



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

DOTTORATO DI RICERCA IN
"SCIENZE CHIRURGICHE E MICROBIOLOGIA APPLICATA"

CICLO XXXII

POSSIBILE RUOLO REGOLATORIO DELLA PROTEINA CITOCHERATINA 8 DEL SISTEMA DEI FILAMENTI INTERMEDI DEL CITOSCHELETRO SULL'INFEZIONE SPERIMENTALE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33 (H1N1) IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Francesco Ceccarelli

Tutore:
Gent.ma Dott.ssa Flora De Conto

Dottoranda: Dott.ssa Francesca Conversano

Anni 2016/2018

INDICE

RIASSUNTO	pag. 3
ABSTRACT	pag. 6
INTRODUZIONE	pag. 9
IL VIRUS INFLUENZA	pag. 9
- CLASSIFICAZIONE	pag. 10
- MORFOLOGIA E STRUTTURA	pag. 13
- CICLO REPLICATIVO	pag. 18
- CARATTERISTICHE BIOLOGICHE	pag. 21
- INTERAZIONE VIRUS-CELLULA OSPITE	pag. 24
- TRASMISSIONE	pag. 27
- EPIDEMIOLOGIA	pag. 28
- PREVENZIONE, CONTROLLO E TERAPIA DELL'INFLUENZA	pag. 30
- DIAGNOSI DI LABORATORIO DELL'INFEZIONE DA VIRUS INFLUENZA	pag. 32
IL CITOSCHELETRO CELLULARE	pag. 34
- I FILAMENTI INTERMEDI	pag. 36
- MODIFICAZIONI POST-TRADUZIONALI DEI FILAMENTI INTERMEDI	pag. 40
- IMPLICAZIONI DELLA PROTEINA CITOCHERATINA 8 IN ALCUNE PATOLOGIE E INFEZIONI VIRALI	pag. 43
- POSSIBILE RUOLO REGOLATORIO DELLA PROTEINA "RAS HOMOLOG ENRICHED IN BRAIN LIKE-1" (RHEBL1) SUI FILAMENTI INTERMEDI	pag. 44
SCOPO DELLA TESI	pag. 48
MATERIALI E METODI	pag. 50
- COLTURE CELLULARI	pag. 50
- VIRUS	pag. 50
- ANTICORPI	pag. 50
- INFEZIONE VIRALE DI MONOSTRATI CELLULARI	pag. 51
- TRATTAMENTO CON SOSTANZE IN GRADO DI MODIFICARE L'ASSETTO E LA FOSFORILAZIONE DEI FILAMENTI INTERMEDI	pag. 52
- IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA	pag. 52
- ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA NUCLEOPROTEINA VIRALE	pag. 53
- SILENZIAMENTO DEL GENE RHEBL1 CON RNA INTERFERENTI	pag. 53
- VALUTAZIONE DELL'INFETTIVITÀ VIRALE MEDIANTE TITOLAZIONE DELLA DOSE INFETTANTE IL 50% DELLE COLTURE DI SAGGIO (TCID ₅₀)	pag. 54
- ELETTROFORESI DI PROTEINE SU GEL DI POLIACRILAMMIDE ("SDS-PAGE")	pag. 55
- WESTERN BLOTTING	pag. 56
- MICROSCOPIA CONFOCALE	pag. 57
- ALLESTIMENTO DI SEDIMENTI CELLULARI E IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA	pag. 58
- ANALISI STATISTICA	pag. 59

RISULTATI	pag. 60
1. EFFETTI DELLA DEPOLIMERIZZAZIONE DEI FILAMENTI INTERMEDI SULL'INFEZIONE SPERIMENTALE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33 (H1N1) IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO	pag. 60
- 1.1. EFFETTI INDOTTI DAL TRATTAMENTO CON ACRILAMMIDE SUI FILAMENTI INTERMEDI	pag. 60
- 1.2. EFFETTI INDOTTI DAL TRATTAMENTO CON ACRILAMMIDE SULL'INFEZIONE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33	pag. 62
2. ANALISI DELLA FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8 IN CORSO DI INFEZIONE SPERIMENTALE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33 IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO	pag. 64
- 2.1. ANALISI DEL LIVELLO DI ESPRESSIONE E FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8	pag. 64
- 2.2. EFFETTI DELLA REPLICAZIONE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33 SULL'ESPRESSIONE E FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8	pag. 65
3. EFFETTI DELLA MODULAZIONE DELLA FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8 INDOTTA DA SOSTANZE CHIMICHE SULL'INFEZIONE SPERIMENTALE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33 IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO	pag. 67
- 3.1. EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON ACIDO OKADAICO E CON 12-O-TETRADECANOILFORBOLO-13-ACETATO (TPA) SULL'ASSETTO E SULLA FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8	pag. 67
- 3.2. EFFETTI DEL TRATTAMENTO CON ACIDO OKADAICO E CON TPA SULL'INFEZIONE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33	pag. 69
- 3.3. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DI CITOCHERATINA 8 E DELLA SUA COMPONENTE FOSFORILATA IN CONDIZIONI FISIOLOGICHE E IN CORSO DI INFEZIONE CON IL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33	pag. 71
4. ANALISI DELLA LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DELLA NUCLEOPROTEINA VIRALE A CONFRONTO CON CITOCHERATINA 8 E CITOCHERATINA 8 FOSFORILATA IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO IN CORSO DI INFEZIONE SPERIMENTALE CON IL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33	pag. 73
- 4.1. ANALISI DELLA LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DI CITOCHERATINA 8 E CITOCHERATINA 8 FOSFORILATA	pag. 73
- 4.2. ANALISI DELLA LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DELLA NUCLEOPROTEINA VIRALE A CONFRONTO CON CITOCHERATINA 8 E CITOCHERATINA 8 FOSFORILATA IN CORSO DI INFEZIONE CON IL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33	pag. 75
5. EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DEL GENE RHEBL1 SULL'INFEZIONE SPERIMENTALE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33 IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO	pag. 79
- 5.1. ANALISI DELL'ESPRESSIONE DELLA PROTEINA RHEBL1	pag. 79
- 5.2. ANALISI DEL SILENZIAMENTO DEL GENE RHEBL1	pag. 80
- 5.3. EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DEL GENE RHEBL1 SULL'INFEZIONE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33	pag. 81
- 5.4. ANALISI DEGLI EFFETTI INDOTTI DAL SILENZIAMENTO DEL GENE RHEBL1 SULLA FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8	pag. 83
6. ANALISI DELLA FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8 IN CELLULE DELL'EPITELIO RESPIRATORIO UMANO	pag. 85
- 6.1. EFFETTI DELL'INFEZIONE DEL VIRUS INFLUENZA A E DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCIZIALE SULLA FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8 IN CELLULE ESFOLIATE DELL'EPITELIO RESPIRATORIO UMANO	pag. 85
DISCUSSIONE	pag. 87
BIBLIOGRAFIA	pag. 99

RIASSUNTO

L'obiettivo principale di questa tesi è stato quello di sondare l'implicazione del sistema dei filamenti intermedi del citoscheletro cellulare nello svolgimento del ciclo replicativo del virus influenza umano A/NWS/33 (H1N1) in due modelli cellulari di mammifero a differente grado di permissività, al fine di individuare possibili fattori cellulari di restrizione all'infezione. Nello specifico, è stato esaminato il ruolo della componente citocheratina 8 dei filamenti intermedi e di una sua modificazione post-traduzionale, consistente nella fosforilazione, in corso di infezione sperimentale con il virus NWS/33; questa è stata condotta, a confronto, nelle cellule LLC-MK2 (rene di scimmia, modello semi-permissivo) e nelle cellule A549 (polmone umano, modello permissivo).

I risultati ottenuti in seguito alla depolimerizzazione dei filamenti intermedi con la sostanza acrilammide hanno evidenziato la comparsa di modificazioni strutturali più evidenti nelle cellule LLC-MK2, dove peraltro citocheratina 8 ha un livello di espressione e di organizzazione in filamenti più esiguo, rispetto alle cellule A549. Sebbene la depolimerizzazione dei filamenti intermedi abbia esercitato effetti positivi sull'espressione della nucleoproteina (NP) del virus NWS/33 in entrambi i modelli, non sono stati ottenuti esiti analoghi per quanto riguarda i titoli infettanti della progenie virale, che sono risultati di entità lievemente inferiore. Tali osservazioni depongono per il fatto che un assetto altamente dinamico dei filamenti intermedi, quale quello indotto da acrilammide, si rivela congeniale allo svolgimento delle attività biosintetiche virali, ma, verosimilmente, ostacola l'emergenza della progenie virale, interferendo con le fasi tardive dell'infezione.

L'analisi degli effetti indotti dal virus NWS/33 nei due modelli cellulari allo studio ha rivelato che citocheratina 8 viene modificata solo in fasi tardive dell'infezione. Inoltre, il

virus NWS/33 è in grado di aumentare la fosforilazione di citocheratina 8 solo nelle cellule A549, a partire da fasi precoci dell'infezione. Tali dati evidenziano l'univocità dell'interazione virus-cellula ospite, in quanto solo nel modello permissivo il virus NWS/33 è in grado di modificare precocemente l'assetto di citocheratina 8, sfruttando l'attivazione della fosforilazione, che contribuisce ad aumentare la dinamicità di tale componente del citoscheletro. Tali risultati sono stati successivamente suffragati dalle osservazioni desunte dall'analisi in microscopia confocale, che ha evidenziato la co-localizzazione della NP virale con citocheratina 8 e la sua componente fosforilata nel corso di fasi precoci dell'infezione nelle cellule A549, ma non nelle cellule LLC-MK2, dove è stata evidenziata solo una debole co-localizzazione con citocheratina 8.

Il trattamento dei modelli cellulari allo studio con sostanze chimiche (*i.e.* acido okadaico e 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato) in grado di attivare la fosforilazione ha indotto delle modificazioni strutturali di citocheratina 8 più evidenti nelle cellule A549. Peraltro, l'aumento della fosforilazione di citocheratina 8 indotto da tali sostanze ha favorito l'espletamento del ciclo replicativo virale nelle cellule A549, al contrario di quanto osservato nelle LLC-MK2.

Allo scopo di sondare ulteriormente le implicazioni della fosforilazione di citocheratina 8 sul ciclo replicativo virale, è stato impiegato un approccio molecolare che prevedeva il silenziamento del gene codificante per la proteina regolatoria "Ras homolog enriched in brain like-1" (RhebL1). I risultati ottenuti hanno mostrato un aumento della fosforilazione di citocheratina 8 in entrambi i modelli, oltre a ripercussioni positive sull'esito dell'infezione virale nelle cellule A549.

Al fine di estendere le osservazioni ottenute anche alle cellule dell'epitelio respiratorio umano, che rappresentano il primo bersaglio dell'infezione del virus influenza, sono stati esaminati dei campioni dell'apparato respiratorio di pazienti pediatrici. L'analisi ha

permesso di evidenziare che nelle cellule positive per il virus influenza A, ma non per il virus respiratorio sinciziale, si assiste a un aumento della fosforilazione di citocheratina 8. Tali risultati attestano che il virus influenza A impiega anche “*in vivo*” un meccanismo di attivazione della fosforilazione verosimilmente analogo a quello individuato nel modello permissivo A549 e strettamente virus-dipendente.

I risultati ottenuti consentono, innanzitutto, di implementare le scarse informazioni finora disponibili in letteratura relativamente al ruolo dei filamenti intermedi in corso di infezione virale. Nello specifico, è stato appurato che in modelli cellulari permissivi (*i.e.* A549 e cellule dell’epitelio respiratorio) il virus è in grado di cooptare, a proprio vantaggio, citocheratina 8 e di modularne la fosforilazione, al fine di potenziare ulteriormente il suo ciclo replicativo. Al contrario, nel modello semi-permissivo LLC-MK2, dove precedenti osservazioni sperimentali ottenute dal gruppo di ricerca avevano consentito di evidenziare altri fattori di restrizione correlati al citoscheletro, la fosforilazione di citocheratina 8 non sembra essere funzionale al virus per aumentare la sua efficienza replicativa.

Nell’insieme, i dati ottenuti evidenziano la complessità dell’interazione che si esprime tra virus e filamenti intermedi del citoscheletro cellulare, i cui meccanismi di regolazione dovranno essere oggetto di ulteriori studi e approfondimenti.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the involvement of cytoskeletal intermediate filaments in the human influenza A/NWS/33 virus (H1N1) infection using two mammalian cell models, in order to find out new cellular restriction factors. Specifically, the role of cytokeratin 8 and its post-translational modification, the phosphorylated state, were examined during NWS/33 virus infection in semi-permissive rhesus monkey-kidney (LLC-MK2) and permissive human lung (A549) epithelial cells.

In order to analyse the effects induced by intermediate filaments depolymerisation, cell monolayers were treated with acrylamide. Major morphological changes were observed in LLC-MK2 cells, where cytokeratin 8 was poorly expressed and organized in filaments, when compared to A549 cells. Although acrylamide increased the expression of NWS/33 virus nucleoprotein (NP) in both models, the corresponding viral yield slightly diminished. These data suggest that NWS/33 virus might take advantage of a highly dynamic state of intermediate filaments during the early stages of infection, but not during the latest stages.

The effects induced by NWS/33 virus infection evidenced that the cytokeratin 8 organization is subverted during the latest stages of the infection in both models. Furthermore, NWS/33 virus was able to promote cytokeratin 8 phosphorylation only in A549 cells at early phases of infection. These results demonstrate that there is a very exclusive “relationship” occurring between influenza virus and the host cell. In particular, NWS/33 virus is able to take advantages of the modification of the cytokeratin 8 organization during the early stages of infection in the A549 model.

In addition, the confocal microscopy analysis of the early stages of infection showed the co-localization of viral NP with cytokeratin 8, and its phosphorylated component in A549

cells, but not in LLC-MK2 cells, where only a weak co-localization of NP with cytokeratin 8 was observed.

The treatment with two chemical activators of the phosphorylation (*i.e.* okadaic acid and 12-O-tetradecanoylforbol-13-acetate) induced major structural changes of cytokeratin 8 in A549 cells. Additionally, these treatments increased cytokeratin 8 phosphorylation, favoring the NWS/33 virus replicative efficiency only in A549 cells.

Subsequently, a molecular approach was applied. The silencing of the gene "Ras homolog enriched in brain like-1" (RhebL1) involved in the phosphorylation pathway showed an increased phosphorylation of cytokeratin 8 in both models, and positive effects on the outcome of NWS/33 virus infection only in A549 cells.

Consistent with these findings, in epithelial respiratory cells from paediatric patients with acute respiratory disease it was assessed that cytokeratin 8 phosphorylation was increased by influenza A virus, but not by respiratory syncytial virus infection. Therefore, influenza A virus is able to hijack the phosphorylation mechanism also "*in vivo*", which seems to be virus-dependent.

The obtained results implemented the available information about the role of intermediate filaments during viral infection. In particular, we showed that in permissive cells (*i.e.* A549 and respiratory epithelial cells) influenza virus is able to co-opt cytokeratin 8 to enhance its own replication. On the contrary, in semi-permissive LLC-MK2 cells, where other cytoskeletal restriction factors were previously assessed, the NWS/33 strain does not take advantage of cytokeratin 8 phosphorylation for its replication.

In conclusion, these data highlight the complex interplay occurring between influenza virus and intermediate filaments, whose regulatory mechanisms require further in-depth studies.

INTRODUZIONE

IL VIRUS INFLUENZA

La famiglia *Orthomyxoviridae*, nella quale è classificato il virus influenza, comprende numerosi virus responsabili di infezioni caratterizzate da un diverso grado di morbilità e di mortalità ¹.

La malattia causata dal virus influenza è una malattia infettiva acuta a carattere epidemico o pandemico e deve la denominazione di “influenza” alla credenza che fosse dovuta a un influsso climatico maligno, conseguente a una sfavorevole congiunzione astrale. Tale malattia era già nota nell'antichità, come emerge dalle testimonianze del 412 a.C. di Ippocrate e Livio ^{2,3}.

L'influenza è caratterizzata da uno spettro di sintomi altamente variabile, che spazia da lievi affezioni respiratorie, quali riniti o faringiti in presenza di tosse e febbre, a polmoniti dall'esito infausto. La comparsa e la gravità di tali sintomi variano a seconda delle caratteristiche dell'ospite e del virus influenza ⁴⁻⁷.

I sintomi dell'influenza compaiono dopo un periodo di incubazione di circa 1-2 giorni e hanno un'espressione sistemica, caratterizzata da febbre, brividi, mal di testa, mialgia, malessere e anoressia, oltre che prettamente respiratoria, con comparsa di tosse non produttiva, secrezioni nasali e faringite ⁴⁻⁷. Inoltre, nei soggetti con infezione in atto, possono manifestarsi dei sintomi a livello oculare, come, ad esempio, congiuntivite, lacrimazione e dolore in seguito a movimento degli occhi ⁴.

I sintomi dell'influenza possono differire nei bambini, rispetto agli adulti ^{4,6}. Infatti, i bambini con influenza generalmente presentano delle temperature corporee più elevate

di quelle degli adulti e possono anche più frequentemente manifestare sintomi gastrointestinali ^{4,6,7}.

L'eliminazione del virus influenza da soggetti infettati inizia generalmente durante il periodo di incubazione, con un picco nei primi giorni di malessere, e diminuisce progressivamente, correlando con la gravità dei sintomi ⁸. Nei bambini e nei pazienti immunocompromessi l'eliminazione del virus influenza ha una durata maggiore, rispetto agli adulti immunocompetenti ^{9,10}. Scarse conoscenze si hanno, invece, riguardo l'eliminazione del virus influenza nelle infezioni asintomatiche ¹¹.

La guarigione dalla malattia è, in genere, rapida, ma alcuni pazienti possono presentare astenia persistente per diverse settimane ¹².

Un importante ruolo negli studi rivolti all'individuazione dell'agente eziologico dell'influenza è stato svolto dal medico londinese Henry Franklin Parsons, che individuò la modalità di trasmissione interumana dell'influenza ¹³.

L'isolamento del virus influenza avvenne nel 1933, impiegando dei furetti infettati sperimentalmente per via intranasale con un aspirato naso-faringeo prelevato da un soggetto con influenza ¹⁴. Negli anni successivi ci fu un ulteriore sviluppo degli studi sul virus influenza, che erano, in particolar modo, rivolti alla determinazione dei diversi sottotipi e alla messa a punto di vaccini potenzialmente destinati all'uomo.

Classificazione

I virus influenzali appartengono alla famiglia *Orthomyxoviridae* e sono classificati in quattro generi: *Alphainfluenzavirus* (specie Influenza A virus), *Betainfluenzavirus* (specie Influenza B virus), *Gammainfluenzavirus* (specie Influenza C virus) e *Deltainfluenzavirus* (specie Influenza D virus) ¹⁵.

Alla famiglia dei virus influenzali appartengono anche i generi *Isavirus* (specie *Salmon isavirus*), *Quaranjavirus* (specie *Johnston Atoll quaranjavirus* e *Quaranfil quaranjavirus*) e *Thogotovirus* (specie *Dhori thogotovirus* e *Thogoto thogotovirus*).

A differenza dei virus influenzali di tipo A e B, che infettano principalmente l'uomo e causano epidemie stagionali, le infezioni sostenute dai virus influenzali di tipo C sono meno frequenti e generalmente associate a una malattia respiratoria lieve ¹⁶, che, tuttavia, sembrerebbe manifestarsi in forma più grave nei bambini ¹⁷. Infine, è stato osservato che i virus influenzali di tipo D, di più recente scoperta, non infettano l'uomo ¹⁸.

I virus influenzali A, B e C sono distinti, innanzitutto, sulla base delle caratteristiche antigeniche della nucleoproteina virale (NP) e della proteina di matrice (M), che sono specifiche per ciascuno dei suddetti tipi e rappresentano dei rilevanti fattori di virulenza. Inoltre, la classificazione dei virus influenzali in diversi generi trae le premesse dallo spettro d'ospite e dalla severità dei sintomi causati, come anche da aspetti epidemiologici ¹⁹.

I virus influenzali di tipo A possono essere, a loro volta, differenziati in sottotipi, sulla base della combinazione delle glicoproteine di superficie emoagglutinina (H) e neuraminidasi (N), delle quali sono state finora identificate, rispettivamente, diciotto e undici varianti ²⁰ (Tabella A). Solo tre molecole di emoagglutinina (H1, H2, H3) e due di neuraminidasi (N1, N2) sono state finora identificate nei virus influenzali di tipo A che infettano l'uomo ²¹. Gli ulteriori sottotipi virali noti sono stati isolati da uccelli acquatici, in particolare da specie migratorie, che rappresentano il serbatoio naturale del virus influenza (Figura A).

Sottotipi H	Sottotipi N	Uomo	Suino	Cavallo	Pollame domestico	Uccelli acquatici	Mammiferi marini (Foca/Balena)	Pipistrello
H1	N1	H1/N1	H1/N1		H1/N1	H1/N1	H1	
H2	N2	H2/N2	H2/N2		H2/N2	H2/N2	N2	
H3	N3	H3/N3	H3	H3	H3/N3	H3/N3	H3/N3	
H4	N4	N4	H4		H4/N4	H4/N4	H4	
H5	N5	H5	H5		H5/N5	H5/N5	N5	
H6	N6	H6/N6	H6/N6		H6/N6	H6/N6		
H7	N7	H7/N7		H7/N7	H7/N7	H7/N7	H7/N7	
H8	N8	N8		N8	H8/N8	H8/N8		
H9	N9	H9/N9	H9		H9/N9	H9/N9	N9	
H10	N10	H10			H10	H10	H10	N10
H11	N11				H11	H11		N11
H12					H12	H12		
H13					H13	H13	H13	
H14					H14	H14		
H15					H15	H15		
H16					H16	H16		
H17								H17
H18								H18

Tabella A. Specificità d'ospite dei diversi sottotipi di emoagglutinina (H) e neuraminidasi (N) del virus influenza A. Tabella modificata da: Mostafa *et al.* Viruses. 2018;10(9).pii:E497.

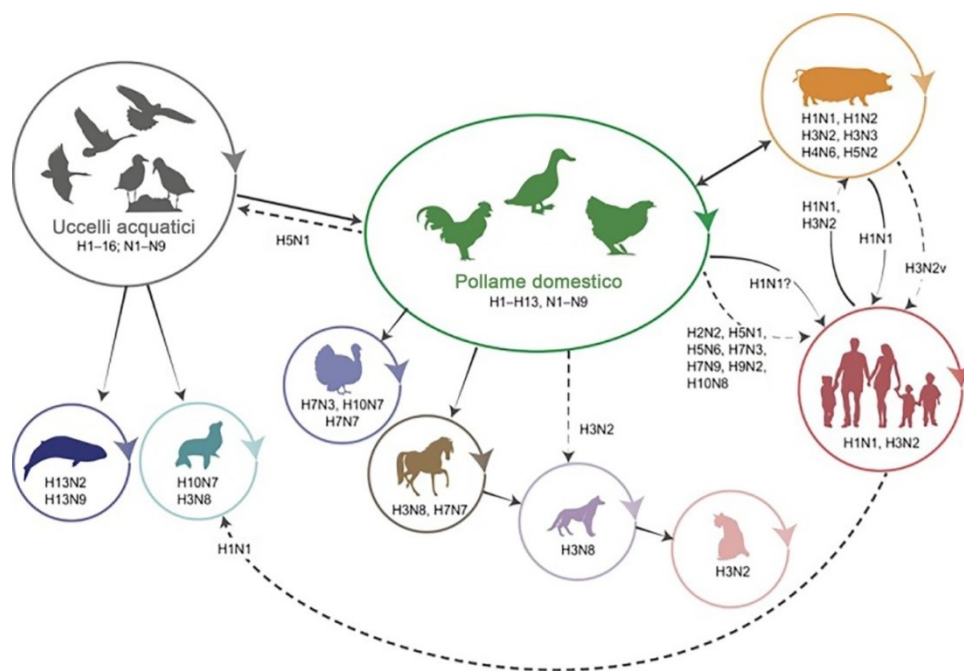


Figura A. Schema rappresentativo della trasmissione interspecie del virus influenza A e dei relativi sottotipi. Immagine modificata da: Joseph *et al.* Influenza Other Respir Viruses. 2017;11(1):74-84.

Ogni ceppo di virus influenza viene identificato da un crittogramma, che indica nell'ordine: specie/specie ospite dalla quale il ceppo è stato isolato (nel caso di isolati virali non umani)/luogo d'isolamento/numero dell'isolato/anno di isolamento. Nel caso

dei virus influenzali di tipo A, viene anche indicato il sottotipo [ad esempio: A/Chicken/Hong Kong/220/97(H5N1)].

A differenza del virus influenza A, la classificazione in sottotipi non è necessaria per i virus influenzali di tipo B, in quanto sono meno diversificati tra loro. Nello specifico, sulla base degli studi epidemiologici finora effettuati, è stato osservato che nell'uomo l'infezione da virus influenza B è causata da due lineaggi antigenicamente differenti, denominati Victoria e Yamagata ⁷.

Morfologia e struttura

I virus influenzali sono dotati di pericapside e presentano un genoma segmentato, costituito da molecole di RNA monocatenario lineare a polarità negativa ¹⁶.

Le particelle del virus influenza A sono pleiomorfe, in quanto possono essere caratterizzate da una forma sferica od ovoidale, con diametro di circa 100 nm, oppure da una forma filamentosa, che si estende fino a 20 μm ^{22,23} (Figura B).

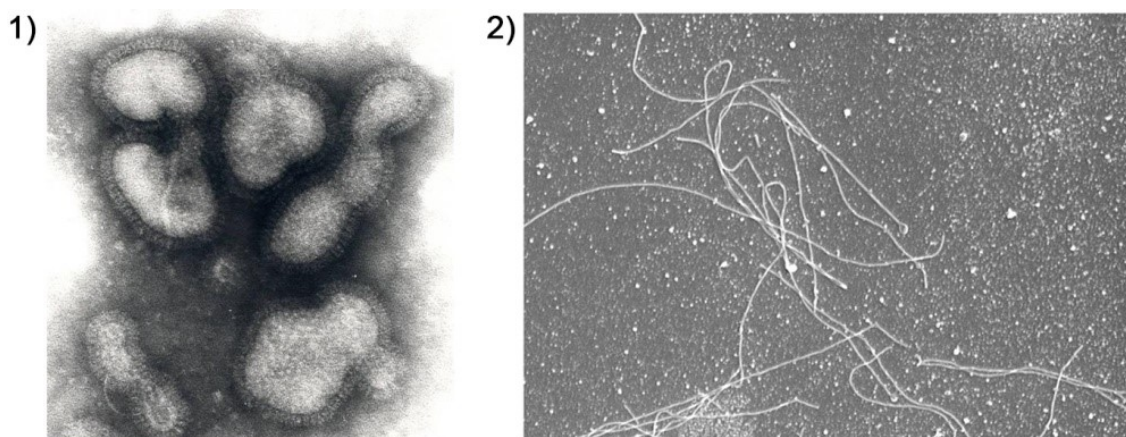


Figura B. 1) Osservazione al microscopio elettronico a trasmissione (28.000x) di virus influenzali, effettuata presso il Dipartimento di Medicina e Chirurgia dell'Università di Parma. 2) Osservazione al microscopio elettronico a scansione di virioni influenzali filamentosi e sferici. Immagine tratta da: Badham e Rossman. Curr Clin Microbiol Rep. 2016;3(3):155-61.

Il pericapside dei virus influenzali presenta due tipologie di peplomeri, costituiti da glicoproteine virus-specifiche (H e N) (Figura C).

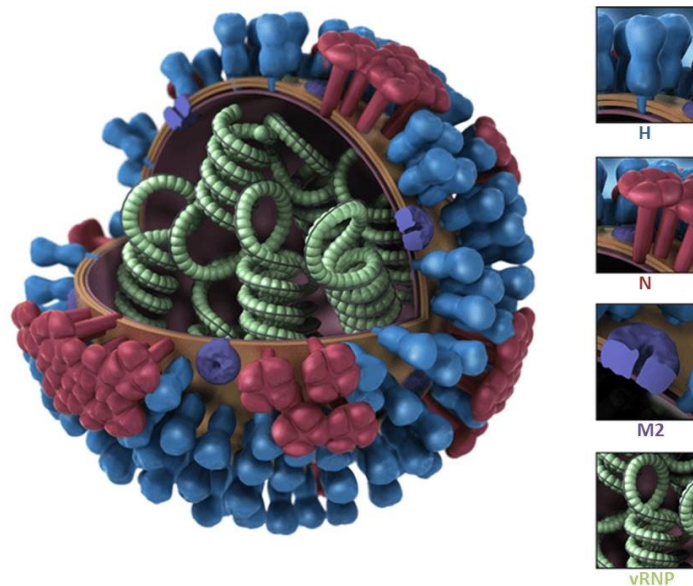


Figura C. Rappresentazione schematica della struttura di un virione influenzale. Immagine modificata dal sito web: <https://www.cdc.gov/flu/resource-center/freeresources/graphics/images.htm>.

Il doppio strato lipidico, che compone il pericapside e viene acquisito dalla particella virale mediante gemmazione a livello della membrana plasmatica della cellula ospite, è arricchito in colesterolo e glicosfingolipidi.

I peplomeri dei virus influenzali A e B sono le proteine emoagglutinina (H, ~80%) e neuroaminidasi (N, ~17%) ²⁴. La proteina H, che è responsabile del legame del virus influenza alla cellula ospite, è un trimero, che protrude dalla superficie virale per circa 13,5 nm e presenta una caratteristica forma a bastoncino, mentre la proteina N genera un tetramero fungiforme ²⁵⁻²⁷. In particolare, quest'ultima proteina ha la funzione di scindere gli acidi sialici presenti sulle cellule ospiti, consentendo ai virioni neoformati del virus influenza A di essere rilasciati in modo efficiente dalla cellula infettata ^{28,29}. È stato osservato che l'attività enzimatica della proteina N facilita l'infezione delle cellule,

aiutando il virione a penetrare nel muco del tratto respiratorio ³⁰. Nei virus influenzali C è presente un solo tipo di peplomero, che svolge entrambe le attività biologiche delle proteine H ed N dei tipi A e B.

Nel pericapside è, inoltre, presente in piccole quantità un'altra proteina virus-specifica, la proteina di matrice 2 (M2), che genera dei canali ionici protone-selettivi necessari per l'efficace scapsidamento dei virus influenzali ²⁹.

All'interno del pericapside del virus influenza è racchiuso il nucleocapside, caratterizzato da una simmetria elicoidale e con un diametro di circa 9 nm. Il nucleocapside racchiude i segmenti di RNA virale (890–2.341 nucleotidi), in associazione con la proteina NP e tre proteine ad attività polimerasica, ossia PA, PB1 e PB2. Tali proteine, che sono state classificate come acide (A) o basiche (B) in relazione alla loro mobilità elettroforetica, svolgono l'attività di replicazione/trascrizione del virus influenza. La loro associazione con le molecole di RNA forma le ribonucleoproteine virali (vRNP) ²⁷, che hanno una struttura caratterizzata da una testa globulare e una porzione allungata, entrambe rivestite dalla proteina NP (Figura D).

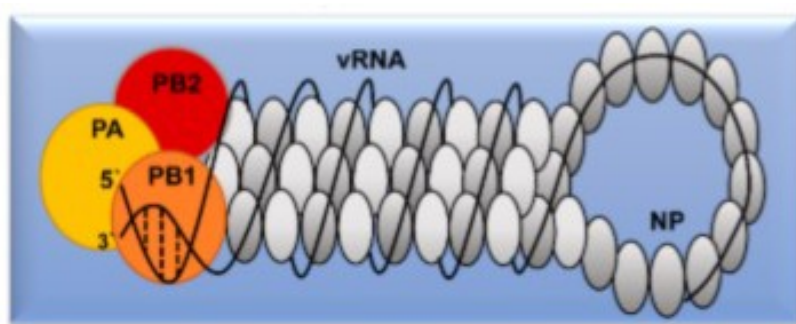


Figura D. Rappresentazione schematica della struttura di uno dei segmenti di ribonucleoproteina del virus influenza. Immagine modificata da: Mostafa *et al.* Viruses. 2018;10(9).pii:E497.

La proteina M2 promuove l'acidificazione del nucleocapside virale, dopo che il virus è entrato nella cellula ospite, consentendo ai complessi vRNP di essere rilasciati nel citoplasma ²⁸.

Il genoma dei virus influenzali A e B è composto da 8 segmenti di RNA, che codificano per almeno 10 diverse proteine virali, mentre quello dei virus influenzali C e D ne contiene 7.

Nello specifico, ciascuno degli 8 segmenti del genoma del virus influenza A codifica, rispettivamente, per le seguenti proteine: polimerasi basica 2 (PB2, segmento 1), polimerasi basica 1 (PB1, segmento 2), polimerasi acida (PA, segmento 3), emoagglutinina (H, segmento 4), nucleoproteina (NP, segmento 5), neuroaminidasi (N, segmento 6), proteine di matrice 1 e 2 (M1 e M2, segmento 7) e proteine non strutturali (NS1 e NS2 o proteina di esporto nucleare, NEP, segmento 8) ¹⁶.

Le proteine nucleocapsidiche del virus influenza A svolgono un ruolo strutturale, e, inoltre, sono coinvolte nella replicazione del genoma virale, nella modulazione delle risposte antivirali della cellula ospite e, infine, rappresentano dei fattori di virulenza ^{28,29,31,32}.

La proteina M1 riveste la superficie interna del pericapside ^{28,31} e partecipa all'assemblaggio e alla gemmazione del virus ²⁹.

La proteina NEP/NS2 svolge un importante ruolo regolatorio nel trasporto dei complessi vRNP dal nucleo verso il citoplasma ^{29,31,33}.

La proteina NS1 è una proteina multifunzionale, che, in particolare, risulta implicata nell'inibizione delle difese dell'ospite mediate da interferone ^{31,34,35}.

Un'ulteriore proteina, denominata PB1-F2, deriva da uno schema di lettura alternativo ("frameshift") del segmento genico che codifica per la proteina PB1 ³⁶ ed è presente nella maggior parte dei virus influenzali A ³⁷. Tale proteina svolge un importante ruolo nella patogenesi dell'infezione da virus influenza, contrastando la risposta immunitaria innata

dell'ospite e promuovendo l'insorgenza di co-infezioni ³⁸⁻⁴⁰. Tuttavia, gli effetti indotti da PB1-F2 sulla manifestazione dell'infezione differiscono a seconda del ceppo virale e della specie ospite. Infatti, la proteina può variare in lunghezza e sequenza per la presenza di codoni "stop" alternativi, che portano all'espressione di proteine tronche PB1-F2 di diversa lunghezza, come anche per la presenza di specifici residui amminoacidici, che determinano una maggiore virulenza e suscettibilità alle sovrainfezioni.

L'altra proteina accessoria codificata dal segmento genico PB1 è la proteina N40, che è una forma tronca all'estremità N-terminale di PB1 ⁴¹. Tale proteina sembrerebbe regolare l'equilibrio tra l'espressione di PB1 e PB1-F2, tuttavia, non è ancora stato chiarito se essa svolge ulteriori ruoli regolatori nella replicazione del virus influenza ⁴².

Recentemente è stato identificato un nuovo prodotto genico del virus influenza, codificato dal segmento 3 e denominato PA-X, che avrebbe la capacità di contrastare le difese dell'ospite ⁴³. PA-X è una proteina di fusione, costituita da un dominio comune N-terminale ad attività endonucleasica di 191 amminoacidi, che presenta l'inizio della fase di lettura ("Open reading frame") della polimerasi PA, ed è unito a un'unica regione C-terminale di 41 o 61 amminoacidi (a seconda del ceppo virale), derivante dallo spostamento della fase di lettura di PA ⁴²⁻⁴⁴ (Figura E).

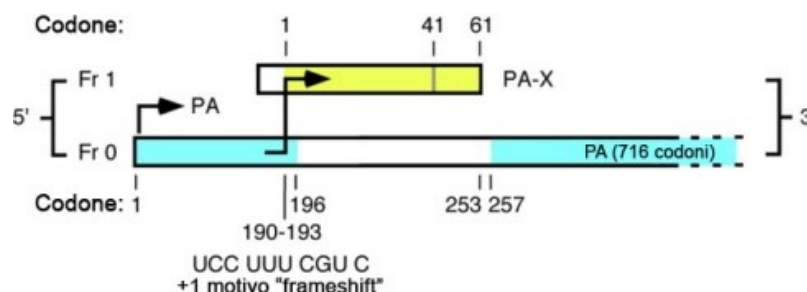


Figura E. Rappresentazione schematica della struttura della proteina PA-X del virus influenza. Immagine modificata da: Shi *et al.* J Virol. 2012;86(22):12411-3.

