

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di Ricerca in Microbiologia e Virologia

XXIII ciclo

Coordinatore: Chiar.mo Prof. Luciano Polonelli

**POSSIBILI MECCANISMI DI RISPOSTA CELLULARE
ALL' INFEZIONE LITICA DA CITOMEGALOVIRUS UMANO
IN UN MODELLO SIMIL-MACROFAGICO *IN VITRO***

Tutore:

Prof.ssa Maria Cristina Arcangeletti

Dottorando:

Dott. Diego Germini

INDICE

1. RIASSUNTO	pag.3
2. PRESENTAZIONE DELLO STUDIO	pag.5
3. INTRODUZIONE	pag.7
3.1 CITOMEGALOVIRUS	pag.7
<u>3.1.1 CARATTERISTICHE GENERALI</u>	pag.7
<u>3.1.2 STRUTTURA DEL VIRIONE</u>	pag.8
<u>3.1.3 IL GENOMA DI CITOMEGALOVIRUS</u>	pag.9
3.2 IL CICLO LITICO DI CITOMEGALOVIRUS	pag.10
<u>3.2.1 L'ESPRESSIONE GENICA VIRALE NELL'AMBITO DEL CICLO REPLICATIVO LITICO</u>	pag.12
3.3 L'INFEZIONE LATENTE DA CITOMEGALOVIRUS	pag.17
3.4 PATOGENESI DELL'INFEZIONE VIRALE	pag.18
3.5 RAPPORTO CITOMEGALOVIRUS-OSPITE	pag.19
<u>3.5.1 IL CICLO CELLULARE</u>	pag.20
<u>3.5.2 IMMUNITÁ INNATA E IMMUNITÁ ACQUISITA</u>	pag.22
<u>3.5.3 I "TOLL-LIKE RECEPTORS"</u>	pag.24
<u>3.5.4 I "TOLL-LIKE RECEPTORS" E GLI AGENTI PATOGENI</u>	pag.25
<u>3.5.5 I "TOLL-LIKE RECEPTORS" E IL CICLO CELLULARE</u>	pag.30
4. TEMA E OBIETTIVI DELLA RICERCA	pag.31
5. MATERIALI E METODI	pag.33
6. RISULTATI	pag.41
6.1 ANALISI DEL CICLO CELLULARE IN MONOCITI THP-1 DIFFERENZIATI A MACROFAGI IN ASSENZA O IN PRESENZA DI INFEZIONE DA HCMV	pag.41
6.2 CARATTERIZZAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI SPECIFICI TLR IN MACROFAGI THP-1 IN ASSENZA O IN PRESENZA DI INFEZIONE DA HCMV	pag.45

6.3 POSSIBILE COINVOLGIMENTO DI TLR3, TLR4 E TLR5 NELL'ATTIVAZIONE DEL CICLO CELLULARE DI MACROFAGI THP-1 NON INFETTATI	pag. 47
<u>6.3.1 ANALISI DEL CICLO CELLULARE E DEI TRASCRITTI DI TLR3, TLR4 E TLR5 IN MACROFAGI THP-1 A SEGUITO DI STIMOLAZIONE CON UNA MOLECOLA AGONISTA DI TLR3 (POLY I:C)</u>	pag. 47
<u>6.3.2 ANALISI DEL CICLO CELLULARE E DEI TRASCRITTI DI TLR3, TLR4 E TLR5 IN MACROFAGI THP-1 A SEGUITO DI STIMOLAZIONE CON UNA MOLECOLA AGONISTA DI TLR4 (LIPOPOLISACCARIDE)</u>	pag. 49
<u>6.3.3 ANALISI DEL CICLO CELLULARE E DEI TRASCRITTI DI TLR3, TLR4 E TLR5 IN MACROFAGI THP-1 A SEGUITO DI STIMOLAZIONE CON UNA MOLECOLA AGONISTA DI TLR5 (FLAGELLINA)</u>	pag. 50
6.4 ANALISI DEL CICLO CELLULARE IN MACROFAGI THP-1 NON INFETTATI A SEGUITO DELL'INIBIZIONE DEL "SIGNALING" MEDIATO DA TLR4 UTILIZZANDO UNA MOLECOLA ANTAGONISTA DI TLR4 (CLI)	pag. 52
6.5 EFFETTI DELL'INIBIZIONE DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE MEDIATA DA TLR4 IN MACROFAGI THP-1 INFETTATI CON HCMV IN PRESENZA DELL'ANTAGONISTA CLI	pag. 53
6.6 ANALISI DEL CICLO CELLULARE IN MACROFAGI THP-1 NON INFETTATI IN SEGUITO ALL'INIBIZIONE DI TLR4 MEDIANTE UN ANTICORPO POLICLONALE CON FUNZIONE NEUTRALIZZANTE (NEUTRAB)	pag. 56
6.7 EFFETTI DELL'INIBIZIONE DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE MEDIATA DA TLR4 IN MACROFAGI THP-1 INFETTATI CON HCMV IN PRESENZA DELL'ANTAGONISTA NEUTRAB	pag. 57
<u>6.7.1 ESPRESSIONE DELLE PROTEINE PRECOCISSIME VIRALI E DI TRASCRITTI RAPPRESENTATIVI DEL CICLO LITICO DI HCMV</u>	pag. 57
<u>6.7.2 ANALISI IN MICROSCOPIA CONFOCALE DELL'EFFETTO DI NEUTRAB SULLA DISTRIBUZIONE CELLULARE DELLE PROTEINE PRECOCISSIME DI HCMV</u>	pag. 60
<u>6.7.3 EFFETTI DI DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI NEUTRAB SULLA DISTRIBUZIONE CELLULARE DELLE PROTEINE PRECOCISSIME DI HCMV</u>	pag. 61
6.8 EFFETTI DELL'INIBIZIONE DEL "SIGNALING" MEDIATO DA TLR4 SULL'ATTIVAZIONE DEL CICLO CELLULARE INDOTTA DA HCMV IN MACROFAGI THP-1	pag. 63
7. DISCUSSIONE	pag. 65
8. BIBLIOGRAFIA	pag. 70

1. RIASSUNTO

In corso di infezione da citomegalovirus umano (HCMV), un adatto stato metabolico della cellula è fondamentale per garantire al virus di portare a termine una efficace infezione produttiva. Per questo motivo HCMV ha sviluppato diverse strategie per alterare il metabolismo della cellula ospite al fine di creare le condizioni più favorevoli per la propria replicazione. In particolare, è nota la capacità del virus di interferire con il ciclo cellulare, provocandone generalmente il blocco in G1-G1/S in cellule proliferanti. Le finalità principali di questo studio sono state quelle di valutare la possibile azione di interferenza sul ciclo cellulare da parte di HCMV ed i possibili meccanismi che ne sono alla base in cellule irreversibilmente uscite dal ciclo cellulare. A tale scopo, sono stati utilizzati monociti THP-1 differenziati a macrofagi; anche in questo caso è stata dimostrata un'azione di interferenza da parte di HCMV sul ciclo cellulare, che si estrinseca spingendo tali cellule, inizialmente ferme in G0, verso la fase S. Per quel che riguarda i possibili meccanismi utilizzati dal virus, la parallela osservazione dell'attivazione del "Toll-like receptor" (TLR) 4 in corso di infezione virale e i dati recenti di letteratura che supportano il suo ruolo nell'indurre la proliferazione cellulare, hanno successivamente orientato lo studio alla verifica di un coinvolgimento di questo recettore nel mediare l'azione virus-indotta sul ciclo cellulare. A tale scopo, sono stati utilizzati due specifici antagonisti di TLR4 (che intervengono su due differenti fasi del "pathway" metabolico da esso attivato) per studiare l'efficienza dell'infezione virale e l'effetto di interferenza virus-indotta sul ciclo cellulare. I dati ricavati da questo studio supportano l'ipotesi di un coinvolgimento di TLR4 quale possibile meccanismo cooptato dal virus per l'espletamento di un'efficiente ciclo replicativo litico in macrofagi THP-1.

A suitable metabolic state of the cell is fundamental for a productive infection with human cytomegalovirus (HCMV). In particular, it is known that this virus is able to interfere with the cell cycle regulation, principally by inducing a blockade of proliferating cells in G1-G1/S phases. This study aimed at deepening our knowledge on the HCMV ability to develop a lytic cycle in a cellular model irreversibly withdrawn from the cell cycle and on the possible mechanisms used by the virus to accomplish a successful replication. To this end, we used THP-1 monocytes differentiated to macrophages and demonstrated that, in this case too, HCMV is able to deregulate the cell cycle, pushing these cells, arrested in G0, towards the S phase. As to the possible mechanisms underlying these observations, the parallel results demonstrating the Toll-like receptor (TLR) 4 activation following HCMV infection of THP-1 macrophages, and the literature data describing TLR4 as involved in the cell cycle deregulation, let us investigate the possible involvement of TLR4 in the cell cycle alteration observed in HCMV-infected THP-1 macrophages. To this end, two specific TLR4 antagonists (acting on different steps of the metabolic pathway activated by this receptor) were used. Their effects were evaluated by checking the effectiveness of virus infection, as well as the virus-induced activation of the cell cycle. Our data support the notion of a role of TLR4 in favouring the development of an efficient viral lytic cycle in THP-1 macrophages.

2. PRESENTAZIONE DELLO STUDIO

Citomegalovirus umano (HCMV), virus ubiquitario appartenente alla famiglia *Herpesviridae*, è stato per molti anni considerato un agente moderatamente patogeno per l'uomo, dal momento che le uniche patologie documentate erano rappresentate da rari casi di malattia da inclusioni in neonati con infezione congenita da HCMV. Tuttavia, la sua rilevanza ed il suo impatto sulla salute umana sono gradualmente aumentati di pari passo con l'incremento del numero di soggetti esposti a fattori di rischio, quali pazienti sottoposti a terapie immunosoppressive a seguito di trapianto d'organo o di midollo, così come malati di AIDS. Attualmente, è noto come il 70-90% della popolazione mondiale sia stata infettata da HCMV e risulti così "portatrice" di tale virus. Infatti, analogamente agli altri membri della famiglia a cui appartiene, dopo l'infezione primaria HCMV non viene eliminato dall'organismo infettato, bensì dà luogo ad un'infezione latente, con possibilità di riattivazione anche dopo molti anni, in seguito a stimoli diversi. È rilevante considerare che l'infezione primaria e/o le ricorrenze asintomatiche o paucisintomatiche negli individui immunocompetenti, possono invece portare allo sviluppo di quadri patologici a volte anche mortali, in caso di infezione congenita, o di infezione in soggetti immunocompromessi. Più recentemente, HCMV è stato tirato in causa nell'eziologia di diverse tipologie di tumori, come anche nell'ambito di processi aterosclerotici, in patologie dell'apparato cardiovascolare ed in malattie autoimmuni.

La vasta gamma di patologie che possono essere sviluppate a seguito di infezione da HCMV in categorie di soggetti a rischio è anche da mettere in relazione con la sua eccezionale capacità di infettare differenti tipi di cellule *in vivo*, quali quelle epiteliali, fibroblastiche, stromali, neuronali, epatiche, muscolari lisce, endoteliali. Inoltre, bersagli virali sono anche diverse tipologie di cellule effettrici, a vari livelli, della risposta immune, quali cellule progenitrici della linea mieloide, cellule dendritiche, neutrofili, monociti, macrofagi.

È interessante sottolineare che, "a completamento" di tale straordinaria capacità, HCMV è in grado di stabilire interazioni differenti con la cellula ospite, dipendentemente dalla tipologia cellulare coinvolta. In particolare, è stato osservato che, mentre in cellule epiteliali e fibroblastiche HCMV è in grado di espletare un classico ciclo litico, in cellule endoteliali esso dà luogo ad un'infezione con bassi livelli di produzione di progenie virale, in assenza di un effetto citopatico evidente; questo ulteriore tipo di interazione, pur non corrispondendo ad una vera fase di latenza, permette tuttavia al virus di persistere per lunghi periodi in tali cellule. Infine, è attualmente accertato come i monociti del sangue

periferico ed i loro progenitori CD34+ nel midollo osseo rappresentino le principali sedi di latenza virale. I meccanismi che permettono ad HCMV di sostenere le suddette tipologie di interazione rimangono ad oggi solo parzialmente chiariti.

Da quanto sopra esposto sembra evidente che, alla base delle diverse condizioni interattive che HCMV può stabilire con differenti tipologie cellulari, debbano necessariamente essere considerate le possibili strategie elaborate dal virus per eludere i sistemi di riconoscimento e di eradicazione da parte del sistema immunitario, in modo da potere stabilire rapporti a lungo termine con l'organismo infettato, permettendo la sopravvivenza di quest'ultimo, ma garantendo anche, al contempo, la sua stessa persistenza e possibilità di essere trasmesso ad altri ospiti. È anche da sottolineare il fatto che, come già accennato, in maniera estremamente "ingegnosa", HCMV è in grado di infettare proprio alcune delle cellule effettrici della risposta immune. A questo proposito, una tipologia cellulare di particolare interesse è rappresentata dal macrofago che costituisce uno dei più importanti bersagli strategici per HCMV, garantendo al virus la disseminazione nei diversi tessuti dell'ospite. Ciò è possibile a seguito di differenziamento dei monociti a macrofagi e conseguente riattivazione del virus ed espletamento di un ciclo replicativo litico. È interessante sottolineare che i macrofagi, diversamente da altre tipologie cellulari in grado di sostenere un'infezione produttiva da HCMV (in prevalenza metabolicamente attive), sono cellule irreversibilmente uscite dal ciclo cellulare, a seguito di differenziamento. Tale condizione è, apparentemente, in contrasto con la necessità da parte del virus di cooptare funzioni enzimatiche della cellula ospite, con particolare riguardo per gli enzimi coinvolti nella replicazione del DNA, di cui la cellula è ricca in G1/S e nella fase S precoce.

Sulla base di tali presupposti, questo studio si è proposto di individuare almeno alcuni dei possibili meccanismi cooptati da HCMV nella cellula macrofagica al fine di potere espletare un efficiente ciclo di replicazione litico. L'approfondimento delle conoscenze sulle strategie impiegate dal virus in questa tipologia cellulare, tra le più rilevanti per HCMV *in vivo*, potrebbe fornire preziose informazioni per la messa a punto di interventi volti a bloccare la riattivazione del virus latente.

3. INTRODUZIONE

3.1 CITOMEGALOVIRUS

3.1.1 CARATTERISTICHE GENERALI

Citomegalovirus umano (HCMV) è un virus ubiquitario appartenente alla famiglia *Herpesviridae*, sottofamiglia *Betaherpesvirinae* [Mocarski and Courcelle, 2001], in grado di causare infezioni nel 70-100% della popolazione. Analogamente agli altri membri della famiglia cui appartiene è un virus che può stabilire uno stato di latenza nell'ospite ed ha la capacità di riattivarsi anche dopo molti anni, in seguito a stimoli diversi [Malm and Engman, 2007; Sissons et al., 2002].

La sua rilevanza e l'impatto sulla salute umana sono gradualmente aumentati nel tempo, di pari passo con l'incremento del numero di soggetti esposti a fattori di rischio (pazienti sottoposti a terapie immunosoppressive, così come malati di AIDS). L'infezione primaria e/o le ricorrenze, che negli individui immunocompetenti risultano asintomatiche o paucisintomatiche, possono portare allo sviluppo di quadri patologici a volte anche mortali in caso di infezione congenita (con quadri di particolare gravità per il feto o per il neonato a seguito di infezione primaria materna da HCMV). Inoltre, nei trapiantati d'organo l'infezione da HCMV è spesso associata a rigetto dell'organo stesso; in ogni caso, sia per questa categoria, sia per i trapiantati di midollo, tale virus è la causa più frequente di gravi infezioni post-trapianto (quali polmonite), mentre nei malati di AIDS, la riattivazione del virus latente è spesso causa di retinite e conseguente cecità, ulcere esofagee e processi infiammatori intestinali [Cobbs et al., 2002; Pass, 2001]. Recentemente HCMV è stato associato anche ad altre patologie, tra cui diverse tipologie di tumori, processi aterosclerotici, patologie dell'apparato cardiovascolare e malattie autoimmuni [Cobbs et al., 2002; Lunardi et al., 2006; Söderberg-Nauclér, 2012; Varani and Landini, 2011].

L'associazione di questo virus a quadri clinici così differenti, quali quelli sopra riportati, è motivata anche dalla vasta gamma di tipi cellulari suscettibili all'infezione *in vivo*: cellule epiteliali, fibroblastiche, stromali, neuronali, epatiche, muscolari lisce, endoteliali e diverse tipologie di cellule effettrici della risposta immune come cellule progenitrici della linea mieloide, cellule dendritiche, neutrofili, monociti e macrofagi [Arrode and Devrinche, 2003; Lunardi et al., 2005; Pass, 2001; Sinzger et al., 1995]. Il sistema monocita-macrofago, in particolare, rappresenta non solo una importante sede di latenza (monocita), ma

anche un mezzo di disseminazione virale nell'organismo (macrofago tissutale) [Ioudinkova et al., 2006; Shane Smith et al., 2004].

3.1.2 STRUTTURA DEL VIRIONE

Il virione maturo, di forma rotondeggiante e di diametro compreso tra i 150-250 nm, è costituito da: un involucro pericapsidico ("envelope"), formato da un doppio strato fosfolipidico tipico delle membrane cellulari, da cui sporgono diversi tipi di glicoproteine virus-specifiche; un nucleocapside icosaedrico di circa 100 nm di diametro, costituito da 162 capsomeri prismatici e, interposto tra quest'ultimo e l'"envelope", uno strato di materiale elettrondenso fibroso e granulare di natura proteica denominato tegumento (Figura 1).

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

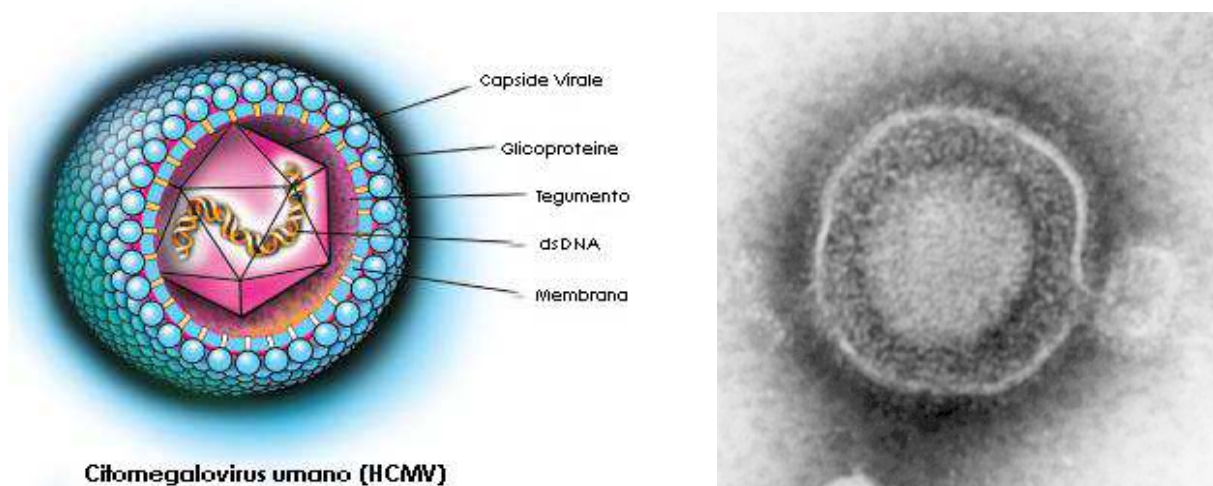


Figura 1. Citomegalovirus umano: rappresentazione schematica (immagine modificata da http://eyecaremanual.com/wp-content/uploads/2010/11/cytomegalovirus_diagram.jpg) della struttura del virione e immagine acquisita al microscopio elettronico a trasmissione.

HCMV si replica *in vitro* in cellule fibroblastoidi con corredo cromosomico diploide provenienti dalla specie ospite naturale *in vivo*, mentre cellule indifferenziate, trasformate o aneuploidi non sono suscettibili all'infezione. A differenza di altri herpesvirus, HCMV ha

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

3.1.3 IL GENOMA DI CITOMEGALOVIRUS

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

Il genoma di HCMV, di lunghezza compresa tra i 200 e 240 Kb e di peso molecolare di 150-155x10⁶ Dalton, è formato da due sequenze nucleotidiche di lunghezza diversa, UL ("Unique Long") e US ("Unique Short"), fiancheggiate da brevi sequenze di basi ripetute e invertite, indicate rispettivamente come *b* (TRL/IRL: "Terminal Repeats Long/Internal Repeats Long") e *c* (IRS/TRS: "Internal Repeats Short/Terminal Repeats Short"), che consentono l'organizzazione del genoma stesso in quattro forme isomeriche (Figura 2).

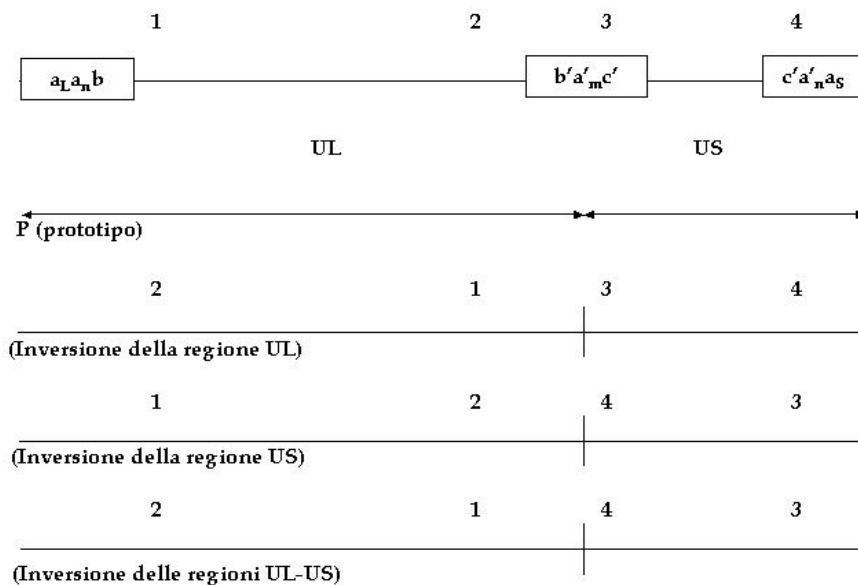


Figura 2. Rappresentazione schematica delle quattro forme isomeriche del genoma di HCMV.

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

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

Il virione maturo di HCMV, a differenza di altri virus a DNA, contiene, oltre alla molecola di DNA genomico, due classi di molecole di RNA. Un tipo di RNA forma strutture ibride RNA-DNA all'interno dell'origine di replicazione litica *oriLyt*, che potrebbero facilitare la replicazione dello stesso DNA virale [Prichard et al., 1998; Xu et al., 2004]; la seconda classe di trascritti, invece, sembra essere localizzata a livello del tegumento virale; la sua traduzione avverrebbe subito dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite [Bresnahan and Shenk, 2000; Terhune et al., 2004].

3.2 IL CICLO LITICO DI CITOMEGALOVIRUS

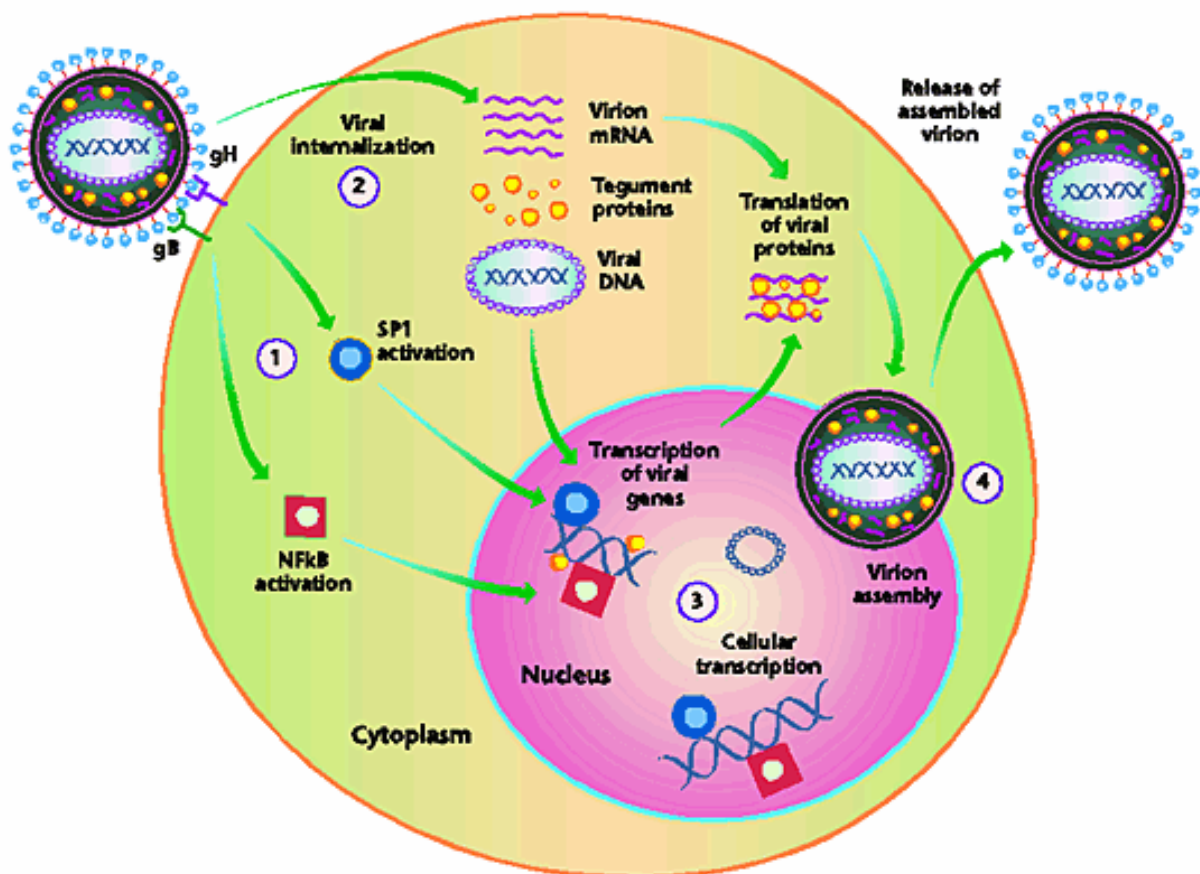


Figura 3. Rappresentazione schematica del ciclo replicativo virale di HCMV. Immagine modificata da http://www.nature.com/nm/journal/v6/n8/fig_tab/nm0800_863_F1.html [Huang and Johnson, 2000].

Le conoscenze sugli eventi iniziali del ciclo di replicazione di HCMV (Figura 3) sono a tutt'oggi ancora incomplete. L'attacco alla superficie cellulare è rapido ed efficiente, sia in cellule permissive, sia in cellule non permissive, suggerendo una vasta distribuzione dei recettori cellulari riconosciuti da HCMV. L'interazione tra virus e cellula ospite (Figura 3-①), come nel caso di altri herpesvirus, è mediata dal legame a bassa affinità degli antirecettori virali con le molecole di eparan-solfato dei proteoglicani di membrana [Boyle and Compton, 1998; Compton et al., 1993]. All'iniziale interazione con i residui di eparan-solfato seguono l'adsorbimento e la penetrazione (Figura 3-②) mediati dalla fusione del pericapside virale con la membrana cellulare, processo che risulta indipendente dall'abbassamento del pH [Compton et al., 1993] e che, probabilmente, coinvolge in prima istanza il complesso glicoproteico virale gH-gL-gO [Keay and Baldwin, 1991; Theiler and Compton, 2001]. Mentre gli antirecettori virali sono rappresentati, con ogni probabilità, dalle glicoproteine gB e gH/gL [Kinzler and Compton, 2005], i recettori cellulari, sebbene abbondantemente espressi, sono scarsamente caratterizzati. Recentemente è stata dimostrata un'associazione delle glicoproteine gB e gH con le molecole "Toll-like receptor" 2 (TLR2) e "Toll-like receptor" 1 (TLR1), due recettori transmembrana la cui principale funzione, comune a tutti i TLR, è quella di mediare le fasi iniziali dell'immunità innata, ovvero attivare la cascata di eventi che culmina nell'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B e nella secrezione di citochine infiammatorie. L'associazione delle glicoproteine dell'"envelope" virale con TLR2 e TLR1 durante le fasi di attacco e penetrazione del virus nella cellula ospite potrebbe rappresentare un notevole vantaggio temporale per la risposta immune dell'ospite contro l'infezione virale [Boehme et al., 2006].

Successivamente alla penetrazione nella cellula ospite, il nucleocapside virale si muove rapidamente verso il nucleo (Figura 3-③), dove il genoma virale circolarizza grazie alla presenza delle strutture palindromiche alle sue estremità, e viene trascritto, ad opera dell'enzima RNA polimerasi II cellulare e di altri fattori che fanno parte del complesso apparato trascrizionale della cellula ospite [Fortunato and Spector, 1999; Mocarski and Courcelle, 2001].

Sempre a livello nucleare, il DNA replicato viene inserito nei capsidi preformati: in questo modo, le particelle sub-virali acquistano dimensioni tali da non potere abbandonare il nucleo (Figura 3-④) se non attraverso la lamina nucleare, al fine di raggiungere la membrana nucleare interna. Questo processo richiede la depolimerizzazione della lamina nucleare stessa che, molto probabilmente, avviene per fosforilazione delle proteine che la compongono, in particolare in seguito all'attivazione di chinasi cellulari reclutate dal virus

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

3.2.1 L'ESPRESSIONE GENICA VIRALE NELL'AMBITO DEL CICLO REPLICATIVO LITICO

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

La replicazione del DNA si situa temporalmente tra l'espressione dei geni β e quella dei geni γ . Il genoma di HCMV contiene, localizzata all'interno della regione UL, un'unica origine di replicazione *oriLyt*. In seguito alla circolarizzazione del DNA virale, la sua replicazione procede da *oriLyt* in modo bi-direzionale (modalità di replicazione "rolling-circle") [McVoy and Adler, 1994], ad opera della DNA polimerasi virus-specifica di tipo α . L'espressione dei geni IE avviene immediatamente dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite ed è indipendente dall'espressione di altri geni virali. L'espressione dei geni E, al contrario, dipende dall'espressione dei geni IE; alla stessa stregua, la successiva espressione dei geni L è dipendente dai geni IE ed E. La trascrizione dei geni virali dipende dall'enzima RNA polimerasi II cellulare e da altri fattori che fanno parte del complesso apparato trascrizionale della cellula ospite, cooptata dal virus durante l'infezione attraverso la produzione di transattivatori virus-specifici, in grado di modulare l'espressione sia dei geni virali, sia dei geni cellulari [Fortunato and Spector, 1999; Mocarski and Courcelle, 2001].

