



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Medicina Molecolare

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN : BIOMEDICINA

CICLO XXVII

**SVILUPPO DI UN APPROCCIO TERAPEUTICO BASATO SU PICCOLI RNA DIRETTI VERSO I
SEGMENTI GENOMICI CODIFICANTI LA POLIMERASI DEL VIRUS DELL'INFLUENZA**

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Riccardo Manganelli

Supervisore : Dott.ssa Arianna Calistri

Dottorando : Francesco Martelli

INDICE

ABBREVIAZIONI	pag. 1
SUMMARY	pag. 3
SOMMARIO	pag. 4
1. INTRODUZIONE	pag. 6
1.1 I virus influenzali: caratteristiche generali.....	pag. 6
1.2 Nomenclatura e classificazione dei virus influenzali.....	pag. 6
1.3 Struttura e morfologia del virione.....	pag. 7
1.3.1 Struttura del genoma virale.....	pag. 9
1.4 Variabilità genetica.....	pag. 13
1.4.1 Antigenic Drift	pag. 13
1.4.2 Antigenic Shift	pag.13
1.5 Replicazione dei virus influenzali.....	pag. 14
1.5.1 Legame alla cellula ospite.....	pag. 15
1.5.2 Ingresso del virus nella cellula bersaglio.....	pag. 16
1.5.3 Sintesi dell'RNA virale virale.....	pag. 17
1.5.4 Sintesi delle proteine virali.....	pag. 17
1.5.5 Packaging del genoma virale nelle particelle neo formate.....	pag. 19
1.6 Terapia anti influenzale.....	pag. 22
1.7 RNA <i>interference</i>	pag. 25
1.8 Caratteristiche dei vettori Lentivirali.....	pag. 26
2. SCOPO DELLA RICERCA	pag. 29
3. MATERIALI E METODI	pag. 30
3.1 Linee cellulari.....	pag. 30

3.2 Virus.....	pag. 30
3.3 Preparazione degli stock di virus influenzali di tipo A e B.....	pag. 31
3.4 Titolazione dell'infettività del virus influenzale a diluizione limite	pag. 31
3.5 Vettori.....	pag. 32
3.6 Ottenimento dei vettori lentivirali esprimenti RNA antisenso e miRNA.....	pag. 33
3.7 Preparazione di DNA plasmidico su piccola scala.....	pag. 38
3.8 Preparazioni di DNA plasmidico su larga scala (maxi-prep)	pag. 38
3.9 Reazione di sequenziamento.....	pag. 39
3.10 Produzione dei virioni ricombinanti.....	pag. 40
3.11 Trasduzione di cellule A549 con particelle Lentivirali.....	pag. 41
3.12 Titolazione dello stock di particelle ricombinanti prodotte.....	pag. 42
3.13 Infezione delle cellule A549 precedentemente trasdotte con le particelle lentivirali	pag. 42
3.14 Estrazione dell' RNA.....	pag. 43
3.15 Sintesi del cDNA per l'amplificazione dell'RNA.....	pag. 43
3.16 qRT-PCR per l'amplificazione degli RNAs.....	pag. 44
4.RISULTATI.....	pag. 45
4.1 Ottenimento e caratterizzazione di vettori lentivirali esprimenti piccoli RNA aventi come target le regioni dei segmenti genomici codificanti le subunità delle polimerasi acida e basiche (PA, PB1 e PB2) del virus influenzale di tipo A	pag. 45
4.2 Titolazione su cellule A549 dei virus umani ed aviari utilizzati.....	pag. 52
4.3 Valutazione degli effetti dei virioni ricombinanti sulla replicazione di virus dell' influenza di tipo A umani.....	pag. 53
4.4 Valutazione degli effetti dei virioni lentivirali ricombinanti sulla replicazione di virus dell' influenza di tipo A umani a differenti tempi dall'infezione	pag. 56
4.5 Valutazione degli effetti dei virioni lentivirali ricombinanti sulla replicazione di virus dell'influenza A aviari	pag. 57

4.6 Le particelle lentivirali ricombinanti sviluppati hanno un effetto antivirale specifico per i virus dell'influenza di tipo A.....	pag. 59
4.7 Mutazioni a livello della regione target alterano la capacità dei piccoli RNA di inibire la replicazione del virus dell'influenza di tipo A.....	pag. 60
4.8 Effetto delle mutazioni al di fuori della regione target sulla sensibilità virale degli small RNA.....	pag. 61
4.9 Effetto delle differenti combinazioni degli small-RNA sul virus PR8 H1N1 (prototipo).....	pag. 62
4.10 Confronto tra i livelli di espressione dei piccoli RNA diretti verso PB2.....	pag. 63
5. DISCUSSIONE.....	pag. 64
6. BIBLIOGRAFIA.....	pag. 72

Abbreviazioni

293T, Cellule renali di embrioni umani

A549, cellule alveolari umane adenocarcinoma basali epiteliali

AA, aminoacido/i

Ab, anticorpo

Amp, ampicillina

Pb, paia di basi

BSA, albumina di siero bovino

BSL-3, laboratori di biosicurezza di livello tre

CAF, cloramfenicolo

DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium

DNA, acido desossiribonucleico

d.p.i., day post-infection

Early, precoce

EDTA, acido etilendiamminotetracetico

FBS, fetal bovine serum

GFP, green fluorescent protein

HA, emoagglutinina

h.p.i., hours post-infection

kb, kilobasi

kDa, kilo Dalton

LB, loading buffer

LB-Medium, Luria Bertani-Medium

LTR, long terminal repeat

Mg, microgrammi, 10^{-6}

μl, microlitri, 10^{-6}

MDCK, Madin-Darby cellule renali canine

m.o.i., molteplicità d'infezione

NA, Neuraminidasi

ng, nanogrammi, 10^{-9} g

NP, Nucleoproteina

NTP, nucleotide trifosfato

PA, polimerasi acida
PB1, polimerasi basica di tipo 1
PB2, polimerasi basica di tipo 2
PBS, phosphate buffer saline (tampone fosfato)
PCR, polymerase chain reaction
PFU, unità formanti placca
RNA, acido ribonucleico
RNAs, piccoli acido ribonucleico
Rpm, rivoluzioni per minuto
TBE, trisborato EDTA
TCID 50%, dosi infettanti il 50% del tessuto di coltura
TU/ml, unità trasducesti su millilitro
UPF, unità formanti placche
vRNP, Complessi Ribonucleoproteici Virali

SUMMARY

Influenza A viruses, capable of infecting humans and birds, are associated not only to seasonal epidemics, but also to pandemics, with an high impact on Public Health. The emergence of influenza viruses to the currently available drugs and the lack of universal vaccination strategies are main human and veterinarian concerns. Thus, the research of innovative targets for the development of therapeutic anti-influenza A virus strategies is still required. The aim of this study was to develop an innovative antiviral approach based on the delivery into eukaryotic cells susceptible to influenza virus infection of small RNA molecules targeting the highly conserved regions mapping at the 5' ends of the 3 viral genomic segments encoding for the polymerase (PA, PB1, PB2), an enzyme essential for viral replication (Giannecchini S. et al., 2009- 2011). The target sequences represent the packaging signals of these 3 genomic segments and play an important role during the assembly and budding of the newly formed particles (Qinshan Gao et al., 2012). To this end, we developed different lentiviral vectors expressing miRNAs [pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR] or antisense-RNAs [pLentilox 3.7 GFP] targeting PA, PB1 and PB2 segments. Recombinant lentiviral particles, produced by transfecting human embryonic kidney cells (293T) with both vectors in combination with a packaging systems, were harvested and titrated on human alveolar adenocarcinoma cell line (A549) by FACS analysis. The lentiviral vectors transduction efficiency on different cell lines was evaluated by FACS assay and by quantitative Real-Time PCR. The transduced cells were infected with epidemiologically relevant human influenza viruses type A and B and avian viruses type A. The viral inhibitory activity was assessed by employing an infectivity assay.

We showed that recombinant lentiviral particles expressing miRNA or antisense-RNAs efficiently transduced A549 cell lines that are highly susceptible to influenza virus replication. More importantly, a reduction from 1 to 3 logatims of the viral titre was obtained in all tested cell lines infected with human and avian subtypes of influenza type A viruses. By contrast, no inhibition of influenza type B virus was observed. Furthermore, mutations within the target sequences abolished the antiviral effects of the developed vectors, thus confirming the specificity of the approach. Our study contributes to the demonstration that the expression of small RNAs targeting the packaging signal of the polymerases gene might represent an efficient strategy against the influenza A virus infection in human (especially in pandemic events) and birds.

SOMMARIO

I virus dell'influenza di tipo A sono in grado di infettare gli esseri umani e gli uccelli ed essendo responsabili non solo di epidemie stagionali, ma anche di pandemie, hanno un impatto importante per la Salute Pubblica. L' insorgenza di virus influenzali resistenti ai farmaci attualmente disponibili e la mancanza di una terapia vaccinale universale sono una fonte di costante preoccupazione tanto per la popolazione umana quanto per quella animale. Pertanto, la ricerca di nuovi bersagli per lo sviluppo di approcci terapeutici / preventivi nei confronti del virus influenzale di tipo A è ancora necessaria. Lo scopo di questo studio è stato quello di sviluppare e valutare una strategia antivirale innovativa basata sul delivery in cellule eucariotiche suscettibili d'infezione da parte del virus dell'influenza di tipo A di piccoli RNA. Questi ultimi hanno come bersaglio le regioni conservate presenti al 5' dei 3 segmenti del genoma virale codificanti la polimerasi (PA, PB1, PB2), enzima essenziale perché il virus possa replicarsi (Giannecchini S. et al., 2009- 2011). Nelle regioni bersaglio si trovano i segnali di packaging, che svolgono un ruolo importante durante le fasi di assemblaggio e gemmazione delle particelle virali nascenti (Qinshan Gao et al., 2012). A tale scopo, abbiamo sviluppato diversi vettori lentivirali esprimenti miRNA [pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR] o antisenso-RNA [pLentilox 3.7 GFP] diretti verso i segmenti genomici PA, PB1 e PB2. Le particelle lentivirali ricombinanti, sono state prodotte trasfettando cellule umane embrionali renali (293T) con entrambi i vettori insieme ad un appropriato sistema di packaging. Le particelle lentivirali ricombinanti sono state utilizzate per trasdurre le cellule umane di derivazione alveolare (A549) che rappresentano un ottimo modello per lo studio di molecole in grado di interferire con la replicazione del virus dell'influenza di tipo A.

Le cellule trasdotte sono state quindi infettate con virus dell'influenza di tipo A di origine umana e aviaria e con un virus di tipo B. L'effetto di inibizione sul titolo della progenie virale è stato valutato mediante un test di infettività.

Abbiamo dimostrato che le particelle lentivirali ricombinanti che esprimono miRNA o antisenso-RNA, trasducendo in modo efficiente la linea cellulare A549, determinano una riduzione del titolo virale che varia dagli 1 a 3 logaritmi, a seconda del virus e del bersaglio molecolare preso in esame. Al contrario, non è stata osservato nessun effetto nel caso del virus dell'influenza di tipo B. Inoltre, mutazioni all'interno delle sequenze bersaglio fanno sì che non vi siano più effetti antivirali dei vettori sviluppati, confermando la specificità dell'approccio sviluppato. I nostri dati contribuiscono alla dimostrazione che il delivery intracellulare di piccoli RNA specifici per i segnali di packaging dei geni virali codificanti la polimerasi, possono rappresentare una valida strategia terapeutica nei

confronti dei virus dell'influenza umani, specialmente nell'eventualità di insorgenza di virus pandemici, e aviari.

1.INTRODUZIONE

1.1 I virus influenzali: caratteristiche generali

L'influenza, che coinvolge circa 500 milioni di persone all'anno causando 250-500 mila morti nel mondo (Arias et al., 2009), è una patologia respiratoria acuta che si presenta annualmente con andamento epidemico ed occasionalmente come pandemia.

I virus influenzali A, B e C sono 3 dei 5 generi della famiglia *Orthomyxoviridae* e sono così chiamati per la loro abilità di agglutinare i globuli rossi e per distinguerli da un'altra famiglia di virus a RNA a singolo filamento negativo i *Paramyxoviridae*. Gli *Orthomyxoviridae* comprendono anche i generi *Thogotovirus*, chiamato anche virus dell'influenza D e trasmesso dalle zecche, e *Isavirus*, che causa l'anemia infettiva dei salmoni (Alexander et al., 2007).

La famiglia *Orthomyxoviridae* è caratterizzata da un genoma a RNA a polarità negativa segmentato. Quest'ultima caratteristica permette il fenomeno del riassortimento genico che avviene tra i sottotipi di virus A e ne influenza fortemente le proprietà biologiche.

I virus influenzali di tipo A e B sono patogeni per l'uomo. Tuttavia, mentre i virus di tipo A circolano in un ampio gruppo di specie animali, come le specie aviarie e i mammiferi, rivelandosi di conseguenza i più diffusi in natura, i tipi B circolano esclusivamente nell'essere umano. Il tipo A ha come ospite naturale le specie aviarie, con gli uccelli acquatici quale riserva di tutti i sottotipi, e possono trasmettersi ad alcuni mammiferi, tra cui l'uomo ed il maiale, nei quali provocano ricorrenti infezioni. Sono, infatti, i virus responsabili delle epidemie influenzali stagionali e delle pandemie. I virus influenzali di tipo B con un genoma composto da 8 segmenti di RNA a singolo filamento con polarità negativa, presentano un basso grado di variabilità antigenica e sono presenti quasi esclusivamente nell'uomo in cui provocano saltuariamente epidemie. I virus influenzali di tipo C hanno un genoma formato da 7 segmenti di RNA a singolo filamento con polarità negativa ed anche questi sono presenti quasi esclusivamente nell'uomo, distinguendosi oltre che a livello strutturale anche a livello antigenico, e presentando un potenziale patogeno nettamente inferiore ai tipi A e B (Lamb et al., 1996).

1.2 Nomenclatura e classificazione dei virus influenzali

La divisione dei virus influenzali nei generi A, B e C viene fatta in base allo spettro d'ospite e alle caratteristiche antigeniche di alcune proteine virali interne: proteina di Matrice 1 (M1), e Nucleoproteina (NP). I virus di tipo A (figura 1.1) sono in grado di infettare oltre all'uomo

numerose specie animali, sia aviarie che mammiferi; inoltre vengono ulteriormente classificati in sottotipi, denominati HxNy, dove x e y sono numeri, in base alle loro glicoproteine di superficie, Emoagglutinina (HA o H) e Neuraminidasi (NA o N). Come accennato, solo i virus di tipo A sono in grado di dare origine a manifestazioni di tipo pandemico; il loro principale reservoir sono gli uccelli acquatici in cui si ritrovano tutti i sottotipi HxNy. Inoltre, mentre i virus di tipo B infettano solitamente l'uomo e le foche, quelli di tipo C danno infezioni leggere o asintomatiche nell'uomo e nei suini; nessuno di questi due generi presenta ulteriori suddivisioni al suo interno. Nei virus di tipo A sono stati identificati 18 sottotipi di HA (HA1-HA18) e 11 tipi di NA (NA1-NA11) (Wang C. et al., 2010, Fereidouni S. et al., 2014) nelle diverse combinazioni possibili, mentre nell'uomo si ritrovano stabilmente solo tre tipi di HA, e cioè H1, H2 e H3, e due tipi di NA, N1 e N2; anche se, sporadicamente, sono state osservate infezioni ad opera di virus aviari H5N1, H7N7 e H9N2, H7N9 per trasmissione diretta da contatto con animali infetti (Jadhao S.J. et al., 2008).

Seguendo questa classificazione ogni isolato virale può essere identificato da un sistema di nomenclatura standard costituito da:

- tipo virale di appartenenza (A, B o C)
- la specie dell'ospite se diverso dall'uomo
- il luogo dell'isolamento
- il numero progressivo dell'isolato
- l'anno di isolamento

Ad esempio, nel caso di un virus influenzale dell'uomo avremo la seguente nomenclatura A / California / 7 / 2009 (H1N1), mentre per un virus influenzale dell'animale (A / Mallard / IT / 33 / 2001 H7N3), dove Mallard è una specie di anatra.

1.3 Struttura e morfologia del virione

I virus influenzali di tipo A sono prevalentemente di forma sferica o ovoidale con un diametro di circa 100 nm, anche se talvolta si presentano in forma filamentosa e possono superare i 300 nm di lunghezza (figura 1.1).

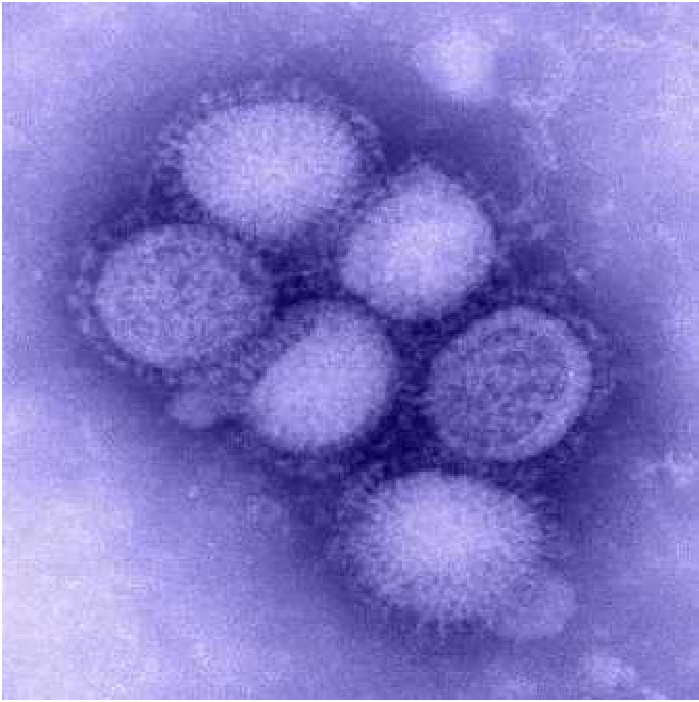


Figura 1.1: Immagine al microscopio elettronico di alcuni virioni influenzali(<http://www.tuttoirlanda.com/swine-flu-ah1n1-in-irlanda>)

Il virione presenta un involucro lipoproteico chiamato *envelope* che viene acquisito a livello di specifici domini della membrana plasmatica durante il rilascio della progenie virale (gemmazione), ricchi in colesterolo e glicosfingolipidi. Da questo involucro sporgono spicole glicoproteiche composte da HA e NA in proporzione di circa 4-5 a 1; si stima che nel caso dei virus di tipo A per ogni virione ci siano circa 500 spicole che sporgono per circa 10-14 nm dall'*envelope*.

HA e NA sono tra i fattori che determinano il tropismo virale: ogni spicola di HA è costituita da un omotrimerico. Questa proteina è cruciale nelle fasi precoci dell'infezione in quanto media l'interazione con i recettori cellulari e l'endocitosi del virus.

La NA invece partecipa alle fasi finali di rilascio e maturazione della progenie virale; ogni spicola, in questo caso, è composta da un omotetramero.

Nell'*envelope* possiamo trovare, in quantità minore, anche la proteina M2, un omotetramero transmembrana di 15 kD, costituito da uno dei due prodotti proteici ottenuti dallo splicing del frammento genomico M. Questa proteina svolge la funzione di canale ionico pH-dipendente e modula la concentrazione di ioni H^+ all'interno degli endosomi. È presente 1 proteina M2 per ogni 10-100 molecole di HA.

Al di sotto dell'involucro lipoproteico troviamo il capsid, che, a sua volta, comprende una matrice esterna e una parte centrale chiamata *core*. La matrice consiste di uno strato proteico composto dalla proteina M1, il secondo prodotto dello splicing del frammento genomico M, che è la proteina

più abbondante del virione.-M1 fornisce sostegno strutturale, collegando l'*envelope* al core, ed è essenziale nei processi di assemblaggio, rilascio e maturazione del virus.

All'interno del virus, nel *core* della particella, si ritrovano la proteina Non Strutturale 2 (NS2) e i Complessi Ribonucleoproteici Virali (le vRNP). Questi ultimi presentano una simmetria elicoidale e sono composti dall'RNA virale strettamente associato a Nucleoproteine (NP); ogni molecola di NP realizza un legame aspecifico ad alta affinità con sequenze di 24 nucleotidi presenti a livello dell'RNA virale, favorendone il corretto incapsidamento e la stabilizzazione (Boulo et al., 2007).

All'estremità della struttura super-avvolta formata da NP e vRNA è associato il complesso della RNA polimerasi virale-RNA dipendente, composto da Polimerasi Acida (PA), Polimerasi Basica 1 (PB1) e Polimerasi Basica 2 (PB2). PB2 differisce leggermente tra virus umani e aviari. In particolare, la presenza di una lisina in posizione 627 permette un'efficiente replicazione nell'uomo, mentre l'acido glutammico nella stessa posizione favorisce la replicazione negli uccelli.

La struttura dei virus influenzali di tipo B si differenzia, invece, per la presenza a livello dell'*envelope* di due proteine chiamate NB e BM2, al posto della proteina M2.

I virus di tipo C, infine, possono presentarsi come morfologicamente distinti dai virus di tipo A e B, sulla superficie delle cellule infette. Infatti essi possono formare strutture simili a cordoli lunghi anche 500 μm , e presentano un genoma costituito da soli 7 segmenti. Dal punto di vista della composizione, anche i virus C sono simili agli altri tipi, con un *envelope* lipoproteico che ricopre uno strato di matrice proteica e complessi ribonucleoproteici. Tuttavia, sull'*envelope* è presente una proteina, chiamata "Hemagglutinin esterase fusion protein", che sostituisce funzionalmente HA e NA, e una proteina meno rappresentata, CM2.

1.3.1 Struttura del genoma virale

I virus influenzali di tipo A e B possiedono un genoma composto da 8 segmenti (Figura 1.2) di RNA a polarità negativa, mentre il virus dell'influenza C ha un genoma a 7 segmenti.

Nei virus dell'influenza di tipo A i diversi segmenti sono numerati in ordine di lunghezza decrescente e le loro dimensioni variano da 890 a 2341 nucleotidi, per un totale di circa 12 kb (Arias et al., 2009).

Ogni segmento di RNA virale possiede delle regioni non codificanti, sia all'estremità 3' che all'estremità 5'. Queste regioni sono estremamente conservate e fungono da promotori sia per la

trascrizione che per la replicazione del genoma virale; inoltre, includono i segnali di poliadenilazione e parte dei segnali necessari per l'assemblaggio del virus.

Ogni segmento possiede una conformazione tridimensionale detta a "forcina elicoidale", alla cui estremità troviamo il complesso eterotrimetrico della polimerasi virale; il resto del materiale genetico è completamente legato a molecole di NP le quali, essendo ricche di arginina, un aminoacido basico, si legano all'RNA carico negativamente (Figura 1.2).

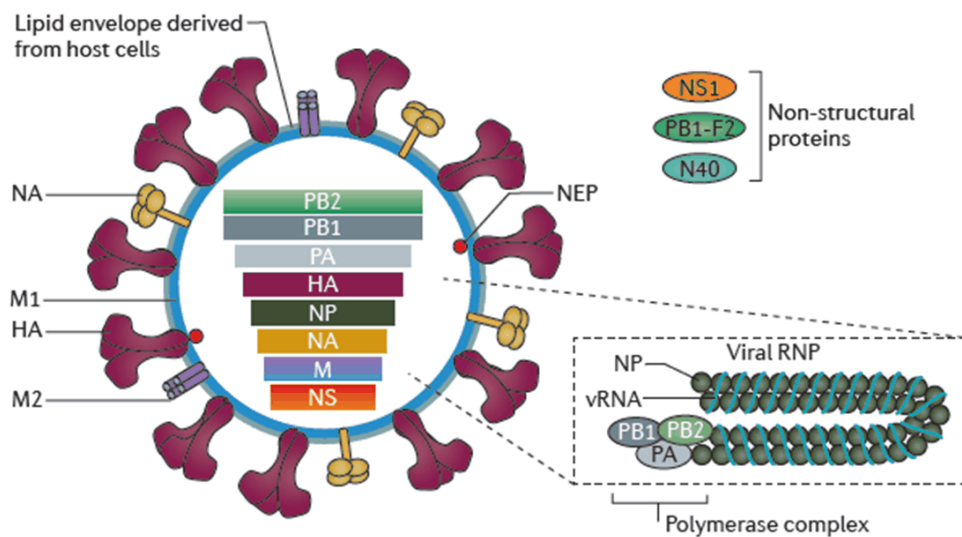


Figura 1.1: Immagine schematica della struttura del virus influenzale, del genoma virale ed, in particolare, della struttura delle vRNP (Medina et al., 2001).

Nei virus A e B i segmenti 1, 3, 4, 5 codificano una sola proteina per segmento (Tabella 1.1): rispettivamente le proteine PB2, PA, HA, NP; tutti i virus dell'influenza codificano la PB1 nel segmento 2.. In alcuni sottotipi di virus A, questo segmento può codificare, a partire da un'in un reading frame alternativo posizionato a +1, anche la proteina PB1-F2, una piccola proteina di 87 aminoacidi con attività pro-apoptotica..

Al contrario, il segmento 6 dei virus dell'influenza A codifica solo la proteina NA, mentre lo stesso segmento nel virus B viene utilizzato, in un frame alternativo posizionato a -1, per produrre anche la proteina di matrice NB, che corrisponde alla proteina M2 dei virus di tipo A.