Sebbene la maggior parte dei virus influenzali finora isolati abbiano 61 residui amminoacidici nel dominio C-terminale, alcuni ceppi, come quello pandemico H1N1 del 2009, possiedono un codone “stop” prematuro, che determina la formazione di un dominio C-terminale tronco di soli 41 amminoacidi ⁴²⁻⁴⁴.

Ciclo replicativo

L'infezione del virus influenza inizia con il legame (adsorbimento) dell'anti-recettore emoagglutinina ai residui di acido sialico presenti sulla superficie delle cellule sensibili dell'apparato respiratorio (Figura F).

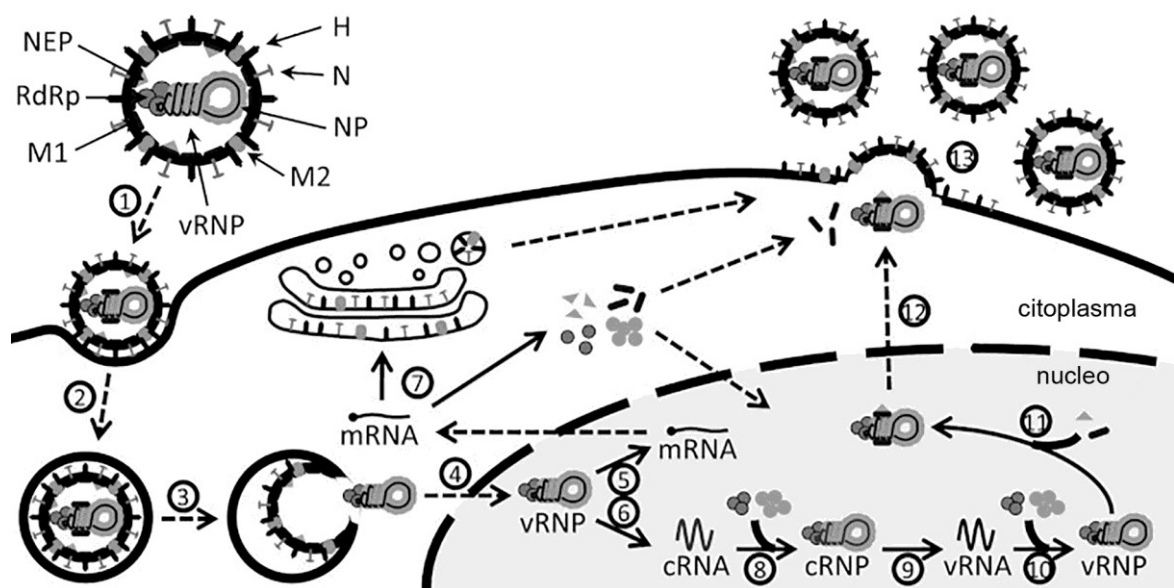


Figura F. Schema del ciclo replicativo del virus influenza. Immagine modificata da: Heldt *et al.* J Virol. 2012;86(15):7806-17.

In particolare, è noto che gli stipiti umani si legano a recettori cellulari in cui l'acido sialico è complessato al galattosio mediante legami di tipo α -2,6, mentre gli stipiti aviari a quelli di tipo α -2,3. Il suddetto legame porta all'attivazione di diversi possibili meccanismi di entrata. Tra questi, quello maggiormente utilizzato dal virus influenza è l'endocitosi ^{45,46}.

Una volta che il virus è entrato nella cellula ospite, esso viene trasportato nel citoplasma all'interno di un endosoma precoce, che andrà incontro a un processo di acidificazione progressiva, fino a divenire endosoma tardivo. Tale meccanismo determina delle alterazioni conformazionali nell'emoagglutinina, che espone una porzione idrofobica, la quale, inserendosi nella membrana dell'endosoma, ne provoca la fusione con il pericapside virale. Di conseguenza, i complessi vRNP vengono liberati nel citoplasma e le molecole di RNA in essi contenute raggiungeranno il nucleo cellulare ^{47,48}. Infatti, a differenza della maggior parte degli altri virus a RNA, il virus influenza replica all'interno del nucleo della cellula ospite.

Dal momento che i segmenti di RNA dei virus influenzali hanno una polarità negativa, la sintesi delle proteine virali richiede che gli stessi vengano trascritti in RNA messaggeri (mRNA). Tali mRNA vengono trascritti nel nucleo ad opera degli enzimi ad attività RNA-polimerasica presenti nel virione.

La proteina PB1 inizia la trascrizione utilizzando come innesco dei frammenti 3'-terminali di RNA cellulare presenti nel nucleo e realizza delle copie complementari, le quali vengono successivamente addizionate all'estremità 3' di sequenze poliadenilate e all'estremità 5' di guanosina metilata ("cap").

La replicazione dei segmenti di RNA virale avviene ad opera della RNA polimerasi virus-specifica, attraverso la sintesi di molecole di RNA complementari, che, a loro volta, funzionano da stampo per la sintesi di copie multiple di RNA identiche a quelle del virus parentale, ossia di senso negativo.

Le proteine virus-codificate, sintetizzate a livello citoplasmatico, seguono un diverso percorso intracellulare. Le proteine H, N e M raggiungono la membrana plasmatica, dove le prime due si inseriranno. La proteina NP si trasferisce, invece, nel nucleo per formare, in associazione con le molecole di RNA di recente sintesi, i nucleocapsidi della progenie

virale. Questi, successivamente, migreranno dal nucleo al citoplasma, fino a raggiungere la membrana plasmatica modificata dove, attraverso un processo di gemmazione, si libereranno i virioni neoformati (Figura G).

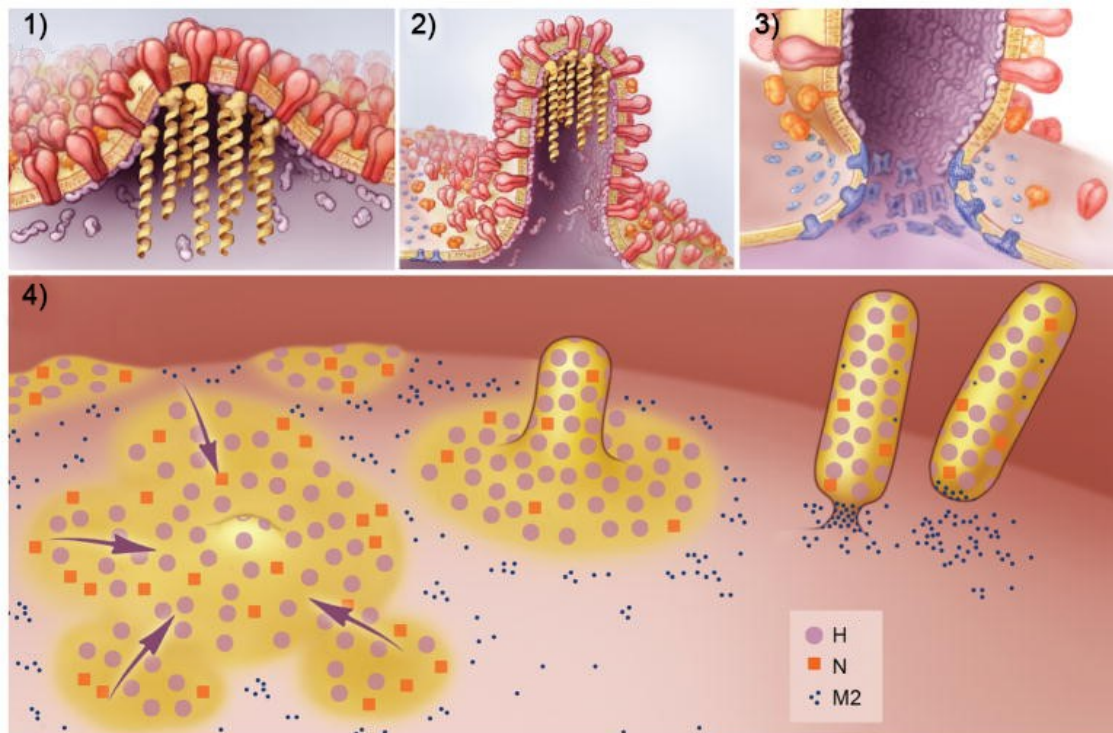


Figura G. Rappresentazione del processo di gemmazione del virus influenza. 1) Inizio della gemmazione del virus indotta dal raggruppamento delle glicoproteine H (in rosso) e N (in arancione) nel doppio strato lipidico. La proteina M1 (in viola) si lega alle estremità citoplasmatiche di H e N e funge da sito di ancoraggio per i complessi vRNP (in giallo). 2) Protrusione della membrana causata dalla polimerizzazione della proteina M1, con conseguente localizzazione polarizzata dei vRNP. La proteina M2 (in blu) è reclutata alla superficie del virus in gemmazione attraverso l'interazione con M1. 3) Scissione della membrana causata dall'inserimento dell'elica anfipatica di M2 al confine della fase lipidica, che altera la curvatura della membrana del virus in gemmazione e ne favorisce il rilascio. 4) Visione d'insieme del processo di gemmazione dei virus influenzali, che mostra l'addensamento di H e N in domini lipidici (in giallo), la formazione di un virione filamentoso e la scissione dalla membrana citoplasmatica favorita da M2. Immagine modificata da: Rossman e Lamb. *Virology*. 2011;411(2):229-36.

La liberazione delle particelle virali dalle cellule infettate si verifica per molto tempo dall'inizio dell'infezione, senza che le cellule vadano incontro a lisi. Tuttavia, è stato osservato che il protrarsi dell'infezione virale ha come conseguenza la morte programmata (apoptosi) della cellula ospite ^{49,50}.

Caratteristiche biologiche

La grande rilevanza epidemiologica dei virus influenzali dipende strettamente da caratteristiche intrinseche alla loro replicazione e, in particolare, dalla rapida insorgenza di caratteristiche antigeniche nuove. Quest'ultimo fenomeno è, nella maggior parte dei casi, la conseguenza di modificazioni strutturali delle glicoproteine del pericapside e, in particolare, dell'emoagglutinina, che insorgono a causa dell'accumulo progressivo di mutazioni puntiformi. Questo fenomeno, che prende il nome di deriva antigenica ("drift"), interessa sia i virus influenzali di tipo A sia quelli di tipo B e rende un individuo, precedentemente infettato da virus influenza o vaccinato, potenzialmente suscettibile all'infezione da parte di virus con caratteristiche antigeniche differenti (Figura H).

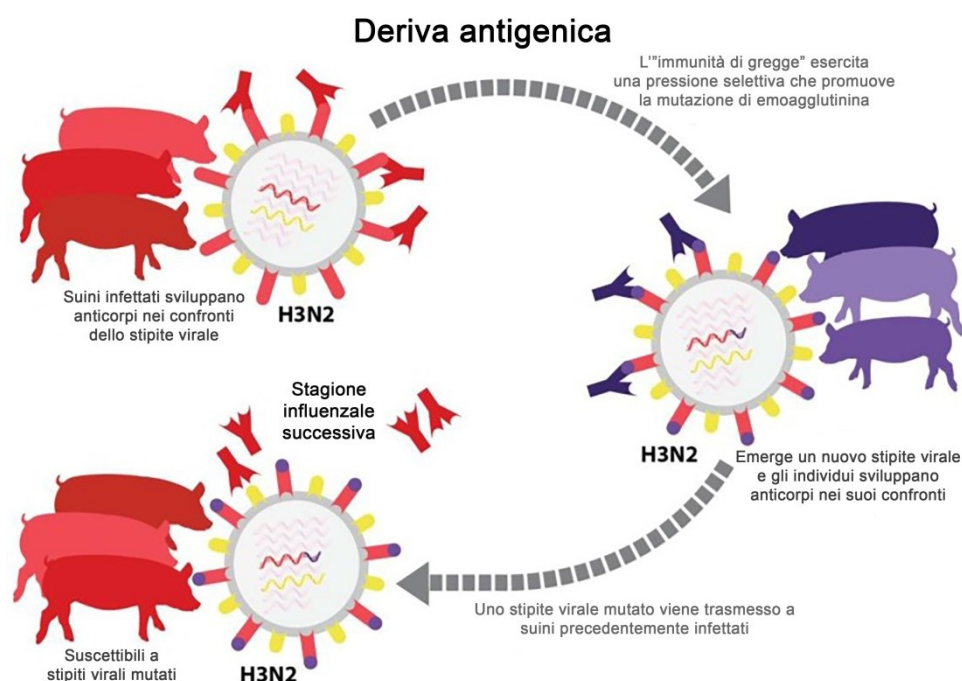


Figura H. Rappresentazione schematica del fenomeno di deriva antigenica. Immagine modificata da: Sandbulte *et al.* *Vaccines*. 2015;3:22-73.

In particolare, spicca la capacità di alcuni virus influenzali circolanti in ospiti aviari di emergere in maniera non prevedibile, attraverso riassortimento genico o trasmissione diretta, e, conseguentemente, diffondere nella popolazione umana. In particolare, i virus

influenzali di tipo A evolvono molto più rapidamente, rispetto a quelli di tipo B. I virus influenzali di tipo C sono, invece, relativamente più stabili.

Soprattutto nel caso dei virus influenzali A, possono occasionalmente comparire degli stipiti virali completamente nuovi, ossia caratterizzati da rilevanti modificazioni antigeniche, in conseguenza del fenomeno di riassortimento genico, che si esprime tra segmenti genici di virus influenzali che hanno co-infettato una stessa cellula (sostituzione antigenica, “shift”) (Figura I).

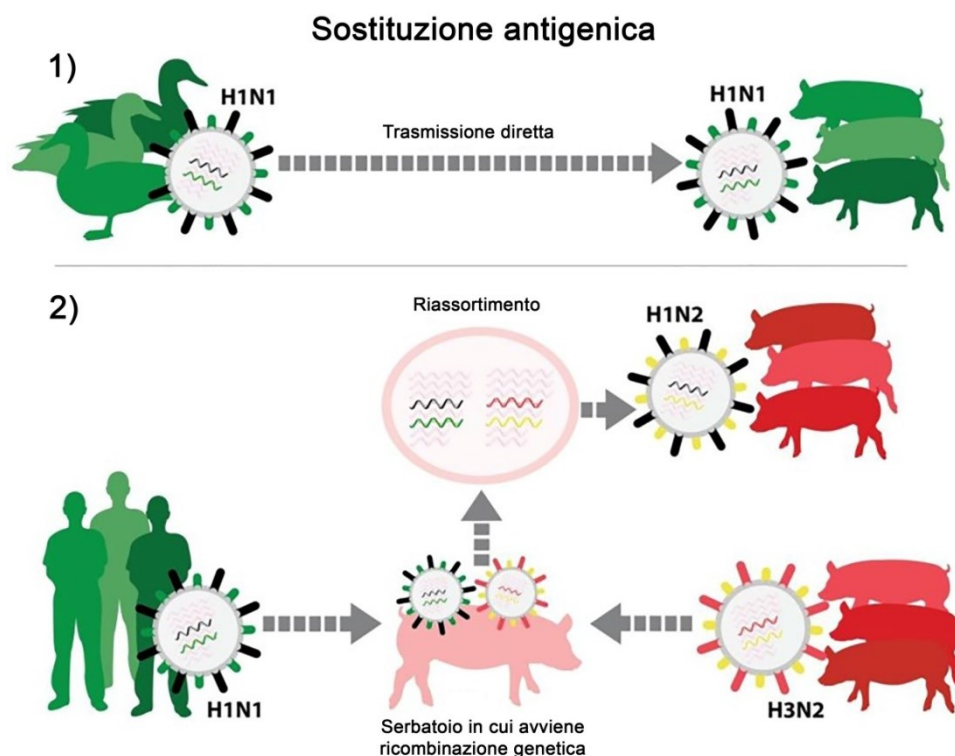


Figura I. Rappresentazione schematica del fenomeno di sostituzione antigenica. Immagine modificata da: Sandbulte *et al.* Vaccines. 2015;3:22-73.

Di norma, il riassortimento genico si verifica tra uno stipite umano di virus influenza A e uno stipite animale di virus influenza A. La specie più idonea per il verificarsi di tale fenomeno è il suino, che può essere infettato da virus influenzali A sia umani sia aviari.

Il fenomeno di deriva antigenica rende ragione del verificarsi di epidemie stagionali di influenza ⁵¹, mentre le sostituzioni antigeniche sono la principale causa delle pandemie finora avvenute.

La prima pandemia influenzale ad essere documentata è stata quella del 1580, che ha interessato Europa, Africa e America, ed è stata caratterizzata da un'incidenza e una mortalità estremamente elevate. Nel diciottesimo secolo, ci furono due pandemie influenzali (1729-1733 e 1781-1782) e tre nel diciannovesimo secolo (1830-1833, 1847-1848 e 1889-1891). Nel ventesimo secolo, la pandemia più rilevante si è verificata nel 1918-1919 ed è stata denominata "influenza spagnola", mentre le pandemie influenzali più recenti si sono verificate nel 1957, 1968, 1977 e 2009. In particolare, quest'ultima pandemia è originata in Messico e negli Stati Uniti in seguito alla propagazione di uno stirpe di virus influenza di sottotipo H1N1, derivante da un triplice riassortimento genico tra un ceppo influenzale aviario, uno umano e uno suino ⁵².

È interessante notare che il tasso di mutazione puntiforme è più alto nei virus influenzali A umani, rispetto a quelli aviari ⁵³. Inoltre, è stato osservato che il riassortimento genico si verifica solo per i virus appartenenti allo stesso genere (A, B e C) ⁵⁴.

Dal 1977, sono stati identificati tre tipi principali di virus influenzali circolanti negli esseri umani: influenza A H3N2, influenza A H1N1 e influenza B (Victoria e Yamagata).

L'emoagglutinina è il principale determinante di patogenicità nei ceppi influenzali aviari ^{55,56}, sebbene alla modulazione di questa caratteristica contribuiscano numerosi prodotti genici virali ⁵⁷.

L'emergenza di virus influenzali aviari di tipo A con caratteristiche antigeniche nuove è, ad esempio, attestata dal riscontro dei sottotipi H5N1, H7N7 e H7N9, responsabili di infezioni nell'uomo a elevato tasso di mortalità ⁵⁸⁻⁶⁰.

Nel 1997, un ceppo di virus influenza A di sottotipo H5N1 circolante nel pollame a Hong Kong è stato trasmesso direttamente all'uomo, causando la morte di sei delle diciotto persone infettate ^{12,61,62}. Successivamente, nel 2003, tale ceppo è stato veicolato da uccelli migratori e si è diffuso nel continente Asiatico e, a seguire, in Europa, Medio Oriente e Africa ^{63,64}. Parallelamente, altri ceppi di virus influenza A, tra cui i sottotipi H7N2, H7N3, H7N7, H9N2 e H10N7, hanno determinato dei casi sporadici di infezione nell'uomo, di entità lieve o addirittura fatale, in diversi distretti geografici ^{58,65-68}. Inoltre, a partire dal 2013, nuovi ceppi di virus influenza A originati da fenomeni di riassortimento genico (H5N6, H6N1, H7N4, H7N7, H7N9, H9N2, H10N8) sono stati in grado di infettare gli esseri umani, causando delle infezioni di diversa gravità ed entità ⁶⁹⁻⁷⁴.

Infine, è stato osservato come, in individui infettati da uno stesso ceppo di virus influenza, si possa generare una progenie virale notevolmente disomogenea, indice di una selezione a favore di precise sub-popolazioni virali e strettamente dipendente dall'ospite cellulare in cui il virus si è replicato ⁷⁵⁻⁷⁸. È, del resto, noto come la cellula ospite contribuisca, in particolare attraverso processi di glicosilazione e modificazione post-traduzionale delle proteine virali, all'emergenza di virus influenzali in parte modificati e con caratteristiche nuove, rispetto al virus parentale.

Interazione virus-cellula ospite

È stato finora documentato che le proteine del virus influenza sono in grado di attivare diverse vie di trasduzione del segnale, che coinvolgono ben 1.023 proteine cellulari ⁷⁹ (Figura L).

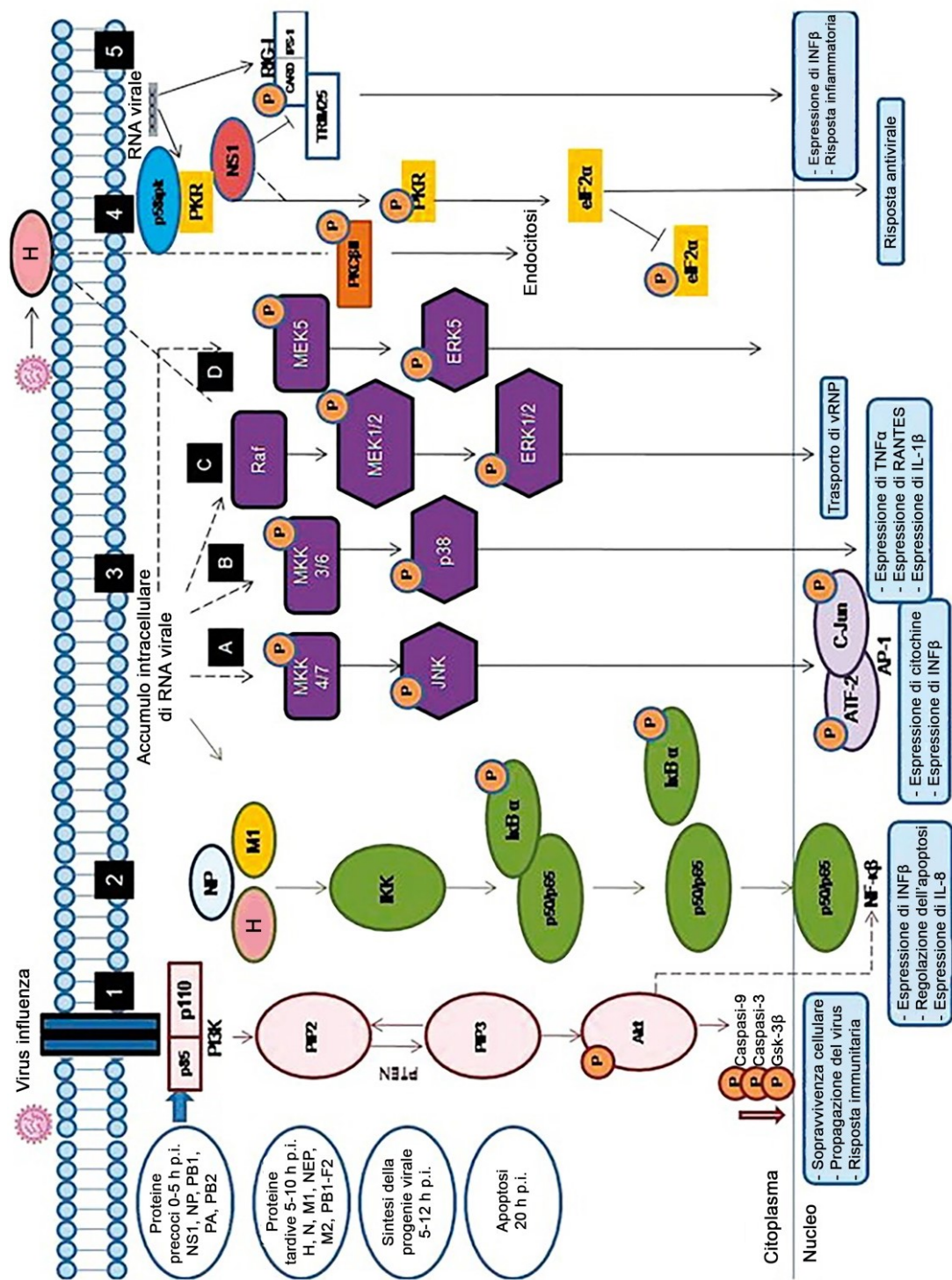


Figura L. Attivazione di diverse vie di trasduzione del segnale in seguito a infezione della cellula ospite con virus influenza. Immagine modificata da: Gaur *et al.* Med Sci Monit. 2011;17(6):RA148-54.

La maggior parte dei recettori contenenti acido sialico presenti nell'epitelio nasale, nella trachea e nei bronchi del tratto respiratorio umano sono di tipo α -2,6⁸⁰. Si ritiene che l'assenza di legami di tipo α -2,3 nel tratto respiratorio superiore dell'uomo ostacoli il legame e la trasmissione interumana dei ceppi di virus influenza aviare⁸⁰. Sebbene nel tratto respiratorio superiore dei suini siano presenti acidi sialici con legami sia di tipo α -2,3 sia α -2,6⁸¹, che, pertanto, rendono tali animali suscettibili all'infezione da parte di ceppi influenzali aviari e umani, rappresentando un serbatoio per il potenziale riassortimento genico dei virus influenzali, studi più recenti suggeriscono che la distribuzione dei recettori del virus influenza A nei suini presenti delle similarità rispetto all'uomo⁸²⁻⁸⁴.

Alcuni dati sperimentali hanno focalizzato l'attenzione sulla capacità dei virus influenzali di legarsi a glicani di tipologia diversa, rispetto ai recettori finora noti⁸⁵, evidenziando come le conoscenze relative alla specificità recettoriale di tali virus non siano del tutto note. Inoltre, un aspetto importante che interviene nella modulazione dell'infettività dei virus influenzali è rappresentato dalla differente suscettibilità della proteina H al clivaggio effettuato da proteasi dell'ospite. Nello specifico, la proteina H dei virus influenzali viene sintetizzata come singolo precursore polipeptidico (H0), che viene poi scisso nelle subunità H1 e H2 dalle proteasi cellulari. In particolare, la sequenza amminoacidica del sito di clivaggio determina da quali proteasi cellulari il precursore H0 possa essere scisso⁵¹.

I virus dell'influenza aviare a bassa patogenicità hanno una proteina H che può essere scissa solo da proteasi presenti nel tratto gastrointestinale degli uccelli, mentre quelli ad alta patogenicità (ad esempio H5N1 e H7N9) hanno una proteina H che può essere scissa da proteasi di altra tipologia^{86,87}.

L'insieme delle evidenze sopra riportate depone per l'esistenza di numerosi fattori/funzioni cellulari che sono indispensabili all'espletamento del ciclo replicativo dei virus influenzali e la cui conoscenza è, a tutt'oggi, incompleta e in continua evoluzione.

Trasmissione

La rilevanza epidemiologica dei virus influenzali è strettamente correlata alla loro capacità di diffondere rapidamente da persona a persona.

Il virus influenza può essere trasmesso attraverso tre modalità principali: contatto diretto con individui affetti, contatto con fomite e inalazione di aerosol contenenti il virus.

Dal momento che la modalità principale di trasmissione del virus è tramite inalazione di aerosol, la frequentazione di luoghi pubblici affollati nei mesi freddi contribuisce alla sua diffusione ⁸⁸. Al contrario, la temperatura elevata e la maggiore intensità dei raggi ultravioletti nei mesi estivi contribuiscono a ridurre la presenza e la permanenza del virus influenza nell'ambiente.

L'incidenza stagionale dell'influenza aumenta tipicamente nel tardo autunno e inizia a declinare a metà primavera. Nell'emisfero settentrionale, il periodo epidemico si manifesta da novembre a marzo, mentre in quello meridionale da aprile a settembre. Nei paesi tropicali, l'influenza si verifica sporadicamente durante tutto l'anno e la sua incidenza aumenta in correlazione con l'umidità atmosferica ^{21,89}.

Focolai localizzati di influenza stagionale si verificano anche in anni inter-pandemici, in particolare quando i ceppi di virus influenzali circolano in comunità di soggetti con un'immunità preesistente di entità minima.

Epidemiologia

Nell'uomo, la maggior parte delle infezioni è causata dai virus influenzali di tipo A e B. Contrariamente al virus influenza A, che è responsabile di epidemie e pandemie, il tipo B è responsabile di focolai d'infezione più circoscritti ²¹. Infatti, i virus influenzali di tipo A possiedono uno spettro d'ospite più ampio, dal momento che sono in grado di infettare diverse specie di mammifero e di uccelli.

In particolare, il virus influenza A di sottotipo H3N2 è stato riscontrato più frequentemente in Africa meridionale, in Australia e in Nuova Zelanda, il ceppo pandemico H1N1 del 2009 in Sud America e in Asia meridionale ⁹⁰, mentre il virus influenza B è predominante in alcuni paesi Europei ⁹¹.

Un recente studio epidemiologico, condotto dal gruppo di ricerca, ha evidenziato, per l'area di Parma, una prevalenza dell'infezione da virus influenza pari all'11,53% dei casi totali, con la più alta percentuale di casi (35,85%) nei bambini di età tra 6 mesi e 3 anni ⁹². L'influenza raggiunge i più alti picchi di prevalenza nei mesi invernali e, dal momento che l'alternarsi delle stagioni è diverso tra l'emisfero settentrionale e quello meridionale, si verificano ogni anno due differenti periodi epidemici a livello globale (Figura M). Per tale motivo, l'Organizzazione Mondiale della Sanità pubblica ogni anno due specifiche formulazioni vaccinali ⁹³.

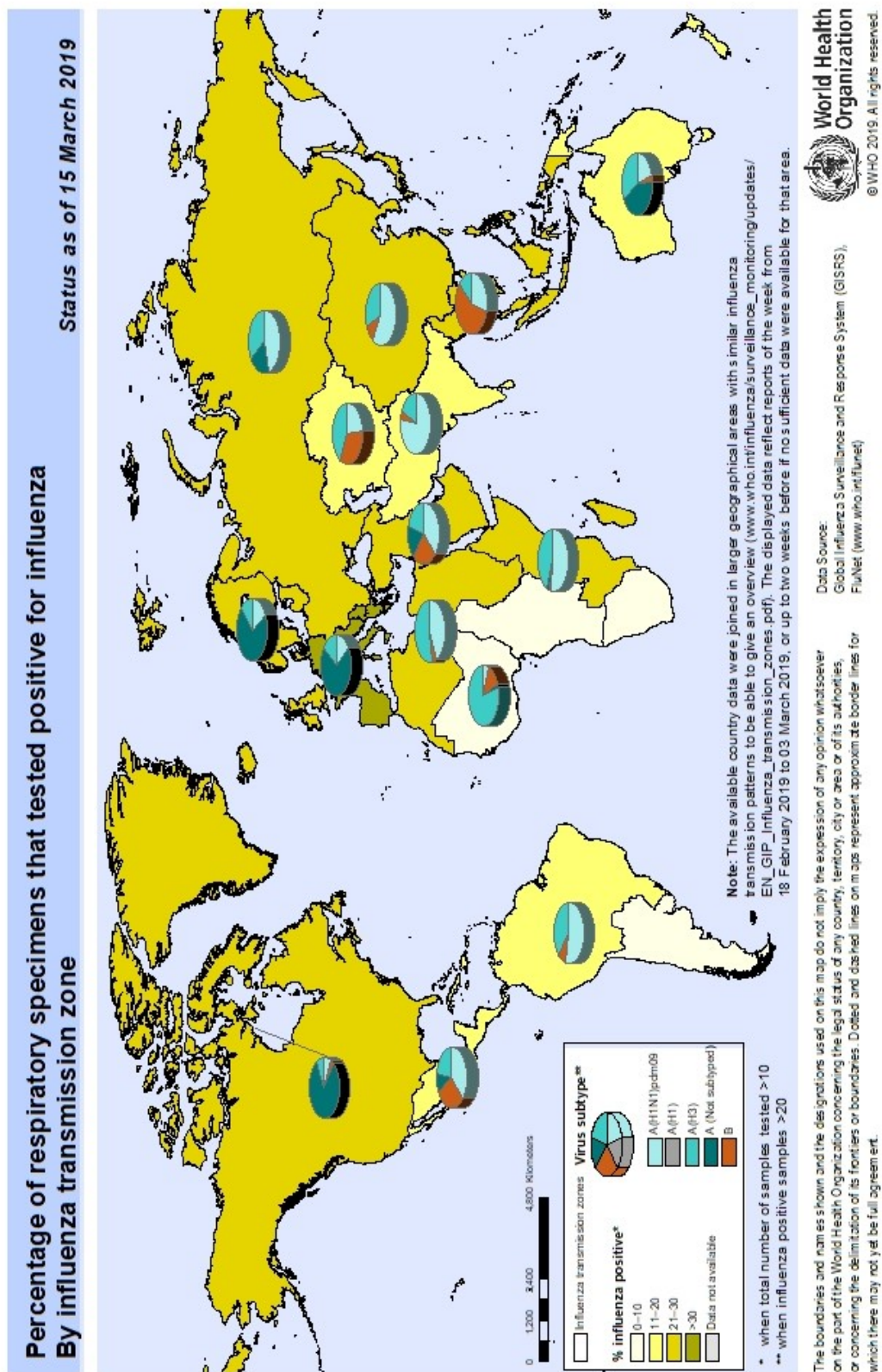


Figura M. Distribuzione geografica dei principali sottotipi circolanti di virus influenzali. Immagine tratta dal sito web: https://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/latest_update_GIP_surveillance/en/.

Prevenzione, controllo e terapia dell'influenza

Dal momento che i sintomi dell'influenza non sono abbastanza distintivi da consentire una diagnosi basata esclusivamente sul quadro clinico ^{94,95}, è importante avvalersi di metodi diagnostici di laboratorio.

Una corretta e tempestiva diagnosi di laboratorio di infezione da virus influenza non solo consente di evitare il trattamento antibiotico ma, soprattutto, garantisce l'efficacia del trattamento con farmaci antivirali, qualora si renda necessario. È stato osservato che i farmaci antivirali sono maggiormente efficaci se applicati dopo l'insorgenza dei primi sintomi ⁹⁶. Infatti, la somministrazione tardiva del farmaco antivirale può comportare il rischio di selezionare dei ceppi virali resistenti. In tal caso, il rischio di complicanze dell'infezione aumenta significativamente ^{97,98}.

Per quanto riguarda la profilassi e la terapia delle infezioni da virus influenza, i farmaci attualmente utilizzati sono stati classificati in due categorie: inibitori del canale ionico M2 (amantadina e rimantadina) e inibitori della neuraminidasi (oseltamivir e zanamivir) ⁹⁹. In particolare, l'amantadina e i suoi derivati interferiscono con l'attività del canale ionico M2 del virus influenza A, impedendo il passaggio di protoni e, pertanto, l'inizio della replicazione virale ¹⁰⁰, mentre gli inibitori della neuraminidasi ne ostacolano l'attività, interferendo con il rilascio della progenie virale e la diffusione dell'infezione. Questi farmaci sono attivi nei confronti di virus influenzali di tipo A e B.

L'efficacia dei suddetti farmaci è, tuttavia, limitata da frequenti fenomeni di farmaco-resistenza ¹⁰¹⁻¹⁰⁴, dovuti all'alto tasso di mutazione a cui i virus influenzali vanno incontro. A tal riguardo, è stato di recente formulato un nuovo farmaco antivirale, denominato "baloxavir marboxil", che agisce ostacolando l'attività endonucleasica della subunità PA del complesso polimerasico del virus influenza, prevenendo la sua replicazione ⁹⁹.

Dal momento che l'infezione naturale conferisce un'immunità di breve durata nei confronti dello stesso ceppo virale, la vaccinazione è considerata un approccio valido per la prevenzione dell'influenza, soprattutto in categorie di soggetti a rischio.

Attualmente sono disponibili dei vaccini costituiti da virus inattivati, virus vivi e attenuati o da proteine virali ricombinanti, che si basano principalmente sulla produzione di anticorpi contro la proteina H ¹⁰⁵.

In genere, i vaccini anti-influenzali stagionali sono multivalenti e contengono dei ceppi di virus influenzali A e B antigenicamente simili a quelli circolanti nella popolazione durante la stagione epidemica ¹⁰⁶. Tuttavia, è noto che la comparsa di nuove varianti virali, che è un fenomeno molto frequente, può eludere l'immunità indotta dalla vaccinazione.

I vaccini anti-influenzali basati su antigeni comuni ai diversi sottotipi di virus influenza A e, pertanto, relativamente ben conservati, avrebbero il vantaggio di evitare una continua formulazione di nuovi vaccini sulla base delle varianti antigeniche isolate ogni anno. Sperimentazioni preliminari con costrutti di DNA in grado di esprimere la proteina NP, comprensiva della porzione extracellulare della proteina M2, si sono rivelate in grado di stimolare la risposta immune umorale e cellulo-mediata ¹⁰⁷. In tale ottica, sono in atto differenti approcci sperimentali, che hanno l'obiettivo di sviluppare un vaccino anti-influenza "universale", impiegando, come antigeni, delle regioni conservate della proteina H ¹⁰⁸. In particolare, poiché la porzione della proteina H che protrude all'esterno del virione muta di continuo, l'attenzione è stata focalizzata sulla porzione interna, in quanto è meno soggetta alle mutazioni.

