anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con fosfatasi alcalina. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti.

In conclusione, i suddetti risultati depongono per il fatto che la proteina DIAPH1 possa contribuire, unitamente ad altri fattori/meccanismi cellulari, alla stabilizzazione dei microtubuli nelle cellule LLC-MK2.

3.3. Analisi degli effetti indotti dal silenziamento del gene che codifica per la proteina DIAPH1 sull'assetto dei microfilamenti e dei microtubuli nelle cellule LLC-MK2

In una fase successiva, sono stati condotti degli esperimenti di immunofluorescenza nelle cellule LLC-MK2 non trasfettate, oppure trasfettate per 48 ore con siRNA rivolti contro l'espressione del gene DIAPH1, allo scopo di valutare le ripercussioni sull'assetto dei microfilamenti e dei microtubuli sull'espressione delle principali proteine che li costituiscono (*i.e.* actina, *beta*-tubulina ed *alpha*-tubulina acetilata; Figura 36).

I risultati ottenuti hanno messo in luce che, in condizioni di silenziamento genico, la componente di actina filamentosa diminuiva a vantaggio di quella globulare,

rispetto a quanto osservato nelle cellule non trasfettate (Figura 36A1 vs A). In parallelo, è stata osservata una riduzione dell'espressione della componente corticale dell'actina, localizzata in prossimità della membrana citoplasmatica.

Inoltre, nelle cellule trasfettate è stata osservata una riorganizzazione dell'assetto dei microtubuli ed una considerevole diminuzione dell'espressione di *beta*-tubulina.

Più precisamente, nelle cellule trasfettate i microtubuli si estendevano, occupando una regione citoplasmatica più ampia, a differenza della prevalente localizzazione perinucleare osservata nelle cellule non trasfettate (Figura 36B1 vs B).

Infine, sono state riscontrate delle ripercussioni del tutto paragonabili a quelle osservate per *beta*-tubulina anche per la proteina *alpha*-tubulina acetilata (Figura 36C1 vs C).

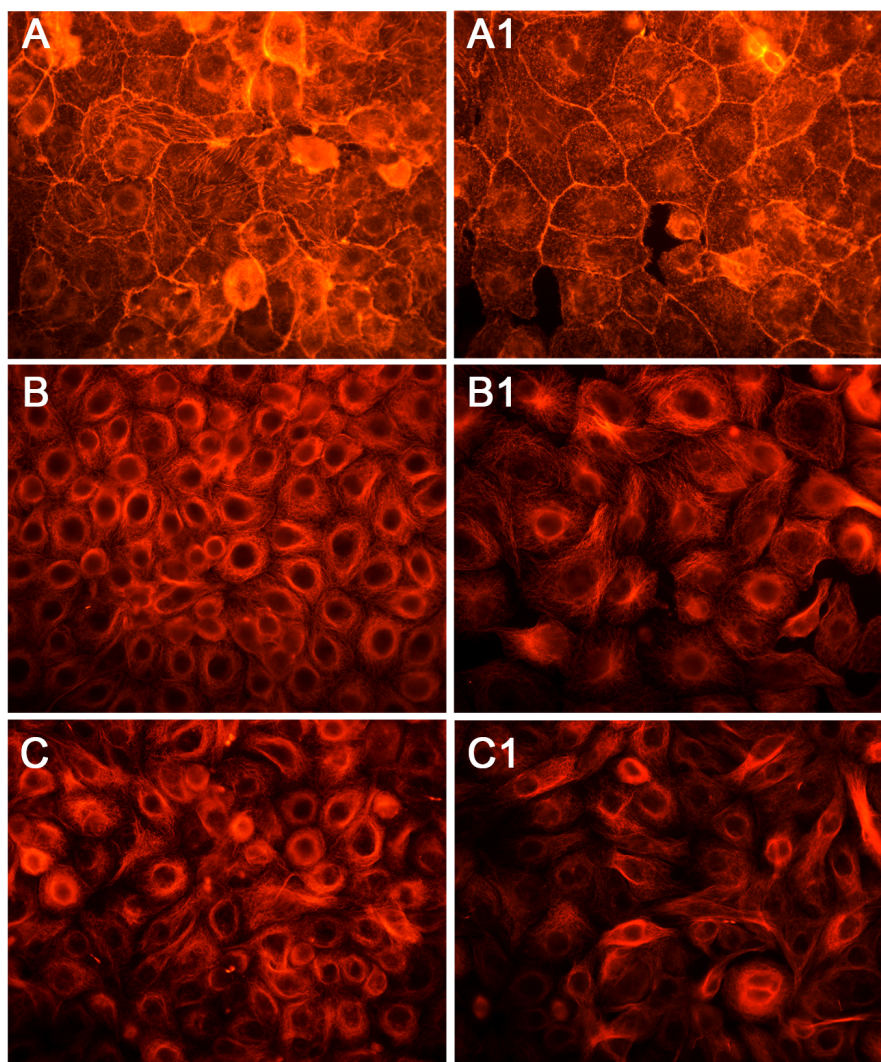


Figura 36. Analisi degli effetti del silenziamento del gene DIAPH1 sui sistemi citoscheletrici dei microtubuli e dei microfilamenti nelle cellule LLC-MK2. Le cellule LLC-MK2 venivano (A, B, C) non sottoposte a silenziamento genico, oppure (A1, B1, C1) trasfettate con siRNA rivolti contro l'espressione del gene DIAPH1 (siRNA DIAPH1a, 40 nM) per 48 ore. Successivamente, le cellule venivano sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando (A, A1) la sostanza falloidina coniugata con isotiocianato di rodamina, oppure degli anticorpi (B, B1) anti-*beta*-tubulina e (C, C1) anti-*alpha*-tubulina acetilata, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (ingrandimento: 500x).

In conclusione, i suddetti risultati depongono per il fatto che, nelle cellule LLC-MK2, la proteina DIAPH1 contribuisca alla regolazione dell'assetto dei microtubuli e dei microfilamenti, favorendone la stabilizzazione e la polimerizzazione; infatti, la sua diminuzione di espressione, indotta dal silenziamento genico, comporta l'insorgenza di modificazioni strutturali a carico di entrambi i sistemi citoscheletrici, oltre che modulazioni di espressione delle proteine che li costituiscono.

3.4 Analisi della localizzazione ed espressione della proteina DIAPH1 nelle cellule LLC-MK2 non infettate ed infettate con il virus influenza A/NWS/33

Nell'ottica di approfondire le conoscenze sul ruolo svolto dalla proteina DIAPH1 in corso di infezione virale, ne è stata esaminata l'espressione, mediante immunofluorescenza, nelle cellule LLC-MK2 non infettate, oppure infettate con il virus influenza A/NWS/33 per diversi tempi (m.o.i = 2 u.f.p/cellula; 3-24 ore di infezione; Figura 37).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che, nelle cellule non infettate, la proteina DIAPH1 presentava un marcaggio citoplasmatico diffuso e di lieve entità (Figura 37A). Dopo 3 ore dall'inizio dell'infezione virale, la proteina DIAPH1 risultava addensata e prevalentemente concentrata nella zona perinucleare, con comparsa, in alcune cellule, di una distribuzione citoplasmatica di tipo granulare (Figura 37B). A 5 ore dall'inizio dell'infezione, è stato osservato un aumento dell'intensità di espressione della proteina oggetto di studio, che presentava una localizzazione citoplasmatica abbastanza uniforme (Figura 37C). Nelle cellule infettate per 9 ore, la proteina DIAPH1 presentava un marcaggio citoplasmatico granulare, con un addensamento perinucleare, visibile nella quasi totalità delle cellule (Figura 37D). Dopo 18 ore d'infezione, la proteina DIAPH1 aumentava la sua espressione a livello del citoplasma (Figura 37E). Infine, dopo 24 ore di infezione, oltre ad un'evidente modificazione della morfologia cellulare, imputabile all'azione del virus, veniva evidenziata un'espressione citoplasmatica disomogenea della proteina DIAPH1 (Figura 37F), ed una localizzazione nucleare della stessa, in alcune cellule del monostrato (freccie nella Figura 37F).

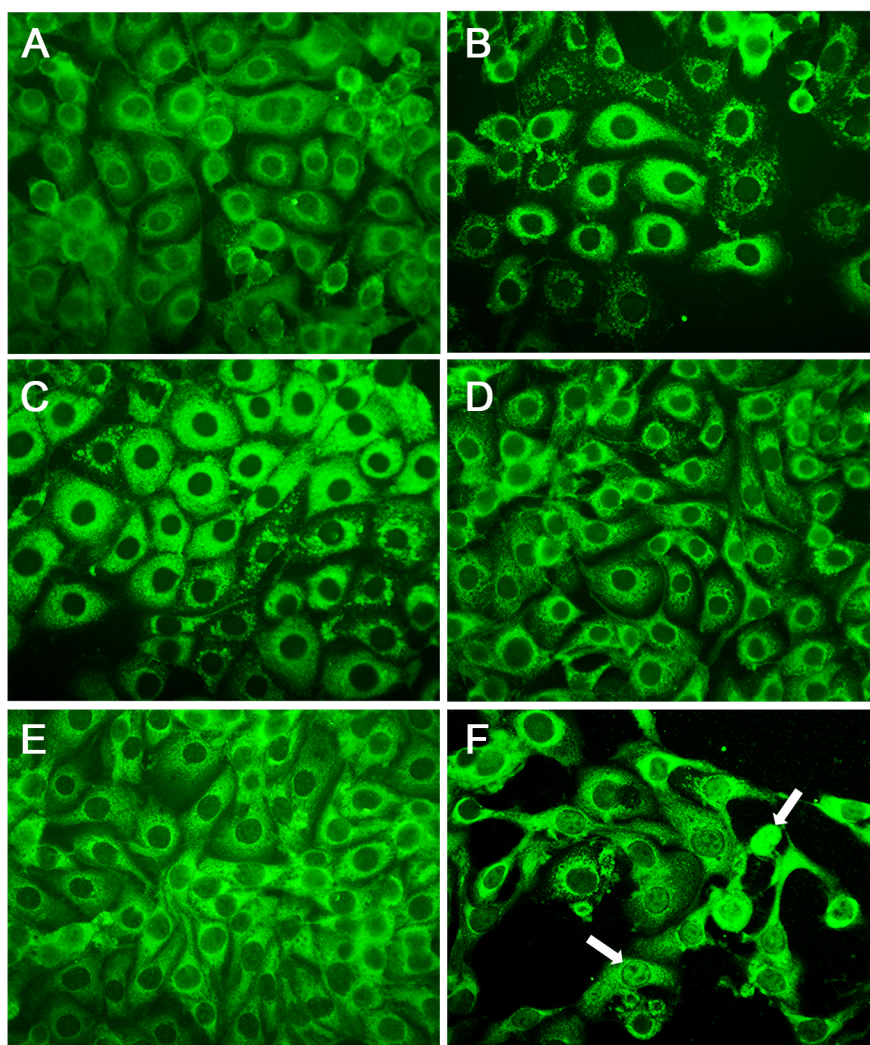


Figura 37. Analisi dell'espressione e localizzazione subcellulare della proteina DIAPH1 in corso di infezione con il virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2. Le cellule LLC-MK2 venivano (A) non infettate, oppure (B-F) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula) per (B) 3 ore, (C) 5 ore, (D) 9 ore, (E) 18 ore e (F) 24 ore, rispettivamente. Le cellule venivano, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi anti-DIAPH1, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (ingrandimento: 500X).

In conclusione, i risultati ottenuti attestano una localizzazione ed espressione altamente dinamica della proteina DIAPH1 in corso di infezione virale, rispetto a quella osservata nelle cellule LLC-MK2 non infettate.

3.5. Analisi degli effetti indotti dalla depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti sull'espressione e localizzazione della proteina DIAPH1 nelle cellule LLC-MK2

In una fase successiva, sono state valutate le ripercussioni della depolimerizzazione dei microtubuli (trattamento con nocodazolo) e dei microfilamenti (trattamento con citocalasina B) sulla localizzazione ed espressione della proteina DIAPH1 nelle cellule LLC-MK2, mediante reazione di immunofluorescenza (Figura 38).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che, nelle cellule LLC-MK2 trattate con nocodazolo, la proteina DIAPH1 aumentava lievemente la sua espressione e presentava una distribuzione citoplasmatica granulare, rispetto alle cellule non trattate (Figura 38B e B1 vs A). Invece, a seguito del trattamento con citocalasina B, si osservava un'espressione più accentuata della proteina DIAPH1 nella regione perinucleare delle cellule (Figura 38C e C1 vs A). In particolare, in alcune cellule del monostrato, si osservava la presenza di filamenti, che mimavano l'aspetto dei microtubuli (freccie nella Figura 38C e C1).

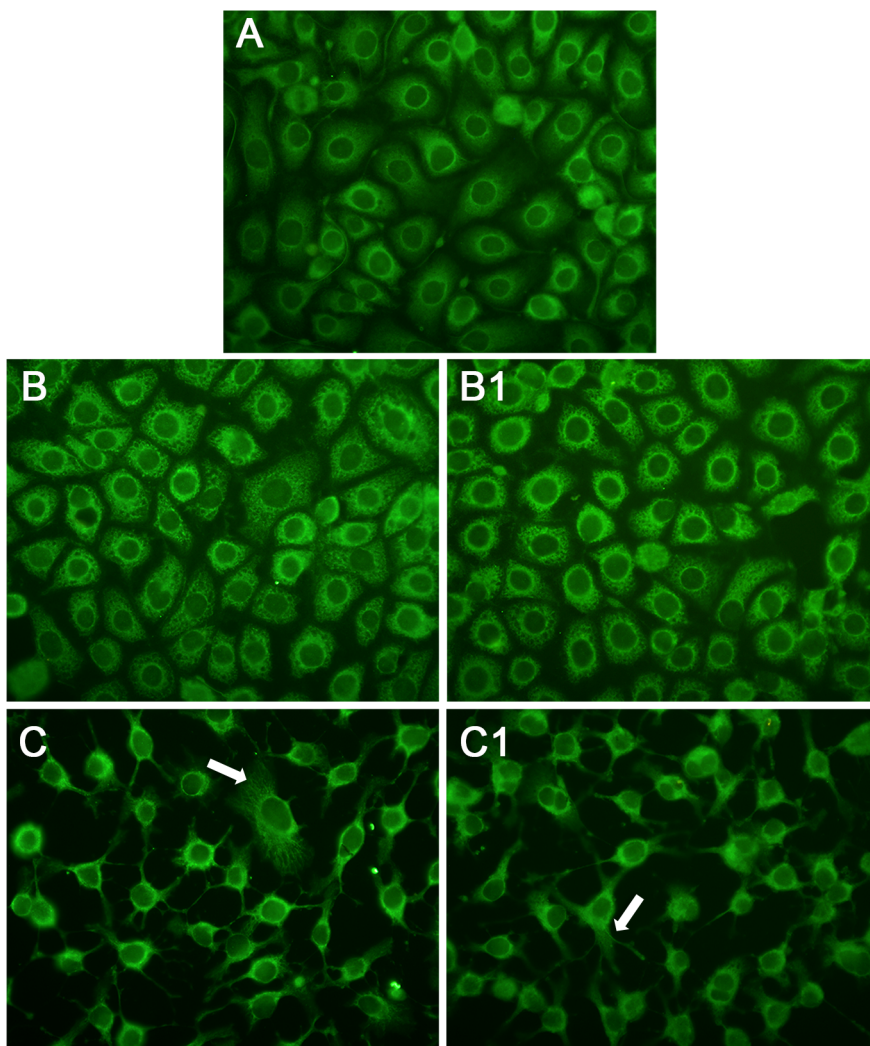


Figura 38. Analisi dell'espressione della proteina DIAPH1 in seguito a depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti nelle cellule LLC-MK2. Le cellule LLC-MK2 venivano (A) non trattate, (B, B1) trattate con nocodazolo (2 μ M), oppure (C, C1) trattate con citocalasina B (3,5 μ g/ml) per (B, C) 2 ore e (B1, C1) 5 ore. Le cellule venivano, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi anti-DIAPH1, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (ingrandimento: 500x).