Il segmento 7 dà origine alla proteina M1 sia nei virus A che nei virus B. Tuttavia nel tipo A uno splicing alternativo permette di ottenere la proteina M2, mentre nel tipo B, mediante traduzione di un frame alternativo in posizione +2, si produce la proteina BM2.

Infine, il segmento 8 codifica la proteina NS1, un'antagonista dell'interferone, e, per mezzo di uno splicing alternativo, la proteina NS2, che contribuisce al trasporto delle vRNP dal nucleo al citoplasma, come descritto successivamente.

La sigla NS sta per proteina Non Strutturale. Infatti, NS1 e NS2 non si ritrovano nel virione maturo ma sono espresse esclusivamente nelle cellule infettate.

Il genoma del virus dell'influenza C è abbastanza simile a quello degli altri due tipi virali. Tuttavia esso presenta un segmento in meno e le funzioni di HA e NA sono presenti in un'unica proteina.

Segmento	Lunghezza del segmento in nucleotidi	Proteina codificata in	Lunghezza della proteina in aminoacidi	Funzione della proteina
1	2341	PB2	759	Subunità della polimerasi virale, attività endonucleasica nei confronti dei <i>cap</i> dei pre-mRNA virali.
2	2341	PB1	757	Subunità della polimerasi virale, allungamento dell'RNA, attività endonucleasica.
		PB1-F2	87	Attività pro-apoptotica.
3	2233	PA	716	Subunità della polimerasi virale, attività proteasica.
4	1778	HA	550	Glicoproteina di superficie, maggiore determinante antigenico, legame alla cellula e fusione del virus.
5	1565	NP	498	Ruolo strutturale nella formazione dei vRNP, regolazione dell'importo nucleare, ruolo nella conversione dell'attività dell'RNA polimerasi.
6	1413	NA	454	Glicoproteina di superficie, attività sialidasica, ruolo nel rilascio della particelle virali.
7	1027	M1	252	Proteina di matrice, interazione con i vRNP, regolazione dell'esporto nucleare dell'RNA e nella gemmazione virale.
		M2	97	Canale ionico, coinvolta nella liberazione del virus nel citoplasma e nell'assemblaggio delle particelle neoformate.
8	890	NS1	230	Attività anti-interferone, regolazione dell'espressione genica dell'ospite.
		NS2/NEP	121	Trasporto dei vRNP dal nucleo al citoplasma.

Tabella 1.1: Caratteristiche dei segmenti genomici e dei loro prodotti.

1.4 Variabilità genetica

Il virus dell'influenza è uno dei virus che presenta maggiore variabilità genetica. I meccanismi responsabili di tale variabilità sono due:

- *antigenic drift*
- *antigenic shift*

1.4.1 Antigenic Drift

Questo meccanismo si verifica sia nei virus di tipo A che in quelli di tipo B e consiste nella comparsa di nuove varianti virali caratterizzate dall'accumulo di mutazioni puntiformi spontanee a livello dei geni che codificano l'emoagglutinina e l'neuraminidasi, mutazioni che vanno a modificare, in particolare, i siti antigenici. La comparsa di queste mutazioni sembra essere dovuta alla mancanza di attività *proof-reading* della polimerasi virale e la selezione delle nuove varianti virali viene esercitata dalla risposta immunitaria dell'organismo (Wong et al., 2005).

Sono questi i virus che causano le epidemie stagionali, in quanto sono in grado di re-infettare individui che erano già venuti a contatto con lo stesso sottotipo.

Durante la replicazione del genoma del virus influenzale, si ha un tasso di mutazione di 1 cambio di nucleotide per ogni copia di genoma; il tasso di evoluzione varia tra i diversi segmenti probabilmente a causa della pressione immunitaria dell'ospite, infatti i valori più alti si riscontrano nelle proteine di superficie HA, NA e M2. Ad esempio la media del tasso di evoluzione totale per il virus pandemico A / H1N1 del 2009 è $3,66 \times 10^{-3}$ sostituzioni/sito/anno (Arias et al., 2009).

1.4.2 Antigenic Shift

In questo caso il fenomeno riguarda esclusivamente i virus di tipo A, in quanto è legato sia alla natura segmentata del genoma virale sia alla capacità, esclusiva dei virus di tipo A, di infettare specie diverse da quella umana.

L'esito è la comparsa di un virus influenzale dalle proprietà antigeniche completamente nuove, verso il quale la popolazione umana non possiede alcun tipo di protezione immunitaria, e in grado, quindi, di causare pandemie.

La formazione di questi nuovi sottotipi dipende dal riassortimento genetico di due diversi virus che infettano lo stesso organismo, detto serbatoio di riassortimento o “*mixing vessel*”. Le specie candidate alla coinfezione sono il suino, i polli, il fagiano, il tacchino, la quaglia, i primati, compreso l’uomo. Questo perché tali specie presentano sia i recettori con l’acido sialico legato in conformazione α -2,3 - necessario per l’infezione da parte dei virus aviari - sia in conformazione α -2,6, che permette l’infezione da parte dei virus umani; anche se bisogna sottolineare che la sola affinità recettoriale non garantisce un’infezione produttiva (Medina et al., 2011).

La natura segmentata del genoma influenzale fa sì che, durante l’assemblaggio della progenie virale, all’interno di un virione possano ritrovarsi segmenti genomici del virus di origine umana e segmenti di quello di origine aviaria; se il nuovo ceppo virale possiede caratteristiche replicative idonee e non ha subito mutazioni in regioni essenziali, allora è caratterizzato da un vantaggio selettivo enorme in quanto la popolazione umana risulta completamente *naïve* nei suoi confronti. Grazie agli studi epidemiologici possiamo affermare che nel corso del secolo passato sono comparsi due nuovi ceppi virali a causa di un *antigenic shift*:

- il ceppo H2N2, responsabile della pandemia di “influenza asiatica” del 1957 e che deriverebbe dal virus H1N1 circolante all’epoca in seguito ad una doppia sostituzione;
- il ceppo H3N2 – che, a sua volta, deriva dal virus H2N2 – il quale causò la pandemia di “influenza di Hong Kong” del 1968.

Anche il virus che ha causato la recente pandemia del 2009 (“influenza suina” H1N1pdm09) deriverebbe da un fenomeno di *antigenic shift*.

1.5 Replicazione dei virus influenzali

Il ciclo replicativo del virus dell’influenza risulta molto simile a quello degli altri virus dotati di envelope, ma, a differenza degli altri virus a RNA, la trascrizione e la replicazione del genoma avvengono all’interno del nucleo e non nel citoplasma (Figura 1.3).

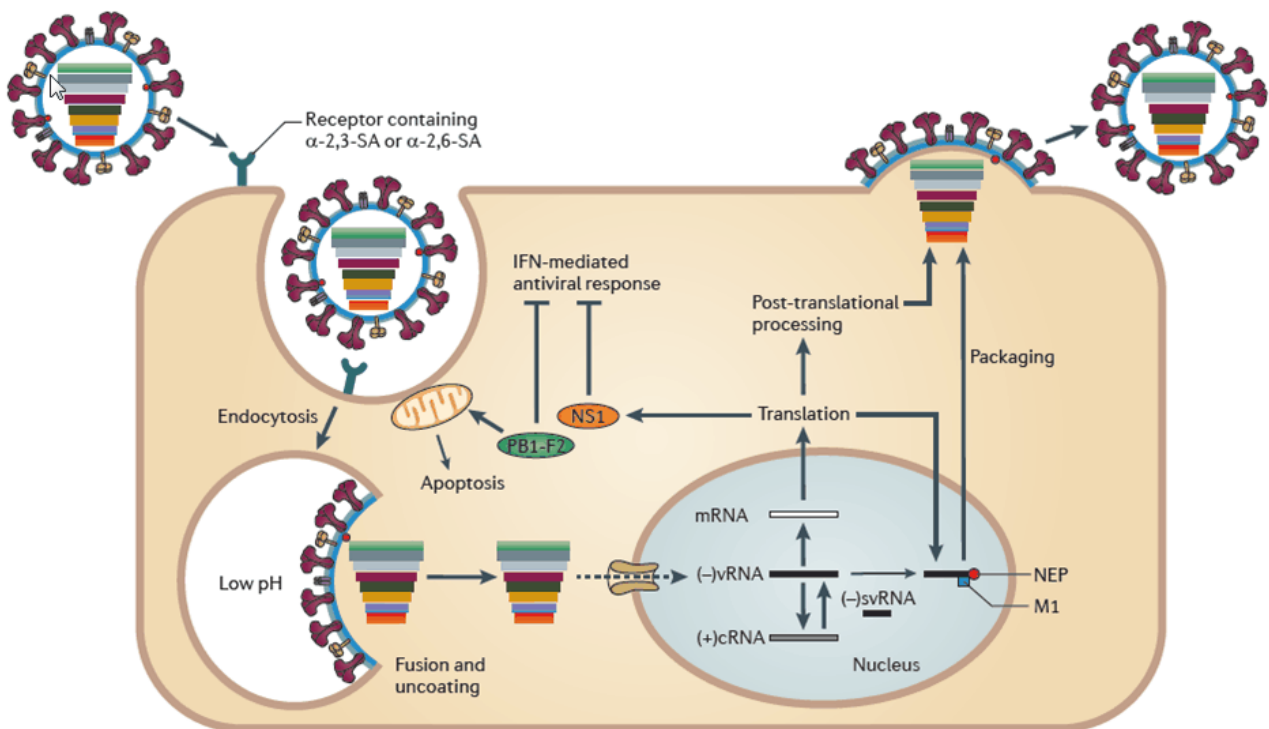


Figura 1.2: Rappresentazione schematica del ciclo replicativo del virus influenzale di tipo A (Medina et al., 2001).

1.5.1 Legame alla cellula ospite

Perché il contatto tra un virus e una cellula dia luogo ad un legame efficiente, è necessario che l'antirecettore presente sull'*envelope* virale, in questo caso un dominio dell'HA, interagisca con il recettore complementare presente sulla membrana cellulare, ovvero con le molecole di acido sialico. Il legame tra recettore e antirecettore necessita di un ambiente ricco di ioni che neutralizzino le cariche di superficie delle strutture complementari; la sensibilità di una cellula ad un certo virus è determinata dalla presenza sulla superficie della cellula stessa di recettori idonei al legame con esso. Perché l'infezione vada a buon fine, tuttavia, è necessario che una cellula non solo sia sensibile, ma anche permissiva all'infezione, ovvero che possieda il corredo di proteine necessario alla replicazione del genoma virale.

L'acido sialico è un monosaccaride a nove atomi di carbonio che si trova comunemente al termine di molti glicocongiugati. Il carbonio 2 dell'acido sialico può legare o il carbonio 3 del galattosio o il

carbonio 6, formando quindi o dei legami α -2,3 o α -2,6; le diverse Emoagglutinine del virus hanno affinità differenti verso i due tipi di legame e in particolare, come già detto, i virus aviari infettano preferenzialmente le cellule che presentano l'acido sialico legato in conformazione α -2,3 presenti prevalentemente nei volatili; i virus umani invece si legano all'acido sialico in conformazione α -2,6 (Medina RA et al., 2011).

In realtà l'uomo e i primati presentano anche recettori in cui l'acido sialico è legato in conformazione α -2,3, tuttavia questi sono meno abbondanti e si trovano soprattutto nelle basse vie respiratorie, più difficilmente raggiungibili. La loro presenza spiega come sia possibile per l'uomo essere infettato anche da virus aviari e come le infezioni da parte di questi ultimi degenerino facilmente in gravi polmoniti con esito fatale, in oltre il 60 % dei casi (Capobianchi M.R. 2001).

L'HA viene sintetizzata sotto forma di precursore inattivo HA0, che viene in seguito attivato grazie al taglio ad opera di serin-proteasi dell'ospite, dando origine a due porzioni: HA1, che contiene il sito di legame al recettore e i siti antigenici e HA2, un peptide di fusione. Come detto, la molecola di HA si presenta in forma omotrimerica; ogni monomero presenta due regioni strutturalmente distinte: uno "stelo" composto da tre filamenti di alfa-eliche super-avvolte e composto principalmente dalla subunità HA2, e una "testa" globulare costituita principalmente da foglietti beta antiparalleli appartenenti alla catena HA1; proprio nella testa si ritrovano il sito di legame con l'acido sialico e i determinanti antigenici e per questo è anche la zona maggiormente variabile.

1.5.2 Ingresso del virus nella cellula bersaglio

Il processo di ingresso del virus nella cellula bersaglio coinvolge attivamente la cellula. Questo processo avviene, infatti, attraverso l'endocitosi delle particelle virali. Perché il nucleocapside virale possa essere liberato nel citoplasma della cellula infettata è necessaria la presenza di un ambiente acido all'interno dell'endosoma: l'acidità causa un cambiamento conformazionale della componente fusogena di HA2, la quale si inserisce nella membrana dell'endosoma e permette l'apertura di un poro attraverso il quale le vRNP vengono liberate. Inoltre la proteina M2 svolge la sua funzione pompando ioni H^+ all'interno della particella virale, che neutralizzano le interazioni proteina-proteina in modo che le vRNP vengano liberate dalla matrice proteica.

Proprio la proteina M2 è il bersaglio di alcuni farmaci, Amantadina e Rimantadina, efficaci contro l'influenza A; inoltre, essendo una proteina di membrana, è stata proposta come target per lo

sviluppo di un vaccino universale o comunque a più ampio spettro rispetto a quelli attualmente in uso basati su HA e NA (Zhao G, et al., 2014).

1.5.3 Sintesi dell'RNA virale

Una volta liberate nel citoplasma, le vRNP vengono traslocate nel nucleo da proteine della cellula ospite che riconoscono un segnale di localizzazione nucleare presente sulla NP. Nel nucleo il complesso RNA polimerasi RNA dipendente virale crea 8 frammenti complementari di RNA a polarità positiva, che vengono utilizzati come stampo per la successiva sintesi del genoma virale, ma anche numerosi mRNA. Al contrario degli mRNA messaggeri cellulari, la coda di poliA degli mRNA virali è già codificata nell'RNA a polarità negativa sotto forma di alcuni residui di uracile, da 5 a 7, che la polimerasi virale trascrive nel filamento come adenina.

Anche il capping dell'mRNA avviene nel virus dell'influenza in un modo particolare. Infatti, le subunità PB1 e PB2 della polimerasi svolgono anche un'attività endonucleasica prelevando le sequenze 5'-cap metilate dai pre-mRNA cellulari per utilizzarle per quelli virali: questo processo viene chiamato "*cap snatching*".

In alcuni filamenti si possono verificare fenomeni di *splicing* alternativo che portano alla produzione di proteine diverse, come accade per M1 e M2 o per NS1 e NS2.

A questo punto, le vRNP vengono trasportate nel citoplasma grazie alle proteine M1 e NS2; si ritiene che la proteina M1 leghi assieme i vRNP e NS2, mentre quest'ultima medierebbe l'uscita del complesso nel citoplasma sfruttando le nucleoporine.

Alcune proteine verosimilmente tornano nel nucleo dopo essere state prodotte, ad esempio la proteina NP necessaria per l'assemblaggio di nuove vRNP; di recente alcuni studi hanno dimostrato come il livello di questa proteina sia di grande importanza per la regolazione del ciclo virale, infatti solo quando questa ha raggiunto certi livelli nel nucleo viene avviato il procedimento di assemblaggio del nucleocapside (Tarus B. et al., 2014)

1.5.4 Sintesi delle proteine virali

Le proteine HA, NA e M2 sono sintetizzate da ribosomi legati alla membrana del reticolo endoplasmatico, dove vengono ripiegate e successivamente indirizzate all'apparato del Golgi per

le modificazioni post-traduzionali. Tutte e tre queste proteine possiedono piccole porzioni che fungono da segnali di localizzazione e che sono coinvolte nell'indirizzamento delle proteine alla membrana cellulare dove avviene l'assemblaggio del virione.

Le altre proteine virali, essendo idrosolubili, vengono sintetizzate dai ribosomi liberi nel citoplasma; anche in questo caso la presenza di segnali specifici ne favorisce l'accumulo a livello dei siti di assemblaggio. Nella zona destinata all'assemblaggio le proteine HA e NA sostituiscono quasi completamente le proteine di membrana cellulari e si assiste ad un accumulo della proteina M1 che, in questa fase, svolge un ruolo essenziale: si aggrega, infatti, a formare uno strato in corrispondenza della superficie interna della membrana ed interviene nel reclutamento delle componenti necessarie all'assemblaggio. Inoltre, insieme alle vRNP e ai domini citoplasmatici di HA, NA e M2, contribuisce a creare la deformazione della membrana plasmatica (curvatura), essenziale per la gemmazione. Dalla proteina M1 dipende anche la forma delle particelle virali neo-formate.

La proteina M2, grazie ad una sua porzione di conformazione α elica anfipatica, interviene a sua volta in questo processo permettendo la fissione del collo della gemma e, quindi, la scissione del virione dalla membrana, (figura 1.4). E' interessante notare che proprio grazie all'azione concertata di queste proteine virali, ed in particolare di M2, il virus dell'influenza è uno dei pochissimi virus con genoma ad RNA che fuoriesce dalla cellula senza l'aiuto delle proteine Vps o ESCRT cellulari (Rossman JS, et al., 2010).

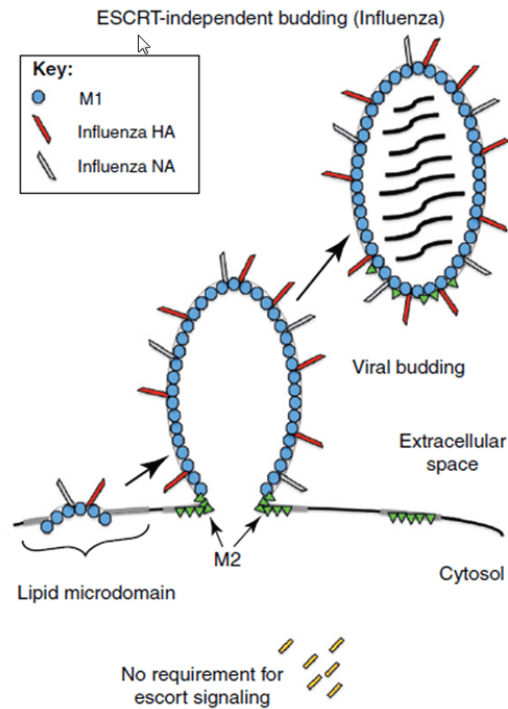


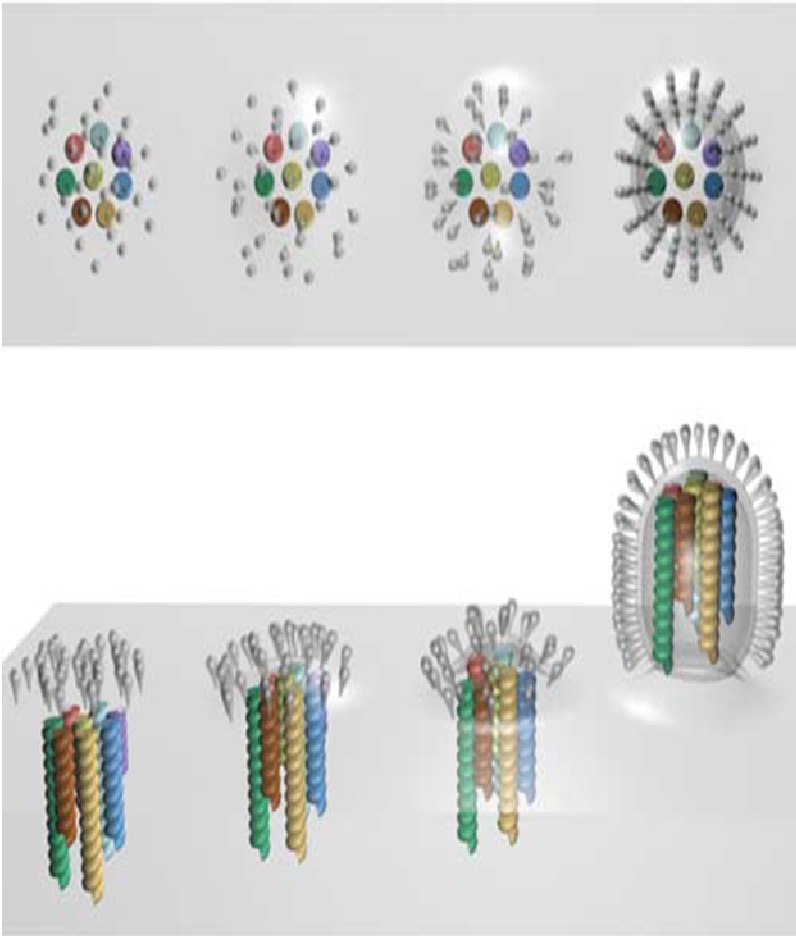
Figura 1.3: Rappresentazione schematica del meccanismo peculiare di gemmazione del virus dell'influenza, basato sulla proteina M2 (Heaton et al. , 2011)

A gemmazione è completa, tuttavia, le spicole di HA continuano a mantenere il virus legato ai residui di acido sialico presenti sui recettori della cellula. A questo punto interviene la NA: che, in questa fase, risulta cruciale in quanto svolge il clivaggio dei residui di acido sialico dai recettori cellulari permettendo il rilascio della progenie virale ed evitando l'attacco a cellule già infettate; inoltre, rimuove i residui anche dallo stesso *envelope* virale, prevenendo l'auto-aggregazione tra particelle virali (Bullough P.A et al., 1994). La NA contribuisce infine all'infettività del virus, neutralizzando le mucine presenti nelle secrezioni respiratorie; anticorpi prodotti dall'ospite contro questa proteina (Mitnaul L.J et al., 2000). La fase di gemmazione dura diverse ore e la cellula muore tardivamente, forse per le alterazioni metaboliche indotte dalla replicazione virale.

1.5.5 Packaging del genoma virale nelle particelle neo formate

Il virus dell'influenza è strutturalmente unico in quanto il suo genoma è frammentato come i cromosomi umani per questo motivo il packaging è complicato, ma biologicamente interessante.

Infatti, il genoma virale deve essere selezionato da una grande quantità di materiale genetico di partenza presente nella cellula infetta, in modo che ogni particella virale neo formata contenga tutti gli otto segmenti genomici. Storicamente, due modelli del meccanismo di packaging sono stati proposti per spiegare i meccanismi con cui i segmenti di RNA virale sono confezionati nella progenie virale: il modello di packaging casuale e il modello di packaging selettivo. Il primo modello ritiene che i vari segmenti di RNA virale siano arbitrariamente incorporati in particelle virali, e le particelle infettive vengano prodotte solo quando almeno una copia di ogni segmento di RNA virale è incorporato nella particella casualmente (Hutchinson EC. et al., 2009). In realtà nuove evidenze dimostrano come il processo sia molto più selettivo e basato su segnali di incorporazione, altamente conservati, presenti su tutti i frammenti genomici che fanno in modo che la maggior parte delle particelle virali neoformate possieda un corredo genomico completo (Marsh GA, et al., 2008; Fournier E. et al., 2012) (figura 1.5).



Noda et al. 2006

Figura 1.5: Assemblaggio e rilascio degli 8 segmenti del virus influenzale (Noda et al., 2006)

In particolare, i segnali di *packaging* presenti ad entrambe le estremità degli RNA genomici che codificano le subunità dell'RNA polimerasi sembrano svolgere un ruolo chiave nella gerarchia delle interazioni tra i segmenti durante l'incorporazione nelle particelle gemmanti (Muramoto et al., 2006), figura 1.6.

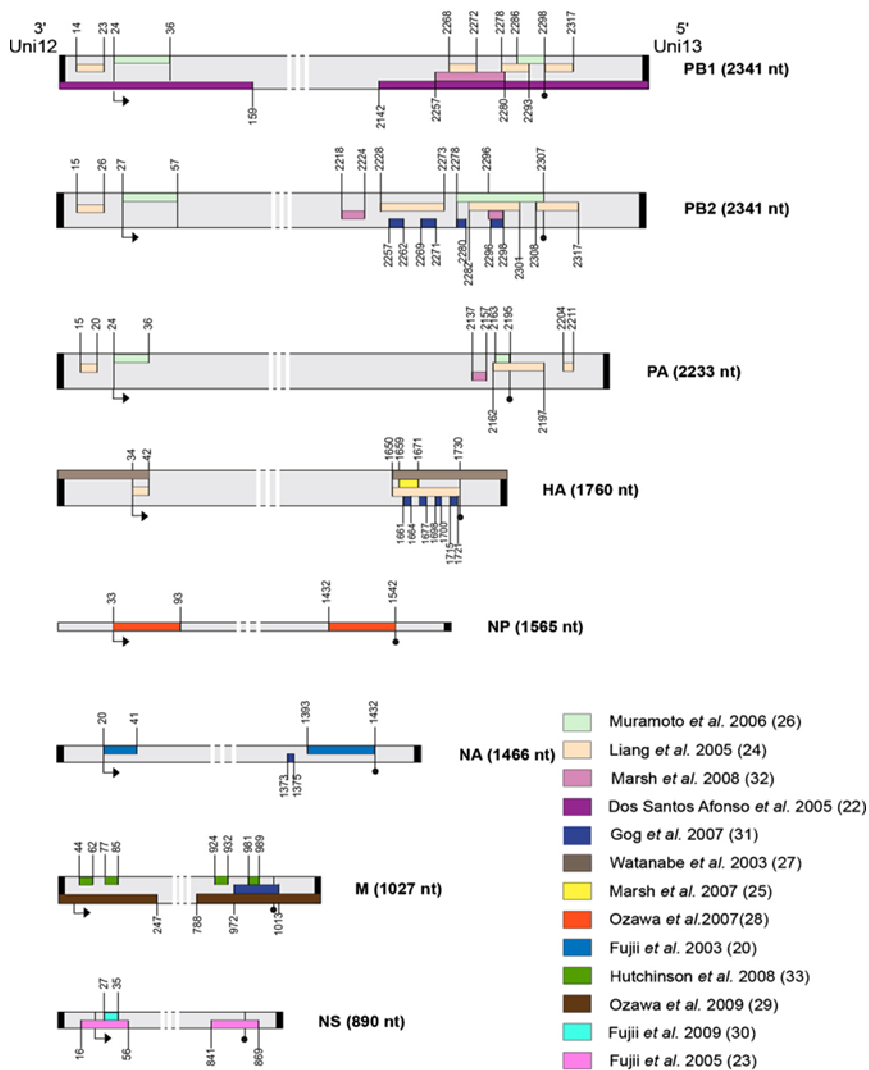


Figura 1.6: Regioni degli otto segmenti codificanti del virus influenzale che sono implicate nel meccanismo del packaging (Noda *et al.*, 2006).