Quale approccio alternativo, studi di ricerca scientifica di base, quale quello oggetto di questa tesi, possono costituire un'utile premessa all'individuazione di nuovi "bersagli" molecolari nella cellula ospite, che sono fondamentali per la replicazione del virus

influenza e che potrebbero offrire uno spunto per la formulazione di nuovi vaccini/farmaci antivirali.

Diagnosi di laboratorio dell'infezione da virus influenza

La diagnosi di laboratorio dell'infezione da virus influenza può essere effettuata attraverso la rivelazione del virus o di suoi costituenti (diagnosi diretta) nel campione biologico prelevato al paziente e/o la dimostrazione della comparsa o dell'aumento di anticorpi specifici (diagnosi indiretta).

I campioni idonei per la ricerca dei virus influenzali sono le secrezioni dell'apparato respiratorio, che vengono raccolte attraverso lavaggi o aspirati nasali, gargarizzati, lavaggi bronco-alveolari, tamponi faringei e tamponi nasali. Tali campioni devono auspicabilmente essere prelevati entro i primi 2-3 giorni di malattia e trasportati in laboratorio in opportuni terreni di trasporto per virus, avendo cura di mantenerli a bassa temperatura (0-4°C) per preservare l'infettività virale.

Attualmente sono disponibili diversi approcci per la diagnosi di infezione da virus influenza nell'uomo, come, ad esempio, l'isolamento del virus influenza in colture cellulari, i saggi di immunofluorescenza con anticorpi tipo-specifici (anti-influenza A e anti-influenza B) su cellule esfoliate dell'epitelio respiratorio per la ricerca di antigeni virali, i saggi di amplificazione degli acidi nucleici virali (reazione polimerasica a catena, PCR) e i saggi di immunocromatografia ^{21,92}.

In particolare, l'isolamento del virus in colture cellulari, quali le cellule di rene di cane ("Madin-Darby Canine Kidney with α -2,6-linked sialic acids enhanced expression", MDCK-SIAT1), prevede l'osservazione quotidiana delle colture inoculate allo scopo di appurare la comparsa dell'effetto citopatico virus-indotto. Il virus cresciuto in coltura viene successivamente identificato mediante saggio di immunofluorescenza, che, se positivo,

consente anche di definirne il tipo (A o B). Tuttavia, la comparsa dell'effetto citopatico, sebbene metta in luce l'infettività virale e costituisca pertanto, a tutt'oggi, un metodo diagnostico di riferimento, è un evento che si esprime, nella maggior parte dei casi, a distanza di diversi giorni dall'inoculo del campione clinico e, quindi, risulta scarsamente utilizzabile ai fini del trattamento e dell'eventuale isolamento del soggetto infettato. La ricerca di antigeni virali (mediante reazioni di immunofluorescenza o immunoenzimatiche) e del genoma virale (PCR) viene impiegata per garantire una diagnosi rapida.

Per quanto riguarda, invece, la diagnosi indiretta dell'infezione da virus influenza, il principale metodo utilizzato è la ricerca di immunoglobuline specifiche della classe IgM e IgG mediante saggio immunoenzimatico.

IL CITOSCHELETRO CELLULARE

Il citoscheletro cellulare è uno dei primi sistemi “dirottati” dai virus per garantire il loro trasporto intracellulare e avviare il loro ciclo replicativo ¹⁰⁹.

Oltre a funzioni connesse all’organizzazione architetturale della matrice citoplasmatica, al citoscheletro compete la trasduzione di segnali ad attività regolatoria sull’espressione genica, sulla sintesi di RNA, sulla modulazione del livello intracellulare degli ioni calcio e sulla proliferazione cellulare.

Le diverse funzioni del citoscheletro sono strettamente correlate alle proprietà di quattro famiglie di proteine, che si assemblano a formare quattro tipi di filamenti (Figura N).

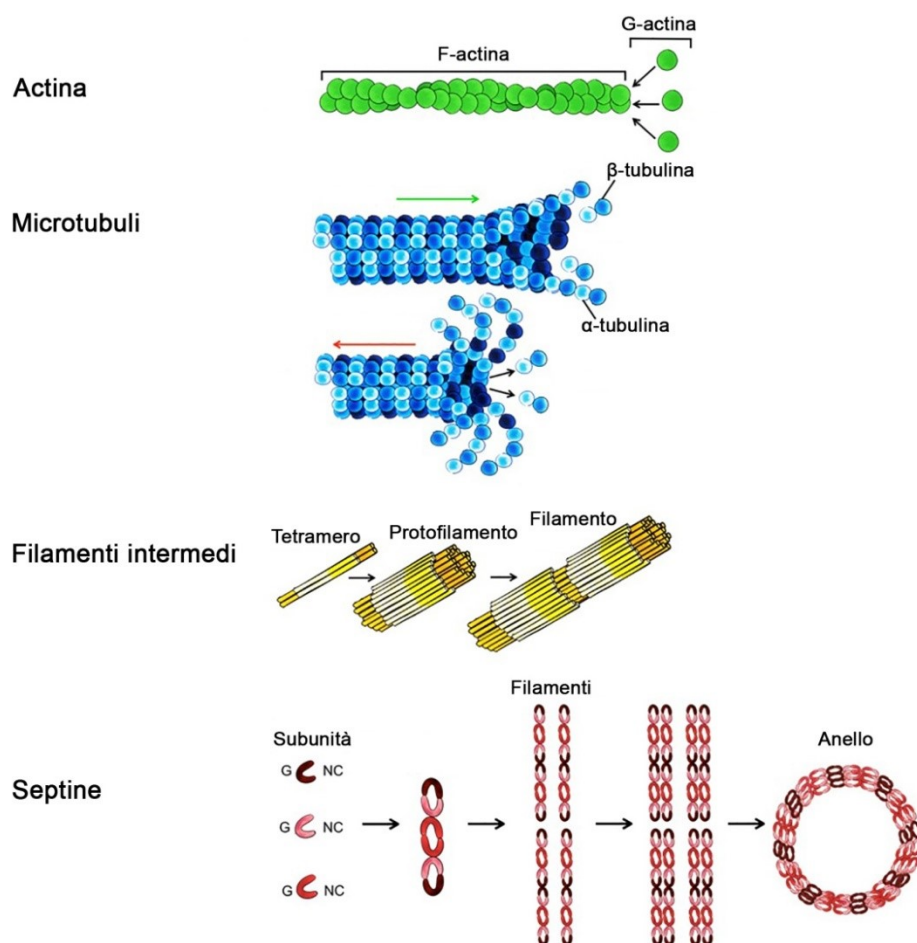


Figura N. Rappresentazione schematica dei principali componenti del citoscheletro cellulare. Immagine modificata da: Mostowy. PLoS Pathog. 2014;10(11):e1004409.

Tra i principali sistemi citoscheletrici delle cellule eucariote vi sono i microtubuli, formati prevalentemente da tubulina, i filamenti intermedi, variabili da un tipo cellulare a un altro, e i microfilamenti, costituiti principalmente da actina. Ciascun sistema del citoscheletro interagisce con gli altri sistemi ¹¹⁰. La dinamica di questi sistemi e le loro interazioni risultano di fondamentale importanza per l'espressione di diverse funzioni cellulari, quali la contrazione muscolare, la divisione cellulare e l'ancoraggio della cellula a un substrato.

Tutte le cellule eucariote contengono actina e tubulina, mentre il terzo tipo principale di filamenti del citoscheletro, i filamenti intermedi, si trova soltanto in alcuni metazoi, tra cui i vertebrati, i nematodi e i molluschi, e, peraltro, anche in questi organismi non è presente in tutti i tipi cellulari.

I filamenti intermedi sono particolarmente espressi nel citoplasma di cellule soggette a stress meccanici, essendo la loro principale funzione quella di impartire forza fisica a cellule e tessuti. Inoltre, essi rappresentano un abbondante "sistema tampone", che protegge da "stress" fisico, chimico o microbico ¹¹¹. Tale proprietà è molto rilevante nelle cellule epiteliali, che, come è noto, sono soggette a diversi fattori di "stress" ambientale.

Recentemente è stato individuato un quarto sistema di filamenti del citoscheletro: le septine ¹¹². Tali proteine sono in grado di legare guanosina trifosfato (GTP) e sono state riconosciute come componenti del citoscheletro in virtù della loro struttura filamentosa e della loro interazione con le membrane cellulari fosfolipidiche, con i filamenti di actina e con i microtubuli ¹¹². Esse non solo si assemblano a formare filamenti e fasci, ma possono anche formare delle strutture ad anello (Figura N). In particolare, alcuni studi hanno messo in luce un importante ruolo per le septine nel controllo delle infezioni batteriche ¹¹³, in quanto tali proteine "intrappolerebbero" i batteri destinati ad autofagia ¹¹⁴.

I filamenti intermedi

Tra le principali componenti del citoscheletro, i filamenti intermedi sono quella meno caratterizzata, a causa della loro variegata tipologia di proteine, distribuzione e funzione tessuto-specifica ¹¹⁵. I filamenti intermedi sono costituiti da proteine a elevata variabilità di sequenza, che si organizzano per formare filamenti di diametro di circa 10 nm.

I singoli polipeptidi dei filamenti intermedi condividono un'organizzazione strutturale comune (Figura O).



Figura O. Rappresentazione schematica di una subunità dei filamenti intermedi. Immagine modificata da: Intermediate filaments. The cell: a molecular approach, 2nd edition, Cooper, Sunderland (MA), Sinauer Associates, 2000.

Nello specifico, si tratta di molecole allungate con un dominio centrale ad α -elica di circa 310 amminoacidi e due domini N- e C-terminali. Il dominio centrale è simile nelle diverse isoforme delle proteine, mentre i domini globulari N- e C-terminali possono variare in dimensione, sequenza e struttura secondaria. Si ritiene che il dominio centrale svolga un ruolo cruciale nell'assemblaggio dei filamenti intermedi, mentre i domini terminali ne determinino le specifiche funzioni.

Ciascuna subunità dei filamenti intermedi forma un dimero che, associandosi in modo anti-parallelo a un altro dimero, genera un tetramero sfalsato (Figura P).

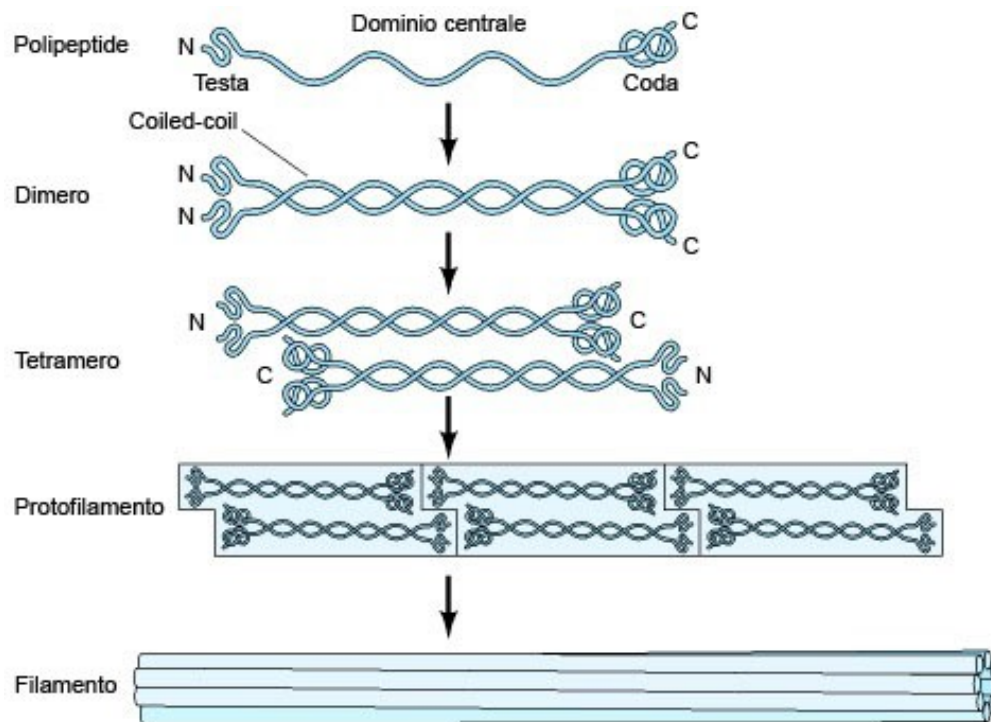


Figura P. Rappresentazione schematica dell'assemblaggio dei filamenti intermedi. Immagine modificata da: Intermediate filaments. The cell: a molecular approach, 2nd edition, Cooper, Sunderland (MA), Sinauer Associates, 2000.

L'unione di diversi tetrameri determina la formazione di un protofilamento e l'associazione di otto protofilamenti genera il filamento intermedio, che è una struttura cava e priva di polarità.

I filamenti intermedi presentano una distribuzione radiale, dalla regione perinucleare alla periferia cellulare ^{116,117}.

Più di 70 proteine, che collocano i geni che le codificano tra le 100 più grandi famiglie di geni presenti nell'uomo ¹¹⁸, sono state finora identificate e classificate in sei tipologie principali di filamenti intermedi, in base alla loro struttura primaria e all'espressione tessuto-specifica ¹¹⁹. Infatti, famiglie diverse di filamenti intermedi sono espresse in specifiche tipologie cellulari (Figura Q).

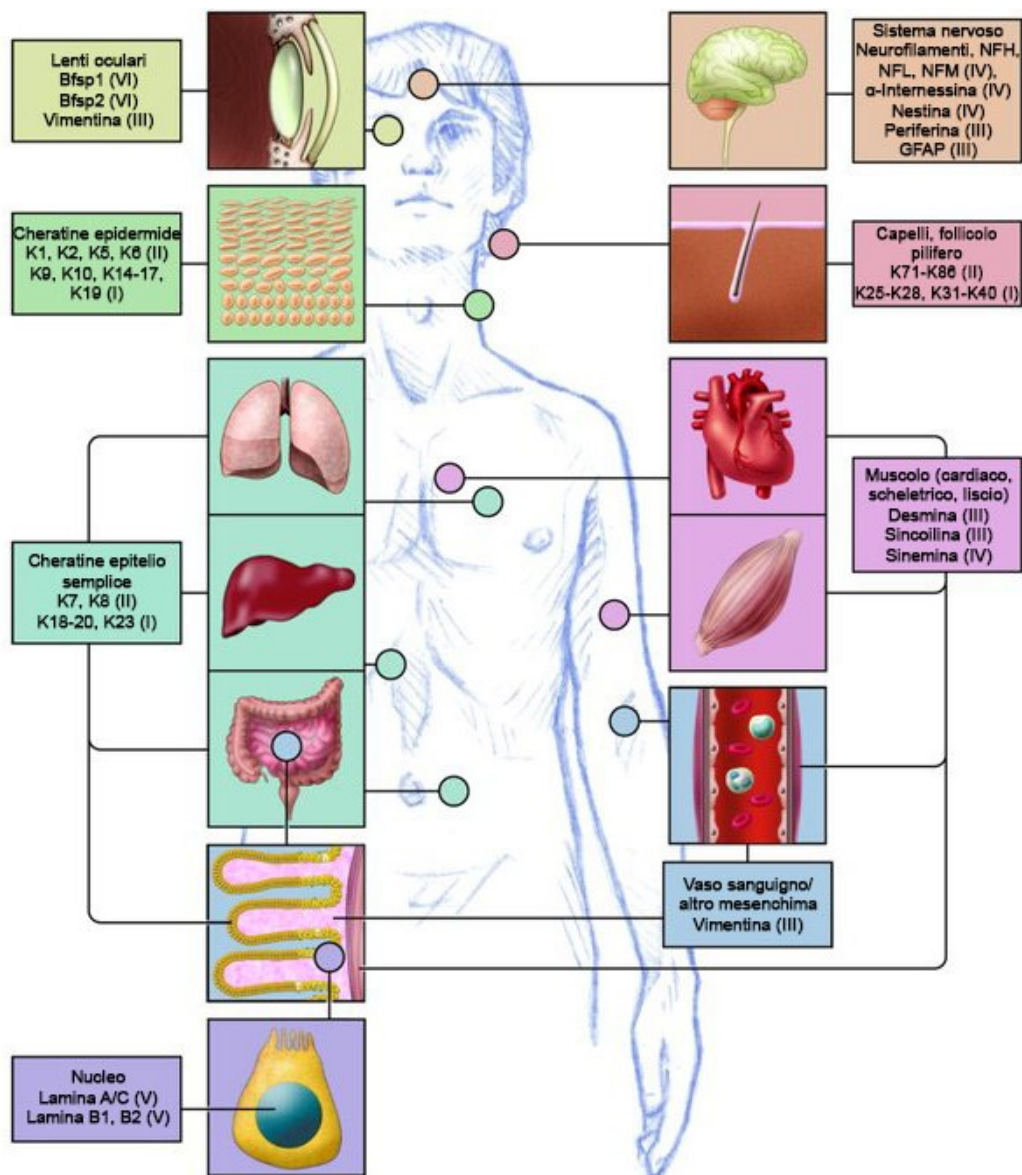


Figura Q. Distribuzione dei filamenti intermedi nei tessuti umani. Immagine modificata da: Omary. J Clin Invest. 2009; 119(7):1756-62.

In particolare, le proteine dei filamenti intermedi di tipo I-IV sono espresse nel citoplasma, mentre quelle di tipo V nel nucleo e, infine, quelle di tipo VI esclusivamente nelle lenti oculari ¹¹⁹.

La famiglia di proteine più numerosa è quella delle citocheratine (K); esistono, infatti, circa 20 citocheratine nelle cellule epiteliali umane (citocheratina molle) e 10 nelle cellule di annessi cutanei, quali capelli e unghie (citocheratina dura) ¹²⁰.

Una singola cellula epiteliale può produrre più tipi di citocheratine, che polimerizzano in una complessa rete, rappresentando quasi il 5% delle proteine cellulari totali ¹²¹.

Ciascun filamento di citocheratina è composto, in parti uguali, da catene di citocheratina di tipo I (citocheratine relativamente acide: K9-K28 e K31-K40) e II (citocheratine relativamente neutre/basiche: K1-K8 e K71-K86) ¹²². Queste proteine formano eterodimeri, che si uniscono a due a due per generare la subunità tetramerica fondamentale.

Le citocheratine svolgono un ruolo cruciale nel mantenere l'integrità strutturale e le proprietà meccaniche delle cellule, proteggendole da "insulti" ambientali ¹²³. Inoltre, le citocheratine contribuiscono alla regolazione delle proprietà meccaniche del citoplasma e del nucleo ^{124,125}.

La diversità delle citocheratine viene impiegata nella diagnosi di laboratorio dei cancro epiteliali, in quanto fornisce un'importante indicazione riguardo al tessuto epiteliale in cui il cancro è originato e può contribuire a orientare la scelta del trattamento farmacologico.

Le proteine dei filamenti intermedi di tipo III, che comprendono vimentina, desmina, sincoilina, proteina gliale fibrillare acida e periferina, formano degli omopolimeri. Vimentina è espressa in cellule mesenchimali e nella lente dell'occhio, desmina in cellule muscolari, sincoilina principalmente nelle cellule del muscolo scheletrico e cardiaco, la proteina gliale fibrillare acida negli astrociti e, infine, periferina negli assoni periferici.

I filamenti intermedi di tipo IV comprendono i neurofilamenti, nestina, sinemina e α -internessina. I neurofilamenti sono la componente più importante del citoscheletro dei neuroni. A tal riguardo, tre tipi di proteine di neurofilamenti di basso (NF-L), medio (NF-M) e alto (NF-H) peso molecolare si co-assemblano "*in vivo*", formando degli eteropolimeri.

Il gruppo dei filamenti intermedi di tipo V comprende le lamine nucleari A, B1 e B2, che rivestono la superficie interna della membrana nucleare ¹²².

Infine, le proteine phakinina e finlensina, appartenenti ai filamenti intermedi di tipo VI, sono espresse esclusivamente nelle lenti dell'occhio, dove svolgono un ruolo regolatorio sulla funzione e trasparenza ^{126,127}.

Modificazioni post-traduzionali dei filamenti intermedi

Nella maggior parte dei tipi cellulari, i filamenti intermedi rappresentano delle strutture altamente dinamiche (Figura R).

I processi di associazione e dissociazione dei filamenti intermedi sono regolati da diverse modificazioni post-traduzionali, che includono la fosforilazione, glicosilazione, sumoilazione, acetilazione e prenilazione ¹¹⁵.

L'assemblaggio dei filamenti intermedi comporta la formazione di diverse strutture intermedie, che si associano tra loro.

La successiva organizzazione dei filamenti intermedi in reticoli e fasci è mediata da varie proteine, che formano dei legami crociati sia tra i filamenti intermedi, sia tra questi e specifiche strutture cellulari, come, ad esempio, la membrana plasmatica, la membrana nucleare, i microtubuli e i microfilamenti.

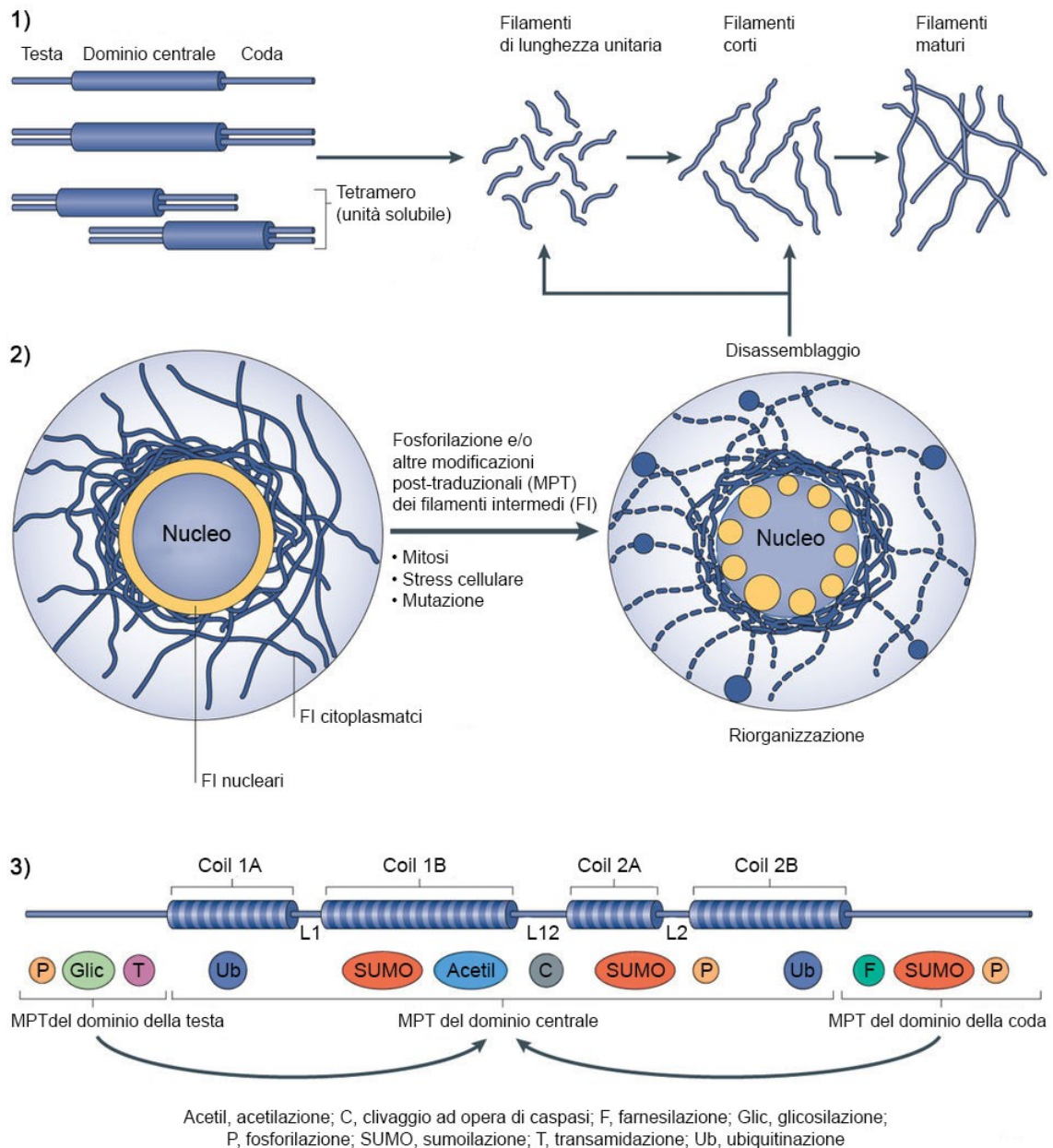


Figura R. Rappresentazione schematica dell'assemblaggio e della riorganizzazione citoplasmatica dei filamenti intermedi in risposta a modificazioni post-traduzionali. Immagine modificata da: Snider e Omary. Nat Rev Mol Cell Biol. 2014;15(3):163-77.

Nell'ambito delle modificazioni post-traduzionali dei filamenti intermedi, la fosforilazione è quella meglio caratterizzata ^{115,128}. La maggior parte dei siti di fosforilazione si trova in corrispondenza di residui di serina e treonina presenti nei domini globulari della testa e della coda delle subunità dei filamenti intermedi (Figura S).

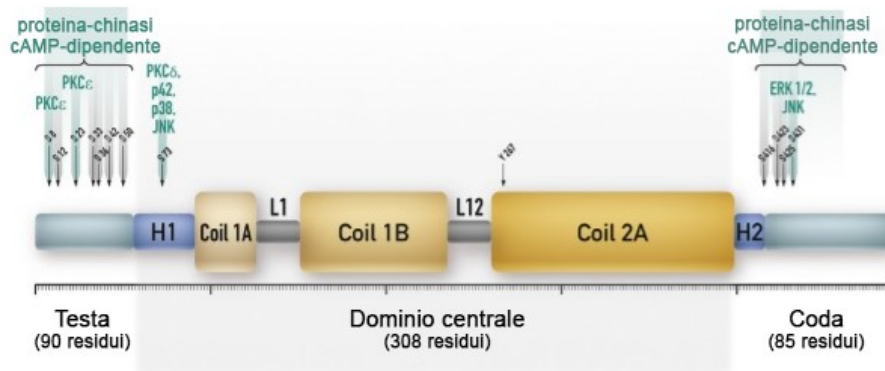


Figura S. Rappresentazione schematica dei siti di fosforilazione identificati nella proteina citocheratina 8 umana. Immagine modificata da: Sawant e Leube. Int Rev Cell Mol Biol. 2017;330:171-225.

Recenti studi proteomici hanno messo in luce numerosi siti di fosforilazione anche nel dominio centrale delle subunità dei filamenti intermedi, che solo recentemente è stato caratterizzato funzionalmente ¹²⁹.

Una delle principali funzioni della fosforilazione dei filamenti intermedi è quella di promuoverne la riorganizzazione e le dinamiche di assemblaggio/disassemblaggio ^{115,130,131}. Ad eccezione dei neurofilamenti, la fosforilazione basale delle proteine dei filamenti intermedi è di lieve entità e si accentua in caso di stimoli che alterano l'assetto cellulare fisiologico, come, ad esempio, nel corso della mitosi e a seguito di mutazioni delle proteine che li costituiscono.

In particolare, citocheratina 8 (K8) e citocheratina 18 (K18) sono le principali componenti dei filamenti intermedi dell'epitelio semplice ^{132,133}.

La molecola di serina 52 (Ser52) è il principale sito di fosforilazione di K18 umana "*in vivo*". Un aumento di fosforilazione di tale sito è stato associato a una maggiore solubilità e alterata polimerizzazione di citocheratina ^{134,135}, come anche a una riorganizzazione della stessa ¹³⁶ e all'attivazione dell'apoptosi ^{121,137}. Analogamente, la molecola di serina 432 (Ser432) è un importante sito di fosforilazione di K8 umana "*in vivo*". È stato, in particolare, osservato che Ser432 viene fosforilata da proteine chinasi stimulate da

mitogeni ("mitogen-activated protein kinase", MAPK), in risposta all'attivazione del recettore del fattore di crescita dell'epidermide ("epidermal growth factor receptor", EGFR) ¹²¹. Ad esempio, la fosforilazione in questo sito è stata descritta durante lo stress iper-osmotico in cellule epiteliali umane dell'intestino ¹³⁸.

Implicazioni della proteina citocheratina 8 in alcune patologie e infezioni virali

Recenti studi hanno evidenziato una stretta correlazione tra alterazioni dell'espressione di citocheratina 8 e la progressione di diversi tumori ¹³⁹. In particolare, un'aumentata espressione di citocheratina 8 favorisce la proliferazione e la migrazione cellulare in pazienti con tumore gastrico. In aggiunta, citocheratina 8, unitamente a citocheratina 18, svolge un ruolo importante ai fini della determinazione della prognosi del cancro al seno ¹⁴⁰. Nello specifico, è stato osservato che l'espressione di citocheratina 8 correla con un fenotipo meno invasivo di cancro al seno, mentre la sua assenza correla con metastasi precoci e prognosi infausta ¹⁴¹.

Altri dati di letteratura hanno attestato che la carenza di citocheratina 8, unitamente ad altre citocheratine epiteliali semplici (*i.e.* K18 e K19), aumenta la suscettibilità nei confronti di malattie renali ¹⁴². Inoltre, citocheratina 8 costituisce un antigene, che viene selettivamente riconosciuto da autoanticorpi generatisi in pazienti con artrite reumatoide ¹⁴³.

A tutt'oggi, esistono limitate evidenze del coinvolgimento di citocheratina 8 in corso di infezione virale e, apparentemente, nessuno studio è stato finora effettuato per il virus influenza. In particolare, è stato osservato che il silenziamento del gene che codifica per citocheratina 8 ostacola la replicazione del virus dell'epatite B ¹⁴⁴, mentre l'espressione di citocheratina 8 aumenta in cellule infettate dal virus dell'epatite C ¹⁴⁵. In aggiunta, aumentati livelli di fosforilazione di citocheratina 8 e 18 correlano con la progressione

dell'infezione da virus dell'epatite B e C ¹⁴⁶⁻¹⁴⁷. Analogamente, l'infezione da rotavirus comporta un aumento della fosforilazione di citocheratina 8 ¹³⁵, che è accompagnato da una riorganizzazione della stessa. Inoltre, è stata dimostrata la partecipazione di citocheratina 8, unitamente a citocheratina 18, alla regolazione del ciclo replicativo del virus respiratorio sinciziale ¹⁴⁸. Infine, è stato riportato che citocheratina 8 viene processata dalla proteinasi 2A durante le fasi tardive del ciclo replicativo di rhinovirus umano in cellule tumorali della cervice uterina (HeLa) ¹⁴⁹.

Possibile ruolo regolatorio della proteina “Ras homolog enriched in brain like-1” (RhebL1) sui filamenti intermedi

La proteina “Ras homolog enriched in brain 1” (Rheb1) è una GTPasi appartenente alla famiglia delle proteine Ras. Tale proteina, inizialmente identificata nel cervello di topo ¹⁵⁰, è altamente conservata nelle varie specie.

Nei mammiferi sono stati identificati due geni, Rheb1 e “Ras homolog enriched in brain like-1” (RhebL1 o Rheb2) ¹⁵¹. Rheb1 presenta un'espressione ubiquitaria, anche se è soprattutto abbondante nelle cellule muscolari e nel cervello ^{152,153}. RhebL1 è, invece, espressa principalmente nel cervello e, in minore entità, in numerosi tessuti periferici. Le due proteine sono identiche al 52% nella composizione amminoacidica e svolgono delle funzioni assai simili. Tuttavia, sono state segnalate delle differenze riguardo alla loro localizzazione intracellulare, come anche al profilo di espressione dei geni che le codificano ¹⁵⁴.

Come altre proteine che legano GTP, la proteina Rheb1 è in grado di legare sia GTP sia guanosina difosfato (GDP) e idrolizzare GTP, alternandosi fra due stati conformazionali distinti: uno attivo, quando è legata a GTP, e uno inattivo, quando è legata a GDP.

Rheb1 interviene nella via di segnalazione intracellulare della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI 3-chinasi)/proteina chinasi B (PKB o Akt)/“mammalian target of rapamycin” (mTOR), che è cruciale in molti processi fisiologici, quali la progressione del ciclo cellulare, la trascrizione, la traduzione, il differenziamento cellulare, l’apoptosi, la motilità e il metabolismo cellulare ¹⁵⁵ (Figura T).

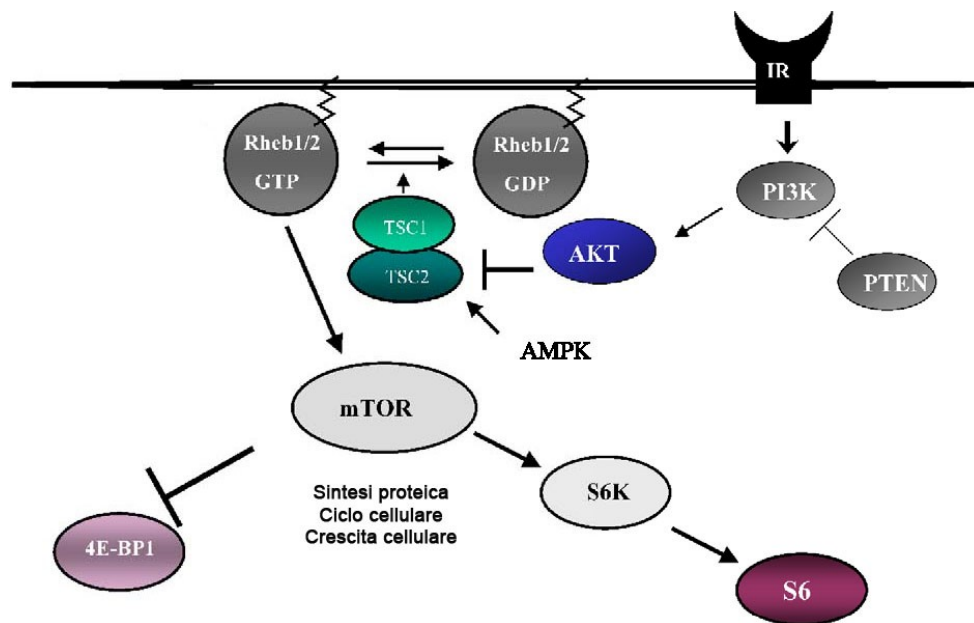


Figura T. Rappresentazione schematica della via di trasduzione del segnale insulina/mTOR/S6K. Immagine modificata da: Aspuria e Tamanoi. Cell Signal. 2004; 16(10):1105-12.

In particolare, Rheb1 svolge un ruolo fondamentale nell'attivazione di mTOR, una serina/treonina chinasi, che forma due complessi distinti, “mTOR Complex1” (mTORC1) e “mTOR Complex2” (mTORC2). Mentre l’attivazione di mTORC1 da parte della proteina Rheb1 favorisce un aumento della sintesi proteica, della crescita e della sopravvivenza cellulare, l’attivazione di mTORC2 agisce sulle dinamiche del citoscheletro cellulare, sulla migrazione e su altri processi cellulari ^{156,157}.

Rheb1 è localizzata a valle del complesso “tuberous sclerosis complex” (TSC) e a monte di mTOR nella via di trasduzione del segnale mTOR. L’attività di Rheb1 è regolata dal

complesso “tuberous sclerosis complex 1” (TSC1)/TSC2, dove la proteina TSC2 attiva le GTPasi (GAP), stimolando l’attività intrinseca di Rheb1 e inibendo la via di segnalazione mTOR ¹⁵⁸.

In particolare, la proteina Akt agisce sul complesso mTORC1, fosforilando e inibendo la proteina TSC2, il quale forma un complesso con TSC1. L’inibizione di TSC2 permette alla proteina Rheb1 di associarsi a GTP e di attivare mTORC1 ¹⁵⁹. Se Akt attiva mTORC1, quest’ultimo, a sua volta, regola Akt, inibendola, attraverso un meccanismo di controllo negativo; infatti, se mTORC1 viene inibito, si ha un’iperattivazione di Akt e dei suoi substrati, sia “*in vivo*” sia “*in vitro*” ¹⁶⁰. Il meccanismo che controlla, invece, l’attivazione di mTORC2 non è ancora del tutto noto; l’attivazione di questo complesso è, inoltre, collegata alla via di segnale PI 3-chinasi.

Un numero assai limitato di studi attesta il coinvolgimento di Rheb1 in corso di infezione virale. In particolare, è stata dimostrata l’incapacità di citomegalovirus di completare il proprio ciclo infettivo in cellule deplete di Rheb1, in quanto contribuirebbe a mantenere mTORC1 in uno stato attivo ¹⁶¹. Inoltre, un aumento del livello di espressione di Rheb1 e mTOR è stato osservato in epatociti infettati dal virus dell’epatite C ¹⁶².

La proteina RhebL1, di 183 aminoacidi, presenta due isoforme di diverso peso molecolare ed è altamente conservata in molte specie ¹⁶³ (Figura U).