In conclusione, tali risultati depongono per il fatto che la proteina DIAPH1 possa “interagire”, direttamente o indirettamente, con i sistemi citoscheletrici dei microtubuli e dei microfilamenti nelle cellule LLC-MK2, dal momento che la depolimerizzazione di tali componenti ha delle evidenti ripercussioni sulla sua localizzazione ed espressione.

3.6. Analisi della localizzazione subcellulare delle proteine DIAPH1 ed actina nelle cellule LLC-MK2 non infettate ed infettate con il virus influenza A/NWS/33

Allo scopo di approfondire le conoscenze sul ruolo regolatorio della proteina DIAPH1 sul citoscheletro dei microfilamenti, è stata effettuata un'analisi, mediante microscopia confocale, della sua localizzazione subcellulare, a confronto con quella di actina, nelle cellule LLC-MK2 non infettate, oppure infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 10 u.f.p./cellula; 2 ore di infezione; Figura 39).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che, rispetto alle cellule non infettate, l'infezione virale accentua l'espressione della proteina DIAPH1 (Figura 39B vs A e D vs C), come precedentemente riportato, e, inoltre, determina una diminuzione di espressione della componente dell'actina filamentosa (Figura 39B1 vs A1 e D1 vs C1). In aggiunta, è stata osservata una parziale co-localizzazione tra le proteine DIAPH1 ed actina sia nelle cellule non infettate sia in quelle infettate, soprattutto a livello della componente corticale dell'actina, e, in misura minore, nel citoplasma (Figura 39A2, B2, C2 e D2).

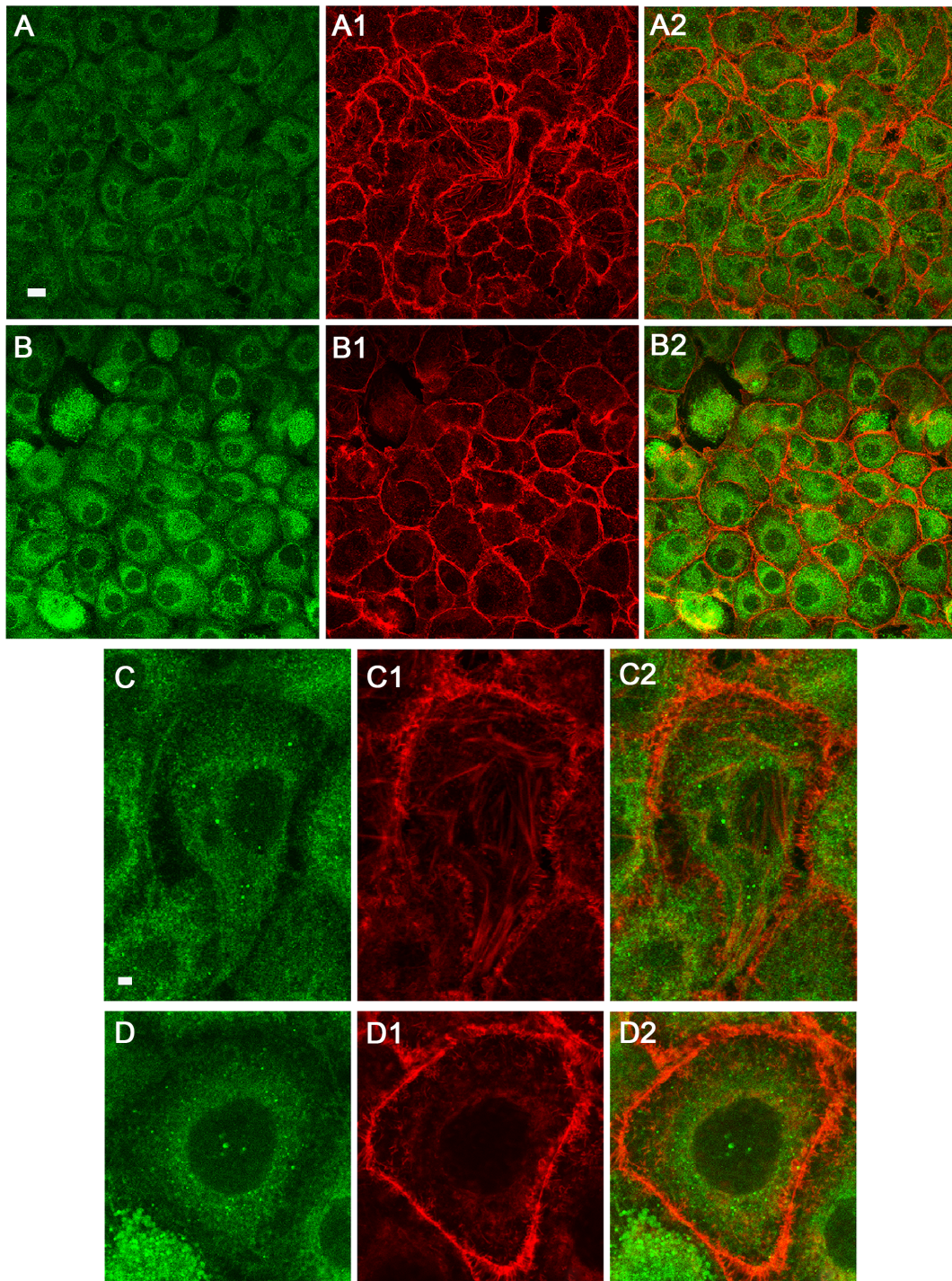


Figura 39. Analisi della co-localizzazione tra le proteine DIAPH1 ed actina nelle cellule LLC-MK2 non infettate o infettate con il virus influenza A/NWS/33. Le cellule LLC-MK2 venivano (A-A2 e C-C2) non infettate, oppure (B-B2 e D-D2) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 10 u.f.p./cellula; 2 ore). Le cellule venivano, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A, B, C, D) anti-DIAPH1, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina, e (A1, B1, C1, D1) la sostanza falloidina coniugata con isotiocianato di rodamina. I piani focali mostrati in figura sono rappresentativi della localizzazione subcellulare della proteina DIAPH1 (in verde) e dell'actina (in rosso). Le aree di co-localizzazione appaiono in colore giallo/arancione. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. Barra nella figura A = 10 μ m; barra nella figura C = 2 μ m.

3.7. Analisi della localizzazione subcellulare delle proteine DIAPH1, *beta*-tubulina ed *alpha*-tubulina acetilata nelle cellule LLC-MK2 non infettate ed infettate con il virus influenza A/NWS/33

Allo scopo di approfondire le conoscenze sul ruolo regolatorio della proteina DIAPH1 sul citoscheletro dei microtubuli, è stata condotta un'analisi in microscopia confocale delle cellule LLC-MK2 non infettate, oppure infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 10 u.f.p./cellula; 2 ore di infezione), previa reazione di immunofluorescenza.

Dai risultati ottenuti è stato evidenziato che l'infezione virale accentuava l'espressione di *beta*-tubulina nella regione citoplasmatica periferica, dove erano visibili dei cospicui addensamenti della proteina, rispetto alla distribuzione radiale osservata nelle cellule non infettate (Figura 40B1 vs A1).

Le aree di co-localizzazione tra la proteina DIAPH1 e *beta*-tubulina erano presenti, soprattutto, nella regione periferica del citoplasma, ed erano di entità maggiore nelle cellule infettate, rispetto a quelle non infettate (Figura 40B2 vs A2).

Relativamente ad *alpha*-tubulina acetilata, nelle cellule infettate si osservava una prevalente localizzazione perinucleare ed un aumento di espressione, mentre nelle cellule non infettate la distribuzione di tale proteina era appannaggio di un'ampia area citoplasmatica, sebbene con un livello di espressione inferiore (Figura 40D1 vs C1).

I segnali di co-localizzazione tra le proteine *alpha*-tubulina acetilata e DIAPH1 venivano principalmente rilevati nel distretto perinucleare delle cellule infettate, mentre in quelle non infettate si osservavano in un'ampia regione del citoplasma ed erano di intensità minore, oltre che appannaggio di un ridotto numero di cellule (Figura 40D2 vs C2).

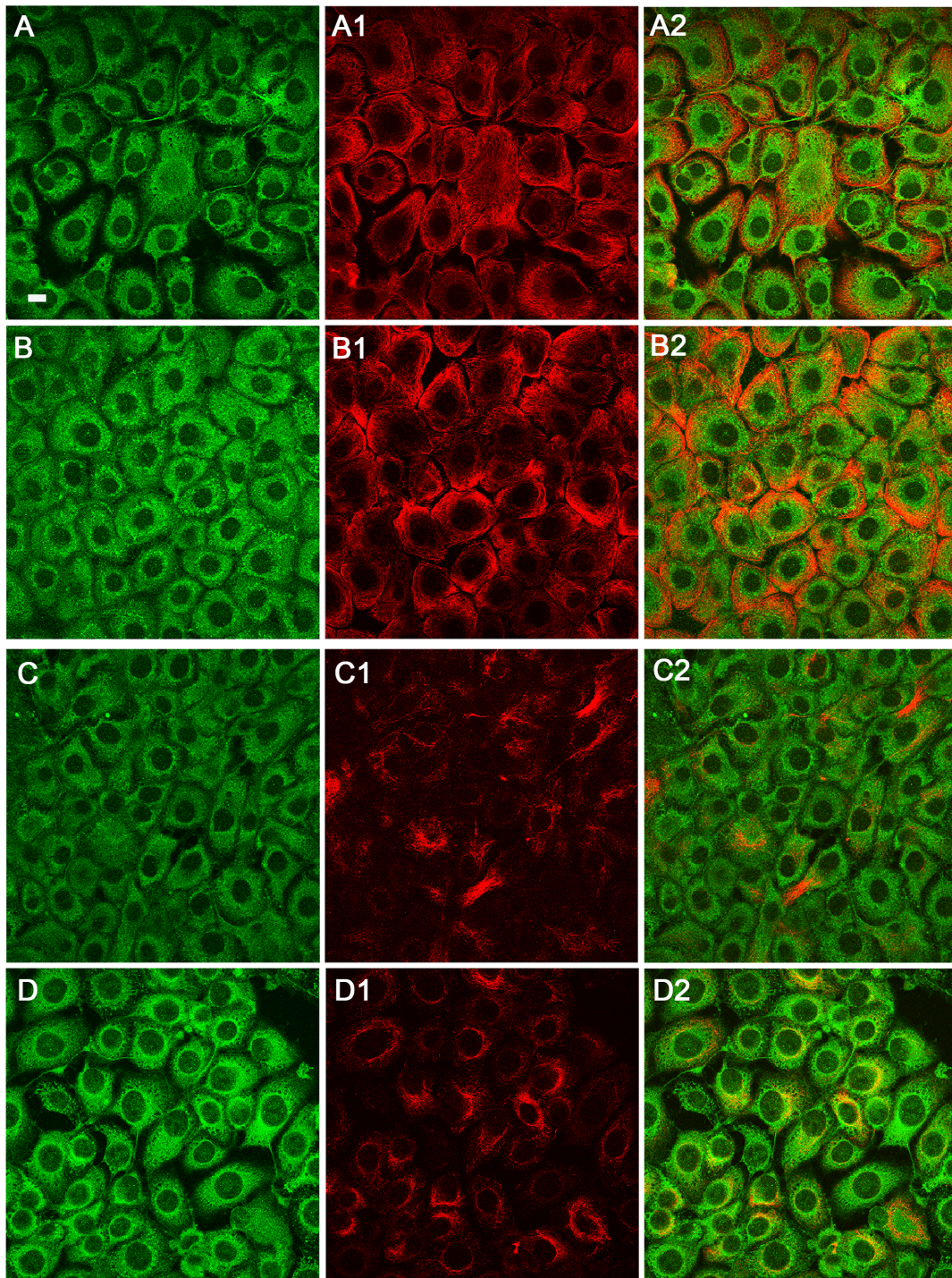


Figura 40. Analisi della co-localizzazione tra le proteine DIAPH1, *beta*-tubulina ed *alpha*-tubulina acetilata nelle cellule LLC-MK2 non infettate o infettate con il virus influenza A/NWS/33. Le cellule LLC-MK2 venivano (A-A2 e C-C2) non infettate, oppure (B-B2 e D-D2) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 10 u.f.p./cellula; 2 ore). Le cellule venivano, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A, B, C, D) anti-DIAPH1, (A1, B1) anti-*beta*-tubulina e (C1, D1) anti-*alpha*-tubulina acetilata, rivelati con (A, B, C, D) anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina, e (A1, B1, C1, D1) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina. I piani focali mostrati in figura sono rappresentativi della localizzazione subcellulare delle proteine DIAPH1 (in verde), *beta*-tubulina (in rosso) ed *alpha*-tubulina acetilata (in rosso). Le aree di co-localizzazione appaiono in colore giallo/arancione. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. Barra = 10 μ m.

3.8. Analisi della localizzazione subcellulare delle proteine DIAPH1 e nucleoproteina virale nelle cellule LLC-MK2 infettate con il virus influenza A/NWS/33

Allo scopo di approfondire le conoscenze sul ruolo regolatorio svolto dalla proteina DIAPH1 sul ciclo replicativo virale, è stata analizzata, mediante microscopia confocale, la localizzazione subcellulare delle proteine DIAPH1 e nucleoproteina virale nelle cellule LLC-MK2 infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 10 u.f.p./cellula; 2 ore di infezione; Figura 41), previa reazione di immunofluorescenza. Dai risultati ottenuti, è emerso che la nucleoproteina virale era prevalentemente localizzata nella regione periferica del citoplasma cellulare (Figura 41B1 e C1), dove veniva osservata una parziale co-localizzazione della stessa con la proteina DIAPH1 (Figura 41B2 e C2).