- LE PROTEINE VIRALI

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

L'espressione genica relativa al ciclo di replicazione litico di HCMV prevede, come atto iniziale, la sintesi di un esiguo numero di proteine definite precocissime o "immediate-

early" (IE) o α , prodotte nell'ambito delle prime ore di infezione. Tali proteine vengono codificate dai due geni precocissimi maggiori ("Major Immediate-Early"/MIE) e da geni ausiliari, quali UL36-UL38, UL115-UL119, IRS1/TRS1 e US3; esse hanno un profondo impatto sulla fisiologia della cellula ospite, dovuto alla loro capacità di regolare l'espressione di numerosi geni cellulari [Cosme et al., 2009; Fortunato and Spector, 1999; Petrik et al., 2006].

Le proteine precocissime maggiori (MIE) IEp72 e IEp86 sono codificate, rispettivamente, dai geni IE UL123 (IE1) e UL122 (IE2), la cui espressione è regolata da un elemento modulatore – "enhancer", che è in grado di promuovere con elevata efficienza l'attività di trascrizione virale, anche attraverso l'interazione con fattori trascrizionali della cellula ospite quali NF- κ B, AP-1, Sp1 e CREB/ATF attivati dall'infezione stessa [Boshart et al., 1985; Isomura et al., 2008; Sun et al., 2001; Stern et al., 2008]. Le proteine IEp72 ed IEp86 sono accomunate da una breve sequenza aminoacidica (circa 85 aminoacidi) codificata dai primi tre esoni dell'mRNA codificante per esse, mentre differiscono nella porzione codificata dagli esoni 4 e 5 [Du et al., 2011]. Recentemente è stato attribuito alla sequenza dell'esone 3 un ruolo di spicco nell'ambito della regolazione della trascrizione, dell'espressione dei geni virali precoci e nella modulazione di proteine, quali ad esempio le cicline, direttamente coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare [White and Spector, 2005].

IEp86 rappresenta la più importante proteina con funzioni regolatorie codificata dal virus [Petrik et al., 2006; Spector, 1996; Stenberg, 1996]. Il ruolo più rilevante di questa proteina consiste nell'attivazione dell'espressione sia dei geni β , sia dei geni γ . Compito di IEp86 è, inoltre, quello di assicurare che l'espressione di tali geni, durante l'infezione, avvenga in modo sequenziale e temporalmente regolato [Fortunato and Spector, 1999; Stinski and Petrik, 2008], oltre a quello di garantire la repressione dell'espressione dei geni α IE1/IE2 e US3, nelle fasi tardive dell'infezione [Fortunato and Spector, 1999; Mocarski and Courcelle, 2001]. Questa proteina funziona quindi da attivatore trascrizionale, coadiuvata dal prodotto del gene IE1 che ne promuove ulteriormente l'attività.

Una funzione inedita è stata attribuita alle proteine IEp86 e IEp72, che risulta coinvolta nella regolazione dell'espressione dei geni che codificano per proteine che agiscono come mediatori e regolatori dell'immunità innata [Burns et al., 1993; Iwamoto et al., 1990; Kline et al., 1994]. In corso d'infezione virale, le cellule infettate sono in grado di rispondere al virus mediante l'attivazione di citochine pro-infiammatorie. In particolare, le prime citochine espresse e secrete in corso di infezione virale sono l'interferone β (IFN β) e l'interferone α (IFN α), il cui scopo è quello di bloccare la replicazione del genoma virale in

cellule infettate e nei tessuti circostanti. Le cellule infettate possono, inoltre, produrre chemochine, la cui funzione è quella di consentire la rimozione degli agenti virali mediante il richiamo di leucociti, di macrofagi, di cellule "Natural Killer" (NK) e di cellule T al sito di infezione, potenziando da un lato l'attività citotossica che caratterizza le cellule NK e T e, dall'altro, bloccando l'entrata degli agenti virali che riconoscono i recettori per le chemochine.

Numerosi dati di letteratura mettono in evidenza come HCMV regoli l'espressione dell'interferone β [Browne et al., 2001; Browne and Shenk, 2003; Taylor and Bresnahan, 2005; Zhu et al., 1998], di alcune chemochine, quali per esempio quelle definite come "regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted" (RANTES) [Abate et al., 2004; Browne et al., 2001; Browne and Shenk, 2003; Gravel and Servant, 2005; Zhu et al., 1998], di monociti indotti dall'interferone γ ("monokine induced by interferon- γ " o MIG) [Abate et al., 2004; Browne et al., 2001; Browne and Shenk, 2003], delle proteine 1 e 2 di monociti chemiotattici (MCP-1 e -2) [Browne and Shenk, 2003; Hirsch and Shenk, 1999], della proteina 1α di macrofagi indotti dal processo infiammatorio (MIP- 1α) [Abate et al., 2004; Browne et al., 2001] e, infine, dell'interleuchina 8 [Browne and Shenk, 2003; Craigen et al., 1997; Randolph-Habecker et al., 2002]. La proteina virale IEp86 è inoltre coinvolta nel blocco del ciclo cellulare in fase G1/S [Bresnahan et al., 1996; Dittmer and Mocarski, 1997; Jault et al., 1995; Lu and Shenk, 1996; Salvant et al., 1998; Sanchez and Spector, 2008], con conseguente blocco della sintesi di DNA cellulare. Questo evento è rilevante in quanto crea un ambiente favorevole alla replicazione del virus che può così sfruttare a proprio vantaggio il corredo enzimatico e l'apparato biosintetico della cellula ospite [Fortunato et al., 2000; Kalejta and Shenk, 2002].

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

Nell'ambito dell'espressione dei geni α ausiliari, sono da evidenziare i diversi prodotti di "splicing" codificati dal gene US3, che hanno caratteristiche di glicoproteine integrali di membrana e risultano coinvolti nella diminuita espressione delle molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC di classe I), ostacolandone sia il trasporto

intracellulare, sia la maturazione [Jones et al., 1996; Liu et al., 2002; Stasiak and Mocarski, 1992]. Il gene US3 rappresenta il primo gene virale trascritto subito dopo l'inizio dell'infezione; esso contribuisce, insieme a numerose altre strategie attuate da HCMV, all'evasione del virus nei confronti della risposta immunitaria [Liu et al., 2002; Liu et al., 2009; Misaghi et al., 2004].

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

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

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

Le glicoproteine codificate dai geni US2 e US11 mediano invece l'evasione del virus dal sistema immune, legandosi alle catene pesanti delle molecole MHC di classe I e trasportandole nel citoplasma dove vengono degradate dal proteasoma [Chevalier et al., 2002; Chevalier and Johnson, 2003; Story et al., 1999].

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

• *Le proteine tardive ("Late" o γ).*

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

Il capsido virale è composto da sette tipi di proteine diverse: "Major Capsid Protein" (MCP), che rappresenta il principale componente dei pentoni ed esoni capsidici, "Minor Capsid Protein" (mCP), "Minor Capsid Binding Protein" (mC-BP), "Smallest Capsid Protein" (SCP) ed infine, tre distinte proteine che svolgono funzioni diverse nella costruzione del capsido stesso. Nell'ambito di queste ultime, la più rappresentata è la proteina "Assembly

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

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

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

Già nell'ambito della prima ora di infezione la proteina pp65 del virus "parentale" viene velocemente traslocata verso il nucleo cellulare, grazie a specifici segnali di localizzazione nucleare [Gallina et al., 1996; Giesen et al., 2000; Nguyen et al., 2008] e manifesta un significativo accumulo a livello nucleolare, visibile anche a tempi più tardivi, per il virus neoformato [Arcangeletti et al., 2003; 2009; 2011]. Tali segnali sono costituiti da brevi sequenze di aminoacidi basici denominate sequenze di localizzazione nucleare o "NLS" [Gallina et al., 1996; Giesen et al., 2000; Nguyen et al., 2008]. È stato ipotizzato che queste sequenze vengano riconosciute, probabilmente a livello citoplasmatico, da proteine con funzione recettoriale che si legano ad esse trasportandole verso il poro nucleare. In questo processo, le nucleoporine svolgono un ruolo primario, riconoscendo le sequenze "NLS" insieme alle proteine recettoriali a cui sono legate e consentendone il passaggio attraverso il poro nucleare. La proteina pp65 contiene due sequenze "NLS", funzionalmente e strutturalmente distinte, localizzate entrambe all'estremità carbossi-terminale della proteina, ed una sequenza addizionale che ne garantiscono un efficace trasferimento in sede nucleare. L'accentuato tropismo nucleare di pp65 a tempi precocissimi dopo l'infezione, unitamente ad una dimostrata attività protein-chinasica, rendono tale proteina candidata ideale quale fattore di regolazione dell'espressione

genica virale [Gallina et al., 1999]. Oltre a un putativo ruolo di pp65 nella regolazione della replicazione e dell'espressione genica virale, tale proteina è in grado di indurre una modulazione parziale dell'espressione di IFN β e di alcune chemochine in corso di infezione virale, mentre essa non sembra essere coinvolta nella regolazione di altre citochine pro-infiammatorie a differenza di quanto osservato per la proteina IEp86 [Abate et al., 2004; Browne and Shenk, 2003; Taylor and Bresnahan, 2006].

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

Il pericapside virale è formato da un doppio strato lipidico, tipico delle membrane cellulari, in cui sono inseriti tre grandi complessi glicoproteici virus-specifici. Il complesso glicoproteico I è costituito essenzialmente dalla glicoproteina B (gB) che è una proteina transmembrana altamente polimorfica della quale, ad oggi, si conoscono quattro genotipi (gB1, gB2, gB3 e gB4) [Coaquette et al., 2004]; il complesso glicoproteico II è formato dalle glicoproteine M (che rappresenta la sua parte maggiore) ed N (proteina transmembrana molto piccola ed altamente polimorfica) [Dal Monte et al., 2001; Mach et al., 2005]; il complesso glicoproteico III è formato da tre glicoproteine: due di esse (gH e gL) sono proteine transmembrana mentre gO è legata covalentemente a gH [Li et al., 1997; Theiler and Compton 2001]. Come già menzionato questi tre complessi, svolgono funzioni di rilievo in diversi processi, quali l'ingresso del virus nella cellula ospite o, ancora, la risposta immunitaria, in quanto siti di legame per gli anticorpi neutralizzanti. Il genoma di HCMV codifica, inoltre, per numerose proteine con caratteristiche tipiche delle proteine transmembrinarie, come la proteina "integrate membrane protein" [Lehner et al., 1989], che potrebbero rappresentare costituenti minori del pericapside virale ed essere coinvolte nelle fasi di attacco e di ingresso del virus nella cellula ospite.

3.3 L'INFEZIONE LATENTE DA CITOMEGALOVIRUS

Un'interessante proprietà biologica di HCMV, comune a tutti i virus erpetici, è la sua capacità di persistere, dopo un'infezione primaria generalmente asintomatica, in specifiche sedi anatomiche dell'organismo ospite [Hengel et al., 1998] in una condizione di latenza da cui può sporadicamente riattivarsi [Sissons et al., 2002]. Per molti anni i tentativi di definire le sedi di latenza virale sono stati resi vani dalla difficoltà di individuare la presenza del virus in individui sani, sieropositivi per HCMV. L'introduzione di strumenti molecolari quali la reazione polimerasica a catena (PCR) [Gnann et al., 1988; Hendrix et

al., 1997; Schrier et al., 1985] ha fornito un valido strumento per rilevare la presenza anche di un basso numero di copie genomiche di HCMV nelle cellule del sangue periferico di portatori sani [Larsson et al., 1998; Stanier et al., 1992; Taylor-Wiedeman et al., 1991] ed ha consentito di arrivare alla definizione dei monociti del sangue periferico e dei loro progenitori CD34+ nel midollo osseo quali sedi certe di latenza di citomegalovirus [Mocarski et al., 2007] e di disseminazione virale a seguito di differenziamento a macrofagi [Goodrum et al., 2002].

Durante l'infezione latente il DNA di HCMV rimane nel nucleo delle cellule infettate in forma episomale [Bolovan-Fritts et al., 1999], in assenza di livelli rilevabili di progenie virale. In tali cellule l'espressione genica virale sembra essere limitata ad un gruppo di trascritti, definiti genericamente come trascritti associati alla latenza ("cytomegalovirus latency transcripts" – CLTs) [Kondo et al., 1994]. In accordo con i meccanismi di mantenimento della latenza di altri herpesvirus, come ad esempio il virus di Epstein-Barr (EBV) e/o l'herpes simplex virus di tipo 1 (HSV1), sembra che ciò che determina la riattivazione dalla latenza di HCMV sia la piena espressione dei geni virali IE [Amon and Farrell, 2005; Everett, 2000; Halford and Schaffer, 2001; Sinclair, 2003; Speck et al., 1997].

3.4 PATOGENESI DELL'INFEZIONE VIRALE

I meccanismi utilizzati da citomegalovirus per penetrare nell'organismo ospite non sono ancora del tutto chiari: dati di letteratura suggeriscono che l'ingresso del virus sia un evento mediato dal contatto dello stesso con l'epitelio delle superfici mucose. Dopo una prima fase di replicazione nella sede d'ingresso, il virus dissemina nell'organismo per via ematica e, veicolato dai leucociti [Gilbert et al., 1989], raggiunge vari organi e tessuti (ghiandole salivari, polmone, fegato, rene e surrene, vie digerenti, pancreas, sistema nervoso centrale), dove provoca la comparsa delle tipica citopatologia, caratterizzata dall'aumento del volume cellulare e dalla presenza di inclusioni nucleari e citoplasmatiche [Ho, 1991; Plachter et al., 1996; Sinzger and Jahn, 1996].

Esaurita la fase viremica dell'infezione, la maggior parte degli individui infettati continua ad eliminare il virus (in particolare, attraverso l'urina ed altre secrezioni corporee) per mesi o, in alcuni casi, per anni [Pass et al., 1986; Revello et al., 1998; Zanghellini et al., 1999].

La capacità del virus di resistere all'eliminazione da parte delle cellule effettrici del sistema immunitario dell'ospite sembra essere correlata all'espressione di diversi prodotti genici virali [Hengel et al., 1998; Wiertz et al., 1997]. In particolare, la proteina virale precocissima US3 e le proteine precoci US2 e US11 riducono, con meccanismi diversi, l'espressione delle

molecole MHC di classe I (MHC I) e II (MHC II) sulla membrana citoplasmatica delle cellule infettate, interferendo con il processo di presentazione degli antigeni ai linfociti T citotossici e ai linfociti T "helper". Inoltre, HCMV produce un omologo dell'interleuchina 10 (cmvIL-10), che può contribuire alla soppressione della funzione delle cellule dendritiche e dei monociti ed alterare la loro capacità di attivare i linfociti T [Spencer et al., 2002].

L'evasione dalla risposta immunitaria umorale implica, invece, l'espressione in cellule infettate, di un recettore per la regione Fc delle IgG [Furukawa et al., 1975]. La presenza di tali recettori ha la funzione di mascherare gli antigeni virali con IgG, impedendo l'interazione tra complemento e anticorpo e proteggendo la cellula infettata dalla lisi mediata dal complemento stesso.

3.5 RAPPORTO CITOMEGALOVIRUS-OSPITE

Il successo dell'infezione da HCMV, in particolare di quella produttiva, è legato ad una complessa serie di fattori virali, così come di risposte cellulari indotte dal virus. È evidente come da un lato, il virus debba contrastare le difese immunitarie dell'ospite e, dall'altro, debba essere in grado di controllare a suo vantaggio il metabolismo cellulare. A tale proposito, è noto come le cellule infettate da HCMV vadano incontro ad una serie di modificazioni del profilo fisiologico relative, in particolare, al ciclo cellulare, al "signaling" intracellulare ed all'attivazione e/o induzione di più elevati livelli di complessi molecolari importanti per la regolazione del ciclo cellulare (quali cicline D ed E, pRb, p53) e di fattori di trascrizione (quali NF-κB, SP-1). Tali osservazioni suggeriscono come anche l'attività trascrizionale della cellula infettata sia modificata da HCMV, a seguito di una profonda riprogrammazione genica virus-indotta. Nello specifico, è stato osservato che i geni la cui espressione è maggiormente indotta sono quelli legati alla regolazione del ciclo cellulare e quelli che codificano per indicatori di attivazione dell'immunità innata.

Quest'ultimo aspetto appare, in un certo senso, paradossale o comunque illogico, se si considera che, apparentemente, il virus innescherebbe risposte volte alla propria eliminazione. In realtà, diversi dati di letteratura supportano l'ipotesi di un'attivazione virus-indotta del processo infiammatorio e/o di altre risposte cellulari relative all'immunità innata quali fattori legati alla patogenesi dell'infezione da HCMV ed alla sua virulenza diventando così vantaggiosi per il virus [Boheme and Compton, 2004; Compton et al., 2003; Mocarski, a 2002].

3.5.1 IL CICLO CELLULARE

Il microambiente extracellulare esercita un'influenza continua sugli eventi intracellulari, tramite i contatti cellula-cellula, la produzione di fattori di crescita, la disponibilità di sostanze nutritive e la presenza di eventuali agenti tossici. La maggior parte dei segnali extracellulari coinvolti nella proliferazione cellulare viene trasmessa al nucleo tramite il legame di fattori di crescita (i quali possono influenzare positivamente o negativamente la crescita cellulare) a recettori presenti sulla membrana citoplasmatica o all'interno della cellula. L'interazione ligando-recettore attiva le proteine deputate alla trasmissione del segnale e induce la produzione di secondi messaggeri, cui consegue la modulazione di fattori trascrizionali che attivano o reprimono l'espressione di geni specifici, i cui prodotti spingono la cellula ad iniziare il proprio ciclo replicativo o, viceversa, ne impediscono l'avvio.

Il ciclo cellulare si articola principalmente in quattro fasi (Figura 4): nel corso della prima (fase G₁; quantità di DNA 2N), la cellula svolge le sue normali funzioni metaboliche, cresce in volume e sintetizza le diverse molecole (tra cui numerosi enzimi) necessarie per la fase successiva (fase S), che è quella più impegnativa dal punto di vista energetico. In questa fase viene duplicato il DNA cellulare, così come tutte le altre strutture cellulari. Terminata la fase S, la cellula intraprende un'ulteriore fase di preparazione (fase G₂, quantità di DNA 4N), in cui si ha il controllo quantitativo e qualitativo dell'avvenuta duplicazione del DNA e vengono prodotte proteine attive nella successiva mitosi (fase M, composta a sua volta da profase, metafase, anafase, telofase e citochinesi).

Ognuna delle fasi del ciclo cellulare è caratterizzata da numerosi eventi che si susseguono in maniera estremamente ordinata, grazie ad elaborati meccanismi di regolazione che ne controllano l'evoluzione. Un ruolo chiave nella regolazione del ciclo cellulare è svolto dalla fosforilazione e defosforilazione di substrati proteici da parte di specifiche chinasi (tra cui, soprattutto, le serina-treonina chinasi ciclina-dipendenti, o cdk). L'attività delle chinasi è a sua volta soggetta ad una serie di complessi meccanismi di controllo. Le subunità catalitiche cdk si legano a specifiche proteine a funzione regolatoria denominate cicline (A, B, D ed E), per formare un complesso attivo ciclina-cdk. La formazione, l'attivazione ed il disassemblaggio del complesso ciclina-cdk rappresentano gli eventi pilota che guidano la cellula attraverso il ciclo cellulare, compresi i relativi punti di regolazione o "restriction points", in cui viene "vaghiata", a livello molecolare, la possibilità di proseguire verso la successiva fase del ciclo cellulare.

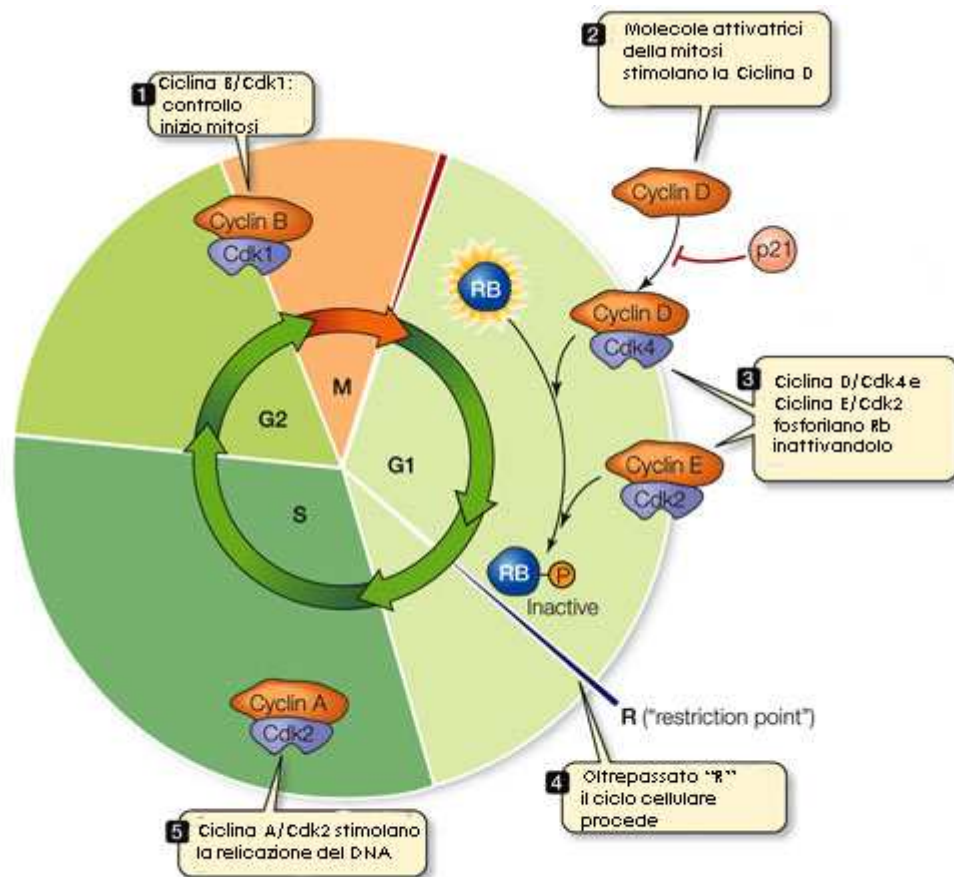


Figura 4. Le fasi del ciclo cellulare e relativi punti di regolazione. Immagine modificata, ottenuta da http://bcs.whfreeman.com/thelifewire8e/content/cat_010/f09006.jpg.

Per quel che riguarda, in particolare, gli eventi salienti che caratterizzano la fase G1 e la transizione G1/S, occorre innanzitutto ricordare che le cicline e le relative chinasi coinvolte sono la D (con le chinasi cdk 4 e 6) e la E (con cdk 2), quest'ultima implicata soprattutto nel passaggio alla fase S. Bersagli noti ed importanti delle chinasi cdk G1-specifiche sono la famiglia di proteine multifunzionali soppressori di tumore appartenenti al gruppo "retinoblastoma" (Rb), quali pRb, p107 e p130, che fungono da regolatori negativi del complesso eterodimerico di fattori di trascrizione E2F-DP. Nello specifico, il gruppo di proteine Rb funge da interruttore molecolare sulla repressione/attivazione di E2F attraverso il suo stato di fosforilazione: in forma ipofosforilata, Rb rimane legata ad E2F, che è inattivo, mentre la iperfosforilazione di Rb (che avviene in tarda fase G1 principalmente ad opera di cdk 2, 4 e 6) porta al rilascio di E2F (nella forma di eterodimero E2F-DP). A sua volta, questo agisce attivando la trascrizione di geni che codificano per le proteine a funzione enzimatica da utilizzare in fase S, quali DNA polimerasi alfa, timidina chinasi, diidrofolato reductasi [Bain and Sinclair, 2007]. Altre

proteine nucleari e nucleolari intervengono nella regolazione del ciclo cellulare, come nucleolina che può essere fosforilata da diverse chinasi; questo evento porta ad una più elevata sintesi di rRNA ed alla proliferazione cellulare [Ugrinova et al., 2007]. In effetti, è noto come i livelli di trascrizione aumentino durante la fase G1 e come la sintesi di rRNA sia principalmente mediata anche dalla fosforilazione (in particolare ad opera di cdk4-ciclina D1 e cdk2-ciclina E) dei fattori di trascrizione che modulano l'attività dell'enzima RNA polimerasi I, quali UBF [Voit et al., 1999]. A tale proposito, studi *in vitro* hanno anche dimostrato un'interazione tra la forma ipofosforilata di Rb e UBF e conseguente abrogazione dell'attività trascrizionale di RNA polimerasi I [Voit et al., 1999].

3.5.2 IMMUNITÀ INNATA E IMMUNITÀ ACQUISITA

L'immunità innata (chiamata anche immunità naturale) rappresenta il sistema di difesa anti-microbica filogeneticamente più antico presente in tutti gli organismi multicellulari verso molecole riconosciute come estranee, in particolare verso microrganismi e virus. Essa si estrinseca attraverso un sistema di complessi molecolari di tipo recettoriale volti al riconoscimento (come "non-self") di microrganismi e virus "invasori" e deputati all'attivazione di una cascata di segnali che porta, a sua volta, all'avvio di reazioni infiammatorie, con liberazione di chemochine e citochine e richiamo di cellule (macrofagi, natural killer ecc.) che intervengono nella eliminazione dei suddetti agenti patogeni. I componenti principali dell'immunità innata (Figura 5) sono: le barriere fisico/chimiche dell'organismo, quali gli epitelii e le sostanze ad azione antimicrobica da essi prodotte; le cellule ad attività fagocitica (neutrofili, macrofagi) e le cellule ad attività citotossica naturale (natural killer, NK); proteine del sangue, quali quelle che compongono il sistema del complemento od altri mediatori infiammatori; numerose proteine, fra cui citochine e chemochine, che regolano e coordinano molte funzioni svolte dalle cellule dell'immunità innata. I meccanismi dell'immunità innata sono attivati da strutture molecolari comuni a gruppi di patogeni simili tra loro e non possono discriminare le sottili differenze che esistono tra le diverse sostanze estranee. Oltre all'immunità innata, l'esposizione agli agenti infettivi mette in moto meccanismi molto più evoluti, la cui potenza e capacità difensiva si accrescono ad ogni successiva esposizione ad uno stesso patogeno. Questa forma di immunità si sviluppa in risposta alle infezioni e da esse viene plasmata e progressivamente affinata e prende il nome di immunità acquisita.

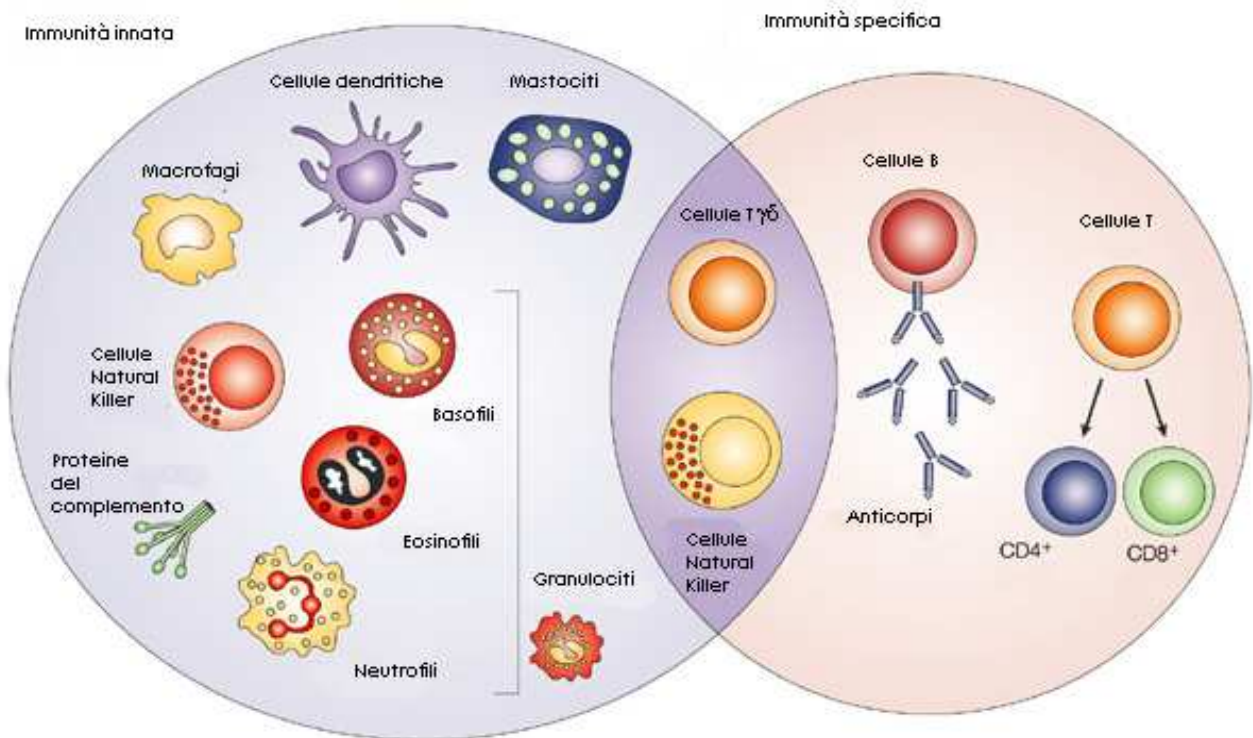


Figura 5. Principali cellule componenti dell'immunità innata e dell'immunità specifica. Immagine modificata da http://people.eku.edu/ritchisong/301images/Immunity_Innate-Adaptive.jpg.