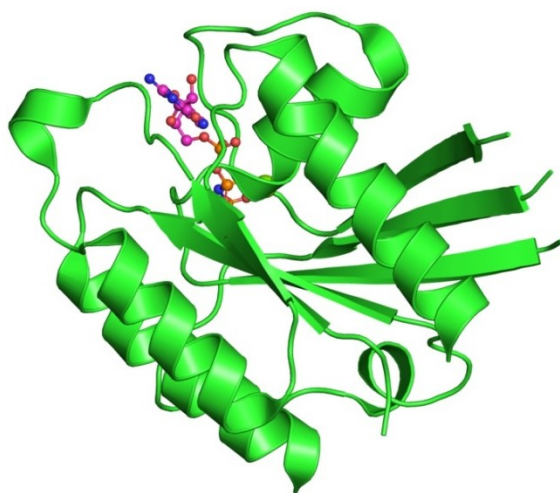


Figura U. Rappresentazione schematica della struttura cristallina della proteina RhebL1. Immagine tratta dal sito web: <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/entry/pdb/3oes/citations>.

La proteina RhebL1 è localizzata a livello della membrana cellulare e nel citoplasma ed è distribuita in maniera ubiquitaria in tutte le cellule, soprattutto in quelle muscolari e nervose ¹⁵⁰, aumentando notevolmente la sua espressione in cellule tumorali.

Tale proteina, legandosi a GTP, esplica la propria attività di GTPasi e, pertanto, può attivare la trascrizione genica mediata dal fattore “nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells” (NF-κB), promuovere la trasduzione del segnale tramite mTOR, attivare la proteina ribosomiale S6 chinasi beta-1 (RPS6KB1), oltre che costituire un bersaglio a valle delle proteine TSC1 e TSC2 ^{158,164-166} (Figura T).

In particolare, recenti studi hanno messo in luce il coinvolgimento di RhebL1 nella riorganizzazione e fosforilazione di citocheratina 8 in cellule epiteliali di polmone umano A549 ¹⁶⁷. Oltre a evidenziare che la localizzazione di RhebL1 è simile a quella dei filamenti di citocheratina 8 fosforilata, tali studi attestano che il silenziamento genico di RhebL1 causa un’inibizione della fosforilazione e riorganizzazione di citocheratina 8 indotta dalla sostanza sfingosilfosforilcolina.

SCOPO DELLA TESI

Il grado di virulenza dei virus influenzali dipende non solo dai numerosi meccanismi di variabilità genetica, che ne influenzano le caratteristiche antigeniche, ma anche dalla complessa interazione con specifici fattori e/o funzioni della cellula ospite, la cui conoscenza è ancora incompleta e in continua evoluzione.

Il progetto di ricerca oggetto di questa tesi ha l'obiettivo di mettere in luce la partecipazione di fattori/funzioni del citoscheletro cellulare (filamenti intermedi) nello svolgimento del ciclo replicativo del virus influenza A (H1N1) in due modelli cellulari di mammifero (cellule LLC-MK2: rene di scimmia, modello semi-permissivo; cellule A549: polmone umano, modello permissivo), al fine di approfondire le attuali conoscenze sull'interazione virus-cellula ospite e, possibilmente, individuare fattori di restrizione all'infezione virale. I risultati ottenuti potrebbero, pertanto, costituire un'utile premessa alla formulazione di nuovi farmaci antivirali.

Precedenti risultati del gruppo di ricerca hanno evidenziato che il citoscheletro cellulare svolge un importante ruolo regolatorio sul ciclo replicativo del virus influenza A in diversi modelli cellulari di mammifero ^{46,168-171}. In particolare, tali studi hanno messo in luce il ruolo della stabilizzazione dei microfilamenti e dei microtubuli quale fattore di restrizione nei confronti dell'infezione con il virus influenza A/NWS/33 (H1N1).

Dal momento che sussistono limitate evidenze relative alla partecipazione dei filamenti intermedi alla regolazione del ciclo replicativo del virus influenza, il progetto di ricerca è stato focalizzato su tale componente del citoscheletro. In particolare, si è voluto sondare il ruolo di citocheratina 8, come anche del suo stato fosforilato, traendo le premesse da

precedenti osservazioni, che ne attestano il coinvolgimento in condizioni non fisiologiche, quali l'infezione virale ^{135,146,147}, l'oncogenesi ^{139,172} e alcune epatopatie ¹⁴⁶.

Nello specifico, il progetto svolto nel Dottorato di Ricerca ha, come scopo principale, quello di sondare il coinvolgimento di citocheratina 8 nella modulazione di fasi precoci dell'infezione del virus influenza A/NWS/33 in cellule LLC-MK2 (rene di scimmia: modello semi-permissivo) e A549 (polmone umano: modello permissivo). In particolare, saranno valutati gli effetti della modulazione della fosforilazione di citocheratina 8, una modificazione post-traduzionale dei filamenti intermedi, sull'infezione virale.

MATERIALI E METODI

Colture cellulari

Nelle fasi sperimentali venivano impiegate le seguenti linee cellulari:

- cellule simil-epiteliali in linea continua di rene di scimmia (LLC-MK2);
- cellule simil-epiteliali in linea continua di rene di cane (MDCK);
- cellule simil-epiteliali in linea continua di polmone umano (A549).

Le cellule LLC-MK2 e MDCK venivano coltivate in terreno Minimum Essential Medium Eagle (E-MEM), mentre le cellule A549 in terreno Ham's F-12, in presenza di L-glutammina (2 mM), antibiotici (penicillina 100 U/ml e streptomicina 100 µg/ml) e siero di vitello fetale (10%: terreno di crescita; 1%: terreno di mantenimento) (EuroClone). Le colture cellulari venivano incubate a 37°C in presenza di CO₂ al 5%. Le suddette colture cellulari sono state acquistate presso l'“Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna”.

Virus

Per le infezioni sperimentali, veniva impiegato il ceppo di virus influenza umano A/NWS/33 (ATCC N°VR-219), con caratteristiche antigeniche H1N1. Tale stipite era stato precedentemente propagato in uova embrionate di pollo, titolato mediante metodo delle placche e conservato a -80°C ¹⁶⁸.

Anticorpi

Per il saggio di immunofluorescenza indiretta, venivano impiegati anticorpi monoclonali di topo anti-NP (Argene/BioMérieux; diluizione 1:30) e anti-proteina di fusione del virus respiratorio sinciziale (Argene/BioMérieux; diluizione 1:30). Inoltre, venivano impiegati

anticorpi policlonali di coniglio anti-K8 (ThermoFischer Scientific; diluizione 1:100), anticorpi policlonali di coniglio anti-K8 fosforilata a livello della molecola serina 432 (pK8) (ThermoFischer Scientific; diluizione 1:100) e anticorpi policlonali di capra anti-RhebL1 (Santa Cruz Biotechnology; diluizione 1:15). L'immunoreazione veniva rivelata utilizzando, rispettivamente, anticorpi secondari anti-topo coniugati con isotiocianato di rodamina (RITC) (Molecular Probes; diluizione 1:470), anticorpi secondari anti-coniglio coniugati con isotiocianato di fluoresceina (FITC) (Li StarFish; diluizione 1:70) e anticorpi secondari anti-capra coniugati con RITC (Molecular Probes; diluizione 1:500).

Per il saggio di Western blotting, venivano utilizzati degli anticorpi policlonali di coniglio anti-K8 (diluizione 1:3.000) e anticorpi policlonali di coniglio anti-pK8 (diluizione 1:500). L'immunoreazione veniva rivelata utilizzando degli anticorpi anti-immunoglobuline di coniglio coniugati con fosfatasi alcalina (Sigma-Aldrich; diluizione 1:5.000).

Infezione virale di monostrati cellulari

Le cellule LLC-MK2 e A549 venivano coltivate per 48 ore in "shell vials" o in piastre di Petri a bassa densità iniziale, fino al raggiungimento della confluenza. Dopo aver effettuato due lavaggi con terreno di coltura E-MEM/Ham's F-12 senza siero di vitello fetale (E-MEM-S/Ham's F-12 -S), le cellule venivano infettate con una sospensione virale allestita in terreno E-MEM-S/Ham's F-12 -S e calcolata in funzione della molteplicità di infezione (unità formanti placca, u.f.p./cellula; m.o.i.) desiderata. Le cellule venivano centrifugate, in presenza dell'inoculo virale, a 1.000 rotazioni per minuto (rpm) per 45 minuti a 4°C (centrifuga "Eppendorf centrifuge 5810 R", Eppendorf AG) e poi incubate per 25 minuti a 4°C, allo scopo di consentire il legame del virus ai recettori cellulari e di impedirne la penetrazione all'interno delle cellule. L'inoculo virale veniva, quindi,

eliminato e sostituito con E-MEM-S/Ham's F-12 -S. I monostrati cellulari infettati venivano, infine, incubati a 37°C per i tempi prestabiliti di infezione.

Trattamento con sostanze in grado di modificare l'assetto e la fosforilazione dei filamenti intermedi

I monostrati di cellule LLC-MK2 e A549 venivano trattati per i tempi previsti dal protocollo sperimentale con le sostanze di seguito elencate:

- acrilammide (ACRYL; Bio-Rad), applicata ai monostrati cellulari alla concentrazione 5 mM;
- acido okadaico (9,10-deepithio-9,10-didehydroacanthifolicin; OA; Sigma-Aldrich), applicato ai monostrati cellulari alla concentrazione 0,05 µg/ml;
- 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA), denominato anche forbolo 12-miristato 13-acetato (Sigma-Aldrich), applicato ai monostrati cellulari alle concentrazioni 25 nM (LLC-MK2) e 50 nM (A549).

I trattamenti con le suddette sostanze venivano effettuati a 37°C.

Immunofluorescenza indiretta

Dopo aver effettuato l'infezione sperimentale e/o i trattamenti con sostanze chimiche, i monostrati cellulari venivano lavati con tampone fosfato salino (PBS; pH=7,4) [Na_2HPO_4 (2 H_2O) 137 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; NaCl 135 mM; KCl 2,7 mM] a temperatura ambiente e, in seguito, fissati con metanolo per 5 minuti a -20°C.

I monostrati cellulari venivano poi saturati per 20 minuti con sieroalbumina bovina (BSA; pH=8,0) all'1% in PBS a temperatura ambiente e, successivamente, incubati in camera umida per 1 ora a 37°C, in presenza dell'anticorpo primario diluito in BSA allo 0,2% in PBS. Dopo aver effettuato tre lavaggi con PBS (5 minuti per ciascun lavaggio) a

temperatura ambiente, l'immunoreazione veniva rivelata utilizzando anticorpi secondari diluiti in BSA allo 0,2% in PBS. L'anticorpo secondario veniva lasciato in incubazione per 45 minuti a 37°C in camera umida. I monostrati cellulari venivano, in seguito, lavati con PBS per tre volte (5 minuti per ciascun lavaggio) a temperatura ambiente e montati con liquido di montaggio (Argene/BioMérieux) su vetrino portaoggetti.

Le cellule venivano, infine, osservate con microscopio a fluorescenza (Leica-DMLB), impiegando un obiettivo a secco (ingrandimento 200X) o, alternativamente, a immersione (ingrandimento 500X).

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

Le reazioni di immunofluorescenza indiretta sono state eseguite in almeno due esperimenti indipendenti.

Analisi dell'espressione della nucleoproteina virale

Allo scopo di determinare l'espressione della proteina NP mediante immunofluorescenza, venivano selezionati dieci campi focali rappresentativi per ogni monostrato cellulare e le cellule positive per la NP venivano espresse come valore medio percentuale, rispetto al numero totale di cellule. Tale numero veniva determinato mediante marcaggio della cromatina nucleare con 4',6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI) (Sigma-Aldrich), utilizzato alla concentrazione 2,5 µg/ml, nella miscela allestita in BSA allo 0,2% in PBS e contenente gli anticorpi secondari.

Silenziamento del gene RhebL1 con RNA interferenti

Per silenziare il gene RhebL1, veniva impiegata una sequenza di oligonucleotidi diretta contro l'RNA messaggero codificante per la proteina RhebL1. Le sequenze di RNA

interferenti (“small interfering RNAs”, siRNAs) impiegate sono state disegnate commercialmente (Sigma-Aldrich) e vengono di seguito riportate:

5'– GCAGGAUGAGUACAGCAUU – 3'

3'– CGUCCUACUCAUGUCGUAA – 5'.

Le cellule LLC-MK2 e A549 venivano coltivate per 24 ore in “shell vials” a bassa densità iniziale, fino al raggiungimento di una condizione di semi-confluenza. In seguito, i monostrati cellulari venivano trattati con RNA interferenti rivolti contro RhebL1 alla concentrazione 15 nM, utilizzando il kit di trasfezione “MISSION® siRNA Transfection Reagent” (Sigma-Aldrich), sulla base delle indicazioni fornite dalla ditta produttrice. Come controllo veniva utilizzata una sequenza siRNA che non riconosceva alcun gene (controllo negativo). Dopo 48 ore di trasfezione, i monostrati cellulari venivano infettati con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione) e, infine, fissati in metanolo, prima di effettuare la reazione di immunofluorescenza.

Il silenziamento del gene RhebL1 è stato effettuato in almeno due esperimenti indipendenti.

Valutazione dell'infettività virale mediante titolazione della dose infettante il 50% delle colture di saggio (TCID₅₀)

Allo scopo di valutare l'infettività della progenie virale emersa dopo un ciclo replicativo in cellule LLC-MK2 e A549, secondo specifiche condizioni sperimentali, il mezzo di coltura dei monostrati cellulari veniva impiegato per la titolazione TCID₅₀. Allo scopo, venivano allestite in E-MEM-S diluizioni seriali in base dieci dei campioni da titolare. Una volta allestite le diluizioni, veniva utilizzata una piastra da 96 pozzetti, nella quale, per ciascuna diluizione, venivano distribuiti 100 µl in quattro pozzetti. Inoltre, nella piastra venivano riservati due pozzetti per il controllo cellule, in cui venivano distribuiti 100 µl di

E-MEM-S, e due pozzetti per il controllo infezione, nel quale venivano dispensati 100 µl del mezzo di coltura dei monostrati infettati non diluito. Infine, ad ogni pozzetto venivano aggiunti 100 µl di sospensione di cellule MDCK ($2,16 \times 10^5$ cellule/ml) allestita in terreno E-MEM al 2,5% di siero scomplementato a 56°C per 30 minuti. La piastra veniva successivamente incubata in termostato a 37°C e osservata quotidianamente, per 4-5 giorni, al fine di valutare la comparsa dell'effetto citopatico. Il titolo veniva determinato in accordo con il protocollo sperimentale elaborato da Reed e Muench ¹⁷³.

La valutazione dei titoli della progenie virale è stata effettuata in almeno due esperimenti indipendenti.

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

Le cellule LLC-MK2 e A549, cresciute a confluenza in piastre di Petri e sottoposte o meno a trattamenti chimici e all'infezione virale, venivano, in seguito, raccolte in PBS con uno "scraper" e centrifugate a 1.000 rpm, per 5 minuti a 4°C (centrifuga "Eppendorf centrifuge 5415 R", Eppendorf AG). Dopo aver aspirato il sopranatante, il sedimento cellulare veniva risospeso in tampone di Laemmli [Tris-HCl (pH=6,8) 1 M; saccarosio 12%; β-mercaptoetanolo 2%; dodecilsolfato di sodio (SDS) 2%; tracce di blu di bromofenolo] e, successivamente, scaldato per 5 minuti a 95°C. Infine, i campioni venivano conservati a -20°C, prima dell'analisi elettroforetica. L'elettroforesi veniva effettuata con il sistema Mini-Protean Tetra Cell (Bio-Rad), sfruttando la combinazione di un gel di impacchettamento ("stacking gel") [acrilammide 4%; bis-acrilammide 0,1%; Tris-HCl (pH=6,8) 0,12 M; SDS 0,1%; persolfato di ammonio (APS) 0,12%; N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) 0,13%] e un gel di separazione ("running gel") [acrilammide 13%; bis-acrilammide 0,3%; Tris-HCl (pH=8,7) 0,4 M; SDS 0,1%; APS 0,05%; TEMED 0,06%]. Nei pozzetti preformati del gel di "stacking", venivano caricate

uguali quantità di proteine (20 µg) per ciascun campione. Inoltre, un pozzetto del gel veniva utilizzato per caricare una miscela di proteine a peso molecolare noto (14,4-97,4 kDa; SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Low Range, Bio-Rad). La migrazione elettroforetica avveniva in apposito tampone (Tris 37,5 mM; glicina 0,3 M; SDS 0,1%), a 100 V costanti, per circa 2 ore.

Western blotting

Una volta terminata la migrazione su gel, le proteine venivano trasferite elettroforeticamente su membrana di nitrocellulosa (Bio-Rad) in apposito tampone (Tris 25 mM; glicina 192 mM; SDS 0,35 mM; metanolo 20%), mediante l'utilizzo del sistema Mini Trans Blot Cell (Bio-Rad), a 20 V costanti, per 15-18 ore, a 4°C. Dopo il trasferimento, la membrana di nitrocellulosa veniva saturata per 30 minuti con latte magro, mantenendola in agitazione costante e a temperatura ambiente, in modo da impedire il legame aspecifico degli anticorpi alla sua superficie. In seguito, la membrana veniva incubata per 1 ora e 30 minuti con anticorpi primari diluiti in latte magro, in agitazione costante e a temperatura ambiente. La membrana veniva lavata per tre volte con PBS (10 minuti per ciascun lavaggio) a temperatura ambiente e, successivamente, incubata per 1 ora con anticorpi secondari diluiti in PBS, in agitazione costante e a temperatura ambiente. Una volta terminato il periodo di incubazione, la membrana veniva lavata per tre volte con PBS (10 minuti per ciascun lavaggio) a temperatura ambiente e, in seguito, sottoposta a rivelazione, mediante impiego del substrato dell'enzima fosfatasi alcalina (Sigma fast BCIP/NBT tablet; Sigma-Aldrich) e fino allo sviluppo di una reazione colorimetrica.

Il saggio di Western blotting è stato effettuato, per ciascuna condizione sperimentale, in almeno due esperimenti indipendenti.

Microscopia confocale

Dopo aver effettuato la reazione di immunofluorescenza indiretta, sono stati condotti studi di microscopia confocale nelle cellule LLC-MK2 e A549, al fine di valutare la localizzazione subcellulare della proteina NP in rapporto alle proteine K8 e pK8. A tal fine, è stato impiegato un microscopio confocale invertito Zeiss LSM 510 META con un obiettivo a immersione 63x 1,4 NA.

Il segnale corrispondente alla lunghezza d'onda di 488 nm (FITC) veniva acquisito con un laser ad argon e l'emissione veniva registrata nelle lunghezze d'onda di 505-530 nm. Il segnale corrispondente alla lunghezza d'onda di 543 nm (RITC) veniva acquisito con un laser ad elio-neon e l'emissione veniva registrata nelle lunghezze d'onda di 560-615 nm. Per ciascun campione è stata acquisita una serie di sezioni dello spessore di 0,39 μm ciascuna. In parallelo, sono stati esaminati dei monostrati immunomarcati solo con anticorpi secondari (controlli negativi) per confermare la specificità dei segnali osservati. Dalla sovrapposizione di ciascuna immagine derivante dall'emissione di segnale del fluorocromo RITC con la relativa immagine derivante dall'emissione di segnale del fluorocromo FITC è stata generata una nuova immagine in cui le aree di co-localizzazione tra le proteine oggetto di studio appaiono in colore giallo/arancio.

Per l'analisi della co-localizzazione, dalla sovrapposizione di ciascuna immagine è stato generato un diagramma a dispersione del numero di "pixel" derivanti dall'emissione di segnale del fluorocromo RITC, rapportati a quelli derivanti dall'emissione di segnale del fluorocromo FITC. I coefficienti di co-localizzazione ponderata calcolati rappresentano la somma dell'intensità dei "pixel" co-localizzanti (rivelati in colore giallo/arancio) nei canali rosso e verde, rispetto alla somma complessiva dell'intensità dei "pixel" che si trovano al di sopra del valore soglia. Il coefficiente di co-localizzazione ponderata può assumere valori che vanno da 0 (nessuna co-localizzazione) a 1 (tutti i "pixel" co-

localizzano). I “pixel” di intensità più rilevante contribuiscono maggiormente alla determinazione della co-localizzazione ponderata, rispetto a quelli di debole intensità. I coefficienti di co-localizzazione ponderata sono stati ottenuti con il software gestionale del microscopio Zeiss LSM 510 META.

Allestimento di sedimenti cellulari e immunofluorescenza indiretta

Campioni dell'apparato respiratorio (tamponi faringei e aspirati naso-faringei), prelevati da pazienti pediatrici ricoverati od osservati ambulatorialmente presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma e conservati a 4°C in terreno di trasporto per virus [soluzione salina bilanciata di Hank; BSA 0,5%; fungizone 5 µg/ml; penicillina 200 U/ml; streptomycin 0,2 mg/ml], sono pervenuti presso l'Unità Operativa di Virologia per la diagnosi di infezione da virus dell'apparato respiratorio. Tali campioni venivano sottoposti ad agitazione meccanica su vortex e, successivamente, trasferiti in provette, prima di essere centrifugati a 1.000 rpm, per 10 minuti a 4°C (centrifuga “Eppendorf centrifuge 5810 R”, Eppendorf AG). Il sedimento cellulare ottenuto veniva risospeso in 5 ml di PBS e nuovamente centrifugato a 1.000 rpm, per 10 minuti, a 4°C.

Dopo aver eliminato il sopranatante, il sedimento cellulare veniva risospeso in 0,2 ml di PBS e trasferito su vetrino portaoggetto, mediante citocentrifugazione a 1.000 rpm (centrifuga “Shandon Cytospin 3”, Shandon Southern Instruments, Inc.), per 5 minuti a temperatura ambiente. Il preparato ottenuto veniva fissato in acetone, per 10 minuti, a -20°C, lasciato asciugare a temperatura ambiente e, infine, conservato a -20°C, prima di essere sottoposto a immunofluorescenza indiretta.

I sedimenti cellulari allestiti su vetrino portagetto, dopo essere stati scongelati e delimitati con DakoPen (Dako), venivano sottoposti a immunoreazione. I sedimenti cellulari venivano reidratati con PBS e poi saturati per 20 minuti con BSA all'1% in PBS.

Successivamente, i sedimenti cellulari venivano incubati per 45 minuti a 37°C in camera umida, in presenza degli anticorpi primari, opportunamente diluiti in BSA allo 0,2% in PBS. Venivano, in seguito, effettuati due lavaggi con PBS (5 minuti per ciascun lavaggio) a temperatura ambiente. L'immunoreazione veniva rivelata con anticorpi secondari, diluiti in BSA allo 0,2% in PBS, e lasciati in incubazione, per 35 minuti a 37°C, in camera umida. Successivamente, venivano effettuati due lavaggi con PBS (5 minuti per ciascun lavaggio), a temperatura ambiente, dei sedimenti cellulari, che venivano poi lasciati asciugare al riparo dalla luce. Infine, sui sedimenti cellulari veniva dispensato il liquido di montaggio (Argene/BioMérieux) e posizionato un vetrino coprioggetto. I preparati venivano osservati con microscopio a fluorescenza (Leica-DMLB) con obiettivo a immersione (ingrandimento 500X).

Le osservazioni sperimentali sono state effettuate su sedimenti cellulari allestiti a partire da dieci campioni clinici.

Analisi statistica

I dati sperimentali relativi all'espressione della NP e alla titolazione della progenie virale venivano rappresentati graficamente previo calcolo della media aritmetica derivante da tre distinti esiti sperimentali e della relativa deviazione standard.

La significatività dei risultati veniva appurata impiegando il test *t* di Student. L'analisi statistica veniva condotta con il software GraphPad Prism (versione 5.0 per Windows). Il valore $P < 0,05$ (indicato con il simbolo *) veniva considerato statisticamente significativo e $P > 0,05$ (indicato con "n.s.") non significativo.

RISULTATI

1. EFFETTI DELLA DEPOLIMERIZZAZIONE DEI FILAMENTI INTERMEDI SULL'INFEZIONE SPERIMENTALE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33 (H1N1) IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO

Precedenti osservazioni del gruppo di ricerca hanno evidenziato che la modificazione del sistema citoscheletrico dei filamenti intermedi esercita un effetto inibitorio sulla replicazione del virus influenza aviare A/FPV/Ulster 73 (H7N1), in quanto compromette la sintesi proteica della cellula ospite ¹⁷⁴.

Nell'ambito delle proteine che compongono i filamenti intermedi, l'attenzione è stata focalizzata su citocheratina 8, al fine di valutarne le implicazioni nell'infezione del virus influenza A/NWS/33 (H1N1), condotta, a confronto, nelle cellule LLC-MK2 (rene di scimmia: modello semi-permissivo) e A549 (polmone umano: modello permissivo). Inoltre, è stato sondato il ruolo regolatorio di una modificazione post-traduzionale di citocheratina 8, la fosforilazione, nota per favorire il disassemblaggio dei filamenti intermedi.

1.1. Effetti indotti dal trattamento con acrilammide sui filamenti intermedi

Allo scopo di valutare il possibile intervento dei filamenti intermedi nella regolazione del ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 nei modelli cellulari di mammifero oggetto di studio, in una prima fase sperimentale è stata impiegata la sostanza acrilammide, in quanto è in grado di provocarne la depolimerizzazione.

L'analisi, mediante saggio di immunofluorescenza indiretta, degli effetti indotti dal trattamento con acrilammide, che veniva applicata per 8 ore ai monostrati delle cellule

LLC-MK2 e A549, ha messo in luce delle profonde ripercussioni sull'assetto dei filamenti intermedi, rivelati tramite un anticorpo in grado di riconoscere citocheratina 8 (Figura 1).

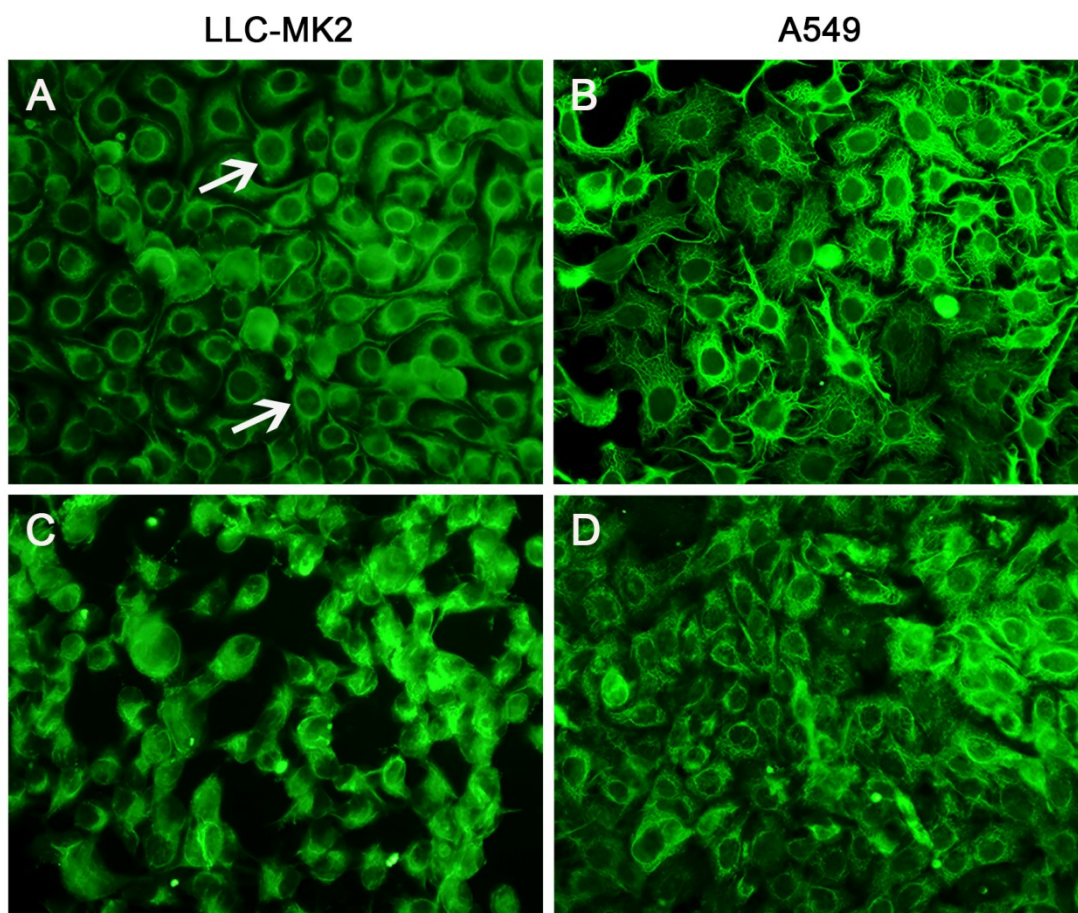


Figura 1. Effetti indotti da acrilammide su citocheratina 8 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 (A, C) e A549 (B, D), non trattate (A, B) o trattate (C, D) con acrilammide (5 mM) per 8 ore, venivano fissate e, in seguito, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare citocheratina 8. I preparati venivano osservati con microscopio a fluorescenza (ingrandimento 500x).

Il tempo di trattamento con acrilammide è stato individuato sulla base di esperimenti preliminari (dati non mostrati), che hanno evidenziato come la comparsa di modificazioni dei filamenti intermedi facilmente osservabili richieda almeno 8 ore.

In cellule in condizioni fisiologiche, citocheratina 8 presenta un'organizzazione filamentosa contraddistinta da una distribuzione radiale, che si estende dalla regione perinucleare verso la periferia della cellula (Figure 1A e 1B). Nelle cellule A549,

l'espressione di citocheratina 8 è maggiore, rispetto alle cellule LLC-MK2, dove peraltro la componente filamentosa risulta assai scarsa (Figura 1B vs 1A). Inoltre, nelle cellule LLC-MK2 si osserva una prevalente localizzazione di citocheratina 8 nella regione perinucleare (freccette nella Figura 1A), al contrario delle cellule A549, dove la distribuzione della stessa appare maggiormente omogenea.

Il trattamento con acrilammide provoca un addensamento di citocheratina 8 nella regione perinucleare in entrambi i modelli allo studio e, inoltre, causa la depolimerizzazione della componente filamentosa (Figura 1C vs 1A e 1D vs 1B). Tali modificazioni sono più pronunciate nelle cellule LLC-MK2 (Figura 1C vs 1D).

1.2. Effetti indotti dal trattamento con acrilammide sull'infezione del virus influenza A/NWS/33

Dal momento che i risultati precedenti hanno evidenziato delle rilevanti ripercussioni indotte da acrilammide sull'assetto di citocheratina 8, l'attenzione è stata successivamente focalizzata sul ciclo replicativo del virus NWS/33, condotto in presenza della sostanza.

L'analisi, mediante saggio di immunofluorescenza indiretta, ha rivelato un aumento statisticamente significativo dell'espressione di NP nelle cellule LLC-MK2 e A549 infettate con il virus NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione), qualora acrilammide venga applicata per 4 ore prima dell'infezione (pre-trattamento) e mantenuta per le prime 4 ore della stessa (Figura 2A). Tale condizione sperimentale, che aveva lo scopo di indurre delle modificazioni evidenti dei filamenti intermedi durante le fasi precoci del ciclo replicativo virale, è stata adottata a seguito delle osservazioni desunte dagli esperimenti precedenti, dove il tempo di trattamento con acrilammide era pari a 8 ore.

Inoltre, la bassa molteplicità d'infezione prescelta era funzionale a evidenziare la semi-permissività delle cellule LLC-MK2 ¹⁶⁸.

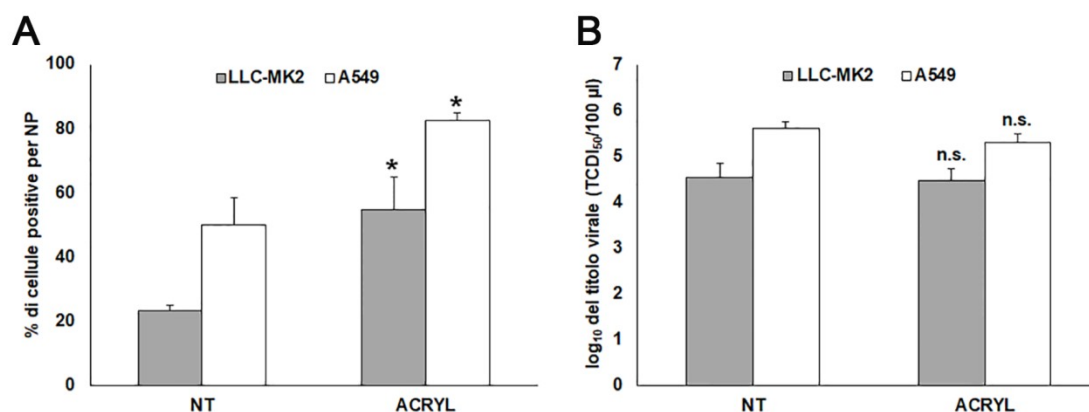


Figura 2. Effetti indotti da acrilammide sul ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 e A549 venivano non trattate (NT) o pre-trattate (ACRYL) con la sostanza acrilammide (5 mM) per 4 ore e, successivamente, infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore) in assenza (NT) o in presenza (ACRYL) della sostanza per le prime 4 ore dell'infezione. Nei grafici sono rappresentati: (A) la percentuale di cellule positive per la NP, che veniva determinata mediante reazione di immunofluorescenza indiretta, rispetto alla popolazione cellulare totale; (B) i valori logaritmici dei titoli della progenie virale emersa, che venivano determinati mediante il saggio TCDI₅₀. I valori di significatività (* = $P < 0,05$ e n.s. = $P > 0,05$) sono stati calcolati con il test t di Student, rispetto ai relativi controlli.

In parallelo, i titoli della progenie virale emersa da cellule LLC-MK2 e A549, trattate o non trattate con acrilammide come sopra descritto, venivano determinati con il saggio TCDI₅₀ (Figura 2B). I dati ottenuti hanno evidenziato che la depolimerizzazione dei filamenti intermedi nel corso di fasi precoci dell'infezione comporta una diminuzione, sebbene non statisticamente significativa, dell'efficienza replicativa del virus NWS/33 in entrambi i modelli cellulari.

2. ANALISI DELLA FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8 IN CORSO DI INFEZIONE SPERIMENTALE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33 IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO

2.1. Analisi del livello di espressione e fosforilazione di citocheratina 8

L'analisi dell'espressione e della fosforilazione di citocheratina 8 nelle cellule LLC-MK2 e A549 è stata effettuata mediante saggio di immunofluorescenza indiretta (Figura 3).

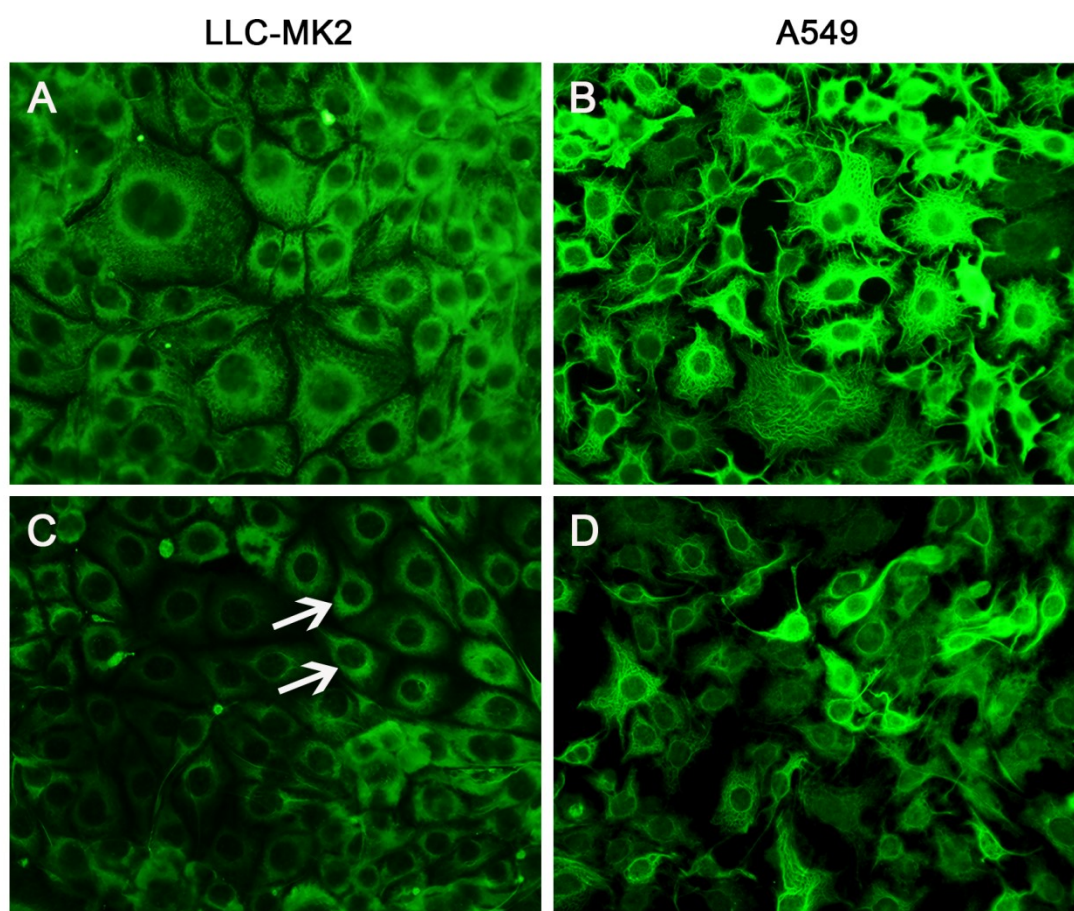


Figura 3. Analisi dell'espressione e della fosforilazione di citocheratina 8 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 (A, C) e A549 (B, D) venivano fissate e, in seguito, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare citocheratina 8 (A, B) e citocheratina 8 fosforilata (C, D). I preparati venivano osservati con microscopio a fluorescenza (ingrandimento 500x).