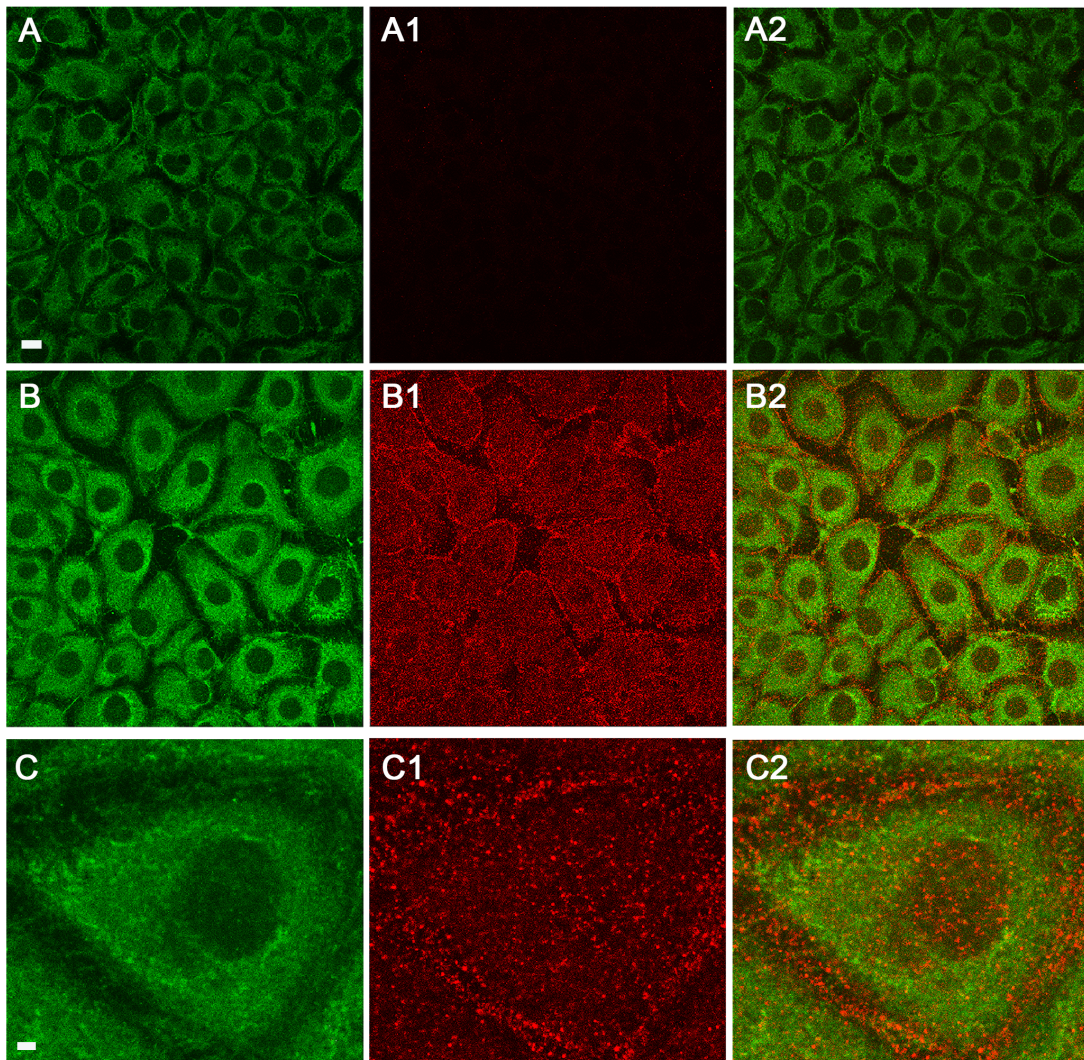


Figura 41. Analisi della co-localizzazione tra la proteina DIAPH1 e la nucleoproteina virale nelle cellule LLC-MK2 non infettate o infettate con il virus influenza A/NWS/33. Le cellule LLC-MK2 venivano (A-A2) non infettate oppure (B-C2) infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 10 u.f.p./cellula; 2 ore) e, successivamente, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A, B, C) anti-DIAPH1, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina, e (A1, B1, C1) anticorpi anti-NP, rivelati con anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina. I piani focali mostrati in figura sono rappresentativi della localizzazione subcellulare della proteina DIAPH1 (in verde) e della nucleoproteina virale (in rosso). Le aree di co-localizzazione appaiono in colore giallo/arancione. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. Barra nella figura A = 10 μm ; barra nella figura C = 2 μm .

In conclusione, i risultati ottenuti mediante analisi in microscopia confocale nelle cellule LLC-MK2 infettate con lo stipite influenzale NWS/33 attestano la parziale co-localizzazione della proteina DIAPH1 con actina, componenti dei microtubuli e la nucleoproteina virale.

4. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI COMPONENTI DEI MICROTUBULI E DELLA PROTEINA DIAPH1 NELLE CELLULE DELL'EPITELIO RESPIRATORIO UMANO POSITIVE PER IL VIRUS INFLUENZA A ED IL VIRUS RESPIRATORIO SINCIZIALE

Nell'ottica di generalizzare le osservazioni sperimentali ottenute nel modello cellulare LLC-MK2, l'espressione di componenti dei microtubuli e della proteina DIAPH1 è stata esaminata anche nelle cellule dell'epitelio respiratorio umano. Allo scopo, sono state impiegate cellule derivanti da tamponi faringei e nasali di soggetti ricoverati od osservati ambulatorialmente e pervenuti presso l'Unità Operativa di Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma per la diagnosi di laboratorio di infezione da virus dell'apparato respiratorio. Le cellule prescelte ai fini del percorso sperimentale erano positive per il virus influenza A, oppure per il virus respiratorio sinciziale.

In una fase iniziale, è stata valutata, mediante immunofluorescenza, l'espressione di componenti dei microtubuli (*beta*-tubulina, *alpha*-tubulina acetilata e MAP4) e della proteina DIAPH1 nelle cellule LLC-MK2 citocentrifugate su vetrino portaoggetti (Figura 42), al fine di poter confrontare i risultati ottenuti con quelli riferiti ai sedimenti di cellule esfoliate dell'epitelio respiratorio umano.

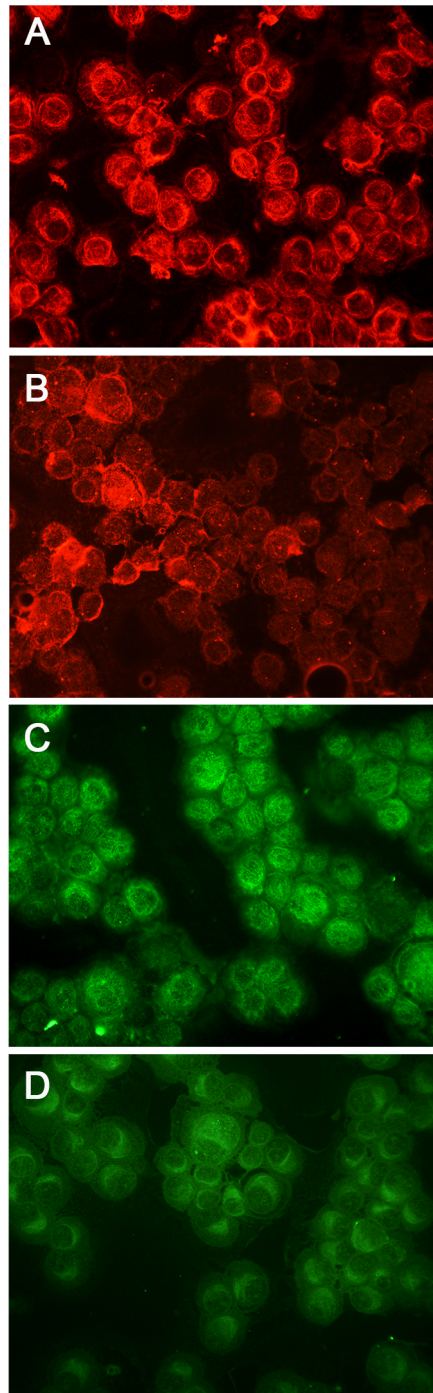


Figura 42. Analisi dell'espressione delle proteine *beta*-tubulina, *alpha*-tubulina acetilata, MAP4 e DIAPH1 nelle cellule LLC-MK2. Le cellule LLC-MK2 citocentrifugate su vetrino portaoggetti venivano sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A) anti-*beta*-tubulina, (B) anti-*alpha*-tubulina acetilata, (C) anti-MAP4 e (D) anti-DIAPH1, rivelati con (A, B) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina e (C, D) anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (ingrandimento: 500x).

I risultati hanno evidenziato che nelle cellule LLC-MK2 l'espressione delle proteine *beta*-tubulina, *alpha*-tubulina acetilata e MAP4 era rilevante, mentre quella della proteina DIAPH1 di lieve entità (Figura 42A, B e C vs D).

Successivamente, sono stati condotti analoghi esperimenti di immunofluorescenza in sedimenti di cellule esfoliate dell'epitelio respiratorio umano, riscontrate positive per il virus influenza A. Più precisamente, è stata esaminata l'espressione delle proteine virali emoagglutinina e nucleoproteina, utili ad individuare, nel sedimento, le cellule infettate dal virus influenza A, che venivano esaminate al fine di appurare l'espressione delle proteine *alpha*-tubulina acetilata, MAP4 e DIAPH1, a confronto con quelle non infettate, presenti nello stesso campo microscopico (Figura 43).

I risultati ottenuti hanno mostrato che, nelle cellule infettate dal virus influenza A, l'espressione delle proteine *alpha*-tubulina acetilata e MAP4 era di scarsa entità (freccie nella Figura 43A1, B1, C1) e pressoché paragonabile a quella delle cellule non infettate (triangoli nella Figura 43A1, B1, C1); al contrario, l'espressione della proteina DIAPH1 era più accentuata, rispetto alle cellule non infettate (freccia vs triangolo nella Figura 43D1). La sovrapposizione dei rispettivi campi microscopici, effettuata mediante utilizzo di un apposito software, rende ragione dei risultati ottenuti, in quanto il segnale della sovrapposizione (giallo) è di entità pronunciata solo nel caso del raffronto tra le proteine DIAPH1 ed NP (freccia in Figura 43D2).

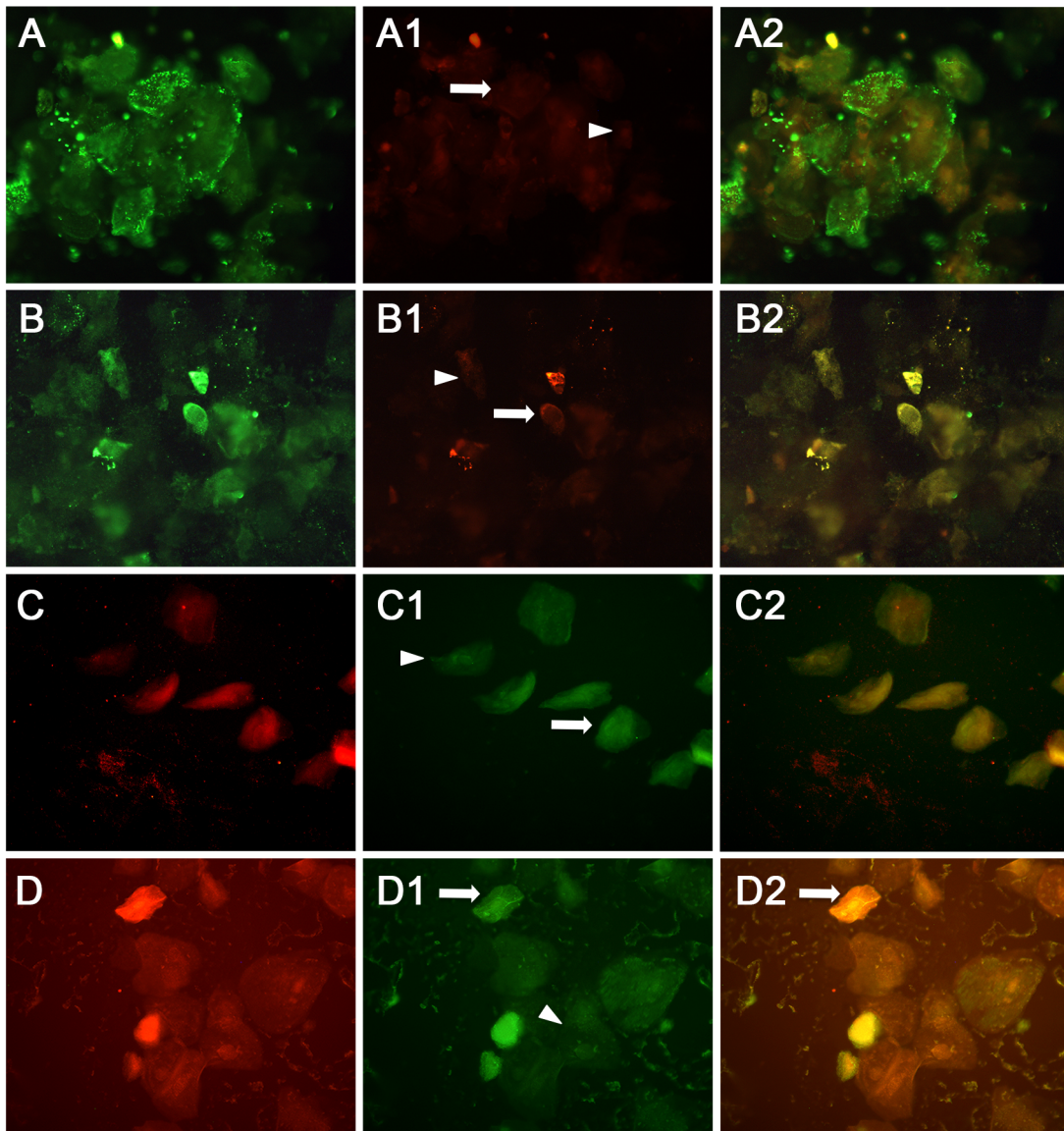


Figura 43. Analisi dell'espressione delle proteine DIAPH1, *alpha*-tubulina acetilata e MAP4 nelle cellule esfoliate dell'apparato respiratorio umano infettate dal virus influenza A. I sedimenti di cellule epiteliali del tratto naso-faringeo umano positive per il virus influenza A venivano sottoposti a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A) anti-HA di sottotipo 1, (B, C, D) anti-NP, (A1, B1) anti-*alpha*-tubulina acetilata, (C1) anti-MAP4 e (D1) anti-DIAPH1. Tali anticorpi venivano rivelati con (A) anticorpi anti-immunoglobuline di pecora coniugati con isotiocianato di fluoresceina (in verde), (B) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di fluoresceina (in verde), (C, D, A1, B1) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina (in rosso) e (C1, D1) anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina (in verde). Nelle immagini A2, B2, C2 e D2 è mostrata la sovrapposizione dei piani focali A ed A1, B e B1, C e C1, D e D1, rispettivamente. Tale sovrapposizione è stata ottenuta impiegando il software Leica QFluoro. Le aree di sovrapposizione tra le proteine oggetto di studio appaiono in colore arancione/giallo. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (ingrandimento: 500x).

Relativamente ai sedimenti cellulari positivi per il virus respiratorio sinciziale, è stato possibile osservare che, nelle cellule infettate, rilevate nel campo microscopico mediante marcaggio della proteina di fusione del virus, l'espressione di *alpha*-tubulina acetilata era più accentuata (freccia nella Figura 44A1), rispetto alle cellule non infettate (triangolo nella Figura 44A1). In particolare, l'espressione di *alpha*-tubulina acetilata era assai rilevante nelle cellule ciliate riscontrate nei diversi campi microscopici (Figura 44D ed E). Al contrario, l'espressione delle proteine MAP4 e DIAPH1 era di lieve entità (freccie nella Figura 44B1 e C1), rispetto a quanto osservato nelle cellule non infettate (triangoli in B1 e C1).