1.6 Terapia anti influenzale

Due classi di farmaci antivirali sono attualmente disponibili in commercio per la profilassi e il trattamento dell'influenza: adamantani e inibitori della neuraminidasi (Figura 1.7). Gli adamantani (amantadina e remantadine), noti come bloccanti dei canali M2, inibiscono la replicazione del virus dell'influenza A bloccando l'attività del canale ionico della proteina M2 che è necessario per il rilascio di RNA virale nel citoplasma di cellule infettate. D'altra parte, gli inibitori della NA sono efficaci sia contro i virus dell'influenza A che B. Durante il processo di gemmazione, la proteina NA

dei virus influenzali A e B taglia gli acidi sialici dai recettori cellulari per facilitare il rilascio di particelle virali dalla superficie della cellula infetta.

L'emergere di varianti resistenti ai farmaci può limitare i benefici della terapia antivirale.

Mentre oseltamivir e zanamivir sono attualmente disponibili in numerosi paesi per uso clinico, due inibitori supplementari della NA, peramivir e laninamivir, sono stati recentemente approvati in Giappone (Fujisaki S. et al., 2012). Questi inibitori sono stati progettati per agire sul sito attivo che è altamente conservato tra le proteine del virus dell'influenza A e B. Pertanto, sostituzioni amminoacidiche nei residui catalitici causano una ridotta affinità per i farmaci inibitori della NA, portando allo sviluppo di resistenza al farmaco. L'emergere di ceppi farmaco-resistenti potrebbe compromettere l'efficacia del trattamento dell'influenza nei soggetti e ridurre le scelte disponibili per il controllo delle malattie epidemiche e pandemiche.

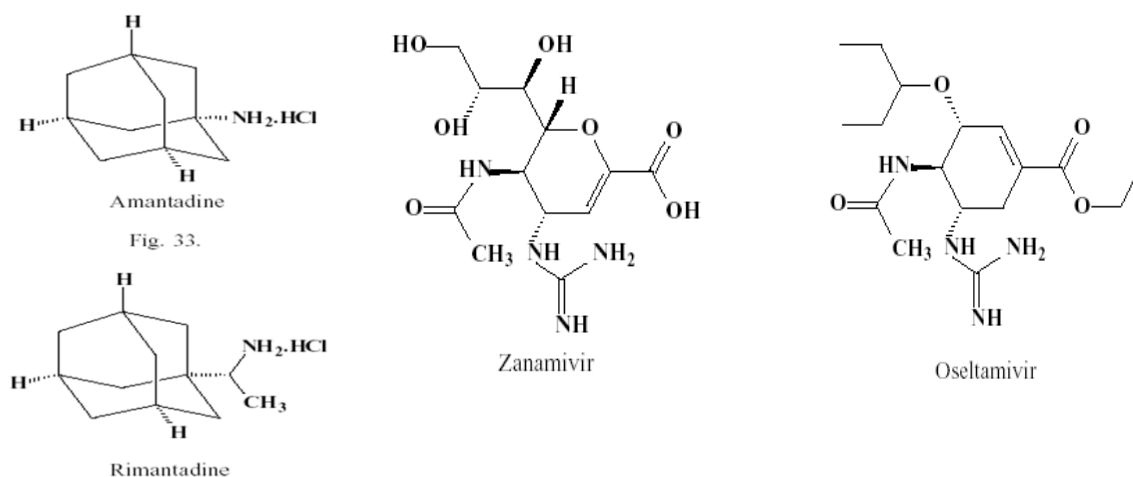


Figura 1.7: Farmaci antivirali attualmente in commercio.

Considerati gli effetti collaterali delle terapie attualmente disponibili e la facilità con cui emergono i ceppi virali resistenti, sono state proposte e sviluppate diverse strategie alternative per il trattamento dell'infezione da parte del virus influenzale. In particolare, l'idea alla base di tutti questi approcci innovativi è quello di andare a colpire proteine, o interazioni proteiche o processi che siano il più conservati possibile tra i diversi virus dell'influenza e che siano essenziali per il ciclo replicativo virale, in maniera da ridurre al massimo lo sviluppo di ceppi resistenti. Con questa ottica sono state messe a punto e testate molecole che hanno come bersaglio regioni costanti dell'HA, la NP, NS1, nonché approcci basati sulla distruzione di interazioni proteina/proteina essenziali, quali

le interazioni tra le subunità della polimerasi virale (Muratore G. et al, 2012; Loregian A. et al., 2014). Inoltre, sono state sviluppate strategie che coinvolgono il metabolismo della cellula ospite o la risposta antivirale della stessa (Loregian A. et al., 2014). Tutte queste strategie presentano pro e contro, gli ultimi legati soprattutto alla difficoltà di rendere le molecole sviluppate facilmente somministrabili in vivo e/o di migliorare la loro bio disponibilità e farmacocinetica

Alcuni studi si sono focalizzati sullo sviluppo di molecole, in particolare, oligonucleotidi in grado di interferire con le sequenze mappanti all'estremità 5' dei segmenti codificanti PB1, PB2 e PA, coinvolte nel meccanismo di incorporazione degli otto segmenti di RNA nella nuova progenie virale (Giannecchini S. et al., 2009- 2011). Questi lavori hanno dimostrato come tali sequenze regolatorie rappresentino un buon target per lo sviluppo di strategie antivirali innovative (Giannecchini S. et al., 2009- 2011).

Nonostante i dati incoraggianti, tale approccio soffre della variabilità sperimentale legata alla necessità di trasfettare gli oligonucleotidi terapeutici nelle cellule, senza la possibilità di ottenere un'espressione costante ed estesa al maggior numero possibile di cellule delle sequenze oligonucleotidiche di interesse. Inoltre, il delivery in vivo, come per altre strategie innovative sviluppate, risulta di difficile realizzazione.

Il metodo più efficace di contrastare la diffusione dell'influenza è sicuramente la vaccinazione. La protezione indotta dal vaccino comincia circa due settimane dopo la somministrazione e dura dai sei agli otto mesi, per poi diminuire. La vaccinazione anti-influenzale è particolarmente consigliata per alcune categorie, o perché a rischio di complicanze gravi e potenzialmente mortali (categorie a rischio) o perché particolarmente esposte al contagio (personale ospedaliero).

I vaccini attualmente presenti in commercio in Europa sono prodotti in uova embrionate di pollo, tuttavia nel caso in cui dovesse essere prodotto un vaccino pandemico il loro numero limitato costituirebbe un problema. A questo si deve aggiungere la considerazione che nelle uova di pollo non possono essere amplificati virus patogeni per questa specie, per questi motivi si stanno sviluppando protocolli di preparazione che sfruttino l'amplificazione del virus in colture cellulari (in cellule Vero, MDCK o MDCK.2). Alcuni studi hanno dimostrato che i vaccini ottenuti mediante crescita del virus in coltura cellulare hanno un'efficacia paragonabile a quella dei vaccini ottenuti da uova embrionate (Joanne M Langley et al., 2012).

1.7 RNA interference

Per anni gli RNA antisenso sono stati utilizzati per inattivare geni. Per oligonucleotide antisenso si intende un breve frammento di DNA, di circa 15-20 nucleotidi, che contiene la sequenza nucleotidica complementare del filamento di DNA codificante (senso) o di RNA messaggero (mRNA). Perciò l'antisenso, grazie a questa sua "specularità" rispetto al DNA senso, si appaia ad esso, o all' mRNA, annullandone l'attività biologica. Gli oligonucleotidi di impiego in terapia sono sintetici, ma nelle cellule sono stati individuati anche oligonucleotidi endogeni, di cui è ignota la funzione. L'oligonucleotide antisenso si lega all' RNA messaggero, o a sequenze di controllo dell'espressione genica presenti sul filamento complementare di DNA, impedendo così la decodificazione ed il successivo processo di sintesi proteica (Yu C. et al., 2015).

L'RNA interference (RNAi) si basa su un meccanismo di regolazione genica post- trascrizionale cellulare mediata da micro RNA (miRNA), molecole di RNA a doppio filamento di 22 paia di basi, identificato sia nei nematodi sia in lieviti e piante (Bartel DP. Et al., 2004) (Cullen BR. Et al., 2005). I miRNA vengono trascritti inizialmente dalla RNA polimerasi II come parte di un lungo precursore primario (pri-miRNA), che si ripiega in una particolare struttura stem-loop. Il pri-miRNA viene successivamente tagliato da Drosha, un'endonucleasi appartenente alla famiglia delle RNasi III, a livello della base dello stelo, formando una molecola di circa 85 paia di basi (pre- miRNA) con un'estremità 5' fosfato e un overhang di 2 nucleotidi al 3'. Il pre- miRNA viene quindi trasportato nel citoplasma dal fattore di esporto nucleare Exportina-5, dove una seconda RNasi III (Dicer) riconosce l'overhang al 3' e taglia a circa 22 paia di basi da questo, rimuovendo il loop terminale e lasciando un altro overhang al 3'. L'miRNA maturo viene incorporato nell'RNA-Induced Silencing Complex (RISC); durante l'incorporazione la doppia elica dell'miRNA viene srotolata e solo il filamento di RNA che presenta l'estremità 5' meno stabile, detto antisenso, rimane associato nel RISC, mentre l'altro viene rilasciato e degradato. Il filamento di RNA antisenso indirizza l'attività di RISC verso l'mRNA complementare: se l'appaiamento è perfetto, l'endonucleasi di RISC (Slicer) taglia l'mRNA a metà della zona di complementarietà, mentre se l'appaiamento non è perfetto RISC media comunque una repressione traduzionale dell'mRNA. Ognuno dei tre intermedi a RNA, pri-miRNA, pre-miRNA e miRNA, può rappresentare un punto di entrata di RNA sintetici per indurre l'RNAi e regolare l'espressione genica in cellule eucariotiche. Inizialmente l'inserimento di lunghe molecole di RNA a doppio filamento portava alla formazione di small interfering RNA (siRNA) di 22 paia di basi simili agli miRNA prodotti dal taglio di Dicer2. In questo modo si otteneva

un silenziamento genico rilevante, ma transiente. Un secondo approccio ha impiegato short hairpin RNA (shRNA) simili ai pre-miRNA trascritti sotto il controllo di promotori per la RNA polimerasi III per consentire un silenziamento più efficiente. I problemi derivanti da questo approccio erano la mancata possibilità di regolare l'attività dei promotori per la RNA polimerasi III e l'espressione di shRNA mediata da vettori. Un terzo approccio fa uso di pri-miRNA artificiali (shRNA-mir) posti sotto il controllo di promotori inducibili della RNA polimerasi II; ciò consente di mediare un silenziamento molto potente e regolabile. Il meccanismo dell'RNAi è oggi usato in molte applicazioni al fine di ottenere il knock-down di specifici geni.

1.8 Caratteristiche dei vettori Lentivirali

I vettori lentivirali sono stati principalmente sviluppati dal Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 (HIV-1), dal Virus dell'Immunodeficienza della Scimmia (SIV) e dal Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV). I loro principali vantaggi sono nella semplicità di manipolazione, nella facilità ad essere pseudotipizzati con envelope eterologhi, che ne ampliano il tropismo e nella capacità di mediare l'integrazione del transgene nel genoma della cellula bersaglio anche in cellule che non sono in attiva fase di replicazione. Quest'ultima caratteristica li differenzia dai vettori oncoretrovirali che pure derivano da virus ugualmente appartenenti alla famiglia *Retroviridae*.

HIV-1, agente eziologico della Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS), possiede una particella di forma sferica di circa 110 nm di diametro, costituita da un *envelope* fosfolipidico esterno da cui protrudono le glicoproteine di membrana e da una doppia componente capsidica, composta da una matrice proteica e da un nucleocapside. Quest'ultimo contiene il genoma virale, costituito da due molecole identiche di RNA a singolo filamento a polarità positiva di circa 10 Kb, e le proteine necessarie alla maturazione e alla replicazione dei virioni, quali la proteasi, la trascrittasi inversa e l'integrasi. Entrambi i filamenti del genoma virale contengono una struttura 7-metilguanosa (m⁷G(5')ppp(5')G) detta CAP all'estremità 5' e una coda di poli-adenine all'estremità 3', alle quali seguono due brevi sequenze ripetute (R) e due sequenze uniche (U5, U3) rispettivamente poste all'estremità 5' e all'estremità 3'. Da queste due regioni, grazie al meccanismo di retrotrascrizione dell'RNA virale a DNA provirale, si formano le LTR (*Long Terminal Repeat*), costituite dalla sequenza U3-R-U5 e presenti ad entrambe le estremità del genoma: la LTR al 5' funge da promotore per la presenza di una sequenza *TATA box*, mentre la LTR al 3' serve come terminatore della trascrizione. Nel genoma di HIV-1 sono presenti i geni *gag*, *pol* ed *env* orientati

nella stessa direzione (5'gag-pol-env-3') comuni a tutti i Retrovirus7.

Il gene *gag* codifica la poliproteina Pr55Gag che viene processata dalla proteasi virale al momento della gemmazione per formare le proteine strutturali della matrice (MA), del capsido (CA), del nucleocapsido (NC) e il peptide p6. Il gene *pol* viene sintetizzato come precursore Pr160GagPol, in seguito ad un raro *frameshift* ribosomale durante la traduzione di Gag, e viene processato per autocatalisi dalla proteasi contenuta al suo interno negli enzimi virali proteasi, trascrittasi inversa, responsabile del processo di retrotrascrizione, e integrasi, che catalizza l'integrazione del DNA provirale nel genoma cellulare. Il gene *env* codifica la glicoproteina gp160, processata da una proteasi cellulare durante la maturazione del virione in due proteine, gp120 e gp41. Inizialmente gp120 lega il recettore CD4, con cui forma un complesso molto stabile, per poi legare i co-recettori (CXCR4, CCR5). Successivamente l'esposizione del peptide di fusione presente in gp41 catalizza la fusione dell'*envelope* virale con la membrana plasmatica e il rilascio del nucleocapsido nel citoplasma della cellula bersaglio. Sono presenti anche due geni (*tat*, *rev*) codificanti due proteine regolatrici attive in *trans*, e quattro geni con funzione accessoria (*nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*) responsabili *in vivo* della progressione della malattia. Il gene *tat* codifica la proteina Tat che funge da potente transattivatore dell'espressione genica virale grazie al riconoscimento della sequenza TAR (*Transactivation Response Region*), presente all'estremità 5' del DNA provirale. Il gene *rev* codifica la proteina Rev che regola l'esporto dal nucleo dei trascritti virali mediante il legame alla sequenza RRE (*Rev Responsive Element*) localizzata nel gene *env*7.

I vettori basati su HIV-1 contengono le sequenze regolative del genoma virale attive in *cis* ed una cassetta di espressione per consentire l'espressione del transgene da veicolare; le sequenze codificanti le proteine attive in *trans* necessarie sono fornite da uno o più costrutti *helper*. In questo modo si producono particelle virali infettive in grado di indurre un'infezione abortiva nelle cellule trasdotte e si limita la produzione di Retrovirus Replicazione-Competenti (RCR) dovuto ad eventi di ricombinazione (Kay MA. Et al., 2001) . Per soddisfare sempre di più questi criteri i vettori virali basati su HIV-1 e i rispettivi costrutti di *packaging* si sono evoluti nel tempo. Il sistema vettoriale di prima generazione era costituito da tre costrutti: un costrutto di *packaging*, uno di *envelope* ed un costrutto vettore. Nei costrutti di *packaging* e di *envelope* le LTR al 5' e al 3' sono state sostituite rispettivamente con un promotore ed un segnale di poliadenilazione eterologhi. Il costrutto di *packaging* contiene tutte le sequenze virali eccetto il gene *env* (*gag*, *pol*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*), ma è debole del segnale di incapsidazione per impedire l'incapsidazione dell'RNA nei virioni ricombinanti. Il costrutto di *envelope* codifica le glicoproteine dell'*envelope* virale. Il

costrutto vettore contiene le LTR alle estremità 5' e 3', il segnale di incapsidazione ed i primi nucleotidi del gene *gag*, responsabili dell'aumento dell'efficienza di trasferimento genico⁸, il transgene e la sequenza RRE.

Gli standard di biosicurezza tendono ad eliminare dal vettore le proteine virali e separare le sequenze codificanti necessarie in più costrutti, per diminuire la probabilità di eventi ricombinativi che portano alla formazione di RCR. Per soddisfare questi criteri i sistemi vettoriali di seconda generazione hanno eliminato dal costrutto di *packaging* le proteine virali accessorie (Dull T, 1998).

Un ultimo miglioramento è stato apportato dai sistemi vettoriali di terza generazione, dove la proteina Rev viene fornita separatamente da un quarto costrutto e non è richiesta la proteina Tat, poiché il costrutto vettore è dotato di un promotore chimerico al 5' in cui la regione U3 della LTR è stata sostituita con il promotore del Virus del Sarcoma di Rous (RSV) o del Citomegalovirus Umano (hCMV). Un ulteriore progresso è stato raggiunto mediante la delezione degli elementi di attivazione della trascrizione dalla regione U3 presente all'estremità 3' rendendo il vettore *Self-Inactivating* (SIN) in seguito all'evento di retrotrascrizione⁹. La presenza di entrambe le LTR inattive impedisce l'attivazione di possibili oncogeni presenti vicino al sito di integrazione del vettore. Inoltre, i vettori di ultima generazione contengono al loro interno sequenze che promuovono l'espressione post- trascrizionale, come il *Woodchuck Hepatitis C Virus Post-transcriptional Regulatory Element* (WPRE). Infine, il tropismo di virioni ricombinanti HIV-1 può essere ampliato grazie alla capacità di HIV-1 di incorporare nell'*envelope* glicoproteine derivate da altri virus, come la glicoproteina G del Virus della Stomatite Vescicolare (VSV-G), mediante il processo di pseudo tipizzazione (Srinivasakumar N. et al., 2001).

2. SCOPO

E' stato precedentemente dimostrato come sia possibile inibire la replicazione dei virus dell'influenza di tipo A mediante la trasfezione in cellule bersaglio di oligonucleotidi, o di loro derivati, complementari alle sequenze regolatorie altamente conservate presenti nelle regioni al 5' dei segmenti genomici codificanti le subunità (PA, PB1 e PB2) della polimerasi virale (Giannecchini S. et al., 2009- 2011).

Prendendo spunto da questi lavori di letteratura, obiettivi del presente progetto di ricerca sono stati i) lo sviluppo di un sistema robusto ed efficace per mediare il trasferimento di piccoli RNA in grado di interferire con tali sequenze regolatorie in opportune cellule bersaglio; ii) la valutazione dell'efficacia e della specificità di tale strategia nell'inibire la replicazione di virus dell'influenza di tipo A; iii) lo studio del meccanismo molecolare alla base dell'eventuale attività antivirale dei piccoli RNA selezionati; iv) l'ottenimento informazioni su specifiche fasi della replicazione virale grazie alla loro perturbazione in seguito all'espressione intracellulare degli RNA terapeutici utilizzati. I risultati ottenuti sono promettenti e pongono le basi per l'ottimizzazione di una strategia terapeutica innovativa in particolare diretta a ceppi di virus dell'influenza A a potenziale pandemico. Abbiamo inoltre sviluppato un importante tool per lo studio di step cruciali del ciclo vitale dei virus influenzali, quali il packaging del genoma nelle particelle neoformate.

3.MATERIALI E METODI

3.1 Linee cellulari

In questo lavoro di tesi sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

1. Cellule Madin-Darby di rene di cane (MDCK, gentilmente fornite dall'Istituto zooprofilattico di Brescia), che sono cellule di elezione per l'isolamento, il mantenimento e la titolazione dei virus dell'influenza.
2. Cellule umane adenocarcinomiche alveolari basali epiteliali A549, (gentilmente fornite dall'Università degli studi di Siena, Dipartimento di Biotecnologie Mediche);
3. Cellule renali embrionali umane (293T), gentilmente fornite dal Dr. D. Baltimore (Rockefeller University, Manhattan, a New York.). Queste cellule contengono stabilmente integrato nel genoma il gene che codifica l'antigene T del Virus 40 di scimmia (SV40), che risulta essere necessario per la replicazione efficiente di vettori plasmidici recanti l'origine di replicazione della linea cellulare SV40.

Tutte le linee cellulari sono state mantenute in terreno Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) con l'aggiunta di siero fetale bovino (FBS) al 10% v/v in incubatore umidificato e al 5% di CO₂.

3.2 Virus

Per questo studio abbiamo selezionato un pannello di virus influenzali di tipo A (umani e aviari) e B, come segue: A / Puerto Rico / 8 / 1934 (H1N1), A / Trieste / 30 / 2009 (H1N1 stagionale), A / Parma / 1720 / 2009 (H1N1 pandemico), A / Firenze / 6 / 2012 (H3N2 stagionale), A / Germano / 23 / 2006 (H7N7), A / Germano / 435 / 2006 A (H10N7), A / Germano / 433 / 2009 (H9), B / Firenze / 8 / 2012 (B stagionale),

Inoltre, sono stati utilizzati virus ricombinanti, generati con un sistema di genetica inversa a partire dal virus influenzale H1N1 A / PR / 8 / 34 e gentilmente forniti dal Professore Paul Digard (Università di Edimburgo, UK). Gli stock virali sono ottenuti dai sovranatanti di cellule MDCK e A549, come spiegato successivamente, opportunamente titolati e conservati a -80 ° C fino all'uso.

Tutti gli esperimenti con i virus sono stati eseguiti in laboratori di biosicurezza di livello 3 (BSL-3).

3.3 Preparazione degli stock di virus influenzali di tipo A e B

Per l'infezione cellule MDCK, 2×10^5 , venivano seminate in piastre da 24 pozzetti. Il giorno successivo, il terreno di coltura veniva rimosso dal monostrato confluyente e venivano effettuati 2 lavaggi con PBS (1X v/v). In ciascun pozzetto venivano, quindi, inoculati 100 μ l di virus influenzale di tipo A o B opportunamente diluiti in PBS (1X) per ottenere una MOI di 0.01 TCID₅₀/cellula. Trascorso il tempo di incubazione (1 ora a 37 °C), veniva tolto l'inoculo e si aggiungeva terreno DMEM (1 ml per pozzetto) contenente tripsina alla diluizione finale di 1/150 v/v. Si eseguiva quindi un'incubazione di ulteriori 3 giorni a 37°C, conclusa la quale si raccoglievano i sovranatanti che venivano titolati come descritto di seguito.

3.4 Titolazione del virus influenzale con metodo di diluizione limite

Allo scopo di titolare il virus dell'influenza, la sospensione di partenza veniva diluita in base 10 in PBS (1X). Ciascuna diluizione veniva quindi inoculata su cellule A549, 2×10^5 , seminate in piastre da 24 pozzetti. In particolare, si utilizzavano 4 pozzetti e si eseguiva un'incubazione di 1 ora a 37°C. Trascorso il tempo di incubazione, veniva tolto l'inoculo e si aggiungeva il terreno DMEM con la tripsina alla diluizione finale di 1/150 v/v; infine si incubava nuovamente a 37°C per 3 giorni. Al terzo giorno si prelevava il supernatante e si calcolava il titolo virale come dose infettante il 50% del tessuto di coltura (TCID 50%), indicante la dose che induce un effetto citopatico nel 50% delle colture inoculate. Per il calcolo si è utilizzato il metodo di Reed-Muench. (Schmidt N.J., Diagnostic procedures for viral, Rickettsial and Chlamydial infections, pp 32-35).

Questo metodo si basa sulla determinazione dei dati cumulativi delle colture infettate a partire dalla diluizione più alta impiegata e delle colture non infettate a partire dalla più bassa e sul calcolo della percentuale di colture infettate a ciascuna diluizione.