I risultati ottenuti confermano la minore espressione e organizzazione in filamenti di citocheratina 8 nelle cellule LLC-MK2, rispetto ad A549 (Figura 3A vs 3B).

Per quanto riguarda la componente fosforilata di citocheratina 8, è stato osservato un esiguo livello di espressione in entrambi i modelli cellulari, sebbene lievemente più accentuato in cellule A549 (Figura 3D vs 3C). Inoltre, tale componente presenta una distribuzione citoplasmatica più omogenea nelle cellule A549, rispetto a LLC-MK2, dove si notano degli addensamenti della proteina nella regione perinucleare di numerose cellule del monostrato (Figura 3D vs frecce nella Figura 3C).

2.2. Effetti della replicazione del virus influenza A/NWS/33 sull'espressione e fosforilazione di citocheratina 8

Allo scopo di appurare il coinvolgimento di citocheratina 8 nel ciclo replicativo virale nelle cellule LLC-MK2 e A549, sono stati successivamente valutati gli effetti indotti su tale proteina dall'infezione con il virus NWS/33. A tal fine, l'infezione veniva condotta per diversi intervalli di tempo (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula; 2 ore, 4 ore, 8 ore e 24 ore) (Figura 4). Dall'analisi, effettuata mediante saggio di immunofluorescenza indiretta, emerge che la replicazione virale non comporta delle sostanziali modificazioni nell'espressione e organizzazione di citocheratina 8 in entrambi i modelli cellulari, se non in fasi tardive dell'infezione. Infatti, dopo 24 ore di infezione si osserva una diminuzione dell'espressione di citocheratina 8 e la perdita della sua consueta conformazione radiale. Inoltre, si evidenzia un collasso dei filamenti di citocheratina 8 nella regione perinucleare di numerose cellule (frecce nelle Figure 4O e 4P).

Per quanto riguarda, invece, citocheratina 8 fosforilata, in fasi tardive dell'infezione (*i.e.* a partire da 8 ore e fino a 24 ore di infezione) nelle cellule LLC-MK2 si osserva una parziale perdita dell'addensamento perinucleare e del livello di espressione presenti in cellule non infettate, come anche nel corso di fasi precoci dell'infezione (Figure 4M e 4Q vs 4C e 4G). Al contrario, nelle cellule A549, l'espressione di citocheratina 8 fosforilata aumenta

progressivamente in corso di infezione, a partire già da 2 ore (dati non mostrati) e raggiunge la massima espressione a 24 ore (Figure 4H, 4N e 4R vs 4D). Tale aumento si osserva soprattutto a livello della regione perinucleare della maggior parte delle cellule del monostrato.

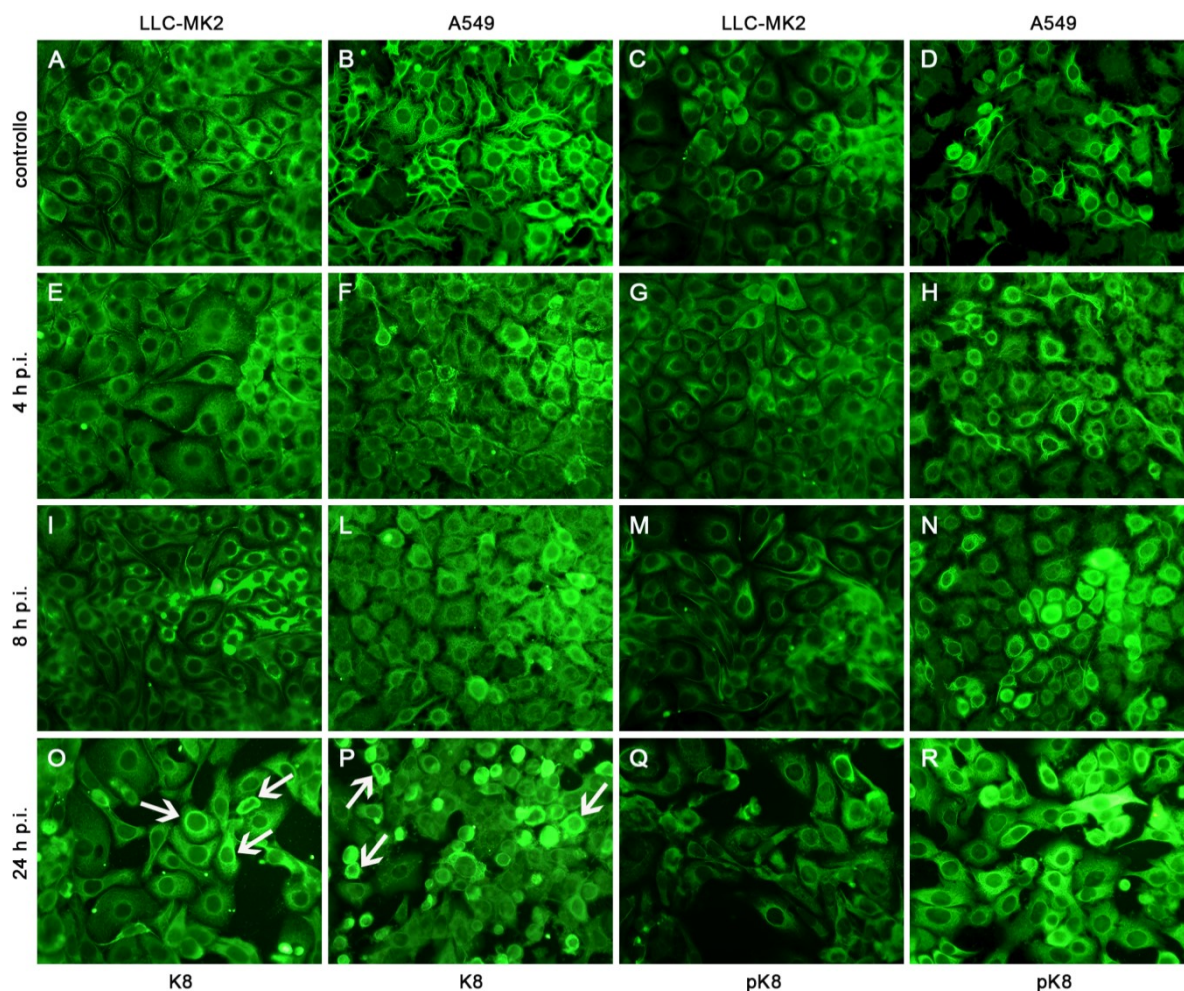


Figura 4. Analisi dell'espressione e della fosforilazione di citocheratina 8 in corso di infezione con il virus influenza A/NWS/33 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 e A549 venivano non infettate (A-D), oppure infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 2 u.f.p./cellula) (E-R) per 2 ore (dati non mostrati), 4 ore (E-H), 8 ore (I-N) e 24 ore (O-R), rispettivamente. Le cellule venivano successivamente sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare citocheratina 8 (A, B, E, F, I, L, O, P) e citocheratina 8 fosforilata (C, D, G, H, M, N, Q, R). I preparati venivano osservati con microscopio a fluorescenza (ingrandimento 500x).

3. EFFETTI DELLA MODULAZIONE DELLA FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8 INDOTTA DA SOSTANZE CHIMICHE SULL'INFEZIONE SPERIMENTALE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33 IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO

3.1. Effetti del trattamento con acido okadaico e con 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA) sull'assetto e sulla fosforilazione di citocheratina 8

Dal momento che i risultati precedenti hanno messo in luce delle differenze per quanto riguarda la fosforilazione di citocheratina 8 nei due modelli cellulari allo studio, sia in condizioni fisiologiche sia in corso di infezione virale, è stato successivamente impiegato un inibitore delle fosfatasi 1 e 2A (acido okadaico), allo scopo di valutarne le ripercussioni in cellule non infettate o infettate.

L'analisi, mediante saggio di immunofluorescenza indiretta, degli effetti indotti dal trattamento con acido okadaico è mostrata nella Figura 5. In particolare, è possibile osservare che nei due modelli cellulari allo studio il livello di fosforilazione di citocheratina 8, che è di lieve entità (Figure 5A e 5B), viene modulato in maniera differente dal trattamento con la sostanza, applicata ai monostrati cellulari per 4 ore. Infatti, nelle cellule LLC-MK2 trattate con acido okadaico si osserva in circa il 20% delle cellule del monostrato un lieve aumento della fosforilazione, soprattutto nella regione perinucleare (frecche nella Figura 5C vs 5A). Al contrario, nelle cellule A549 sono state osservate delle modificazioni di grande rilievo, ossia la comparsa di "granuli" di citocheratina 8 fosforilata di dimensioni variabili, e, conseguentemente, la perdita della sua conformazione radiale (Figura 5D vs 5B).

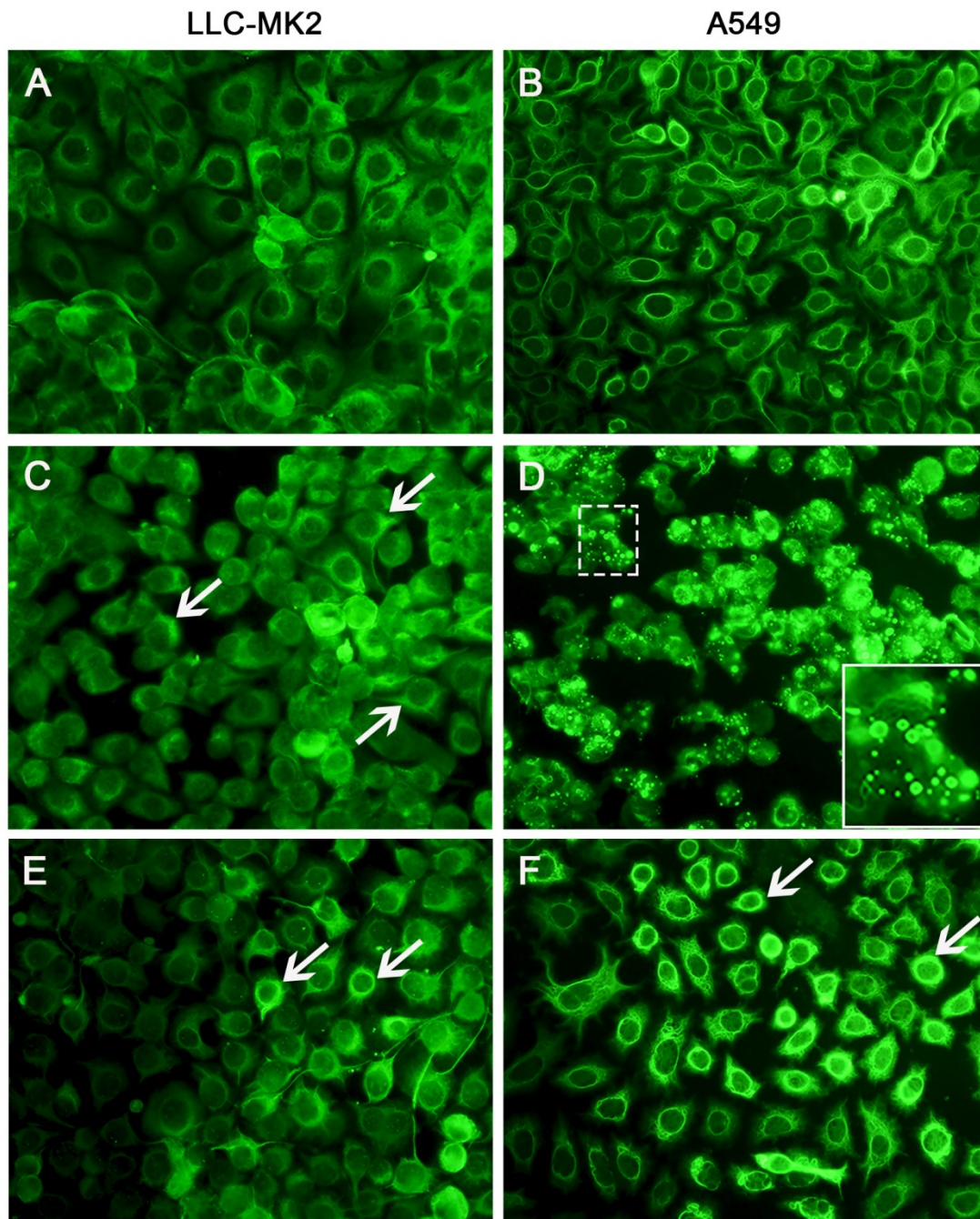


Figura 5. Analisi della modulazione della fosforilazione di citocheratina 8 mediante trattamento con acido okadaico e TPA in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 (A, C, E) e A549 (B, D, F) venivano non trattate (A, B) o trattate con acido okadaico (0,05 µg/ml) (C, D) per 4 ore oppure con TPA (LLC-MK2: 25 nM; A549: 50 nM) (E, F) per 1 ora e 20 minuti. Le cellule venivano, in seguito, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare citocheratina 8 fosforilata. I preparati venivano osservati con microscopio a fluorescenza (ingrandimento 500x). (D) Un ingrandimento, pari a 4 volte (2.000x), dell'area contrassegnata con una linea tratteggiata viene mostrato nella parte inferiore destra dell'immagine.

Successivamente, sono stati sondati gli effetti del trattamento con TPA, un attivatore dell'enzima protein-chinasi C (PKC), che veniva applicato ai monostrati cellulari per 1 ora

e 20 minuti (25 nM nelle cellule LLC-MK2 e 50 nM nelle cellule A549). Il tempo di trattamento con TPA è stato individuato sulla base di esperimenti preliminari (dati non mostrati), che hanno evidenziato come la comparsa di modificazioni dei filamenti intermedi richieda tempi assai brevi (1 ora circa).

Il trattamento con TPA causa la depolimerizzazione dei filamenti di citocheratina 8 fosforilata in entrambi i modelli allo studio, oltre a un addensamento degli stessi in regione perinucleare (freccie nelle Figure 5E e 5F vs 5A e 5B). Inoltre, la sostanza determina un aumento della fosforilazione di citocheratina 8 in entrambi i modelli cellulari (Figura 5E vs 5A e 5F vs 5B) e, in maniera più evidente, nelle cellule A549 (Figura 5F vs 5E).

3.2. Effetti del trattamento con acido okadaico e con TPA sull'infezione del virus influenza A/NWS/33

In una fase sperimentale successiva, sono stati saggiati gli effetti indotti dalle sostanze acido okadaico e TPA sul ciclo replicativo del virus NWS/33.

L'analisi, mediante saggio di immunofluorescenza indiretta, degli effetti indotti dal trattamento con acido okadaico (Figura 6A) ha rivelato un aumento, sebbene non statisticamente significativo, dell'espressione di NP nelle cellule A549 infettate con il virus NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione), qualora la sostanza venga applicata per 2 ore prima dell'infezione e mantenuta per le prime 2 ore della stessa. Il tempo di trattamento con la sostanza è stato individuato sulla base dei risultati ottenuti in cellule non infettate, dove il tempo di trattamento era pari a 4 ore.

Al contrario, nelle cellule LLC-MK2 trattate con acido okadaico l'espressione di NP diminuisce, sebbene in maniera non statisticamente significativa (Figura 6A).

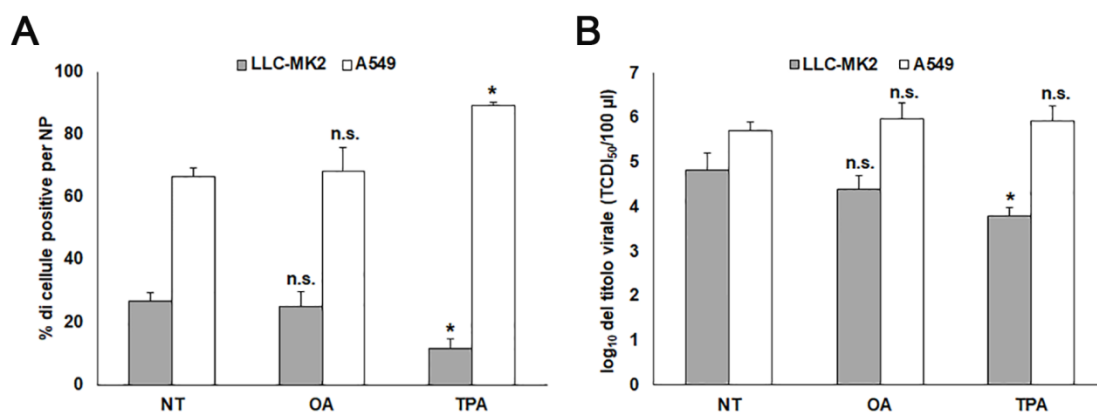


Figura 6. Analisi degli effetti indotti dal trattamento con acido okadaico e TPA sul ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 e A549 venivano non trattate (NT) o pre-trattate con la sostanza acido okadaico (0,05 µg/ml) (OA) per 2 ore oppure con TPA (LLC-MK2: 25 nM; A549: 50 nM) (TPA) per 40 minuti e, successivamente, infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore) in assenza (NT) o in presenza di acido okadaico per le prime 2 ore dell'infezione o di TPA per i primi 40 minuti della stessa. Nei grafici sono rappresentati: (A) la percentuale di cellule positive per la NP, che veniva determinata mediante reazione di immunofluorescenza indiretta, rispetto alla popolazione cellulare totale; (B) i valori logaritmici dei titoli della progenie virale emersa, che venivano determinati mediante il saggio TCID₅₀. I valori di significatività (* = $P < 0,05$ e n.s. = $P > 0,05$) sono stati calcolati con il test *t* di Student, rispetto ai relativi controlli.

L'analisi, mediante saggio di immunofluorescenza indiretta, degli effetti indotti dal trattamento con TPA (Figura 6A) nei due modelli cellulari allo studio, infettati alle condizioni sopra descritte, ha rivelato degli esiti simili a quelli ottenuti con acido okadaico. Infatti, nelle cellule LLC-MK2 è stata osservata una riduzione statisticamente significativa dell'espressione di NP, contrariamente alle cellule A549, dove si assiste a un aumento statisticamente significativo, qualora la sostanza venga applicata per 40 minuti prima dell'infezione (pre-trattamento) e mantenuta per i primi 40 minuti della stessa. Il tempo di trattamento con la sostanza è stato individuato sulla base dei risultati ottenuti in cellule non infettate, dove il tempo di trattamento era pari a 1 ora e 20 minuti. Le condizioni sperimentali adottate avevano lo scopo di indurre delle modificazioni evidenti dell'assetto dei filamenti intermedi durante le fasi precoci del ciclo replicativo virale, evitando, al contempo, l'insorgenza di effetti tossici, come appurato nel corso di

esperimenti preliminari (dati non mostrati) in cui la sostanza veniva applicata per tempi più prolungati.

In parallelo, i titoli della progenie virale emersa dalle cellule LLC-MK2 e A549, trattate o non trattate con acido okadaico e TPA, come sopra descritto, venivano determinati con il saggio TCDI₅₀ (Figura 6B). L'aumento di NP osservato, mediante saggio di immunofluorescenza indiretta, in cellule A549 trattate con acido okadaico è correlato a un aumento, sebbene non statisticamente significativo, dell'efficienza replicativa del virus NWS/33 (Figura 6B). In parallelo, nelle cellule LLC-MK2 si osserva una riduzione della replicazione virale, sebbene non statisticamente significativa (Figura 6B). Il trattamento con TPA comporta un aumento, sebbene non statisticamente significativo, dell'efficienza replicativa del virus NWS/33 nelle cellule A549, contrariamente a LLC-MK2, dove si osserva una riduzione statisticamente significativa della stessa.

3.3. Analisi dell'espressione di citocheratina 8 e della sua componente fosforilata in condizioni fisiologiche e in corso di infezione con il virus influenza A/NWS/33

Allo scopo di approfondire l'analisi dell'espressione di citocheratina 8 e della sua componente fosforilata nelle cellule LLC-MK2 e A549, l'espressione della proteina è stata esaminata mediante saggio di Western blotting.

I risultati ottenuti hanno messo in luce che l'impiego di sostanze chimiche (acido okadaico e TPA) determina delle modificazioni di espressione di citocheratina nei due modelli cellulari esaminati (Figura 7).

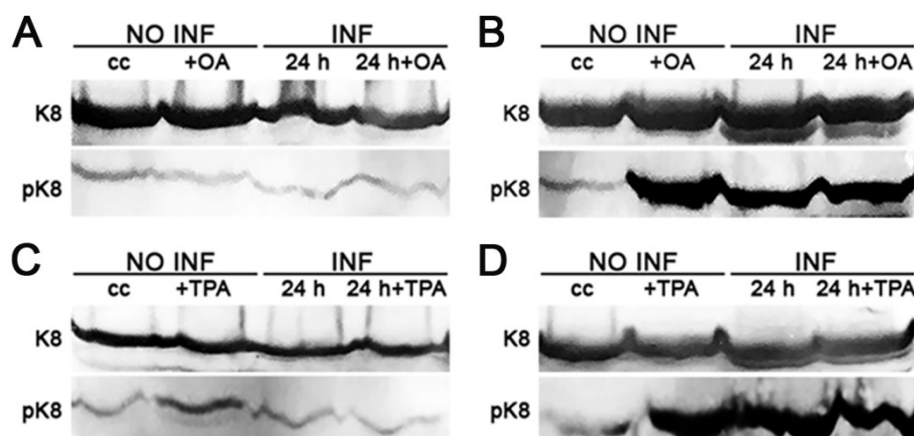


Figura 7. Analisi degli effetti indotti dal trattamento con acido okadaico e TPA sull'espressione di citocheratina 8 e citocheratina 8 fosforilata in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 (A, C) e A549 (B, D) non infettate (NO INF) venivano non trattate (cc) o trattate con acido okadaico (0,05 µg/ml; +OA) per 4 ore, oppure con TPA (LLC-MK2: 25 nM; A549: 50 nM; +TPA) per 80 minuti. In parallelo, le cellule LLC-MK2 e A549 venivano inoculate (INF) con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 1 u.f.p./cellula; 24 ore) non applicando (24 h) o applicando acido okadaico (24 h +OA) per 2 ore e TPA (24 h +TPA) per 40 minuti prima dell'infezione sperimentale. Le sostanze venivano mantenute per le prime 2 ore (OA) e i primi 40 minuti (TPA) di infezione, rispettivamente. In seguito, le cellule venivano analizzate mediante saggio di Western blotting per rivelare citocheratina 8 e citocheratina 8 fosforilata.

In particolare, nelle cellule LLC-MK2 trattate con acido okadaico (Figura 7A) e TPA (Figura 7C) il livello di espressione di citocheratina 8 è di entità pressoché paragonabile a quello presente in cellule in condizioni fisiologiche (Figura 7A: "+OA" vs "cc" e Figura 7C: "+TPA" vs "cc"). L'espressione di tale proteina diminuisce leggermente in seguito a infezione con il virus NWS/33 (m.o.i. = 1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione), sia in assenza (Figure 7A e 7C: "24 h" vs Figure 7A e 7C: "cc"), sia in presenza (Figura 7A: "24 h+OA" e Figura 7C: "24 h+TPA" vs Figure 7A e 7C: "cc") di tali sostanze.

Nelle cellule A549 il trattamento con acido okadaico (Figura 7B) e TPA (Figura 7D) non modifica in maniera sostanziale l'espressione di citocheratina 8 (Figura 7B: "+OA" vs "cc" e Figura 7D: "+TPA" vs "cc"). Al contrario, si osserva un aumento della sua espressione in seguito a infezione con il virus NWS/33, sia in assenza (Figure 7B e 7D: "24 h" vs Figure 7B e 7D: "cc"), sia in presenza (Figura 7B: "24 h+OA" e Figura 7D: "24 h+TPA" vs Figure 7B e 7D: "cc") di tali sostanze.

Per quanto riguarda il livello di fosforilazione di citocheratina 8, il saggio di Western blotting ha evidenziato che nelle cellule LLC-MK2 sia il trattamento con acido okadaico (Figura 7A: "+OA" vs "cc") sia l'infezione con il virus NWS/33 in assenza (Figura 7A: "24 h" vs "cc") o in presenza (Figura 7A: "24 h+OA" vs "cc") di tale sostanza ne causano una lieve diminuzione. Il trattamento con TPA determina, invece, un aumento del livello di espressione di citocheratina 8 fosforilata (Figura 7C: "+TPA" vs "cc"). Inoltre, in seguito a infezione con il virus NWS/33, il livello di espressione di citocheratina 8 fosforilata rimane di entità pressoché paragonabile a quello presente in cellule in condizioni fisiologiche sia in assenza (Figura 7C: "24 h" vs "cc"), sia in presenza (Figura 7C: "24 h+TPA" vs "cc") di tale sostanza.

Nelle cellule A549, la fosforilazione di citocheratina 8 aumenta considerevolmente qualora vengano trattate con acido okadaico (Figura 7B: "+OA" vs "cc") e con TPA (Figura 7D: "+TPA" vs "cc"), sia in condizioni fisiologiche, sia in corso di infezione con il virus NWS/33 (Figura 7B: "24 h" e "24 h+OA" e Figura 7D: "24 h" e "24 h+TPA").

4. ANALISI DELLA LOCALIZZAZIONE SUBCELLULARE DELLA NUCLEOPROTEINA VIRALE A CONFRONTO CON CITOCHERATINA 8 E CITOCHERATINA 8 FOSFORILATA IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO IN CORSO DI INFEZIONE SPERIMENTALE CON IL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33

4.1. Analisi della localizzazione subcellulare di citocheratina 8 e citocheratina 8 fosforilata

Nell'ottica di analizzare la localizzazione subcellulare di citocheratina 8 e della sua componente fosforilata, è stata condotta un'analisi in microscopia confocale, previo saggio di immunofluorescenza indiretta, nelle cellule LLC-MK2 e A549 (Figura 8).

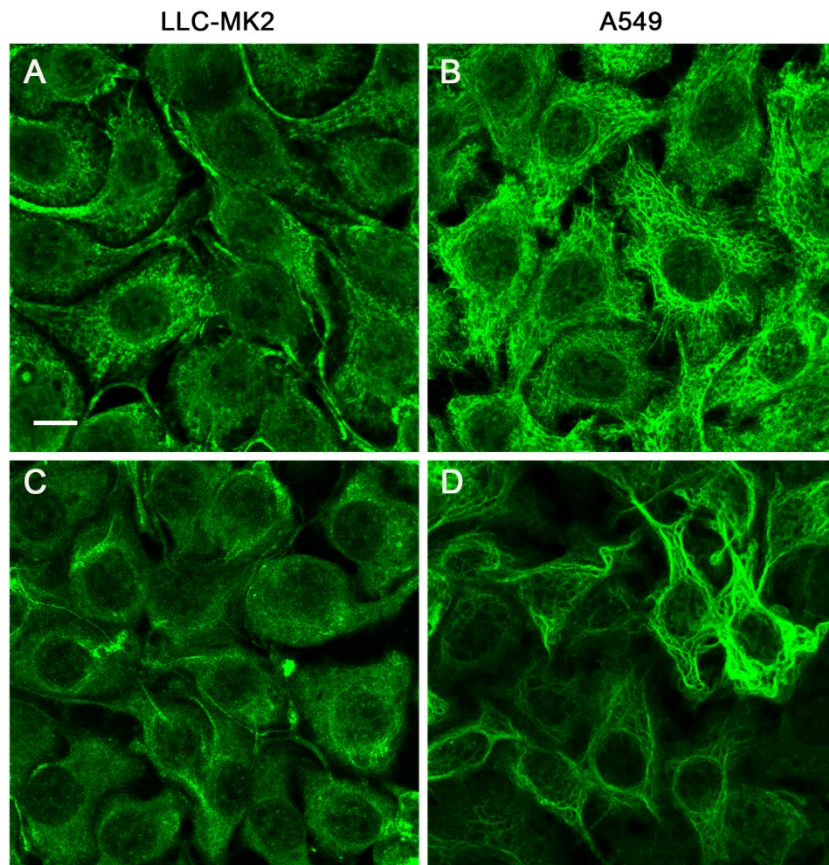


Figura 8. Analisi in microscopia confocale dell'espressione e organizzazione di citocheratina 8 e citocheratina 8 fosforilata in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 (A, C) e A549 (B, D) venivano fissate e, in seguito, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare citocheratina 8 (A, B) e citocheratina 8 fosforilata (C, D). I preparati venivano osservati con microscopio confocale. Barra: 10 μ m.

L'analisi ha evidenziato un'organizzazione filamentosa di citocheratina 8 a livello citoplasmatico in entrambi i modelli cellulari (Figure 8A e 8B). Si conferma, inoltre, che citocheratina 8 è maggiormente espressa nelle cellule A549, dove peraltro i suoi filamenti sono più pronunciati, rispetto alle cellule LLC-MK2 (Figura 8B vs 8A).

L'espressione di citocheratina 8 fosforilata, che risulta di scarsa entità, rispetto a citocheratina 8, in entrambi i modelli cellulari (Figure 8C e 8D vs 8A e 8B), è comunque più accentuata nelle cellule A549, dove presenta una ricca organizzazione filamentosa (Figura 8D vs 8C).

4.2. Analisi della localizzazione subcellulare della nucleoproteina virale a confronto con citocheratina 8 e citocheratina 8 fosforilata in corso di infezione con il virus influenza A/NWS/33

Successivamente, è stata condotta un'analisi in microscopia confocale, previo saggio di immunofluorescenza indiretta, nelle cellule LLC-MK2 e A549 infettate con il virus NWS/33, allo scopo di valutare la co-localizzazione della NP virale con citocheratina 8 (Figura 9) e citocheratina 8 fosforilata (Figura 10). In particolare, è stato scelto un tempo di infezione funzionale a osservare una prevalente localizzazione citoplasmatica della NP. Pertanto, sono stati esaminati tempi di infezione lievemente differenti nei due modelli (*i.e.* 1 ora e 30 minuti nelle cellule LLC-MK2 e 1 ora nelle cellule A549). Infatti, dati sperimentali precedenti ^{46,168} hanno attestato che nelle cellule LLC-MK2 il tempo impiegato dal virus per entrare è maggiore. Allo scopo di ottimizzare la visualizzazione del virus infettante, rivelato mediante marcaggio in immunofluorescenza della NP, le cellule sono state infettate con un'alta molteplicità d'infezione (*m.o.i.* = 10 u.f.p./cellula). Dall'analisi in microscopia confocale è emerso che l'organizzazione e l'espressione di citocheratina 8 non vengono pressoché modificate durante le fasi precoci dell'infezione del virus NWS/33 nei due modelli cellulari, rispetto a quanto osservato in cellule non infettate (Figura 9A vs 8A e 9B vs 8B).

La proteina NP (Figure 9A1 e 9B1) presenta una prevalente localizzazione citoplasmatica con un assetto granulare e disomogeneo, mentre citocheratina 8 presenta un assetto filamentoso (Figure 9A e 9B).

Citocheratina 8 co-localizza parzialmente con la NP a livello citoplasmatico nelle cellule A549 (Figura 9B2). Tale co-localizzazione si esprime anche nelle cellule LLC-MK2, sebbene con un'intensità di segnale decisamente minore (Figura 9A2).

In parallelo, è stata esaminata la localizzazione subcellulare di citocheratina 8 fosforilata a confronto con la NP in corso di infezione con il virus NWS/33 nelle cellule LLC-MK2 e A549. In accordo con le precedenti osservazioni sperimentali (si veda Figura 4), l'espressione di citocheratina 8 fosforilata aumenta lievemente dopo 1 ora d'infezione nelle cellule A549 (Figura 10B vs 8D), ma non nelle LLC-MK2 (Figura 10A vs 8C). Inoltre, nelle cellule A549 è evidente l'organizzazione in filamenti di citocheratina 8 fosforilata, che invece non è osservabile nelle cellule LLC-MK2 (Figura 10B vs 10A).

Relativamente alla sovrapposizione dei piani focali, sono stati evidenziati deboli segnali di co-localizzazione tra citocheratina 8 fosforilata e NP nella regione perinucleare delle cellule A549, a differenza delle cellule LLC-MK2, dove invece non si osservano segnali di co-localizzazione (Figura 10B2 vs 10A2).

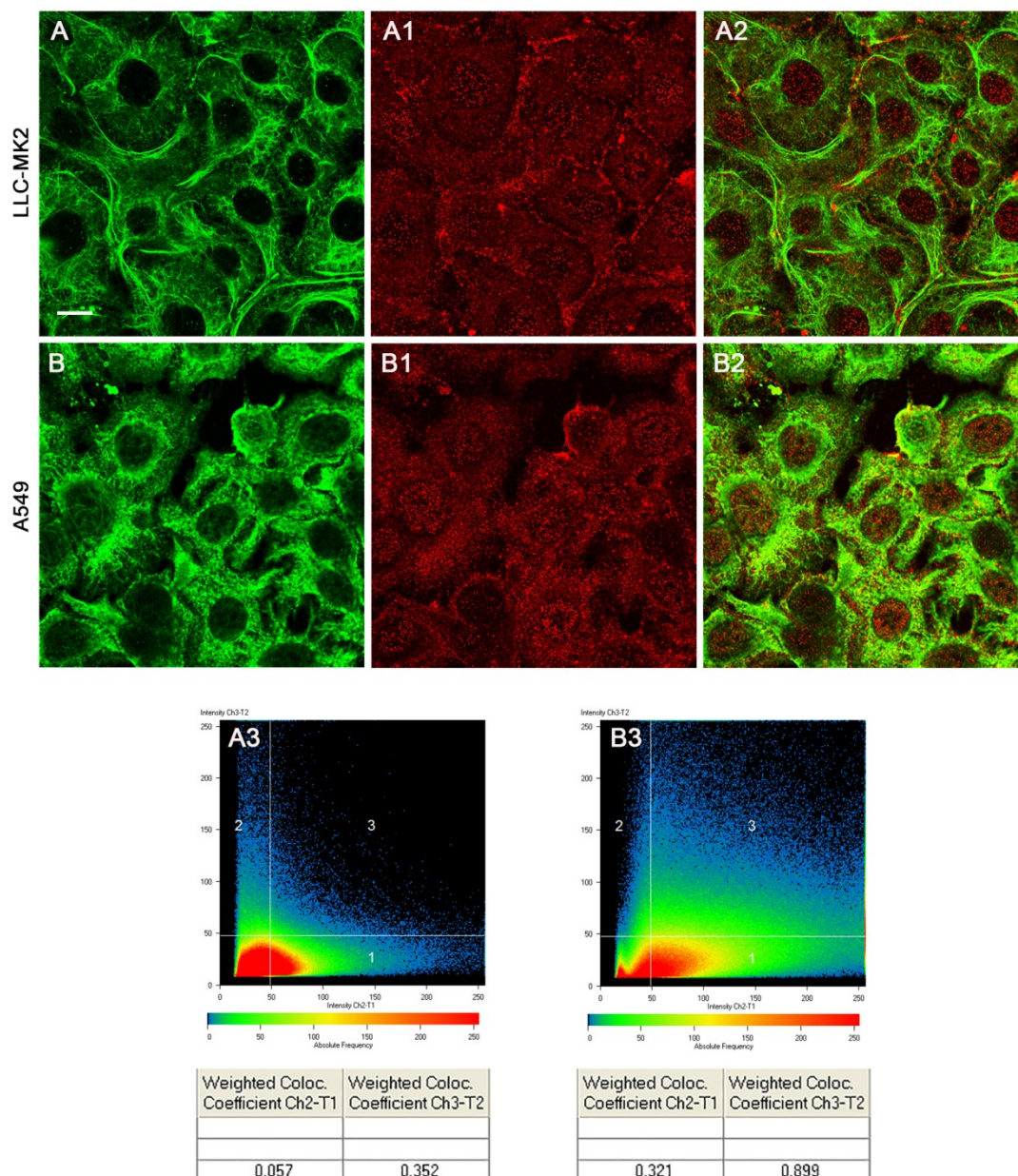


Figura 9. Analisi della co-localizzazione tra citocheratina 8 e NP in corso di infezione con il virus influenza A/NWS/33 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 e A549 venivano infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 10 u.f.p./cellula) per 1 ora e 30 minuti (A, A1, A2) e 1 ora (B, B1, B2), rispettivamente, e, in seguito, venivano sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare citocheratina 8 (A, B) e NP (A1, B1). Nelle immagini A2 e B2 è mostrata la sovrapposizione dei piani focali A e A1, e B e B1, rispettivamente. Le aree di co-localizzazione tra le proteine oggetto di studio appaiono in colore giallo/arancio. I preparati venivano osservati con microscopio confocale. Nei diagrammi a dispersione (A3, B3), derivanti dall'analisi delle immagini A2 e B2, rispettivamente, è rappresentato il numero di "pixel" corrispondenti all'emissione di segnale del fluorocromo FITC, rapportati a quelli corrispondenti all'emissione di segnale del fluorocromo FITC. I coefficienti di co-localizzazione ponderata sono stati ottenuti con software Zeiss LSM 510 META (canale verde: Ch2-T1; canale rosso: Ch3-T2). Barra: 10 μ m.