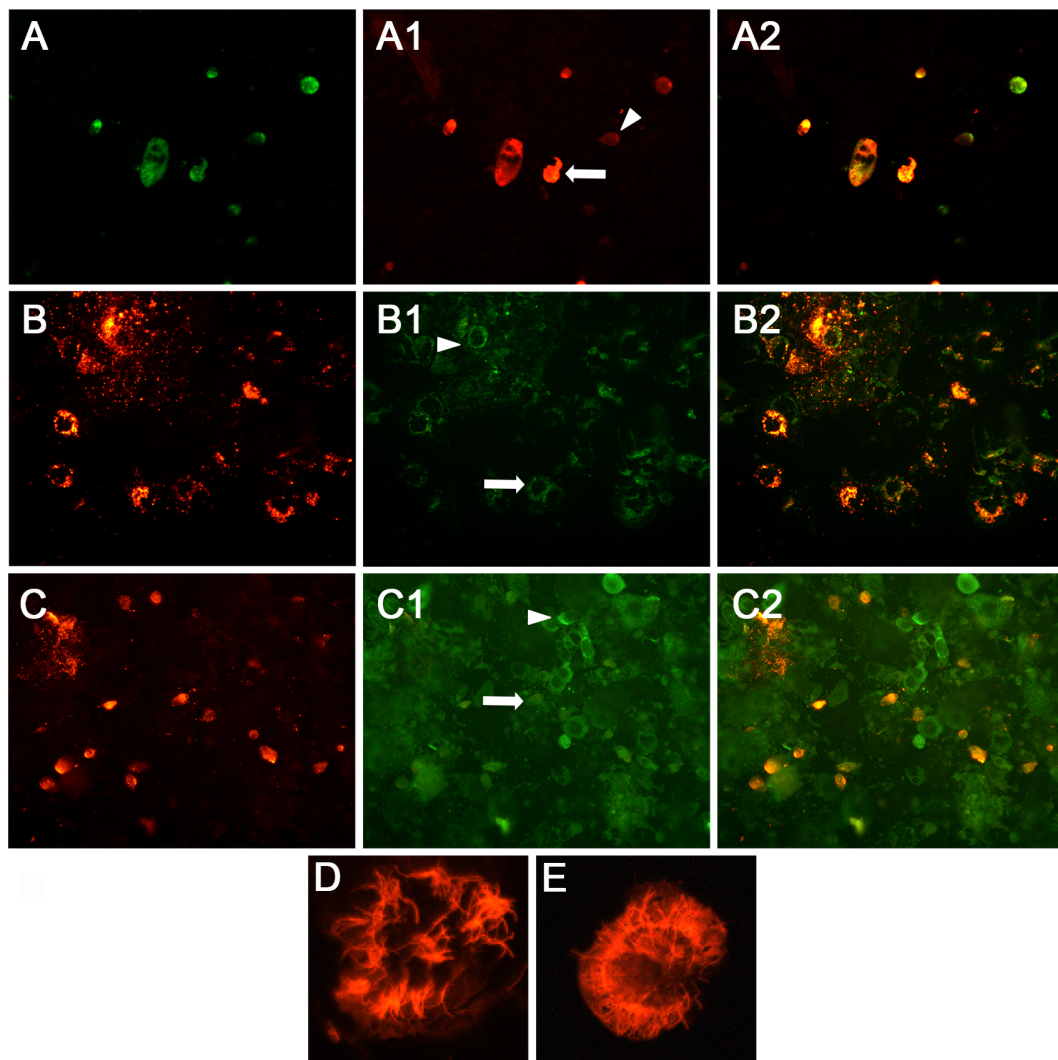


Figura 44. Analisi dell'espressione delle proteine DIAPH1, *alpha*-tubulina acetilata e MAP4 nelle cellule esfoliate dell'apparato respiratorio umano infettate dal virus respiratorio sinciziale. I sedimenti di cellule epiteliali del tratto naso-faringeo umano positive per il virus respiratorio sinciziale venivano sottoposti a reazione di immunofluorescenza indiretta, impiegando degli anticorpi (A, B, C) anti-subunità F0 e F1 della proteina di fusione del virus respiratorio sinciziale, (A1, D, E) anti-*alpha*-tubulina acetilata, (B1) anti-MAP4 e (C1) anti-DIAPH1. Tali anticorpi venivano rivelati con (A) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di fluoresceina (in verde), (B, C, D, E, A1) anticorpi anti-immunoglobuline di topo coniugati con isotiocianato di rodamina (in rosso) e (B1, C1) anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina (in verde). Nelle immagini A2, B2 e C2 è mostrata la sovrapposizione dei piani focali A e A1, B e B1, C e C1, rispettivamente. Tale sovrapposizione è stata ottenuta impiegando il software Leica QFluoro. Nelle immagini D ed E sono mostrate cellule ciliate dell'epitelio respiratorio umano presenti in sedimenti cellulari positivi per il virus respiratorio sinciziale. I risultati sono rappresentativi di due esperimenti indipendenti. I preparati venivano osservati con un microscopio a fluorescenza (A-C2: ingrandimento: 500x; D, E: ingrandimento: 2000x).

In conclusione, l'analisi in immunofluorescenza nelle cellule esfoliate dell'epitelio respiratorio umano evidenzia delle differenti modulazioni dell'espressione delle componenti dei microtubuli e della proteina DIAPH1, dipendentemente dalla tipologia di virus che le ha infettate.

DISCUSSIONE

Il lavoro sperimentale oggetto di questa tesi nasce da un'interessante problematica scientifica, volta a mettere in luce l'intervento di una componente cellulare, il citoscheletro, nella regolazione dell'infezione sperimentale della linea cellulare LLC-MK2 (rene di scimmia) con stipiti di virus influenza A (H1N1). Le cellule LLC-MK2 costituiscono un modello semi-permissivo per il virus influenza, nel caso si utilizzi un inoculo virale a bassa molteplicità, e, pertanto, sono funzionali a svelare meccanismi di resistenza cellulare all'infezione virale.

Le complesse dinamiche dei virus influenzali sfidano continuamente le barriere d'ospite e l'emergenza di un nuovo ceppo di virus influenza umano ad elevata virulenza rappresenta un'evenienza costante. Considerando che, nella complessa interazione virus influenza-ospite, i fattori dell'ospite giocano un ruolo chiave nel determinare la severità della malattia, gli studi, quale quello oggetto della tesi, finalizzati all'identificazione dei fattori di restrizione all'infezione virale risultano di fondamentale importanza per comprendere le "esigenze", a livello molecolare, di specifici fattori cellulari da parte del virus, che, in prospettiva futura, potrebbero offrire lo spunto per la formulazione di nuovi vaccini e sostanze anti-virali.

Precedenti osservazioni del gruppo di ricerca in cui sono stata inserita attestano che i sistemi citoscheletrici dei microtubuli e dei microfilamenti costituiscono un fattore di restrizione nelle fasi precoci dell'infezione del virus influenza ^{178, 179}. Sulla base di tali premesse, l'obiettivo principale della tesi è stato quello di appurare l'intervento di funzioni/componenti regolatorie dei microtubuli e dei microfilamenti in corso di infezione sperimentale con stipiti di virus influenza A (H1N1) nelle cellule LLC-MK2. L'attenzione è stata inizialmente focalizzata sul ruolo svolto dai proteasomi nella regolazione dei microtubuli e sulle parallele ripercussioni esercitate sull'infezione virale.

Le proprietà dei microtubuli sono strettamente dipendenti sia dalle subunità di *alpha*- e *beta*-tubulina, che possono andare incontro a differenti modificazioni post-traduzionali, sia dalla loro interazione con proteine motrici ed associate ¹⁸¹. Numerosi dati di letteratura hanno suffragato la capacità dei microtubuli di alternare un assetto stabile ad un assetto altamente dinamico, dipendentemente dal tipo cellulare, dalla fase del ciclo cellulare e dalle interazioni con proteine regolatorie ^{85 - 87}. Le dinamiche dei microtubuli sono sottoposte al controllo di diversi elementi regolatori, tra i quali spiccano, per rilevanza, i proteasomi ^{182, 183}. È noto che i virus sfruttano il sistema dei microtubuli per assicurare le fasi di trasporto intracellulare ai siti di replicazione, assemblaggio e fuoriuscita dalla cellula ospite ^{184, 185}. Inoltre, crescenti evidenze sperimentali attestano l'intervento dei virus nella riorganizzazione dei microtubuli, non solo al fine di adattarli alle loro esigenze replicative ^{186 - 189}, ma anche per contrastare i meccanismi di difesa cellulare ¹⁹⁰.

In una fase iniziale del percorso sperimentale, sono state impiegate delle sostanze chimiche in grado di modulare le funzioni proteolitiche dei proteasomi, al fine di valutarne le ripercussioni sull'assetto dei microtubuli e sull'espletamento del ciclo replicativo dei virus influenzali A/NWS/33 (stipite umano) e A/Mallard/03 (stipite aviare) nelle cellule LLC-MK2. I risultati ottenuti attestano una diminuzione di espressione di *alpha*-tubulina acetilata, principale componente dei microtubuli in assetto stabilizzato, a seguito dell'attivazione delle funzioni proteolitiche dei proteasomi con la sostanza IU1; viceversa, è stato appurato un aumento dell'espressione della suddetta proteina, in conseguenza dell'inibizione dei proteasomi con la sostanza MG132. Le condizioni sperimentali prescelte hanno consentito di osservare la comparsa di modificazioni nei microtubuli delle cellule LLC-MK2, che correlavano con modulazioni dell'infezione del virus influenza. Più

precisamente, l'efficienza del ciclo replicativo virale aumentava in condizioni di attivazione dei proteasomi e, pertanto, di maggiore dinamicità dei microtubuli, mentre diminuiva a seguito dell'inibizione dei proteasomi, che era correlata all'aumento della stabilizzazione dei microtubuli.

E' verosimile ritenere che, tra gli effetti esercitati dalla modulazione dell'attività proteolitica dei proteasomi, siano, in primo luogo, implicate delle alterazioni dei meccanismi di trasporto mediati dai microtubuli. In accordo con tale ipotesi, alcuni Autori hanno dimostrato che l'inibizione dei proteasomi interferisce negativamente con le dinamiche dei microtubuli ed ha ripercussioni negative sulle funzioni di trasporto ad essi correlate ^{191 - 193}.

Allo scopo di approfondire il coinvolgimento dei proteasomi nella regolazione delle dinamiche dei microtubuli nelle cellule LLC-MK2, ne è stata successivamente esaminata la localizzazione subcellulare, mediante microscopia confocale. I risultati ottenuti hanno consentito di dimostrare una parziale co-localizzazione dei proteasomi con la nucleoproteina virale e con componenti dei microtubuli stabili. In particolare, sebbene quest'ultima osservazione sia stata riscontrata anche nelle cellule non infettate, il segnale di co-localizzazione era di maggiore entità nelle cellule infettate, dove sono stati osservati dei rilevanti cambiamenti nella distribuzione citoplasmatica e nell'espressione delle proteine *alpha*-tubulina e MAP4. Infatti, nelle cellule infettate è stato osservato un addensamento di *alpha*-tubulina nella regione perinucleare ed una diminuzione dell'espressione di MAP4. Inoltre, la presenza di differenti segnali di co-localizzazione tra i proteasomi ed i marcatori dei microtubuli stabili in specifiche aree citoplasmatiche, è indicativa del fatto che, nelle cellule LLC-MK2 infettate dal virus influenza, i proteasomi formano dei complessi con i microtubuli in assetto stabilizzato, attraverso una selettiva interazione con la proteina *alpha*-tubulina acetilata, oppure con la proteina MAP4.

Nell'insieme, i risultati ottenuti depongono per l'intervento dei proteasomi nella modulazione dell'assetto dei microtubuli nelle cellule LLC-MK2 infettate con il virus influenza, che trae vantaggio da un "contesto" citoscheletrico reso idoneo alla sua replicazione. Tuttavia, i suddetti risultati rendono ardua la generalizzazione delle conclusioni ottenute. Infatti, il coinvolgimento dei proteasomi potrebbe anche essere funzionale al virus influenza per modulare, a proprio vantaggio, dei meccanismi di segnalazione intracellulare mediati dai microtubuli, che, svolgendo un'azione regolatoria sull'immunità innata, potrebbero, indirettamente, contribuire alla virulenza del virus ^{186, 194}. Inoltre, alla luce del fatto che i proteasomi svolgono un ruolo regolatorio in numerosi processi cellulari, non si può escludere che l'alterazione dell'omeostasi proteica indotta dalla loro inibizione possa contrastare l'infezione del virus influenza tramite meccanismi indipendenti dai microtubuli. A tal riguardo, è stato, ad esempio, evidenziato che l'attivazione del fattore nucleare pro-infiammatorio NF-kB, che viene considerato un parametro dell'efficienza replicativa del virus influenza A ^{195 - 197}, è strettamente connessa alla degradazione, mediata dai proteasomi, delle proteine che inibiscono tale fattore ¹⁹⁸. In aggiunta, è stato riportato che l'inibitore dei proteasomi PS-341 interferisce negativamente con la replicazione del virus influenza A, tramite l'attivazione di meccanismi di segnalazione intracellulare, mediati dal fattore NF-kB e dalla chinasi c-Jun NH₂-terminale, come anche della trascrizione di citochine ad attività anti-virale ¹⁹⁹.

In una fase successiva del percorso sperimentale, l'attenzione è stata focalizzata sull'analisi della possibile interazione tra microtubuli e microfilamenti e sul contributo sinergico di tali componenti del citoscheletro alla regolazione del ciclo replicativo virale nelle cellule LLC-MK2.

A tutt'oggi sussistono dati non esaustivi riguardanti la cooperazione e l'interazione che si esprimono tra microtubuli e microfilamenti ^{125 - 129, 131, 132}; le evidenze

sperimentali disponibili sono, in particolar modo, riferite a processi biologici che portano ad una rapida riorganizzazione cellulare in risposta a stimoli esterni, quale l'infezione virale ^{129, 130}.

I risultati ottenuti hanno consentito di appurare che la depolimerizzazione con sostanze chimiche dei microtubuli e dei microfilamenti dà luogo a modificazioni reciproche dell'assetto di tali componenti citoscheletriche, deponendo per il fatto che sussista una sorta di "comunicazione" tra di esse, in accordo con altre osservazioni sperimentali ¹³². Inoltre, è stato osservato che i sistemi dei microtubuli e dei microfilamenti fungono da fattore di restrizione nei confronti di fasi precoci dell'infezione virale, in accordo con precedenti osservazioni ^{178, 179}.

Alcuni dati di letteratura attestano che la depolimerizzazione dei microtubuli con nocodazolo può attivare enzimi a funzione deacetilasi, che contribuiscono ad aumentare la dinamicità di tale componente del citoscheletro, in quanto ne diminuiscono il livello di acetilazione ²⁰⁰.

In particolare, l'effetto positivo del trattamento con nocodazolo sulle fasi precoci dell'infezione virale potrebbe essere imputabile alla principale modalità di internalizzazione impiegata dal virus NWS/33 nelle cellule LLC-MK2, ossia la macropinosi ⁶⁸. A tale riguardo, alcune evidenze sperimentali hanno dimostrato che il trattamento con nocodazolo nelle cellule polarizzate MDCK, che costituiscono un modello permissivo per i virus influenzali, ostacola le funzioni di trasporto intracitoplasmatico dalla regione baso-laterale verso quella apicale ^{201, 202}. Tuttavia, in tali cellule, l'ingresso del virus avviene esclusivamente nel distretto apicale e, pertanto, non è influenzato dall'azione regolatoria dei microtubuli. Dal momento che l'internalizzazione del virus NWS/33 nelle cellule LLC-MK2 avviene anche a livello della regione baso-laterale ¹⁷⁸, in quest'ultimo distretto il sistema dei microtubuli in assetto stabilizzato sarebbe in grado di contrastare efficacemente la veicolazione del

virus. Qualora, invece, la penetrazione del virus influenzale avvenga mediante endocitosi, questa risulta subordinata al legame del virus con i recettori di membrana ed avviene all'interno di vescicole rivestite principalmente di clatrina ²⁰³, ²⁰⁴. Tali vescicole si formano in particolari zone della membrana plasmatica, denominate fossette rivestite. È interessante rilevare come, in alcune cellule, tali fossette siano in connessione a fasci citoplasmatici di actina ⁸⁴. Tale interazione potrebbe rendere ragione della difficoltà di espletamento delle fasi precoci dell'infezione del virus influenza osservato nel modello LLC-MK2, dove è presente una ricca concentrazione della componente dell'actina corticale. In tale ottica, è verosimile ritenere che il trattamento con citocalasina B, in grado di depolimerizzare i microfilamenti, agevoli l'impiego dei meccanismi di endocitosi da parte del virus.