Le sue caratteristiche distintive sono: la straordinaria specificità per le diverse macromolecole "non-self" e la capacità di "ricordare" (memoria immunitaria), ossia di rispondere in maniera sempre più potente in occasione di ripetute esposizioni ad uno stesso microbo. Il termine "acquisita" sottolinea il fatto che l'estrema potenza delle risposte viene raggiunta attraverso il contatto diretto con gli agenti patogeni. Per la sua straordinaria capacità di distinguere tra patogeni e macromolecole differenti, anche tra loro molto simili, l'immunità acquisita viene spesso chiamata anche immunità specifica. I componenti dell'immunità specifica sono i linfociti e le molecole da essi prodotte. Le sostanze estranee in grado di indurre risposte immunitarie specifiche, o che di tali risposte sono bersaglio, vengono definite antigeni. Tra immunità innata e specifica vi sono due importanti collegamenti: le risposte innate verso i patogeni stimolano le risposte specifiche, influenzandone la natura; le risposte specifiche impiegano, come meccanismi effettori per eliminare i patogeni, molti dei meccanismi propri dell'immunità innata; in tal modo le risposte specifiche potenziano l'attività antimicrobica dei meccanismi di difesa dell'immunità innata. Il concetto che le risposte immunitarie specifiche potenziano e "migliorano" quelle dell'immunità innata si riflette nella filogenesi del sistema immunitario. Negli invertebrati la difesa dell'organismo nei confronti degli agenti esterni è affidata a

meccanismi dell'immunità innata, quali i fagociti e le molecole circolanti che ricordano le proteine plasmatiche presenti nel sistema immunitario innato dei vertebrati. L'immunità specifica, composta da linfociti ed anticorpi, compare per la prima volta nei vertebrati, specializzandosi sempre più man mano che si sale nella scala evolutiva.

3.5.3.1 "TOLL-LIKE RECEPTORS"

Una tra le più importanti classi di recettori coinvolti nel riconoscimento di molecole "non-self" è quella dei "Toll-Like Receptors" (TLR). Essi sono stati scoperti studiando una proteina transmembrana di *Drosophila melanogaster* chiamata, per l'appunto, *Toll* la quale possiede un lungo dominio extracellulare che consiste in una serie di ripetizioni ricche di leucina. Questa venne identificata originariamente come una proteina recettoriale della superficie cellulare, coinvolta nella determinazione della polarità dorso-ventrale nelle giovani larve di *Drosophila* [Stein et al., 1991]. Successivamente è stato scoperto che essa gioca anche un ruolo cruciale nella resistenza alle infezioni fungine nella mosca adulta, insieme ad altri peptidi antimicrobici. La via intracellulare di trasduzione del segnale attivata a valle di *Toll*, quando una mosca è esposta a un fungo patogeno, porta alla traslocazione della proteina NF- κ B nel nucleo, dove attiva la trascrizione di vari geni, compresi quelli che codificano per "difensine" antifungine [Lemaitre et al., 1996]. Il sequenziamento del genoma della *Drosophila melanogaster* ha permesso di rivelare l'esistenza di nove proteine che appartengono tutte alla stessa famiglia *Toll* [Tauszig et al., 2000]. Si assunse che ogni membro della famiglia fosse coinvolto nella difesa contro i patogeni. Negli anni novanta furono identificate le prime proteine dei mammiferi correlate strutturalmente ai *Toll* di *Drosophila* che sono attualmente chiamate recettori umani "Toll-like" 1 e 4 [Medzhitov et al., 1997; Nomura et al., 1994].

Nell'uomo e nel topo ad oggi sono stati scoperti tredici diversi TLR tra i quali i TLR dall'1 al 9 sono conservati in entrambe le specie, il TLR10 nel topo non è funzionante mentre i geni codificanti per i TLR11, TLR12, TLR13 sono stati persi dal genoma umano nel corso dell'evoluzione [Kawai and Akira, 2010]. Questi recettori vengono espressi in diverse combinazioni da una vasta gamma di tipi cellulari dell'organismo, in particolare (ma non solo) da cellule dendritiche e da macrofagi che esprimono il più alto numero di TLR (Figura 6) [Hornung et al., 2002; Zarembek and Godowski, 2002].

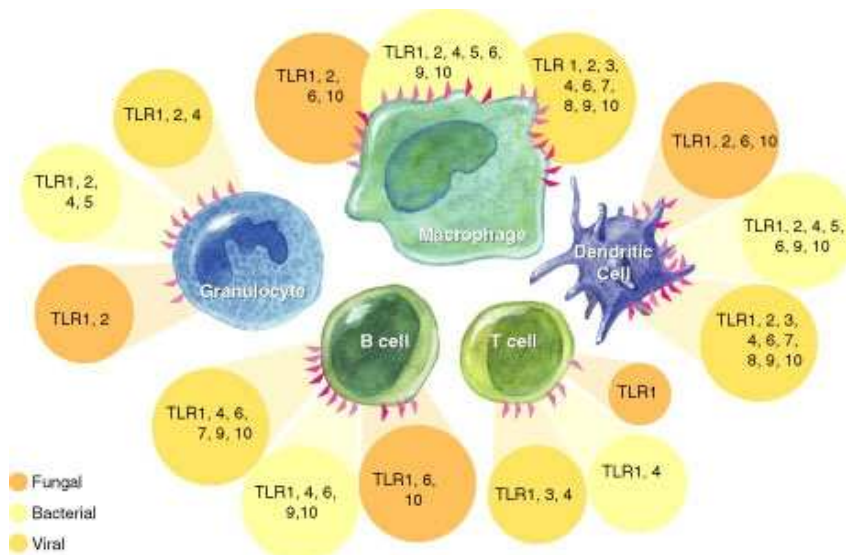


Figura 6. Espressione dei TLR nelle principali cellule del sistema immunitario e microorganismi da loro riconosciuti. Immagine modificata da http://www.rndsystems.com/dam_public/5564.jpg .

In seguito al legame con un ligando specifico, l'attivazione dei TLR dà il via ad una complessa cascata di eventi che culmina nella trasduzione del segnale al nucleo e nell'attivazione della trascrizione di specifici geni, quale evento finale di risposta cellulare allo stimolo iniziale; i prodotti di tali geni sono principalmente rappresentati da proteine effettrici nel processo infiammatorio e implicate a vari livelli nella regolazione del metabolismo cellulare [Compton et al., 2003; Malmgaard et al., 2004; Remer et al., 2006].

3.5.4 I "TOLL-LIKE RECEPTORS" E GLI AGENTI PATOGENI

Fino a qualche anno fa, i componenti molecolari meglio caratterizzati appartenenti ad agenti patogeni e riconosciuti da specifici TLR, erano quelli batterici [Van der Kleij et al., 2004]. Più recentemente, i TLR sono stati riconosciuti come importanti "sensori" di infezione anche per i virus [Van der Kleij et al., 2004]. Le tipologie di componenti virali fino ad oggi descritti quali ligandi per specifici TLR, in grado di innescare la cascata di segnali ed una serie coordinata di risposte cellulari, sono quattro: glicoproteine del pericapside, DNA (in particolare, dinucleotidi citosina-guanina, detti isole CpG, non metilati), RNA a singolo e a doppio filamento [Boheme and Compton 2004], quest'ultimo è spesso presente quale forma intermedia nel corso del ciclo replicativo di virus ad RNA e a DNA (Tabella 1).

"TOLL- LIKE RECEPTORS" DEI MAMMIFERI E LORO LIGANDI		
	Ligandi esogeni	Ligandi endogeni
TLR1	Tri-acil lipopeptide del micoplasma	
TLR2 + TLR1	Lipoproteine batteriche	
TLR2 + TLR6	Lipoproteine batteriche, acido lipoteicoico, mannano della parete dei lieviti, emoagglutinina	
TLR2	Glicoproteine virali, peptidoglicano (batteri Gram +), glicolipidi (Treponemna, Maltophilum), porine, zimosano	Cellule necrotiche, apolipoproteina CIII, versicano, beta amiloide, diverse Heat shock proteins (HSP), high-mobility group box1 (HMGB1)
TLR3	RNA a doppio filamento	mRNA
TLR4	LPS, glicoproteine dell'"envelope" virale, taxolo, proteina di fusione di RSV, proteine dell'"envelope" di MMTV,	Proteina A del surfactante polmonare, fibrinogeno, fibronectina, eparan solfato, diverse Heat shock proteins (HSP), high-mobility group box1 (HMGB1), ialuronano
TLR5	Flagellina batterica	
TLR6	Di-acil lipopeptidi di micoplasma, fattore solubile termosensibile di streptococchi di gruppo B	
TLR7	RNA a singolo filamento (virale)	Acidi nucleici della cellula
TLR8	RNA a singolo filamento(virale)	Acidi nucleici della cellula
TLR9	DNA contenente CpG (virale e batterico)	Acidi nucleici della cellula
TLR10	Sconosciuto	
TLR11	Profilina del <i>Toxoplasma</i>	
TLR12	Sconosciuto	
TLR13	Sconosciuto	

Tabella 1. Principali ligandi esogeni (batterici, virali, fungini) ed endogeni dei "Toll-like receptors" [Cole et al., 2010; Zhang and Schluesener, 2006].

Alcuni TLR sono localizzati a livello della membrana citoplasmatica e rappresentano le "sentinelle" precoci, in grado di rilevare i microrganismi e i virus extra-cellulari che stanno prendendo contatto con la cellula ospite.

In questo modo è descritta l'azione, in alcuni modelli sperimentali, del dimero TLR2/TLR1 che riconosce le glicoproteine virali di superficie B ed H di citomegalovirus umano [Boheme et al., 2006], TLR4 è il classico recettore per il lipopolisaccaride batterico ed è in grado di riconoscere diversi componenti virali, in particolare forme mutate di TLR4 sembrerebbero legate ad un maggiore rischio di sviluppare gravi *sequelae*, dovute all'infezione da HCMV, in pazienti trapiantati [Cervera et al., 2007; Ducloux et al., 2005] mentre TLR5 è attivato dalla flagellina batterica. La Figura 7 mostra che la possibilità di rilevamento di acidi nucleici virali da parte dei TLR è legata alla localizzazione intracitoplasmatica di alcuni di essi (TLR3, che sembra avere un ruolo nell'inibire l'infezione da HCMV *in vitro* [Harwani et al., 2007], TLR7, TLR8, TLR9) Questo rende plausibile il fatto che l'infezione possa essere monitorata a diversi stadi, grazie alla presenza di TLR che vengono attivati da componenti virali che si accumulano gradualmente nella cellula durante il ciclo replicativo del virus [Boehme and Compton, 2004; Fitzner et al., 2003; Funderburg et al., 2008; Harwani et al., 2007].

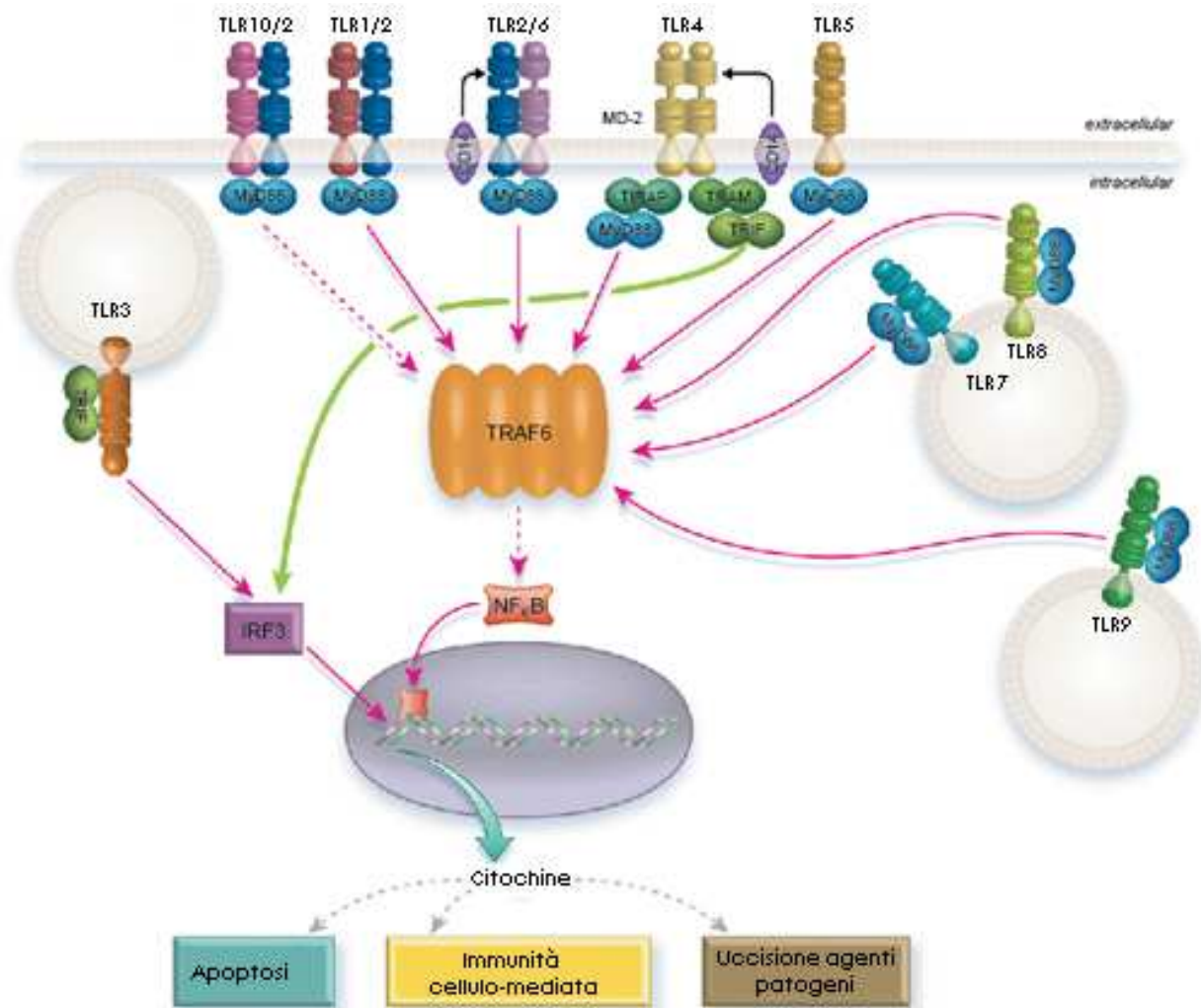


Figura 7. Schematizzazione della distribuzione dei TLR all'interno e sulla superficie di una cellula. Immagine modificata da

http://www.abdserotec.com/antibodies/minireview_toll_like_receptors_tlr5_-1060.html

L'attivazione dei TLR in seguito al riconoscimento dell'agente patogeno è generalmente molto rapida e porta a diverse tipologie di risposte cellulari, tra cui le più importanti sono: l'attivazione di NF-κB, la secrezione di citochine infiammatorie, la maturazione di cellule dendritiche, la stimolazione della produzione di molecole co-stimolatorie coinvolte nell'immunità e, per alcuni TLR, la produzione di interferone di tipo I (α , β , γ) (Figura 8). Tuttavia, le risposte "difensive" da parte della cellula, innescate attraverso i TLR, sono solo uno degli aspetti di un sistema molto complesso e pluri-sfaccettato. In effetti, recenti dati di letteratura supporterebbero un ruolo dei TLR come possibile meccanismo sfruttato da vari agenti patogeni per eludere le difese dell'ospite, attraverso strategie diversificate. In particolare, è stata descritta un'azione immunosoppressiva indotta attraverso l'attivazione di TLR2 che favorisce, a sua volta, la produzione di interleuchina 10 (IL-10), una citochina

anti-infiammatoria [Re and Strominger, 2004]. Inoltre, alcune proteine virali (es. analoghe a recettori per le citochine o inibitori delle caspasi prodotte da poxvirus), inibirebbero l'attivazione del fattore di trascrizione nucleare NF- κ B, impedendo la trascrizione di geni i cui prodotti sono legati all'immunità innata [Mohamed and McFaden, 2009]. Infine, per altri virus (quali HIV) il legame con specifici TLR (TLR2, 4, 9) porterebbe a più elevati livelli di replicazione virale [Bafica et al., 2004].

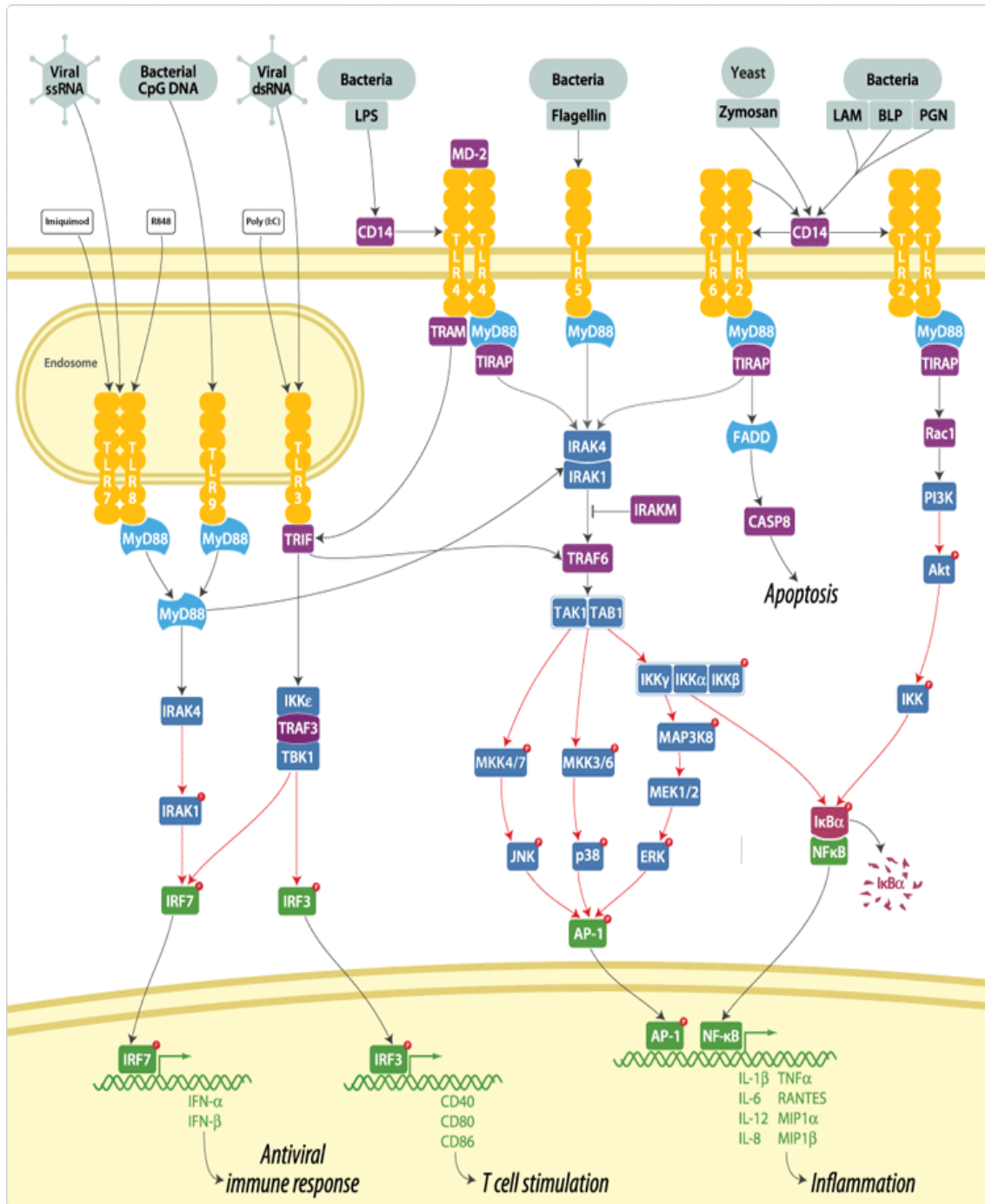


Figura 8. Principali vie di trasduzione del segnale intracellulare che si attivano in seguito al riconoscimento, da parte dei TLR, di ligandi specifici. Immagine modificata da <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cell-and-Tissue-Analysis/Signaling-Pathways/Toll-like-Receptor-TLR.html>

3.5.5.1 "TOLL-LIKE RECEPTORS" E IL CICLO CELLULARE

Dati recenti di letteratura supportano funzioni inedite dei TLR, non legate all'immunità innata, descrivendo un loro ruolo nella regolazione del ciclo cellulare [Hasan et al., 2005; 2007]. Questa ipotesi ha iniziato a prendere piede dopo alcuni studi svolti da un gruppo di ricercatori [Rakoff-Nahoum et al., 2004] i quali hanno dimostrato che l'attivazione del "signaling" dei TLR (che culmina con l'attivazione del fattore di trascrizione NF- κ B, implicato nel controllo dell'espressione di citochine infiammatorie e di molecole di maturazione cellulare) porta al ripristino dell'omeostasi dell'epitelio attraverso la proliferazione e la riparazione tissutale in seguito a danno epiteliale diretto. Questo evento può essere spiegato considerando che citochine prodotte in seguito all'attivazione dell'immunità innata, e quindi dei TLR, come le interleuchine 6 e 8 e il "transforming growth factor" (TGF), sono fondamentali anche per il differenziamento delle cellule endoteliali necessario per la riparazione di un danno tissutale [Rakoff-Nahoum et al., 2004].

Tra le citochine prodotte conseguentemente alla stimolazione dei TLR vi è anche l'interferone beta (IFN- β) che viene secreto in seguito all'attivazione dell'adattatore "TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β " (TRIF) il quale si lega al fattore di regolazione dell'IFN (IRF-3) e porta alla secrezione di IFN- β [Doyle et al., 2003]. Dipendentemente dal tipo cellulare in cui avviene l'attivazione del "signaling" TRIF-dipendente mediato dai TLR, esso può portare o all'apoptosi (microglia, cellule di rene embrionale 293T, cellule beta del pancreas) [Jung et al., 2005; Kaiser and Offermann, 2005; Rasschaert et al., 2005] o alla proliferazione cellulare (cellule dell'epitelio intestinale, cellule del sangue della linea mieloide) [Abreu et al., 2005; de Bouteiller et al., 2005]. In particolare, i TLR che sembrano maggiormente coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare sono i TLR3, 4 e 5 i quali influenzerebbero la proliferazione cellulare, spingendo la cellula verso la fase S, attraverso l'inattivazione e/o la degradazione della proteina p27 (codificata dal gene oncosoppressore p27Kip1) che contribuisce all'arresto del ciclo cellulare attraverso inibizione di chinasi associate a cicline [Hasan et al., 2005; 2007].

4. TEMA E OBIETTIVI DELLA RICERCA

I meccanismi messi a punto da HCMV per eludere la risposta dell'ospite all'infezione sono sicuramente complessi ed ancora non completamente chiariti.

Il potenziale patogeno di tale virus è strettamente legato allo stato immunitario dell'individuo infettato, in particolare all'efficienza della risposta cellulo-mediata; inoltre, dati recenti di letteratura supportano un ruolo importante anche dell'immunità innata nell'ambito dell'evoluzione dell'infezione verso quadri patologici di varia entità, dipendentemente dagli effettori attivati a seguito di infezione da HCMV e dalla tipologia di cellula infettata.

Infatti, da un lato è noto come soggetti immunocompetenti mettano in atto una poderosa risposta immunitaria (sia innata, sia specifica), a seguito di un'infezione da HCMV, determinando la soppressione dell'attività di replicazione virale e favorendo così l'instaurarsi di uno stato di latenza, dal quale il virus può riattivarsi a seguito di una significativa flessione del controllo immunitario. Lo stesso virus possiede un cospicuo numero di geni che codificano per proteine implicate nell'immunomodulazione, in particolare quelle che interferiscono con il complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I).

HCMV ha anche sviluppato molteplici strategie in grado di portare ad una significativa alterazione del metabolismo della cellula ospite. Tra le più importanti, sono da sottolineare quelle volte all'alterazione del ciclo cellulare, come dimostrato nei numerosi modelli di infezione *in vitro* ed *ex vivo* studiati, in particolare in quelli costituiti da cellule proliferanti (attivamente coinvolte nel ciclo cellulare). In tali modelli, HCMV è in grado di arrestare il ciclo cellulare in tarda fase G1 o alla transizione G1/S, inducendo più elevati livelli di cicline, fattori di trascrizione ed enzimi utili per la successiva fase S e bloccando, al contempo, la sintesi di DNA cellulare. È anche noto come HCMV sia in grado di indurre una consistente risposta cellulare infiammatoria, verosimilmente attraverso il "signaling" mediato da specifici TLR. Di primo acchito, l'attivazione indotta da HCMV dell'immunità innata (che per definizione stessa rappresenta un meccanismo di difesa verso il "non self" e, pertanto, sicuramente anti-virale), sembrerebbe quasi un paradosso, nell'ambito del poderoso "arsenale" anti-risposta immunitaria sviluppato da HCMV. In realtà, una mole crescente di dati di letteratura sembra supportare una funzione del processo infiammatorio quale meccanismo incrementante la virulenza di HCMV, favorendone la disseminazione. Nello specifico, l'attivazione di cellule progenitrici della linea mieloide e/o di monociti che alberghino virus latente innescherebbe un processo di differenziamento

cellulare, con conseguente slatentizzazione di HCMV; inoltre, il richiamo (mediato da effettori dell'infiammazione) di neutrofili e monociti dal circolo verso i siti di infezione favorirebbe a sua volta la disseminazione virale o l'instaurarsi di un'infezione latente, rispettivamente.

È evidente come l'approfondimento delle conoscenze relative a questi importanti aspetti, attraverso la definizione dei fattori cellulari coinvolti in tali eventi, possa favorire la messa a punto di strategie volte da un lato, ad impedire l'attivazione di percorsi che potenzino il potere patogeno del virus e, dall'altro, ad implementare le conoscenze utili per la progettazione di specifici interventi profilattici.

Il progetto di ricerca sviluppato durante i quattro anni di dottorato si è proposto di studiare alcuni dei possibili meccanismi messi in atto da HCMV per svolgere un ciclo replicativo produttivo in un modello cellulare simil-macrofagico (linea monocitaria umana THP-1 differenziata), ossia una tipologia cellulare che riproducesse, sostanzialmente, le caratteristiche del macrofago *in vivo*, nella consapevolezza dell'importanza che tale bersaglio cellulare riveste per questo agente virale nell'ambito dell'infezione naturale.

In particolare, il primo obiettivo di questo studio è stato quello di verificare l'effetto dell'infezione da HCMV sul ciclo cellulare di macrofagi THP-1 (cellule quiescenti).

Tenendo conto del fatto che i macrofagi vengono considerati tra i più importanti effettori cellulari dell'immunità innata, che questa gioca un ruolo di spicco nell'evoluzione dell'infezione e che tali cellule esprimono il più grande numero di TLR, il secondo obiettivo è stato incentrato sullo studio dell'espressione di geni codificanti per specifici TLR in corso di infezione da HCMV, a confronto con quella osservabile in cellule non infettate.

Infine, sulla base di dati di letteratura che indicano funzioni inedite di specifici TLR (diverse dal classico ruolo nell'ambito dell'immunità innata), che li vedono coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare, il terzo obiettivo è stato quello di verificare tale presunta funzione nel modello macrofagico studiato e valutare il loro possibile ruolo in corso di infezione da HCMV.

5. MATERIALI E METODI

Colture cellulari

- Le cellule monocitarie THP-1 (linea cellulare derivata da leucemia mieloide acuta) [Tsuchiya et al., 1980], modello per lo studio della latenza da HCMV, sono state coltivate in sospensione in RPMI 1640, addizionato di siero fetale di vitello (10%), sodio piruvato (1%), L-glutamina (1%), antibiotici (Penicillina 10000 unità/ml e Streptomicina 10000 µg/ml) e beta-mercaptoetanololo (50 µM).

Per indurre il differenziamento cellulare (monociti THP-1 differenziati a macrofagi: modello di infezione litica da HCMV), aliquote a concentrazione nota di monociti THP-1 sono state trattate con 80 nM di tetradecanoilforbolo-acetato (TPA) risospeso in dimetilsulfossido (DMSO), per 48 ore. Lo stato di differenziamento, oltre ad essere stato valutato morfologicamente (i macrofagi sono cellule aderenti mentre i monociti sono cellule in sospensione), è stato dimostrato analizzando l'espressione di uno specifico marcatore di differenziamento (CD11b) maggiormente espresso nei macrofagi piuttosto che nei monociti.

- Fibroblasti da polmone embrionale umano MRC5 [Jacobs et al., 1970] e fibroblasti umani HFF ("human foreskin fibroblasts") sono stati coltivati in terreno MEM (Minimum Essential Medium), modificato con sali di Earle ed addizionato di siero fetale di vitello (10%), sodio piruvato (1%), aminoacidi non essenziali (1%), L-glutamina (1%) ed antibiotici (Penicillina 10000 unità/ml e Streptomicina 10000 µg/ml).

- Cellule endoteliali HUVEC ("human umbilical vein endothelial cells") sono state coltivate in fiasche da 75 cm² collagenate: le fiasche sono state incubate per 30 minuti a 37°C con 6 ml di tampone salino fosfato (PBS) [7 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄ (pH 7.4), 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl] addizionati di 60 µl di collagene di ratto (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 1 mg/ml. Al termine di questo periodo è stato eliminato l'eccesso di PBS e le cellule sono state coltivate in EBM (Endothelial Basal Medium) addizionato di siero fetale di vitello (2%), estratto di cervello bovino (BBE-0,4%), fattore di crescita dell'epidermide (EGF-0,1%), idrocortisone (0,1%), gentamicina/amfotericina B (0,1%).

Virus

I ceppi di riferimento di HCMV utilizzati sono:

- ceppo Towne (ATCC N. VR-977) riprodotto in fibroblasti embrionali umani MRC5; tale stipite virale è stato utilizzato per tutti gli esperimenti previsti per l'espletamento di questo progetto di ricerca;

-ceppo AD169 (ATCC N. VR-538) riprodotto in fibroblasti embrionali umani MRC5;
-ceppo endoteliotropico TB40E (gentilmente fornito dal Prof. Thomas Mertens, Università di Ulm, Germania), amplificato inizialmente in cellule endoteliali (HUVEC) ed in seguito riprodotto in fibroblasti umani HFF; tale stipite, così come il ceppo AD169, è stato utilizzato solo per l'esperimento i cui risultati sono illustrati in Figura 26.

Le riproduzioni virali sono state titolate, sulla base della determinazione quantitativa dell'infettività, mediante una reazione di immunofluorescenza condotta su fibroblasti MRC5, impiegando un anticorpo monoclonale che riconosce un epitopo comune alle 2 proteine precocissime (IEp72/IEp86) di citomegalovirus.

Infezione di fibroblasti embrionali umani con HCMV

Cellule MRC5 sono state incubate a 37°C in atmosfera addizionata del 5% di CO₂ fino al raggiungimento della semi-confluenza. Dopo un lavaggio con MEM privo di siero fetale di vitello, i monostrati sono stati inoculati con HCMV a molteplicità di infezione di 1 (m.o.i = 1 unità formanti placca [ufp]/cellula) e incubati per 60 minuti a 37°C. Al termine dell'adsorbimento, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito con terreno di coltura addizionato di siero fetale di vitello al 10%. I monostrati infettati sono stati infine incubati a 37°C per i tempi prestabiliti.