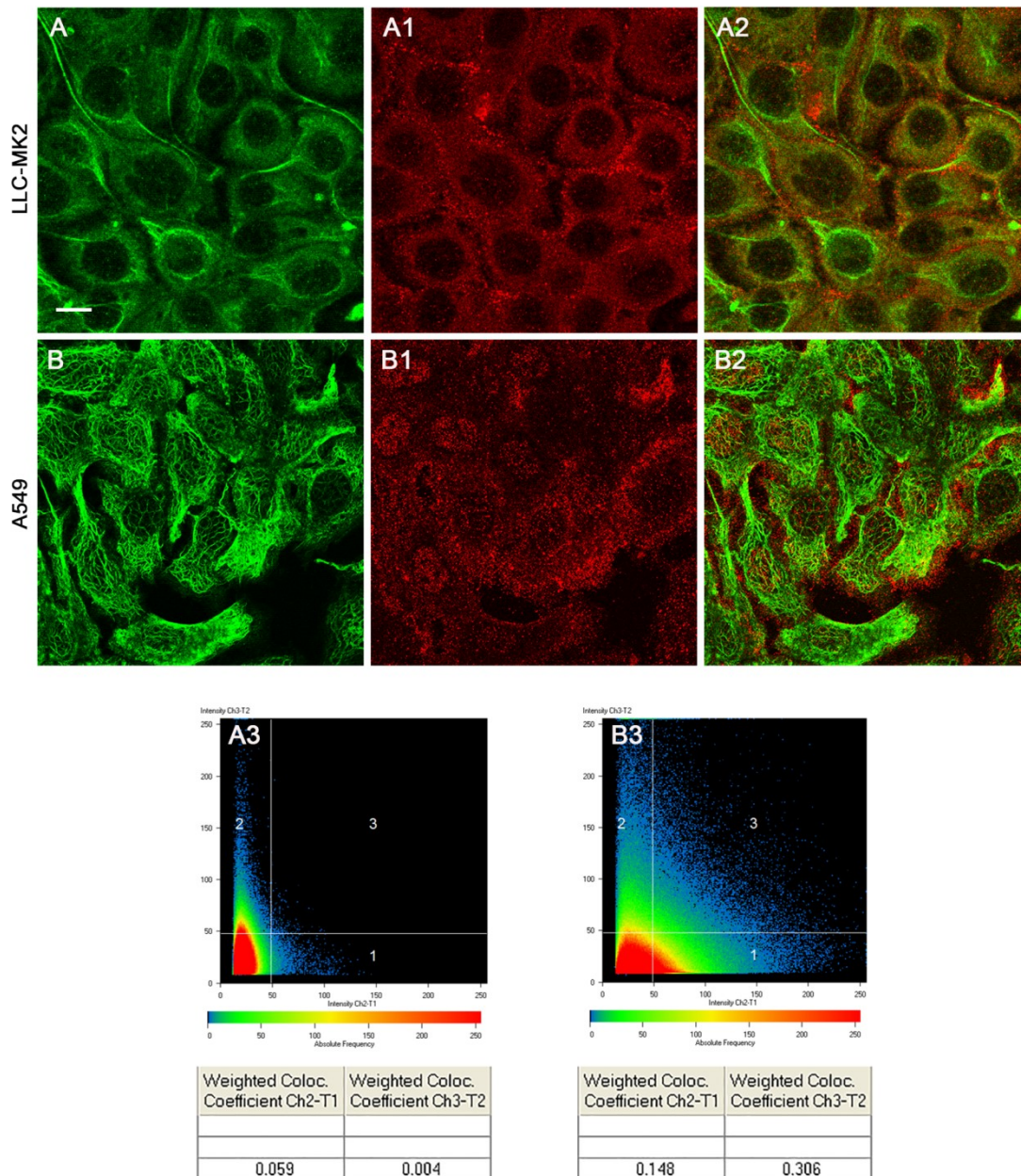


Figura 10. Analisi della co-localizzazione tra citocheratina 8 fosforilata e NP in corso di infezione con il virus influenza A/NWS/33 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 e A549 venivano infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 10 u.f.p./cellula) per 1 ora e 30 minuti (A, A1, A2) e 1 ora (B, B1, B2), rispettivamente, e, in seguito, venivano sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare citocheratina 8 fosforilata (A, B) e NP (A1, B1). Nelle immagini A2 e B2 è mostrata la sovrapposizione dei piani focali A e A1, e B e B1, rispettivamente. Le aree di co-localizzazione tra le proteine oggetto di studio appaiono in colore giallo/arancio. I preparati venivano osservati con microscopio confocale. Nei diagrammi a dispersione (A3, B3), derivanti dall'analisi delle immagini A2 e B2, rispettivamente, è rappresentato il numero di "pixel" corrispondenti all'emissione di segnale del fluorocromo FITC, rapportati a quelli corrispondenti all'emissione di segnale del fluorocromo RITC. I coefficienti di co-localizzazione ponderata sono stati ottenuti con software Zeiss LSM 510 META (canale verde: Ch2-T1; canale rosso: Ch3-T2). Barra: 10 μ m.

5. EFFETTI DEL SILENZIAMENTO DEL GENE RHEBL1 SULL'INFEZIONE SPERIMENTALE DEL VIRUS INFLUENZA A/NWS/33 IN MODELLI CELLULARI DI MAMMIFERO

5.1. Analisi dell'espressione della proteina RhebL1

Allo scopo di valutare il possibile ruolo regolatorio della proteina RhebL1 sulla fosforilazione di citocheratina 8, ne è stata, innanzitutto, esaminata l'espressione (Figura 11).

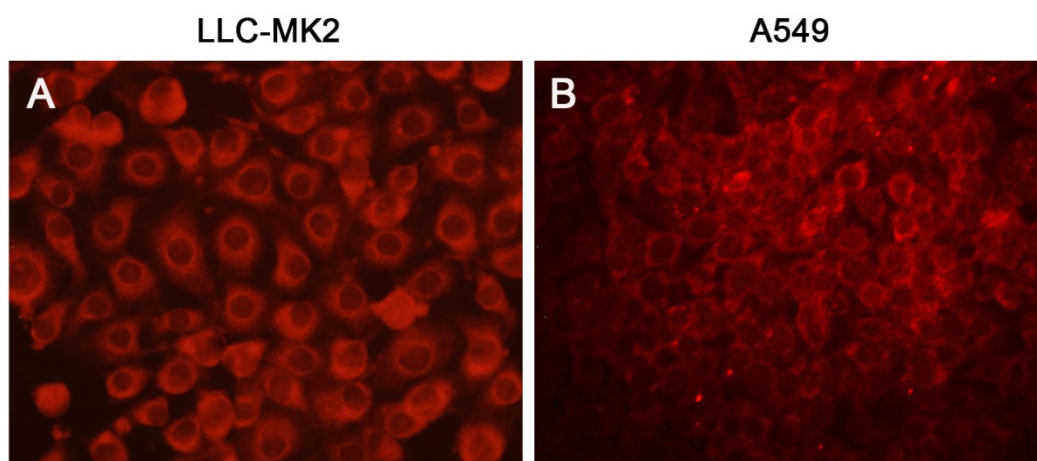


Figura 11. Analisi dell'espressione di RhebL1 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 (A) e A549 (B) venivano fissate e, in seguito, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare RhebL1. I preparati venivano osservati con microscopio a fluorescenza (ingrandimento 500x).

L'analisi in immunofluorescenza indiretta ha rivelato un esiguo livello di espressione di RhebL1 in entrambi i modelli cellulari, sebbene risulti più pronunciata nelle cellule LLC-MK2 (Figura 11A vs 11B). Inoltre, nelle cellule LLC-MK2 si osserva una prevalente localizzazione di RhebL1 nella regione perinucleare (Figura 11A), al contrario delle cellule A549, dove la proteina ha una distribuzione citoplasmatica omogenea (Figura 11B).

5.2. Analisi del silenziamento del gene *RhebL1*

Successivamente, sono stati condotti degli esperimenti di silenziamento del gene che codifica per la proteina RhebL1 nei modelli cellulari allo studio. Il silenziamento del gene RhebL1 è stato valutato mediante saggio di immunofluorescenza indiretta (Figura 12), in quanto l'anticorpo impiegato non presenta reattività in immunoblotting. Sono attualmente in corso altri esperimenti, che prevedono l'impiego di un anticorpo adatto a tale scopo.

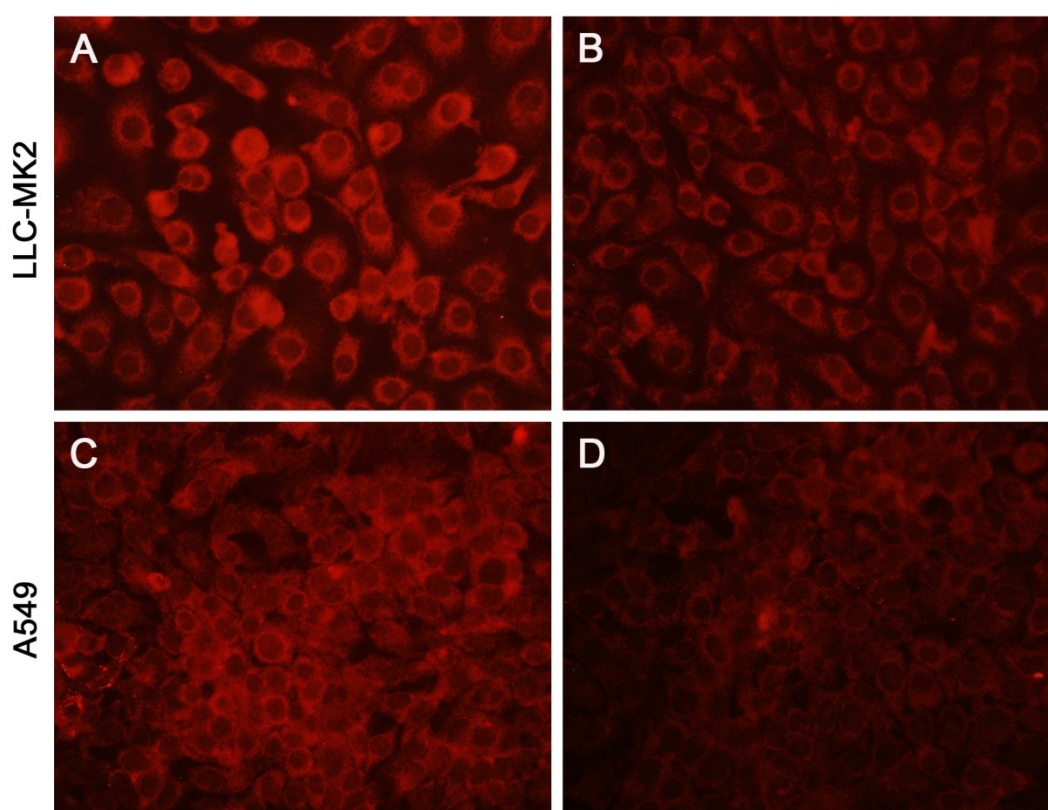


Figura 12. Analisi del silenziamento del gene che codifica per la proteina RhebL1 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 (A, B) e A549 (C, D) venivano trattate con sequenze siRNA controllo (A, C) oppure con la sequenza siRNA (15 nM) diretta contro il gene RhebL1 (B, D) per 48 ore e, in seguito, venivano sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare RhebL1. I preparati venivano, infine, osservati con microscopio a fluorescenza (ingrandimento 500x).

L'analisi in immunofluorescenza indiretta mostra una riduzione dell'espressione di RhebL1 nelle cellule LLC-MK2 e A549 trattate con siRNA, rispetto ai relativi controlli, che

venivano trattati con sequenze siRNA che non riconoscevano alcun gene (Figura 12B vs 12A e 12D vs 12C).

5.3. Effetti del silenziamento del gene RhebL1 sull'infezione del virus influenza A/NWS/33

L'analisi, mediante saggio di immunofluorescenza indiretta, degli effetti indotti dal silenziamento del gene RhebL1 (Figura 13) ha rivelato degli esiti differenti nei due modelli cellulari allo studio in corso di infezione sperimentale con il virus NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore di infezione). Nello specifico, nelle cellule LLC-MK2 trattate con siRNA diretti contro RhebL1 per 48 ore prima dell'infezione con il virus NWS/33, l'espressione di NP è risultata di entità pressoché paragonabile a quella presente in cellule trattate con sequenze siRNA controllo (Figura 13B vs 13A). Al contrario, nelle cellule A549 trattate con siRNA si assiste a un aumento di espressione di NP (Figura 13D vs 13C).

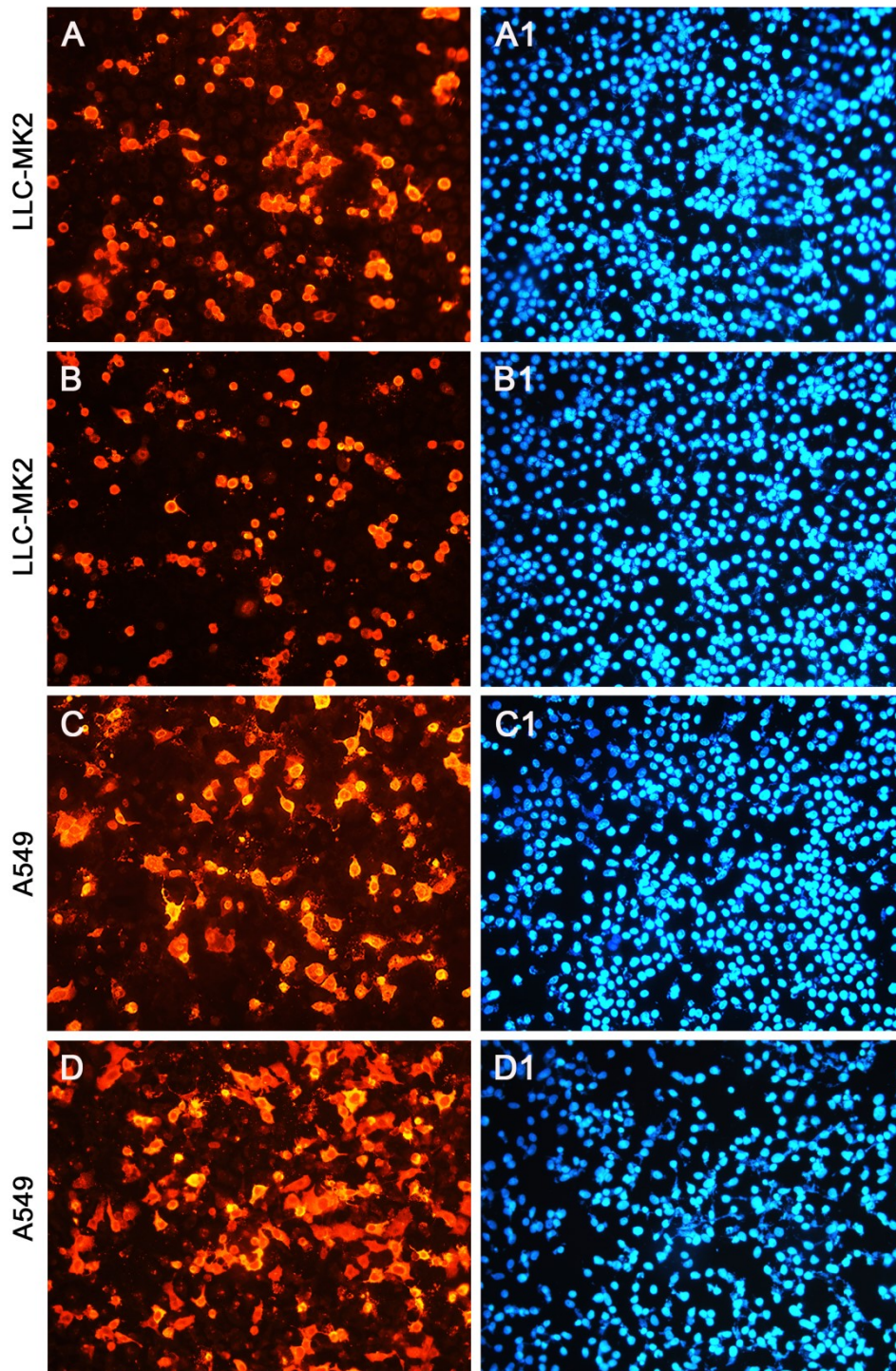


Figura 13. Analisi degli effetti del silenziamento del gene RhebL1 sull'espressione della proteina NP del virus influenza A/NWS/33 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 (A, A1, B, B1) e A549 (C, C1, D, D1) venivano trattate con sequenze siRNA controllo (A, A1, C, C1) oppure con la sequenza siRNA (15 nM) diretta contro il gene RhebL1 (B, B1, D, D1) per 48 ore e, successivamente, infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore). In seguito, le cellule venivano sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare la NP (A-D) parallelamente alla cromatina nucleare (A1-D1). Nelle immagini sono mostrati i medesimi piani focali (A-A1; B-B1; C-C1; D-D1), rivelati simultaneamente con l'anticorpo anti-NP (A-D) e con DAPI (A1-D1). I preparati venivano osservati con microscopio a fluorescenza (ingrandimento 200x).

I risultati ottenuti in immunofluorescenza sono stati successivamente esaminati a livello statistico. Nelle cellule LLC-MK2, si assiste a una diminuzione non significativa dell'espressione di NP, al contrario delle A549, dove la NP aumenta in maniera significativa (Figura 14A). In parallelo, i titoli della progenie virale emersa dalle cellule LLC-MK2 e A549, alle condizioni sopra descritte, venivano determinati con il saggio TCDI₅₀ (Figura 14B). I risultati ottenuti sono in linea con quelli relativi all'espressione di NP.

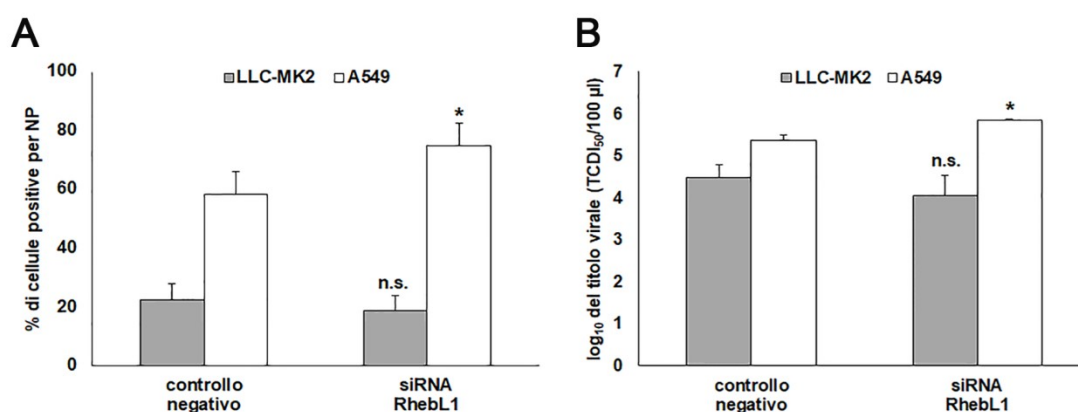


Figura 14. Effetti indotti dal silenziamento del gene RhebL1 sul ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 e A549 venivano trattate con sequenze siRNA controllo (controllo negativo) oppure con la sequenza siRNA (15 nM) diretta contro il gene RhebL1 (siRNA RhebL1) per 48 ore e, successivamente, infettate con il virus influenza A/NWS/33 (m.o.i. = 0,1 u.f.p./cellula; 24 ore). Nei grafici sono rappresentati: (A) la percentuale di cellule positive per la NP, che veniva determinata mediante reazione di immunofluorescenza indiretta, rispetto alla popolazione cellulare totale; (B) i valori logaritmici dei titoli della progenie virale emersa, che venivano determinati mediante il saggio TCDI₅₀. I valori di significatività (* = $P < 0,05$ e n.s. = $P > 0,05$) sono stati calcolati con il test t di Student, rispetto ai relativi controlli.

5.4. Analisi degli effetti indotti dal silenziamento del gene RhebL1 sulla fosforilazione di citocheratina 8

Dopo aver appurato che il silenziamento del gene che codifica per la proteina RhebL1 ha delle ripercussioni differenti sul ciclo replicativo del virus NWS/33 nei due modelli allo studio, ne sono stati valutati gli effetti sulla fosforilazione di citocheratina 8 (Figura 15). L'analisi, mediante saggio di immunofluorescenza indiretta nelle cellule LLC-MK2 e A549,

che venivano trattate o non trattate con la sequenza siRNA diretta contro il gene RhebL1 per 48 ore, ha rivelato che il silenziamento genico determina un aumento della fosforilazione di citocheratina 8 circoscritto ad alcuni campi del monostrato cellulare. Inoltre, è stato osservato un addensamento di tale proteina in regione perinucleare in entrambi i modelli (Figura 15C vs 15A e 15D vs 15B), ma più evidente nelle cellule A549 (Figura 15D vs 15C).

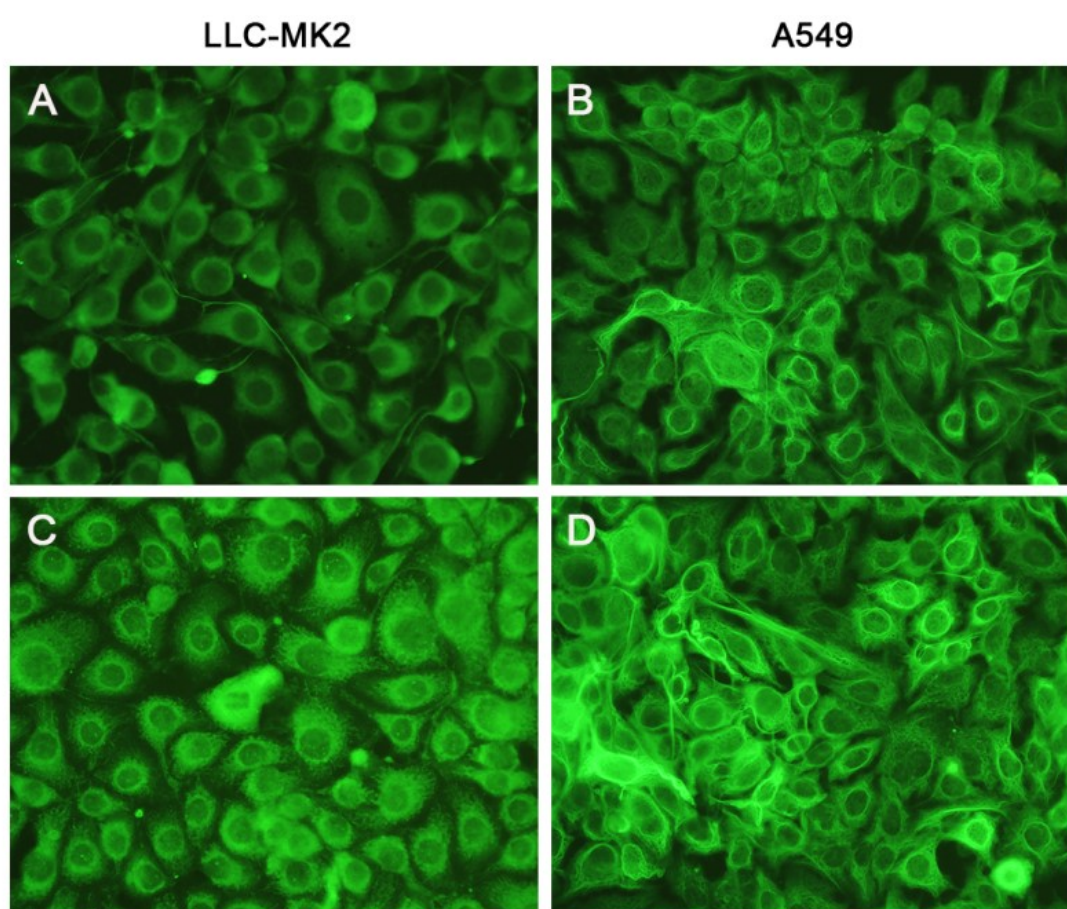


Figura 15. Effetti indotti dal silenziamento del gene RhebL1 sulla fosforilazione di citocheratina 8 in cellule LLC-MK2 e A549. Le cellule LLC-MK2 (A, C) e A549 (B, D) venivano non trattate (A, B) oppure trattate con la sequenza siRNA (15 nM) diretta contro il gene RhebL1 (C, D) per 48 ore. Le cellule venivano fissate e, in seguito, sottoposte a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare citocheratina 8 fosforilata (A-D). I preparati venivano osservati con microscopio a fluorescenza (ingrandimento 500x).

6. ANALISI DELLA FOSFORILAZIONE DI CITOCHERATINA 8 IN CELLULE DELL'EPITELIO RESPIRATORIO UMANO

6.1. Effetti dell'infezione del virus influenza A e del virus respiratorio sinciziale sulla fosforilazione di citocheratina 8 in cellule esfoliate dell'epitelio respiratorio umano

Dal momento che i risultati ottenuti depongono per un intervento di regolazione positiva di citocheratina 8 in corso di infezione con il virus NWS/33 nel modello permissivo A549, al contrario di LLC-MK2, è stata successivamente analizzata la fosforilazione di citocheratina 8 nelle cellule esfoliate dell'epitelio respiratorio umano (Figura 16). Tali cellule rappresentano, infatti, il primo bersaglio di numerosi virus, che infettano l'apparato respiratorio. Nello specifico, le cellule dell'epitelio respiratorio sono state ottenute da tamponi faringei e aspirati naso-faringei prelevati da pazienti pediatrici ricoverati od osservati ambulatorialmente presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma, che erano pervenuti presso l'Unità Operativa di Virologia per la diagnosi di laboratorio di infezione da virus dell'apparato respiratorio.

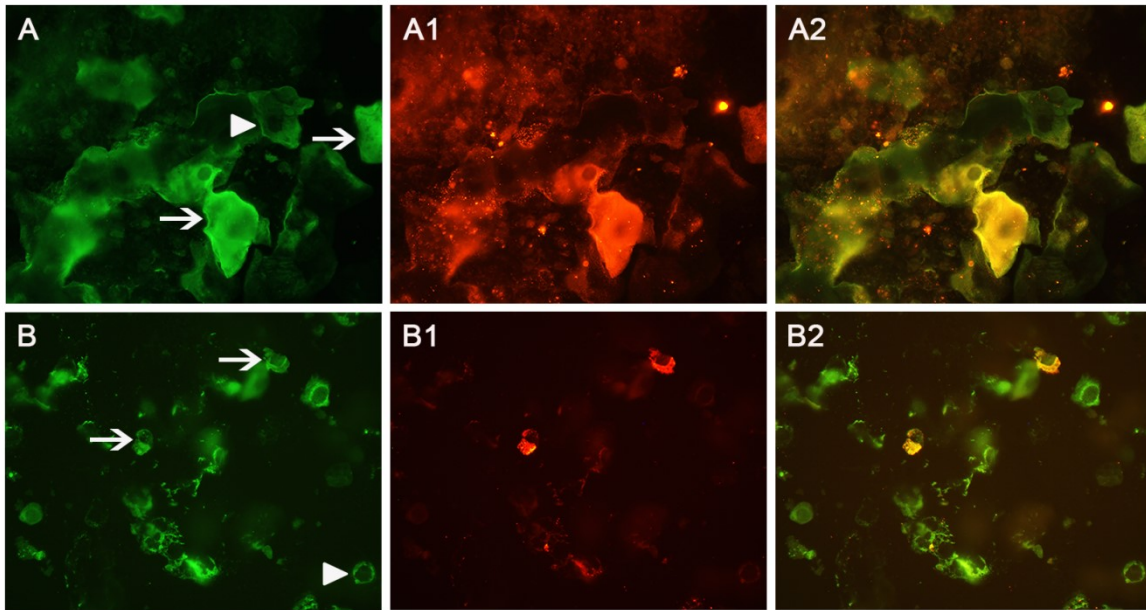


Figura 16. Analisi dell'espressione di citocheratina 8 fosforilata in cellule esfoliate dell'epitelio respiratorio umano infettate dal virus influenza A e dal virus respiratorio sinciziale. I sedimenti di cellule epiteliali del tratto naso-faringeo umano positive per il virus influenza A (A-A2) o per il virus respiratorio sinciziale (B-B2) venivano sottoposti a reazione di immunofluorescenza indiretta per rivelare citocheratina 8 fosforilata (A, B), la proteina NP del virus influenza (A1) e la proteina di fusione del virus respiratorio sinciziale (B1). Nelle immagini A2 e B2 è mostrata, rispettivamente, la sovrapposizione dei piani focali A e A1, e B e B1, ottenuta con software Leica QFluoro. Le aree di sovrapposizione tra le proteine oggetto di studio appaiono in colore giallo/arancio. I preparati venivano osservati con microscopio a fluorescenza (ingrandimento 500x).

I sedimenti cellulari allestiti a partire da campioni positivi per il virus influenza A (Figure 16A-A2) e per il virus respiratorio sinciziale (Figure 16B-B2) sono stati sottoposti a saggio di immunofluorescenza indiretta per rivelare simultaneamente citocheratina 8 fosforilata (Figura 16A) e NP (Figura 16A1), oppure citocheratina 8 fosforilata (Figura 16B) e la proteina di fusione del virus respiratorio sinciziale (Figura 16B1).

I risultati ottenuti evidenziano un aumento di espressione di citocheratina 8 fosforilata in cellule positive per il virus influenza A (frecche nella Figura 16A), rispetto a cellule non infettate (triangolo nella Figura 16A). Tale aumento non si osserva, invece, in cellule positive per il virus respiratorio sinciziale (frecche nella Figura 16B), dove la fosforilazione di citocheratina 8 è di entità pressoché paragonabile a cellule non infettate (triangolo nella Figura 16B).

DISCUSSIONE

L'influenza costituisce, a tutt'oggi, uno dei principali problemi di sanità pubblica a livello mondiale ^{175,176}.

L'instaurarsi dell'infezione dipende strettamente dalla capacità del virus influenza di cooptare a proprio vantaggio l'apparato biosintetico della cellula ospite, nonché da caratteristiche di virulenza che sono intrinseche a ciascun stipite. In relazione a quest'ultimo aspetto, è infatti noto che i virus influenzali sono caratterizzati da un'elevata variabilità genetica, che favorisce l'insorgenza di caratteristiche antigeniche nuove, in grado di evadere le difese immunitarie preesistenti dell'ospite ¹⁷⁷.

Alla luce degli aspetti sopra riportati, un'approfondita analisi delle interazioni che si esprimono tra virus influenza e cellula ospite potrebbe fornire non solo delle nuove conoscenze sulle modalità replicative del virus, ma anche sull'impiego di specifici "bersagli" cellulari, che sono determinanti nel regolare la permissività della cellula all'infezione virale. In tale ottica, i risultati ottenuti potrebbero costituire un'utile presupposto alla formulazione di farmaci antivirali innovativi, in grado di contrastare i fenomeni di farmaco-resistenza che vengono di frequente evidenziati per farmaci rivolti contro componenti/funzioni virali.

L'attività sperimentale oggetto di questa tesi si inserisce nell'ambito di un progetto di ricerca scientifica di base, volto a mettere in luce la partecipazione del citoscheletro cellulare nello svolgimento del ciclo replicativo del virus influenza A/NWS/33 (H1N1).

Precedenti osservazioni sperimentali del gruppo di ricerca hanno attestato il ruolo dell'assetto stabilizzato dei sistemi dei microfilamenti e dei microtubuli del citoscheletro

cellulare quali fattori di restrizione nei confronti dell'infezione del virus NWS/33 in cellule di mammifero ^{46,168-171}.

La ricerca oggetto di questa tesi si è posta, come obiettivo principale, quello di valutare l'implicazione del sistema dei filamenti intermedi nello svolgimento dell'infezione del virus NWS/33. Tale scopo trae le premesse dal fatto che le conoscenze relative al coinvolgimento dei filamenti intermedi in corso di infezione virale sono molto limitate ^{174,178-180}, sebbene, fungendo da elemento di comunicazione tra membrana citoplasmatica e membrana nucleare e avendo la capacità di interagire con i complessi ribonucleoproteici citoplasmatici, sia plausibile che possano contribuire alla regolazione dell'infezione virale. In particolare, l'attenzione è stata focalizzata su citocheratina 8, una componente dei filamenti intermedi fortemente espressa negli epitelii semplici. Nello specifico, è stata esaminata l'implicazione di citocheratina 8 nel corso di fasi precoci dell'infezione del virus NWS/33, che è stata condotta, a confronto, nelle cellule semi-permissive LLC-MK2 e nelle cellule permissive A549. Inoltre, è stato sondato il ruolo della fosforilazione di citocheratina 8, una modificazione post-traduzionale, associata alla riorganizzazione strutturale dei filamenti intermedi ¹⁸¹, come anche alla capacità di citocheratina di polimerizzare e di distribuirsi nel citoplasma cellulare ^{121,182-185}. In relazione a quest'ultimo aspetto, è importante evidenziare che le conoscenze sulle complesse dinamiche dei filamenti intermedi sono limitate, rispetto a quelle disponibili per microfilamenti e microtubuli, e, pertanto, il percorso sperimentale di questa tesi potrebbe contribuire ad incrementarle.

In una fase iniziale, è stata impiegata la sostanza acrilammide, al fine di depolimerizzare i filamenti intermedi ¹⁸⁶. Le ripercussioni sono risultate più evidenti nelle cellule LLC-MK2, rispetto ad A549. Tale risultato rende ragione del fatto che il sistema dei filamenti intermedi, come emerso attraverso saggi di immunofluorescenza volti a rivelare

citocheratina 8, presenta un assetto strutturale e, verosimilmente, funzionale, di tipologia differente nei due modelli allo studio. Infatti, le cellule A549 sono caratterizzate da una maggiore espressione e organizzazione in filamenti di citocheratina 8. Inoltre, in tali cellule la componente fosforilata di citocheratina 8 è più accentuata, oltre che presentare un'articolata organizzazione in filamenti.

La depolimerizzazione dei filamenti intermedi durante le fasi precoci dell'infezione del virus NWS/33 ha rivelato effetti positivi sull'espressione della NP virale in entrambi i modelli cellulari. Tale risultato depone per il fatto che un assetto altamente dinamico dei filamenti intermedi possa favorire l'espletamento del ciclo replicativo virale. Tuttavia, è stato parallelamente osservato che la depolimerizzazione dei filamenti intermedi comporta una lieve diminuzione dei titoli infettanti della progenie virale. Pertanto, è verosimile che la modificazione di assetto di citocheratina indotta da acrilammide promuova le attività biosintetiche connesse al ciclo replicativo virale e, al contempo, abbia ripercussioni negative sulle fasi tardive dell'infezione, in accordo con osservazioni di altri Autori ^{187,188}. Tale ipotesi è anche suffragata dal fatto che, sebbene acrilammide sia stata applicata ai monostrati cellulari nel corso di fasi precoci dell'infezione, il tempo richiesto per il ripristino dell'assetto fisiologico dei filamenti intermedi, dopo rimozione della sostanza, è cospicuo ¹⁷⁴, e, pertanto, questo comporta che l'assetto depolimerizzato o, comunque, altamente dinamico dei filamenti intermedi persista anche nelle fasi tardive dell'infezione. A tal riguardo, è di rilievo evidenziare che alcuni Autori hanno appurato che il trattamento con acrilammide causa una diminuzione del livello di fosforilazione di citocheratina ¹⁸⁹. Tali osservazioni correlano con il fatto che, come verrà discusso successivamente, la fosforilazione di citocheratina rappresenta un importante fattore di regolazione del ciclo replicativo virale.