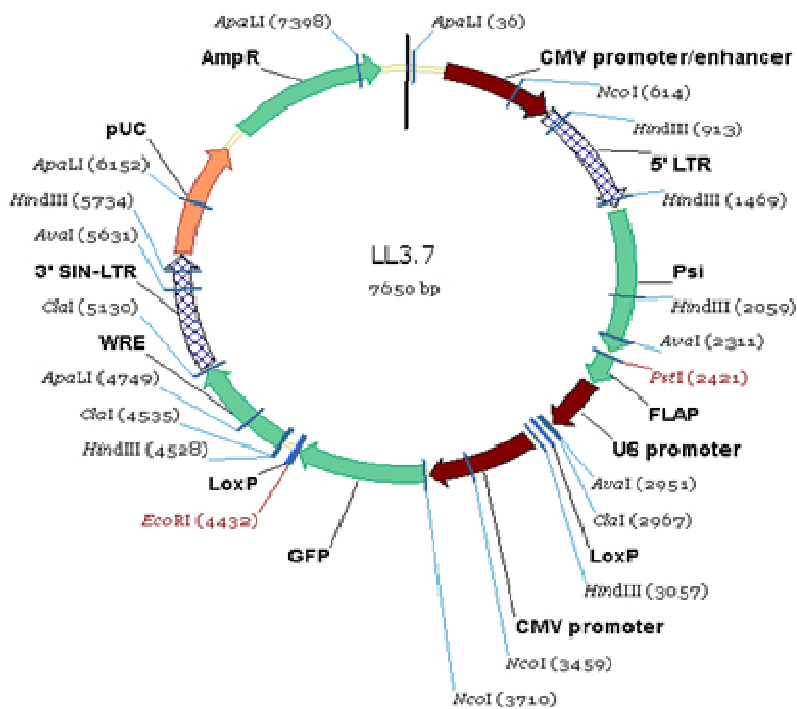
Per il calcolo esatto della TCID₅₀ viene poi utilizzata la percentuale:

$$\frac{(\% \text{ di colture infettate alla diluizione superiore al } 50\%) - (50\%)}{(\% \text{ di colture infettate alla diluizione superiore al } 50\%) - (\% \text{ di colture infettate alla diluizione inferiore al } 50\%)}$$

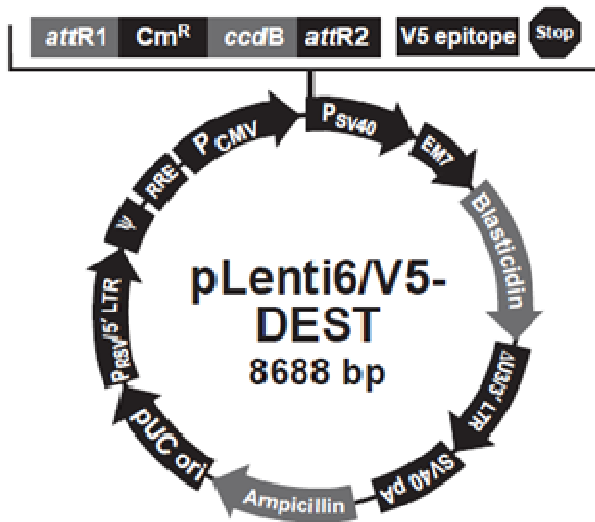
Il risultato di tale percentuale indica la distanza proporzionale (che corrisponde al logaritmo dell'intervallo tra le due diluizioni). Questo valore, sommato al logaritmo della diluizione immediatamente superiore al 50%, dà il logaritmo delle dosi infettanti (DI).

3.5 Vettori

I vettori utilizzati in questo lavoro di tesi sono entrambi vettori lentivirali: pLentilox 3.7 GFP (Science gateway) (Figura 3.1 A) e il pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR del Kit BLOCK-iT™ Pol II miRNAi (Invitrogen) (figura 3.1 B) che risulta dalla ricombinazione di due ulteriori vettori il pcDNA 6.2 with EmGFP-miR dove si inserisce il gene di interesse e il pDONOR 221. Entrambi i vettori sono caratterizzati dalla presenza del promotore immediate early (i.e.) del Citomegalovirus umano (HCMV) a monte del gene reporter EGFP, di un promotore riconosciuto dalla polimerasi di tipo III a monte del sito di policlonaggio e da ulteriori sequenze necessarie al corretto funzionamento del vettore. In particolare, il vettore pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR contiene un gene codificante la resistenza alla blasticidina che è stato utilizzato in questo lavoro di tesi. Di seguito sono riportate le rappresentazioni schematiche dei due vettori:



A



B

Figura 3.1: Rappresentazione schematica del vettore pLentilox 3.7 GFP (A) e del vettore pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR (B)

3.6 Ottenimento dei vettori lentivirali esprimenti RNA antisenso e miRNA

In questo lavoro di tesi sono stati costruiti diversi vettori lentivirali esprimenti RNA antisenso o miRNA aventi come bersaglio alcune regioni altamente conservate del genoma virale riportate in figura 3.2.

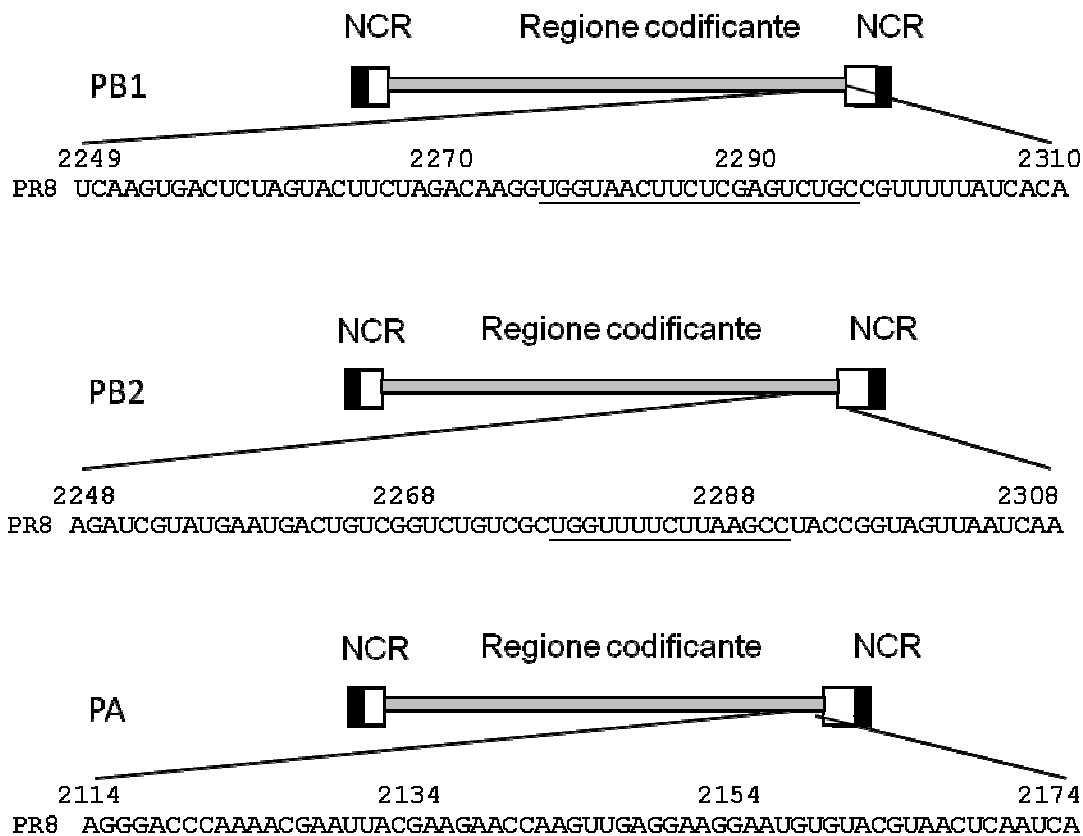


Figura 3.2: Sequenze oligonucleotidiche nelle regioni codificanti delle polimerasi del virus influenzale tipo A. Tali sequenze oligonucleotidiche sono state inserite nei vettori lentivirali.

Partendo da tali sequenze sono state generate 3 coppie di oligonucleotidi a singolo filamento complementari per l'espressione di RNA antisense specifici da clonare all'interno del vettore pLentilox 3.7 GFP. Dovendo ottenere RNA antisense sono stati presi gli oligonucleotidi (60 pb) contenenti la sequenza bersaglio delle polimerasi del virus influenzale. A tali oligonucleotidi sono stati aggiunti dei nucleotidi per favorire l'inserimento di tali sequenze entro il vettore nei siti di tagli degli enzimi HpaI e XhoI del vettore (nello specifico una A per HpaI e T C G A per XhoI). In figura 3.2 sono illustrate le sequenze oligonucleotidiche utilizzate. In figura 3.3 si può osservare le sequenze oligonucleotidiche appaiate che poi sono state inserite nel vettore pLentilox 3.7 GFP. Inoltre, sono state generate 3 coppie di oligonucleotidi, a singolo filamento complementari per l'espressione di miRNA diretti verso le sequenze descritte in Figura 3.2. In questo caso, poiché per il clonaggio abbiamo utilizzato un kit commerciale, il kit BLOCK-iT™ Pol II miRRNAi (Invitrogen), gli oligonucleotidi sono stati disegnati come richiesto. In particolare, oltre alle sequenze bersaglio, gli oligonucleotidi contenevano partendo dall'estremità 5':

1. ' TGCTG oligonucleotidi derivanti dal mir155
- 2 . L'antisense della sequenza bersaglio 21 - nucleotidi .
- 3 .GTTTTGGCCACTGACTGAC (loop terminale del mir155) .
- 4 .Nucleotidi 21 (5' - 3 ') senso della sequenza bersaglio.

Ciò è stato realizzato come da kit BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System (Invitrogen™) (figura 3.3).

Infine altre due coppie di oligonucleotidi a singolo filamento complementari sono stati opportunamente disegnati per ottenere un RNA antisense e un miRNA diretti verso una sequenza scramble (SCR).

Gli oligonucleotidi disegnati sono riportati in figura 3.3

A

Oligonucleotidi utilizzati per la generazione degli RNA antisense

PB1 F 5' - TGATGATAAAACGgca gactcgagaagt taccacCTTGTCTAGPAGTACTAGAGTCACTTGA-3'
 PB1 R 5' - **TCGATCAAGT**GACTCTAGTACTTCTAGACAAGGt ggtaacttctcgagctgccCGTTTTTAT**CACA**-3'

PB2 F 5' - TTGATTAAC TACCGGTAggcttaagaaaaccaGCGACAGACCGACAGTCAITCATAACGATCT-3'
 PB2 R 5' - **TCGAAGATCGTATGAA**TGACTGTCCGTCCTGTCGC tggttttctttaagcctACCGGTAGTTAATCAA-3'

PA F 5' - TGATTGAGTTAcgtacacattccttccctcaactTGGTTCTTCGIAATTCGTTTTGGGTCCCT-3'
 PA R 5' - **TCGAAGGGACCCAAAACGAAT**TACGAAGAACCAGt tgaggaaggaatgtgtacgtTAAC TCAATCA-3'

SCR F 5' - TTTTGAAACTACCGCGACTAGAAC TAGAGATCCAAGACAGTCAACACCAGATCTTCATTCACT-3'
 SCR R 5' - **TCGAATGAATGAAGATCGTGGTCTGACTGTCTTGGATCTCTAGTTC**TAGTCGCGGTAGTTTCAAAA-3'

B

Oligonucleotidi utilizzati per la generazione dei miRNA

FB1 F 5' - TGCTGggcagactcgagaagt taccacGTITTTGGCCACTGACTGActggtaacttcagctctgcc-3'
 FB1 R 5' - CCTGggcagactagagaagt taccacGTCACTCAGTGGCCAAAAC -ggtaacttctcgagctctgcc-3'

FB2 F 5' - TGCTGccggtaggcttaagaaaaccaGTITTTGGCCACTGACTGActggttttcttaacctaccgg -3'
 FB2 R 5' - CCTGccggtaggtaagaaaaccaGTCACTCAGTGGCCAAAAC -ggttttcttaagcctaccgg-3'

PA F 5' - TGCTGacgtacacattccttccctcaGTITTTGGCCACTGACTGActtgaggaaggaggtgtacgt-3'
 PA R 5' - CCTGacgtacactccctcctcaGTCACTCAGTGGCCAAAAC ttgaggaaggaatgtgtacgt-3'

SCR F 5' - TGCTGgccaactagagaactagagaccaGTITTTGGCCACTGACTGActggatctctagctagctcgc3'
 SCR R 5' - CCTGgccaactagctagagatccaGTCACTCAGTGGCCAAAAC tggaactctctagctcgc-3'

Figura 3.3. Caratteristiche della sequenza degli oligonucleotidi PB1, PB2, PA e SCRAMBLE (SCR) utilizzati per produrre i piccoli RNA interferenti. In figura A, in rosso sono mostarti i nucleotidi aggiunti per inserire correttamente le sequenze oligonucleotiche entro il vettore linearizzato con gli enzimi HpaI e XhoI, i restanti oligonucleotidi rappresentano le sequenze conservate delle polimerasi del virus influenzale. In figura B, le parti sottolineate alle estremità rappresentano il mir155, i nucleotidi sottolineati nel centro rappresentano una parte derivante dal mir155, le parti

rosse rappresentano l'antisense della sequenza target e gli oligonucleotidi blu rappresentano la sequenza target delle varie polimerasi del virus influenzale.

A questo punto, al fine di inserire le coppie di oligonucleotidi generate nei vettori, si è proceduto all'annealing delle stesse, procedura necessaria per la generazione di frammenti a doppio filamento. A questo scopo ci si è avvalsi del kit commerciale BLOCK-iT™ Pol II miRNAi (Invitrogen) seguendo opportunamente le istruzioni. Brevemente, per allestire la reazione sono stati utilizzati i seguenti materiali:

- I due oligonucleotidi a singolo filamento complementari alla concentrazione di 200 mM in tampone TE
- un tampone di annealing fornito con il kit e opportunamente diluito
- DNasi / RNasi-Free (fornita con il kit)

La miscela veniva incubata a 95°C per 4 minuti e quindi lasciata raffreddare sul bancone per circa 1 ora, fino al raggiungimento della temperatura ambiente. Un esempio di annealing è riportato in figura 3.4

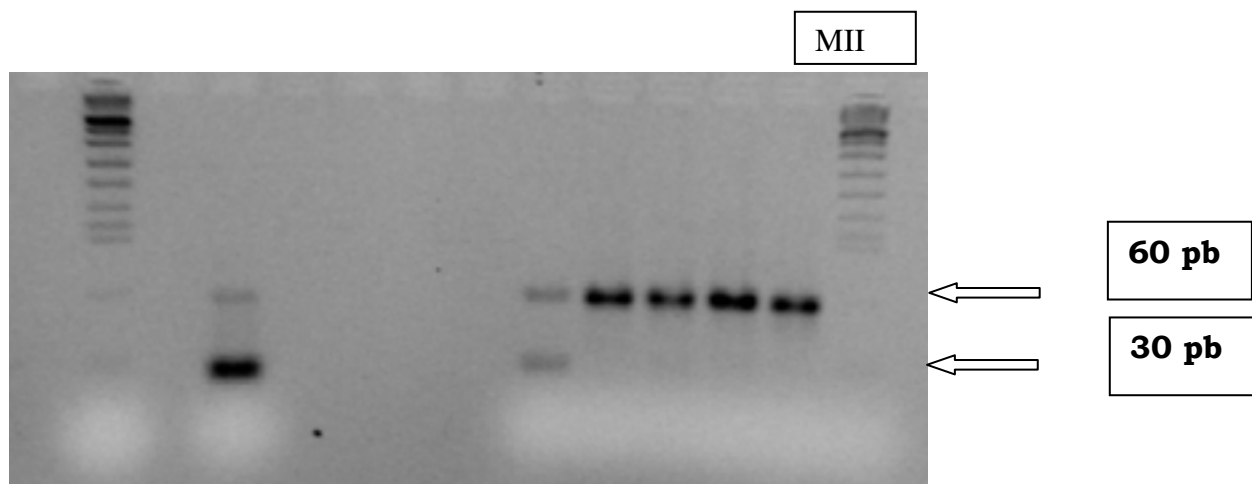


Figura 3.4: Esempio di annealing,, si vedono le bande degli oligonucleotidi a 60 (doppie) e 30 (singole) paia di basi. Il marker utilizzato è il marker II (ROCHE).

A questo punto 1 µl degli oligonucleotidi appaiati venivano portati alla concentrazione di 10 nM (diluizione 1:5000) e utilizzati per la reazione di ligazione.

Nel caso dei miRNA, si allestiva la seguente reazione:

- 5X di Ligasi Buffer, 4 µl
- pcDNA™ 6.2-GW 10 ng di EmGFP-miR (prodotto già linearizzato)
- 4µl degli oligonucleotidi (10 nM)

- 9µl di DNasi / RNasi-Free
- 1 µ DNA ligasi T4 (1U/µl) I

Nel caso degli RNA antisense, si allestiva la seguente reazione:

- 5X di Ligasi Buffer, 4 µl
- 10 ng di pLentilox 3.7 GFP, linearizzati con gli enzimi di restrizione HpaI e XhoI
- 4µl degli oligonucleotidi (10 nM)
- 9µl di DNasi / RNasi-Free
- 1 µ DNA ligasi T4 (1U/µl) I

In entrambi i casi la reazione veniva portata ad un volume finale di 20µl e si eseguiva un'incubazione di 45 minuti a temperatura ambiente.

2 µl della reazione venivano, quindi, messi in contatto con cellule di *E.coli*, ceppo OneShot TOP10 nel caso del pcDNA™6.2-GW/ EmGFP-miR o ceppo DH5-α nel caso del pLentilox 3.7 GFP. Si eseguiva un'incubazione in ghiaccio per 30 minuti, seguita da shock termico per 45 secondi a 42°C, senza agitazione. Si trasferivano le provette in ghiaccio per 2 minuti e quindi si aggiungevano 250 µl di terreno S.O.C. (2% w/v di triptone, 0,5 % w/v di estratto di lievito, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glucosio) ai batteri trasformati con pcDNA™6.2-GW/ EmGFP-miR e di terreno Luria Bertani (LB) nel caso di quelli trasformati con il pLentilox 3.7 GFP. Si effettuava un'incubazione a 37 ° C per 1 ora in agitazione. A questo punto, un'aliquota di batteri trasformati veniva piastrata su LB agar e dopo 16-18 h si osserva la presenza di colonie.

Nel caso del pLentilox 3.7 GFP si passava allo screening delle colonie per osservare se l'inserto fosse correttamente inserito nel vettore finale, mentre nel caso del pcDNA™6.2-GW/ EmGFP-miR veniva eseguita la reazione di ricombinazione nel vettore di destinazione finale, secondo la metodologia Gateway (Invitrogen)

Brevemente 1-2 ug del vettore pcDNA™6.2-GW/ EmGFP-miR contenente il miRNA di interesse venivano linearizzati utilizzando l'enzima di restrizione EagI. Si precipitava, quindi, il DNA aggiungendo 0,1 volume di 3M acetato di sodio, seguito da 2.5 volumi di etanolo al 100% v/v e da centrifugazione più lavaggio del pellet 2 volte con etanolo al 70% v/v.

Il DNA veniva risospeso in tampone TE, pH 8,0, ad una concentrazione finale di 50-150 ng/µl. Si passava, quindi alla ricombinazione con 150 ng del vettore pDONRvector 221 e 150 ng del vettore finale pLenti6/V5-DEST. A questo scopo, si utilizzavano 2 µl della mix di enzimi Clonase BP™ II, 2 µl pDONRvector 221 e 1-2 ug del vettore pcDNA™6.2-GW/ EmGFP-miR, contenente il miRNA .

Dopo circa 1 ora si prelevavano 3 µl della miscela di reazione e si aggiungevano 2 µl della mix di enzimi Clonase LR II e 2 µl del plamide finale pLenti6/V5-DEST più 1 µl di soluzione di proteinasi K. Si incubava per 10 minuti a 37 ° C e quindi si procedeva alla trasformazione, come precedentemente descritto e infine allo screening delle colonie ottenute.

3.7 Preparazione di DNA plasmidico su piccola scala

Al fine di ottenere una preparazione di DNA plasmidico pulita per le reazioni di sequenziamento dell'inserito clonato nel vettore lentivirale veniva utilizzato il kit "*High pure plasmid isolation*" (Roche). Il sedimento batterico, risospeso in 250 µl di soluzione 1 (*suspension buffer*), veniva lisato mediante aggiunta di un isovolume di soluzione 2 (*lysis buffer*). Alla soluzione chiara e viscosa formatasi venivano aggiunti 350 µl di soluzione 3 (*binding buffer*), si mescolava delicatamente e si lasciava la miscela in incubazione per 5 minuti in ghiaccio. A questo punto si procedeva a centrifugare la soluzione flocculosa per 10 minuti a 13000 rpm per eliminare la gran parte dei detriti batterici e a trasferire il surnatante nell'apposita colonnina. Dopo aver centrifugato 1 minuto a 13000 rpm, sono effettuavano 2 lavaggi consecutivi, aggiungendo 500 µl di soluzione 4 (*wash buffer I*), e 700 µl di soluzione 5 (*wash buffer II*), centrifugando 1 minuto a 13000 rpm, per poi effettuare un'ulteriore centrifugazione in modo da eliminare ogni residuo di liquido. Il DNA legato alla resina veniva eluito in 100 µl di soluzione 6 (*elution buffer*) previa centrifugazione di 30 secondi a 13000 rpm.

3.8 Preparazioni di DNA plasmidico su larga scala (maxi-prep)

Le colonie batteriche contenenti i plasmidi d'interesse venivano fatte crescere in 3ml di LB con ampicillina a 37°C in agitazione. Successivamente, si procedeva a diluire la coltura batterica in 250 ml di LB con ampicillina e le beute venivano fatte crescere a 37°C in agitazione per 16 ore. Per la preparazione plasmidica è stato utilizzato il kit "QIAGEN Plasmid" (Qiagen), che sfrutta la tecnica di cromatografia a scambio ionico. I batteri venivano trasferiti in appositi tubi, sottoposti a centrifugazione a 6000 rpm per 15 minuti a 4°C e risospesi in 10 ml di soluzione P1 (50 mM glucosio, 25 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA pH8.0). Venivano aggiunti 10 ml di soluzione P2 (0.2

NaOH, 1% SDS). Si procedeva ad una incubazione di 5' a RT. Successivamente venivano aggiunti 10 ml di soluzione P3 (60% potassio acetato 5 M, 11.5% acido acetico glaciale), e si incubava in ghiaccio per 15-20 minuti. A questo punto, si effettuava una centrifugazione di 30 minuti a 13000 rpm, a 4°C. Il surnatante veniva quindi trasferito in una colonna a scambio ionico precedentemente equilibrata con 10 ml di buffer di equilibratura QBT, e poi si è procedeva ad effettuare 2 lavaggi con 30 ml di buffer QC. Il DNA legato alla resina veniva eluito con 15 ml di buffer di eluizione QF. Per la precipitazione del DNA, venivano aggiunti 10.5 ml di isopropanolo e si procedeva ad una centrifugazione di 60 minuti a 5000 rpm a 4°C. Il sedimento veniva lavato con 2 ml di etanolo al 70% v/v, seguito da una centrifugazione di 20' a 5000 rpm a 4°C. Dopo aver eliminato il surnatante, il DNA veniva risospeso in 150 ul di TE sterile..

La concentrazione del DNA plasmidico e la sua purezza veniva analizzata mediante strumento NanoDrop (NanoDrop - Thermo Scientific - Biosistema scr) : tramite tale strumento e metodologia associata è possibile leggere i campioni automaticamente a 260 – 280 – 230 nm di lunghezza d'onda. Per tale processo oltre al materiale da misurare occorre eseguire precedenti misurazioni con il prodotto con il quale è stata fatta l'eluizione durante il processo di estrazione, in modo tale da tarare lo strumento.

3.9 Reazione di sequenziamento

Per il sequenziamento dei plasmidi di interesse è stata utilizzata la tecnica Sanger mediante sequenziatori automatico (Sanger Applied Biosystems® | Life Technologies).

La miscela finale era costituita da :

- 1 µl di buffer 5X (Lifetechnologies)
- 1 µl Big Dye (Lifetechnologies)
- Primer 1 µl (1 µM) (Forniti da Sigma)
- DNA del campione ~ 5 ng (corrispondente ad un template compreso tra 500-1000 bp)H₂O distillata e sterile per raggiungere un volume finale di 10 µl

A questa mix venivano poi aggiunti i campioni insieme ad uno dei due primers:

Plentilox 3.7:

Forward 5'- CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'

Reverse 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

pcDNA™6.2-GW/ EmGFP-miR 5

Forward 5'- TCCCAAGCTGGCTAGTTAAG -3'

Reverse 5'-GGCATGGACGAGCTGTACAA -3'

pLENTI6/V5-DEST

U6 Forward 5'-GGACTATCATATGCTTACCG-3'

V5(C-term) Reverse 5'-ACCGAGGAGAGGGTTAGGGAT-3'

I campioni venivano sottoposti a 35 cicli di amplificazione, ciascuno dei quali costituito da 10 secondi a 95°C per la denaturazione, 5 secondi a 50°C per l'annealing dei primers e 4 minuti a 60°C per l'estensione; successivamente viene eseguito il sequenziamento.