Dal momento che i dati ottenuti hanno evidenziato la co-partecipazione dei microtubuli e dei microfilamenti alla regolazione del ciclo replicativo virale, l'attenzione è stata successivamente rivolta al possibile intervento di un fattore cellulare che regola le funzioni di entrambe le componenti, ossia la proteina omologa alla proteina diafano 1 di *Drosophila* (DIAPH1).

L'abilità delle formine di regolare le proprietà dei microtubuli, in stretta coordinazione con gli effetti indotti sui microfilamenti, suggerisce che tali proteine possano svolgere un ruolo chiave nel controllo delle dinamiche del citoscheletro. Nello specifico, sono state evidenziate delle interazioni dirette delle formine con i microtubuli ¹³³, ¹⁵⁷, come anche delle interazioni mediate da proteine regolatorie, che avevano come bersaglio l'estremità positiva dei microtubuli ¹⁵¹, ¹⁵⁴, ²⁰⁵, oppure ne modificavano lo stato post-traduzionale ¹³⁴, ²⁰⁶. In particolare, alla formina DIAPH1 è stata attribuita un'attività deacetilasica, che contribuirebbe a contrastare la stabilizzazione dei microtubuli ²⁰⁷.

Nonostante le suddette evidenze scientifiche, le conoscenze sulle modalità di interazione delle formine con fattori di regolazione dei microtubuli e dei microfilamenti in corso di infezione virale risultano assai limitate. A tal riguardo, è stato osservato che l'infezione del virus herpes umano 8 comporta un aumento dei microtubuli acetilati ¹⁶⁷. Al contrario, l'infezione con il virus vaccinico favorisce l'aumento della dinamicità del sistema dei microtubuli, imputabile all'inibizione del fattore RhoA, indotta dalla proteina virale F11L, analogamente a quanto osservato in condizioni di silenziamento del gene che codifica per la formina DIAPH1 ^{168, 208}. Infine, è stato osservato che il silenziamento del gene che codifica per la proteina DIAPH1 aumenta l'efficienza replicativa del virus della mixomatosi del coniglio, dal momento che, diminuendo la componente corticale dell'actina, favorisce la fuoriuscita della progenie virale dalla cellula ospite ²⁰⁹.

Allo scopo di valutare l'intervento della formina DIAPH1 sul ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2 sono stati intrapresi degli esperimenti di silenziamento genico con RNA interferenti. I dati ottenuti nelle cellule LLC-MK2 sottoposte a silenziamento genico ed infettate con il virus influenza A/NWS/33 hanno evidenziato un aumento della produttività dell'infezione virale. Inoltre, è stata osservata una modificazione di assetto dei microtubuli, che erano caratterizzati da una diminuita espressione di *alpha*- e *beta*-tubulina e si estendevano ad un'area citoplasmatica più ampia, e dei microfilamenti, che erano contraddistinti da una diminuzione della componente filamentosa dell'actina, in particolar modo a livello corticale.

Recenti dati di letteratura hanno evidenziato che il silenziamento del gene DIAPH1 comporta una diminuzione dei microtubuli stabili, con ripercussioni sul traffico intracellulare ²¹⁰. Inoltre, la deplezione di DIAPH1 favorisce l'aumento dell'instabilità dinamica dei microtubuli ²¹¹ e la diminuzione della componente

detirosinata, che è appannaggio esclusivo di microtubuli stabilizzati ¹⁵⁶. Al contrario, l'aumento di espressione delle formine DIAPH1 e DIAPH2 induce un aumento della stabilizzazione e della detirosinazione dei microtubuli ¹³⁴. In relazione ai microfilamenti, dati di letteratura attestano il coinvolgimento delle formine nei processi di polimerizzazione. Tra questi, è stato di recente osservato che la proteina CLIP-170, associata all'estremità crescente dei microtubuli, si lega alle formine, allo scopo di favorire l'elongazione dei filamenti di actina ²¹². Inoltre, è stato appurato il rilevante contributo della formina DIAPH1 nell'assemblaggio della componente corticale dell'actina ²¹³.

Le suddette osservazioni rendono ragione dell'aumento di produttività dell'infezione del virus influenza A/NWS/33 osservato nelle cellule LLC-MK2 sottoposte a silenziamento del gene DIAPH1, dal momento che tale condizione sperimentale favorisce l'aumento della dinamicità dei microtubuli e la diminuzione dell'actina filamentosa. Tuttavia, sussistono anche dati di letteratura contrastanti, che attestano l'aumento della stabilità dei microtubuli, a seguito della deplezione di DIAPH1 in corso di differenziazione cellulare ¹⁴⁷.

I risultati ottenuti in esperimenti successivi hanno messo in luce una localizzazione subcellulare ed un livello di espressione altamente variabili della proteina DIAPH1 in diversi tempi dell'infezione del virus influenza A/NWS/33 nelle cellule LLC-MK2. In particolare, in fasi tardive dell'infezione, è stata anche osservata una localizzazione nucleare della proteina DIAPH1. Tali risultati depongono per specifiche funzioni regolatorie svolte dalla formina DIAPH1 nel distretto subcellulare principalmente coinvolto nell'espletamento dell'infezione virale. In particolare, alcuni Autori hanno suffragato la localizzazione nucleare delle formine, che sarebbe funzionale alla partecipazione ad eventi di segnalazione intracellulare e all'organizzazione delle complesse dinamiche del nucleoscheletro ²¹⁴.

I dati sperimentali ottenuti in una fase successiva hanno evidenziato modificazioni della localizzazione ed espressione della proteina DIAPH1 a seguito della depolimerizzazione dei microtubuli e dei microfilamenti, che depongono per l'esistenza di una "interazione" di tale proteina con le suddette componenti del citoscheletro. A tal riguardo, alcuni Autori hanno appurato modificazioni nella localizzazione intracellulare della proteina DIAPH1 in seguito alla destabilizzazione dei microfilamenti con sostanze chimiche ²¹⁵; infatti, rispetto ad una distribuzione diffusa nel citoplasma, è stata rilevata un'organizzazione filamentosa, soprattutto nel distretto perinucleare, dove la proteina DIAPH1 co-localizzava con i microtubuli. Tali osservazioni rendono ragione del fatto che la proteina DIAPH1, in condizioni di ridotta associazione con i microfilamenti, sarebbe in grado di promuovere la sua interazione con i microtubuli.

In seguito, sono stati condotti degli esperimenti in microscopia confocale, che hanno evidenziato, nelle cellule LLC-MK2 infettate, la parziale co-localizzazione della proteina DIAPH1, oltre che con la nucleoproteina virale, anche con actina, *alpha*-tubulina acetilata e *beta*-tubulina. Tali risultati sono in accordo con dati di letteratura, che attestano la co-localizzazione della proteina DIAPH1 con i microtubuli ed i microfilamenti ²¹⁰. In particolare, la co-localizzazione della proteina DIAPH1 con componenti del citoscheletro cellulare è risultata di entità maggiore, oltre che appannaggio di differenti aree citoplasmatiche, nelle cellule LLC-MK2 infettate dal virus NWS/33, rispetto alle cellule non infettate. Tali evidenze sperimentali potrebbero rendere ragione di una localizzazione differenziale ed altamente dinamica della proteina DIAPH1 che, in condizioni di infezione virale, aumenterebbe la propria espressione, promuovendo la stabilizzazione dei microtubuli e la polimerizzazione dei microfilamenti in specifiche regioni del citoplasma, al fine di contrastare la replicazione del virus.

Infine, nell'ottica di generalizzare le osservazioni sperimentali ottenute nel modello cellulare LLC-MK2, l'espressione di componenti dei microtubuli e della proteina DIAPH1 è stata esaminata anche nelle cellule dell'epitelio respiratorio umano. Allo scopo, sono state impiegate cellule positive per il virus influenza A, oppure per il virus respiratorio sinciziale, derivanti da tamponi faringei e nasali di soggetti ricoverati od osservati ambulatorialmente e pervenuti presso l'Unità Operativa di Virologia dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma per la diagnosi di laboratorio di infezione da virus dell'apparato respiratorio. In particolare, i risultati ottenuti hanno evidenziato che, nelle cellule positive per il virus influenza A, l'espressione della proteina DIAPH1 risultava più accentuata, rispetto alle cellule non infettate, analogamente a quanto riscontrato nel modello LLC-MK2. Al contrario, nelle cellule positive per il virus respiratorio sinciziale, la proteina DIAPH1 presentava una ridotta espressione. Tali risultati rendono ragione del fatto che, anche nelle cellule dell'epitelio respiratorio umano, l'espressione della proteina DIAPH1 è soggetta a differenti modulazioni in corso d'infezione virale.

I risultati conseguiti rafforzano le conoscenze sul fatto che la stabilizzazione dei microtubuli e la polimerizzazione dei microfilamenti, alla cui regolazione partecipano i proteasomi e la formina DIAPH1, possa concorrere in maniera significativa alla modulazione dell'infezione del virus influenza A nelle cellule LLC-MK2.

Nell'insieme, tali risultati rendono ragione dell'elevata complessità del rapporto che intercorre tra virus influenza e cellula ospite e pongono l'accento sulla stretta correlazione con aspetti morfologico-funzionali della cellula infettata. Le peculiarità della cellula ospite giocano, infatti, un ruolo chiave nel determinare quei complicati quanto labili equilibri, che portano alla permissività o alla resistenza cellulare all'infezione virale.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Shope R.E., 1931. Swine influenza: III. Filtration experiments and etiology. *J Exp Med.* 54(3): 373-385. doi:10.1084/jem.54.3.373
- ² Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P., 1933. A virus obtained from influenza patients. *The Lancet.* 222(5732): 66-68. doi:10.1016/S0140-6736(00)78541-2
- ³ Goodman A.G., Heinen P.P., Guerra S., Vijayan A., Sorzano C.O., Gomez C.E., Esteban M., 2011. A human multi-epitope recombinant vaccinia virus as a universal T cell vaccine candidate against influenza virus. *PLoS One.* 6(10): e25938. doi:10.1371/journal.pone.0025938
- ⁴ World Health Organization (WHO), 2014. Influenza (Seasonal). Fact sheet N° 211, March 2014.
- ⁵ Lamb R.A. e Krug R.M., 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology.* 4th Edition; Knipe D.M. and Howley P.M., Lippincott Williams & Wilkins, 1487-1531.
- ⁶ Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuenco S., Gomez J., Chen L.M., Johnson A., Tao Y., Dreyfus C., Yu W., McBride R., Carney P.J., Gilbert A.T., Chang J., Guo Z., Davis C.T., Paulson J.C., Stevens J., Rupprecht C.E., Holmes E.C., Wilson I.A., Donis R.O., 2013. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog.* 9(10): e1003657. doi:10.1371/journal.ppat.1003657
- ⁷ World Health Organization (WHO), 1980. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bulletin of the World Health Organization;* 58(4): 585-591.
- ⁸ Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y., 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev.* 56(1): 152-179.
- ⁹ Munster V.J., De Wit E., Van Riel D., Beyer W.E., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Kuiken T., Fouchier R.A., 2007. The molecular basis of the pathogenicity of the Dutch highly pathogenic human influenza A H7N7 viruses. *J Infect Dis.* 196(2): 258-265. doi:10.1086/518792
- ¹⁰ Malik Peiris J.S., 2009. Avian influenza viruses in humans. *Rev Sci Tech.* 28(1): 161-173.

- ¹¹ Kawaoka Y. e Neumann G., 2012. Influenza Virus: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology; Humana Press, 1-9.
- ¹² Qi L., Pujanauski L.M., Davis A.S., Schwartzman L.M., Chertow D.S., Baxter D., Scherler K., Hartshorn K.L., Slemons R.D., Walters K.A., Kash J.C., Taubenberger J.K., 2014. Contemporary avian influenza A virus subtype H1, H6, H7, H10, and H15 hemagglutinin genes encode a mammalian virulence factor similar to the 1918 pandemic virus H1 hemagglutinin. MBio. 5(6): e02116-14. doi:10.1128/mBio.02116-14
- ¹³ To K.K., Tsang A.K., Chan J.F., Cheng V.C., Chen H., Yuen K.Y., 2014. Emergence in China of human disease due to avian influenza A(H10N8)-cause for concern? J Infect. 68(3): 205-215. doi:10.1016/j.jinf.2013.12.014
- ¹⁴ Karasin A.I., West K., Carman S., Olsen C.W., 2004. Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. J Clin Microbiol. 42(9): 4349-4354. doi:10.1128/JCM.42.9.4349-4354.2004
- ¹⁵ Zhu H., Webby R., Lam T.T., Smith D.K., Peiris J.S., Guan Y., 2013. History of Swine influenza viruses in Asia. Curr Top Microbiol Immunol. 370: 57-68. doi:10.1007/82_2011_179
- ¹⁶ Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F., Martina B.E., Bestebroer T.M., Fouchier R.A., 2000. Influenza B virus in seals. Science. 288(5468): 1051-1053. doi:10.1126/science.288.5468.1051
- ¹⁷ Yuanji G. e Desselberger U., 1984. Genome analysis of influenza C viruses isolated in 1981/82 from pigs in China. J Gen Virol. 65: 1857-1872. doi:10.1099/0022-1317-65-11-1857
- ¹⁸ Ohwada K., Kitame F., Homma M., 1986. Experimental infections of dogs with type C influenza virus. Microbiol Immunol. 30(5): 451-460. doi:10.1111/j.1348-0421.1986.tb02971.x
- ¹⁹ Rossman J.S. e Lamb R.A., 2011. Influenza virus assembly and budding. Virology. 411(2): 229-236. doi:10.1016/j.virol.2010.12.003
- ²⁰ Palese P. e García-Sastre A., 2002. Influenza vaccines: present and future. J Clin Invest. 110(1): 9-13. doi:10.1172/JCI200215999

- ²¹ Bouvier N.M. e Palese P., 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 26(Suppl 4): D49-D53. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.039
- ²² Arias C.F., Escalera-Zamudio M., Soto-Del Rio Mde L., Cobián-Güemes A.G., Isa P., López S., 2009. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res*. 40(8): 643-654. doi:10.1016/j.arcmed.2009.10.007
- ²³ Enami M. e Enami K., 1996. Influenza virus hemagglutinin and neuroaminidase glycoproteins stimulate the membrane association of the matrix protein. *J Virol*. 70(10): 6653-6657.
- ²⁴ Zebedee S.L. e Lamb R.A., 1988. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J Virol*. 62(8): 2762-2772.
- ²⁵ Chen G.W., Yang C.C., Tsao K.C., Huang C.G., Lee L.A., Yang W.Z., Huang Y.L., Lin T.Y., Shih S.R., 2004. Influenza A virus PB1-F2 gene in recent Taiwanese isolates. *Emerg Infect Dis*. 10(4): 603-606. doi:10.3201/eid1004.030412
- ²⁶ Robertson J.S., 1979. 5' and 3' terminal nucleotide sequences of the RNA genome segments of influenza virus. *Nucleic Acids Res*. 6(12): 3745-3757. doi:10.1093/nar/6.12.3745
- ²⁷ Luo G.X., Luytjes W., Enami M., Palese P., 1991. The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol*. 65(6): 2861-2867.
- ²⁸ Li X. e Palese P., 1994. Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J Virol*. 68(2): 1245-1249.
- ²⁹ Muramoto Y., Takada A., Fujii K., Noda T., Iwatsuki-Horimoto K., Watanabe S., Horimoto T., Kida H., Kawaoka Y., 2006. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J Virol*. 80(5): 2318-2325. doi:10.1128/JVI.80.5.2318-2325.2006
- ³⁰ Baudin F., Bach C., Cusack S., Ruigrok R.W., 1994. Structure of influenza virus RNP. I. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J*. 13(13): 3158-3165.