Infezione di cellule endoteliali HUVEC con HCMV TB40E

Cellule HUVEC sono state incubate a 37°C in atmosfera addizionata del 5% di CO₂ in fiasche collagenate, come precedentemente descritto. Una volta raggiunta la semi-confluenza, il terreno è stato tolto per aspirazione fino a lasciarne un sottile film sopra i monostrati, i quali sono stati inoculati con HCMV TB40E ed incubati per 60 minuti a 37°C. Al termine dell'adsorbimento, è stato aggiunto terreno di coltura EBM addizionato dei componenti necessari (come descritto precedentemente). I monostrati infettati sono stati infine incubati a 37°C per i tempi prestabiliti. Tale procedura è stata adottata al fine di produrre uno "stock" di virus TB40E per la successiva riproduzione in cellule HFF.

Infezione di cellule monocitarie THP-1 con il ceppo Towne di HCMV - modello di infezione latente

Aliquote a concentrazione nota di cellule THP-1 sono state sottoposte a lavaggio con soluzione salina bilanciata di Hank (HBSS) priva di ioni calcio e magnesio, e a centrifugazione per 10 minuti a 1400 rpm. Il sedimento cellulare è stato risospeso in MEM privato di siero per potere procedere al conteggio cellulare con camera di Burker. In

seguito, aliquote cellulari a concentrazione nota sono state di nuovo centrifugate e messe a contatto con un adeguato volume di sospensione virale, in modo da ottenere una m.o.i. di 1 ufp/cellula. Per la fase di adsorbimento, le cellule infettate sono state inizialmente sottoposte a centrifugazione (45 minuti a 1400 rpm) utilizzando piastre a 6 pozzetti (3 cm di diametro/pozzetto) e poi incubate per 1 ora e 15 minuti a 37°C. Trascorso questo tempo, la sospensione cellulare è stata raccolta, centrifugata per 10 minuti a 1000 rpm ed il sedimento risospeso in RPMI. Al termine del periodo di infezione previsto, aliquote a concentrazione nota di monociti THP-1 sono state prelevate e sottoposte a citocentrifugazione (Cytospin3, Shandon) a 1000 rpm per 5 minuti. Gli "spots" cellulari, costituiti da circa 200000 cellule, sono stati fissati in metanolo freddo per 10 minuti, poi utilizzati per la ricerca delle proteine precocissime di HCMV mediante reazione di immunofluorescenza, come dettagliato di seguito, nella relativa sottosezione.

Infezione di cellule THP-1 differenziate - modello di infezione litica

Aliquote a concentrazione nota di cellule THP-1 sono state coltivate in provette "shell-vial", dotate di vetrino sul fondo o in piastre a 6 pozzetti (3 cm di diametro/pozzetto), in presenza di TPA (80 nM) per 48 ore a 37°C, per indurre il differenziamento. Dopo un lavaggio con MEM privo di siero fetale di vitello, i monostrati cellulari sono stati infettati con l'opportuna diluizione di sospensione virale, allestita in terreno MEM privo di siero e centrifugati a 1400 rpm per 45 minuti. Al termine della centrifugazione le cellule infettate sono state incubate a 37°C per un ulteriore periodo di 75 minuti (periodo di adsorbimento = 2 ore). Al termine dell'adsorbimento, l'inoculo virale è stato rimosso e sostituito con RPMI 1640 addizionato di siero fetale di vitello al 10%. I monostrati infettati sono stati infine incubati a 37°C per i tempi prestabiliti.

Inattivazione di HCMV ceppo Towne

La sospensione virale è stata trasferita in piastra a 6 pozzetti (3 cm di diametro/pozzetto), in ragione di 2 ml/pozzetto ed esposta per 2 ore a luce ultravioletta mantenendo le piastre in ghiaccio (per evitare una eccessiva esposizione della sospensione virale al calore) ad una distanza massima di 4,5 cm dalla lampada.

Trattamento con agonisti di TLR

Cellule THP-1 differenziate in piastra a 6 pozzetti (3 cm di diametro/pozzetto), alla concentrazione di 3×10^6 cellule/pozzetto, sono state trattate per 6 ore con un analogo sintetico di dsRNA (Poly I:C high molecular weight) alla concentrazione finale di 1 µg/ml,

come agonista di TLR3, o con lipopolisaccaride (Ultra Pure *E.coli* K12 LPS) alla concentrazione finale di 1 µg/ml, come agonista di TLR4, o con flagellina (*S. Typhimurium* FLA) alla concentrazione finale di 500 ng/ml, come agonista di TLR5 [Taganov et al., 2006; Takashiba et al., 1999]; le suddette sostanze sono state fornite dalla ditta Invivogen. Al termine del periodo di trattamento, i monostrati cellulari sono stati incubati in presenza di terreno di mantenimento privo dell'agonista per i tempi prestabiliti (24, 48 e 72 ore).

Trattamento con antagonista di TLR4 (CLI-095)

Cellule THP-1 differenziate sono state pretrattate con CLI-095 (Invivogen) per un'ora alla concentrazione di 1 µg/ml ed in seguito, in concomitanza con LPS alla concentrazione di 10 µg/ml [Kawamoto et al., 2008; Li et al., 2006], o con HCMV, per 6 ore. Successivamente alle 6 ore di incubazione, l'antagonista di TLR4 è stato mantenuto nel terreno di coltura per i tempi prestabiliti (24, 48 o 72 ore) alla concentrazione di 100 ng/ml in assenza o in presenza di virus.

Trattamento con anticorpo anti-TLR4 con funzione neutralizzante (PAb hTLR4)

Macrofagi THP-1 sono stati pretrattati con PAb hTLR4 (Invivogen) per un'ora alla concentrazione di 10 µg/ml. In seguito, le cellule sono state tenute in contatto con una concentrazione minore di anticorpo (5 µg/ml) per tutta la durata dell'esperimento, in assenza o in presenza di virus e con trattamento congiunto (per 6 ore) con l'agonista LPS di TLR4.

Estrazione dell'RNA totale da macrofagi THP-1

L'RNA totale è stato estratto da cellule THP-1 differenziate seguendo il protocollo fornito dal sistema "NucleoSpin® RNAII kit" della ditta Macherey-Nagel. In breve, dopo la lisi cellulare ottenuta attraverso incubazione delle cellule in una soluzione ad alta concentrazione di ioni caotropici, mediante un sistema a colonne viene favorito l'adsorbimento dell'RNA totale alla membrana di silice, rimuovendo il DNA contaminante con l'azione dell'enzima DNasi a temperatura ambiente per 15 minuti. Varie fasi di lavaggio con tamponi specifici consentono la rimozione dei sali, di metaboliti e di componenti macromolecolari cellulari. Infine, l'RNA purificato è stato eluito in condizioni di bassa concentrazione ionica con acqua priva di RNasi. L'integrità degli estratti è stata valutata dopo migrazione elettroforetica degli stessi in gel di agarosio denaturante, mentre la loro purezza e quantità è stata determinata misurando, al biofotometro, l'assorbanza a 260 nm e 280 nm dei campioni opportunamente diluiti in H₂O (pH 7,5).

Reazione polimerasica a catena previa retrotrascrizione (RT-PCR)

L'RNA estratto come precedentemente descritto, è stato retrotrascritto utilizzando il sistema "RevertAid first strand cDNA synthesis kit" (Fermentas) e amplificato usando i primer specifici elencati in Tabella 2. Il trascritto per l'enzima cellulare costitutivo GAPDH (257 pb) è stato utilizzato come controllo di reazione.

Primers	Sequenza nucleotidica	Dimensione amplificato
TLR2 (“Toll Like Receptor” 2)	F 5' - ATTGCCGCAACTCAAAGAA- 3' R 5' - TATTGCCACCAGCTTCCAA- 3'	177 pb
TLR3	F 5' -AGGAACTCCTTTCCTTGGT – 3' R 5' - CAAGACCCTCCAACATGTCA – 3'	172 pb
TLR4	F 5' - AATCCCCTGAGGCATTAGG – 3' R 5' - CACAGCCACCAGCTTCTGTA – 3'	225 pb
TLR5	F 5' - GTCTTGGATATAACTCATAACA – 3' R 5' - GAACTTTGTGACTGTGAGGA – 3'	273 pb
TLR8	F 5 - TCAACAAATCCGCACTTGAA – 3 R 5 - CCTCTTGTATCCCCAGGACT - 3	182 pb
TLR9	F 5 - CTACGATGCCTTCGTGGTCT – 3 R 5 - GCCCACAGGTTTCTCAAAGAG - 3	168 pb
IFNβ1 (Interferone beta 1)	F 5' – GCTCTCCTGTGTGCTTCTCCAC – 3' R 5' – CAATAGTCTCATTCCAGCCAGTGC – 3'	303 pb
IL-8 (Interleuchina 8)	F 5' - TTGGCAGCCTTCCTGATTTC – 3' R 5' - AACTTCTCCACAACCCTCTG – 3'	260 pb
GAPDH	F 5' – AAGGCTGTGGGCAAGGTCAT – 3' R 5' – GAGGAGTGGGTGTCGCTGTT – 3'	257 pb

Tabella 2. Primers utilizzati nelle reazioni di RT-PCR.

I prodotti dell'amplificazione sono stati rivelati mediante elettroforesi in gel di agarosio (1,5%) colorato con bromuro di etidio ed affiancati da un marcatore di pesi molecolari (1kb DNA ladder-Invitrogen).

Amplificazione mediante “Real Time PCR” previa retrotrascrizione

L'RNA estratto e retrotrascritto come precedentemente descritto, è stato amplificato mediante Real-time PCR quantitativa, applicata per valutare il livello di trascritti precocissimi virali (MIEP, esone 4) nei controlli di infezione ed in corso di trattamento con inibitori di TLR4. La reazione è stata eseguita con lo strumento Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Analisi densitometrica

L'analisi densitometrica è stata eseguita allo scopo di quantificare l'intensità del segnale delle bande presenti nei gel di agarosio, direttamente proporzionale alla quantità di amplificato presente.

Questo tipo di analisi è stato effettuato con il Software “Gel Doc XR” della ditta Biorad che permette, selezionando la banda che si desidera analizzare, di ottenere valori corrispondenti alla intensità della stessa. Facendo il rapporto tra l'intensità rilevata per il punto di infezione preso in considerazione e il rispettivo GAPDH si possono normalizzare i diversi valori, eliminando in questo modo le possibili oscillazioni determinate da quantitativi differenti di acido nucleico presenti nei diversi campioni.

Anticorpi ed altri composti utilizzati per immunofluorescenza e/o citofluorimetria

Per lo studio in immunofluorescenza dell'espressione dei geni virali di HCMV in cellule THP-1 differenziate è stato utilizzato un anticorpo monoclonale in grado di riconoscere le proteine virali IE (IEp72 – IEp86) di HCMV (Argene).

L'anticorpo monoclonale anti-IE virali è stato utilizzato alla diluizione di 1:30 in sieroalbumina bovina (BSA) allo 0.2% in PBS. Per la rivelazione dell'anticorpo primario sono state impiegate IgG anti-topo coniugate con isotiocianato di fluoresceina (Alexa FITC 488, Invitrogen) diluite 1:500 in BSA allo 0,2%. Per valutare lo stato di differenziamento dei monociti THP-1 a macrofagi mediante analisi citofluorimetrica (FACS: “fluorescence activated cell sorter”), è stato usato un anticorpo monoclonale diretto contro il marcatore di membrana CD11b, direttamente coniugato con isotiocianato di fluoresceina.

Oltre agli anticorpi descritti, per la colorazione dei nuclei sono state utilizzate sostanze fluorescenti quali il 4',6-diamidino-2-fenilindolo cloridrato (DAPI-385 nm), marcatore della cromatina, o un antrachinone sintetico ad alta affinità per il DNA (DRAQ5) - quest'ultimo utilizzato per le analisi mediante microscopia confocale - impiegati rispettivamente alla

diluizione di 1:2000 o 1:625 in BSA allo 0,2%. La sostanza ioduro di propidio (IP: 10 µg/ml), un intercalante del DNA, è stato utilizzato per le analisi al FACS.

Immunofluorescenza indiretta

Prima dell'esecuzione della reazione di immunofluorescenza, le cellule sono state fissate e permeabilizzate utilizzando metanolo freddo per 10 minuti a -20°C. Per l'immunoreazione, le cellule sono state incubate con un anticorpo monoclonale anti-proteine precocissime di HCMV per un'ora a 37°C in camera umida. Dopo tre lavaggi di 5 minuti ciascuno in PBS, i preparati cellulari sono stati incubati con IgG anti-topo coniugate con isotiocianato di fluoresceina (Alexa 488, Invitrogen) per 45 minuti a 37°C, in camera umida. Al termine del periodo di incubazione i preparati sono stati lavati con PBS (tre lavaggi di 5 minuti ciascuno), montati con liquido di montaggio (DakoCytomation) ed osservati mediante microscopio a fluorescenza (Leica DM LB). Per l'analisi in microscopia confocale è stato utilizzato il liquido di montaggio "Prolog Gold anti-fade reagent (Molecular Probes)" e i vetrini sono stati osservati con il sistema a scansione Laser dotato di funzioni di riconoscimento spettrale LSM 510 META della ditta Zeiss. Per la valutazione delle cellule infettate, sono stati contati i nuclei positivi per IE in 10 campi per vetrino; il loro valore medio è stato espresso come percentuale del numero totale di cellule per campo (valutate mediante marcaggio con DAPI).

Immunofluorescenza per l'analisi citofluorimetrica

Le cellule sono state tripsinizzate e raccolte in PBS, centrifugate e fissate in etanolo (concentrazione finale 70% in PBS). Il sedimento cellulare è stato centrifugato e risospeso in 50 µl di una diluizione 1:30 dell'anticorpo monoclonale specifico per l'epitopo comune codificato dall'esone 2 dei prodotti dei geni precocissimi di HCMV IEp72 e IEp86 in tampone di diluizione ("dilution buffer": PBS 0.5%, BSA 0.5%, Tween 20). Esso è stato incubato al buio per 30 minuti a temperatura ambiente e, al termine di questo periodo, lavato con 1 ml di soluzione di lavaggio ("wash buffer": PBS 0,5%, BSA 0,5%) e centrifugato 10 minuti a temperatura ambiente a 1000 rpm. Successivamente, il sedimento è stato risospeso in 50 µl di una diluizione 1:500 (in "dilution buffer") dell'anticorpo secondario anti-IgG di topo coniugato con il fluorocromo "verde" (Alexa 488, Invitrogen); al termine del periodo di incubazione (30 minuti al buio e a temperatura ambiente) è stato effettuato un lavaggio con "wash buffer". La sospensione cellulare è stata sottoposta a centrifugazione per 10 minuti a temperatura ambiente a 1000 rpm ed il sedimento ottenuto è stato infine

risospeso in 0,5 ml di PBS 1X addizionato di ioduro di propidio (IP: 10 µg/ml) e RNasi (100 µg/ml) per la successiva analisi citofluorimetrica a flusso.

Analisi citofluorimetrica a flusso di macrofagi THP-1 infettati con HCMV

I preparati cellulari infettati con HCMV e processati come descritto nella precedente sottosezione, sono stati analizzati in citofluorimetria tramite lo strumento EPICS® XL-MCL COULTER (Beckman), al fine di attuare la valutazione del contenuto di DNA (fluorescenza emessa da IP) e di parametri di infezione virale (antigeni precocissimi di HCMV rivelati, tramite immunofluorescenza indiretta, con anticorpi secondari coniugati con Alexa 488) nelle diverse fasi del ciclo cellulare. Tramite il software "Expo32" (Beckman) è effettuata l'analisi degli eventi analizzati: in particolare, sono stati impostati "cursori" che delimitano le aree sottese dai picchi dell'istogramma e sono stati quantificati gli eventi che rientrano in tali aree. Come controlli per l'impostazione dei "cursori" e l'identificazione delle varie sottopopolazioni cellulari, le cellule sono state colorate con anticorpo irrilevante (MARM-7). I valori percentuali, presenti nei profili citofluorimetrici indicano la quantità di cellule racchiusa nel "gate" e quindi la quantità di "eventi" registrati.

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

6. RISULTATI

6.1 ANALISI DEL CICLO CELLULARE IN MONOCITI THP-1 DIFFERENZIATI A MACROFAGI IN ASSENZA O IN PRESENZA DI INFEZIONE DA HCMV.

I monociti THP-1 rappresentano una linea cellulare umana molto utilizzata come modello di latenza da HCMV *in vitro*. Si tratta di cellule proliferanti (ossia attivamente implicate nel ciclo cellulare) e non permissive per l'infezione litica di HCMV. Il loro differenziamento a macrofagi, mediante l'utilizzo di esteri del forbolo, media il passaggio ad una fase post-mitotica e ne determina la permissività alla replicazione produttiva di HCMV. Prima di procedere all'attuazione delle fasi sperimentali proprie di questo progetto di ricerca, sulla base dell'esperienza pregressa maturata da questo stesso gruppo di ricerca sullo studio della latenza da HCMV in tale modello [Ioudinkova et al., 2006], sono stati di nuovo verificati alcuni parametri basilari. Nello specifico, è stata confermata l'assenza di espressione dei geni che caratterizzano il ciclo litico di HCMV nei monociti THP-1 mentre, al contrario, è stata evidenziata la presenza dei suddetti prodotti genici in corso di infezione di monociti THP-1 differenziati a macrofagi (dati non mostrati). Una volta confermata la validità dei parametri di base di questo modello cellulare dalla duplice valenza nei confronti dell'infezione da HCMV, è stato effettuato uno studio volto ad analizzare il ciclo cellulare in monociti THP-1, così come nella stessa tipologia cellulare dopo differenziamento a macrofago; tale analisi è stata eseguita sia in cellule non infettate, sia durante l'infezione di macrofagi THP-1 con lo stipite di riferimento Towne di HCMV. Prima di passare all'applicazione del suddetto piano sperimentale, sono state fatte ulteriori verifiche volte a dimostrare l'avvenuto differenziamento dei monociti THP-1 (Figura 9). In particolare, lo stato di differenziamento è stato confermato sia morfologicamente (i macrofagi sono cellule aderenti mentre i monociti sono cellule in sospensione) (Figura 9A), sia analizzando l'espressione di uno specifico marcatore di differenziamento, CD11b, maggiormente espresso nei macrofagi THP-1 rispetto ai monociti (Figura 9B).

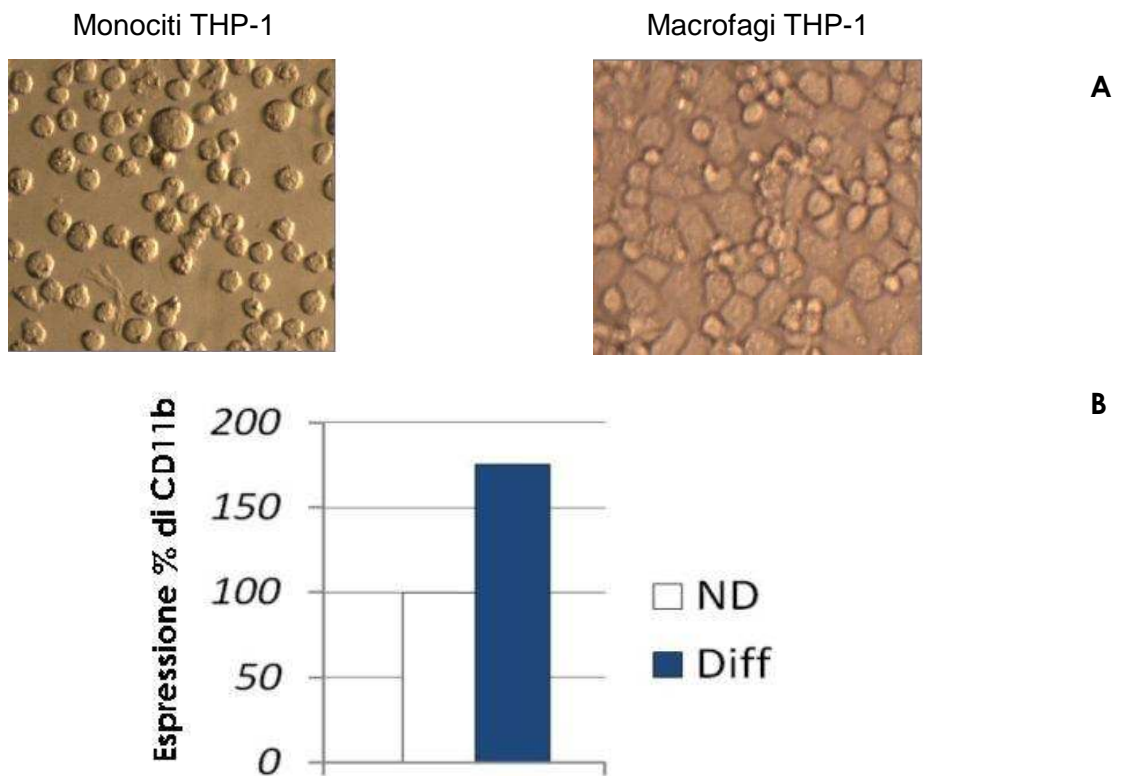


Figura 9. Caratterizzazione morfologica e parametri di differenziamento di monociti e macrofagi THP-1.

A. Immagini ottenute tramite microscopio ottico che mostrano chiaramente la differente morfologia delle due tipologie cellulari prese in considerazione: i monociti THP-1 sono cellule rotondeggianti in sospensione, mentre i macrofagi THP-1 sono cellule aderenti.

B. Analisi mediante FACS del livello di espressione di una glicoproteina transmembrana (CD11b) maggiormente espressa in macrofagi piuttosto che in monociti. L'analisi è stata effettuata eseguendo una reazione di immunofluorescenza, come descritto nelle sezioni "Materiali e metodi", con anticorpi monoclonali coniugati con isotiocianato di fluoresceina diretti verso la suddetta proteina. ND: "cellule non differenziate"; Diff: "cellule differenziate".

Dopo avere dimostrato l'avvenuto processo di differenziamento dei monociti THP-1 è stato effettuato lo studio del ciclo cellulare in assenza di infezione da HCMV, confrontando il profilo di distribuzione del DNA di cellule THP-1 non differenziate con quello di THP-1 differenziate (Figura 10). Si può notare che nelle prime sono visibili tutte le fasi del ciclo cellulare, con 17,7% di fase S, a conferma che tali cellule sono in stato di proliferazione e sono quindi dinamicamente coinvolte nel ciclo cellulare. D'altra parte,, come atteso, a seguito di differenziamento tale linea cellulare non è più "ciclante": lo dimostrano una fase S esigua (6,5%) ed un picco corrispondente alla transizione G2/M

rapportabile ad un accumulo di cellule che hanno un DNA duplicato (4N), ma che non si dividono più (assenza di mitosi).

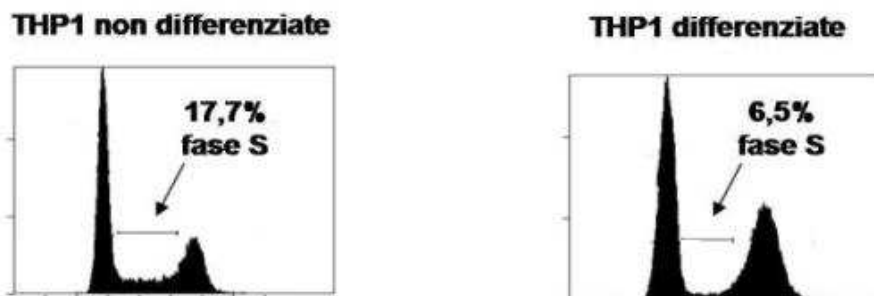


Figura 10. Analisi mediante citofluorimetria a flusso della distribuzione del DNA nelle diverse fasi del ciclo cellulare in monociti THP-1 non infettati prima e dopo differenziamento a macrofagi.

I monociti e i macrofagi THP-1 sono stati processati come dettagliato nella sezione "Materiali e metodi" e marcati con ioduro di propidio (IP).

Successivamente è stato operato un confronto del profilo di distribuzione del contenuto di DNA di macrofagi THP-1 in tre condizioni sperimentali e tre tempi differenti: cellule non infettate, infettate con HCMV attivo ed infettate con HCMV inattivato agli UV dopo 24h, 48h e 72h (Figura 11).

Lo studio è stato effettuato mediante analisi biparametrica del contenuto di DNA e del segnale di fluorescenza verde (FITC) emesso da cellule infettate da HCMV e preventivamente processate mediante immunofluorescenza per il rilevamento delle proteine precocissime maggiori (IE1/2) del virus. Quest'ultima condizione è stata introdotta allo scopo di dimostrare che l'eventuale effetto di alterazione del ciclo cellulare fosse indotto dal virus replicantesi e non provocato semplicemente a seguito del legame ai recettori cellulari o da altri elementi presenti nel terreno (citochine o fattori di crescita). Come si può osservare (Figura 11), mentre le cellule THP-1 differenziate e non infettate (profili rappresentati in nero) non sono più "ciclanti" (come mostrato anche in Figura 10), nelle cellule infettate (in verde), la presenza del virus sembra "spingere" le stesse a rientrare nel ciclo cellulare, con un graduale aumento della fase S e della fase G2/M, effetto che non si rileva in cellule infettate con virus inattivato agli UV (in grigio).

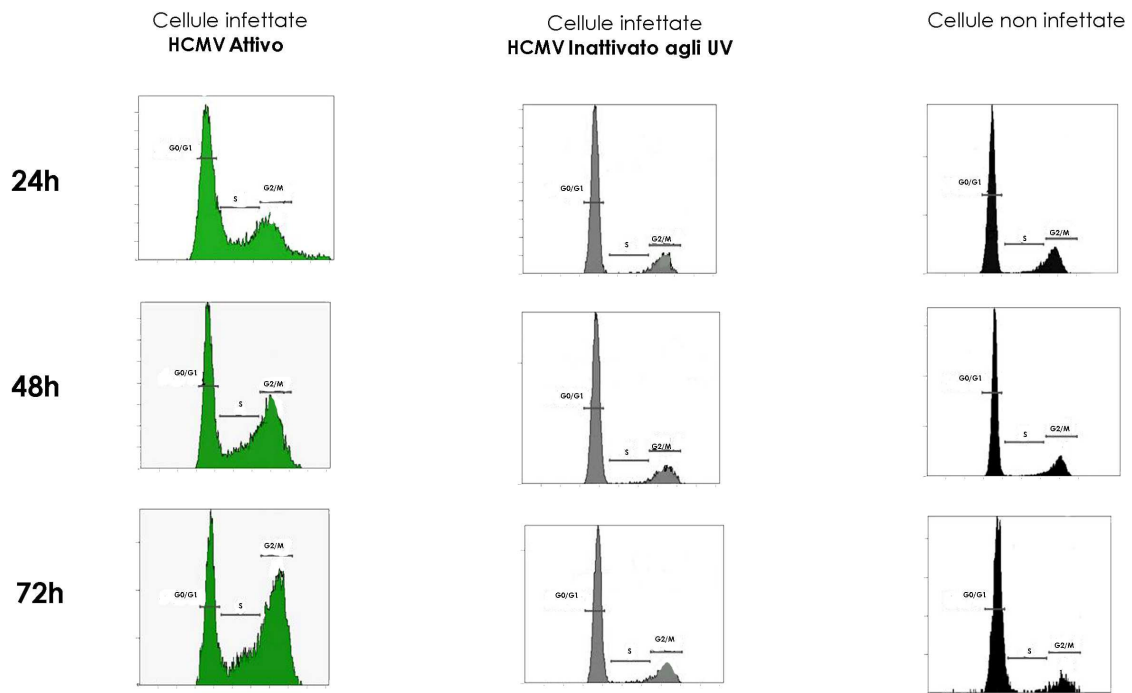


Figura 11. Analisi biparametrica mediante citofluorimetria a flusso del contenuto di DNA di macrofagi THP-1 non infettati o sottoposti ad infezione con HCMV attivo o inattivato agli UV.

I macrofagi THP-1 sono stati infettati (o non infettati) con HCMV Towne per i tempi indicati. In seguito, sono stati processati come dettagliato nella sezione "Materiali e metodi"; le cellule non infettate sono state marcate con IP, mentre le cellule infettate sono state marcate con IP e con anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo comune della proteina virale codificata dall'esone 2 dei geni precocissimi virali IE1 e IE2.

La dimostrazione che le cellule siano infettate da virus attivamente replicantesi è stata ottenuta attraverso l'analisi molecolare illustrata in Figura 12, che mostra la presenza dei trascritti virali rappresentativi della fasi precocissima (IE), precoce (DNA pol), precocetardiva (pp65) e tardiva (pp150) nell'ambito dei tempi di infezione considerati.

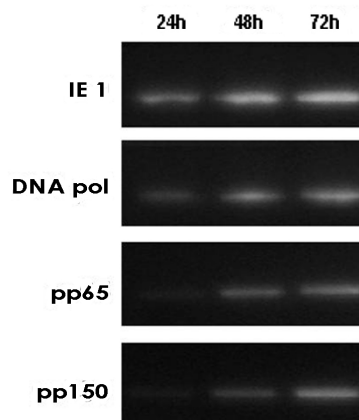


Figura 12. Analisi (RT-PCR) dei trascritti di HCMV rappresentativi delle varie fasi del ciclo di replicazione virale in macrofagi THP-1 dopo 24, 48 e 72 ore di infezione.

6.2 CARATTERIZZAZIONE DELL'ESPRESSIONE DI SPECIFICI TLR IN MACROFAGI THP-1 IN ASSENZA O IN PRESENZA DI INFEZIONE DA HCMV.