In linea con i risultati sopra riportati, precedenti osservazioni del gruppo di ricerca hanno evidenziato che nelle cellule LLC-MK2 infettate con lo stipite aviare A/FPV/Ulster 73 (H7N1) di virus influenza la depolimerizzazione dei filamenti intermedi causa una riduzione della sintesi proteica cellulare e ostacola la fuoriuscita della progenie virale ¹⁷⁴. Inoltre, altri Autori hanno evidenziato che le modificazioni strutturali dei filamenti intermedi in corso di infezione con il virus di Junin ¹⁹⁰, il virus dell'afta epizootica ¹⁹¹, il virus Dengue ¹⁸⁸ e citomegalovirus ¹⁹² comportano una diminuzione dell'efficienza replicativa virale.

L'analisi degli effetti indotti dall'infezione del virus NWS/33 nei modelli allo studio ha rivelato l'insorgenza di modificazioni strutturali di citocheratina 8, come anche la modulazione del suo livello di fosforilazione. In particolare, l'assetto di citocheratina 8 viene modificato solo in fasi tardive dell'infezione virale in entrambi i modelli allo studio, mentre l'aumento della fosforilazione si esprime esclusivamente nelle cellule A549, già a partire da fasi precoci del ciclo replicativo virale. Tali osservazioni depongono per il fatto che, nelle cellule A549, il virus NWS/33 è in grado di promuovere una maggiore dinamicità dei filamenti di citocheratina 8, attraverso l'aumento della fosforilazione, al contrario di quanto si verifica nel modello semi-permissivo LLC-MK2, dove si osserva soltanto una diminuzione dell'espressione di citocheratina 8 a livello perinucleare. I risultati ottenuti sono indicativi del fatto che il virus NWS/33 è in grado di concorrere alla regolazione delle complesse vie di trasduzione del segnale responsabili della fosforilazione di citocheratina 8 nelle cellule A549, ma non nelle LLC-MK2. In tale ottica, è verosimile ritenere che nel modello semi-permissivo siano presenti dei fattori di regolazione negativa della fosforilazione in grado di contrastare l'iperfosforilazione indotta dal virus. Tale ipotesi è rafforzata dal fatto che il livello di fosforilazione

osservabile nelle cellule LLC-MK2 in condizioni fisiologiche è decisamente minore, rispetto alle cellule A549. Tali risultati, che rendono ragione della complessità dei meccanismi di regolazione della fosforilazione di citocheratina 8, dovranno, in ogni caso, essere oggetto di ulteriori studi, che consentiranno di approfondire le differenze emerse nei modelli allo studio.

A supporto delle osservazioni sperimentali ottenute, è stato precedentemente riportato che citocheratina 8 può essere fosforilata da protein-chinasi stimulate da mitogeni (MAPK) ^{119,128}, che vengono attivate dal virus influenza in cellule bronchiali umane ¹⁹³, al fine di promuovere i meccanismi di trasporto dei complessi ribonucleoproteici virali e la successiva fuoriuscita della progenie virale ¹⁹⁴. Inoltre, è stato osservato che elevati livelli di fosforilazione correlano con il disassemblaggio dei filamenti intermedi ¹⁹⁵, una maggiore dinamicità degli stessi ¹⁹⁶ e un aumento della solubilità di citocheratina nel citoplasma ¹²¹. In aggiunta, è stato riportato che la fosforilazione di citocheratina 8 ha delle ripercussioni sulla sua riorganizzazione in sede perinucleare ¹⁹⁷.

Le suddette evidenze sperimentali rendono ragione del fatto che il sistema dei filamenti intermedi del citoscheletro risenta dell'attività regolatoria di numerosi fattori e di come i virus possano contribuire ad aumentarne la dinamicità, cooptando, a loro vantaggio, specifici meccanismi. A tal riguardo, è stato, ad esempio, osservato che il virus HIV è in grado di effettuare il clivaggio di una componente dei filamenti intermedi, vimentina, causando profonde modificazioni strutturali al citoscheletro ^{198,199}.

Nelle fasi sperimentali successive, l'attenzione è stata focalizzata sugli effetti indotti sul ciclo replicativo del virus NWS/33 dalla modulazione della fosforilazione di citocheratina 8. I risultati ottenuti in seguito all'impiego di acido okadaico, un inibitore delle fosfatasi 1 e 2A ²⁰⁰, sono risultati di maggiore impatto nelle cellule A549, attestando, anche in questo

caso, importanti differenze nei meccanismi di regolazione della fosforilazione, che si esprimono nei due modelli allo studio. Infatti, dopo trattamento con acido okadaico, solo nelle cellule A549 si osserva una rilevante alterazione dell'assetto di citocheratina 8 fosforilata, oltre a un aumento della sua espressione.

Analoghi risultati di iperfosforilazione e depolimerizzazione di citocheratina in seguito a trattamento con acido okadaico sono stati descritti in precedenti studi effettuati in cheratinociti murini ²⁰¹, cheratinociti umani ²⁰², fibroblasti murini ²⁰³ e cellule di carcinoma umano ¹⁸⁴.

In parallelo, il trattamento con la sostanza TPA, un attivatore dell'enzima protein-chinasi C ^{204,205}, ha evidenziato, in entrambi i modelli allo studio, un addensamento di citocheratina 8 fosforilata nella regione perinucleare, come anche un aumento di espressione di tale proteina, evidente soprattutto nelle cellule A549. Risultati simili sono stati riportati da altri Autori per epatociti murini ¹⁹⁵ e cellule pancreatiche umane ¹⁸¹ trattate con TPA.

Per quanto riguarda il ciclo replicativo virale, il trattamento con acido okadaico e TPA ha presentato delle ripercussioni positive sull'efficienza replicativa del virus NWS/33 nelle cellule A549, al contrario delle LLC-MK2, dove correla con la riduzione della progenie virale. Tali risultati sono in linea con quanto precedentemente osservato in corso di infezione virale. Infatti, il virus NWS/33 è in grado di aumentare la fosforilazione di citocheratina 8 nelle cellule permissive A549, ma non nelle LLC-MK2, dove, in base ai risultati sopra riportati, la fosforilazione sembra svolgere un ruolo di regolazione negativa sull'efficienza dell'infezione virale. A tal riguardo, è importante evidenziare che i meccanismi che regolano la fosforilazione di citocheratina sono estremamente complessi e non del tutto chiariti. Infatti, la fosforilazione prevede il coinvolgimento di diversi fattori, quali il fattore di crescita dell'epidermide ("epidermal growth factor", EGF),

inibitori di fosfatasi e leucotriene B₄ ^{201,206,207}, che si esprimono dipendentemente dal modello cellulare e dalle condizioni in cui questo si trova. In particolare, è stato osservato che i meccanismi di iperfosforilazione di citocheratina correlano con la progressione della malattia in soggetti con infezione cronica ^{146,208}, partecipando alla riorganizzazione di citocheratina e agendo sull'interazione della stessa con altre molecole ¹³³. Tali osservazioni supportano i risultati ottenuti in questo studio, che attestano come nelle cellule permissive A549 il virus NWS/33 sia in grado di contrastare l'assetto altamente organizzato di citocheratina 8 e, verosimilmente, di modularne le interazioni con altre molecole, al fine di potenziare la sua mobilità intracitoplasmatica e l'efficienza dell'infezione. In linea con i risultati ottenuti, è stato precedentemente osservato un aumento della fosforilazione di citocheratina 8 in seguito all'infezione produttiva di rotavirus e dei virus delle epatiti B e C ^{135,146,147}.

Precedenti dati di letteratura hanno evidenziato che il virus influenza NWS/33 è in grado di attivare l'enzima protein-chinasi C in fasi precoci dell'infezione ^{209,210}, promuovendo, in tal modo, il suo ingresso nella cellula ²¹¹. Nello specifico, è stato appurato che l'attivazione di protein-chinasi C favorirebbe l'ingresso dei virus attraverso il meccanismo di endocitosi ^{212,213}. Precedenti osservazioni del gruppo di ricerca hanno attestato che l'ingresso del virus NWS/33 in cellule LLC-MK2 avviene prevalentemente per macropinocitosi e, solo in minima parte, attraverso vescicole rivestite di clatrina (endocitosi) ⁴⁶. Tali dati potrebbero rendere ragione del fatto che l'attivazione dell'endocitosi tramite meccanismi di iperfosforilazione possa essere funzionale al virus NWS/33 nel modello permissivo A549, ma non nelle cellule semi-permissive LLC-MK2.

In linea con i dati sopra riportati, è stato osservato, mediante saggio di Western blotting, che nelle cellule A549 l'infezione del virus NWS/33 aumenta l'espressione della

componente fosforilata di citocheratina 8. Al contrario, nelle cellule LLC-MK2 l'infezione si ripercuote negativamente sull'espressione di tale componente. Sebbene dati sperimentali ottenuti da altri Autori abbiano messo in evidenza un analogo aumento di espressione di citocheratina 10 nelle cellule A549 infettate con lo stipite aviare di virus influenza A (H9N2) ²¹⁴, dati contrastanti ottenuti previa infezione con papillomavirus hanno evidenziato una riduzione di espressione di citocheratina 14 in cellule epiteliali di cervice umana ²¹⁵, attestando l'univocità dell'interazione che si verifica tra tipologie differenti di virus e specifiche componenti dei filamenti intermedi.

I risultati ottenuti in microscopia confocale hanno consentito di rafforzare le informazioni relative alla partecipazione di citocheratina 8 alla regolazione del ciclo replicativo virale. Infatti, è stata attestata la parziale co-localizzazione della NP virale con citocheratina 8 e la sua componente fosforilata durante le fasi precoci dell'infezione nel modello cellulare A549, mentre nelle LLC-MK2 sono stati osservati solo minimi segnali di co-localizzazione con citocheratina 8, e, addirittura, assenza di segnali con la componente fosforilata. In accordo con tali osservazioni, altri Autori hanno riportato che la proteina US2 del virus herpes simplex tipo 2 co-localizza con citocheratina 18 in cellule di carcinoma umano ²¹⁶ e la nucleoproteina del virus della coriomeningite linfocitaria co-localizza con citocheratina 1 in cellule epiteliali della cervice umana ²¹⁷.

Nell'ottica di sondare ulteriormente il ruolo della fosforilazione di citocheratina 8 in corso di infezione virale, l'attenzione è stata successivamente rivolta alla proteina RhebL1, avente funzioni regolatorie su tale processo ¹⁶⁷. È noto, infatti, che RhebL1 interagisce con molecole che sono in grado di attivare le vie di trasduzione del segnale delle protein-chinasi, come, ad esempio, le chinasi regolate da segnali extracellulari (ERK), le chinasi "c-

Jun" N-terminali (JNK) e la protein-chinasi C, promuovendo la fosforilazione di citocheratina ^{172,218}.

I risultati ottenuti in questo studio hanno evidenziato che, analogamente a quanto già osservato impiegando attivatori chimici della fosforilazione, il silenziamento genico di RhebL1 si ripercuote positivamente sul ciclo replicativo del virus influenza NWS/33 nelle cellule A549, ma non nelle LLC-MK2. Tale risultato potrebbe essere conseguente al fatto che la proteina RhebL1 ha un'espressione differente nei due modelli allo studio e, pertanto, svolge delle funzioni regolatorie di entità/tipologia diversa. Infatti, sebbene RhebL1 sia poco espressa in entrambi i modelli cellulari, dal momento che è principale appannaggio di cellule del sistema nervoso ²¹⁹, ne è stata appurata una maggiore espressione nelle cellule LLC-MK2. Inoltre, i risultati ottenuti hanno attestato che il silenziamento genico di RhebL1 determina un aumento della fosforilazione di citocheratina in entrambi i modelli ma, soprattutto, nelle cellule A549. Pertanto, gli effetti negativi sull'infezione riscontrati nel modello LLC-MK2 previo silenziamento del gene RhebL1 potrebbero essere imputabili all'aumento di fosforilazione osservato.

I dati ottenuti sono in parziale contrasto con quelli descritti da Kim *et al.* ¹⁶⁷, che attestano un'inibizione della fosforilazione a seguito del silenziamento di RhebL1. Tuttavia, in questo caso il silenziamento genico è stato condotto previo trattamento con sfingosilfosforilcolina, una molecola che aumenta la fosforilazione di citocheratina. Pertanto, le condizioni sperimentali non sono del tutto analoghe. In tale accezione, è importante considerare che diversi dati di letteratura ²²⁰⁻²²² attestano un ruolo regolatorio meno critico per RhebL1, rispetto alla proteina Rheb1, sulla regolazione della fosforilazione. Inoltre, è stato osservato che la proteina Rheb1 può compensare la deplezione di RhebL1, ma non può avvenire il contrario ²²². In aggiunta, è stato appurato

che l'attività di fosforilazione del complesso mTORC1 è, in parte, indipendente dalla regolazione svolta da Rheb1 e RhebL1 ²²³.

I dati ottenuti in questo studio, che evidenziano un aumento di fosforilazione in seguito al silenziamento genico di RhebL1, potrebbero deporre per un ruolo di regolazione negativa svolto da RhebL1 in tali modelli cellulari sul processo di fosforilazione. Inoltre, potrebbero essere conseguenti all'attivazione di meccanismi alternativi di fosforilazione, indipendenti dal controllo di Rheb1 e RhebL1.

I risultati ottenuti, che hanno, in ogni caso, consentito di apportare delle nuove informazioni sul ruolo di RhebL1, dovranno essere ulteriormente approfonditi e, in particolare, dovranno essere confrontati con quelli conseguenti al silenziamento del gene Rheb1.

Allo scopo di generalizzare i risultati precedentemente riportati, sono state, infine, esaminate le cellule dell'epitelio respiratorio umano ottenute da campioni clinici di pazienti pediatrici pervenuti per la diagnosi di laboratorio di infezione da virus dell'apparato respiratorio. In tali cellule, è stato osservato un aumento della fosforilazione di citocheratina 8 qualora siano state infettate dal virus influenza A, ma non dal virus respiratorio sinciziale. Tali risultati, che sono in linea con quanto osservato nelle cellule A549 infettate dal virus NWS/33, mettono in luce come l'attivazione della fosforilazione sia un meccanismo che si esprime non solo in maniera cellula-dipendente, ma anche virus-dipendente.

Concludendo, tale studio ha permesso di sviluppare delle nuove conoscenze sul ruolo dei filamenti intermedi nell'espletamento del ciclo replicativo del virus NWS/33. In particolare, i dati ottenuti attestano che in modelli cellulari permissivi (*i.e.* cellule A549 ed

epitelio respiratorio umano) il virus NWS/33 è in grado di attivare il processo di fosforilazione di citocheratina 8 a proprio vantaggio, favorendo, in tal modo, un ulteriore potenziamento della sua efficienza replicativa. Infatti, il virus non è in grado di modificare l'assetto di citocheratina 8 se non in fasi tardive dell'infezione e, pertanto, sfrutta efficacemente a tale scopo il meccanismo della fosforilazione. Tali considerazioni sono, in particolare, supportate, oltre che dalle osservazioni desunte in corso di infezione sperimentale, anche dall'aumento dell'efficienza replicativa del virus NWS/33 osservato nelle cellule A549 trattate con sostanze chimiche e con siRNA in grado di attivare la fosforilazione, come anche dai segnali di co-localizzazione della NP con citocheratina 8 fosforilata, rilevati mediante microscopia confocale.

Non avendo osservato analoghi risultati nelle cellule LLC-MK2, dove il livello di fosforilazione di citocheratina 8 è assai esiguo in condizioni fisiologiche, si può ritenere che l'impiego, da parte del virus, di meccanismi di attivazione della fosforilazione di citocheratina non sia funzionale all'aumento della sua efficienza replicativa in tale modello. D'altro canto, nelle cellule LLC-MK2 il sistema dei filamenti intermedi, rilevato attraverso citocheratina 8, è meno espresso e organizzato, rispetto alle cellule A549, e, pertanto, è verosimile che non rappresenti per il virus NWS/33 un fattore di restrizione all'infezione di entità analoga a quella dei sistemi dei microfilamenti e dei microtubuli precedentemente descritti dal gruppo di ricerca ¹⁶⁹⁻¹⁷¹.

Nell'insieme, i risultati ottenuti nell'ambito del Dottorato di Ricerca mettono in luce la complessità dell'interazione che si esprime tra virus influenza e sistema dei filamenti intermedi del citoscheletro cellulare ed evidenziano come la presenza di specifici fattori cellulari sia cruciale nel modulare l'efficienza del ciclo replicativo virale. La natura di questi fattori e i complessi meccanismi che ne regolano le funzioni, determinando la

resistenza o, alternativamente, la permissività all'infezione virale, dovranno essere oggetto di ulteriori studi e approfondimenti.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Gaur P., Munjhal A., Lal S.K., 2011. Influenza virus and cell signaling pathways. *Med Sci Monit.* 17(6): RA148-54.
- ² Hopkirk A.F., 1913. *Influenza: Its History, Nature, Cause and Treatment.* The Walters Scott Publishing Co., LTD. New York.
- ³ Harris J.W., 1919. Influenza occurring in pregnant women: a statistical study of thirteen hundred and fifty cases. *JAMA.* 72(14): 978-980.
- ⁴ Nicholson K.G., 1992. Clinical features of influenza. *Semin Respir Infect.* 7(1): 26-37.
- ⁵ Cox N.J. e Subbarao K., 1999. Influenza. *Lancet.* 354(9186): 1277-1282.
- ⁶ Long S.S., Pickering L.K., Prober C.G., 2012. *Principles and practice of pediatric infectious diseases*, 4th Edition. China: Elsevier.
- ⁷ Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J., 2015. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practices of infectious diseases.* 8th Edition. Philadelphia, PA: Elsevier.
- ⁸ Ip D.K.M., Lau L.L.H., Chan K.H., Fang V.J., Leung G.M., Peiris M.J.S., Cowling B.J., 2016. The dynamic relationship between clinical symptomatology and viral shedding in naturally acquired seasonal and pandemic influenza virus infections. *Clin Infect Dis.* 62(4): 431-437. doi:10.1093/cid/civ909
- ⁹ Esposito S., Daleno C., Baldanti F., Scala A., Campanini G., Taroni F., Fossali E., Pelucchi C., Principi N., 2011. Viral shedding in children infected by pandemic A/H1N1/2009 influenza virus. *Virol J.* 8: 349. doi:10.1186/1743-422X-8-349
- ¹⁰ Memoli M.J., Athota R., Reed S., Czajkowski L., Bristol T., Proudfoot K., Hagey R., Voell J., Fiorentino C., Ademposi A., Shoham S., Taubenberger J.K., 2014. The natural history of influenza infection in the severely immunocompromised vs nonimmunocompromised hosts. *Clin Infect Dis.* 58(2): 214-224. doi:10.1093/cid/cit725
- ¹¹ Carrat F., Vergu E., Ferguson N.M., Lemaître M., Cauchemez S., Leach S., Valleron A.J., 2008. Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *Am J Epidemiol.* 167(7): 775-785. doi:10.1093/aje/kwm375

- ¹² Yuen K.Y., Chan P.K., Peiris M., Tsang D.N., Que T.L., Shortridge K.F., Cheung P.T., To W.K., Ho E.T., Sung R., Cheng A.F., 1998. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. *Lancet*. 351(9101): 467-471.
- ¹³ Parsons H.F., 1893. Further reports and papers on epidemic influenza, 1889-92; with introduction by Medical Officer of Local Government Board. Her Majesty's Stationery Office; London.
- ¹⁴ Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P., 1933. A virus obtained from influenza patients. *The Lancet*. 222(5732): 66-68. doi:10.1016/S0140-6736(00)78541-2
- ¹⁵ International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), 2019. Virus Taxonomy: 2018b Release, February 2019. Accessibile al sito web: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/negative-sense-rna-viruses-2011/w/negrna_viruses/209/orthomyxoviridae
- ¹⁶ Mostafa A., Abdelwhab E.M., Mettenleiter T.C., Pleschka S., 2018. Zoonotic potential of influenza A viruses: a comprehensive overview. *Viruses*. 10(9). pii: E497. doi:10.3390/v10090497
- ¹⁷ Matsuzaki Y., Katsushima N., Nagai Y., Shoji M., Itagaki T., Sakamoto M., Kitaoka S., Mizuta K., Nishimura H., 2006. Clinical features of influenza C virus infection in children. *J Infect Dis*. 193(9): 1229-1235.
- ¹⁸ Su S., Fu X., Li G., Kerlin F., Veit M., 2017. Novel influenza D virus: epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*. 8(8): 1580-1591. doi:10.1080/21505594.2017.1365216
- ¹⁹ Lamb R.A. e Krug R.M., 2001. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: *Fields Virology*. 4th Edition; Knipe D.M. e Howley P.M., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 1487-1531.
- ²⁰ Du R., Cui Q., Rong L., 2019. Competitive cooperation of hemagglutinin and neuraminidase during influenza A virus entry. *Viruses*. 11(5). pii: E458. doi:10.3390/v11050458
- ²¹ Regea G., 2017. Review on influenza virus and its prevention and control. *J Vet Med Res* 4(5): 1089.
- ²² Rossman J.S. e Lamb R.A., 2011. Influenza virus assembly and budding. *Virology*. 411(2): 229-236. doi:10.1016/j.virol.2010.12.003
- ²³ Badham M.D. e Rossman J.S., 2016. Filamentous influenza viruses. *Curr Clin Microbiol Rep*. 3(3): 155-161. doi:10.1007/s40588-016-0041-7

- ²⁴ Bouvier N.M. e Palese P., 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 26 Suppl 4: D49-53.
- ²⁵ Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C., 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*. 289(5796): 366-373.
- ²⁶ Skehel J.J. e Wiley D.C., 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*. 69: 531-569.
- ²⁷ Shaw M.L. e Palese P., 2013. *Orthomyxoviridae*. 6th Edition; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, USA. 1: 1151–1185.
- ²⁸ Samji T., 2009. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med*. 82(4): 153-159.
- ²⁹ Ma W. e Richt J.A., 2010. Swine influenza vaccines: current status and future perspectives. *Anim Health Res Rev*. 11(1): 81-96. doi:10.1017/S146625231000006X
- ³⁰ Matrosovich M.N., Matrosovich T.Y., Gray T., Roberts N.A., Klenk H.D., 2004. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol*. 78(22): 12665-12667.
- ³¹ Lee C.W. e Saif Y.M., 2009. Avian influenza virus. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 32(4): 301-310. doi:10.1016/j.cimid.2008.01.007
- ³² Chakrabarti A.K. e Pasricha G., 2013. An insight into the PB1F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses. *Virology*. 440(2): 97-104. doi:10.1016/j.virol.2013.02.025
- ³³ Hutchinson E.C., Charles P.D., Hester S.S., Thomas B., Trudgian D., Martínez-Alonso M., Fodor E., 2014. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture. *Nat Commun*. 5: 4816. doi:10.1038/ncomms5816
- ³⁴ Tumpey T.M., Alvarez R., Swayne D.E., Suarez D.L., 2005. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. *J Clin Microbiol*. 43(2): 676-683.
- ³⁵ Dundon W.G., Milani A., Cattoli G., Capua I., 2006. Progressive truncation of the Non-Structural 1 gene of H7N1 avian influenza viruses following extensive circulation in poultry. *Virus Res*. 119(2): 171-176.
- ³⁶ Chen W., Calvo P.A., Malide D., Gibbs J., Schubert U., Bacik I., Basta S., O'Neill R., Schickli J., Palese P., Henklein P., Bennink J.R., Yewdell J.W., 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med*. 7(12): 1306-1312.

- ³⁷ Kamal R.P., Alymova I.V., York I.A., 2017. Evolution and virulence of influenza A virus protein PB1-F2. *Int J Mol Sci.* 19(1): 96. doi:10.3390/ijms19010096
- ³⁸ Zamarin D., García-Sastre A., Xiao X., Wang R., Palese P., 2005. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog.* 1(1): e4.
- ³⁹ Conenello G.M., Zamarin D., Perrone L.A., Tumpey T., Palese P., 2007. A single mutation in the PB1-F2 of H5N1 (HK/97) and 1918 influenza A viruses contributes to increased virulence. *PLoS Pathog.* 3(10): 1414-1421.
- ⁴⁰ McAuley J.L., Hornung F., Boyd K.L., Smith A.M., McKeon R., Bennink J., Yewdell J.W., McCullers J.A., 2007. Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. *Cell Host Microbe.* 2(4): 240-249.
- ⁴¹ Wise H.M., Foeglein A., Sun J., Dalton R.M., Patel S., Howard W., Anderson E.C., Barclay W.S., Digard P., 2009. A complicated message: identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. *J Virol.* 83(16): 8021-8031. doi:10.1128/JVI.00826-09
- ⁴² Vasin A.V., Temkina O.A., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Plotnikova M.A., Kiselev O.I., 2014. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. *Virus Res.* 185: 53-63. doi:10.1016/j.virusres.2014.03.015
- ⁴³ Jagger B.W., Wise H.M., Kash J.C., Walters K.A., Wills N.M., Xiao Y.L., Dunfee R.L., Schwartzman L.M., Ozinsky A., Bell G.L., Dalton R.M., Lo A., Efstathiou S., Atkins J.F., Firth A.E., Taubenberger J.K., Digard P., 2012. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. *Science.* 337(6091): 199-204. doi:10.1126/science.1222213
- ⁴⁴ Shi M., Jagger B.W., Wise H.M., Digard P., Holmes E.C., Taubenberger J.K., 2012. Evolutionary conservation of the PA-X open reading frame in segment 3 of influenza A virus. *J Virol.* 86(22): 12411-12413. doi:10.1128/JVI.01677-12
- ⁴⁵ Matlin K.S., Reggio H., Helenius A., Simons K., 1981. Infectious entry pathway of influenza virus in a canine kidney cell line. *J Cell Biol.* 91(3 Pt 1): 601-613.
- ⁴⁶ De Conto F., Covan S., Arcangeletti M.C., Orlandini G., Gatti R., Dettori G., Chezzi C., 2011. Differential infectious entry of human influenza A/NWS/33 virus (H1N1) in mammalian kidney cells. *Virus Res.* 155(1): 221-230. doi:10.1016/j.virusres.2010.10.008
- ⁴⁷ Martin K. e Helenius A., 1991. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. *J Virol.* 65(1): 232-244.

- ⁴⁸ Cros J.F. e Palese P., 2003. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* 95(1-2): 3-12.
- ⁴⁹ Qu X., Ding X., Duan M., Yang J., Lin R., Zhou Z., Wang S., 2017. Influenza virus infection induces translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) in A549 cells: role of AIF in apoptosis and viral propagation. *Arch Virol.* 162(3): 669-675. doi:10.1007/s00705-016-3151-x
- ⁵⁰ Shim J.M., Kim J., Tenson T., Min J.Y., Kainov D.E., 2017. Influenza virus infection, interferon response, viral counter-response, and apoptosis. *Viruses.* 9(8). pii: E223. doi:10.3390/v9080223
- ⁵¹ Schrauwen E.J. e Fouchier R.A., 2014. Host adaptation and transmission of influenza A viruses in mammals. *Emerg Microbes Infect.* 3(2): e9. doi:10.1038/emi.2014.9
- ⁵² Arias C.F., Escalera-Zamudio M., Soto-Del Río Mde L., Cobián-Güemes A.G., Isa P., López S., 2009. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res.* 40(8): 643-654. doi:10.1016/j.arcmed.2009.10.007
- ⁵³ Nelson M.I. e Holmes E.C., 2007. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet.* 8(3): 196-205. doi:10.1038/nrg2053
- ⁵⁴ Conenello G.M., Tisoncik J.R., Rosenzweig E., Varga Z.T., Palese P., Katze M.G., 2011. A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. *J Virol.* 85(2): 652-662. doi:10.1128/JVI.01987-10
- ⁵⁵ Webster R.G. e Rott R., 1987. Influenza virus A pathogenicity: the pivotal role of hemagglutinin. *Cell.* 50(5): 665-666.
- ⁵⁶ Kawaoka Y. e Webster R.G., 1988. Molecular mechanism of acquisition of virulence in influenza virus in nature. *Microb Pathog.* 5(5): 311-318.
- ⁵⁷ Rott R., Orlich M., Scholtissek C., 1979. Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. III. Non-pathogenic recombinants derived from highly pathogenic parent strains. *J Gen Virol.* 44(2): 471-477.
- ⁵⁸ Koopmans M., Wilbrink B., Conyn M., Natrop G., van der Nat H., Vennema H., Meijer A., van Steenbergen J., Fouchier R., Osterhaus A., Bosman A., 2004. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. *Lancet.* 363(9409): 587-593.

- ⁵⁹ Peiris J.S., Yu W.C., Leung C.W., Cheung C.Y., Ng W.F., Nicholls J.M., Ng T.K., Chan K.H., Lai S.T., Lim W.L., Yuen K.Y., Guan Y., 2004. Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. *Lancet*. 363(9409): 617-619.
- ⁶⁰ Ke C., Lu J., Wu J., Guan D., Zou L., Song T., Yi L., Zeng X., Liang L., Ni H., Kang M., Zhang X., Zhong H., He J., Lin J., Smith D., Burke D., Fouchier R.A., Koopmans M., Zhang Y., 2014. Circulation of reassortant influenza A(H7N9) viruses in poultry and humans, Guangdong Province, China, 2013. *Emerg Infect Dis*. 20(12): 2034-2040. doi:10.3201/eid2012.140765
- ⁶¹ Claas E.C., Osterhaus A.D., van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne D.A., Krauss S., Shortridge K.F., Webster R.G., 1998. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet*. 351(9101): 472-477.
- ⁶² Subbarao K., Klimov A., Katz J., Regnery H., Lim W., Hall H., Perdue M., Swayne D., Bender C., Huang J., Hemphill M., Rowe T., Shaw M., Xu X., Fukuda K., Cox N., 1998. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*. 279(5349): 393-396.
- ⁶³ Bahgat M.M., Kutkat M.A., Nasraa M.H., Mostafa A., Webby R., Bahgat I.M., Ali M.A., 2009. Characterization of an avian influenza virus H5N1 Egyptian isolate. *J Virol Methods*. 159(2): 244-250. doi:10.1016/j.jviromet.2009.04.008
- ⁶⁴ Abdelwhab E.M., Hassan M.K., Abdel-Moneim A.S., Naguib M.M., Mostafa A., Hussein I.T.M., Arafa A., Erfan A.M., Kilany W.H., Agour M.G., El-Kanawati Z., Hussein H.A., Selim A.A., Kholousy S., El-Naggar H., El-Zoghby E.F., Samy A., Iqbal M., Eid A., Ibraheem E.M., Pleschka S., Veits J., Nasef S.A., Beer M., Mettenleiter T.C., Grund C., Ali M.M., Harder T.C., Hafez H.M., 2016. Introduction and enzootic of A/H5N1 in Egypt: virus evolution, pathogenicity and vaccine efficacy ten years on. *Infect Genet Evol*. 40: 80-90. doi:10.1016/j.meegid.2016.02.023
- ⁶⁵ Tweed S.A., Skowronski D.M., David S.T., Larder A., Petric M., Lees W., Li Y., Katz J., Kraiden M., Tellier R., Halpert C., Hirst M., Astell C., Lawrence D., Mak A., 2004. Human illness from avian influenza H7N3, British Columbia. *Emerg Infect Dis*. 10(12): 2196-2199.
- ⁶⁶ Alexander D.J., 2006. Avian influenza viruses and human health. *Dev Biol (Basel)*. 124: 77-84.
- ⁶⁷ Abdelwhab E.M. e Abdel-Moneim A.S., 2015. Epidemiology, ecology and gene pool of influenza A virus in Egypt: will Egypt be the epicentre of the next influenza pandemic? *Virulence*. 6(1): 6-18. doi:10.4161/21505594.2014.992662

- ⁶⁸ Short K.R., Richard M., Verhagen J.H., van Riel D., Schrauwen E.J., van den Brand J.M., Mänz B., Bodewes R., Herfst S., 2015. One health, multiple challenges: the inter-species transmission of influenza A virus. *One Health*. 1: 1-13.
- ⁶⁹ Parry J., 2013. H7N9 avian flu infects humans for the first time. *BMJ*. 346: f2151. doi:10.1136/bmj.f2151
- ⁷⁰ Shi W., Shi Y., Wu Y., Liu D., Gao G.F., 2013. Origin and molecular characterization of the human-infecting H6N1 influenza virus in Taiwan. *Protein Cell*. 4(11): 846-853. doi:10.1007/s13238-013-3083-0
- ⁷¹ Wu A., Su C., Wang D., Peng Y., Liu M., Hua S., Li T., Gao G.F., Tang H., Chen J., Liu X., Shu Y., Peng D., Jiang T., 2013. Sequential reassortments underlie diverse influenza H7N9 genotypes in China. *Cell Host Microbe*. 14(4): 446-452. doi:10.1016/j.chom.2013.09.001
- ⁷² Chen H., Yuan H., Gao R., Zhang J., Wang D., Xiong Y., Fan G., Yang F., Li X., Zhou J., Zou S., Yang L., Chen T., Dong L., Bo H., Zhao X., Zhang Y., Lan Y., Bai T., Dong J., Li Q., Wang S., Zhang Y., Li H., Gong T., Shi Y., Ni X., Li J., Zhou J., Fan J., Wu J., Zhou X., Hu M., Wan J., Yang W., Li D., Wu G., Feng Z., Gao G.F., Wang Y., Jin Q., Liu M., Shu Y., 2014. Clinical and epidemiological characteristics of a fatal case of avian influenza A H10N8 virus infection: a descriptive study. *Lancet*. 383(9918): 714-721. doi:10.1016/S0140-6736(14)60111-2
- ⁷³ Qi W., Zhou X., Shi W., Huang L., Xia W., Liu D., Li H., Chen S., Lei F., Cao L., Wu J., He F., Song W., Li Q., Li H., Liao M., Liu M., 2014. Genesis of the novel human-infecting influenza A(H10N8) virus and potential genetic diversity of the virus in poultry, China. *Euro Surveill*. 19(25). pii: 20841.
- ⁷⁴ To K.K., Tsang A.K., Chan J.F., Cheng V.C., Chen H., Yuen K.Y., 2014. Emergence in China of human disease due to avian influenza A(H10N8)--cause for concern? *J Infect*. 68(3): 205-215. doi:10.1016/j.jinf.2013.12.014
- ⁷⁵ Schild G.C., Oxford J.S., de Jong J.C., Webster R.G., 1983. Evidence for host-cell selection of influenza virus antigenic variants. *Nature*. 303(5919): 706-709.
- ⁷⁶ Robertson J.S., Naeve C.W., Webster R.G., Bootman J.S., Newman R., Schild G.C., 1985. Alterations in the hemagglutinin associated with adaptation of influenza B virus to growth in eggs. *Virology*. 143(1): 166-174.
- ⁷⁷ Ito T., Suzuki Y., Takada A., Kawamoto A., Otsuki K., Masuda H., Yamada M., Suzuki T., Kida H., Kawaoka Y., 1997. Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and

allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J Virol.* 71(4): 3357-3362.

⁷⁸ Nakajima S., Nobusawa E., Nakajima K., 2000. Variation in response among individuals to antigenic sites on the HA protein of human influenza virus may be responsible for the emergence of drift strains in the human population. *Virology.* 274(1): 220-231.

⁷⁹ König R., Stertz S., Zhou Y., Inoue A., Hoffmann H.H., Bhattacharyya S., Alamares J.G., Tscherne D.M., Ortigoza M.B., Liang Y., Gao Q., Andrews S.E., Bandyopadhyay S., De Jesus P., Tu B.P., Pache L., Shih C., Orth A., Bonamy G., Miraglia L., Ideker T., García-Sastre A., Young J.A., Palese P., Shaw M.L., Chanda S.K., 2010. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature.* 463(7282): 813-817. doi:10.1038/nature08699

⁸⁰ Matrosovich M., Stech J., Klenk H.D., 2009. Influenza receptors, polymerase and host range. *Rev Sci Tech.* 28(1): 203-217.

⁸¹ Ito T., Couceiro J.N., Kelm S., Baum L.G., Krauss S., Castrucci M.R., Donatelli I., Kida H., Paulson J.C., Webster R.G., Kawaoka Y., 1998. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J Virol.* 72(9): 7367-7373.