3.10 Produzione dei virioni ricombinanti

Per la produzione delle particelle lentivirali ricombinanti sono stati utilizzati 2 protocolli diversi a seconda del vettore di partenza:

1. pLentilox 3.7 GFP

Cellule 293T sono state coltivate al 90% di confluenza in fiasche di coltura da 75cm². Le cellule sono state quindi trasfettate con 9 µg di vettore lentivirale e 3 µg di ciascun plasmide che fornisce il packaging al vettore stesso (PREV, pVSVg e PMDL, rispettivamente), mediante lipofettamina, seguendo le istruzioni del kit (Lipofectamine® 2000, Life Technologies).

Di seguito sono riportate le caratteristiche dei plasmidi utilizzati per il sistema di packaging

- pMDLg/pRRE plasmide contenente i geni *gag* e *pol* di HIV-1, sotto il controllo trascrizionale del promotore precoce HCMV; *gag* codifica le proteine del capsido, mentre *pol* codifica la proteasi, trascrittasi inversa ed integrasi. Il plasmide contiene anche il motivo RRE e la sequenza di poliadenilazione del gene della β globulina umana.
- pRev codifica la proteina Rev di HIV-1, posta sotto il controllo trascrizionale del promotore del virus del Sarcoma di Rous (RSV). Rev è in grado di legare la regione RRE presente trascrizioni virali codificanti le proteine strutturali e enzimatiche e consentirne l'esportazione dal nucleo verso il citoplasma.

- pVSV-G contiene sotto il controllo trascrizionale del promotore precoce HCMV il gene che

codifica l'envelope del virus della stomatite vescicolare (VSV-G), , in grado di conferire alle particelle ricombinanti ottenute un ampio tropismo.

2.pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR

Le cellule 293T sono state coltivate in modo tale da raggiungere una confluenza del 50-80% in fiasche da 75 cm² dopo 24 ore dalla semina. In questo caso, veniva utilizzato un kit commerciale (BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System, Invitrogen™) che prevedeva la trasfezione delle cellule con 9 µg del DNA del vettore lentivirale insieme a 3µg del sistema di packaging (una mix fornita con il kit), seguendo il protocollo indicato dal produttore. Il giorno dopo la trasfezione, il mezzo di coltura veniva opportunamente sostituito con terreno fresco. Dopo ulteriori 24 ore, il surnatante veniva raccolto e si procedeva alla raccolta e stoccaggio delle particelle virali ricombinanti a -80°C fino al momento dell'uso.

3.11 Trasduzione di cellule A549 con particelle Lentivirali

Una volta prodotte le particelle virali ricombinanti si procedeva alla trasduzione delle cellule bersaglio A549. Le cellule venivano seminate in piastre da 24 pozzetti. Successivamente il terreno di coltura veniva rimosso dal monostrato quando la confluenza cellulare era pari a circa il 70% e venivano effettuati 2 lavaggi con PBS (1X). In ciascun pozzetto, venivano quindi inoculati 200 µl di particelle lentivirali pari a 5×10^6 TU/ml (determinato come riportato in seguito), in presenza di 8 µg/ml di polibrene. Si eseguiva, quindi, un'incubazione di 6 ore a 37 C°. Nel frattempo veniva preparato il terreno costituito DMEM più FBS al 10% v/v (800 µl per pozzetto).

Trascorso il tempo di incubazione, veniva aggiunto all'inoculo il terreno preparato, e si procedeva ad un'ulteriore incubazione di 2 giorni a 37C°. Le cellule trasdotte con le particelle ricombinanti basate sul vettore pLentilox 3.7 GFP venivano, quindi, analizzate al FACS per valutare l'efficienza di trasduzione. Al contrario, nel caso di particelle ricombinanti basate sul vettore pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR le cellule venivano selezionate con 10 ug/ml di antibiotico Blastidicina (Bds) che permetteva di eliminare dalla coltura le cellule non trasdotte. Tale procedura richiedeva di mantenere le cellule A549 in selezione fino al raggiungimento di una % di cellule EGFP positive valutate al FACS tra il 90 e il 100%, operazione che richiedeva anche fino a 25 giorni.

3.12 Titolazione dello stock di particelle ricombinanti prodotte

Il titolo e l'efficienza di trasduzione dei virioni ricombinanti contenenti il gene reporter EGFP, venivano valutati in cellule A549 come segue. Le cellule trasdotte, come descritto nel precedente paragrafo, venivano staccate e lavate 3 volte in PBS (1X) freddo. Le cellule venivano quindi risospese in 500 µl di PBS (1X) e mantenute in ghiaccio fino all'analisi mediante citofluorimetria, utilizzando uno strumento FACS Calibur 3CABBy (BD). Veniva quindi valutata la percentuale di cellule EGFP-positivo e veniva calcolato il titolo trasducente delle particelle ricombinanti, espresso come unità trasducenti/ml (TU/ml) utilizzando la seguente formula:

TU/ml =

$$\frac{(\% \text{ di cellule positive per la EGFP} \times \text{il numero di cellule trasdotte} \times \text{il fattore di diluizione della sospensione virale})}{\text{volume nel quale era stata effettuata la trasduzione.}}$$

3.13 Infezione delle cellule A549 precedentemente trasdotte con le particelle lentivirali ricombinanti

Materiali:

- Linea cellulare A549 (cellule umane adenocarcinomiche alveolari basali epiteliali)
- Terreno di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- PBS (10X)
- Tripsina (DIFCO) 10 mg in 10 ml di H₂O distillata
- Vassoio da 24 (NUNC) per colture cellulari
- Virus (Tutti i tipi e i ceppi precedentemente citati sono stati testati)

Una volta trasdotte e valutata l'efficienza di trasduzione al FACS le cellule a549 venivano infettate: Il terreno veniva rimosso ed i pozzetti erano lavati due volte con PBS (1X) e inoculati con 100 µl di virus ad una molteplicità di infezione (MOI) di 0.01 TCID₅₀/cellula. Dopo 1 ora circa di incubazione a 37 °C in incubatore al 5% CO₂, l'inoculo virale è stato rimosso e le cellule lavate due volte con PBS (1X). I surnatanti sono stati raccolti a tempi differenti (24 – 48 – 72 - 96 ore) e centrifugati a 1200 rpm per 30 minuti e in seguito è stata valutata la presenza e la possibile riduzione del titolo virale.

3.14 Estrazione dell' RNA

L'estrazione dell'RNA da cellule A549 precedentemente trasdotte con le particelle lentivirali, è stata realizzata utilizzando il kit "mir Vana miRNA Isolation Kit (Ambion)". Le cellule A549, precedentemente risospese in PBS, sono state centrifugate a 6000 g per 10 minuti, al fine di rimuovere il PBS (1X). Sono stati poi aliquotati 600 µl di Lysis/Binding Solution, come suggerito dal protocollo fornito dal kit. Il volume del Lysing/Binding da aggiungere dipende dal numero di cellule, precedentemente contate ed è compreso tra 300-600 µl a seconda che le cellule presenti nella sospensione siano in un range compreso tra 10^2 - 10^7 . Alla soluzione di cellule e Lysing/Binding, è stato aggiunto poi un 1/10 di volume di miRNA Homogenate Additive, nel nostro caso 60 µl, calcolato in base al volume di Lysing/Binding aggiunto nello step precedente dell'estrazione. Per favorire la lisi cellulare, la soluzione è stata vortexata e incubata in ghiaccio per 10 minuti. Successivamente è stato addizionato, in rapporto 1:1 rispetto al volume di Lysis/Binding Solution, il fenolo-cloroformio. È seguita la centrifugazione a 9400 g per 10 minuti per separare l'RNA dal DNA e dalle proteine. La componente acquosa nel soprannatante è stata così recuperata e misurata; ad essa è stato addizionato 1/3 del volume di etanolo assoluto. L'intero volume è stato filtrato e centrifugato nella colonna fornita dal kit a 9400 g per 15 secondi. La soluzione così ottenuta è stata poi vortexata e aliquotata in una nuova colonna con filtro e centrifugata a 9400 g per 15 secondi. Sono seguiti due lavaggi: il primo con 700 µl di miRNA Wash Solution 1, il secondo con 500 µl di Wash solution 2/3, forniti dal Kit. In entrambi i casi, la colonna è stata centrifugata a 9400 g per 15 secondi. Infine il filtro è stato centrifugato a vuoto per 1 minuto al massimo della velocità. L'eluizione degli RNA è stata fatta in 100 µl di H₂O sterile preriscaldata a 96 °C, dopo centrifugazione a 18000 g per 20-30 secondi. Gli RNA così estratti, dopo misurazione al Nanodrop, sono stati congelati a -80°C per i successivi test di biologia molecolare.

3.15 Sintesi del cDNA per l'amplificazione dell'RNA

Gli RNA estratti sono stati retrotrascritti, utilizzando il protocollo TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem), al fine di ottenere il cDNA. La miscela è stata preparata in un ambiente diverso da quello utilizzato per l'aggiunta dei campioni, per evitare eventuali contaminazioni. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 9 µl di una miscela costituita da: l'enzima Multiscribe Reverse Transcription (50U/µl), l'RNase Inhibitor (20U/µl), il rispettivo Buffer RT (10X), la dNTP Mix (100 nM), H₂O sterile e filtrata, in concentrazione variabile a seconda

della quantità di DNA aggiunta. Nella reazione di retro trascrizione sono stati utilizzati i primers RT disegnati sulla sequenza specifica della polimerasi basica di tipo 2 CCGGUAGGUAAGAAAACCA appositamente forniti dal Custom TaqMan[®] Small RNA Assay Design Tool (Invitrogen).

Sono stati aliquotati nella miscela dopo aver aggiunto concentrazioni variabili di H₂O a seconda del volume di campione necessario per ottenere 50 ng di RNA estratto e misurato al NanoDrop. Ai 9 µl di miscela, dopo centrifugazione a 6000 g per 1 minuto sono stati aggiunti 3 µl di ciascun specifico primer. Nel nostro caso, i primers scelti, sono stati quelli capaci di amplificare le regioni delle polimerasi di nostro interesse. Il volume finale di 12 µl così ottenuto, è stato ricentrifugato a 6000 g per 1 minuto circa e mantenendo in ghiaccio per 5 minuti. L'amplificazione del cDNA è stata realizzata usando il termocicizzatore DNA thermalCycler 2700 (Perkin-Elmer Cetus) seguendo il seguente profilo termico:

16°C 30'

42°C 30'

85 °C 5'

4°C ∞

3.16 qRT-PCR per l'amplificazione degli RNAs

Il cDNA ottenuto, è stato amplificato mediante qRT-PCR. La miscela di reazione di 20 µl di volume finale, è stata ottenuta aliquotando 5 µl di cDNA di ciascun campione a 15 µl di una miscela costituita da: 10 µl di TaqMan Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystem), 4 µl di H₂O sterile e filtrata, 1 µl di primer specifico per le polimerasi del virus influenzale. La quantità relativa dei singoli prodotti di amplificazione è stata calcolata mediante il programma di comparazione relativa ai cicli di soglia (Ct). Il valore del Ct, è stato quindi normalizzato in base al valore del Ct del campione di riferimento. La qRT-PCR è stata realizzata sul RotorGene 6000 (CorbetteResearch) e il profilo termico utilizzato è quello di seguito riportato.

95°C	10'	} 40 cicli
95°C	15'	
60 °C	1'	
4°C	∞	

4.RISULTATI

4.1 Ottenimento e caratterizzazione di vettori lentivirali esprimenti piccoli RNA aventi come target le regioni dei segmenti genomici codificanti le subunità delle polimerasi acida e basiche (PA, PB1 e PB2) del virus influenzale di tipo A.

E' stato precedentemente dimostrato (Giannecchini et al., 2009-2011) come sia possibile inibire la replicazione virale del virus influenzale di tipo A mediante la trasfezione di oligonucleotidi, o loro derivati, complementari alle sequenze regolatrici altamente conservate presenti nella regione in 5' primo dei segmenti genomici codificanti le subunità delle polimerasi acida e basiche (PA, PB1 e PB2) di virus influenzali di tipo A.

Nonostante i dati incoraggianti, tale approccio soffre della variabilità sperimentale legata alla necessità di trasfettare gli oligonucleotidi terapeutici nelle cellule, senza la possibilità di ottenere un'espressione costante ed estesa al maggior numero possibile di cellule delle sequenze oligonucleotidiche di interesse. Al fine di superare queste problematiche, di valutare l'effettiva efficacia della strategia sviluppata e per caratterizzare in dettaglio il meccanismo antivirale di oligonucleotidi diretti verso le sequenze conservate precedentemente descritte, il primo obiettivo del presente progetto di ricerca è stata la messa a punto di un sistema solido, efficiente e riproducibile per l'espressione di piccoli RNA aventi come target le stesse regioni del genoma del virus dell'influenza A descritte nei lavori precedentemente accennati. A tale scopo, sono stati selezionati vettori lentivirali, che risultano essere uno dei sistemi più efficienti per poter trasportare piccoli RNA in cellule bersaglio di diversa natura (Vannucci L. et al., 2013). In particolare, abbiamo selezionato due diversi vettori lentivirali, il pLentilox 3.7 GFP e il pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR .

Entrambi i vettori consentono l'espressione di piccoli RNA grazie alla presenza di un promotore pol-III, inoltre esprimono il gene reporter EGFP sotto il controllo trascrizionale del promotore del CMV. Infine il vettore pLenti6/V5 contiene un gene per la resistenza all'antibiotico blasticidina S HCl, che permette di selezionare le cellule che integrano il vettore nel proprio genoma.

Innanzitutto, prendendo come riferimento quanto pubblicato da Giannecchini e collaboratori (Giannecchini et al. 2011) sono state selezionate le sequenze bersaglio a livello delle polimerasi acida e basica di tipo 1 e 2. Tenendo presente che queste sequenze sono altamente conservate, il virus dell'influenza di tipo A, sottotipo A / Puerto Rico / 8 / 1934 (H1N1) è stato preso come modello.

Le sequenze selezionate sono riportate in figura 4.3

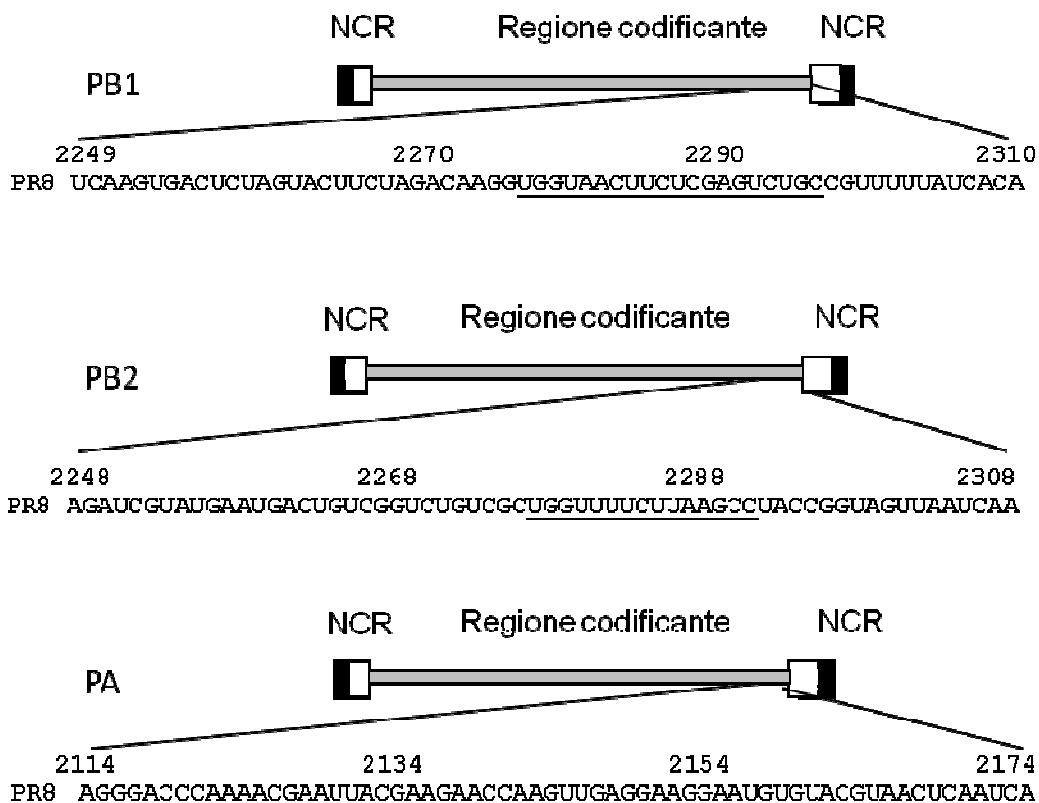


Figura 4.3: Sequenze oligonucleotidiche selezionate come bersaglio a livello delle regioni 5' altamente conservate dei segmenti genomici del virus dell'influenza A codificanti le 3 subunità della polimerasi (PA, PB1 e PB2) (Giannecchini et al., 2009-2011).

Tali sequenze sono state inserite nei due differenti vettori lentivirali. A tal fine, sono state inserite opportune sequenze nucleotidiche a monte e a valle delle sequenze originali insieme ai siti di restrizione che permettono l'inserimento del frammento nei vettori mediante digestione enzimatica. I dettagli relativi agli oligonucleotidi sono riportati nel paragrafo 3.5 della sezione "Materiali e Metodi". Infine, è stata disegnata una sequenza random con la funzione di controllo negativo del sistema, chiamata *scamble*, e anche essa è stata inserita nei vettori lentivirali. Di seguito, in figura 4.4, sono riportate le otto coppie oligonucleotidiche doppio filamento che sono state inserite nei vettori lentivirali.

A

Oligonucleotidi utilizzati per la generazione degli RNA antisenso

PB1 F 5' - TGTGATAAAAACGgcagactcgagaagt taccacCTTGTCTAGAAGTACTAGAGTCACTTGA-3'
PB1 R 5' - **TCGAT**CAAGTGACTCTAGTACTTC TAGACAAGGt ggtaacttctcgagctctgccCGTTTTTATCACA-3'
PB2 F 5' - TTGATTAAC TACCGGTAggcttaagaaaaccaGCGACAGACCGACAGTCATTCATACGATCT-3'
PB2 R 5' - **TCGA**AGATCGTATGAATGACTGTCCGGTCTGTCGC tggttttcttaagcctACCGGTAGTTAATCAA-3'
PA F 5' - TGATTGAGTTAcgtacacattccttctcctcaactTGGTTCTTCGIAATTCGTTTTGGGTCCCT-3'
PA R 5' - **TCGA**AGGGACCCAAAACGAATACGAAGAACCAGTtgaggaaggaatgtgtacgTAACTCAATCA-3'
SCR F 5' - TTTTGAAACTACCGGACTAGAAC TAGAGATCCAAGACAGTCAACACGATCTTCATTCA-3'
SCR R 5' - **TCGA**ATGAATGAAGATCGTGGTCTGACTGTCTTGGATCTCTAGTTC TAGTCGCGGTAGTTTCAAAA-3'

B

Oligonucleotidi utilizzati per la generazione dei miRNA

EB1 F 5' - TGCTGggcagactcgaagaagt taccagTTTGGCCACTGACTGActggtaacttctagctctgcc-3'
EB1 R 5' - CCTGggcagactagaagt taccagTTCAGTCACTGGCCAAAAC -ggtaacttctcgagctctgcc-3'
EB2 F 5' - TGCTGccggtaggetttaagaaaaccaGTTTGGCCACTGACTGActggttttcttaacctaccgg -3'
EB2 R 5' - CCTGccggtaggttaagaaaaccaGTCAGTCACTGGCCAAAAC -ggttttcttaagcctaccggc-3'
EA F 5' - TGCTGacgtacacatccttctcctcaactTGGCCACTGACTGActtgaggaaggagtgtacgt-3'
EA R 5' - CCTGacgtacactccttctcctcaactGTCAGTCACTGGCCAAAACttgaggaaggaatgtgtacgtc-3'
SCR F 5' - TGCTGgcgactagaactagagaaccaGTTTGGCCACTGACTGActggatctctagctagctctgcc-3'
SCR R 5' - CCTGgcgactagctagagatccaGTCAGTCACTGGCCAAAACtggatctctagctagctctgcc-3'

Figura 4.4: Sequenze oligonucleotidiche a doppio filamento inserite nei due vettori lentivirali.

La scelta di due vettori lentivirali deriva dal fatto che si è deciso di andare ad interferire con le sequenze bersaglio con piccoli RNA, aventi la caratteristica di antisense o di miRNA. Infatti, pur essendo entrambi piccoli RNA interferenti e pur avendo la stessa sequenza target, questi vanno ad agire in fasi diverse del ciclo replicativo del virus. Infatti, il sistema che sfrutta l'RNA antisense, per come è stato disegnato, può agire a livello nucleare appaiandosi all'RNA messaggero virale e all'RNA complementare, che si forma durante la replicazione virale. Al tempo stesso, l'RNA antisense potrebbe agire anche a livello dell'incorporazione dei segmenti genomici competendo con questi durante la fase di assemblaggio.

Al contrario, il sistema che sfrutta i miRNA, disegnati ad hoc per appaiarsi a livello delle sequenze bersaglio presenti nell'RNA genomico, dovrebbe agire esclusivamente a livello citoplasmatico andando ad interferire con la stabilità/incorporazione nella particella virale nascente degli specifici segmenti genomici ed eventualmente degli altri, con conseguenze importanti sull'infettività delle particelle virali prodotte.

Tali meccanismi di azione sono illustrati in figura 4.5.

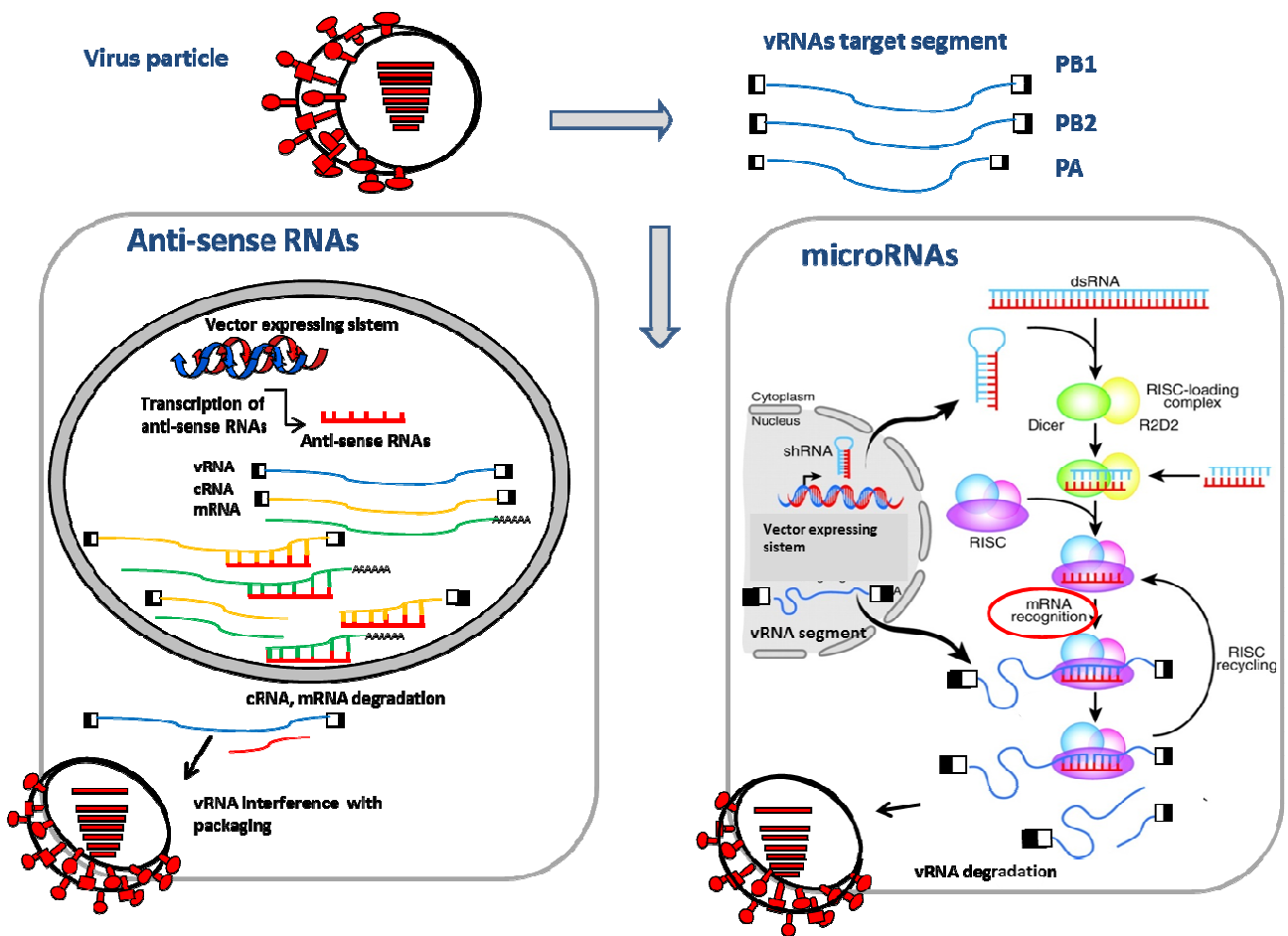


Figura 4.5: Meccanismo d'azione dei due differenti sistemi che sfruttano i piccoli RNA interferenti.