Una volta acquisite prove sperimentali che dimostrano che HCMV è in grado di svolgere un ciclo di replicazione produttivo in cellule quiescenti, quali i macrofagi THP-1, spingendo tali cellule a rientrare nel ciclo cellulare, le fasi successive di questa ricerca sono state orientate allo studio dei possibili meccanismi adottati dal virus per la messa in atto di tale strategia. Come già esplicitato nelle precedenti sezioni, tenendo in considerazione che i macrofagi sono le cellule che esprimono il più elevato numero di TLR e che dati recenti di letteratura attribuiscono a specifici TLR un ruolo nell'indurre la proliferazione cellulare [Hasan et al., 2005; 2007], sono stati attuati esperimenti volti a verificare la possibile attivazione di specifici TLR in corso di infezione da HCMV in macrofagi THP-1. Nell'ambito dei TLR espressi nei macrofagi, ne sono stati scelti sei (TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR8 e TLR9) sulla base di dati di letteratura che testimoniano un loro coinvolgimento in corso di infezione da parte di diversi virus, tra cui anche HCMV. In particolare, per TLR2 (e per il dimero TLR2/TLR1) è descritta un'interazione con HCMV attraverso le glicoproteine di superficie B ed H [Boehme and Compton T., 2004]; TLR3 riconosce, come ligando specifico, RNA a doppio filamento (possibile intermedio del ciclo replicativo dei virus ad RNA e di alcuni virus a DNA): un recente articolo dimostra un suo ruolo importante nel riconoscimento di KSHV (HHV8) [West and Damania, 2008]. Per TLR4 è stata dimostrata la sua capacità di riconoscere le glicoproteine del pericapside di virus ad RNA e a DNA [Akira et al., 2006; Kurt-Jones et al., 2000]; TLR8 riconosce RNA a singolo filamento ed è stata descritta la sua implicazione nel riconoscimento di molti virus ad RNA e di alcuni virus a DNA, tra cui virus erpetici [Gregory et al., 2008]. TLR9 ha come ligando specifico DNA a doppio filamento, in particolare sequenze con il dinucleotide citosina-guanina (isole CpG) non metilato ed è stato descritto in alcuni modelli cellulari come coinvolto nell'infezione da virus erpetici [Sato et al., 2006].

L'indagine sui trascritti di TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR8 e TLR9 è stata effettuata mediante RT-PCR in macrofagi THP-1 non sottoposti a infezione virale o dopo 24, 48 e 72 ore di infezione con HCMV (Figura 13A); come controllo, la reazione di amplificazione è stata svolta in parallelo anche per il trascritto dell'enzima cellulare costitutivo GAPDH, al fine di verificare l'utilizzo di quantità equivalenti di RNA ai diversi tempi di infezione considerati.

I risultati sono stati chiaramente dimostrati anche mediante analisi densitometrica delle bande relative ai TLR in esame, rapportando i valori di intensità delle bande di ogni TLR a quelli del corrispondente GAPDH, allo scopo di normalizzare i valori ottenuti (Figura 13B).

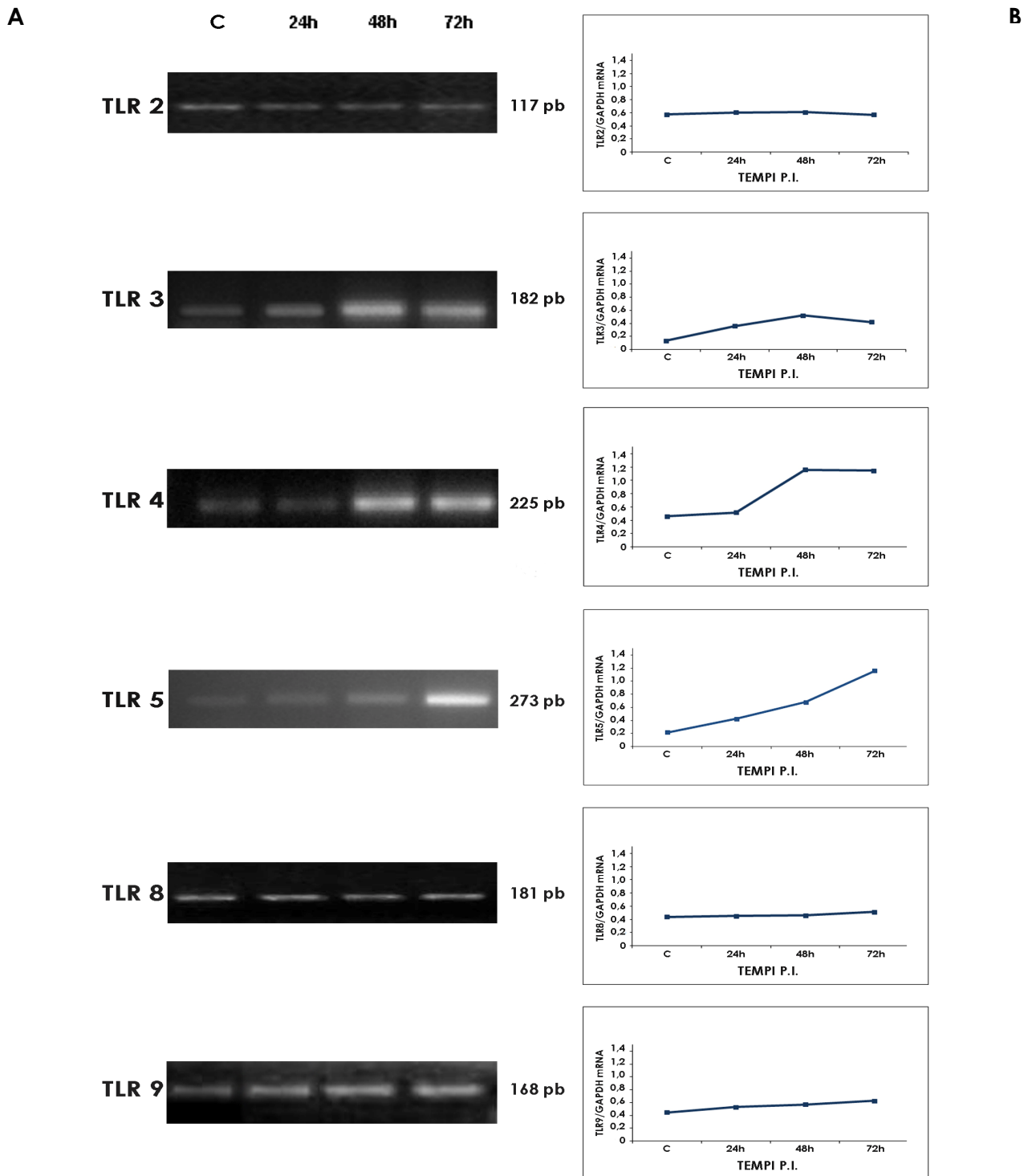


Figura 13. Analisi molecolare dell'espressione di specifici TLR in macrofagi THP-1 in corso di infezione con HCMV Towne.

A. Analisi mediante RT-PCR dei trascritti relativi ai TLR2, 3, 4, 5, 8 e 9 in macrofagi THP-1 non infettati (C), o dopo 24, 48 e 72 ore di infezione con HCMV. Come controllo di reazione è stato utilizzato l'amplificato del gene costitutivo GAPDH.

B. Analisi densitometrica delle bande relative ad ognuno dei TLR considerati, riportando i valori di intensità delle bande di ogni TLR a quelli del corrispondente GAPDH, allo scopo di normalizzare i valori ottenuti.

Come si può osservare dal profilo elettroforetico degli amplificati dei suddetti TLR e dalla relativa analisi densitometrica, per TLR2 e 8 non si rilevano differenze significative tra il livello di espressione in cellule non infettate (C) e quello rilevabile in corso di infezione nell'ambito dei tempi prescelti (24, 48 e 72 ore). Per quanto riguarda TLR9 si nota un lieve aumento nell'espressione del trascritto dopo 24 ore di infezione, probabilmente legato alla replicazione del DNA virale (presenza di isole CpG non metilate). Sostanzialmente, i TLR che hanno mostrato il "comportamento" più interessante sono TLR3, 4 e 5. Infatti, l'analisi dei trascritti per questi tre TLR ha messo in evidenza differenze significative nella loro espressione tra il controllo non infetto, in cui è apprezzabile solo un esiguo livello di espressione di tali TLR, e le cellule infettate in cui, invece, si nota un aumento significativo dell'mRNA, soprattutto dopo 24/48 ore di infezione.

I risultati ottenuti in questa fase dello studio hanno fatto sì che l'attenzione si concentrasse, nel corso delle successive fasi sperimentali, su TLR3, TLR4 e TLR5, la cui espressione aumenta in maniera significativa a partire dalle 24/48 ore di infezione con HCMV in macrofagi THP-1. È interessante notare che il dato relativo all'aumento dei trascritti di TLR3, TLR4 e TLR5 è stato osservato in un intervallo temporale (24-72 ore) del tutto sovrapponibile a quello in cui è stata rilevata, mediante citofluorimetria, un'alterazione del ciclo cellulare in cellule THP-1 differenziate ed infettate (si veda Figura 11). Inoltre, come già accennato, è anche importante sottolineare che TLR3, TLR4 e TLR5 sono i tre recettori descritti in letteratura per avere un ruolo nell'attivazione della proliferazione cellulare [Hasan et al., 2005; 2007].

D'altra parte, gli altri TLR presi in considerazione (TLR2, 8 e 9) non hanno mostrato alcuna risposta all'infezione da HCMV nel modello sperimentale considerato e, pertanto, sono stati esclusi da successivi approfondimenti.

6.3 POSSIBILE COINVOLGIMENTO DI TLR3, TLR4 E TLR5 NELL' ATTIVAZIONE DEL CICLO CELLULARE DI MACROFAGI THP-1 NON INFETTATI.

6.3.1 ANALISI DEL CICLO CELLULARE E DEI TRASCRIPTI DI TLR3, TLR4 E TLR5 IN MACROFAGI THP-1 A SEGUITO DI STIMOLAZIONE CON UNA MOLECOLA AGONISTA DI TLR3 (POLY I:C).

Sulla base dei risultati ottenuti, la ricerca è stata orientata alla valutazione del possibile coinvolgimento di TLR3, TLR4 e TLR5 nell'attivazione del ciclo cellulare di macrofagi THP-1 non infettati. Nello specifico, è stata condotta un'analisi del ciclo cellulare (Figura 14A) e del trascritto di TLR3 (così come di TLR4 e TLR5) (Figura 14B) in cellule THP-1 differenziate e

stimolate con un agonista di TLR3 (Poly I:C); la stimolazione è avvenuta per 6 ore, mentre l'analisi della distribuzione del DNA è stata effettuata dopo complessive 24, 48 e 72 ore. I dati di seguito riportati hanno indotto ad escludere l'ipotesi di un coinvolgimento di TLR3 e della via metabolica da esso attivata quale possibile meccanismo utilizzato dal virus per alterare a proprio vantaggio il ciclo cellulare perché, come evidenziato in Figura 14A, la stimolazione di TLR3 non porta ad alcuna attivazione del ciclo cellulare in questo modello sperimentale. Inoltre, non si assiste neppure ad un aumento dei trascritti relativi ai tre TLR oggetto di studio (Figura 14B).

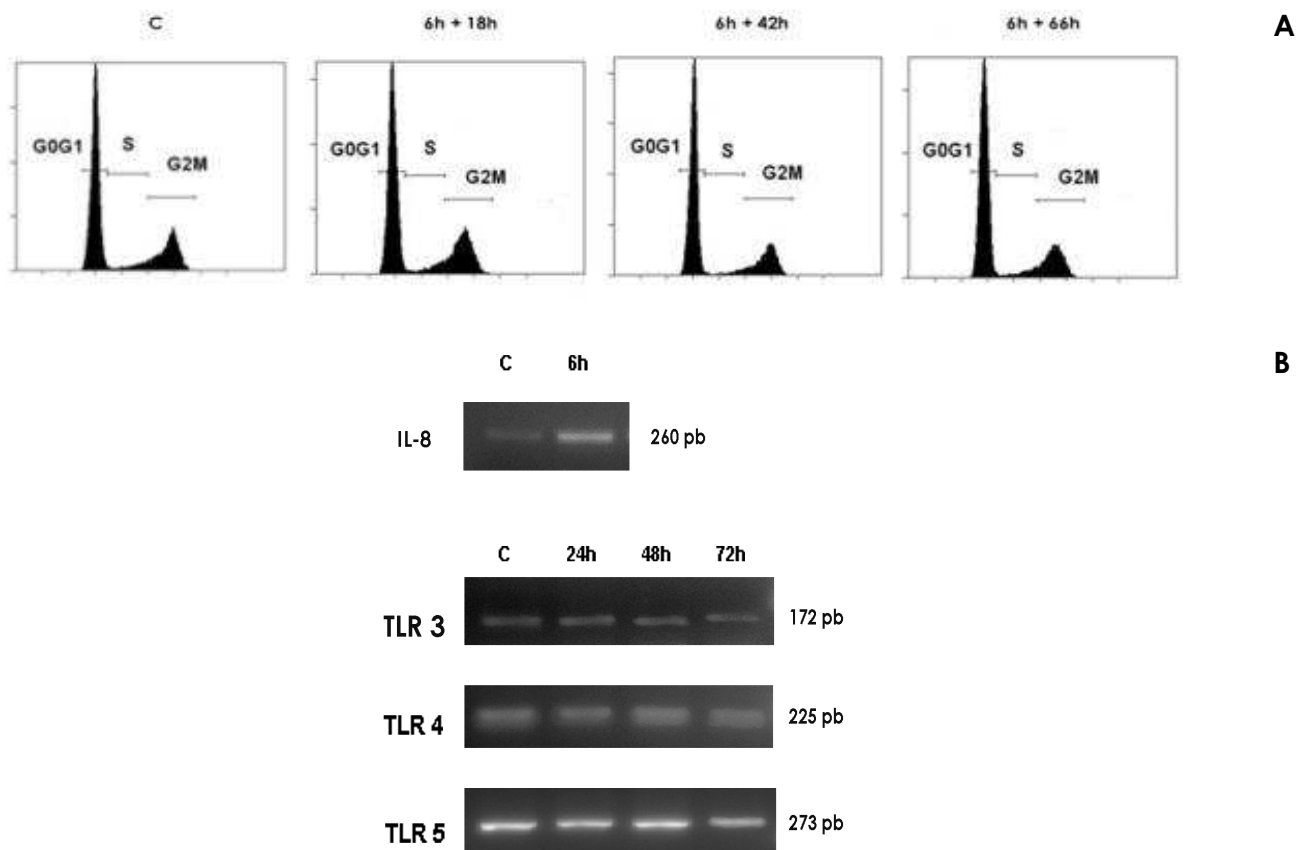


Figura 14. Analisi della distribuzione del DNA e del profilo dei trascritti di TLR3, TLR4 e TLR5 a seguito di stimolazione di TLR3 con specifico agonista in macrofagi THP-1 non infettati.

A. Analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA di macrofagi THP-1 non infettati e stimolati con Poly I:C. Dopo 6 ore di stimolazione, l'agonista è stato rimosso e le cellule mantenute in coltura e poi analizzate ai tempi indicati. Come controllo, sono state in parallelo analizzate cellule non infettate e non trattate (C). Le cellule sono state marcate con IP.

B. Amplificazione mediante RT-PCR dei trascritti di TLR3, 4 e 5 in seguito a trattamento con Poly I:C. Il trattamento è stato effettuato per 6 ore; dopo rimozione della sostanza le cellule sono state lasciate in terreno di mantenimento per i tempi indicati. In questo caso, come controllo dell'avvenuta stimolazione è stata valutata l'espressione del trascritto di Interleuchina 8 (IL-8), citochina che viene stimolata in seguito all'attivazione della via del TLR3.

6.3.2 ANALISI DEL CICLO CELLULARE E DEI TRASCRITTI DI TLR3, TLR4 E TLR5 IN MACROFAGI THP-1 A SEGUITO DI STIMOLAZIONE CON UNA MOLECOLA AGONISTA DI TLR4 (LIPOPOLISACCARIDE).

Al fine di apportare evidenze sperimentali a supporto dell'ipotesi di un coinvolgimento di tale TLR quale possibile mediatore dell'effetto indotto da HCMV sul ciclo cellulare, è stata eseguita l'analisi della distribuzione di DNA nelle diverse fasi del ciclo cellulare (Figura 15A) e dei trascritti di TLR3, TLR4 e TLR5 (Figura 15B), a seguito di stimolazione di TLR4 con specifico agonista (lipopolisaccaride: LPS), in macrofagi THP-1 non infettati. Anche in questo caso, la stimolazione è avvenuta per 6 ore, mentre l'analisi della distribuzione del DNA è stata effettuata dopo complessive 24, 48 e 72 ore.

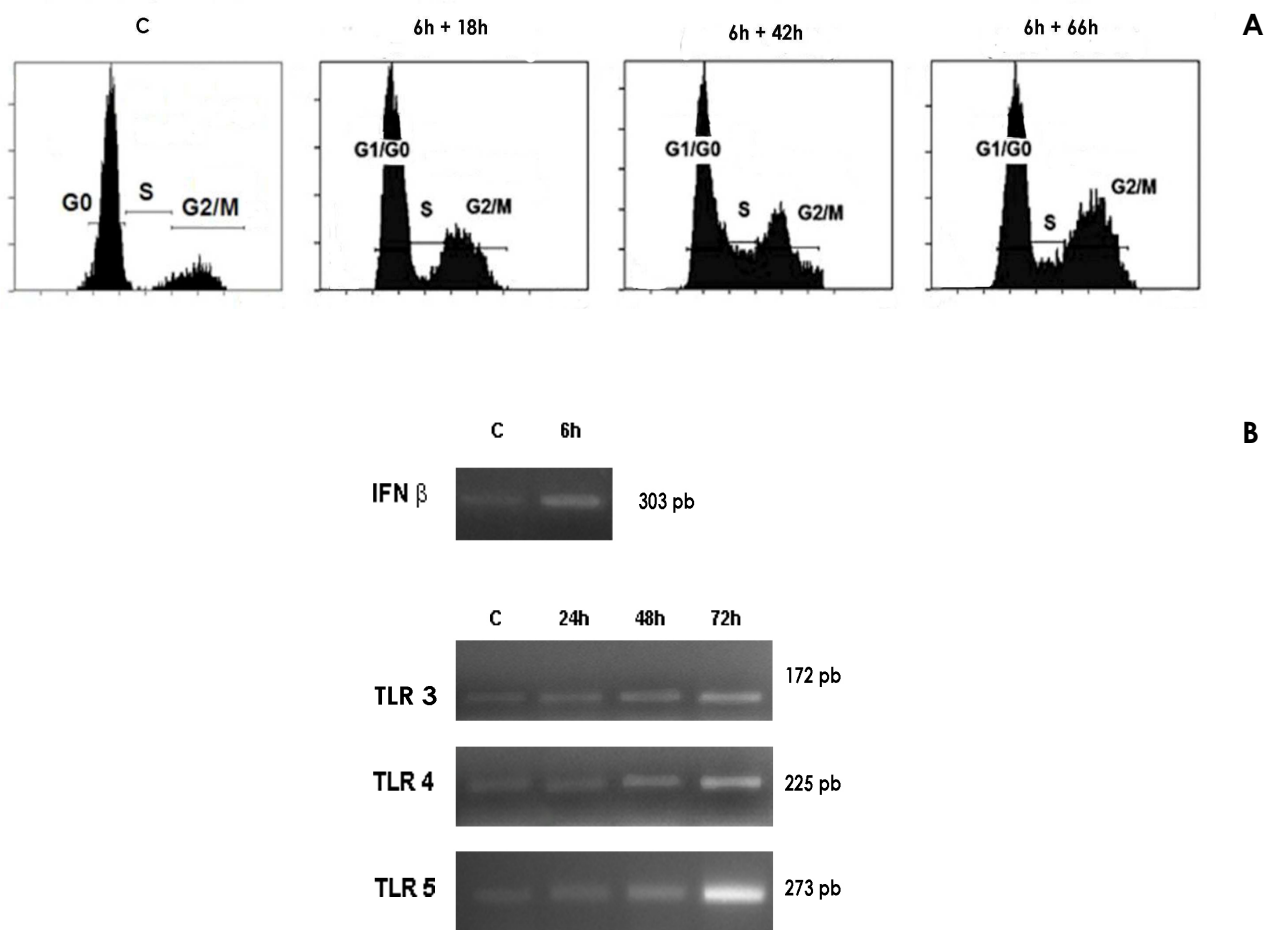


Figura 15. Analisi della distribuzione del DNA e del profilo dei trascritti di TLR3, TLR4 e TLR5 a seguito di stimolazione di TLR4 con specifico agonista in macrofagi THP-1 non infettati.

A. Analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA di macrofagi THP-1 non infettati e stimolati con LPS. Dopo 6 ore di stimolazione, l'agonista è stato rimosso, le cellule mantenute in coltura e poi analizzate ai tempi indicati (24, 48 e 72 ore). Come controllo, sono state in parallelo analizzate cellule non infettate e non trattate (C). Le cellule sono state marcate con IP.

B. Profilo di amplificazione mediante RT-PCR dei trascritti di TLR3, TLR4 e TLR5 in macrofagi THP-1 a seguito di trattamento con LPS. Il trattamento è stato effettuato per 6 ore; dopo rimozione della sostanza le cellule sono state lasciate in terreno di mantenimento per i tempi indicati. Come controllo dell'avvenuta stimolazione è stata valutata l'espressione del trascritto di Interferone beta (IFN β), citochina che viene stimolata in seguito all'attivazione della via del TLR4.

Come si può osservare in Figura 15A, dall'analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA di macrofagi THP-1 non infettati emerge che la stimolazione di TLR4 sembra "spingere" le cellule a rientrare nel ciclo cellulare, con un graduale aumento della fase S da 24 a 48 ore ed un significativo aumento della fase G2/M dopo 72 ore, eventi indicativi di un normale svolgimento del ciclo cellulare nella popolazione di macrofagi THP-1, normalmente quiescenti. Questi risultati rendono più consistente l'ipotesi di un coinvolgimento di TLR4 e della via metabolica da esso attivata quale possibile meccanismo molecolare impiegato da HCMV per la modulazione del ciclo cellulare. Allo scopo di completare il quadro delle risposte cellulari in corso di trattamento con l'agonista specifico di TLR4 è stata in seguito effettuata l'analisi del trascritto di TLR4 (così come di TLR3 e TLR5) (Figura 15B) a tempi di trattamento analoghi a quelli per i quali è stata caratterizzata la distribuzione del DNA in cellule THP-1 (24, 48 e 72 ore).

Tale studio ha messo in evidenza significative differenze di espressione tra il controllo non trattato, in cui è apprezzabile solo un esiguo segnale, e le cellule trattate in cui, invece, si nota un aumento significativo dell'mRNA dei tre TLR considerati, più apprezzabile a 48-72 ore dopo il trattamento.

I risultati riportati in Figura 15B, analogamente a quelli della Figura 15A, sono assolutamente sovrapponibili ai dati ottenuti in cellule infettate con HCMV. Il fatto che, malgrado l'utilizzo di un agonista specifico per TLR4, sia stato osservato un aumento anche nel profilo di espressione dei trascritti di TLR3 e TLR5 (anche in questo caso, vi è un perfetto parallelismo con quanto osservato in cellule infettate), non stupisce se si considera un possibile effetto di "cross-talk" tra tali tipologie di recettori [Palazzo et al., 2008].

6.3.3 ANALISI DEL CICLO CELLULARE E DEI TRASCRITTI DI TLR3, TLR4 E TLR5 IN MACROFAGI THP-1 A SEGUITO DI STIMOLAZIONE CON UNA MOLECOLA AGONISTA DI TLR5 (FLAGELLINA).

Sulla base di quanto evidenziato nelle precedenti sezioni, è stato condotto lo stesso tipo di studio per TLR5, utilizzando in questo caso flagellina (FLA), agonista specifico di tale TLR (Figure 16A e 16B).

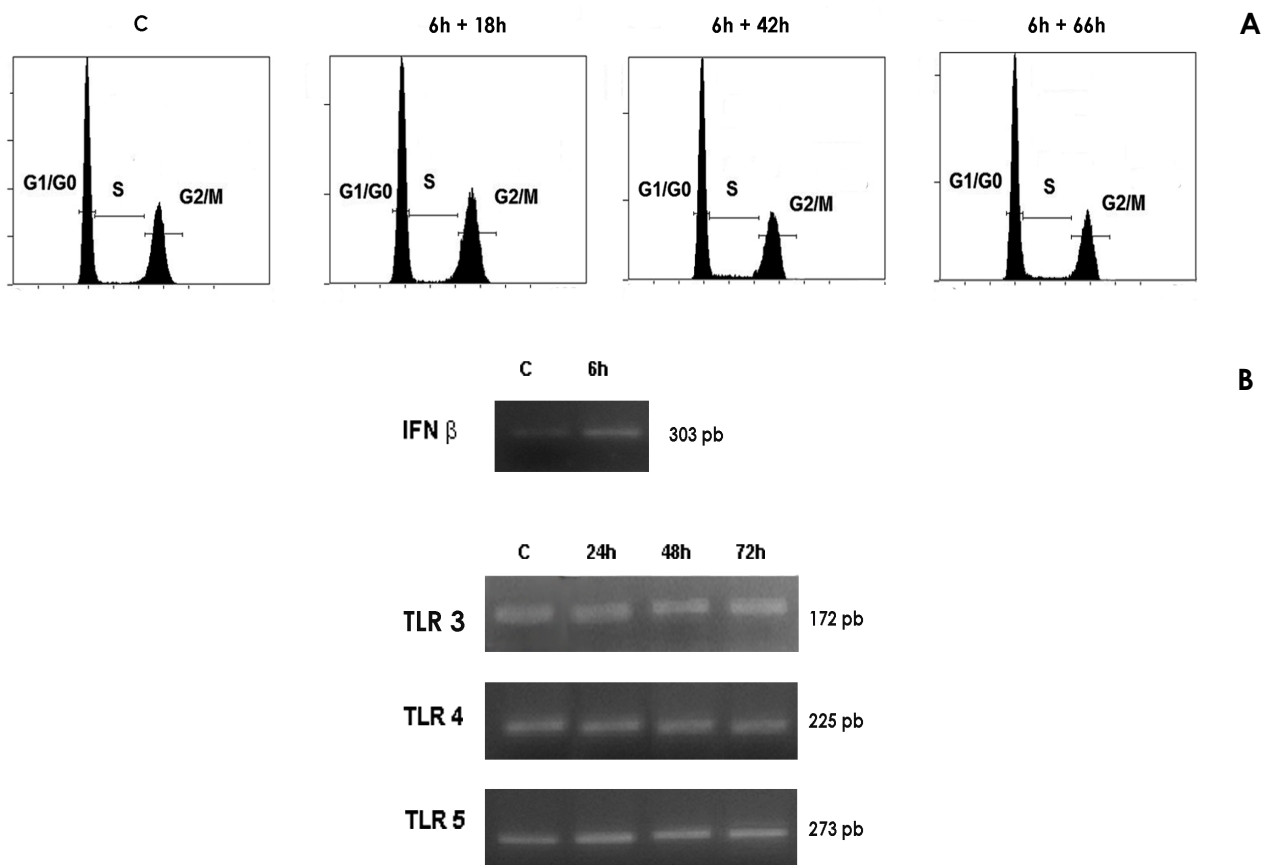


Figura 16. Analisi della distribuzione del DNA e del profilo dei trascritti di TLR3, TLR4 e TLR5 a seguito di stimolazione di TLR5 con specifico agonista in macrofagi THP-1 non infettati.

A. Analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA di macrofagi THP-1 non infettati e stimolati con FLA. Dopo 6 ore di stimolazione, l'agonista è stato rimosso e le cellule mantenute in coltura e poi analizzate ai tempi indicati. Come controllo, sono state in parallelo analizzate cellule non infettate e non trattate (C). Le cellule sono state marcate con IP.

B. Amplificazione mediante RT-PCR dei trascritti di TLR3, 4 e 5 in seguito a trattamento con FLA. Il trattamento è stato effettuato per 6 ore; dopo rimozione della sostanza le cellule sono state lasciate in terreno di mantenimento per i tempi indicati. Come controllo dell'avvenuta stimolazione è stata valutata l'espressione del trascritto di Interferone beta (IFN β), citochina che viene stimolata in seguito all'attivazione della via del TLR5.

Analogamente a quanto già osservato per TLR3, l'attivazione di TLR5 non induce alcun effetto sul ciclo cellulare di macrofagi THP-1 (Figura 16A), che conservano il profilo di distribuzione del DNA tipico di cellule quiescenti; inoltre, non si assiste ad un aumento né del relativo trascritto, né di quello di TLR3 e TLR4 (Figura 16B). Come già evidenziato per TLR3, anche per TLR5 è plausibile escludere un suo coinvolgimento quale meccanismo molecolare cooptato da HCMV per la modulazione del ciclo cellulare.

6.4 ANALISI DEL CICLO CELLULARE IN MACROFAGI THP-1 NON INFETTATI A SEGUITO DELL'INIBIZIONE DEL "SIGNALING" MEDIATO DA TLR4 UTILIZZANDO UNA MOLECOLA ANTAGONISTA DI TLR4 (CLI).

Sulla base dei dati riportati nelle precedenti sezioni, che indicano (sebbene in maniera indiretta) un possibile coinvolgimento di TLR4 e della via metabolica ad esso legata nella modulazione del ciclo cellulare virus-indotta, il passo successivo è stato quello di utilizzare una sostanza antagonista dell'attività di TLR4, in modo da impedirne l'attivazione, e verificarne poi gli effetti inizialmente in cellule non infettate, poi in corso di infezione da HCMV. In particolare, è stata utilizzata la sostanza "CLI-095" (CLI), un derivato del cicloesene che sopprime in maniera selettiva il "signaling" intracellulare che si sviluppa in seguito all'attivazione di TLR4. Esso attua questa azione inibitoria mediante legame e blocco della porzione intracellulare del recettore, lasciando libera di interagire la parte extracellulare; in altre parole, potenzialmente, CLI inibisce sia l'attivazione della via del TLR4 ligando-dipendente sia quella ligando-indipendente (Figura 17).

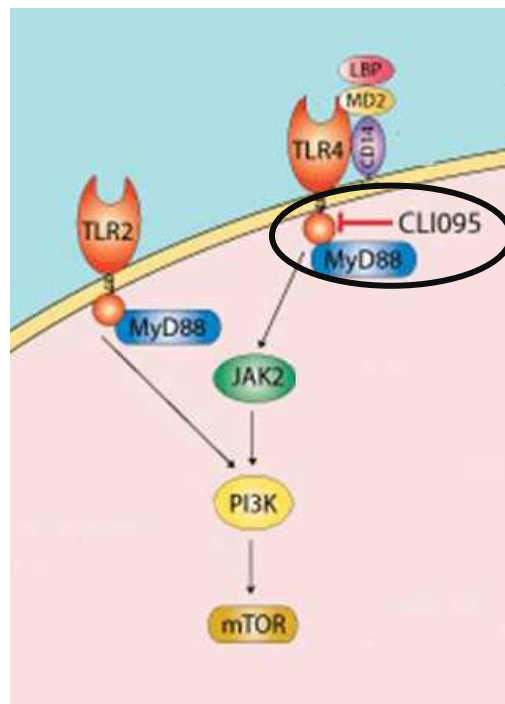


Figura 17. Schema rappresentativo dell'azione dell'antagonista di TLR4 (CLI-095).