- ³¹ Bae S.H., Cheong H.K., Lee J.H., Cheong C., Kainosho M., Choi B.S., 2001. Structural features of an influenza virus promoter and their implications for viral RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(19): 10602-10607. doi:10.1073/pnas.191268798
- ³² Lee M.K., Bae S.H., Park C.J., Cheong H.K., Cheong C., Choi B.S., 2003. A single-nucleotide natural variation (U4 to C4) in an influenza A virus promoter exhibits a large structural change: implications for differential viral RNA synthesis by RNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 31(4): 1216-1223. doi:10.1093/nar/gkg214
- ³³ Park C.J., Bae S.H., Lee M.K., Varani G., Choi B.S., 2003. Solution structure of the influenza A virus cRNA promoter: implications for differential recognition of viral promoter structures by RNA-dependent RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 31(11): 2824-2832. doi:10.1093/nar/gkg387
- ³⁴ Palese P. e Schulman J.L., 1976. Differences in RNA patterns of influenza A viruses. *J Virol.* 17(3): 876-874.
- ³⁵ Ritchey M.B., Palese P., Kilbourne E.D., 1976. RNAs of influenza A, B, and C viruses. *J Virol.* 18(2): 738-744.
- ³⁶ McAuley J.L., Hornung F., Boyd K.L., Smith A.M., McKeon R., Bennink J., Yewdell J.W., McCullers J.A., 2007. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe.* 2(4): 240-249. doi:10.1016/j.chom.2007.09.001
- ³⁷ Chen W., Calvo P.A., Malide D., Gibbs J., Schubert U., Bacik I., Basta S., O'Neill R., Schickli J., Palese P., Henklein P., Bennink J.R., Yewdell J.W., 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med.* 7(12): 1306-1312. doi:10.1038/nm1201-1306
- ³⁸ Gibbs J.S., Malide D., Hornung F., Bennink J.R., Yewdell J.W., 2003. The influenza A virus PB1-F2 protein targets the inner mitochondrial membrane via a predicted basic amphipathic helix that disrupts mitochondrial function. *J Virol.* 77(13): 7214-7224. doi:10.1128/JVI.77.13.7214-7224.2003

- ³⁹ Zamarin D., García-Sastre A., Xiao X., Wang R., Palese P., 2005. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog.* 1(1): e4. doi:10.1371/journal.ppat.0010004
- ⁴⁰ Wise H.M., Foeglein A., Sun J., Dalton R.M., Patel S., Howard W., Anderson E.C., Barclay W.S., Digard P., 2009. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol.* 83(16): 8021-8031. doi:10.1128/JVI.00826-09
- ⁴¹ Medina R.A. e García-Sastre A., 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol.* 9(8): 590-603. doi:10.1038/nrmicro2613
- ⁴² Yewdell J.W e Ince W.L., 2012. Virology. Frameshifting to PA-X influenza. *Science.* 337(6091): 164-165. doi:10.1126/science.1225539
- ⁴³ Shi Y., Wu Y., Zhang W., Qi J., Gao G.F., 2014. Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. *Nat Rev Microbiol.* 12(12): 822-831. doi:10.1038/nrmicro3362
- ⁴⁴ Lamb R.A. e Choppin P.W., 1981. Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. *Virology.* 112(2): 729-737. doi:10.1016/0042-6822(81)90317-2
- ⁴⁵ Wise H.M., Hutchinson E.C., Jagger B.W., Stuart A.D., Kang Z.H., Robb N., Schwartzman L.M., Kash J.C., Fodor E., Firth A.E., Gog J.R., Taubenberger J.K., Digard P., 2012. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS Pathog.* 28(11): e1002998. doi:10.1371/journal.ppat.1002998
- ⁴⁶ Lamb R.A. e Choppin P.W., 1979. Segment 8 of influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(10): 4908-4912.
- ⁴⁷ Klenk E., Faillard H., Lempfrid H., 1955. Enzymatic effect of the influenza virus. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 301(4-6): 235-246.
- ⁴⁸ Rosenberg A., Howe C., Chargaff E., 1956. Inhibition of influenza virus haemagglutination by a brain lipid fraction. *Nature.* 177(4501): 234-235.

- ⁴⁹ Schauer R., 1982. Chemistry, metabolism, and biological functions of sialic acids. *Adv Carbohydr Chem Biochem.* 40: 131-234.
- ⁵⁰ Varki A., 1992. Diversity in the sialic acids. *Glycobiology.* 2(1): 25-40. doi:10.1093/glycob/2.1.25
- ⁵¹ Kawaoka Y., 2006. *Influenza Virology: Current Topics*; Caister Academic Press.
- ⁵² Rogers G.N. e D'Souza B.L., 1989. Receptor binding properties of human and animal H1 influenza virus isolates. *Virology.* 173(1): 317-322. doi:10.1016/0042-6822(89)90249-3
- ⁵³ Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., Suzuki Y., Tateno Y., Nakajima K., 1991. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology.* 182(2): 475-485. doi:10.1016/0042-6822(91)90588-3
- ⁵⁴ Connor R.J., Kawaoka Y., Webster R.G., Paulson J.C., 1994. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology.* 205(1): 17-23. doi:10.1006/viro.1994.1615
- ⁵⁵ Matrosovich M.N., Gambaryan A.S., Teneberg S., Piskarev V.E., Yamnikova S.S., Lvov D.K., Robertson J.S., Karlsson K.A., 1997. Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology.* 233(1): 224-234. doi:10.1006/viro.1997.8580
- ⁵⁶ Ito T., Couceiro J.N., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., Donatelli I., Kida H., Paulson J.C., Webster R.G., Kawaoka Y., 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol.* 72(9): 7367-7373.
- ⁵⁷ Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R., 1999. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *J Virol.* 73(2): 1146-1155.
- ⁵⁸ Baigent S.J. e McCauley J.W., 2003. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *Bioessays.* 25(7): 657-671. doi:10.1002/bies.10303

- ⁵⁹ Patterson S., Oxford J.S., Dourmashkin R.R., 1979. Studies on the mechanism of influenza virus entry into cells. *J Gen Virol.* 43(1): 223-229. doi:10.1099/0022-1317-43-1-223
- ⁶⁰ Matlin K.S., Reggio H., Helenius A., Simons K., 1981. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol.* 91(3 Pt 1): 601-613.
- ⁶¹ Yoshimura A., Kuroda K., Kawasaki K., Yamashina S., Maeda T., Ohnishi S., 1982. Infectious cell entry mechanism of influenza virus. *J Virol.* 43(1): 284-293.
- ⁶² Yoshimura A. e Ohnishi S., 1984. Uncoating of influenza virus in endosomes. *J Virol.* 51(2): 497-504.
- ⁶³ Sieczkarski S.B. e Whittaker G.R., 2002. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 76(20): 10455-10464. doi:10.1128/JVI.76.20.10455-10464.2002
- ⁶⁴ Lakadamyali M., Rust M.J., Babcock H.P., Zhuang X., 2003. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(16): 9280-9285. doi:10.1073/pnas.0832269100
- ⁶⁵ Skehel J.J. e Wiley D.C., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 69: 531-569. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.531
- ⁶⁶ Wagner R., Matrosovich M., Klenk H.D., 2002. Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol.* 12(3): 159-166. doi:10.1002/rmv.352
- ⁶⁷ Viswanathan K., Chandrasekaran A., Srinivasan A., Raman R., Sasisekharan V., Sasisekharan R., 2010. Glycans as receptors for influenza pathogenesis. *Glycoconj J.* 27(6): 561-570. doi:10.1007/s10719-010-9303-4
- ⁶⁸ De Conto F., Covan S., Arcangeletti M.C., Orlandini G., Gatti R., Dettori G., Chezzi C., 2011. Differential infectious entry of human influenza A/NWS/33 virus (H1N1) in mammalian kidney cells. *Virus Res.* 155: 221-230. doi:10.1016/j.virusres.2010.10.008
- ⁶⁹ Martin K. e Helenius A., 1991a. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins:

the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell*. 67(1): 117-130. doi:10.1016/0092-8674(91)90576-K

⁷⁰ Martin K. e Helenius A., 1991b. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol*. 65(1): 232-244.

⁷¹ Bui M., Whittaker G., Helenius A., 1996. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. *J Virol*. 70(12): 8391-8401.

⁷² O'Neill R.E. e Palese P., 1995. NPI-1, the human homolog of SRP-1, interacts with influenza virus nucleoprotein. *Virology*. 206: 116-125.

⁷³ Nagata K., Kawaguchi A., Naito T., 2008. Host factors for replication and transcription of the influenza virus genome. *Rev Med Virol*. 18: 247-260. doi:10.1002/rmv.575

⁷⁴ Dias A., Bouvier D., Crepin T., McCarthy A.A., Hart D.J., Baudin F., Cusack S., Ruigrok R.W., 2009. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature*. 458(7240): 914-918. doi:10.1038/nature07745

⁷⁵ Nayak D.P., Balogun R.A., Yamada H., Zhou Z.H., Barman S., 2009. Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus Res*. 143(2): 147-161. doi:10.1016/j.virusres.2009.05.010

⁷⁶ Nayak D.P., Hui E.K.W., Barman S., 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res*. 106(2): 147-165. doi: 10.1016/j.virusres.2004.08.012

⁷⁷ Gomez-Puertas P., Albo C., Perez-Pastrana E., Vivo A., Portela A., 2000. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol*. 74(24): 11538-11547. doi:10.1128/JVI.74.24.11538-11547.2000

⁷⁸ Rodriguez-Boulan E., Paskiet K.T., Sabatini D.D., 1983. Assembly of enveloped viruses in Madin-Darby canine kidney cells: polarized budding from single attached cells and from clusters of cells in suspension. *J Cel Biol*. 96(3): 866-874. doi:10.1083/jcb.96.3.866

⁷⁹ Chen R. e Holmes E.C., 2006. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. *Mol Biol Evol*. 23(12): 2336-2341. doi:10.1093/molbev/msl102

- ⁸⁰ Wong S.S. e Yuen K.Y., 2006. Avian influenza virus infections in humans. *Chest*. 129(1): 156-168. doi:10.1378/chest.129.1.156
- ⁸¹ Johnson N.P. e Mueller J., 2002. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 "Spanish" influenza pandemic. *Bull Hist Med*. 76(1): 105-115. doi:10.1353/bhm.2002.0022
- ⁸² Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, Dawood F.S., Jain S., Finelli L., Shaw M.W., Lindstrom S., Garten R.J., Gubareva L.V., Xu X., Bridges C.B., Uyeki T.M., 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*. 360(25): 2605-2615. doi:10.1056/NEJMoa0903810
- ⁸³ Dawood F.S., Iuliano A.D., Reed C., Meltzer M.I., Shay D.K., Cheng P.Y., Bandaranayake D., Breiman R.F., Brooks W.A., Buchy P., Feikin D.R., Fowler K.B., Gordon A., Hien N.T., Horby P., Huang Q.S., Katz M.A., Krishnan A., Lal R., Montgomery J.M., Mølbak K., Pebody R., Presanis A.M., Razuri H., Steens A., Tinoco Y.O., Wallinga J., Yu H., Vong S., Bresee J., Widdowson M.A., 2012. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis*. 12(9): 687-695. doi:10.1016/S1473-3099(12)70121-4
- ⁸⁴ Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., 2011. Il citoscheletro. In: *Biologia molecolare della cellula*. Quarta edizione; Garland Science.
- ⁸⁵ Downing K.H., 2000. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 16: 89-111. doi:10.1146/annurev.cellbio.16.1.89
- ⁸⁶ Hammond J.W., Cai D., Verhey K.J., 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr Opin Cell Biol*. 20(1): 71-76. doi:10.1016/j.ceb.2007.11.010
- ⁸⁷ Wade R.H., 2009. On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol*. 43(2): 177-191. doi:10.1007/s12033-009-9193-5
- ⁸⁸ Kollman J.M., Merdes A., Mourey L., Agard D.A., 2011. Microtubule nucleation by-tubulin complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12(11): 709-721. doi:10.1038/nrm3209
- ⁸⁹ Conde C. e Cáceres A., 2009. Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nat Rev Neurosci*. 10(5): 319-332. doi:10.1038/nrn2631

- ⁹⁰ Chen J., Kanai Y., Cowan N.J., Hirokawa N., 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*. 360(6405): 674-677. doi:10.1038/360674a0
- ⁹¹ West R.R., Tenbarge K.M., Olmsted J.B., 1991. A model for microtubule-associated protein 4 structure. Domains defined by comparisons of human, mouse, and bovine sequences. *J Biol Chem*. 266(32): 21886-21896.
- ⁹² Chapin S.J., Lue C.M., Yu M.T., Bulinski J.C., 1995. Differential expression of alternatively spliced forms of MAP4: a repertoire of structurally different microtubule-binding domains. *Biochemistry*. 34(7): 2289-2301. doi:10.1021/bi00007a025
- ⁹³ Iida J., Itoh T.J., Hotani H., Nishiyama K., Murofushi H., Bulinski J.C., Hisanaga S., 2002. The projection domain of MAP4 suppresses the microtubule-bundling activity of the microtubule-binding domain. *J Mol Biol*. 320(1): 97-106. doi:10.1016/S0022-2836(02)00402-3
- ⁹⁴ Mandelkow E. e Mandelkow E.M., 1995. Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol*. 7(1): 72-81. doi:10.1016/0955-0674(95)80047-6
- ⁹⁵ Kremer B.E., Haystead T., Macara I.G., 2005. Mammalian septins regulate microtubule stability through interaction with the microtubule-binding protein MAP4. *Mol Biol Cell*. 16(10): 4648-4659. doi:10.1091/mbc.E05-03-0267
- ⁹⁶ Andersen S.S., 2000. Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18. *Trends Cell Biol*. 10(7): 261-267. doi:10.1016/S0962-8924(00)01786-4
- ⁹⁷ Sodeik B., 2000. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol*. 8(10): 465-472. doi:10.1016/S0966-842X(00)01824-2
- ⁹⁸ Ploubidou A. e Way M., 2001. Viral transport and the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol*. 13(1): 97-105. doi:10.1016/S0955-0674(00)00180-0
- ⁹⁹ Rietdorf J., Ploubidou A., Reckmann I., Holmström A., Frischknecht F., Zettl M., Zimmermann T., Way M., 2001. Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat Cell Biol*. 3: 992-1000. doi:10.1038/ncb1101-992

- ¹⁰⁰ Mabit H., Nakano M.Y., Prank U., Saam B., Döhner K., Sodeik B., Greber U.F., 2002. Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections. *J Virol.* 76(19): 9962-9971. doi:10.1128/JVI.76.19.9962-9971.2002
- ¹⁰¹ Döhner K. e Sodeik B., 2005. The role of the cytoskeleton during viral infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 285: 67-108. doi:10.1007/3-540-26764-6_3
- ¹⁰² Radtke K., Döhner K., Sodeik B., 2006. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cell Microbiol.* 8(3): 387-400. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00679.x
- ¹⁰³ Boisvert M., Fernandes S., Tijssen P., 2010. Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *J Virol.* 84(15): 7782-7792. doi: 10.1128/JVI.00479-10
- ¹⁰⁴ Chambers R. e Takimoto T., 2010. Trafficking of Sendai virus nucleocapsids is mediated by intracellular vesicles. *PLoS One.* 5(6): e10994. doi:10.1371/journal.pone.0010994
- ¹⁰⁵ Mire C.E., White J.M., Whitt M.A., 2010. A spatio-temporal analysis of matrix protein and nucleocapsid trafficking during vesicular stomatitis virus uncoating. *PLoS Pathog.* 6(7): e1000994. doi:10.1371/journal.ppat.1000994
- ¹⁰⁶ Radtke K., Kieneke D., Wolfstein A., Michael K., Steffen W., Scholz T., Karger A., Sodeik B., 2010. Plus- and minus-end directed microtubule motors bind simultaneously to herpes simplex virus capsids using different inner tegument structures. *PLoS Pathog.* 6(7): e1000991. doi:10.1371/journal.ppat.1000991
- ¹⁰⁷ Claus C., Chey S., Heinrich S., Reins M., Richardt B., Pinkert S., Fechner H., Gaunitz F., Schäfer I., Seibel P., Liebert U.G., 2011. Involvement of p32 and microtubules in alteration of mitochondrial functions by rubella virus. *J Virol.* 85(8): 3881-3892. doi:10.1128/JVI.02492-10
- ¹⁰⁸ Moon A. e Drubin D.G., 1995. The ADF/cofilin proteins: stimulus responsive modulators of actin dynamics. *Mol Biol Cell.* 6(11): 1423-1431.
- ¹⁰⁹ Coux O., Tanaka K., Goldberg A.L., 1996. Structure and functions of 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem.* 65: 801-847. doi:10.1146/annurev.bi.65.070196.004101