Con questa doppia strategia non solo intendevamo selezionare il sistema più robusto ed efficiente dal punto di vista antivirale, ma volevamo anche fare chiarezza sul meccanismo d'azione di oligonucleotidi che agiscono a livello delle sequenze conservate di PA, PB1 e PB2

I vettori lentivirali sono stati sviluppati come descritto dettagliatamente nella sezione "Materiali e metodi" (par. 3.5) In particolare, sono stati ottenuti i seguenti vettori lentivirali, esponenti RNA antisense, basati sul pLentilox 3.7 GFP, ed esponenti miRNA, basati su pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR.

<u>pLentilox 3.7 GFP</u>	<u>pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR</u>
pLentilox 3.7 GFP PA	pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PA
pLentilox 3.7 GFP PB1	pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PB1
pLentilox 3.7 GFP PB2	pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PB2
pLentilox 3.7 GFP SCR	pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR SCR

Tabella 4.1: Elenco dei costrutti sviluppati.

Una volta prodotte le particelle lentivirali ricombinanti, ottenute come descritto nel paragrafo 3.11 della sezione “Materiali e Metodi”, si è proceduto a saggiarne l’efficienza di trasduzione, utilizzando come cellule bersaglio le cellule A549. Tali cellule sono cellule epiteliali derivate da un adenocarcinoma alveolare, e sono state scelte in quanto risultano essere altamente suscettibili all’infezione da parte dei virus influenzali di tipo A, specialmente di derivazione umana, e B. Inoltre, a differenza delle cellule di rene canino MDCK, che sono ugualmente utilizzate per l’isolamento dei virus influenzali, le A549 sono cellule di derivazione umana. Infine, il virus dell’influenza colpisce le vie respiratorie, con interessamento, tra l’altro, del distretto alveolare. Pertanto, queste cellule rappresentano un ottimo sistema *in vitro* per lo studio della replicazione dei virus influenzali e dell’effetto di molecole ad azione antivirale.

Poiché al fine di valutare l’efficienza antivirale dei vettori sviluppati era necessario ottenere un’efficienza di trasduzione con le particelle ricombinanti prodotte elevata, abbiamo innanzitutto ottimizzato il protocollo di trasduzione delle cellule A549. L’efficienza di trasduzione delle particelle lentivirali ricombinanti è stata valutata mediante analisi al FACS, sfruttando la presenza del gene EGFP nei due vettori utilizzati per tale studio.

Come riportato in tabella 4.2, nel caso delle particelle lentivirali basate sul pLentilox 3.7, le condizioni migliori per la trasduzione si sono ottenute tramite utilizzo di polibrene. Inoltre, abbiamo osservato che la procedura di “spin inoculation” a fronte di un aumento di indagine della fase di trasduzione non ne aumentava l’efficienza. Come si può osservare dalla tabella 4.2, la percentuale di cellule EGFP positive a 48 ore dalla trasduzione mediante utilizzo di polibrene diminuisce all’aumentare della diluizione di particelle lentivirali utilizzate e raggiunge valori fino al 100% (pLentilox 3.7 GFP PB2) quando lo stock virale è utilizzato non diluito. Nel grafico 4.4 è

riportata come esempio l'analisi della percentuale di cellule A549 EGFP positive ottenuta dopo trasduzione con particelle ricombinanti basate sul vettore pLentilox 3.7 GFP PB2.

<u>Percentuali di cellule EGFP positive ottenute con l'utilizzo del polibrene (particelle Lentivirali non diluite)</u>	<u>Percentuali di EGFP ottenuta con l'utilizzo del polibrene, (particelle Lentivirali diluite 1:2)</u>	<u>Percentuali di EGFP ottenuta con l'utilizzo del polibrene (particelle Lentivirali diluite 1:4)</u>
pLentilox 3.7 GFP PA 87,87%± 5,5	pLentilox 3.7 GFP PA 76,75%±3,2	pLentilox 3.7 GFP PA 48,26%±2,3
pLentilox 3.7 GFP PB1 87,48%±5,6	pLentilox 3.7 GFP PB1 82,45%±1,2	pLentilox 3.7 GFP PB1 58,15%±3,5
pLentilox 3.7 GFP PB2 100%± 0	pLentilox 3.7 GFP PB2 84,65%±5,7	pLentilox 3.7 GFP PB2 60,19%±4
pLentilox 3.7 GFP SCR 91,85%±5,7	pLentilox 3.7 GFP SCR 72,59%±2,4	pLentilox 3.7 GFP SCR 47,58%±3,6

Tabella 4.2: In tabella sono riportati i valori di percentuale di cellule EGFP positive ottenuta dopo trasduzione in presenza di polibrene con le particelle lentivirali ricombinanti basate sul vettore pLentilox 3.7 GFP. I valori riportati sono rappresentativi della media e delle deviazioni standard di 3 esperimenti indipendenti.

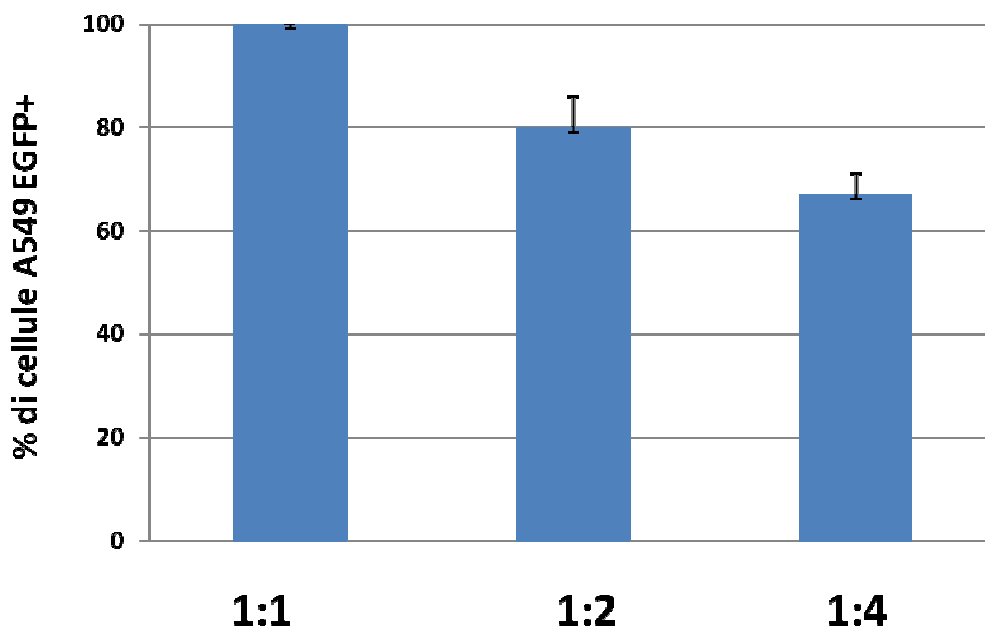


Figura 4.6: Valutazione dell'efficienza della trasduzione delle particelle lentivirali ricombinanti (PB2 nell'esempio). I valori riportati rappresentano la percentuale delle cellule EGFP positive, analizzata al FACS, in cellule A549 trasdotte con le particelle lentivirali ricombinanti basate sul vettore pLentilox 3.7 GFP (sistema RNA antisense). Come si può

apprezzare dal grafico, la percentuale di cellule positive registrata risulta essere dose dipendente. I valori riportati sono le medie rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

Al contrario, nel caso delle particelle lentivirali ricombinanti basate sul vettore pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR, il protocollo di trasduzione classico, anche con aggiunta di polibrene, portava a percentuali di positività alla EGFP nelle cellule bersaglio significativamente più basse di quelle ottenute con le particelle lentivirali ricombinanti basate sul vettore pLentilox 3.7 GFP (Tabella 4.3, colonna di sinistra). L'efficienza di trasduzione rimaneva molto bassa anche a seguito di spin inoculation e alla concentrazione delle particelle ricombinanti mediante ultracentrifugazione seguita da spin inoculation in presenza di polibrene (dati non riportati)., A questo punto, si è pensato di ricorrere alla possibilità di selezionare le cellule recanti il vettore integrato all'interno del genoma mediante il farmaco blastidina (Bds), in quanto, come precedentemente accennato, il pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR contiene un gene per la resistenza. In questo modo, pur in presenza di una bassa efficienza di trasduzione, dopo opportuna selezione si è riusciti ad ottenere una percentuale di A549 positive per la EGFP paragonabile a quella ottenuta con le particelle lentivirali ricombinanti basate sul pLentilox 3.7 GFP, ovvero superiori del 90% (Tabella 4.3, colonna di destra). In figura 4.7 è riportato il confronto tra la percentuale di cellule EGFP positive ottenute dopo 2 giorni di selezione e in assenza di selezione (lette al FACS dopo 2 giorni dalla trasduzione).

Percentuali di GFP ottenuta con l'utilizzo del polibrene	Percentuali di GFP ottenuta selezionando le cellule con <u>Bds</u>
pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PA 2,65%± 0,5	pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PA >90%± 1,1
pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PB1 54,53%±1,3	pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PB1 >90%± 1,15
pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PB2 50,23%±1,5	pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PB2 >90%± 1,1
pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR SCR 73,03%±3,2	pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR SCR >90%± 1,1

Tabella 4.3: In tabella sono riportati I valori di percentuale di EGFP ottenuta dopo trasduzione e analisi al FACS con le particelle lentivirali ricombinanti del pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR. I valori riportati sono le medie e le deviazioni standard rappresentativi di 3 esperimenti indipendenti.

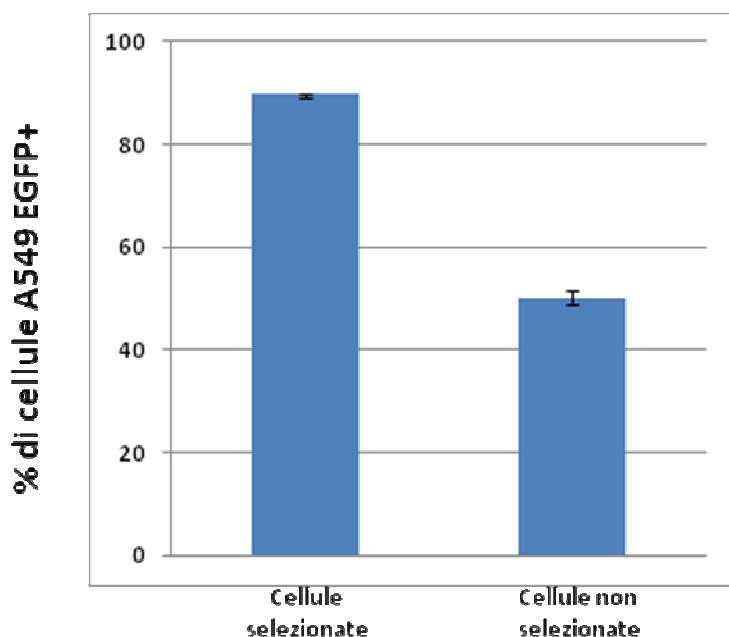


Figura 4.7: Valutazione dell'efficienza della trasduzione delle particelle lentivirali ricombinanti (PB2 nell'esempio). I valori riportati rappresentano la percentuale della EGFP, analizzata mediante FACS, in cellule A549 2 giorni dopo (non selezionate) o 25 giorni dopo (cellule selezionate) trasduzione con le particelle lentivirali ricombinanti, basate sul vettore Lenti6/V5 (sistema miRNA). I valori riportati sono le medie rappresentative di 3 esperimenti indipendenti.

4.2 Titolazione su cellule A549 dei virus umani ed aviari utilizzati.

Per prima cosa sono stati valutati i titoli virali dei virus presi in esame per tale tesi di dottorato.

I virus utilizzati erano isolati e mantenuti in cellule MDCK.

I nostri esperimenti si sono svolti su cellule A549, perciò è stato importante rititolare i virus su MDCK e A549 e confrontare in tre prove separate la media dei titoli ottenuti, in modo tale da utilizzare negli esperimenti di challenge concentrazioni note e riproducibili di virus. A titolo d'esempio in tabella 4.4 è riportato il titolo virale del virus A / Puerto Rico / 8 / 1934 ceppo H1N1 titolato su cellule MDCK e su cellule A549, dove si può apprezzare una sostanziale differenza pari ad almeno 1.1 logaritmi.

Titolazione virus influenzale A / Puerto Rico / 8/1934 ceppo H1N1 (MOI 0.01) su cellule MDCK, titolazione mediante TCID50%	Titolazione virus influenzale A / Puerto Rico / 8/1934 ceppo H1N1 (MOI 0.01) su cellule A549, titolazione mediante TCID50%
1 Titolazione PR8(H1N1): $>2 \times 10^7$ /ml	1 Titolazione PR8(H1N1): 2×10^6 /ml
2 Titolazione PR8(H1N1): $>2 \times 10^7$ /ml	2 Titolazione PR8(H1N1): 2×10^6 /ml
3 Titolazione PR8(H1N1): $>2 \times 10^{7.5}$ /ml	3 Titolazione PR8(H1N1): 2×10^6 /ml
Media dei titoli PR8 (H1N1): $>2 \times 10^{7.1}$ /ml	Media dei titoli PR8(H1N1): 2×10^6 /ml

Tabella 4.4: Titolazione mediante TCID₅₀% del virus influenzale A / Puerto Rico / 8/1934 ceppo H1N1 su cellule MDCK e A549, I valori nelle tabelle indicano i titoli virali ottenuti in tre singole prove e la medie finale di queste.

4.3 Valutazione degli effetti dei virioni ricombinanti sulla replicazione di virus dell'influenza di tipo A umani.

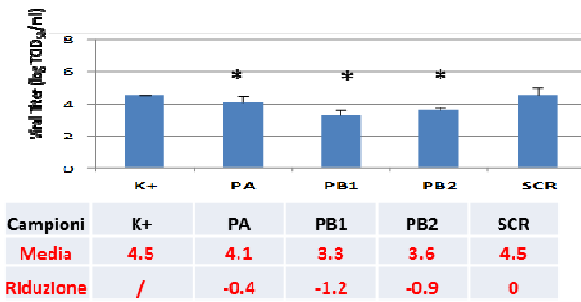
Una volta ottimizzata l'efficienza di trasduzione delle particelle lentivirali ricombinanti e valutato correttamente il titolo infettivo degli stock virali per le cellule A549 l'effetto dei piccoli RNA selezionati sulla replicazione del virus influenzale di tipo A è stata valutata su cellule A549 eseguendo esperimenti di challenge con virus competente per la replicazione. Cellule A549 sono state trasdotte con le particelle lentivirali ricombinanti, come precedentemente descritto, e sono state quindi infettate con diversi ceppi di virus influenzale di tipo A a tropismo umano. Nel caso delle particelle lentivirali basate su pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR si utilizzavano le cellule dopo selezione con blastidicina. In particolare, le cellule A549 selezionate mediante blastidicina venivano utilizzate dopo opportuna selezione di circa 20/25 giorni e previa valutazione al FACS. In alcuni casi, dopo opportuna selezione, quando la percentuale di cellule EGFP positive raggiungeva circa il 90%, le cellule venivano congelate e rimesse in selezione, dopo scongelamento, prima di eseguire gli esperimenti.

I primi virus ad essere stati testati sono stati quelli a tropismo umano. Le colture di cellule A549 precedentemente trasdotte sono state infettate con una MOI di 0.01 TCID₅₀/cellula per 1 ora a 37°C. La crescita del virus nelle colture veniva analizzata 24 ore dopo l'infezione attraverso titolazione del virus presente nei soprannatanti, con saggio di infettività. La scelta delle 24 ore post-infezione per l'esecuzione del test è stata effettuata per due motivi principali: i) evitare che fattori quali la morte cellulare o più cicli di replicazione virale potessero mascherare l'effetto antivirale; ii) per poter valutare l'attività inibitoria antivirale nelle stesse condizioni sperimentali utilizzate precedentemente (Giannecchini et al 2011-2009). Tutti gli esperimenti di challenge riportati in questa tesi di dottorato sono stati effettuati almeno in triplicato.

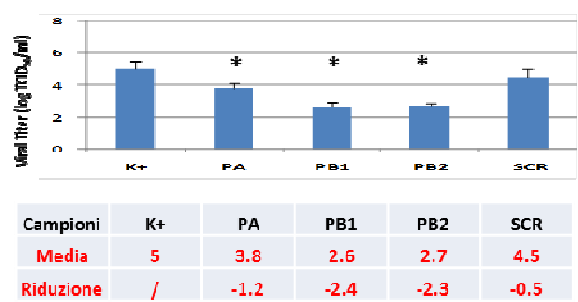
I risultati ottenuti con il virus dell'influenza H1N1 PR8, virus adatto all'utilizzo in laboratorio anche di biosicurezza di livello due (BSL-2), (prototipo sul quale sono state disegnate le sequenze degli oligo utilizzati per produrre i piccoli RNA), mostrano che le particelle lentivirali ricombinanti esprimenti gli RNA antisense determinano una riduzione media del titolo virale di 1,2 logaritmi \pm 0,288 di deviazione standard, quando il bersaglio risulta essere il segmento genomico esprimente la polimerasi basica di tipo 1 (PB1) (figura 4.8).

Le particelle ricombinanti lentivirali esprimenti i micro-RNA risultano avere in generale un effetto più significativo sulla replicazione virale, specialmente quando il target è rappresentato da PB1 e PB2, portando ad una riduzione media di $2.3 \pm 0,288$ e $2.4 \pm 0,25$ logaritmi, rispettivamente. Nel caso dei virus, pandemico H1N1 A / Trieste / 30 / 2009 e A / Parma / 1720 / 2009 e dell'H3N2 stagionale A / Firenze / 6 / 2012 si ottiene un'inibizione paragonabile per entrambi i sistemi e particolarmente chiara quando i target sono rappresentati da PB1 e PB2 (figura 4.8). Nessuna attività inibitoria significativa è stata osservata nel caso delle particelle ricombinanti lentivirali esprimente la sequenza *scramble* (Figura 4.8).

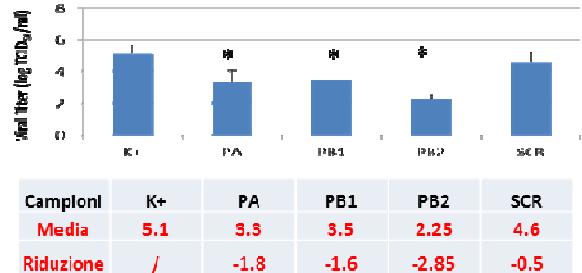
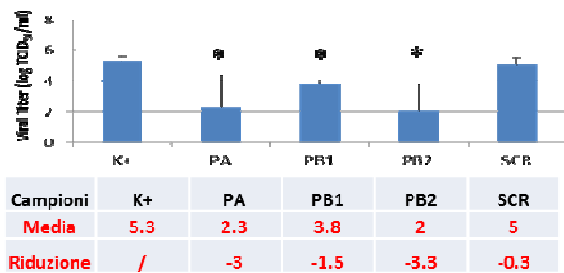
RNA Anti-senso



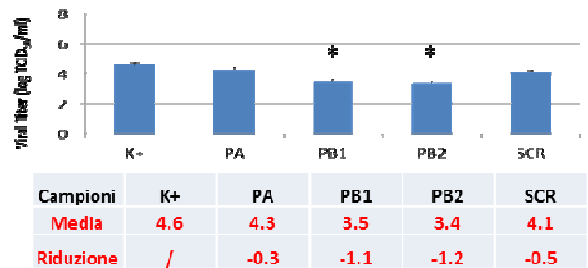
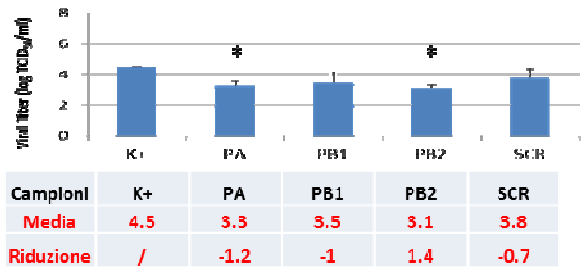
microRNA



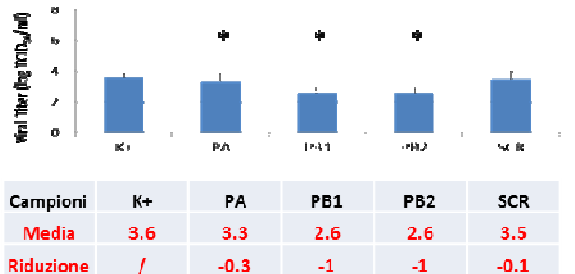
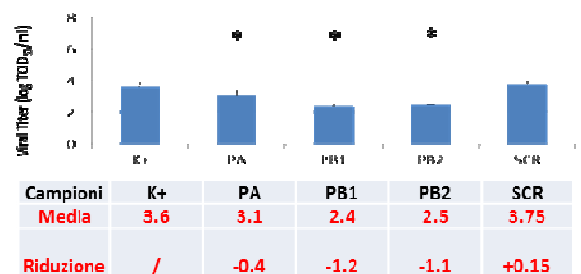
Cellule Infettate con H1N1 (PR8) MOI 0.01



Cellule Infettate con H1N1 (Trieste) MOI 0.01



Cellule Infettate con H1N1 (Parma) MOI 0.01



Cellule Infettate con H3N2 (Human) MOI 0.01

Figura 4.8: Attività antivirale delle particelle ricombinanti lentivirali esprimenti gli RNA antisenso e i microRNA contro i virus dell'influenza umana tipo A (H1N1, H3N2). L'infezione è stata effettuata ad una MOI di 0,01 TCID50/cellula. La crescita virale è espressa come log di TCID50%/ml presente a livello del supernatante, raccolto 24 ore dopo l'infezione.

*Il pannello di virus utilizzati comprende il tipo influenzale A / Puerto Rico / 8 / 1934 ceppo H1N1, i ceppi stagionali e pandemici H1N1 (A / Trieste / 30 / 2009 e A / Parma / 1720 / 2009), e A / Firenze / 6 / 2012 H3N2 ceppo stagionale). I valori nelle tabelle indicano l'attività antivirale delle particelle ricombinanti. (media della riduzione logaritmica del titolo virale). I valori indicati rappresentano la media \pm deviazioni standard di 3 esperimenti indipendenti. L'asterisco * rappresenta valori statisticamente significativi calcolati con il test t di Student, la differenza tra le medie osservate è considerata significativa per $p < 0,05$.*

4.4 Valutazione degli effetti dei virioni lentivirali ricombinanti sulla replicazione di virus dell' influenza di tipo A umani a differenti tempi dall'infezione.

Il sistema basato sulla trasfezione diretta di oligonucleotidi o loro derivati sperimentato nei precedenti lavori in letteratura (Gianecchini et al., 2011- 2009) permette una valutazione dell'effetto antivirale entro poche ore dalla trasfezione, in quanto gli oligonucleotidi vengono rapidamente degradati.

Nel caso del sistema sviluppato in questo lavoro di tesi, poiché i piccoli RNA interferenti vengono prodotti da sequenze integrate nel genoma cellulare, grazie all'utilizzo dei vettori lentivirali, è stato possibile valutare l'effetto anti-influenzale non solo a 24 ore dall'infezione ma a differenti tempi dopo l'infezione, ed in particolare a 24, 48, 72 e 96 ore dopo l'infezione, con i differenti tipi e sottotipi virali.

I risultati ottenuti con il virus dell'influenza H1N1 PR8, nel caso specifico analizzando l'effetto dei piccoli RNA interferenti con il segmento genomico virale PB2, mostrano che le particelle lentivirali ricombinanti, esprimendo sia gli RNA antisenso e i miRNA, determinano una riduzione media del titolo virale costante nel tempo come si può apprezzare in tabella 4.5 e 4.6. Risultati simili sono stati ottenuti con PA e PB1 come target e con tutti gli altri virus umani ed aviari testati (dati non riportati).

Titolo virale a 24 ore dopo l'infezione	Titolo virale 48 ore dopo l'infezione	Titolo virale 72 ore dopo l'infezione	Titolo virale 96 ore dopo l'infezione
MOCK- tutto negativo	MOCK- tutto negativo	MOCK- tutto negativo	MOCK- tutto negativo
MOCK+: 2×10^6 /ml	MOCK+: $2 \times 10^{6,5}$ /ml	MOCK+: $2 \times 10^{6,75}$ /ml	MOCK+: 2×10^7 /ml
PB2: $2 \times 10^{4,1}$ /ml	PB2: $2 \times 10^{4,5}$ /ml	PB2: 2×10^5 /ml	PB2: 2×10^5 /ml
SCR: $2 \times 10^{5,5}$ /ml	SCR: $2 \times 10^{6,5}$ /ml	SCR: 2×10^7 /ml	SCR: 2×10^7 /ml

--	--	--	--

Tabella 4.5: Attività antivirale delle particelle ricombinanti lentivirali esprimenti gli RNA antisenso (vettore **pLentilox 3.7 GFP**). L'infezione è stata effettuata ad una MOI di 0.01 TCID50/cellula. La crescita virale è espressa come log di TCID50%/ ml presente a livello del supernatante, raccolto 24, 48, 72 e 96 ore dopo l'infezione. Il virus utilizzato è tipo influenzale A / Puerto Rico / 8/1934 ceppo H1N1. In tabella sono riportati i valori del titolo virale ottenuto da cellule non trasdotte e non infettate(MOCK-), non trasdotte ed infettate (MOCK+), trasdotte con le particelle lentivirali ricombinanti basate su **pLentilox 3.7 GFP PB2** e su **pLentilox 3.7 GFP SCR**.