Immagine modificata da <http://www.invivogen.com/signal-transduction-inhibitors>.

Utilizzando questa sostanza è stata condotta un'analisi del ciclo cellulare in cellule THP-1 differenziate, non infettate e trattate con un agonista di TLR4 (LPS, per ottenere la sua attivazione), o con LPS e CLI (Figura 18), allo scopo di confermare l'efficacia dell'antagonista nell'inibire la stimolazione del ciclo cellulare indotto a seguito di

attivazione di TLR4. I dati di seguito riportati mostrano un'inibizione dell'attivazione del ciclo cellulare mediata da TLR4, in seguito a trattamento con CLI. Come controllo dell'avvenuta attivazione di TLR4 (trattamento con LPS) o della sua inibizione (trattamento con CLI), è stato analizzato il livello di espressione del trascritto di IFN β .

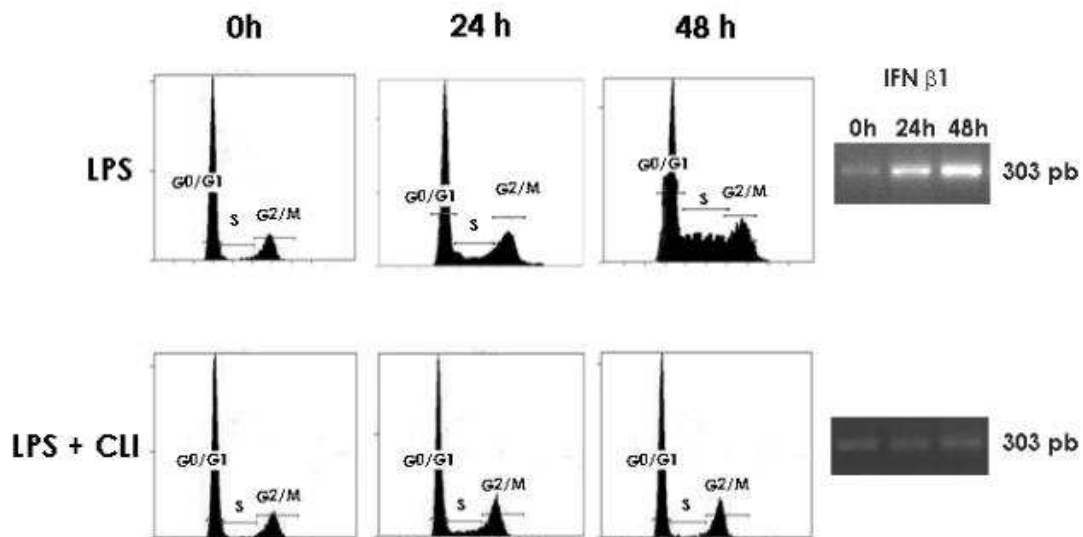


Figura 18. Analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA di macrofagi THP-1 non infettati in presenza di specifico agonista o di antagonista CLI di TLR4.

Le cellule THP-1 sono state trattate con la sostanza agonista di TLR4 (LPS, 6 ore di trattamento), oppure trattate con CLI per tutta la durata dell'esperimento (previo pre-trattamento di un'ora), di cui 6 ore in concomitanza con l'attivatore LPS. Le cellule sono state marcate con IP.

L'incremento di espressione del trascritto di IFN β è stato utilizzato come controllo dell'avvenuta stimolazione di TLR4 (pannelli di RT-PCR mostrati sulla destra).

Come si può notare, in presenza di CLI, le cellule mostrano, per tutti i tempi considerati, un profilo di distribuzione del DNA caratteristico di cellule quiescenti; in altre parole, il trattamento con l'antagonista di TLR4 (CLI) è in grado di bloccare completamente l'effetto di stimolazione del ciclo cellulare che si osserva, invece, in presenza dell'attivatore di TLR4 (LPS).

6.5 EFFETTI DELL'INIBIZIONE DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE MEDIATA DA TLR4 IN MACROFAGI THP-1 INFETTATI CON HCMV IN PRESENZA DELL'ANTAGONISTA CLI.

I dati sperimentali fino a questo punto prodotti supportano indirettamente un possibile coinvolgimento di TLR4 e del "signaling" da esso mediato quale meccanismo molecolare per la modulazione del ciclo cellulare indotta da HCMV. A tale riguardo, è importante

sottolineare di nuovo come la spinta virus-indotta di cellule quiescenti (come la linea macrofagica utilizzata) verso la proliferazione sia una strategia vincente, perché offre al virus la possibilità di svolgere il proprio ciclo replicativo con elevata efficacia, potendo in tale modo sfruttare il corredo enzimatico predisposto dalla cellula ospite per la replicazione del proprio DNA. Pertanto, alla luce di queste considerazioni, è stata verificata in maniera diretta la possibile relazione tra TLR4 ed infezione da HCMV, iniziando dalla valutazione degli effetti della presenza dell'inibitore di TLR4 (CLI) sull'efficienza dell'infezione virale (Figura 19).

I macrofagi THP-1 sono stati infettati con HCMV per 24, 48 e 72 ore; a tali tempi, sono stati valutati i livelli di espressione delle proteine precocissime maggiori (IE) di HCMV (Figura 19) in assenza ("HCMV") o in presenza ("HCMV+CLI") dell'inibitore di TLR4; i risultati sono stati analizzati mediante reazione di immunofluorescenza. I dati ottenuti mostrano chiaramente una netta inibizione dell'espressione dei geni precocissimi virali in seguito a trattamento con l'antagonista CLI di TLR4.

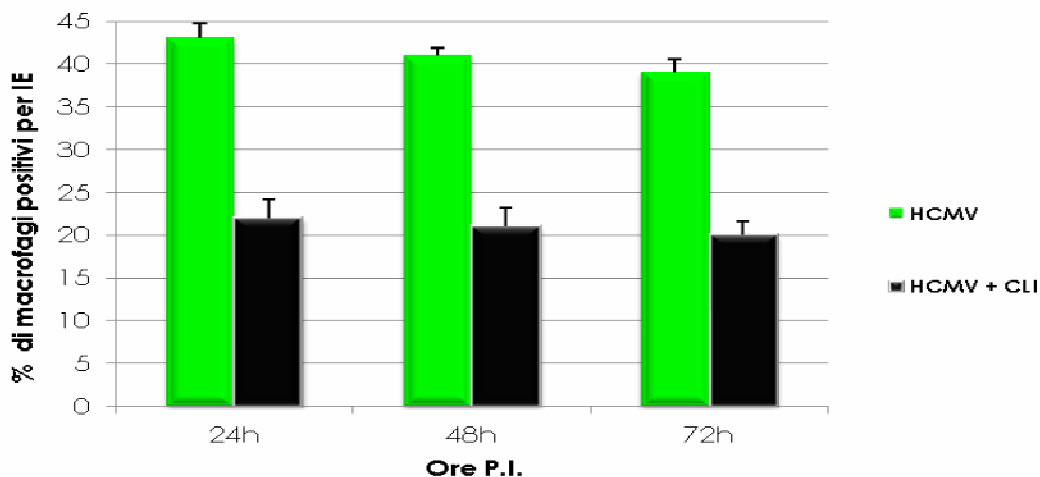


Figura 19. Effetto del trattamento con CLI sull'espressione delle proteine precocissime virali (IE) in macrofagi THP-1 infettati con HCMV.

Le cellule sono state infettate con HCMV in assenza (istogrammi verdi) o in presenza (istogrammi neri) di CLI ed infine fissate dopo 24, 48 e 72 ore di infezione. La reazione di immunofluorescenza è stata eseguita con un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo comune della proteina virale codificata dall'esone 2 dei geni precocissimi virali IE1 e IE2. Per la valutazione delle cellule infettate, sono stati contati i nuclei positivi per IE in 10 campi per vetrino; il loro valore medio è stato espresso come percentuale del numero totale di cellule per campo (valutate mediante marcaggio con DAPI). I dati mostrati rappresentano la media di tre diversi esperimenti.

Allo scopo di approfondire ulteriormente gli effetti di CLI sull'infezione virale sono stati analizzati anche i trascritti virali precocissimi (IE1) e precoci-tardivi (pp65) mediante RT-PCR

in presenza o in assenza di CLI (Figura 20A); i trascritti virali precocissimi sono anche stati quantificati mediante Real-time PCR (Figura 20B). Anche questi dati confermano che la presenza di CLI interferisce sul normale svolgimento di un efficace ciclo litico di HCMV, inibendo anche l'espressione di trascritti, quali pp65, i cui prodotti si rendono evidenti solo nelle fasi tardive dell'infezione.

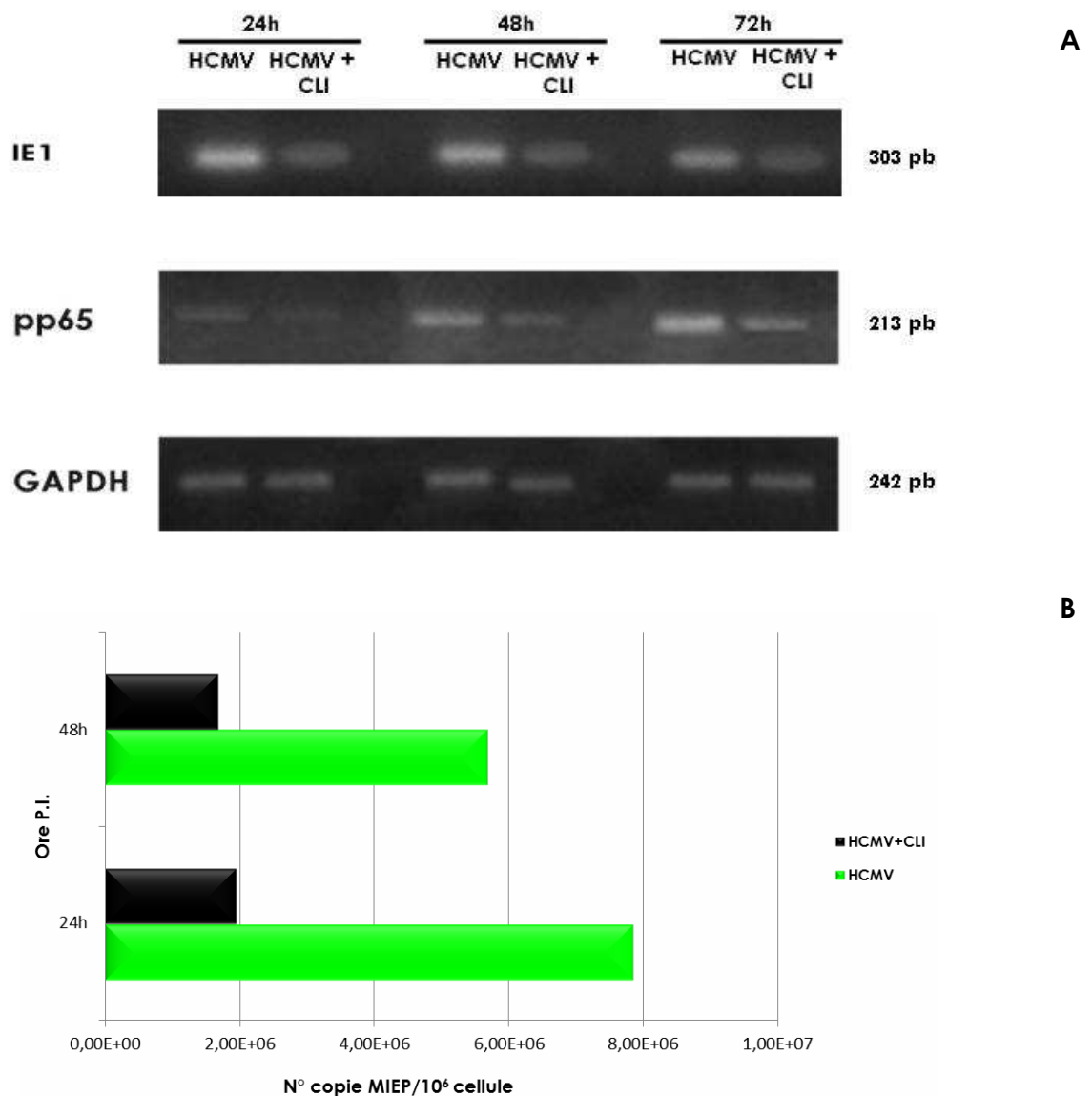


Figura 20. Analisi dei trascritti di HCMV rappresentativi delle fasi precocissima e pre-coce-tardiva del ciclo di replicazione virale in macrofagi THP-1 in presenza dell'antagonista CLI di TLR4.

A. Amplificazione mediante RT-PCR dei trascritti del gene precocissimo IE1 di HCMV e del gene pre-coce-tardivo UL83 (pp65) in assenza o in presenza di CLI dopo 24, 48 e 72 ore di infezione.

B. Quantificazione mediante Real-time PCR del trascritto delle proteine precocissime maggiori (esone 4 di MIEP) di HCMV in assenza (istogrammi verdi) o in presenza (istogrammi neri) di CLI dopo 24 e 48 ore di infezione.

I dati ottenuti sembrano deporre a favore di un ruolo giocato da TLR4 e della via metabolica da esso attivata nello svolgimento di un efficace ciclo litico di HCMV Towne in questo modello sperimentale.

6.6 ANALISI DEL CICLO CELLULARE IN MACROFAGI THP-1 NON INFETTATI IN SEGUITO ALL'INIBIZIONE DI TLR4 MEDIANTE UN ANTICORPO POLICLONALE CON FUNZIONE NEUTRALIZZANTE (NEUTRAB).

Al fine di minimizzare il rischio che i risultati ottenuti con l'inibitore CLI di TLR4 fossero dovuti ad eventuali effetti tossici provocati dalla sostanza stessa, sono stati applicati protocolli sperimentali analoghi a quelli impiegati per l'inibitore CLI utilizzando, al posto di quest'ultimo, un anticorpo neutralizzante diretto contro TLR4 (NeutrAb). Le modalità di inibizione di TLR4 da parte dei due antagonisti impiegati in questo studio (CLI e NeutrAb) sono differenti: come precedentemente accennato, CLI sopprime in maniera selettiva il "signaling" di TLR4 legandosi alla porzione intracellulare del recettore ed inibendo la produzione di ossido nitrico (NO) e di citochine proinfiammatorie; NeutrAb riconosce la porzione esterna del recettore e blocca a monte la cascata del "signaling" attivato da TLR4 (Figura 21).

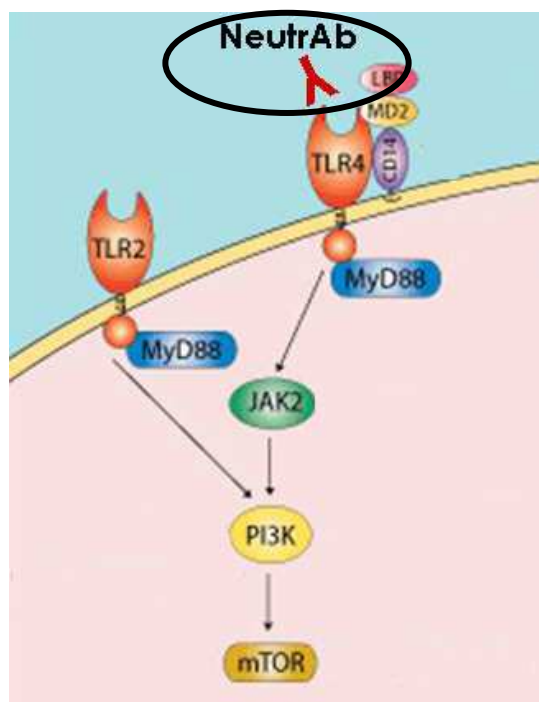


Figura 21. Schema rappresentativo dell'azione dell'anticorpo polyclonale anti-TLR4 con funzione neutralizzante (NeutrAb).

Immagine modificata da <http://www.invivogen.com/signal-transduction-inhibitors>.

L'andamento del ciclo cellulare è stato studiato in macrofagi THP-1 non infettati, in cui TLR4 è stato attivato da uno specifico agonista (Figura 22, LPS) o, alternativamente, bloccato per azione dell'anticorpo neutralizzante (Figura 22, LPS+NeutrAb). I risultati ottenuti mostrano chiaramente che in presenza di NeutrAb, le cellule presentano per tutti i tempi considerati un profilo di distribuzione del DNA caratteristico di cellule quiescenti. In altri termini, anche NeutrAb, come CLI, è in grado di contrastare l'azione di attivazione del ciclo cellulare mediata da TLR4 in macrofagi THP-1.

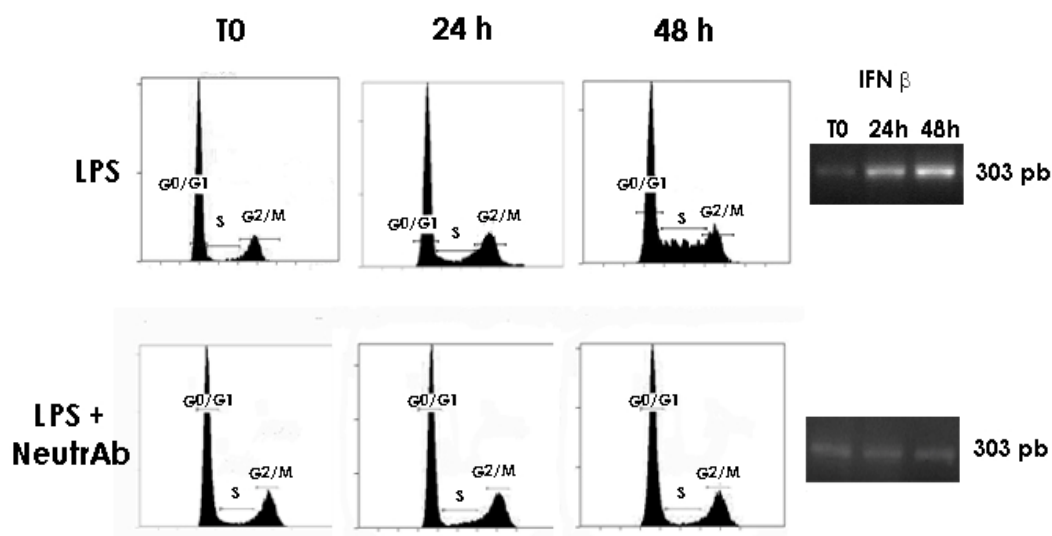


Figura 22. Analisi citofluorimetrica del contenuto di DNA di macrofagi THP-1 non infettati in presenza di specifico agonista o di antagonista NeutrAb di TLR4.

Le cellule THP-1 sono state trattate con la sostanza agonista di TLR4 (LPS), o con NeutrAb per tutta la durata dell'esperimento (oltre a 1 ora di pre-trattamento), di cui 6 ore in concomitanza con l'attivatore LPS. Le cellule sono state marcate con IP. L'incremento di espressione del trascritto di IFNβ è stato utilizzato come controllo dell'avvenuta stimolazione di TLR4 (pannelli di RT-PCR mostrati sulla destra).

6.7 EFFETTI DELL'INIBIZIONE DELLA TRASDUZIONE DEL SEGNALE MEDIATA DA TLR4 IN MACROFAGI THP-1 INFETTATI CON HCMV IN PRESENZA DELL'ANTAGONISTA NEUTRAB.

6.7.1 ESPRESSIONE DELLE PROTEINE PRECOCISSIME VIRALI E DI TRASCRITTI RAPPRESENTATIVI DEL CICLO LITICO DI HCMV.

Sulla base dei dati ottenuti mediante l'utilizzo dell'antagonista CLI di TLR4 in relazione all'espressione delle proteine precocissime maggiori di HCMV, che hanno evidenziato che l'inibizione del "signaling" di TLR4 esercita una netta azione di interferenza sull'avvio dell'infezione virale, è stato condotto lo stesso tipo di studio anche con l'anticorpo

neutralizzante (NeutrAb) anti-TLR4 (Figura 23). Come già evidenziato, l'utilizzo di una molecola che agisce su uno "step" differente, rispetto a CLI, della via metabolica attivata da TLR4, ha lo scopo di confermare i dati ottenuti con il primo inibitore, minimizzando il rischio di un'azione dovuta ad eventuali effetti collaterali della sostanza, non legati all'inibizione di TLR4.

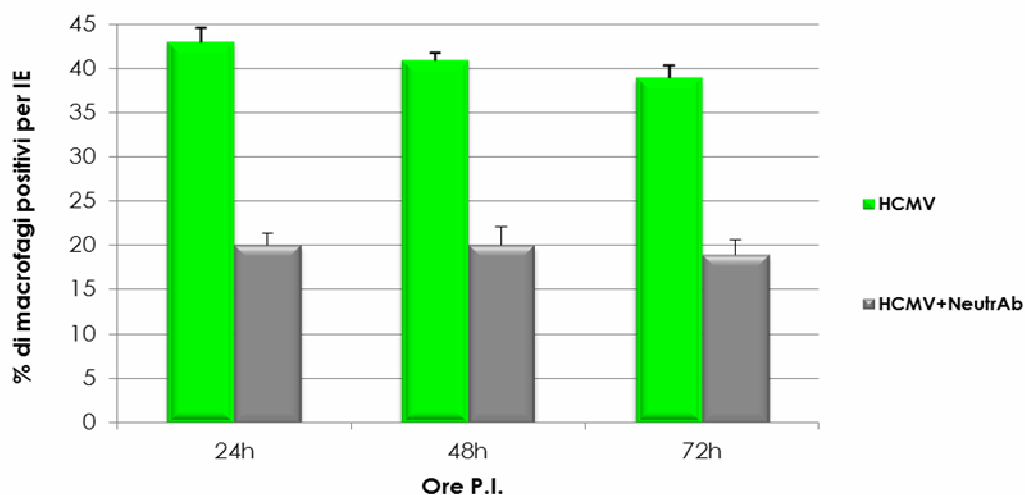


Figura 23. Effetto del trattamento con NeutrAb sull'espressione delle proteine precocissime virali (IE) in macrofagi THP-1 infettati con HCMV.

Le cellule sono state infettate in assenza (istogrammi verdi) o in presenza (istogrammi grigi) di NeutrAb ed infine fissate dopo 24, 48 e 72 ore di infezione. La reazione di immunofluorescenza è stata eseguita con un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo comune della proteina virale codificata dall'esone 2 dei geni precocissimi virali. Per il conteggio dei nuclei infettati, sono stati contati 10 campi per vetrino ed il numero di cellule infettate è stato espresso come un media percentuale del numero totale di cellule per campo (valutate mediante marcaggio con DAPI). I dati mostrati rappresentano la media di tre diversi esperimenti.

I risultati ottenuti mostrano una significativa diminuzione dell'espressione delle proteine precocissime di HCMV in seguito al trattamento con NeutrAb.

L'effetto di NeutrAb sull'infezione virale è stato confermato analizzando anche l'espressione dei trascritti virali precocissimi (IE1) e precoci tardivi (pp65), in presenza o in assenza di NeutrAb (Figura 24A); i trascritti virali precocissimi sono anche stati quantificati mediante Real-time PCR (Figura 24B).

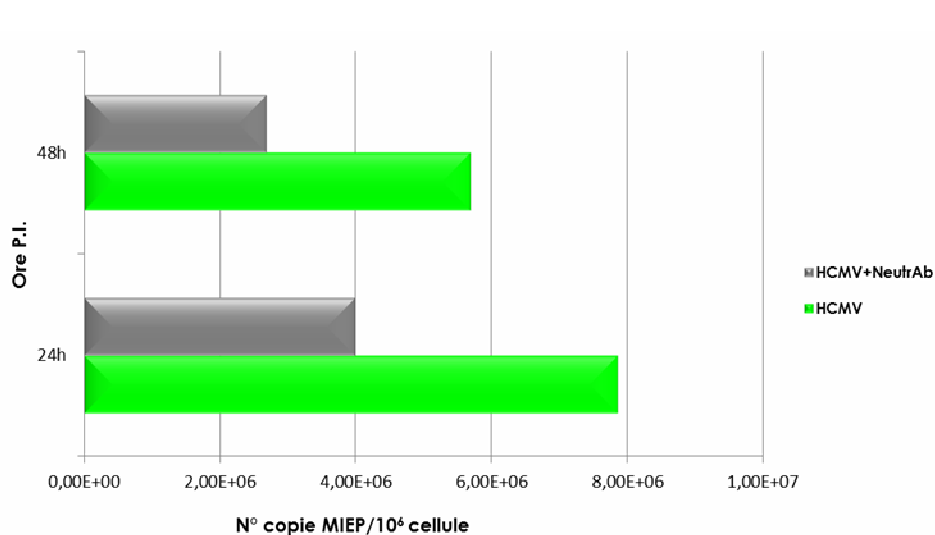
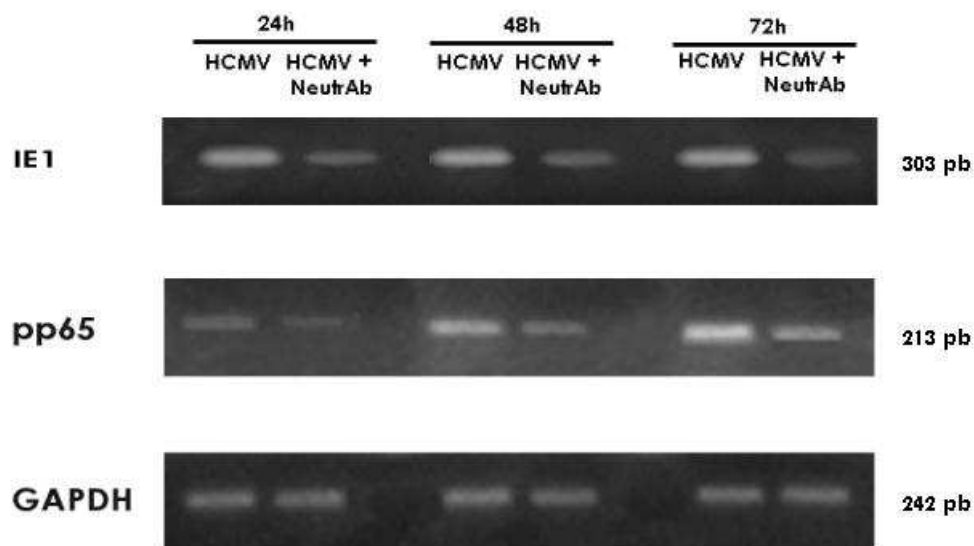


Figura 24. Analisi dei trascritti di HCMV rappresentativi delle fasi precocissima e precoce-tardiva del ciclo di replicazione virale in macrofagi THP-1 in presenza dell'antagonista NeutrAb di TLR4.

A. Amplificazione mediante RT-PCR dei trascritti del gene precocissimo IE1 di HCMV e del gene precoce-tardivo UL83 (pp65) in assenza o in presenza di NeutrAb dopo 24, 48 e 72 ore di infezione.

B. Quantificazione mediante Real-Time PCR del trascritto delle proteine precocissime maggiori (esone 4 di MIEP) di HCMV, in assenza (istogrammi verdi) o in presenza (istogrammi grigi) di NeutrAb dopo 24 e 48 ore di infezione.

Analogamente a quanto osservato in presenza di CLI, anche l'utilizzo di NeutrAb interferisce sullo svolgimento di un efficace ciclo litico di HCMV, inibendo anche l'espressione dei trascritti virali, quale quello per pp65, che si accumulano e vengono tradotti nelle fasi tardive dell'infezione.

6.7.2 ANALISI IN MICROSCOPIA CONFOCALE DELL'EFFETTO DI NEUTRAB SULLA DISTRIBUZIONE CELLULARE DELLE PROTEINE PRECOCISSIME DI HCMV.

L'analisi in microscopia confocale di macrofagi THP-1 infettati con HCMV per 24 ore in presenza degli inibitori CLI o NeutrAb di TLR4 ha permesso di ricavare informazioni dettagliate sulla distribuzione delle proteine precocissime virali all'interno delle cellule infettate (Figura 25). Come si può osservare, la presenza di NeutrAb non solo sembra ridurre significativamente il numero di macrofagi THP-1 positivi per le proteine virali IE (analogamente a quanto si osserva con CLI), ma anche provocare un profilo di distribuzione delle proteine IE aberrante in un numero significativo delle stesse, con blocco dell'accumulo nucleare e ritenzione a livello perinucleare (profilo a spot verdi nel dettaglio a maggiore ingrandimento di Figura 25, in cui il nucleo è colorato in blu).

Questi risultati rafforzano l'ipotesi di un ruolo importante giocato da TLR4 nel creare un ambiente idoneo ad una efficace replicazione virale.

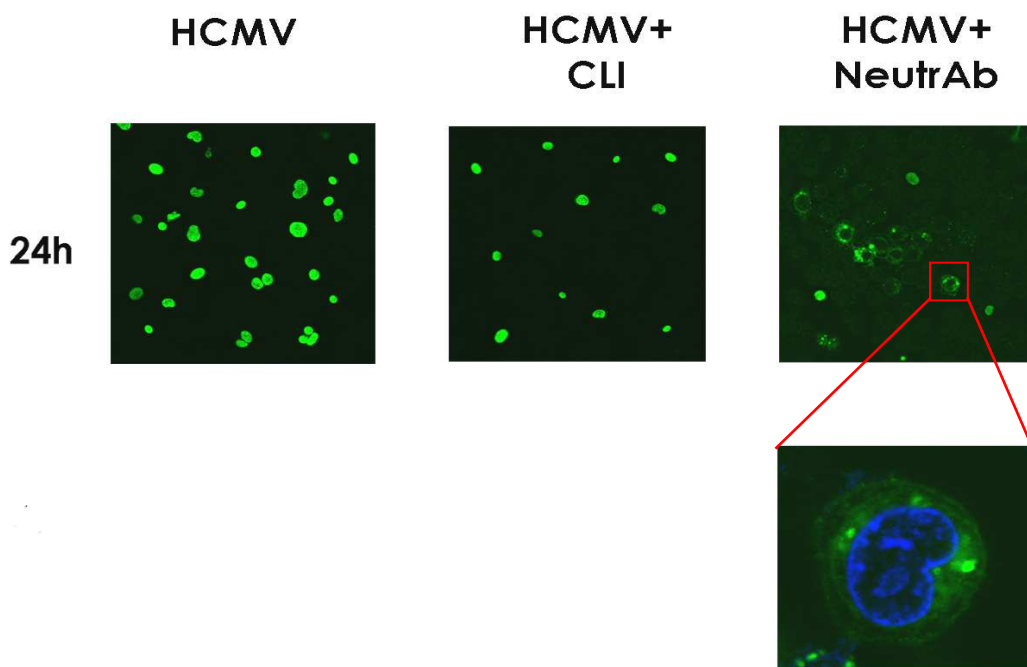


Figura 25. Analisi in microscopia confocale della distribuzione cellulare delle proteine precocissime di HCMV in macrofagi THP-1 infettati in assenza o in presenza di CLI o NeutrAb (inibitori di TLR4).