- ¹¹⁰ DeMartino G.N. e Slaughter C.A., 1999. The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. *J Biol Chem.* 274(32): 22123–22126. doi:10.1074/jcb.274.32.22123
- ¹¹¹ Glickman M.H. e Ciechanover A., 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* 82(2): 373-428. doi:10.1152/physrev.00027.2001
- ¹¹² Rivett A.J., 1998. Intracellular distribution of proteasomes. *Curr Opin Immunol.* 10(1): 110-114. doi:10.1016/S0952-7915(98)80040-X
- ¹¹³ Brooks P., Fuertes G., Murray R.Z., Bose S., Knecht E., Rechsteiner M.C., Hendil K.B., Tanaka K., Dysons J., Rivett A.J., 2000. Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. *Biochem J.* 346: 155-161. doi:10.1042/bj3460155
- ¹¹⁴ Tanaka K., Mizushima T., Saeki Y., 2012. The proteasome: molecular machinery and pathophysiological roles. *Biol Chem.* 393(4): 217-234. doi:10.1515/hsz-2011-0285
- ¹¹⁵ Pitzer F., Dantes A., Fuchs T., Baumeister W., Amsterdam A., 1996. Removal of proteasomes from the nucleus and their accumulation in apoptotic blebs during programmed cell death. *FEBS Lett.* 394(1): 47-50. doi:10.1016/0014-5793(96)00920-9
- ¹¹⁶ Peth A., Boettcher J.P., Dubiel W., 2007. Ubiquitin-dependent proteolysis of the microtubule end-binding protein 1, EB1, is controlled by the COP9 signalosome: possible consequences for microtubule filament stability. *J Mol Biol.* 368(2): 550-563. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.052
- ¹¹⁷ Haarer B., Aggeli D., Viggiano S., Burke D.J., Amberg D.C., 2011. Novel interactions between actin and the proteasome revealed by complex haploinsufficiency. *PLoS Genet.* 7(9): e1002288. doi:10.1371/journal.pgen.1002288
- ¹¹⁸ Kurepa J., Wang S., Smalle J., 2012. The role of 26S proteasome-dependent proteolysis in the formation and restructuring of microtubule networks. *Plant Signal Behav.* 7(10): 1289-1295. doi:10.4161/psb.21543
- ¹¹⁹ Hudson A.M., Mannix K.M., Cooley L., 2015. Actin cytoskeletal organization in *Drosophila* germline ring canals depends on Kelch function in a Cullin-RING E3 ligase. *Genetics.* 201(3): 1117-1131. doi:10.1534/genetics.115.181289

- ¹²⁰ Schneider M., Ackermann K.M., Stuart M., Wex C., Protzer U., Schätzl H.M., Glich S., 2012. Severe acute respiratory syndrome coronavirus replication is severely impaired by MG132 due to proteasome-independent inhibition of M-calpain. *J Virol.* 86(18): 10112-10122. doi:10.1128/JVI.01001-12
- ¹²¹ Haqshenas G., 2013. The p7 protein of hepatitis C virus is degraded via the proteasome-dependent pathway. *Virus Res.* 176(1-2): 211-215. doi:10.1016/j.virusres.2013.06.009
- ¹²² Ko N.L., Taylor J.M., Bellon M., Bai X.T., Shevtsov S.P., Dunder M., Nicot C., 2013. PA28 γ is a novel corepressor of HTLV-1 replication and controls viral latency. *Blood.* 121(5): 791-800. doi:10.1182/blood-2012-03-420414
- ¹²³ Schmidt F.I., Bleck C.K., Reh L., Novy K., Wollscheid B., Helenius A., Stahlberg H., Mercer J., 2013. Vaccinia virus entry is followed by core activation and proteasome-mediated release of the immunomodulatory effector vVH1 from lateral bodies. *Cell Rep.* 4(3): 464-476. doi:10.1016/j.celrep.2013.06.028
- ¹²⁴ Khor R., McElroy L.J., Whittaker G.R., 2003. The ubiquitin-vacuolar protein sorting system is selectively required during entry of influenza virus into host cells. *Traffic.* 4(12): 857-868. doi:10.1046/j.1398-9219.2003.0140.x
- ¹²⁵ Schliwa M. e van Blerkom J., 1981. Structural interaction of cytoskeletal components. *J Cell Biol.* 90(1): 222-235.
- ¹²⁶ Waterman-Storer C., Duey D.Y., Weber K.L., Keech J., Cheney R.E., Salmon E.D., Bement W.M., 2000. Microtubules remodel actomyosin networks in *Xenopus* egg extracts via two mechanisms of F-actin transport. *J Cell Biol.* 150(2): 361-376. doi:10.1083/jcb.150.2.361
- ¹²⁷ Schuh M. e Ellenberg J., 2008. A new model for asymmetric spindle positioning in mouse oocytes. *Curr Biol.* 18(24): 1986-1992. doi:10.1016/j.cub.2008.11.022
- ¹²⁸ Korobova F. e Svitkina T., 2010. Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. *Mol Biol Cell.* 21(1): 165-176. doi:10.1091/mbc.E09-07-0596

- ¹²⁹ Rodriguez O.C., Schaefer A.W., Mandato C.A., Forscher P., Bement W.M., Waterman-Storer C.M., 2003. Conserved microtubule-actin interactions in cell movement and morphogenesis. *Nat Cell Biol.* 5(7): 599-609. doi:10.1038/ncb0703-599
- ¹³⁰ Bartolini F. e Gundersen G.G., 2010. Formins and microtubules. *Biochim Biophys Acta.* 1803(2): 164-173. doi:10.1016/j.bbamcr.2009.07.006
- ¹³¹ Gavin R.H., 1997. Microtubule-microfilament synergy in the cytoskeleton. *Int Rev Cytol.* 173: 207-242. doi:10.1016/S0074-7696(08)62478-X
- ¹³² Goode B.L., Drubin D.G., Barnes G., 2000. Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol.* 12(1): 63-71. doi:10.1016/S0955-0674(99)00058-7
- ¹³³ Gaillard J., Ramabhadran V., Neumann E., Gurel P., Blanchoin L., Higgs H.N., 2011. Differential interactions of the formins INF2, mDia1, and mDia2 with microtubules. *Mol Biol Cell.* 22(23): 4575-4587. doi:10.1091/mbc.E11-07-0616
- ¹³⁴ Palazzo A.F., Cook T.A., Alberts A.S, Gundersen G.G., 2001. mDia mediate Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol.* 3(8): 723-729. doi:10.1038/35087035
- ¹³⁵ Pruyne D., Evangelista M., Yang C., Bi E., Zigmond S., Bretscher A., Boone C., 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science.* 297(5581): 612-615. doi:10.1126/science.1072309
- ¹³⁶ Sagot I., Rodal A.A., Moseley J., Goode B.L., Pellman D., 2002. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol.* 4(8): 626-631. doi:10.1038/ncb834
- ¹³⁷ Goode B.L. e Eck M.J., 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Annu Rev Biochem* 76: 593-627. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142647
- ¹³⁸ DeWard A.D. e Alberts A.S., 2008. Microtubule stabilization: formins assert their independence. *Curr Biol.* 18(14): R605-R608. doi:10.1016/j.cub.2008.06.001

- ¹³⁹ Alberts A.S., 2001. Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain. *J Biol Chem* 276(4): 2824-2030. doi:10.1074/jbc.M006205200
- ¹⁴⁰ Evangelista M., Zigmond S., Boone C., 2003. Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J Cell Sci.* 116(Pt 13): 2603-2611. doi:10.1242/jcs.00611
- ¹⁴¹ Higgs H.N., 2005. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci.* 30(6): 342-353. doi:10.1016/j.tibs.2005.04.014
- ¹⁴² Higgs H.N. e Peterson K.J., 2005. Phylogenetic analysis of the formin homology 2 domain. *Mol Biol Cell.* 16(1): 1-13. doi:10.1091/mbc.E04-07-0565
- ¹⁴³ Li F. e Higgs N.H., 2005. Dissecting requirements for auto-inhibition of actin nucleation by the formin, mDia1. *J Biol Chem.* 280(8): 6986-6992. doi:10.1074/jbc.M411605200
- ¹⁴⁴ Kovar D.R., 2006. Molecular details of formin-mediated actin assembly. *Curr Opin Cell Biol.* 18(1): 11-17. doi:10.1016/j.ceb.2005.12.011
- ¹⁴⁵ Paul A.S e Pollard T.D., 2009. Review of the mechanism of processive actin filament elongation by formins. *Cell Motil Cytoskeleton.* 66(8): 606-617. doi:10.1002/cm.20379
- ¹⁴⁶ Chesarone M.A., DuPage A.G., Goode B.L., 2010. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Mol Cell Biol.* 11(1): 62-74. doi:10.1038/nrm2816
- ¹⁴⁷ Pan J., Lordier L., Meyran D., Rameau P., Lecluse Y., Kitchen-Goosen S., Badirou I., Mokrani H., Naumiya S., Alberts A.S., Vainchenker W., Chang Y., 2014. The formin DIAPH1 (mDia1) regulates megakaryocyte proplatelet formation by remodeling the actin and microtubule cytoskeletons. *Blood.* 124(26): 3967-3977. doi:10.1182/blood-2013-12-544924
- ¹⁴⁸ Tominaga T., Sahai E., Chardin P., McCormick F., Courtneidge S.A., Alberts A.S., 2000. Diaphanous-related formins bridge Rho GTPase and Src tyrosine kinase signaling. *Mol Cell.* 5(1): 13-25. doi:10.1016/S1097-2765(00)80399-8
- ¹⁴⁹ Kato T., Watanabe N., Morishima Y., Fujita A., Ishizaki T., Narumiya S., 2001. Localization of a mammalian homolog of diaphanous, mDia1, to the mitotic spindle in HeLa cells. *J Cell Sci.* 114(Pt4): 775-784.

¹⁵⁰ Bakal C.J., Finan D., LaRose J., Wells C.D., Gish G., Kulkarni S., DeSepulveda P., Wilde A., Rottapel R., 2005. The Rho GTP exchange factor Lfc promotes spindle assembly in early mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(27): 9529-9534. doi:10.1073/pnas.0504190102

¹⁵¹ Yamana N., Arakawa Y., Nishino T., Kurokawa K., Tanji M., Itoh R.E., Monypenny J., Ishizaki T., Bito H., Nozaki K., Hashimoto N., Matsuda M., Narumiya S., 2006. The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src. *Mol Cell Biol.* 26(18): 6844-6858. doi:10.1128/MCB.00283-06

¹⁵² Gomez T.S., Kumar K., Medeiros R.B., Shimizu Y., Leibson P.J., Billadeau D.D., 2007. Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity.* 26(2): 177-190. doi:10.1016/j.immuni.2007.01.008

¹⁵³ Watanabe S., Ando Y., Yasuda S., Hosoya H., Watanabe N., Ishizaki T., Narumiya S., 2008. mDia2 induces the actin scaffold for the contractile ring and stabilizes its position during cytokinesis in NIH 3T3 cells. *Mol Biol Cell.* 19(5): 2328-2338. doi:10.1091/mbc.E07-10-1086

¹⁵⁴ Wen Y., Eng C.H., Schmorzanzer J., Cabera-Poch N., Morris E.J., Chen M., Wallar B.J., Alberts A.S., Gundersen G.G., 2004. EB1 and APC bind to mDia to stabilize microtubules downstream of Rho and promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 6(9): 820-830. doi:10.1038/ncb1160

¹⁵⁵ Yasuda S., Ocequera-Yanez F., Kato T., Okamoto M., Yonemura S., Terada Y., Ishizaki T., Narumiya S., 2004. Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature.* 428(6984): 767-771. doi:10.1038/nature02452

¹⁵⁶ Eng C.H., Huckaba T.M., Gundersen G.G., 2006. The formin mDia regulates GSK3beta through novel PKCs to promote microtubule stabilization but not MTOC reorientation in migrating fibroblasts. *Mol Biol Cell.* 17(12): 5004-5016. doi:10.1091/mbc.E05-10-0914

¹⁵⁷ Bartolini F., Moseley J.B., Schmorzanzer J., Cassimeris L., Goode B.L., Gundersen G.G., 2008. The formin mDia2 stabilizes independently of its actin nucleation activity. *J Cell Biol.* 181(3): 523-536. doi:10.1083/jcb.200709029

¹⁵⁸ Su L.K., Burrell M., Hill D.E., Gyuris J., Brent R., Wiltshire R., Trent J., Vogelstein B., Kinzler K.W., 1995. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res.* 55(14): 2972-2977.