Controllo diminuzione titolo virale 24 ore dopo l'infezione con_A / Puerto Rico / 8/1934 ceppo H1N1 (MOI 0.01)	Controllo diminuzione titolo virale 48 ore dopo l'infezione con_A / Puerto Rico / 8/1934 ceppo H1N1 (MOI 0.01)	Controllo diminuzione titolo virale 72 ore dopo l'infezione con_A / Puerto Rico / 8/1934 ceppo H1N1 (MOI 0.01)	Controllo diminuzione titolo virale 96 ore dopo l'infezione con_A / Puerto Rico / 8/1934 ceppo H1N1 (MOI 0.01)
MOCK- tutto negativo	MOCK- tutto negativo	MOCK- tutto negativo	MOCK- tutto negativo
MOCK+: 2×10^6 /ml	MOCK+: $2 \times 10^{6,5}$ /ml	MOCK+: $2 \times 10^{6,75}$ /ml	MOCK+: 2×10^7 /ml
PB2: 2×10^3 /ml	PB2: 2×10^3 /ml	PB2: $2 \times 10^{3,5}$ /ml	PB2: $2 \times 10^{3,5}$ /ml
SCR: 2×10^6 /ml	SCR: $2 \times 10^{6,5}$ /ml	SCR: $2 \times 10^{6,75}$ /ml	SCR: $2 \times 10^{7,5}$ /ml

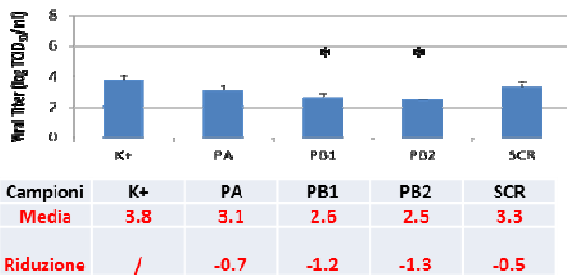
Tabella 4.6: Attività antivirale delle particelle ricombinanti lentivirali esprimenti i microRNA (vettore **pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR**). L'infezione è stata effettuata ad una MOI di 0,01. La crescita virale è espressa come log di TCID50% / ml presente a livello del supernatante, raccolto 24,48,72 e 96 ore dopo l'infezione. Il virus utilizzato è tipo influenzale A / Puerto Rico / 8/1934 ceppo H1N1. I valori nelle tabelle indicano l'attività antivirale delle particelle ricombinanti.. In tabella sono riportati i valori del titolo virale ottenuto da cellule non trasdotte e non infettate(MOCK-), non trasdotte ed infettate (MOCK+), trasdotte con le particelle lentiviral ricombinanti basate su **pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PB2** e su **pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR SCR**.

4.5 Valutazione degli effetti dei virioni lentivirali ricombinanti sulla replicazione di virus dell'influenza A aviari

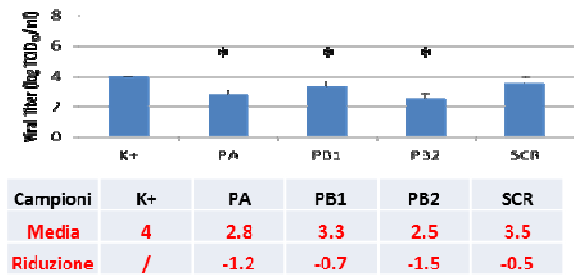
Dopo aver valutato l'attività antivirale dei sistemi sviluppati nei confronti di virus dell'influenza A umana, l'effetto delle particelle lentivirali è stato studiato utilizzando un pannello di virus influenzali di tipo A d'origine aviaria, come riportato in figura 4.9. L'utilizzo di virus aviari è molto interessante perché è stato riportato in letteratura come in specifiche situazioni questi virus

possano infettare anche l'uomo (Subbarao E.K, 1998). Utilizzando i virus dell'influenza aviaria, è stata ottenuta una riduzione del titolo virale, con entrambi i sistemi, di circa 2 logaritmi quando i target sono rappresentati da PB1 e PB2. Nel caso specifico del virus dell'influenza aviaria H7N7, inoltre, anche quando il bersaglio dei piccoli RNA è rappresentato dal segmento genomico esprime la polimerasi basica PBA, è stata ottenuta un'inibizione di circa 2,5 logaritmi. Anche in questo caso, non si verifica alcuna inibizione quando le particelle lentivirali ricombinanti esprimono i piccoli RNA diretti verso la sequenza *scramble*.

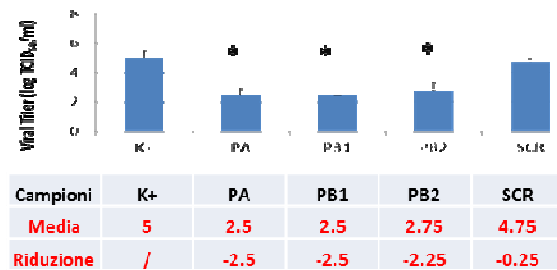
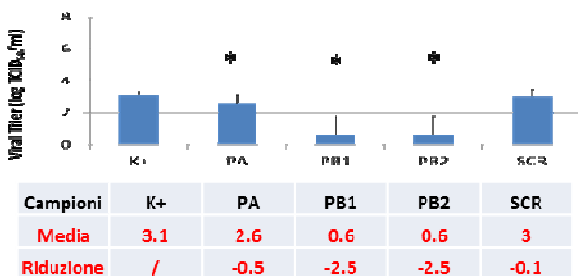
RNA Anti-senso



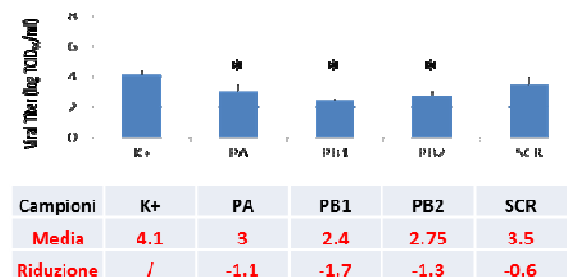
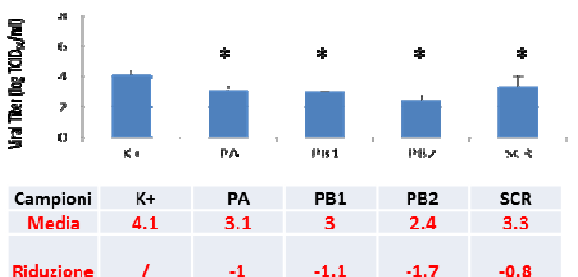
microRNA



Cellule infettate con H9 (Avian) MOI 0.01



Cellule infettate con H7N7 (Avian) MOI 0.01

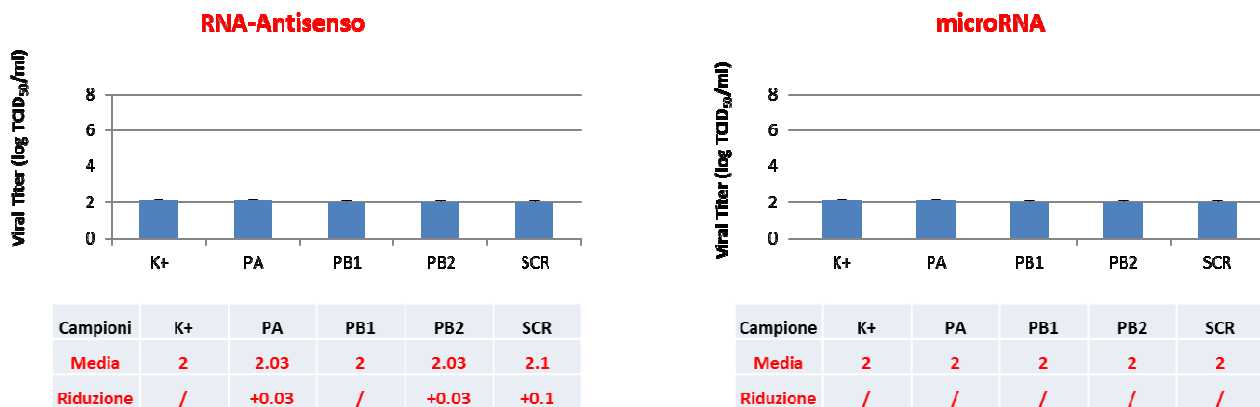


Cellule infettate con H10N2 (Avian) MOI 0.01

Figura 4.9: Attività antivirale delle particelle lentivirali esprimenti gli RNA antisenso e i microRNA contro i virus dell'influenza aviaria di tipo A. L'infezione è stata effettuata ad una MOI di 0,01 TCID₅₀/cellula. La crescita virale è espressa come log TCID₅₀ %/ ml presente nel surnatante, raccolto 24 ore dopo l'infezione. Il pannello di virus utilizzati comprendeva il tipo A ceppo H7N7 (A / Mallard / 23/2006), H10N7 ceppo (A / Mallard / 435/2006), e il ceppo H9 (A / Mallard / 433/2009). I valori riportati sono media \pm deviazioni standard di 3 esperimenti indipendenti. I valori nelle tabelle indicano l'attività antivirale delle particelle ricombinanti, contro il virus dell'influenza aviaria (media dei log di riduzione del titolo virale rispetto ai valori ottenuti in assenza di trattamento). L'asterisco * rappresenta valori statisticamente significativi calcolati con il test t di Student, la differenza tra le medie osservate è significativa per $p < 0,05$.

4.6 Le particelle lentivirali ricombinanti sviluppati hanno un effetto antivirale specifico per i virus dell'influenza di tipo A

I dati ottenuti con le particelle lentivirali ricombinanti esprimenti le due sequenze *scamble* forniscono una prima indicazione circa la specificità del sistema sviluppato. Poiché gli RNA sono stati disegnati utilizzando come bersaglio le regioni 5' dei segmenti genomici del virus dell'influenza di tipo A, che differiscono significativamente da quelli dei virus di tipo B (figura 4.10 in basso), la specificità della strategia sviluppata è stata testata anche utilizzando un virus stagionale dell'influenza di tipo B in esperimenti di challenge. I risultati in figura 4.10 dimostrano che né gli RNA antisenso né i microRNA selezionati presentano attività inibitoria nei confronti dei virus dell'influenza di tipo B



Cellule infettate col virus tipo B MOI0.01

I due sistemi sono altamente specifici e funzionano solamente contro i virus di tipo A

Le sequenze genomiche sono differenti



```

tipo A  ---AATACTCTGGGTCTAGAC-ATCAVAGCAGCC---ACCCATGTTGGA---AGCA
tipo B  CTTGACTATCCTGGTCAAGACCCTACACAGACTAAAACGAAATTAGAAATCAAGAATA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
    
```

Figura 4.10 Valutazione dell'attività antivirale delle particelle lentivirali esprimenti gli RNA antisenso e microRNA contro il virus dell'influenza umana di tipo B. L'infezione è stata effettuata ad una MOI di 0,01 TCID₅₀/cellula. La crescita virale è espressa come log TCID₅₀ % / ml presente nel surnatante, raccolto 24 ore dopo l'infezione. I valori

riportati sono media \pm deviazioni standard dei 3 esperimenti indipendenti. I valori nelle tabelle indicano l'attività antivirale delle particelle ricombinanti mirate contro il virus dell'influenza di tipo ceppo umano B (media dei log di riduzione del titolo virale rispetto ai valori ottenuti in assenza di trattamento).

Questo risultato è molto importante in quanto dimostra che l'abbattimento del titolo virale nel caso dei virus dell'influenza di tipo A sia legato ad un effetto specifico dei piccoli RNA sulle sequenze bersaglio e non ad altri effetti by-stander.

4.7 Mutazioni a livello della regione target alterano la capacità dei piccoli RNA di inibire la replicazione del virus dell'influenza di tipo A

Per confermare ulteriormente la specificità dell'approccio sviluppato, è stata anche valutato l'effetto di mutazioni introdotte nel genoma virale a livello delle regioni bersaglio dei piccoli RNA. A tal fine, sono stati impiegati 2 virus dell'influenza di tipo A (PR8 H1N1), contenenti 5 mutazioni silenti all'interno delle sequenze bersaglio a livello dei segmenti genomici codificanti PB1 e PB2. Tali cloni virali sono risultati essere resistenti sia al sistema che sfrutta l' RNA antisenso che il microRNA. Questi risultati sono riportati in tabella 4.7.

Clone usato	Mutazione nella regione target	Mutazione al di fuori della regione target	Resistenza verso gli SON precedentemente testati	Resistenza	
				RNA Anti-senso	miRNA
PR8 wt	Nessuna	Nessuna	No	No	No
PB2 5-15bmut	C2280U-A2283G-A2286G-U2289C-G2292A	Nessuna	Si	Si	Si
PB1 5-20cmut	C2271A-U2274A-A2277G-G2280A-C2283G-A2286G	Nessuna	Si	Si	Si

Tabella 4.7: Nella tabella sono riportate le mutazioni silenti inserite nella regione bersaglio delle polimerasi basiche di tipo 1 e 2. L'espressione dei piccoli RNA interferenti non è in grado di inibire la replicazione dei ceppi virali mutanti.

4.8 Effetto delle mutazioni al di fuori della regione target sulla sensibilità virale degli small RNA

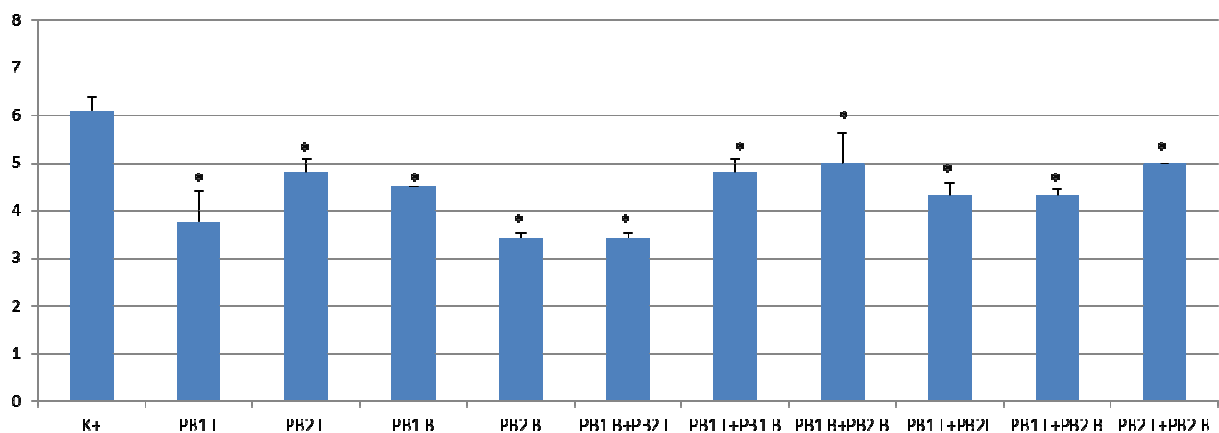
In uno studio precedente (Giannecchini et al., 2011), era stato osservato come la resistenza virale agli oligonucleotidi avveniva anche quando venivano modificate alcune regioni al di fuori di quelle bersaglio. Tali mutazioni, che non sembrano essere presenti in natura in PB1 vengono selezionate dal trattamento con gli oligonucleotidi e generano una perdita della fitness virale. Per confermare il ruolo di queste mutazioni nel mediare la resistenza virale e creare una perdita della fitness virale gli stessi mutanti virali precedentemente testati e basati sul virus prototipo H1N1 PR8 sono stati utilizzati per infettare cellule trasdotte con le particelle ricombinanti sviluppate. I risultati ottenuti dimostrano che tutti i cloni virali mutati sono resistenti anche nei confronti dell'azione dei piccoli RNA espressi dai vettori lentivirali (tabella 4.8).

Clone usato	Mutazione nella regione target	Mutazione al di fuori della regione target	Resistenza verso gli SON precedentemente testati	Resistenza	
				RNA Anti-senso	miRNA
PB1 wt	Nessuna	Nessuna	No	No	No
PB1 5'a	Nessuna	G2280C	Si	Si	Si
PB1 5'c	Nessuna	G2280A	Si	Si	Si
PB1 5'e	Nessuna	G2298C	Si	Si	Si
PB1 5'f	Nessuna	A2297G, G2298A	Si	Si	Si
PA 3'd	Nessuna	C40A, A42G	Si	Si	Si

Tabella 4.8: La tabella riassume le caratteristiche dei mutanti virali impiegati e riporta la loro suscettibilità/resistenza alle particelle ricombinanti sviluppate.

4.9 Effetto delle differenti combinazioni degli small-RNA sul virus PR8 H1N1 (prototipo)

Vista l'efficacia e selettività del sistema sviluppati, per valutare fosse possibile incrementare l'effetto antivirale, è stato saggiato l'effetto sulla replicazione del virus prototipo H1N1 / PR8 delle particelle lentivirali ricombinanti esprimenti i piccoli RNA diretti verso i segmenti virali genomici codificanti PB1 e PB2, singolarmente e in differenti combinazioni. I risultati riportati in Figura 4.11 non hanno evidenziato particolari effetti sinergici dovuti alla combinazione di due vettori lentivirali. L'unica eccezione è rappresentata dalla combinazione PB1 pLenti6 / V5 + pLLox3.7 PB2 che ha mostrato un effetto inibitorio doppio rispetto ai risultati ottenuti con i singoli vettori.



Campioni	Medie	Deviazione Standard	Riduzione
K+	6,166667	0,288675	/
PB1 L (pLLox 3.7)	3,75	0,661438	-2,35
PB2 L	4,833333	0,288675	-1,3
PB1 B (pLenti6/V5)	4,5	0	-1,6
PB2 B	3,416667	0,144338	-2,7
<u>PB1 B+PB2 L</u>	3,416667	0,144338	-2,7
PB1 L+PB1 B	4,833333	0,288675	-1,3
PB1 B+PB2 B	5,083333	0,629153	-1,1
PB1 L+PB2L	4,333333	0,288675	-1,8
PB1 L+PB2 B	4,333333	0,144338	-1,8
PB2 L+PB2 B	5	0	-1,1

Cellule infettate con virus H1N1 (PR8) MOI 0,01

- B (pLenti6/V5) → microRNA
- L (pLLox 3.7) → RNA Anti-senso

Figura 4.11: La figura mostra l'utilizzo di differenti combinazioni di particelle lenti virali ricombinanti dei piccoli RNA. Attività antivirale delle particelle ricombinanti lentivirali esprimenti gli RNA antisenso e i microRNA contro il virus dell'influenza umana tipo A (H1N1). L'infezione è stata effettuata ad una MOI di 0,01 TCID50/cellula. La crescita virale è espressa come log di TCID50% / ml presente a livello del supernatante, raccolto 24 ore dopo l'infezione. Il virus utilizzato il tipo influenzale A / Puerto Rico / 8/1934 ceppo H1N1. I valori nelle tabelle indicano l'attività antivirale delle particelle ricombinanti. (media della riduzione logaritmica del titolo virale). I valori indicati rappresentano la media ± deviazioni standard di 3 esperimenti indipendenti. L'asterisco * rappresenta valori statisticamente significativi calcolati con il test t di Student, la differenza tra le medie osservate è significativa per $p < 0,05$.

4.10 Confronto tra i livelli di espressione dei piccoli RNA diretti verso PB2

A questo punto, considerando che entrambe i sistemi funzionano con un'efficienza paragonabile e che PB2 sembra essere il bersaglio migliore, abbiamo valutato quantitativamente il livello di espressione dei piccoli RNA diretti verso PB2 in cellule A549 trasdotte con le particelle lentivirali ricombinanti. A tal fine abbiamo messo a punto una metodica di PCR Real-time in grado di amplificare in maniera specifica l'RNA antisenso e il miRNA diretti verso il segmento PB2. In questo modo abbiamo evidenziato come il miRNA sia in quantità significativamente superiore (10^3 copie/ng di RNA totale), rispetto all'RNA antisenso (< di 10 copie/ng di RNA totale), come riportato nella tabella 4.9.

Expression system	NUMBER OF COPIES
pLL3.7 vector	< 10 copies / μ g RNA
pLENTI6/V5-DEST	10^3 copies / μ g RNA

Tabella 4.9: Numero di copie di RNA antisenso e miRNA per ng di RNA totale valutato mediante Real Time PCR specifica per i piccoli RNA diretti verso PB2. I valori riportati sono rappresentativi di X esperimenti indipendenti.

5. Discussione

I virus influenzali sono la causa di epidemie annuali e occasionali pandemie che rappresentano una sfida significativa per la salute pubblica (Muratore G. et al., 2012).

I farmaci anti-influenzali disponibili attualmente in commercio soffrono di numerosi effetti collaterali e della rapida comparsa di resistenza al trattamento, anche in assenza di selezione legata alla somministrazione degli stessi. Infine, ad oggi, non esistono strategie vaccinali universali che garantiscano una protezione nei confronti dei diversi tipi virali che stagionalmente ricompaiono nella popolazione, rendendo necessaria una nuova vaccinazione ogni anno e lasciando la popolazione naive nei confronti di eventuali virus pandemici altamente patogeni (Hutchinson et al., 2009).

Scopo principale di questo progetto di dottorato è stato quello di sviluppare una strategia antivirale innovativa basata sul delivery di piccoli RNA in grado di interferire con sequenze altamente conservate presenti all'estremità 5' dei segmenti genomici virali codificanti le subunità acida e basiche di tipo 1 e 2 della polimerasi. Tali sequenze, in precedenti studi, erano state viste essere fondamentali per il meccanismo di replicazione virale e probabilmente legate al meccanismo di packaging virale (Marsh GA, et al., 2008). In questo lavoro di tesi sono stati sviluppati una serie di vettori lentivirali per l'espressione in opportune cellule eucariotiche sia di RNA antisenso sia di miRNA in grado di interferire con tali regioni del genoma virale

In particolare, sono stati selezionati due vettori lentivirali ideali per il nostro scopo, ovvero il pLentilox 3.7 GFP che può efficientemente esprimere RNA antisenso e il pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR che è ottimizzato per i miRNA.

Il sistema che sfrutta l'RNA antisenso va ad interferire a livello nucleare con l'RNA del messaggero e a livello dell'intermedio di replicazione rappresentato dall'RNA virale complementare, essendo gli oligonucleotidi di partenza disegnati per esprimere piccoli RNA con sequenza uguale a quella dell'RNA genomico (che è appunto complementare ai due RNA suddetti). Al tempo stesso l'RNA antisenso potrebbe competere direttamente con i segmenti genomici durante la fase di incorporazione degli stessi nella particella virale nascente.

Il sistema che sfrutta i miRNA, disegnati per essere specifici per sequenze dell'RNA genomico dovrebbe, per contro, agire esclusivamente a livello citoplasmatico, andando ad interferire con l'incorporazione degli otto segmenti e, dunque, con la fase di packaging del genoma virale durante la gemmazione.

La scelta di utilizzare due sistemi diversi con differente meccanismo d'azione è stata effettuata proprio per ottenere informazioni su quali fasi del ciclo virale siano migliori bersagli per l'attività di piccoli RNA diretti verso le sequenze altamente conservate presenti al 5' dei 3 segmenti genomici selezionati in questo lavoro di tesi (PA, PB1, PB2). Inoltre, nel caso in cui tale fase si fosse dimostrata essere il packaging dei segmenti genomici nelle particelle gemmanti, poiché tale fase del ciclo replicativo virale è ad oggi ancora poco compresa (Hutchinson EC. Et al., 2009), ulteriore scopo della tesi era mettere a punto un sistema efficiente per interferire con questo step della replicazione del virus dell'influenza da utilizzare in studi atti a chiarire questo aspetto.

Metodiche che sfruttano oligonucleotidi come possibili antivirali sono già state utilizzate in passato da altri gruppi di ricerca (Mescalchin A. et al., 2011) per vari patogeni a livello respiratorio (DeVincenzo JP. et al., 2012), ma anche, e soprattutto, per il virus influenzale (Wong JP. et al., 2010).

Molti gruppi di ricerca si sono concentrati sulle sub unità che costituiscono la polimerasi virale. Infatti, agendo sui segmenti genomici che codificano tali subunità si potrebbe, in linea teorica, andare ad interferire proprio con la fase di packaging (Gavazzi et al., 2013). Tali lavori, nel complesso, confermano che i segmenti genomici codificanti PA, PB1 e PB2, ed in particolare gli ultimi due, sono bersagli molecolari molto promettenti per lo sviluppo di strategie terapeutiche innovative (Wanyi Li. et al., 2011).