Le cellule sono state infettate con HCMV in assenza o in presenza di CLI o di NeutrAb ed infine fissate dopo 24 ore di infezione. La reazione di immunofluorescenza è stata condotta utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo comune codificato dall'esone 2 dei prodotti dei geni precocissimi di HCMV IEp72 e IEp86; i nuclei positivi per IE appaiono verdi. Nella figura è mostrato un dettaglio di una cellula infettata e trattata con NeutrAb, il nucleo è marcato in blu con DRAQ5. Barra dimensionale= 20 μ m (immagini a minore ingrandimento) e 5 μ m (immagine a maggiore ingrandimento).

6.7.3 EFFETTI DI DIFFERENTI CONCENTRAZIONI DI NEUTRAB SULLA DISTRIBUZIONE CELLULARE DELLE PROTEINE PRECOCISSIME DI HCMV.

L'analisi in microscopia confocale di macrofagi THP-1 infettati con HCMV ha mostrato che l'inibizione del "signaling" di TLR4 provocata dall'anticorpo NeutrAb impedisce l'accumulo a livello nucleare tipico delle proteine IE di HCMV, che invece assumono un profilo a "spot" perinucleari (si veda il dettaglio cellulare di Figura 25).

Al fine di confermare ed approfondire queste osservazioni preliminari, lo stesso protocollo sperimentale è stato applicato alla successiva serie di indagini, utilizzando concentrazioni crescenti di NeutrAb (5 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml), in aggiunta a quella usata nei precedenti esperimenti (10 µg/ml) (Figura 26); l'osservazione dei risultati è stata effettuata mediante microscopia a fluorescenza (Figura 26A) o mediante microscopia confocale (Figura 26B). Come rappresentato graficamente in Figura 26A, i risultati ottenuti con il ceppo Towne mostrano che l'utilizzo di concentrazioni crescenti di NeutrAb è proporzionale non solo alla inibizione dell'espressione delle proteine IE di HCMV (diminuzione percentuale del numero di nuclei di THP-1 positivi per IE), ma anche all'espressione perinucleare a "spot" di queste ultime, che aumenta incrementando la concentrazione di NeutrAb, come dimostrato anche dall'analisi effettuata in microscopia confocale (Figura 26B). Altro aspetto di potenziale interesse è quello relativo alla sovrapposizione di risultati ottenuta utilizzando altri due ceppi di riferimento di HCMV (AD169 e TB40E) (dati non mostrati), che testimonia come questo fenomeno sia verosimilmente generalizzabile ai diversi stipiti di HCMV.

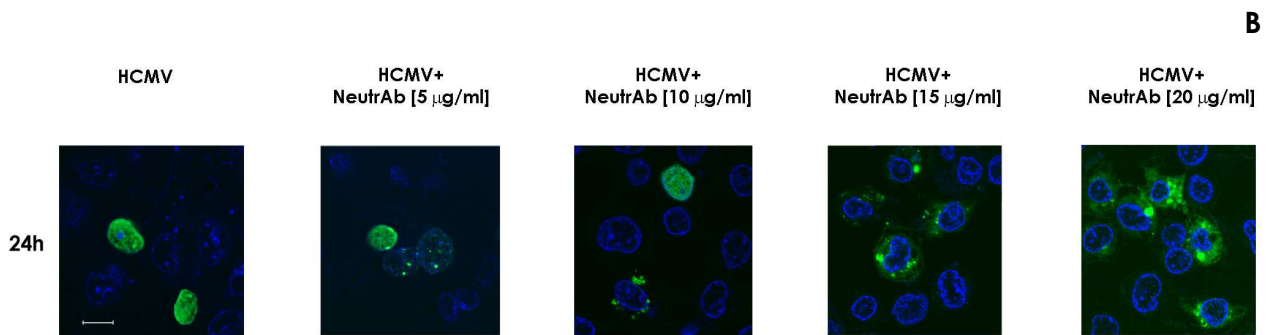
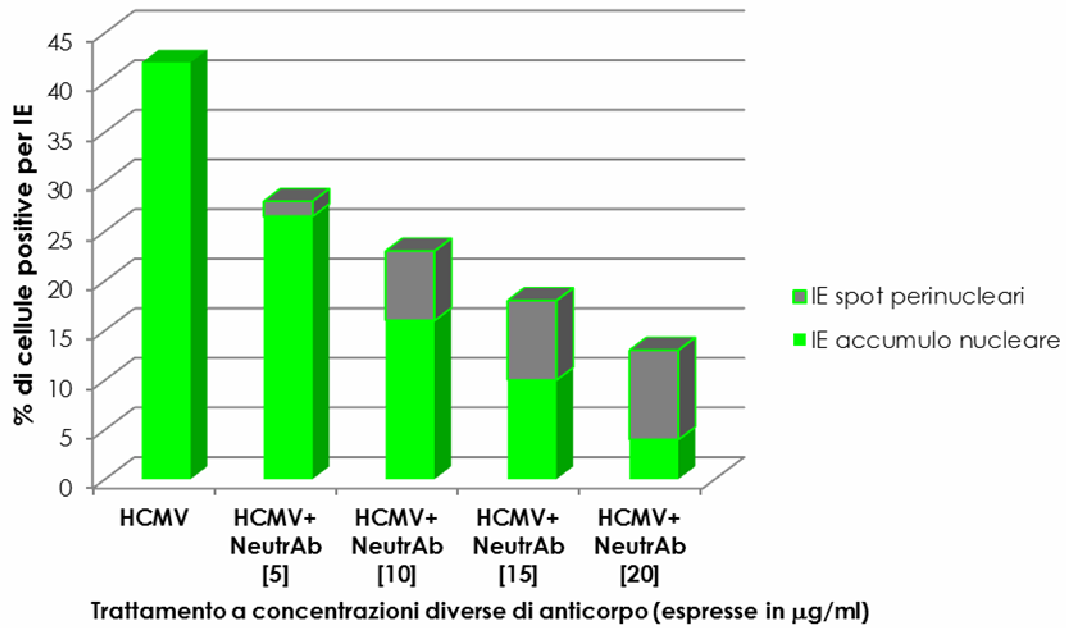


Figura 26. Effetto dell'utilizzo di diverse concentrazioni di NeutrAb (inibitore di TLR4) sull'espressione delle proteine precocissime (IE) di HCMV in macrofagi THP-1 dopo 24 ore di infezione con HCMV Towne.

La reazione di immunofluorescenza è stata condotta utilizzando un anticorpo monoclonale che riconosce l'epitopo comune codificato dall'esone 2 dei prodotti dei geni precocissimi di HCMV IEp72 e IEp86.

A. Analisi dei risultati mediante microscopia a fluorescenza. Le cellule positive per IE sono state conteggiate (come dettagliato nella sezione Materiali e Metodi) ed espresse come percentuale rispetto al numero totale (nuclei colorati con DAPI).

B. Per l'analisi in microscopia confocale in nuclei sono stati colorati con DRAQ5. Barra dimensionale= 10 μm .

6.8 EFFETTI DELL'INIBIZIONE DEL "SIGNALING" MEDIATO DA TLR4 SULL'ATTIVAZIONE DEL CICLO CELLULARE INDOTTA DA HCMV IN MACROFAGI THP-1.

I macrofagi THP-1 sono stati infettati con HCMV (ceppo Towne) per 24, 48 e 72 ore, in presenza o in assenza di uno dei due inibitori di TLR4 (CLI o NeutrAb). L'analisi del contenuto di DNA, della sua distribuzione nelle diverse fasi del ciclo cellulare ed il livello di espressione delle proteine precocissime virali (IE) di citomegalovirus è stata eseguita mediante analisi citofluorimetrica (Figura 27). I risultati ottenuti mostrano, innanzitutto, che il livello di espressione delle proteine IE di HCMV è molto minore in cellule infettate e trattate rispetto a quello osservabile in cellule solamente infettate, come mostrato dai valori percentuali riportati nei grafici ad istogrammi (grafici verdi: cellule infettate; grafici neri: cellule non infettate) per quel che riguarda il controllo di infezione rispetto all'infezione in presenza di CLI o NeutrAb. Risulta anche evidente che, come già descritto in precedenza, in assenza di trattamento con inibitori di TLR4, HCMV spinge i macrofagi THP-1 (cellule quiescenti) a rientrare nel ciclo cellulare; infatti, si può notare come i macrofagi infettati e non trattati (pannello "CONTROLLO": istogrammi verdi), mostrino un profilo di distribuzione del DNA tipico di cellule in attiva proliferazione, con evidenti fasi S e G2/M. D'altro canto, è anche evidente che in cellule infettate e trattate con CLI o con NeutrAb questa spinta al rientro nel ciclo cellulare indotta dal virus, risulta ridotta (in particolare dopo 48 e 72 ore di infezione; vedi frecce nere in S e G2/M nei pannelli "CLI" e "NeutrAb"), mostrando una distribuzione del DNA molto più simile a quella osservata nelle cellule non infettate (istogrammi neri).

Questi risultati rafforzano ulteriormente l'ipotesi di un coinvolgimento di TLR4 nel mediare l'attivazione del ciclo cellulare virus-indotta in macrofagi THP-1, delineando la potenziale importanza di questo recettore e della via metabolica da esso attivata nell'infezione da HCMV in questo modello sperimentale.

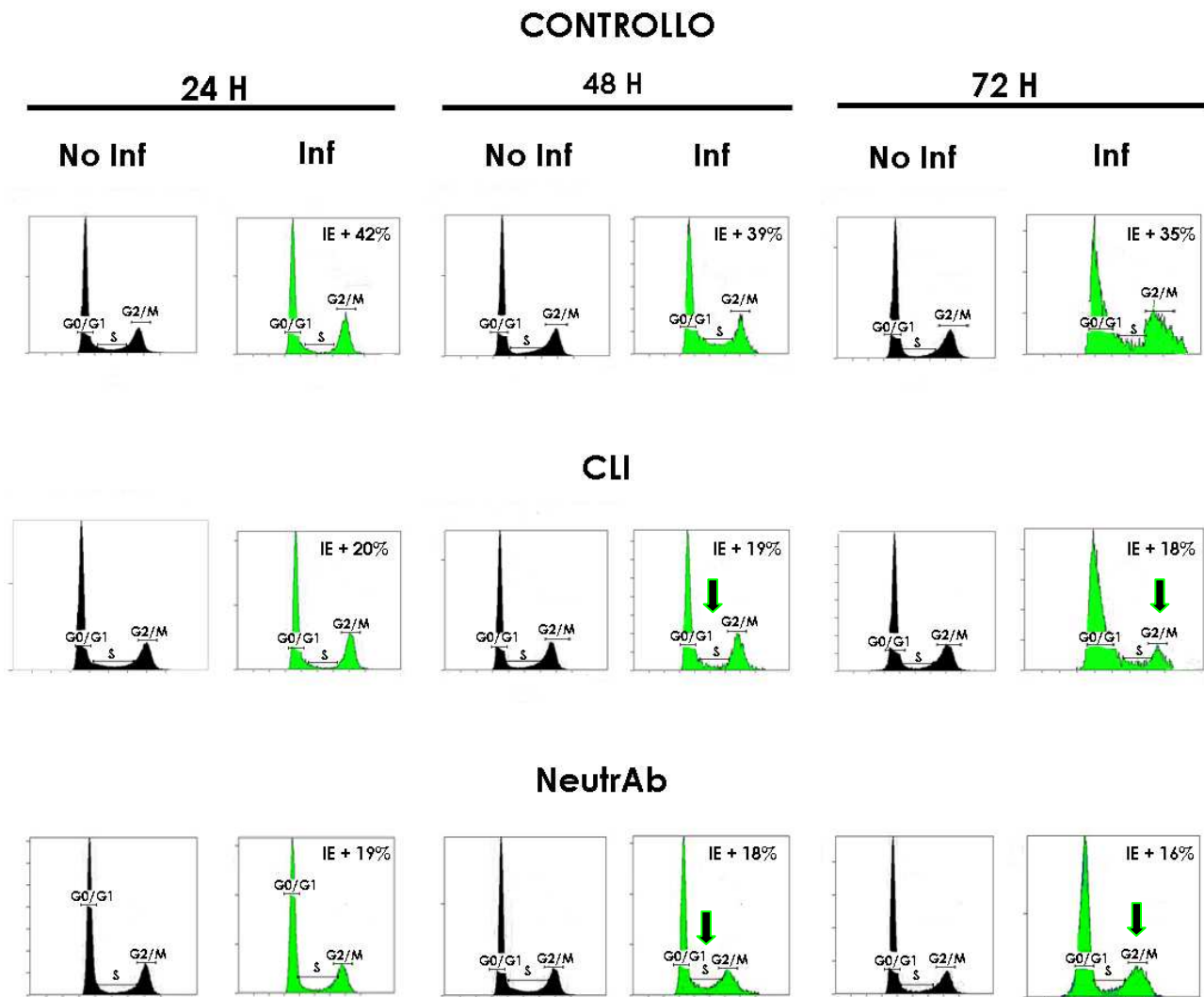


Figura 27. Effetto di CLI e NeutrAb (inibitori di TLR4) sull'attivazione del ciclo cellulare in macrofagi THP-1 infettati con HCMV.

I macrofagi THP-1 sono stati infettati in assenza ("CONTROLLO") o in presenza di CLI o di NeutrAb per 24, 48, 72 ore. Il contenuto di DNA di cellule infettate (IE+, istogrammi verdi) e non infettate (istogrammi neri) è stato analizzato mediante citofluorimetria a flusso. "No Inf": cellule non infettate; "Inf": cellule infettate.

7. DISCUSSIONE

Le strategie messe a punto da diversi virus per compiere il proprio ciclo replicativo litico si esplicano, fondamentalmente, sia attraverso la soppressione dei sistemi di regolazione della cellula ospite, sia operando un'azione di controllo sui circuiti metabolici cellulari. D'altra parte, per quei virus che, come HCMV, sono in grado di instaurare diverse tipologie di interazione con la cellula infettata, tra cui, in particolare, una condizione di latenza, è plausibile ipotizzare che i suddetti meccanismi di regolazione e controllo siano differenziati rispetto a quelli messi in atto durante il ciclo litico: infatti, mentre in caso di infezione latente la maggior parte del genoma di HCMV non è espresso ed il metabolismo cellulare rimane praticamente invariato, in corso di infezione litica il virus compete con la cellula ospite e coopta diverse funzioni cellulari per portare a termine il proprio ciclo replicativo e produrre progenie virale. Inoltre, come già sottolineato, HCMV ha sviluppato una straordinaria capacità di infettare produttivamente diverse tipologie cellulari *in vivo*, tra cui cellule attivamente implicate nel ciclo cellulare, così come cellule quiescenti [Arrode and Devrinche, 2003; Lunardi et al., 2005; Pass, 2001; Sinzger et al., 1995] questa caratteristica di spicco lascia presagire come le strategie messe a punto da HCMV siano ulteriormente variegata in relazione alla tipologia di cellula infettata.

Scopo principale di questo studio è stato quello di ampliare le conoscenze riguardo a meccanismi/funzioni cellulari cooptati da HCMV per svolgere efficacemente il proprio ciclo litico nel modello simil-macrofagico THP-1. È noto come i macrofagi, importanti cellule dell'immunità innata, rappresentino, *in vivo*, un bersaglio strategico cruciale per HCMV, in quanto principali vettori della sua disseminazione nei vari tessuti dell'organismo, a seguito di riattivazione dallo stato di latenza in categorie di individui a rischio. Tale aspetto è da mettere in relazione con quelle che sono le sedi di latenza di HCMV *in vivo*, rappresentate fondamentalmente da cellule progenitrici CD34+ della linea mieloide e da monociti del sangue periferico [Mendelson et al., 1996; Taylor-Wiedeman et al., 1994]. In queste cellule sembra esistere una stretta correlazione tra riattivazione dallo stato di latenza e differenziamento cellulare: in particolare, lo stadio post-mitotico che avvia il processo di differenziamento cellulare da monocita immaturo a macrofago, sembra in grado di influenzare in senso positivo l'espressione genica virale, portando all'infezione produttiva [Sinclair and Sisson, 2006]. D'altra parte, è evidente che HCMV non potrebbe svolgere con successo un ciclo replicativo litico in cellule irreversibilmente fuoriuscite dal ciclo cellulare, quali i macrofagi, senza adottare particolari strategie volte a creare condizioni favorevoli all'efficienza dell'infezione.

A tale proposito, è bene ricordare come, in cellule attivamente impegnate nel ciclo cellulare, in grado di supportare un ciclo di replicazione litico da HCMV, il virus sia capace di modificare il normale svolgimento del ciclo cellulare per direzionarlo a proprio vantaggio, attraverso l'arresto delle cellule in fase G1 o alla transizione G1/S, ossia fasi ricche di enzimi cellulari utili per la successiva sintesi del DNA cellulare, impedendone, al contempo, la sua replicazione [Bain and Sinclair, 2007; Dittmer and Mocarsky, 1997; Fortunato et al., 2002; Hertel and Mocarsky, 2004]. In altri termini, in cellule attivamente impegnate nel ciclo cellulare, HCMV è in grado di alterare quest'ultimo con una duplice finalità: creare un ambiente ricco di enzimi che garantiscano una efficiente replicazione del proprio DNA, abolendo, al contempo, la sintesi di DNA cellulare.

Per quel che riguarda il modello macrofagico utilizzato in questo studio, esso è costituito, come già accennato, da cellule irreversibilmente fuoriuscite dal ciclo cellulare. È noto come HCMV sia in grado di infettare anche cellule quiescenti *in vivo* [Castillo and Kowalik, 2004], ossia cellule che dispongono di una ridotta quantità di desossiribonucleotidi e cofattori che possano essere cooptati dal virus per la replicazione del proprio DNA. Apparentemente, la mancanza di "costituenti della fase S" rappresenta una condizione sfavorevole per la replicazione virale, pertanto appare evidente l'importanza, per HCMV, di sviluppare strategie volte alla modulazione del ciclo cellulare anche in cellule quiescenti.

Considerate queste premesse, il primo obiettivo di questo studio è stato quello di verificare la capacità di HCMV di regolare a proprio vantaggio il ciclo cellulare di macrofagi THP-1 (ossia di cellule irreversibilmente bloccate in fase G0); i dati ottenuti dimostrano che, in effetti, il virus "spinge" queste cellule a rientrare nel ciclo cellulare, come evidenziato dal profilo di distribuzione del DNA che mostra un netto aumento delle fasi S e G2/M. Tali risultati sono in accordo con quelli ottenuti in modelli cellulari quiescenti da altri gruppi di ricerca [Sinclair et al., 2000], che descrivono un analogo effetto da parte di HCMV sul ciclo cellulare della linea NT2D1 (da teratocarcinoma embrionale), cellule irreversibilmente uscite dal ciclo cellulare, anche se molto lontana dalle tipologie di cellule infettate da HCMV nell'infezione *in vivo*, quali i macrofagi. È interessante notare come, nel modello considerato, l'azione di interferenza sul ciclo cellulare si espliciti in modo diverso rispetto a quella rilevata in cellule attivamente impegnate nel ciclo cellulare. Infatti, mentre in queste ultime, HCMV è capace di determinare l'arresto in fase G1 o G1/S [Arcangeletti et al., 2011], in cellule allo stadio terminale di differenziamento, quali i macrofagi, il virus sembra in grado di spingere ulteriormente le cellule verso le fasi S e G2/M, malgrado non si assista ad un aumento numerico delle stesse in corso di

infezione. È possibile che HCMV operi un blocco di queste cellule in una fase più avanzata del ciclo cellulare, in particolare a livello di mitosi: questa ipotesi dovrà essere verificata con ulteriori studi.

La seconda parte dello studio si è focalizzata sulla messa in evidenza di possibili meccanismi cooptati dal virus per determinare l'attivazione del ciclo cellulare in macrofagi THP-1.

Le premesse per l'attuazione di tale obiettivo derivano da una serie di nozioni già note, riguardo alla biologia di tale agente virale, così come da dati più recenti di letteratura.

Innanzitutto, tenendo presente che la cellula macrofagica (quale il modello utilizzato) è uno dei principali effettori dell'immunità innata, è importante sottolineare come HCMV sia in grado di indurre una consistente risposta cellulare infiammatoria, verosimilmente attraverso il "signaling" mediato da specifici TLR. Di primo acchito, l'attivazione indotta da HCMV dell'immunità innata (che per definizione stessa rappresenta un meccanismo di difesa verso il "non-self" e, pertanto, ha un'azione anti-virale), sembrerebbe quasi un paradosso, nell'ambito del poderoso "arsenale" anti-risposta immunitaria sviluppato da HCMV. In realtà, una mole crescente di dati di letteratura sembra supportare una funzione del processo infiammatorio quale meccanismo incrementante la virulenza non solo di HCMV [Boheme and Compton, 2004; Compton et al., 2003; Mocarski 2002 a, b], ma anche di altri agenti virali [Al-Harti et al., 1997; Caselli et al., 2012; Thorley-Lawson, 2001].

Per quel che riguarda, in particolare, i TLR, è anche noto come i macrofagi siano da annoverare tra le tipologie cellulari che ne esprimono il più elevato numero [Hornung et al., 2002; Zarembek and Godowski, 2002].

Infine, dati recenti di letteratura attribuiscono funzioni inedite (diverse dal classico ruolo nell'ambito dell'immunità innata), a specifici TLR, che li vedono coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare [Hasan et al., 2005; 2007]. In particolare, i TLR che sembrano maggiormente implicati in questa funzione sono TLR3, TLR4 e TLR5, i quali influenzerebbero la proliferazione cellulare spingendo la cellula verso la fase S, attraverso l'inattivazione e/o la degradazione della proteina p27 (codificata dal gene oncosoppressore p27Kip1) che contribuisce all'arresto del ciclo cellulare mediante inibizione di chinasi associate a cicline.

Sulla base di tali presupposti, questo studio si è particolarmente concentrato su TLR3, TLR4 e TLR5 in corso di infezione sperimentale da HCMV in macrofagi THP-1, dimostrando che l'infezione di questo modello cellulare da parte di tale agente virale induce un aumento dei livelli dei trascritti dei suddetti recettori. Anche questo risultato, così come quello

riguardante la modulazione del ciclo cellulare, è in accordo con i dati ottenuti da diversi gruppi di ricerca in altri modelli virus/cellula. In particolare, è stato osservato che HCMV modula l'espressione del TLR9 in fibroblasti [Iversen et al., 2009], che il virus di Hantaan induce un incremento del livello di trascrizione di TLR4 in cellule endoteliali HUVEC [Jiang et al., 2008] e che HHV-8 induce un aumento del trascritto di TLR3 in monociti THP-1 [West and Damania, 2008]. La presenza di un "cross-talk", cioè di una rete di comunicazione tra diversi TLR, può spiegare il fatto che più di un TLR possa essere contemporaneamente influenzato da un'infezione [Palazzo et al., 2008].

Obiettivo successivo di questo studio è stato quello di verificare se la stimolazione selettiva di ognuno dei tre TLR considerati (TLR3, TLR4 e TLR5) provocasse l'attivazione del ciclo cellulare in macrofagi THP-1 non infettati. I dati ottenuti dimostrano che solo in seguito a stimolazione di TLR4 con uno specifico agonista (LPS) si ottiene la spinta alla proliferazione cellulare, con tempi sovrapponibili a quelli in cui si verifica il rientro nel ciclo cellulare virus-indotto. Il successivo utilizzo di due antagonisti specifici di TLR4 (CLI e NeutrAb) ha permesso di confermare che l'inibizione del TLR4 (sia a livello intracellulare, sia a livello extracellulare, dipendentemente dall'inibitore utilizzato) annulla l'effetto di attivazione del ciclo cellulare in macrofagi THP-1 non infettati. L'utilizzo degli stessi inibitori nel modello macrofagico THP-1 in corso di infezione sperimentale da HCMV ha permesso di dimostrare che l'inibizione di TLR4 e del "signaling" da esso mediato, interferisce con un efficiente ciclo litico di HCMV, come evidenziato dalla diminuzione significativa delle proteine precocissime virali e dei trascritti rappresentativi delle fasi precocissima (IE1) e tardiva (pp65) del ciclo litico di HCMV.

Un dato di particolare interesse è emerso dallo studio della distribuzione delle proteine precocissime di HCMV mediante microscopia confocale, in presenza dell'anticorpo neutralizzante anti-TLR4, che blocca la porzione extracellulare del recettore. In tali condizioni sperimentali, le suddette proteine virali non mostrano il classico accumulo nucleare, ma mantengono una localizzazione citoplasmatica a "spots". In altri termini, la "schermatura" (da parte dell'anticorpo neutralizzante) del recettore TLR4, esposto a livello di membrana citoplasmatica, sembra interferire con il corretto innesco del ciclo di replicazione litico di HCMV e rende plausibile ipotizzare che TLR4 possa rappresentare una molecola co-recettoriale per HCMV in questo modello cellulare. Analogamente, in altri modelli cellulari (fibroblasti umani) è stato descritto l'intervento del dimero TLR2/TLR1 che riconosce le glicoproteine virali di superficie B ed H di citomegalovirus umano [Boheme et al., 2006].

Ultimo aspetto preso in considerazione in questo studio, quale logico corollario dei dati che indicano il possibile coinvolgimento di TLR4 nel favorire un efficiente ciclo litico di HCMV in macrofagi THP-1, ha riguardato la verifica dell'effetto sul ciclo cellulare in corso di infezione da HCMV, in presenza degli inibitori di TLR4 prescelti. I dati ottenuti rafforzano l'ipotesi del coinvolgimento di TLR4 nel favorire il corretto espletamento del ciclo litico di HCMV nel modello considerato, dimostrando una netta inibizione dell'attivazione del ciclo cellulare in tali condizioni sperimentali. È interessante notare che, mentre gli effetti del legame tra specifiche glicoproteine del pericapside di HCMV e TLR2/TLR1, descritti da altri Autori nel modello permissivo fibroblastico, sono risultati evidenti anche utilizzando virus inattivato da raggi UV [Boheme et al., 2006], in macrofagi THP-1 l'effetto di attivazione del ciclo cellulare virus-indotto, possibilmente mediato da TLR4, richiede la presenza di virus attivo. È possibile ipotizzare che, in questo modello, TLR4 non faccia solo parte di un complesso recettoriale o co-recettoriale, ma che sia coinvolto anche in fasi successive all'internalizzazione di HCMV. A tale proposito è importante sottolineare come, a seguito di attivazione, TLR4 sia internalizzato a livello di endociti [Husebye et al., 2006].

I risultati ottenuti nel presente studio apportano prove a supporto dell'ipotesi di un ruolo importante di TLR4 nel favorire l'instaurarsi ed il mantenimento di condizioni ottimali per un efficace sviluppo del ciclo litico di HCMV in macrofagi THP-1.

Com'è noto, l'attivazione di TLR4 (come quella di altri TLR) dà inizio ad una cascata di eventi cellulari che sfocia nella produzione di NF- κ B. A tale proposito, dati di letteratura descrivono una serie di fattori, nell'ambito dell'apparato trascrizionale cellulare, capaci di regolare positivamente l'espressione dei principali trascritti IE di HCMV [Meier and Stinski, 1996]. In particolare, NF- κ B è in grado di attivare l'"enhancer" virale, legandosi a specifiche sequenze virali [Sambucetti et al., 1989; Santoro et al., 2003].

La verifica di tali risultati in un modello macrofagico *ex vivo* (monociti da sangue periferico di soggetti HCMV-negativi, differenziati a macrofagi), rappresenterebbe una importante conferma dei possibili meccanismi e complessi molecolari cellulari cooptati da HCMV per l'innescò dell'infezione produttiva in tale modello strategicamente rilevante per la riattivazione del virus, e potrebbe anche fornire preziose informazioni per lo sviluppo di terapie anti-virali innovative.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abate DA, Watanabe S, Mocarski ES. 2004. Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* 78:10995-11006.
- Abreu MT, Fukata M, Arditi M. 2005. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 174:4453–4460.
- Ahn JH and Hawyard GS. 2000. Disruption of PML-associated nuclear bodies by IE1 correlates with efficient early stages of viral gene expression and DANN replication in human cytomegalovirus infection. *Virology* 274:39-55.
- Al-Harti L, Roebuck KA, Kessler H, Landay A. 1997. Inhibition of cytokine-driven human immunodeficiency virus type 1 replication by protease inhibitor. *J Infect Dis* 176:1175-1179.
- Amon W and Farrell PJ. 2005. Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev Med Virol* 15:149–156.
- Arcangeletti MC, De Conto F, Ferraglia F, Pinardi F, Gatti R, Orlandini G, Calderaro A, Motta F, Medici MC, Valcavi P, Razin SV, Chezzi C, Dettori G. 2003. Human cytomegalovirus proteins pp65 and IEp72 are targeted to distinct compartments in nuclei and nuclear matrices of infected human embryo fibroblasts. *J Cell Biochem* 90:1056-1067.
- Arcangeletti MC, Rodighiero I, De Conto F, Gatti R, Orlandini G, Ferraglia F, Motta F, Covan S, Razin SV, Dettori G, Chezzi C. 2009. Modulatory effect of rRNA synthesis and ppUL83 nucleolar compartmentalization on human cytomegalovirus gene expression in vitro. *J Cell Biochem* 108:415-423.
- Arcangeletti MC, Rodighiero I, Mirandola P, De Conto F, Covan S, Germini D, Razin S, Dettori G, Chezzi C. 2011. Cell-cycle-dependent localization of human cytomegalovirus UL83 phosphoprotein in the nucleolus and modulation of viral gene expression in human embryo fibroblasts in vitro. *J Cell Biochem*. 112:307-317.