⁸² Nelli R.K., Kuchipudi S.V., White G.A., Perez B.B., Dunham S.P., Chang K.C., 2010. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res.* 6: 4. doi:10.1186/1746-6148-6-4

⁸³ Van Poucke S.G., Nicholls J.M., Nauwynck H.J., Van Reeth K., 2010. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. *Virol J.* 7: 38. doi:10.1186/1743-422X-7-38

⁸⁴ Trebbien R., Larsen L.E., Viuff B.M., 2011. Distribution of sialic acid receptors and influenza A virus of avian and swine origin in experimentally infected pigs. *Virol J.* 8: 434. doi:10.1186/1743-422X-8-434

⁸⁵ Viswanathan K., Chandrasekaran A., Srinivasan A., Raman R., Sasisekharan V., Sasisekharan R., 2010. Glycans as receptors for influenza pathogenesis. *Glycoconj J.* 27(6): 561-570. doi:10.1007/s10719-010-9303-4

⁸⁶ Kash J.C. e Taubenberger J.K., 2015. The role of viral, host, and secondary bacterial factors in influenza pathogenesis. *Am J Pathol.* 185(6): 1528-1536. doi:10.1016/j.ajpath.2014.08.030

⁸⁷ Paules C. e Subbarao K., 2017. Influenza. *Lancet.* 390(10095): 697-708. doi:10.1016/S0140-6736(17)30129-0

- ⁸⁸ Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W.M., Xu X., Skepner E., Deyde V., Okomo-Adhiambo M., Gubareva L., Barnes J., Smith C.B., Emery S.L., Hillman M.J., Rivailler P., Smagala J., de Graaf M., Burke D.F., Fouchier R.A., Pappas C., Alpuche-Aranda C.M., López-Gatell H., Olivera H., López I., Myers C.A., Faix D., Blair P.J., Yu C., Keene K.M., Dotson P.D. Jr, Boxrud D., Sambol A.R., Abid S.H., St George K., Bannerman T., Moore A.L., Stringer D.J., Blevins P., Demmler-Harrison G.J., Ginsberg M., Kriner P., Waterman S., Smole S., Guevara H.F., Belongia E.A., Clark P.A., Beatrice S.T., Donis R., Katz J., Finelli L., Bridges C.B., Shaw M., Jernigan D.B., Uyeki T.M., Smith D.J., Klimov A.I., Cox N.J., 2009. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. *Science*. 325(5937): 197-201. doi:10.1126/science.1176225
- ⁸⁹ Tamerius J.D., Shaman J., Alonso W.J., Bloom-Feshbach K., Uejio C.K., Comrie A., Viboud C., 2013. Environmental predictors of seasonal influenza epidemics across temperate and tropical climates. *PLoS Pathog*. 9(3): e1003194. doi:10.1371/journal.ppat.1003194
- ⁹⁰ World Health Organization (WHO), 2019. Influenza update - 342. May 2019. Accessibile al sito web: https://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2019_05_27_update_GIP_surveillance/en/
- ⁹¹ European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2019. Influenza virus characterisation. May 2019. Accessibile al sito web: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/influenza-characterisation-report-May-2019.pdf>
- ⁹² De Conto F., Conversano F., Medici M.C., Ferraglia F., Pinardi F., Arcangeletti M.C., Chezzi C., Calderaro A., 2019. Epidemiology of human respiratory viruses in children with acute respiratory tract infection in a 3-year hospital-based survey in Northern Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 94(3): 260-267. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2019.01.008
- ⁹³ World Health Organization (WHO), 2019. WHO recommendations on the composition of influenza virus vaccines. May 2019. Accessibile al sito web: https://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2019_20_north/en/
- ⁹⁴ Boivin G., Hardy I., Tellier G., Maziade J., 2000. Predicting influenza infections during epidemics with use of a clinical case definition. *Clin Infect Dis*. 31(5): 1166-1169.
- ⁹⁵ Monto A.S., Gravenstein S., Elliott M., Colopy M., Schweinle J., 2000. Clinical signs and symptoms predicting influenza infection. *Arch Intern Med*. 160(21): 3243-3247.
- ⁹⁶ Nicholson K.G., Aoki F.Y., Osterhaus A.D., Trottier S., Carewicz O., Mercier C.H., Rode A., Kinnersley N., Ward P., 2000. Efficacy and safety of oseltamivir in treatment of acute influenza: a

randomised controlled trial. Neuraminidase Inhibitor Flu Treatment Investigator Group. *Lancet*. 355(9218): 1845-1850.

⁹⁷ de Jong M.D., Tran T.T., Truong H.K., Vo M.H., Smith G.J., Nguyen V.C., Bach V.C., Phan T.Q., Do Q.H., Guan Y., Peiris J.S., Tran T.H., Farrar J., 2005. Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. *N Engl J Med*. 353(25): 2667-2672.

⁹⁸ Moscona A., 2005. Neuraminidase inhibitors for influenza. *N Engl J Med*. 353(13): 1363-1373.

⁹⁹ O'Hanlon R. e Shaw M.L., 2019. Baloxavir marboxil: the new influenza drug on the market. *Curr Opin Virol*. 35: 14-18. doi:10.1016/j.coviro.2019.01.006

¹⁰⁰ Hay A.J., Wolstenholme A.J., Skehel J.J., Smith M.H., 1985. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J*. 4(11): 3021-3024.

¹⁰¹ Zarubaev V.V., Golod E.L., Anfimov P.M., Shtro A.A., Saraev V.V., Gavrilov A.S., Logvinov A.V., Kiselev O.I., 2010. Synthesis and anti-viral activity of azolo-adamantanes against influenza A virus. *Bioorg Med Chem*. 18(2): 839-348. doi:10.1016/j.bmc.2009.11.047

¹⁰² Hurt A.C., Hardie K., Wilson N.J., Deng Y.M., Osbourn M., Gehrig N., Kelso A., 2011. Community transmission of oseltamivir-resistant A(H1N1)pdm09 influenza. *N Engl J Med*. 365(26): 2541-2542. doi:10.1056/NEJMc1111078

¹⁰³ Wang D., Sleeman K., Huang W., Nguyen H.T., Levine M., Cheng Y., Li X., Tan M., Xing X., Xu X., Klimov A.I., Gubareva L.V., Shu Y., 2013. Neuraminidase inhibitor susceptibility testing of influenza type B viruses in China during 2010 and 2011 identifies viruses with reduced susceptibility to oseltamivir and zanamivir. *Antiviral Res*. 97(3): 240-244. doi:10.1016/j.antiviral.2012.12.013

¹⁰⁴ Wu Y., Canturk B., Jo H., Ma C., Gianti E., Klein M.L., Pinto L.H., Lamb R.A., Fiorin G., Wang J., DeGrado W.F., 2014. Flipping in the pore: discovery of dual inhibitors that bind in different orientations to the wild-type versus the amantadine-resistant S31N mutant of the influenza A virus M2 proton channel. *J Am Chem Soc*. 136(52): 17987-17995. doi:10.1021/ja508461m

¹⁰⁵ Houser K. e Subbarao K., 2015. Influenza vaccines: challenges and solutions. *Cell Host Microbe*. 17(3): 295-300. doi:10.1016/j.chom.2015.02.012

¹⁰⁶ Sridhar S., Brokstad K.A., Cox R.J., 2015. Influenza vaccination strategies: comparing inactivated and live attenuated influenza vaccines. *Vaccines (Basel)*. 3(2): 373-389. doi:10.3390/vaccines3020373

- ¹⁰⁷ Wang W., Huang B., Wang X., Tan W., Ruan L., 2019. Improving cross-protection against influenza virus using recombinant vaccinia vaccine expressing NP and M2 ectodomain tandem repeats. *Virol Sin.* doi:10.1007/s12250-019-00138-9
- ¹⁰⁸ Wong S.S. e Webby R.J., 2013. Traditional and new influenza vaccines. *Clin Microbiol Rev.* 26(3): 476-492. doi:10.1128/CMR.00097-12
- ¹⁰⁹ Alberts B., Johnson A., Lewis J., Morgan D., Raff M., Roberts K., Walter P., 2009. *Biologia molecolare della cellula*. Zanichelli, 6^a edizione.
- ¹¹⁰ Hohmann T. e Dehghani F., 2019. The cytoskeleton - A complex interacting meshwork. *Cells.* 8(4). pii: E362. doi:10.3390/cells8040362
- ¹¹¹ Geisler F. e Leube R.E., 2016. Epithelial intermediate filaments: guardians against microbial infection? *Cells.* 5(3). pii: E29. doi:10.3390/cells5030029
- ¹¹² Mostowy S. e Cossart P., 2012. Septins: the fourth component of the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13(3): 183-194. doi:10.1038/nrm3284
- ¹¹³ Van Ngo H. e Mostowy S., 2019. Role of septins in microbial infection. *J Cell Sci.* 132(9). pii: jcs226266. doi:10.1242/jcs.226266
- ¹¹⁴ Mostowy S., Bonazzi M., Hamon M.A., Tham T.N., Mallet A., Lelek M., Gouin E., Demangel C., Brosch R., Zimmer C., Sartori A., Kinoshita M., Lecuit M., Cossart P., 2010. Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures. *Cell Host Microbe.* 8(5): 433-444. doi:10.1016/j.chom.2010.10.009
- ¹¹⁵ Snider N.T. e Omary M.B., 2014. Post-translational modifications of intermediate filament proteins: mechanisms and functions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(3): 163-177. doi:10.1038/nrm3753
- ¹¹⁶ Hatzfeld M. e Franke W.W., 1985. Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides. *J Cell Biol.* 101(5 Pt 1): 1826-1841.
- ¹¹⁷ Lee C.H., Kim M.S., Chung B.M., Leahy D.J., Coulombe P.A., 2012. Structural basis for heteromeric assembly and perinuclear organization of keratin filaments. *Nat Struct Mol Biol.* 19(7): 707-715. doi:10.1038/nsmb.2330

- ¹¹⁸ Hesse M., Magin T.M., Weber K., 2001. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci.* 114(Pt 14): 2569-2575.
- ¹¹⁹ Omary M.B., 2009. "IF-pathies": a broad spectrum of intermediate filament-associated diseases. *J Clin Invest.* 119(7): 1756-1762. doi:10.1172/JCI39894
- ¹²⁰ Cooper G.M., 2000. Intermediate filaments. *The cell: a molecular approach.* 2nd Edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- ¹²¹ Omary M.B., Ku N.O., Liao J., Price D., 1998. Keratin modifications and solubility properties in epithelial cells and in vitro. *Subcell Biochem.* 31: 105-140.
- ¹²² Schweizer J., Bowden P.E., Coulombe P.A., Langbein L., Lane E.B., Magin T.M., Maltais L., Omary M.B., Parry D.A., Rogers M.A., Wright M.W., 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *J Cell Biol.* 174(2): 169-174.
- ¹²³ Yamada S., Wirtz D., Coulombe P.A., 2002. Pairwise assembly determines the intrinsic potential for self-organization and mechanical properties of keratin filaments. *Mol Biol Cell.* 13(1): 382-391.
- ¹²⁴ Maniotis A.J., Chen C.S., Ingber D.E., 1997. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94(3): 849-854.
- ¹²⁵ Fuchs E. e Cleveland D.W., 1998. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science.* 279(5350): 514-519.
- ¹²⁶ Sandilands A., Prescott A.R., Wegener A., Zoltoski R.K., Hutcheson A.M., Masaki S., Kuszak J.R., Quinlan R.A., 2003. Knockout of the intermediate filament protein CP49 destabilises the lens fibre cell cytoskeleton and decreases lens optical quality, but does not induce cataract. *Exp Eye Res.* 76(3): 385-391.
- ¹²⁷ Hyder C.L., Pallari H.M., Kochin V., Eriksson J.E., 2008. Providing cellular signposts--post-translational modifications of intermediate filaments. *FEBS Lett.* 582(14): 2140-2148. doi:10.1016/j.febslet.2008.04.064
- ¹²⁸ Omary M.B., Ku N.O., Tao G.Z., Toivola D.M., Liao J., 2006. "Heads and tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci.* 31(7): 383-394.

- ¹²⁹ Snider N.T., Park H., Omary M.B., 2013. A conserved rod domain phosphotyrosine that is targeted by the phosphatase PTP1B promotes keratin 8 protein insolubility and filament organization. *J Biol Chem.* 288(43): 31329-31337. doi:10.1074/jbc.M113.502724
- ¹³⁰ Izawa I. e Inagaki M., 2006. Regulatory mechanisms and functions of intermediate filaments: a study using site- and phosphorylation state-specific antibodies. *Cancer Sci.* 97(3): 167-174.
- ¹³¹ Sihag R.K., Inagaki M., Yamaguchi T., Shea T.B., Pant H.C., 2007. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp Cell Res.* 313(10): 2098-2109.
- ¹³² Fuchs E. e Weber K., 1994. Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease. *Annu Rev Biochem.* 63: 345-382.
- ¹³³ Coulombe P.A. e Omary M.B., 2002. "Hard" and "soft" principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 14(1): 110-122.
- ¹³⁴ Ku N.O. e Omary M.B., 1994. Identification of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 18: potential kinases and a role in filament reorganization. *J Cell Biol.* 127(1): 161-171.
- ¹³⁵ Liao J., Lowthert L.A., Omary M.B., 1995. Heat stress or rotavirus infection of human epithelial cells generates a distinct hyperphosphorylated form of keratin 8. *Exp Cell Res.* 219(2): 348-357.
- ¹³⁶ Ku N.O., Zhou X., Toivola D.M., Omary M.B., 1999. The cytoskeleton of digestive epithelia in health and disease. *Am J Physiol.* 277(6): G1108-G1137. doi:10.1152/ajpgi.1999.277.6.G1108
- ¹³⁷ Caulín C., Salvesen G.S., Oshima R.G., 1997. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *J Cell Biol.* 138(6): 1379-1394.
- ¹³⁸ Tao G.Z., Toivola D.M., Zhou Q., Strnad P., Xu B., Michie S.A., Omary M.B., 2006. Protein phosphatase-2A associates with and dephosphorylates keratin 8 after hyposmotic stress in a site- and cell-specific manner. *J Cell Sci.* 119(Pt 7): 1425-1432.
- ¹³⁹ Fang J., Wang H., Liu Y., Ding F., Ni Y., Shao S., 2017. High KRT8 expression promotes tumor progression and metastasis of gastric cancer. *Cancer Sci.* 108(2): 178-186. doi:10.1111/cas.13120
- ¹⁴⁰ Iyer S.V., Dange P.P., Alam H., Sawant S.S., Ingle A.D., Borges A.M., Shirsat N.V., Dalal S.N., Vaidya M.M., 2013. Understanding the role of keratins 8 and 18 in neoplastic potential of breast cancer derived cell lines. *PLoS One.* 8(1): e53532. doi:10.1371/journal.pone.0053532

- ¹⁴¹ Mackinder M.A., Evans C.A., Chowdry J., Staton C.A., Corfe B.M., 2012. Alteration in composition of keratin intermediate filaments in a model of breast cancer progression and the potential to reverse hallmarks of metastasis. *Cancer Biomark.* 12(2): 49-64. doi:10.3233/CBM-120293
- ¹⁴² Snider N.T., 2016. Kidney keratins: cytoskeletal stress responders with biomarker potential. *Kidney Int.* 89(4): 738-740. doi:10.1016/j.kint.2015.12.040
- ¹⁴³ Wang X., Chen P., Cui J., Yang C., Du H., 2015. Keratin 8 is a novel autoantigen of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 465(4): 665-669. doi:10.1016/j.bbrc.2015.07.161
- ¹⁴⁴ Zhong Q., An X., Yang Y.X., Hu H.D., Ren H., Hu P., 2014. Keratin 8 is involved in hepatitis B virus replication. *J Med Virol.* 86(4): 687-694. doi:10.1002/jmv.23873
- ¹⁴⁵ Sun M.Z., Dang S.S., Wang W.J., Jia X.L., Zhai S., Zhang X., Li M., Li Y.P., Xun M., 2013. Cytokeratin 8 is increased in hepatitis C virus cells and its ectopic expression induces apoptosis of SMMC7721 cells. *World J Gastroenterol.* 19(37): 6178-6187. doi:10.3748/wjg.v19.i37.6178
- ¹⁴⁶ Toivola D.M., Ku N.O., Resurreccion E.Z., Nelson D.R., Wright T.L., Omary M.B., 2004. Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology.* 40(2): 459-466.
- ¹⁴⁷ Shi Y., Sun S., Liu Y., Li J., Zhang T., Wu H., Chen X., Chen D., Zhou Y., 2010. Keratin 18 phosphorylation as a progression marker of chronic hepatitis B. *Virol J.* 7: 70. doi:10.1186/1743-422X-7-70
- ¹⁴⁸ Shirato K., Ujike M., Kawase M., Matsuyama S., 2012. Increased replication of respiratory syncytial virus in the presence of cytokeratin 8 and 18. *J Med Virol.* 84(2): 365-370. doi:10.1002/jmv.23196
- ¹⁴⁹ Seipelt J., Liebig H.D., Sommergruber W., Gerner C., Kuechler E., 2000. 2A proteinase of human rhinovirus cleaves cytokeratin 8 in infected HeLa cells. *J Biol Chem.* 275(26): 20084-20089.
- ¹⁵⁰ Yamagata K., Sanders L.K., Kaufmann W.E., Yee W., Barnes C.A., Nathans D., Worley P.F., 1994. Rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel Ras-related protein. *J Biol Chem.* 269(23): 16333-16339.
- ¹⁵¹ Patel P.H., Thapar N., Guo L., Martinez M., Maris J., Gau C.L., Lengyel J.A., Tamanoi F., 2003. Drosophila Rheb GTPase is required for cell cycle progression and cell growth. *J Cell Sci.* 116(Pt 17): 3601-3610.

- ¹⁵² Gromov P.S., Madsen P., Tomerup N., Celis J.E., 1995. A novel approach for expression cloning of small GTPases: identification, tissue distribution and chromosome mapping of the human homolog of rheb. *FEBS Lett.* 377(2): 221-226.
- ¹⁵³ Legate K.R., Takahashi S., Bonakdar N., Fabry B., Boettiger D., Zent R., Fässler R., 2011. Integrin adhesion and force coupling are independently regulated by localized PtdIns(4,5)2 synthesis. *EMBO J.* 30(22): 4539-4553. doi:10.1038/emboj.2011.332
- ¹⁵⁴ Takahashi K., Nakagawa M., Young S.G., Yamanaka S., 2005. Differential membrane localization of ERas and Rheb, two Ras-related proteins involved in the phosphatidylinositol 3-kinase/mTOR pathway. *J Biol Chem.* 280(38): 32768-32774.
- ¹⁵⁵ Yuan T.L. e Cantley L.C., 2008. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene.* 27(41): 5497-5510. doi:10.1038/onc.2008.245
- ¹⁵⁶ Fingar D.C. e Blenis J., 2004. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene.* 23(18): 3151-3171.
- ¹⁵⁷ Wullschleger S., Loewith R., Hall M.N., 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 124(3): 471-484.
- ¹⁵⁸ Tee A.R., Blenis J., Proud C.G., 2005. Analysis of mTOR signaling by the small G-proteins, Rheb and RhebL1. *FEBS Lett.* 579(21): 4763-4768.
- ¹⁵⁹ Tee A.R., Manning B.D., Roux P.P., Cantley L.C., Blenis J., 2003. Tuberous sclerosis complex gene products, Tuberin and Hamartin, control mTOR signaling by acting as a GTPase-activating protein complex toward Rheb. *Curr Biol.* 13(15): 1259-1268.
- ¹⁶⁰ Breuleux M., Klopfenstein M., Stephan C., Doughty C.A., Barys L., Maira S.M., Kwiatkowski D., Lane H.A., 2009. Increased AKT S473 phosphorylation after mTORC1 inhibition is rictor dependent and does not predict tumor cell response to PI3K/mTOR inhibition. *Mol Cancer Ther.* 8(4): 742-753. doi:10.1158/1535-7163.MCT-08-0668
- ¹⁶¹ Clippinger A.J., Maguire T.G., Alwine J.C., 2011. Human cytomegalovirus infection maintains mTOR activity and its perinuclear localization during amino acid deprivation. *J Virol.* 85(18): 9369-9376. doi:10.1128/JVI.05102-11
- ¹⁶² Bose S.K., Shrivastava S., Meyer K., Ray R.B., Ray R., 2012. Hepatitis C virus activates the mTOR/S6K1 signaling pathway in inhibiting IRS-1 function for insulin resistance. *J Virol.* 86(11): 6315-6322. doi:10.1128/JVI.00050-12

- ¹⁶³ Aspuria P.J. e Tamanoi F., 2004. The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cell Signal.* 16(10): 1105-1112.
- ¹⁶⁴ Tabancay A.P. Jr, Gau C.L., Machado I.M., Uhlmann E.J., Gutmann D.H., Guo L., Tamanoi F., 2003. Identification of dominant negative mutants of Rheb GTPase and their use to implicate the involvement of human Rheb in the activation of p70S6K. *J Biol Chem.* 278(41): 39921-39930.
- ¹⁶⁵ Yuan J., Shan Y., Chen X., Tang W., Luo K., Ni J., Wan B., Yu L., 2005. Identification and characterization of RHEBL1, a novel member of Ras family, which activates transcriptional activities of NF-kappa B. *Mol Biol Rep.* 32(4): 205-214.
- ¹⁶⁶ Robb V.A., Karbowniczek M., Klein-Szanto A.J., Henske E.P., 2007. Activation of the mTOR signaling pathway in renal clear cell carcinoma. *J Urol.* 177(1): 346-352.
- ¹⁶⁷ Kim H.J., Byun H.J., Park M.K., Kim E.J., Kang G.J., Lee C.H., 2017. Novel involvement of RhebL1 in sphingosylphosphorylcholine-induced keratin phosphorylation and reorganization: binding to and activation of AKT1. *Oncotarget.* 8(13): 20851-20864. doi:10.18632/oncotarget.15364
- ¹⁶⁸ Arcangeletti M.C., De Conto F., Ferraglia F., Pinardi F., Gatti R., Orlandini G., Covan S., Motta F., Rodighiero I., Dettori G., Chezzi C., 2008. Host-cell-dependent role of actin cytoskeleton during the replication of a human strain of influenza A virus. *Arch Virol.* 153(7): 1209-1221. doi:10.1007/s00705-008-0103-0
- ¹⁶⁹ De Conto F., Di Lonardo E., Arcangeletti M.C., Chezzi C., Medici M.C., Calderaro A., 2012. Highly dynamic microtubules improve the effectiveness of early stages of human influenza A/NWS/33 virus infection in LLC-MK2 cells. *PLoS One.* 7(7): e41207. doi:10.1371/journal.pone.0041207
- ¹⁷⁰ De Conto F., Chezzi C., Fazzi A., Razin S.V., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Gatti R., Calderaro A., 2015. Proteasomes raise the microtubule dynamics in influenza A (H1N1) virus-infected LLC-MK2 cells. *Cell Mol Biol Lett.* 20(5): 840-866. doi:10.1515/cmble-2015-0052
- ¹⁷¹ De Conto F., Fazzi A., Razin S.V., Arcangeletti M.C., Medici M.C., Belletti S., Chezzi C., Calderaro A., 2018. Mammalian Diaphanous-related formin-1 restricts early phases of influenza A/NWS/33 virus (H1N1) infection in LLC-MK2 cells by affecting cytoskeleton dynamics. *Mol Cell Biochem.* 437(1-2): 185-201. doi:10.1007/s11010-017-3107-9
- ¹⁷² Busch T., Armacki M., Eiseler T., Joodi G., Temme C., Jansen J., von Wichert G., Omary M.B., Spatz J., Seufferlein T., 2012. Keratin 8 phosphorylation regulates keratin reorganization and migration of epithelial tumor cells. *J Cell Sci.* 125(Pt 9): 2148-2159. doi:10.1242/jcs.080127

- 173 Reed L.J. e Muench H., 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Epidemiol.* 27:b493-497. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a118408
- 174 Arcangeletti M.C., Pinardi F., Missorini S., De Conto F., Conti G., Portincasa P., Scherrer K., Chezzi C., 1997. Modification of cytoskeleton and prosome networks in relation to protein synthesis in influenza A virus-infected LLC-MK2 cells. *Virus Res.* 51(1): 19-34.
- 175 Belser J.A., Katz J.M., Tumpey T.M., 2011. The ferret as a model organism to study influenza A virus infection. *Dis Model Mech.* 4(5): 575-579. doi:10.1242/dmm.007823
- 176 Ryan K.A., Slack G.S., Marriott A.C., Kane J.A., Whittaker C.J., Silman N.J., Carroll M.W., Gooch K.E., 2018. Cellular immune response to human influenza viruses differs between H1N1 and H3N2 subtypes in the ferret lung. *PLoS One.* 13(9): e0202675. doi:10.1371/journal.pone.0202675
- 177 Peiris J.S., de Jong M.D., Guan Y., 2007. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. *Clin Microbiol Rev.* 20(2): 243-267.
- 178 Matsuda K., Shibata T., Sakoda Y., Kida H., Kimura T., Ochiai K., Umemura T., 2005. In vitro demonstration of neural transmission of avian influenza A virus. *J Gen Virol.* 86(Pt 4): 1131-1139.
- 179 Sripada S. e Dayaraj C., 2010. Viral interactions with intermediate filaments: paths less explored. *Cell Health Cytoskelet.* 2(1): 1-7.
- 180 Wu W. e Panté N., 2016. Vimentin plays a role in the release of the influenza A viral genome from endosomes. *Virology.* 497: 41-52. doi:10.1016/j.virol.2016.06.021
- 181 Lee E.J., Park M.K., Kim H.J., Kang J.H., Kim Y.R., Kang G.J., Byun H.J., Lee C.H., 2014. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces keratin 8 phosphorylation and reorganization via expression of transglutaminase-2. *Biomol Ther (Seoul).* 22(2): 122-128. doi:10.4062/biomolther.2014.007
- 182 Liao J. e Omary M.B., 1996. 14-3-3 proteins associate with phosphorylated simple epithelial keratins during cell cycle progression and act as a solubility cofactor. *J Cell Biol.* 133(2): 345-357.
- 183 Strnad P., Windoffer R., Leube R.E., 2001. In vivo detection of cytokeratin filament network breakdown in cells treated with the phosphatase inhibitor okadaic acid. *Cell Tissue Res.* 306(2): 277-293.
- 184 Strnad P., Windoffer R., Leube R.E., 2002. Induction of rapid and reversible cytokeratin filament network remodeling by inhibition of tyrosine phosphatases. *J Cell Sci.* 115(Pt 21): 4133-4148.

- ¹⁸⁵ Ridge K.M., Linz L., Flitney F.W., Kuczmarski E.R., Chou Y.H., Omary M.B., Sznajder J.I., Goldman R.D., 2005. Keratin 8 phosphorylation by protein kinase C delta regulates shear stress-mediated disassembly of keratin intermediate filaments in alveolar epithelial cells. *J Biol Chem.* 280(34): 30400-30405.
- ¹⁸⁶ Eckert B.S., 1985. Alteration of intermediate filament distribution in PtK1 cells by acrylamide. *Eur J Cell Biol.* 37: 169-174.
- ¹⁸⁷ Bhattacharya B., Noad R.J., Roy P., 2007. Interaction between Bluetongue virus outer capsid protein VP2 and vimentin is necessary for virus egress. *Virol J.* 4: 7.
- ¹⁸⁸ Kanlaya R., Pattanakitsakul S.N., Sinchaikul S., Chen S.T., Thongboonkerd V., 2010. Vimentin interacts with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins and dengue nonstructural protein 1 and is important for viral replication and release. *Mol Biosyst.* 6(5): 795-806. doi:10.1039/b923864f
- ¹⁸⁹ Eckert B.S. e Yeagle P.L., 1988. Acrylamide treatment of PtK1 cells causes dephosphorylation of keratin polypeptides. *Cell Motil Cytoskeleton.* 11(1): 24-30.
- ¹⁹⁰ Cordo S.M. e Candurra N.A., 2003. Intermediate filament integrity is required for Junin virus replication. *Virus Res.* 97(1): 47-55.
- ¹⁹¹ Gladue D.P., O'Donnell V., Baker-Branstetter R., Holinka L.G., Pacheco J.M., Fernández Sainz I., Lu Z., Ambroggio X., Rodriguez L., Borca M.V., 2013. Foot-and-mouth disease virus modulates cellular vimentin for virus survival. *J Virol.* 87(12): 6794-6803. doi:10.1128/JVI.00448-13
- ¹⁹² Miller M.S. e Hertel L., 2009. Onset of human cytomegalovirus replication in fibroblasts requires the presence of an intact vimentin cytoskeleton. *J Virol.* 83(14): 7015-7028. doi:10.1128/JVI.00398-09
- ¹⁹³ Kujime K., Hashimoto S., Gon Y., Shimizu K., Horie T., 2000. p38 mitogen-activated protein kinase and c-jun-NH2-terminal kinase regulate RANTES production by influenza virus-infected human bronchial epithelial cells. *J Immunol.* 164(6): 3222-3228.
- ¹⁹⁴ Pleschka S., Wolff T., Ehrhardt C., Hobom G., Planz O., Rapp U.R., Ludwig S., 2001. Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol.* 3(3): 301-305.
- ¹⁹⁵ Cadrin M., McFarlane-Anderson N., Aasheim L.H., Kawahara H., Franks D.J., Marceau N., French S.W., 1992. Differential phosphorylation of CK8 and CK18 by 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate in primary cultures of mouse hepatocytes. *Cell Signal.* 4(6): 715-722.

- ¹⁹⁶ Paramio J.M., 1999. A role for phosphorylation in the dynamics of keratin intermediate filaments. *Eur J Cell Biol.* 78(1): 33-43.
- ¹⁹⁷ Beil M., Micoulet A., von Wichert G., Paschke S., Walther P., Omary M.B., Van Veldhoven P.P., Gern U., Wolff-Hieber E., Eggermann J., Waltenberger J., Adler G., Spatz J., Seufferlein T., 2003. Sphingosylphosphorylcholine regulates keratin network architecture and visco-elastic properties of human cancer cells. *Nat Cell Biol.* 5(9): 803-811.
- ¹⁹⁸ Karczewski M.K. e Strebel K., 1996. Cytoskeleton association and virion incorporation of the human immunodeficiency virus type 1 Vif protein. *J Virol.* 70(1): 494-507.
- ¹⁹⁹ Yohannes E., Ghosh S.K., Jiang B., McCormick T.S., Weinberg A., Hill E., Faddoul F., Chance M.R., 2011. Proteomic signatures of human oral epithelial cells in HIV-infected subjects. *PLoS One.* 6(11): e27816. doi:10.1371/journal.pone.0027816
- ²⁰⁰ Sitprija V. e Sitprija S., 2019. Marine toxins and nephrotoxicity: mechanism of injury. *Toxicon.* 161: 44-49. doi:10.1016/j.toxicon.2019.02.012
- ²⁰¹ Kasahara K., Kartasova T., Ren X.Q., Ikuta T., Chida K., Kuroki T., 1993. Hyperphosphorylation of keratins by treatment with okadaic acid of BALB/MK-2 mouse keratinocytes. *J Biol Chem.* 268(31): 23531-23537.
- ²⁰² Yatsunami J., Komori A., Ohta T., Suganuma M., Yuspa S.H., Fujiki H., 1993. Hyperphosphorylation of cytokeratins by okadaic acid class tumor promoters in primary human keratinocytes. *Cancer Res.* 53(5): 992-996.
- ²⁰³ Ku N.O., Azhar S., Omary M.B., 2002. Keratin 8 phosphorylation by p38 kinase regulates cellular keratin filament reorganization: modulation by a keratin 1-like disease causing mutation. *J Biol Chem.* 277(13): 10775-10782.
- ²⁰⁴ Castagna M., Takai Y., Kaibuchi K., Sano K., Kikkawa U., Nishizuka Y., 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* 257(13): 7847-7851.
- ²⁰⁵ Chen H.W., Chao C.Y., Lin L.L., Lu C.Y., Liu K.L., Lii C.K., Li C.C., 2013. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 expression by docosahexaenoic acid mediated by heme oxygenase 1 in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced MCF-7 human breast cancer cells. *Arch Toxicol.* 87(5): 857-869. doi:10.1007/s00204-012-1003-3

- ²⁰⁶ Ku N.O. e Omary M.B., 1997. Phosphorylation of human keratin 8 in vivo at conserved head domain serine 23 and at epidermal growth factor-stimulated tail domain serine 431. *J Biol Chem.* 272(11): 7556-7564.
- ²⁰⁷ Sivaramakrishnan S., Schneider J.L., Sitikov A., Goldman R.D., Ridge K.M., 2009. Shear stress induced reorganization of the keratin intermediate filament network requires phosphorylation by protein kinase C zeta. *Mol Biol Cell.* 20(11): 2755-2765. doi:10.1091/mbc.E08-10-1028
- ²⁰⁸ Zatloukal K., Stumptner C., Fuchsbichler A., Fickert P., Lackner C., Trauner M., Denk H., 2004. The keratin cytoskeleton in liver diseases. *J Pathol.* 204(4): 367-376.
- ²⁰⁹ Arora D.J. e Gasse N., 1998. Influenza virus hemagglutinin stimulates the protein kinase C activity of human polymorphonuclear leucocytes. *Arch Virol.* 143(10): 2029-2037.
- ²¹⁰ Kunzelmann K., Beesley A.H., King N.J., Karupiah G., Young J.A., Cook D.I., 2000. Influenza virus inhibits amiloride-sensitive Na⁺ channels in respiratory epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97(18): 10282-10287.
- ²¹¹ Root C.N., Wills E.G., McNair L.L., Whittaker G.R., 2000. Entry of influenza viruses into cells is inhibited by a highly specific protein kinase C inhibitor. *J Gen Virol.* 81(Pt 11): 2697-2705.
- ²¹² Constantinescu S.N., Cernescu C.D., Popescu L.M., 1991. Effects of protein kinase C inhibitors on viral entry and infectivity. *FEBS Lett.* 292(1-2): 31-33.
- ²¹³ Toker A., 1998. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci.* 3: D1134-1147.
- ²¹⁴ Yu G., Liang W., Liu J., Meng D., Wei L., Chai T., Cai Y., 2016. Proteomic analysis of differential expression of cellular proteins in response to avian H9N2 virus infection of A549 cells. *Front Microbiol.* 7: 1962. doi:10.3389/fmicb.2016.01962
- ²¹⁵ Bowden P.E., Woodworth C.D., Doniger J., DiPaolo J.A., 1992. Down-regulation of keratin 14 gene expression after v-Ha-ras transfection of human papillomavirus-immortalized human cervical epithelial cells. *Cancer Res.* 52(21): 5865-5871.
- ²¹⁶ Goshima F., Watanabe D., Suzuki H., Takakuwa H., Yamada H., Nishiyama Y., 2001. The US2 gene product of herpes simplex virus type 2 interacts with cytokeratin 18. *Arch Virol.* 146(11): 2201-2209.
- ²¹⁷ Labudova M., Tomaskova J., Skultety L., Pastorek J., Pastorekova S., 2009. The nucleoprotein of lymphocytic choriomeningitis virus facilitates spread of persistent infection through stabilization of the keratin network. *J Virol.* 83(16): 7842-7849. doi:10.1128/JVI.00309-09

- ²¹⁸ Park M.K., Lee H.J., Shin J., Noh M., Kim S.Y., Lee C.H., 2011. Novel participation of transglutaminase-2 through c-Jun N-terminal kinase activation in sphingosylphosphorylcholine-induced keratin reorganization of PANC-1 cells. *Biochim Biophys Acta*. 1811(12): 1021-1029. doi:10.1016/j.bbaliip.2011.07.007
- ²¹⁹ Parmar N. e Bonneau A., 2010. Production and characterization of a highly specific and potent antibody capable of detecting endogenous RhebL1 protein in mammalian tissues and cell lines. *J Biotech Res*. 2: 21-33.
- ²²⁰ Bonneau A. e Parmar N., 2011. Double knockdown of the Rheb gene in mammalian cells using RNA interference. *Biochem Mol Biol. The Faseb Journal*. 25 Suppl 1.
- ²²¹ Zou J., Zhou L., Du X.X., Ji Y., Xu J., Tian J., Jiang W., Zou Y., Yu S., Gan L., Luo M., Yang Q., Cui Y., Yang W., Xia X., Chen M., Zhao X., Shen Y., Chen P.Y., Worley P.F., Xiao B., 2011. Rheb1 is required for mTORC1 and myelination in postnatal brain development. *Dev Cell*. 20(1): 97-108. doi:10.1016/j.devcel.2010.11.020
- ²²² Bonneau A. e Parmar N., 2012. Effects of RhebL1 silencing on the mTOR pathway. *Mol Biol Rep*. 39(3): 2129-2137. doi:10.1007/s11033-011-0960-6
- ²²³ Groenewoud M.J., Goorden S.M., Kassies J., Pellis-van Berkel W., Lamb R.F., Elgersma Y., Zwartkruis F.J., 2013. Mammalian target of rapamycin complex I (mTORC1) activity in ras homologue enriched in brain (Rheb)-deficient mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One*. 8(11): e81649. doi:10.1371/journal.pone.0081649