- ¹⁵⁹ Askham J.M., Moncur P., Markham A.F, Morrison E.E., 2000. Regulation and function of the interaction between the APC tumour suppressor protein and EB1. *Oncogene*. 19(15): 1950-1958. doi:10.1038/sj.onc.1203498
- ¹⁶⁰ Mimori-Kiyosue Y., Shiina N., Tsukita S., 2000. The dynamic behavior of the APC-binding protein EB1 on the distal ends of microtubules. *Curr Biol*. 10(14): 865-868. doi:10.1016/S0960-9822(00)00600-X
- ¹⁶¹ Piehl M., Tulu U.S., Wadsworth P., Cassimeris L., 2004. Centrosome maturation: measurement of microtubule nucleation throughout the cell cycle by using GFP-tagged EB1. *Proc Natl Acad U S A*. 101(6): 1584-1588. doi:10.1073/pnas.0308205100
- ¹⁶² Nakamura M., Zhou X.Z., Lu K.P., 2001. Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr Biol*. 11(13): 1062-1067. doi:10.1016/S0960-9822(01)00297-4
- ¹⁶³ Young K.G. e Copeland J.W., 2010. Formins in cell signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1803(2): 183-190. doi:10.1016/j.bbamcr.2008.09.017
- ¹⁶⁴ Watanabe N., Madaule P., Reid T., Ishizaki T., Watanabe G., Kakizuka A., Saito Y., Nakao K., Jockusch B.M., Narumiya S., 1997. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J*. 16(11): 3044-3056. doi:10.1093/emboj/16.11.3044
- ¹⁶⁵ Watanabe N., Kato T., Fujita A., Ishizaki T., Narumiya S., 1999. Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*. 1(3): 136-143. doi:10.1038/11056
- ¹⁶⁶ Seth A., Otomo C., Rosen M.K., 2006. Autoinhibition regulates cellular localization and actin assembly activity of the diaphanous-related formins FRL α and mDia1. *J Cell Biol*. 174(5): 701-713. doi:10.1083/jcb.200605006
- ¹⁶⁷ Naranatt P.P., Krishnan H.H., Smith M.S., Chandran B., 2005. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus modulates microtubule dynamics via RhoA-GTP-diaphanous 2 signaling and utilizes the dynein in motors to deliver its DNA to the nucleus. *J Virol*. 79(2): 1191-1206. doi:10.1128/JVI.79.2.1191-1206.2005

- ¹⁶⁸ Arakawa Y., Cordeiro J.V., Way M., 2007. F11L-mediated of RhoA-mDia signaling stimulates microtubule dynamics during vaccinia virus infection. *Cell Host Microbe*. 1(3): 213-226. doi:10.1016/j.chom.2007.04.007
- ¹⁶⁹ Balzi E., Choder M., Chen W.N., Varshavsky A., Goffeau A., 1990. Cloning and functional analysis of the arginyl-tRNA-protein transferase gene ATE1 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 265(13): 7464-7471.
- ¹⁷⁰ Saha S., Mundia M.M., Zhang F., Demers R.W., Korobova F., Svitkina T., Perieteanu A.A., Dawson J.F., Kashina A., 2010. Arginylation regulates intracellular actin polymer level by modulating actin properties and binding of capping and severing proteins. *Mol Biol Cell*. 21(8): 1350-1361. doi:10.1091/mbc.E09-09-0829
- ¹⁷¹ Karakozova M., Kozak M., Wong C.C., Bailey A.O., Yates J.R. 3rd, Mogilner A., Zebroski H., Kashina A., 2006. Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science*. 313(5784): 192-196. doi:10.1126/science.1129344
- ¹⁷² Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Milzani A., Rossi R., 2005. S-glutathionylation in human platelets by a thiol-disulfide exchange-independent mechanism. *Free Radic Biol Med*. 38(11): 1501-1510. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.019
- ¹⁷³ Sparaco M., Gaeta L.M., Tozzi G., Bertini E., Pastore A., Simonati A., Santorelli F.M., Piemonte F., 2006. Protein glutathionylation in human central nervous system: potential role in redox regulation of neuronal defense against free radicals. *J Neurosci Res*. 83(2): 256-263. doi:10.1002/jnr.20729
- ¹⁷⁴ Sabens Liedhegner E.A., Gao X.H., Mieyal J.J., 2012. Mechanisms of altered redox regulation in neurodegenerative diseases-focus on S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal*. 16(6): 543-566. doi:10.1089/ars.2011.4119
- ¹⁷⁵ Terman J.R. e Kashina A., 2013. Post-translational modification and regulation of actin. *Curr Opin Cell Biol*. 25(1): 30-38. doi:10.1016/j.ceb.2012.10.009
- ¹⁷⁶ Wang J., Tekle E., Oubrahim H., Mieyal J.J., Stadtman E.R., Chock P.B., 2003. Stable and controllable RNA interference: Investigating the physiological function of glutathionylated actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(9): 5103-5106. doi:10.1073/pnas.0931345100

- ¹⁷⁷ Pastore A., Tozzi G., Gaeta L.M., Bertini E., Serafini V., Di Cesare S., Bonetto V., Casoni F., Carrozzo R., Federici G., Piemonte F. 2003. Actin glutathionylation increases in fibroblasts of patients with Friedreich's ataxia: a potential role in the pathogenesis of the disease. *J Biol Chem.* 278(43): 42588–42595. doi:10.1074/jbc.M301872200
- ¹⁷⁸ Arcangeletti M.C., De Conto F., Ferraglia F., Pinardi F., Gatti R., Orlandini G., Covan S., Motta F., Rodighiero I., Dettori G., Chezzi C., 2008. Host-cell-dependent role of actin cytoskeleton during the replication of a human strain of influenza A virus. *Arch Virol.* 153(7): 1209-1221. doi:10.1007/s00705-008-0103-0
- ¹⁷⁹ De Conto F., Di Lonardo E., Arcangeletti M.C., Chezzi C., Medici M.C., Calderaro A., 2012. Highly dynamic microtubules improve the effectiveness of early stages of human Influenza A/NWS/33 virus infection in LLC-MK2 cells. *PLoS One.* 7(7): e41207. doi:10.1371/journal.pone.0041207
- ¹⁸⁰ De Conto F., Chezzi C., Fazzi A., Razin S.V., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Gatti R., Calderaro A., 2015. Proteasomes raise the microtubule dynamics in influenza A (H1N1) virus-infected LLC-MK2 cells. *Cell Mol Biol Lett.* 20(5): 840-866. doi:10.1515/cmble-2015-0052
- ¹⁸¹ Garnham C.P. e Roll-Mecak A., 2012. The chemical complexity of cellular microtubules: tubulin post-translational modification enzymes and their roles in tuning microtubule functions. *Cytoskeleton (Hoboken).* 69(7): 442-463. doi:10.1002/cm.21027
- ¹⁸² David D.C., Layfield R., Serpell L., Narain Y., Goedert M., Spillantini M.G., 2002. Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem.* 83(1): 176-185. doi:10.1046/j.1471-4159.2002.01137.x
- ¹⁸³ Peth A., Boettcher J.P., Dubiel W., 2007. Ubiquitin-dependent proteolysis of the microtubule end-binding protein 1, EB1, is controlled by the COP9 signalosome: possible consequences for microtubule filament stability. *J Mol Biol.* 368(2): 550-563. doi:10.1016/j.jmb.2007.02.052
- ¹⁸⁴ Greber U.F. e Way M., 2006. A superhighway to virus infection. *Cell.* 124(4): 741-754. doi:10.1016/j.cell.2006.02.018

- ¹⁸⁵ Liu C., Liu M., Zhou J., 2007. Analysis of microtubule-mediated intracellular viral transport. *Methods Mol Med.* 137: 175-180. doi:10.1007/978-1-59745-442-1_124
- ¹⁸⁶ Han X., Li Z., Chen H., Wang H., Mei L., Wu S., Zhang T., Liu B., Lin X., 2012. Influenza virus A/Beijing/501/2009(H1N1) NS1 interacts with β -tubulin and induces disruption of the microtubule network and apoptosis on A549 cells. *PLoS One* 7(11): e48340. doi:10.1371/journal.pone.0048340
- ¹⁸⁷ Jouvenet N. e Wileman T., 2005. African swine fever infection disrupts centrosome assembly and function. *J Gen Virol.* 86(Pt3): 589-594. doi:10.1099/vir.0.80623-0
- ¹⁸⁸ Martin D., Duarte M., Lepault J., Poncet D., 2010. Sequestration of free tubulin molecules by the viral protein NSP2 induces microtubule depolymerization during rotavirus infection. *J Virol.* 84(5): 2522-2532. doi:10.1128/JVI.01883-09
- ¹⁸⁹ Simon K.O., Whitaker-Dowling P.A., Youngner J.S., Widnell C.C., 1990. Sequential disassembly of the cytoskeleton in BHK21 cells infected with vesicular stomatitis virus. *Virology.* 177(1): 289-297. doi:10.1016/0042-6822(90)90482-7
- ¹⁹⁰ Brice A. e Moseley G.W., 2013. Viral interactions with microtubules: orchestrators of host cell biology? *Future Virology.* 8(3): 229-243. doi:10.2217/fvl.12.137
- ¹⁹¹ Diaz-Corrales F.J., Miyazaki I., Asanuma M., Ruano D., Rios R.M., 2012. Centrosomal aggregates and Golgi fragmentation disrupt vesicular trafficking of DAT. *Neurobiol Aging.* 33(10): 2462-2477. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.11.014
- ¹⁹² Staff N.P., Podratz J.L., Grassner L., Bader M., Paz J., Knight A.M., Loprinzi C.L., Trushina E., Windebank A.J., 2013. Bortezomib alters microtubule polymerization and axonal transport in rat dorsal root ganglion neurons. *Neurotoxicology.* 39: 124-131. doi:10.1016/j.neuro.2013.09.001
- ¹⁹³ Agholme L., Nath S., Domert J., Marcusson J., Kågedal K., Hallbeck M., 2014. Proteasome inhibition induces stress kinase dependent transport deficits--implications for Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci.* 58: 29-39. doi:10.1016/j.mcn.2013.11.001

- ¹⁹⁴ Chiang H.S., Zhao Y., Song J.H., Liu S., Wang N., Terhorst C., Sharpe A.H., Basavappa M., Jeffrey K.L., Reinecker H.C., 2014. GEF-H1 controls microtubule-dependent sensing of nucleic acids for antiviral host defenses. *Nat Immunol.* 15(1): 63-71. doi:10.1038/ni.2766
- ¹⁹⁵ Garoufalis E., Kwan I., Lin R., Mustafa A., Pepin N., Roulston A., Lacoste J., Hiscott J., 1994. Viral induction of the human beta interferon promoter: modulation of transcription by NF-kappa B/rel proteins and interferon regulatory factors. *J Virol.* 68: 4707-4715.
- ¹⁹⁶ Ronni T., Matikainen S., Sareneva T., Melen K., Pirhonen J., Keskinen P., Julkunen I., 1997. Regulation of IFN-alpha/beta, MxA, 2',5'-oligoadenylate synthetase, and HLA gene expression in influenza A-infected human lung epithelial cells. *J Immunol.* 158: 2363-2374.
- ¹⁹⁷ Wurzer W.J., Ehrhardt C., Pleschka S., Berberich-Siebelt F., Wolff T., Walczak H., Planz O., Ludwig S., 2004. NF-kappaB-dependent induction of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and Fas/FasL is crucial for efficient influenza virus propagation. *J Biol Chem.* 279: 30931-30937.
- ¹⁹⁸ Karin M. e Ben-Neriah Y., 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol.* 18: 621-663.
- ¹⁹⁹ Dudek S.E, Luig C., Pauli E.K., Schubert U., Ludwig S., 2010. The clinically approved proteasome inhibitor PS-341 efficiently blocks influenza A virus and vesicular stomatitis virus propagation by establishing an antiviral state. *J Virol.* 84: 9439-9451. doi:10.1128/JVI.00533-10
- ²⁰⁰ Chang Y.C., Nalbant P., Birkenfeld J., Chang Z.F., Bokoch G.M., 2008. GEF-H1 couples nocodazole-induced microtubule disassembly to cell contractility via RhoA. *Mol Biol Cell.* 19: 2147-2153. doi:10.1091/mbc.E07-12-1269
- ²⁰¹ Hunziker W., Mâle P., Mellman I., 1990. Differential microtubule requirements for transcytosis in MDCK cells. *EMBO J.* 9(11): 3515-3525.
- ²⁰² van Zeijl M.J. e Matlin K.S., 1990. Microtubule perturbation inhibits intracellular transport of an apical membrane glycoprotein in a substrate-dependent manner in polarized Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Cell Regul.* 1(12): 921-936. doi:10.1091/mbc.1.12.92

- ²⁰³ Huang R.T., 1991. On the penetration mechanism of influenza viruses. *Behring Inst Mitt.* 89: 23-26.
- ²⁰⁴ Sieczkarski S.B., Whittaker G.R., 2002. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol.* 76: 10455–10464.
- ²⁰⁵ Zaoui K., Honoré S., Isnardon D., Braguer D., Badache A., 2008. Memo-RhoA-mDia1 signaling controls microtubules, the actin network, and adhesion site formation in migrating cells. *J Cell Biol.* 183(3): 401-408. doi:10.1083/jcb.200805107
- ²⁰⁶ Thurston S.F., Kulacz W.A., Shaikh S., Lee J.M., Copeland J.W., 2012. The ability to induce microtubule acetylation is a general feature of formin proteins. *PLoS One.* 7(10): e48041. doi:10.1371/journal.pone.0048041
- ²⁰⁷ Bershadsky A.D., Ballestrem C., Carramusa L., Zilberman Y., Gilquin B., Khochbin S., Alexandrova A.Y., Verkhovsky A.B., Shemesh T., Kozlov M.M., 2006. Assembly and mechanosensory function of focal adhesions: experiments and models. *Eur J Cell Biol.* 85(3-4): 165-173. doi:10.1016/j.ejcb.2005.11.001
- ²⁰⁸ Valderrama F., Cordeiro J.V., Schleich S., Frischknecht F., Way M., 2006. Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. *Science.* 311(5759): 377-381. doi:10.1126/science.1122411
- ²⁰⁹ Irwin C.R., Favis N.A., Agopsowicz K.C., Hitt M.M., Evans D.H., 2013. Myxoma virus oncolytic efficiency can be enhanced through chemical or genetic disruption of the actin cytoskeleton. *PLoS One.* 8(12): e84134. doi:10.1371/journal.pone.0084134
- ²¹⁰ Lin Y.N., Bhuwania R., Gromova K., Failla A.V., Lange T., Riecken K., Linder S., Kneussel M., Izbicki J.R., Windhorst S., 2015. Drosophila homologue of Diaphanous 1 (DIAPH1) controls the metastatic potential of colon cancer cells by regulating microtubule-dependent adhesion. *Oncotarget.* 6(21): 18577-18589. doi:10.18632/oncotarget.4094
- ²¹¹ Dong B., Zhang S.S., Gao W., Su H., Chen J., Jin F., Bhargava A., Chen X., Jorgensen L., Alberts A.S., Zhang J., Siminovitch K.A., 2013. Mammalian diaphanous-related formin 1 regulates GSK3 β -dependent microtubule dynamics required for T cell migratory polarization. *PLoS One.* 8(11): e80500. doi:10.1371/journal.pone.0080500

²¹² Henty-Ridilla J.L., Rankova A., Eskin J.A., Kenny K., Goode B.L., 2016. Accelerated actin filament polymerization from microtubule plus ends. *Science*. 352(6288): 1004-1009. doi:10.1126/science.aaf1709

²¹³ Fritzsche M., Erlenkämper C., Moeendarbary E., Charras G., Kruse K., 2016. Actin kinetics shapes cortical network structure and mechanics. *Sci Adv*. 2(4): e1501337. doi:10.1126/sciadv.1501337

²¹⁴ Chan D.C. e Leder P., 1996. Genetic evidence that formins function within the nucleus. *J Biol Chem*. 271(38): 23472-23477. doi:10.1074/jbc.271.38.23472

²¹⁵ Bartolini F., Ramalingam N., Gundersen G.G., 2012. Actin-capping protein promotes microtubule stability by antagonizing the actin activity of mDia1. *Mol Biol Cell*. 20: 4032-4040. doi:10.1091/mbc.E12-05-0338

RINGRAZIAMENTI

Alla Dott.ssa Flora De Conto per la professionalità, la determinazione e la precisione con cui mi ha guidato e incoraggiato durante questi anni di Dottorato.

Alla Prof.ssa Adriana Calderaro per avermi dato l'opportunità di frequentare l'Unità Operativa di Microbiologia e Virologia per lo svolgimento dell'attività di ricerca finalizzata alla realizzazione di questo lavoro di tesi.

Al Prof. Carlo Chezzi per i preziosi consigli, la fiducia e la stima.

Alla Prof.ssa Maria Cristina Medici per la costante collaborazione e il gradito sostegno ricevuto.

Al Prof. Luigi Roncoroni per la disponibilità e la cortesia accordatemi.

A tutti i colleghi, il personale tecnico e il personale laureato strutturato dell'Unità Operativa di Microbiologia e Virologia per avermi aiutato e sostenuto con il loro affetto.

A Rosita e Clara per l'amicizia, per i sorrisi e per aver condiviso con me i momenti di difficoltà cercando sempre di confortarmi e rallegrarmi.

A mamma e papà che hanno creduto in me e nei miei ambiziosi progetti.

A Filippo, lontano ma sempre vicino, per l'amore e l'infinita pazienza.