- Arrode G and Devrinche C. 2003. Dendritic cells and HCMV cross-presentation. *Curr Top Microbiol Immunol.* 276:277-294.
- Báfica A, Scanga CA, Schito M, Chaussabel D, Sher A. 2004. Influence of coinfecting pathogens on HIV expression: evidence for a role of Toll-like receptors. *J Immunol* 172:7229-7234.
- Bain M and Sinclair J. 2007. The S phase of the cell cycle and its perturbation by human cytomegalovirus. *Rev Med Virol* 17:423-434.
- Bodaghi B, Jones TR, Zipeto D, Vita C, Sun L, Laurent L, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Michelson S. 1998. Chemokine sequestration by viral chemoreceptors as a novel viral escape strategy: withdrawal of chemokines from the environment of cytomegalovirus infected cells. *J Exp Med* 188:855-866.
- Boheme KW and Compton T. 2004. Innate sensing of viruses by toll-like receptors. *J Virol* 78:7867-7873.
- Boehme KW, Guerrero M, Compton T. 2006. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *J Immunol* 177:7094-7102.
- Bolovan-Fritts CA, Mocarski ES, Wiedeman JA. 1999. Peripheral blood CD14⁺ cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood* 93:394–398.
- Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41:521–530.
- Boyle KA and Compton T. 1998. Receptor-binding properties of a soluble form of human cytomegalovirus glycoprotein B. *J Virol* 72:1826-1833.
- Bradshaw PA, Duran-Guarino MR, Perkins S, Rowe JL, Fernandez J, Fry KE, Reyes GR, Young L, Fong SKH. 1994. Localization of antigenic sites on human cytomegalovirus virion structural proteins encoded by UL48 and UL56. *Virology* 205:321-328.

- Bresnahan WA, Boldogh I, Thompson EA, Albrecht T. 1996. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* 224:150–160.
- Bresnahan WA and Shenk T. 2000. A subset of viral transcripts packaged within viral particles. *Science* 288:2373-2376.
- Browne EP, Wing B, Coleman D, Shenk T. 2001. Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus-infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol* 75:12319-12330.
- Browne EP and Shenk T. 2003. Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:11439-11444.
- Burns LJ, Waring JF, Reuter JJ, Stinski MF, Ginder GD. 1993. Only the HLA class I gene minimal promoter elements are required for transactivation by human cytomegalovirus immediate early genes. *Blood* 81:1558-1566.
- Caselli E, Benedetti S, Grigolato J, Caruso A, Di Luca D. 2012. Activating transcription factor 4 (ATF4) is upregulated by human herpesvirus 8 infection, increases virus replication and promotes proangiogenic properties. *Arch Virol* 157:63-74.
- Castillo JP and Kowalik TF. 2004. Hcmv infection: modulating the cell cycle and cell death. *Int Rev Immunol* 23:113–139.
- Cervera C, Lozano F, Saval N, Gimferrer I, Ibanez A, Suarez B, Linares L, Cofan F, Ricart MJ, Esforzado N, Marcos MA, Pumarola T, Oppenheimer F, Campistol JM, Moreno A. 2007. The influence of innate immunity gene receptors polymorphisms in renal transplantation infection. *Transplantation* 83:1493-1500.
- Chee MS, Satchwell SC, Preddie E, Weston KM, Barrell BG. 1990. Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature* 344:774-777.

- Chevalier MS, Daniels GM, Johnson DC. 2002. Binding of human cytomegalovirus US2 to major histocompatibility complex class I and II proteins is not sufficient for their degradation. *J Virol* 76:8265-8275.

- Chevalier MS and Johnson DC. 2003. Human cytomegalovirus US3 chimeras containing US2 cytosolic residues acquire major histocompatibility class I and II protein degradation properties. *J Virol* 77:4731-4738.

- Coquette A, Bourgeois A, Dirand C, Varin A, Chen W, Herbein G. 2004. Mixed cytomegalovirus glycoprotein B genotypes in immunocompromised patients. *Clin Infect Dis* 39:155–161.

- Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, Gillespie GY, Bharara S, King PH, Nabors LB, Cobbs CG, Britt WJ. 2002. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* 62:3347-3350.

- Cole JE, Georgiou E, Monaco C. 2010. The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* ePub 2010:393946

- Compton T, Nowlin DM, Cooper NR. 1993. Initiation of human cytomegalovirus infection requires initial interaction with cell surface heparan sulfate. *Virology* 193:834-841.

- Compton T, Kurt-Jones E, Boheme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, Finberg RW. 2003. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and toll-like receptor 2. *J Virol* 77:4588–4596.

- Cosme RS, Yamamura Y, Tang Q. 2009. Roles of polypyrimidine tract binding proteins in major immediate-early gene expression and viral replication of human cytomegalovirus. *J Virol* 83:2839-2850.

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

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

- De Bouteiller O, Merck E, Hasan UA, Hubac S, Benguigui B, Trinchieri G, Bates EE, Caux C. 2005. Recognition of double-stranded RNA by human toll-like receptor 3 and downstream receptor signaling requires multimerization and an acidic pH. *J Biol Chem* 280:38133–38145.

- Dittmer D and Mocarski ES. 1997. Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition, *J Virol* 71:1629–1634.

- Doyle SE, O'Connell R, Vaidya SA, Chow EK, Yee K, Cheng G. 2003. Toll-like receptor 3 mediates a more potent antiviral response than Toll-like 4. *J Immunol* 170:3565–3571.

- Du G, Dutta N, Lashmit P, Stinski MF. 2011. Alternative splicing of the human cytomegalovirus major immediate-early genes affects infectious-virus replication and control of cellular cyclin-dependent kinase. *J Virol* 85:804-817.

- Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, Kazory A, Chalopin JM, Tiberghien P. 2005. Relevance of Toll-like receptor 4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 67: 2454-2461.

- Everett RD. 2000. ICP0, a regulator of herpes simplex virus during lytic and latent infection. *Bioessays* 22: 761–770.

- Fitzner N, Clauberg S, Essmann F, Liebmann J, Kolb-Bachofen V. 2003. Human skin endothelial cells can express all 10 TLR genes and respond to respective ligands. *Clin Vaccine Immunol* 15:138–146.

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

- Fortunato EA, McElroy AK, Sanchez I, Spector DH. 2000. Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* 8:111–119.

- Fortunato EA, Sanchez V, Yen JY, Spector DH. 2002. Infection of cells with human cytomegalovirus during S phase results in a blockade to immediate-early gene expression that can be overcome by inhibition of the proteasome. *J Virol* 76:5369–5379.
- Funderburg N, Luciano AA, Jiang W, Rodriguez B, Sieg SF, Lederman MM. 2008. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS ONE*, 3:e1915.
- Furukawa T, Hornberger E, Sakuma S, Plotkin SA. 1975. Demonstration of immunoglobulin G receptors induced by human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 2: 332–336.
- Gallina A, Pereivalle E, Simoneini L, Revello MG, Gerna G, Milanesi G. 1996. Human cytomegalovirus pp65 lower matrix phosphoprotein harbours two transplantable nuclear localization signals. *J Gen Virol* 77:1151-1157.
- Gallina A, Simoncini L, Garbelli S, Pedrali-Noy G, Lee KS, Erikson RL, Plachter B, Gerna G, Milanesi G. 1999. Polo-like kinase 1 as a target for human cytomegalovirus pp65 lower matrix protein. *J Virol* 73:1468-1478.
- Gao JL and Murphy PM. 1994. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor. *Biol Chem* 269:28539-28542.
- Gibson W. 1996. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 39:389-400.
- Giesen K, Radsak K, Bogner E. 2000. The potential terminase subunit of human cytomegalovirus, pUL56, is translocated into the nucleus by its own nuclear localization signal and interacts with importin alpha. *J Gen Virol* 81:2231-2244.
- Gilbert GL, Hayes K, Hudson IL, James J. 1989. Prevention of transfusion-acquired cytomegalovirus infection in infants by blood filtration to remove leucocytes. Neonatal cytomegalovirus infection study group. *Lancet* 1 (8649):1228-1231.
- Gnann JW, Ahlmen J, Svalander C, Olding L, Oldstone MB, Nelson JA. 1988. Inflammatory cells in transplanted kidneys are infected by human cytomegalovirus. *Am J Pathol* 132:239–248.

- Goodrum FD, Jordan CT, High K, Shenk T. 2002. Human cytomegalovirus gene expression during infection of primary hematopoietic progenitor cells: a model for latency. *PNAS* 99:16255–16260.
- Gravel SP and Servant MJ. 2005. Roles of an I κ B kinase-related pathway in human cytomegalovirus-infected vascular smooth muscle cells: a molecular link in pathogen-induced proatherosclerotic conditions. *J Biol Chem* 280:7477-7486.
- Halford WP and Schaffer PA. 2001. ICP0 is required for efficient reactivation of herpes simplex virus type 1 from neuronal latency. *J Virol* 75: 3240–3249.
- Harwani SC, Lurain NS, Zariffard MR, Spear GT. 2007. Differential inhibition of human cytomegalovirus (HCMV) by toll-like receptor ligands mediated by interferon-beta in human foreskin fibroblasts and cervical tissue. *Virol J* 4: 133-142.
- Hasan AU, Trinchieri G, Vlach J. 2005. Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts. *J Biol Chem* 280: 20620-20627.
- Hasan AU, Caux C, Perrot I, Doffin AC, Menetrier-Caux C, Trinchieri G, Tommasino M, Vlach J. 2007. Cell proliferation and survival induced by toll-like receptors is antagonized by type one IFNs. *PNAS* 104:8047-8052.
- Hendrix RMG, Wagenaar M, Slobbe RL, Bruggeman CA. 1997. Widespread presence of cytomegalovirus DNA in tissues of healthy trauma victims. *J Clin Pathol* 50:59–63.
- Hengel H, Brune W, Koszinowski UH. 1998. Immune evasion by cytomegalovirus-survival strategies of a highly adapted opportunist. *Trends Microbiol* 6:190-197.
- Hertel L and Mocarski ES. 2004. Global analysis of host cell gene expression late during cytomegalovirus infection reveals extensive dysregulation of cell cycle gene expression and induction of pseudomitosis independent of US28 function. *J Virol* 78:11988-12011.
- Hirsch AJ and Shenk T. 1999. Human cytomegalovirus inhibits transcription of the CC chemokine MCP-1 gene. *J Virol* 73:404-410.
- Ho M. 1991. *Cytomegalovirus Biology and Infection*. New York: Plenum Press.

- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G. 2002. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 168:4531-4537.
- Huang ES and Johnson RA. 2000. Human cytomegalovirus – no longer just a DNA virus. *Nat Med* 6: 863-864.
- Husebye H, Halaas O, Stenmark H, Tunheim G, Sandanger O, Bogen B, Brech A, Latz E, Espevik T. 2006. Endocytic pathways regulate toll-like receptor 4 signaling and link innate and adaptive immunity. *EMBO J* 25:683-692.
- Ioudinkova E, Arcangeletti MC, Rynditch A, De Conto F, Motta F, Covan S, Pinardi F, Razin SV, Chezzi C. 2006. Control of human cytomegalovirus gene expression by differential histone modifications during lytic and latent infection of a monocytic cell line. *Gene* 384:120-128.
- Irmiere A and Gibson W. 1983. Isolation and characterization of a noninfectious virionlike particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130:118-133.
- Isomura H, Stinski MF, Kudoh A, Nakayama S, Murata T, Sato Y, Iwahori S, Tsurumi T. 2008. A cis element between the TATA Box and the transcription start site of the major immediate-early promoter of human cytomegalovirus determines efficiency of viral replication. *J Virol* 82:849-858.
- Iversen AC, Steinkjer B, Nilsen N, Bohnhorst J, Moen SH, Vik R, Stephens P, Thomas DW, Benedict CA, Espevik T. 2009. A Proviral Role for CpG in Cytomegalovirus Infection. *J Immunol* 182:5672-5681.
- Iwamoto GK, Monick MM, Clark BD, Auron PE, Stinski MF, Hunninghake GW. 1990. Modulation of interleukin I beta gene expression by the immediate early genes of human cytomegalovirus. *J Clin Invest* 85: 1853-1857.

- Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. 1970. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227:168-170.

- Jault FM, Jault JM, Ruchti F, Fortunato EA, Clark C, Corbeil J, Richman DD, Spector DH. 1995. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol* 69:6697-6704.

- Jiang H, Wang PZ, Zhang Y, Xu Z, Sun L, Wang LM, Huang CX, Lian JQ, Jia ZS, Li ZD, Bai XF. 2008. Hantaan virus induces toll-like receptor 4 expression, leading to enhanced production of beta interferon, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha. *Virology* 380:52-59.

- Jones TR, Wiertz EJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL. 1996. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *PNAS* 93:11327-11333.

- Jung DY, Lee H, Jung BY, Ock J, Lee MS, Lee WH, Suk K. 2005. TLR4, but not TLR2, signals autoregulatory apoptosis of cultured microglia: a critical role of IFN-beta as a decision maker. *J Immunol* 174:6467-6476.

- Kaiser WJ and Offermann MK. 2005. Apoptosis induced by the toll-like receptors interacting protein homotypic interaction motif. *J Immunol* 174:4942-4952.

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

- Kawai T and Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-384.

- Kawamoto T, Li M, Kitazaki T, Lizawa Y, Kimura H. 2008. TAK-242 selectively suppresses toll-like receptor signaling mediated by the intracellular domain. *Eur J Pharmacol* 584:40-48.

- Keay S and Baldwin B. 1991. Anti-idiotypic antibodies that mimic gp86 of human cytomegalovirus inhibit viral fusion but not attachment. *J Virol* 65:5124-5128.

- Kinzler ER and Compton T. 2005. Characterization of human cytomegalovirus glycoprotein-induced cell-cell fusion. *J Virol* 79:7827-7837.
- Kline JN, Geist LJ, Monick MM, Stinski MF, Hunninghake GW. 1994. Regulation of expression of the IL-1 receptor antagonist (IL-1 ra) gene by products of the human cytomegalovirus immediate early genes. *J Immunol* 152:2351-2357.
- Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. 1994. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *PNAS* 91:11879-11883.
- Larsson S, Söderberg-Nauclér C, Wang FZ, Moller E. 1998. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion* 38: 271–278.
- Lehner R, Meyer H, Mach M. 1989. Identification and characterization of a human cytomegalovirus gene coding for a membrane protein that is conserved among human herpesviruses. *J Virol* 63:3792-800.
- Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffman JA. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:973-983.
- Li L, Nelson JA, Britt WJ. 1997. Glycoprotein H-related complexes of human cytomegalovirus: identification of a third protein in the gCIII complex. *J Virol* 71:3090-3097.
- Li M, Matsunaga N, Hazeki K, Nakamura K, Takashima K, Seya T, Hazeki O, Kitazaki T, Lizawa Y. 2006. A novel cyclohexene derivate, ethyl (6R)-6-N-(2-Chloro-4-fluorophenyl)sulfamoyl]cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), selectively inhibits Toll-like receptor 4-mediated cytokine production through suppression of intracellular signaling. *Mol Pharmacol* 69:1288-1295.
- Liu W, Zhao Y, Biegelke B. 2002. Analysis of human cytomegalovirus US3 gene products. *Virology* 301:32-42.

- Liu Z, Winkler M, Biegelke B. 2009. Human cytomegalovirus: host immune modulation by the viral US3 gene. *Int J Biochem Cell Biol.* 41:503-506.
- Liu B and Stinski MF. 1992. Human cytomegalovirus contains a tegument protein that enhances transcription from promoters with upstream ATF and AP-1 cis-acting elements. *J Virol* 66:4434-4444.
- Lu M and Shenk T. 1996. Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J Virol* 70:8850-8857.
- Lunardi C, Bason C, Corrocher R, Puccetti A. 2005. Induction of endothelial cell damage by HCMV molecular mimicry. *Trends Immunol.* 26:19-24.
- Lunardi C, Dolcino M, Peterlana D, Bason C, Navone R, Tamassia N, Beri R, Corrocher R, Puccetti A. 2006. Antibodies against human cytomegalovirus in the pathogenesis of systemic sclerosis: a gene array approach. *Plos* 3:94-108.
- Mach M, Kropff B, Kryzaniak M, Britt W. 2005. Complex formation by glycoproteins M and N of human cytomegalovirus: structural and functional aspects. *J Virol* 79:2160-2170.
- Malm G and Engman M. 2007. Congenital cytomegalovirus infections. *Semin Fetal Neonatal Med* 12:154-159.
- Malmgaard L, Melchjorsen J, Bowie AG, Mogensen SC, Paludan SR. 2004. Viral activation of macrophages through TLR-Dependent and -independent pathways. *J Immunol* 173: 6890-6898.
- McElroy AK, Dwarakanath RS, Spector DH. 2000. Dysregulation of cyclin E gene expression in human cytomegalovirus-infected cells requires viral early gene expression and is associated with changes in the Rb-related protein p130. *J Virol* 74:4192-4206.
- McVoy MA and Adler SP. 1994. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. *J Virol* 68:1040-1051.

- McVoy MA, Nixon DE, Adler SP, Mocarski ES. 1998. Sequences within the herpesvirus conserved pac1 and pac2 motifs are required for cleavage and packaging of the murine cytomegalovirus genome. *J Virol* 72:48-56.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Meier JL and Stinski MF. 1996. Regulation of human cytomegalovirus immediate-early gene expression. *Intervirology* 39: 331–342.
- Meier JL and Pruessner JA. 2000. The human cytomegalovirus major immediate-early distal enhancer region is required for efficient viral replication and immediate-early gene expression. *J Virol* 74:1602-1613.
- Mendelson M, Monard S, Sissons P, Sinclair J. 1996. Detection of endogenous human cytomegalovirus in CD34⁺ bone marrow progenitors. *J Gen Virol* 77:3099–3102.
- Michelson S. 2004. Consequences of human cytomegalovirus mimicry. *Hum Immunol* 65:465-475.
- Misaghi S, Sun ZY, Stern P, Gaudet R, Wagner G, Ploegh H. 2004. Structural and functional analysis of human cytomegalovirus US3 protein. *J Virol* 78:413-423.
- Mocarski ES, Kemble GW, Lyle JM, Greaves RF. 1996. A deletion mutant in the human cytomegalovirus gene encoding IE1(491aa) is replication defective due to a failure in autoregulation. *PNAS* 93:11321-11326.
- Mocarski ES and Courcelle CT. 2001. Cytomegalovirus and their replication. In: *Fields Virology*, Knipe D and Howley P Editors. Lippincott-Raven, Philadelphia 2629–2673.
- Mocarski ES. 2002 (a). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol* 10:332-339.
- Mocarski ES. 2002 (b). Virus self-improvement through inflammation: no pain, no gain. *PNAS* 99:3362-3364.

- Mocarski ES, Shenk T, Pass RF. 2007. Cytomegalovirus. In: Fields Virology, 5th ed. Knipe D and Howley P (eds), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 2701-72.
- Mohamed MR and McFadden G. 2009. NFkB inhibitors: strategies from poxviruses. Cell Cycle 8:3125-3132.
- Muller S and Dejean A. 1999. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. J Virol 73:5137-5143.
- Muranyi W, Haas J, Wagner M, Krohne G, Koszinowski UH. 2002. Cytomegalovirus recruitment of cellular kinases to dissolve the nuclear lamina. Science 297:854-857.
- Nguyen NL, Loveland AN, Gibson W. 2008. Nuclear localization sequences in cytomegalovirus capsid assembly proteins (UL80 proteins) are required for virus production: inactivating NLS1, NLS2, or both affects replication to strikingly different extents. J Virol 82:5381-5389.
- Nicholson IP, Sutherland JS, Chaudry TN, Blewett EL, Barry PA, Nicholl MJ, Preston CM. 2009. Properties of virion transactivator proteins encoded by primate cytomegaloviruses. Virol J 27:65.
- Nomura N, Myajima N, Sazuka T, Tanaka A, Kawarabayasi Y, Sato S, Nagase T, Seki N, Ishikawa K, Tabata S. 1994. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. Part I. The coding sequences of 40 new genes deduced by analysis of randomly sampled cDNA clones from human immature myeloid cell line KG-1. DNA Res 1:27-35.
- Palazzo M, Gariboldi S, Zanobbio L, Dusio GF, Selleri S, Bedoni M, Balsari A, Rumio C. 2008. Cross-talk among Toll-like receptors and their ligands. Int Immunol 20: 709-718.
- Pass RF, Hutto C, Ricks R, Cloud GA. 1986. Increased rate of cytomegalovirus infection among parents of children attending day-care centers. N Engl J Med 314:1414-1418.
- Pass RF. 2001. Cytomegalovirus. In: Fields Virology, 4th ed. Knipe D and Howley P (eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2575-2705.

- Pepperl S, Münster J, Mach M, Harris JR, Plachter B. 2000. Dense bodies of human cytomegalovirus induce both humoral and cellular immune responses in the absence of viral gene expression. *J Virol* 74:6132-6146.
- Petrik DT, Schmitt KP, Stinski MF. 2006. Inhibition of cellular DNA synthesis by the human cytomegalovirus IE86 protein is necessary for efficient virus replication. *J Virol* 80:3872-3883.
- Plachter B, Sinzger C, Jahn G. 1996. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* 46:195– 261.
- Prichard MN, Jairath S, Penfold ME, Jeor S, Bohlman MC, Pari GS. 1998. Identification of persistent RNA-DNA hybrid structures within the origin of replication of human cytomegalovirus. *J Virol* 72:6997-7004.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118:229–241.
- Randolph-Habecker J, Iwata M, Geballe AP, Jarrachian S, Torok-Storb B. 2002. Interleukin 1-mediated inhibition of cytomegalovirus replication is due to increased IFN-beta production. *J Interferon Cytokine Res* 22:765-772.
- Rasschaert J, Ladriere L, Urbain M, Dogusan Z, Katabua B, Sato S, Akira S, Gysemans C, Mathieu C, Eizirik DL. 2005. Toll-like receptor 3 and STAT-1 contribute to double-stranded RNA+ interferon-gamma-induced apoptosis in primary pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 280:33984–33991.
- Re F and Strominger JL. 2004. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol* 173:7548-7555.
- Remer KA, Brcic M, Sauter KS, Jungi TW. 2006. Human monocytoïd cells as a model to study toll-like receptor-mediated activation. *J Immunol Methods* 313:1–10.

- Revello MG, Zavattoni M, Saracini A, Percivalle E, Simoncini L, Gerna G. 1998. Human cytomegalovirus in blood of immunocompetent persons during primary infection: prognostic implications for pregnancy. *J Infect Dis* 177:1170-1175.
- Robson L and Gibson W. 1989. Primate cytomegalovirus assembly protein: genome location and nucleotide sequence. *J Virol* 63:669-676.
- Romanowski MJ, Garrido-Guerrero E, Shenk T. 1997. pIRS1 and pTRS1 are present in human cytomegalovirus virions. *J Virol* 71:5703-5705.
- Salvant BS, Fortunato EA, Spector DH. 1998. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J Virol* 72:3729-3741.
- Sambucetti LC, Cherrington JM, Wilkinson GWG, Mocarski ES. 1989. NF- κ B activation of the cytomegalovirus enhancer is mediated by a viral transactivator and by T cell stimulation. *EMBO J* 8:4251-4258.
- Sanchez V and Spector DH. 2002. CMV makes a timely exit. *Science* 297:778-779.
- Sanchez V and Spector DH. 2008. Subversion of cell cycle regulatory pathways. *Curr Top Microbiol Immunol* 325:243-262.
- Santoro MG, Rossi A, Amici C. 2003. NF- κ B and virus infection: who controls whom. *EMBO J* 22:2552-2560.
- Sarov I and Abady I. 1975. The morphogenesis of human cytomegalovirus. Isolation and polypeptide characterization of cytomegalovirions and dense bodies. *Virology* 66:464-473.
- Shane Smith M, Bentz GL, Alexander JS, Yurochko AD. 2004. Human cytomegalovirus induces monocyte for dissemination and persistence differentiation and migration as a strategy. *J Virol* 78: 4444-4453.
- Schierling K, Buser C, Mertens T, Winkler M. 2005. Human cytomegalovirus tegument protein ppUL35 is important for viral replication and particle formation. *J Virol* 79:3084-3096.

- Schrier RD, Nelson JA, Oldstone MB. 1985. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science* 230:1048–1051.

- Sinclair AJ. 2003. bZIP proteins of human gammaherpesviruses. *J Gen Virol* 84:1941–1949.

- Sinclair J, Baillie J, Bryant L, Caswell R. 2000. Human cytomegalovirus mediates cell cycle progression through G1 into early S phase in terminally differentiated cells. *J Gen Virol* 81:1553-1565.

- Sinclair J and Sisson P. 2006. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 87:1763-1779.

- Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. 1995. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 76:741-750.

- Sinzger C and Jahn G. 1996. Human cytomegalovirus cell tropism and pathogenesis. *Intervirology* 39: 302-319.

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

- Söderberg-Nauclér C. 2012. Autoimmunity induced by human cytomegalovirus in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 14:101-102.

- Speck SH, Chatila T, Flemington E. 1997. Reactivation of Epstein-Barr virus: regulation and function of the BZLF1 gene. *Trends Microbiol* 5: 399–405.

- Spector DH. 1996. Activation and regulation of human cytomegalovirus early genes. *Intervirology* 39:361-377.

- Spencer JV, Lockridge KM, Barry PA, Lin G, Tsang M, Penfold ME, Schall TJ. 2002. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 76:1285-1292.

- Stanier P, Kitchen AD, Taylor DL, Tynms AS. 1992. Detection of human cytomegalovirus in peripheral mononuclear cells and urine samples using PCR. *Mol Cell Probes* 6: 51–58.
- Stasiak PC and Mocarski ES. 1992. Transactivation of the cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the alpha gene product TRS1 in addition to IE1 and IE2. *J Virol* 66:1050-1058.
- Stein D, Roth S, Vogelsang E, Nusslein-Volhard C. 1991. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell* 65:725-735.
- Stenberg RM. 1996. The human cytomegalovirus major immediate-early gene. *Intervirology* 39:343-349.
- Stern JL, Cao JZ, Xu J, Mocarski ES, Slobedman B. 2008. Repression of human cytomegalovirus major immediate early gene expression by the cellular transcription factor CCAAT displacement protein. *Virol* 378:214-225.
- Stinski MF and Petrik DT. 2008. Functional roles of the human cytomegalovirus essential IE86 protein. *Curr Top Microbiol Immunol* 325:133-152.
- Story CM, Furman MH, Ploegh HL. 1999. The cytosolic tail of class I MHC heavy chain is required for its dislocation by the human cytomegalovirus US2 and US11 gene products. *PNAS* 96:8516-8521.
- Sun B, Harrowe G, Reinhard C, Yoshihara C, Chu K, Zhuo S. 2001. Modulation of human cytomegalovirus immediate-early gene enhancer by mitogen-activated protein kinase kinase kinase-1. *J Cell Biochem* 83:563-573.
- Taganov K, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. 2006. NFkB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *PNAS* 103:12481-12486.
- Takashiba S, Van Dyke TE, Amar S, Murayama Y, Soskolna AW, Shapira L. 1999. Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kB. *Infect Immun* 67:5573-5578.

- Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JA, Imler JL. 2000. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in drosophila. PNAS 97:10520-10525.
- Taylor RT and Bresnahan WA. 2005. Human cytomegalovirus immediate-early 2 gene expression blocks virus-induced beta interferon production. J Virol 79:3873-3877.
- Taylor RT and Bresnahan WA. 2006. Human cytomegalovirus IE86 attenuates virus and tumor necrosis factor alpha-induced NFkappaB-dependent gene expression. J Virol 80:10763-10771.
- Taylor-Wiedeman J, Sissons JGP, Borysiewicz LK, Sinclair JH. 1991. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. J Gen Virol 72:2059–2064.
- Taylor-Wiedeman J, Sissons P, Sinclair J. 1994. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. J Virol 68:1597–1604.
- Terhune SS, Schröer J, Shenk T. 2004. RNAs are packaged into human cytomegalovirus virions in proportion to their intracellular concentration. J Virol 78:10390-10398.
- Theiler RN and Compton T. 2001. Characterization of the signal peptide processing and membrane association of human cytomegalovirus glycoprotein O. J Biol Chem 276:39226-39231.
- Thorley-Lawson DA. 2001. Epstein-Barr virus:exploiting the immune system. Nat Rev Immunol 1:75-82.
- Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line(THP-1). Int J Cancer 26:171-176.
- Ugrinova I, Monier K, Ivaldi C, Thiy M, Storck S, Mongelard F, Bouvet P. 2007. Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication. BMC Mol Biol 8:66-82.

- Van der Kleij D, van den Biggelaar AHJ, Kruize YCM, Retra K, Fillie Y, Schmitz M, Kremsner PG, Tielens AGM, Yazdanbakhsh M. 2004. Responses to toll-like receptor ligands in children living in areas where schistosome infections are endemic. *J Infect Dis* 189: 1044-1051.

- Varani S and Landini MP. 2011. Cytomegalovirus-induced immunopathology and its clinical consequences. *Herpesviridae* 2:6-20

- Voit R, Hoffmann M, Grummt I. 1999. Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *The EMBO J* 18:1891-1899.

- Welch AR, Woods AS, McNally LM, Cotter RJ, Gibson W. 1991. A herpesvirus maturational proteinase, assemblin: identification of its gene, putative active site domain, and cleavage site. *PNAS* 88:10792-10796.

- West J and Damania B. 2008. Upregulation of the TLR3 pathway by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus during primary infection. *J Virol* 82:5440-5449.

- White EA and Spector DH. 2005. Exon 3 of the human cytomegalovirus major immediate-early region is required for efficient viral gene expression and for cellular cyclin modulation. *J Virol* 79:7438-7452.

- Wiertz E, Hill A, Tortorella D, Ploegh H. 1997. Cytomegaloviruses use multiple mechanisms to elude the host immune response. *Immunol Lett.* 57: 213-216.

- Winkler M, Schmolke S, Plachter B, Stamminger T. 1995. The pUL69 protein of human cytomegalovirus (HCMV), a homologue of the herpes simplex virus ICP27, is contained within the tegument of virions and activates the major immediate early enhancer of HCMV in synergy with the tegument protein pp71 (ppUL82). *Scand J Infect Dis Suppl* 99:8-9.

- Xu Y, Cei SA, Rodriguez Huete A, Colletti KS, Pari GS. 2004. Human cytomegalovirus DNA replication requires transcriptional activation via an IE2- and UL84-responsive bidirectional promoter element within oriLyt. *J Virol* 78:11664-11677.

- Zanghellini F, Boppana SB, Emery VC, Griffiths PD, Pass RF. 1999. Asymptomatic primary cytomegalovirus infection: virologic and immunologic features. *J Infect Dis* 180: 702-707.
- Zarembek KA and Godowski PJ. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNA in leukocytes in response to microbes, their production, and cytokines. *J Immunol* 168:554-561.
- Zhang Z and Schliesser HJ. 2006. Mammalian toll-like receptors: from endogenous ligands to tissue regeneration. *Cell Mol Life Sci* 63:2901-2907.
- Zhu H, Shen Y, Shenk T. 1995. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* 69:7960-7970.
- Zhu H, Cong JP, Mamtora G, Gingeras T, Shenk T. 1998. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *PNAS* 95:14470-14475.