Infatti, è chiaro che a livello di questi segmenti genomici possono essere identificate delle sequenze altamente conservate non è solo nei sottotipi di virus influenzale che interessano l'uomo, ma a livello di tutti i virus dell'influenza di tipo A. E' quindi possibile sviluppare, come dimostrano anche i dati da noi raccolti, un approccio antivirale ad ampio spettro ed universale nei confronti dei virus dell'influenza di tipo A. Essendo questi i virus causa di pandemie, la strategia messa a punto, opportunamente ottimizzata, potrebbe, quindi, rappresentare un'arma efficace nel caso di comparsa improvvisa di virus influenzali pandemici altamente patogeni per i quali non siano state ancora messe a punto strategie preventive e/o terapeutiche più tradizionali efficaci, che sono causa di pandemie. Di nota, ma molto importante da sottolineare, i livelli di inibizione ottenuti negli esperimenti di challenge riportati in questa tesi sono paragonabili a quelli ottenuti con i farmaci attualmente in commercio, Zanamivir ed Oseltamivir (H.-L. Yen et al., 2014). Ovviamente, uno dei nostri obiettivi è quello di ottimizzare l'efficacia dei vettori lentivirali sviluppati. Da questo punto di vista, già in questa tesi di dottorato, abbiamo lavorato per migliorare l'efficienza di trasduzione delle particelle ricombinanti nei confronti delle cellule

bersaglio selezionate, le cellule A549. Tali cellule rappresentano un ottimo modello per gli studi *in vitro* relativi al virus influenzale. Infatti, oltre ad essere di origine umana, derivano da una sede anatomica che è correlata all'infezione virale. Tale scelta ha comportato ovviamente una serie di difficoltà legate al fatto che i virus a disposizione erano stati inizialmente isolati e propagati su cellule canine MDCK. Quindi, prima di procedere con gli esperimenti tutti i virus di origine umana sono stati rititolati su cellule A549 per determinare con precisione il titolo virale e al fine di utilizzare la stessa molteplicità di infezione indipendentemente dal virus utilizzato. Inoltre, quando si è passati ad utilizzare i virus aviari non poche sono state le difficoltà iniziali per ottenere stock virali con dei titoli validi su A549.

L'efficienza di trasduzione delle particelle lentivirali ricombinanti è stata valutata mediante analisi al FACS, sfruttando la presenza del gene EGFP nei due vettori utilizzati per tale studio.

Le particelle lentivirali ricombinanti basate sul vettore pLentilox 3.7 GFP hanno garantito da subito valori di cellule EGFP positive intorno al 90%, utilizzando lo stock non diluito e in presenza di polibrene.

Al contrario, nel caso di pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR anche se sono stati saggiati diversi protocolli di trasduzione non si è mai raggiunto valori di cellule EGFP positive superiori al 70%. Questi valori non sono stati considerati da noi accettabili. Infatti, volendo valutare parallelamente l'efficacia dei due sistemi di vettori sviluppati avevamo bisogno di ottenere un'efficienza di trasduzione paragonabile per poi analizzare eventuali altri fattori influenzanti l'effetto antivirale ottenuto. Per tale motivo, nel caso delle particelle lentivirali basate sul vettore pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR, abbiamo sfruttato la presenza del gene per la resistenza alla blasticidina presente nel costrutto. Ovviamente, tale procedura ha richiesto un settaggio iniziale delle quantità di antibiotico da utilizzare che varia molto a seconda della linea cellulare in uso. Di conseguenza, per ottenere una popolazione cellulare che desse valori in percentuale di EGFP intorno al 90-100%, abbiamo dovuto mantenere tali cellule in selezione con l'antibiotico per circa 25 giorni.

Messo a punto il protocollo di traduzione, siamo passati alle prove per valutare l'effetto sul titolo virale in cellule A549 precedentemente trasdotte con particelle lentivirali sviluppate. I dati ottenuti dimostrano che entrambi i sistemi sono efficaci nei confronti dei virus dell'influenza A di origine umana testati, in particolare quando il bersaglio è rappresentato dai segmenti genomici che codificano le subunità basiche della polimerasi. Molto interessante è stato notare che l'inibizione sulla replicazione si esplica a vari tempi dopo la trasduzione, ovvero dopo 24, 48, 72 e 96 ore, dimostrando che i piccoli RNA interferenti continuano ad essere espressi una volta che il

DNA del vettore è integrato nel genoma cellulare. Questo aspetto è importante in quanto, in precedenti approcci presenti in letteratura, uno dei principali limiti di questa strategia basata su RNA interferente era rappresentato dall'efficienza limitata degli oligonucleotidi sviluppati, inferiore alle 24 ore (Giannecchini et al., 2011). Inoltre, siamo stati in grado di dimostrare che la nostra strategia è attiva anche contro i virus dell'influenza aviaria, come mostrato nel caso di H7N7, H9 e H10N7. In particolare, i risultati ottenuti sono simili in termini di inibizione a quelli raggiunti con i virus di origine umana. Tuttavia, è interessante notare che l'inibizione più significativa si è ottenuta quando il segmento genomico PA è stato impiegato come bersaglio, cosa che non si era osservata nel caso dei virus a tropismo umano. La tabella 5.1 e la tabella 5.2 riassumono tutti i risultati sopra descritti e permettono di confrontare l'efficacia dei due approcci sviluppati per l'espressione dei piccoli-RNA.

Viruses PB2		PA	PB1
Viral Titer Reduction (log TCID₅₀/ml)			
H1N1A/PR/8/34 H1N1	-0,4	-1,2	-0,9
A/Trieste/30/09 H1N1 (seasonal)	-3	-1,5	-3,3
A/Parma/1720/09 H1N1 (pandemic)	-1,2	-1	-1,4
A/Firenze/6/2012 H3N2 (seasonal)	-0,4	-1,1	-1,2
A/Mallard/Italy/Unibo/23/06 H7N7	-0,5	-2,5	-2,5
A/Mallard/Italy/Unibo/435/06 H10N7	-1	-1,1	-1,7
A/Mallard/Italy/Unibo/433/09 H9	-0,7	-1,2	-1,3

Tabella 5.1: La tabella mostra le medie complessive dei valori delle riduzioni del titolo virale, espressi in scala logaritmica e ottenuti con i virus di tipo A, a tropismo umano ed aviario testati, con le particelle lentivirali ricombinanti esprimenti gli RNA antisenso.

Viruses PB2	PA		PB1
Viral Titer Reduction (log TCID₅₀/ml)			
H1N1A/PR/8/34 H1N1	-1,2	-2,4	-2,3
A/Trieste/30/09 H1N1 (seasonal)	-1,8	-1,6	-2,85
A/Parma/1720/09 H1N1 (pandemic)	-0,3	-1,1	-1,2
A/Firenze/6/2012 H3N2 (seasonal)	-0,3	-1	-1
A/Mallard/Italy/Unibo/23/06 H7N7	-2,5	-2,5	-2,25
A/Mallard/Italy/Unibo/435/06 H10N7	-1,1	-1,7	-1,3
A/Mallard/Italy/Unibo/433/09 H9	-1,2	-0,7	-1,5

Tabella 5.2: La tabella mostra le medie complessive dei valori delle riduzioni del titolo virale espressi in scala logaritmica e ottenuti con i virus di tipo A, a tropismo umano ed aviario testati, con le particelle lentivirali ricombinanti esprimenti i miRNA.

Nel complesso, i due sistemi lentivirali portano ad una riduzione di almeno 1 logaritmo nel titolo virale, con effetti inibitori simili soprattutto per quanto riguarda il virus stagionale umano H1N1 A / Trieste / 30 / 2009. In generale, l'effetto maggiore si ottiene quando il bersaglio è rappresentato dai segmenti genomici che codificano le polimerasi di tipo basico, ed in particolare la polimerasi basica di tipo 2, anche se nel caso dei virus di origine aviaria l'inibizione più significativa si è ottenuta nel caso di PA. Il virus più sensibile all'approccio da noi sviluppato risulta essere il virus aviario H7N7.

Partendo dai risultati ottenuti, abbiamo voluto valutare se i due sistemi portassero allo stesso livello di espressione degli RNA interferenti. A questo scopo abbiamo messo a punto un sistema di

PCR Real Time in grado di quantificare le copie di piccoli RNA interferenti prodotte dai due sistemi nei confronti del segmento genomico codificante PB2. I dati ottenuti hanno dimostrato che i livelli di espressione di miRNA sono nettamente superiori a quelli di RNA antisenso. Considerando che i livelli di trasduzione sono paragonabili, questo risultato può essere spiegato da diversi fattori: i)diversi vettori lentivirali con diversa efficienza nell'espressione del gene terapeutico; ii)diversa stabilità dei miRNA rispetto agli RNA antisenso; iii)impatto della selezione con blasticidina anche sui livelli di espressione del RNA antivirale. Questi diversi aspetti sono attualmente in fase di valutazione. Tuttavia, è possibile concludere che, nonostante livelli di espressione nettamente inferiori, gli RNA antisenso portano ad un livello di inibizione della replicazione virale paragonabile ai miRNA. Il dato non è completamente inatteso. Infatti, come precedentemente spiegato, gli RNA antisenso hanno teoricamente 3 bersagli diversi durante replicazione virale, potendo agire a livello di mRNA virale codificante le subunità della polimerasi (essenziale per la replicazione virale), a livello di RNA complementare (essenziale per la replicazione virale) e a livello dei segmenti genomici (essenziali per l'infettività delle particelle virali nascenti). Va infatti tenuto presente che il sistema con il quale è stato valutato l'effetto antivirale dei vettori sviluppati va a saggiare il titolo nel sovrinatante delle cellule trasdotte. Quindi si evidenzia non solo un abbattimento del numero di particelle virali presenti nel mezzo di coltura (legato ad una minore replicazione virale) ma anche una diminuita infettività della progenie virale (legato ad un'incorporazione deficitaria di segmenti genomici). Questo esperimento ci porta quindi a concludere che i)il sistema RNA antisenso è probabilmente il sistema da ottimizzare per migliorare l'efficacia antivirale della strategia sviluppata; ii)che l'interferenza a livello segmenti genomici nel citoplasma (quindi nelle fasi finali della replicazione virale) dà conto, almeno in parte, dell'effetto antivirale dei piccoli RNA sviluppati, come dimostrato dall'effetto ottenuto con i miRNA. Tuttavia, i dati ottenuti con gli RNA antisenso sembrerebbero indicare che anche l'interferenza con mRNA e RNA complementare potrebbero avere un impatto. È interessante notare che il sistema di incorporazione dei segmenti genomici nelle particelle virali è ad oggi poco chiaro. I tre segmenti che abbiamo preso in considerazione in questo lavoro di tesi sembrano svolgere un ruolo anche nell'incorporazione degli altri segmenti, grazie ad interazioni RNA/RNA (Gavazzi C. et al., 2013). Quindi sia che i piccoli RNA influenzino la stabilità dei segmenti genomici bersagli, sia che ne impediscano fisicamente l'incorporazione, questo meccanismo potrebbe portare a particelle virali non infettive. A tale proposito, dati preliminari ottenuti valutando i livelli del segmento codificante PB2 in cellule trasdotte con le opportune particelle ricombinanti hanno evidenziato che entrambi i sistemi

portano ad una riduzione significativa di tali livelli nelle A549 trasdotte. Valutazioni simili sono in corso per PA e PB1. Inoltre, stiamo esaminando, attraverso PCR Real Time e PCR su gel sviluppate *ad hoc*, i livelli di specifici segmenti genomici a livello delle particelle virali neoformata e purificate. Questi esperimenti dovrebbero ulteriormente chiarire il meccanismo d'azione dei nostri RNA interferenti e potrebbero fornire importanti informazioni sull'impatto dei 3 segmenti genomici oggetto di questa tesi di dottorato sull'incorporazione degli altri. Significativamente, abbiamo dimostrato che la combinazione di particelle ricombinanti esprimenti miRNA/RNA antisense dirette verso bersagli diversi non aumentano significativamente l'effetto antivirale, con l'unica eccezione della combinazione pLenti6/V5-GW/EmGFP-miR PB1 + pLentilox 3.7 GFP PB2. Tuttavia, questi risultati devono essere ulteriormente convalidati.

A supporto della specificità della strategia che abbiamo sviluppato per virus a potenziale impatto pandemico, abbiamo dimostrato che i due sistemi lentivirali sono attivi solamente nei confronti dei virus influenzali di tipo A, e non nei confronti dei virus influenzali di tipo B, che presentano differenze significative a livello delle sequenze target identificate nel genoma virale. A supporto ulteriore della conclusione che i sistemi sviluppati agiscono specificamente attraverso un'interferenza con le sequenze bersaglio selezionato e non determinano un effetto inibitorio random, sono i dati ottenuti valutando l'impatto di 5 mutazioni inserite ad hoc a livello delle sequenze target dei piccoli RNA. A tal fine, abbiamo impiegato 2 virus influenzali A ricombinanti ottenuti mediante sistemi di genetica inversa, in collaborazione con il gruppo del Professor Paul Digard (Università di Edimburgo), recanti tali mutazioni silenti a livello del genoma virale. Tali virus ricombinanti si sono dimostrati resistenti sia all'effetto degli RNA antisense, sia verso i miRNA. Infine, per valutare se l'azione antivirale esplicita dai nostri piccoli RNA fosse effettivamente paragonabile a quella osservata, ma non chiaramente caratterizzata dal punto di vista meccanicistico, con analoghi oligonucleotidi direttamente trasfettati nelle cellule (Giannecchini et al., 2009, 2011), abbiamo anche valutato l'effetto inibitorio esplicito dai vettori lentivirali sviluppati nei confronti di un ulteriore pannello di mutanti virali che nei lavori precedenti era stato selezionato dal trattamento con gli oligonucleotidi (Giannecchini et al., 2011). I dati ottenuti hanno dimostrato che tutti i cloni mutati risultano resistenti anche nei confronti dei piccoli RNA sviluppati. Questo dato conferma che trasferendo gli RNA terapeutici nella cellula attraverso i vettori lentivirali abbiamo riprodotto e migliorato il sistema precedentemente sviluppato da Giannecchini e collaboratori (Giannecchini et al., 2011), generando molecole che funzionano attraverso un meccanismo simile agli oligonucleotidi direttamente trasfettati nelle cellule. Non

dobbiamo dimenticare, tuttavia, che, allo stato attuale, non abbiamo dati che indichino se le stesse mutazioni testate negli esperimenti condotti possano essere selezionate in vitro dai vettori lentivirali generati. Questo aspetto non è trascurabile perché se dimostrassimo che tali mutanti non vengono selezionati avremmo migliorato ulteriormente l'approccio antivirale. Avendo dimostrato che è possibile seguire la replicazione virale over-time in cellule trasdotte con le particelle ricombinanti, esperimenti sono attualmente in corso disegnati proprio allo scopo di evidenziare l'insorgenza di eventuali mutanti virali (aviari e umani) nelle cellule A549.

Concludendo, l'approccio che si è sviluppato basato sugli RNA con il trasporto e l'integrazione a livello cellulare dei vettori lentivirali, sembra essere particolarmente efficace a livello dei segmenti delle polimerasi basiche di tipo 1 ed in particolare di tipo 2, suggerendo il loro ruolo centrale nel ciclo replicativo virale. Sarà importante chiarire il meccanismo di azione dei vari piccoli RNA, in particolare di discriminare tra una inibizione della replicazione del genoma / o a livello di trascrizione e/o a livello del packaging. In ogni caso, i nostri risultati suggeriscono che questa strategia basata su piccoli RNA è in grado di fornire protezione ad ampio spettro alle cellule A549 nei confronti dei virus dell'influenza di tipo A e come possa essere ulteriormente ottimizzata per lo sviluppo di una strategia terapeutica da utilizzare ad esempio all'insorgenza di un nuovo ceppo pandemico per l'uomo o di nuovi virus aviari particolarmente aggressivi. Inoltre, abbiamo generato un tool interessante per chiarire aspetti del ciclo replicativo virale, in particolare il packaging, e il coinvolgimento negli stessi di specifiche sequenze genomiche che troveranno applicazione in studi di base e nel design e ottimizzazione di approcci preventivi e terapeutici.

6. BIBLIOGRAFIA

Abed Y., Goyette N., Boivin G. A reverse genetics study of resistance to neuraminidase inhibitors in an influenza A/H1N1 virus. *Antivir Ther*, 2004, 9: 577-81.

Alexander D.J. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiology*, 2000, 74: 3-13.

Arias CF, Escalera-Zamudio M, Soto-Del Río Mde L, Cobián-Güemes AG, Isa P, López S. Molecular anatomy of 2009 influenza virus A (H1N1). *Arch Med Res*. 2009 Nov;40(8):643-54. doi: 10.1016/j.arcmed.2009.10.007. Review.

Banks J., Speidel E.S., Moore E., Plowright L., Piccirillo A., Capua I., Cordioli P., Fioretti A., Alexander D.J. Changes in the hemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. *Arch Virol*, 2001, 146: 963-73.

Bartel DP. 2004. MicroRNA: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell*, Vol 116, pp. 281-297

Baum L.G., Paulson J.C. Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. *Acta Histochem XL Suppl*, 1990, 40: 35-8.

Blaas D., Patzet E., Kuechler E. Cap – recognizing protein of influenza virus. *Virology*, 1982, 116:339–48.

Block J., Air G.M. Variation in the membrane-insertion and stalk sequences in eight subtypes of influenza type A virus neuraminidase. *Biochemistry*, 1982, 21: 4001-07.

Braam J., Ulmanen I., Krug R.M. Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell*, 1983, 34: 609-18.

Briedis D.J., Lamb R.A., Choppin P.W. Influenza B virus RNA segment 8 codes for two nonstructural proteins. *Virology*, 1981, 112: 417-25.

Briedis D.J., Lamb R.A. Influenza B virus genome: sequences and structural of RNA segment 8 and the mRNAs the NS1 and NS2 proteins. *Virology*, 1982, 42: 186-93.

Bullough P.A., Hughson F.M., Skehel J.J., Wiley D.C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. *Nature (London)*, 1994, 371: 37-43.

Buonagurio D.A., Nakada S., Desselberger U., Krystal M., Palese P. Noncumulative sequence changes in the hemagglutinin genes of the influenza C virus isolates. *Virology*, 1985, 146: 221-32.

Capobianchi M.R. Orthomixovirus. In *Manuale di Virologia Medica*. Dianzani F., Antonelli G., Capobianchi M. R., Dolei., McGraw-Hill.(ed.), 2001, 2nd ed, p.104-105..

Castrucci M.R., Kawaoka Y. Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol*, 1993, 67: 759-64.

Chauhan N, Narang J, Pundir S, Singh S, Pundir CS. Department of Biochemistry, M. D. University , Rohtak, Haryana , India. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2012 Nov 12. Laboratory diagnosis of swine flu: a review.

Cheung C.Y., Poon L.L., Lau A.S., Luk W., Lau Y.L., Shortridge K.F., Gordon S., Guan Y., Peiris J.S. Induction of proinflammatory cytokines in the human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *The Lancet*, 2002, 360: 1831-7.

Claas E.J., Osterhaus A.E., Van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne D.A., Krauss S., Shortridge K.F., Webster R.G. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. *The Lancet*, 1998, 351: 472-77.

Colman P., Hoyne P.A., Lawrence M.C. Sequence and structure alignment of paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase with influenza virus neuraminidase. *J Virol*, 1993, 67: 2972-80.

Compans R.W., Choppin P.W. Reproduction of myxoviruses. In: Fraenkel-Conrat H, Wagner RR, ed. *Comprehensive virology*. New York: Plenum Press: 1975, vol IV: 179-252.

Couceiro J.N., Paulson J.C., Baum L.G. Influenza virus strains selectively recognize sialyloigosaccharides on human respiratory epithelium: the role of the host cell in selection of hemagglutinin receptor specificity. *Virus Res*, 1993, 29: 155-65.

Cox NJ, Subbarao K (2000) Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med* 51:407–421A).

Cullen BR. 2005. RNAi the natural way. *Nat Med*, Vol 37, pp. 1163-1165

DeVincenzo JP. The promise, pitfalls and progress of RNA-interference-based antiviral therapy for respiratory viruses. *Antivir Ther.* 2012;17(1 Pt B):213-25. doi: 10.3851/IMP2064. Epub 2012 Feb 3.

Deshpande K.L., Fried V.A., Ando M., Webster R.G. Glycosilation affects cleavage of an H5N2 influenza hemagglutinin and regulates virulence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987, 84: 36-40.

Dos Santos A.E., Escriou N., Leclercq I., van der Werf S., Naffakh N. The generation of recombinant influenza A viruses expressing a PB2 fusion protein requires the conservation of a packaging signal overlapping the coding and noncoding regions at the 5' end of the PB2 segment. *Virology*, 2005, 341: 34-36.

Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L.
1998. A third generation lentivirus vector with a conditional packaging system.
J Virol, Vol 72, pp. 8463-8471 11

Els M.C., Air G.M., Murti K.G., Webster R.G., Lavel W.G. An 18-amino acid deletion in an influenza neuraminidase. *Virology*, 1985, 142: 241-7.

Enami M., Sharma G., Benham C., Palese P. An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology*, 1991, 185: 291-98.

Fereidouni S, Kwasnitschka L, Balkema Buschmann A, Müller T, Freuling C, Schatz J, Pikula J, Bandouchova H, Hoffmann R, Ohlendorf B, Kerth G, Tong S, Donis R, Beer M, Harder T. No Virological Evidence for an Influenza A - like Virus in European Bats.

Fouchier R.A., Schneeberger P.M., Rozendaal F.W., Broekman J.M., Kemink S.A., Munster V., Kuiken T., Rimmelzwaan G.F., Schutten M., Van Doornum G.J., Koch G., Bosman A., Koopmans M., Osterhaus A.D. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 1356-61.

Fouchier R.A., Munster V., Wallensten A., Bestebroer T.M., Herst S., Smith D., Rimmelzwaan G.F., Olsen B., Osterhaus A.D. Characterization of a novel influenza A virus Hemagglutinin subtype (H16) obtain from black-headed gulls. *J Virol*, 2005, 79: 2814-22.

Fournier E, Moules V, Essere B, Paillart JC, Sirbat JD, Isel C, Cavalier A, Rolland JP, Thomas D, Lina B, Marquet R. A supramolecular assembly formed by influenza A virus genomic RNA segments. *Nucleic Acids Res.* 2012 Mar;40(5):2197-209. Epub 2011 Nov 10.

Fujii Y., Goto H., Watanabe T., Yoshida T., Kawaoka Y. Selective incorporation of influenza virus RNA segment into virions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 2002-07.

Gamblin S.J., Haire L.F., Russell R.J., Stevens D.J., Xiao B., Ha Y., Vasisht N., Steinhauer D.A., Daniels R.S., Elliot A., Wiley D.C., Skehel J.J. The structure and receptor-binding properties of the 1918 influenza hemagglutinin. *Science*, 2004, 303: 1838-42.

Gambaryan A.S., Matrosovich M.N. Solid-phase enzyme-linked assay for influenza virus receptor-binding activity. *J Virol Methods*, 1992, 39: 111-23.

Gambaryan A., Webster R., Matrosovich M. Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and chicken. *Arch Virol*, 2002, 147: 1197-1208.

Gambaryan A., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Yamnikova S.S., Lvov D.K., Webster R.G., Matrosovich M.N. Differences between influenza virus receptors on target cells of duck and receptor specificity of the 1997 H5N1 chicken and human influenza viruses from Hong Kong. *Avian Diseases*, 2003, 47: 1154-60.

Garten W., Klenk H.D. Characterization of the carboxypeptidase involved in the proteolytic cleavage of the hemagglutinin. *J Gen Virol*, 1983, 64: 2127-37.

Garten W., Klenk H.D. Understanding influenza virus pathogenicity. *Trends Microbiol*, 1999, 7:99-100.

Gavazzi C, Yver M, Isel C, Smyth RP, Rosa-Calatrava M, Lina B, Moulès V, Marquet R
A functional sequence-specific interaction between influenza A virus genomic RNA segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Oct 8;110(41):16604-9. doi: 10.1073/pnas.1314419110. Epub 2013 Sep 25.

Geiss G.K., Salvatore M., Tumpey T.M., Carter V.S., Wang X., Basler C.F., Taubenberger J.K., Bumgarner R.E., Palese P., Katze M.G., García-Sastre A. Cellular transcriptional profiling in influenza A virus-infected lung epithelial cells: the role of the non-structural NS1 protein in the evasion of the host innate defence and its potential contribution to pandemic influenza. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 10736-41.

Giannecchini S, Wise HM, Digard P, Clausi V, Del Poggetto E, Vesco L, Puzelli S, Donatelli I, Azzi A.
Packaging signals in the 5'-ends of influenza virus PA, PB1, and PB2 genes as potential targets to develop nucleic-acid based antiviral molecules.
Antiviral Res. 2011 Oct;92(1):64-72. Epub 2011 Jun 29.

Goto H., Kawaoka Y. A novel mechanism for acquisition of virulence by a human influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 10224-228.

Gottschalk A. The specific enzyme of influenza virus and *Vibrio cholerae*. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 23: 645- 6.

Harris A., Cardone G., Winkler D.C., Heymann J.B., Brecher M., White J.M., Steven A.C. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci*, 2006, 103: 19123-7.

Hatta M., Gao P., Halfmann P., Kawaoka Y. Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science*, 2001, 293: 1840-2.

Herrler G., Compans R.W., Meier-Ewert H. A precursor glycoprotein in influenza C virus. *Virology*, 1979, 99: 49-56.

Hilleman M.R. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*, 2002, 20: 3068-87.

Hirst G.K. Agglutination of red cell by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science*, 1941, 94: 22-23.

Hoffmann E., Stech J., Guan Y., Webster R.G., Perez D.R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A virus. *Arch Virol*, 2001, 183: 217-222.

Horimoto T., Kawaoka Y. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol*, 1994, 68: 3120-28.

Horimoto T., Kawaoka Y. Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 2001, 14: 129-49.

Horisberger M. A. The large P protein of influenza A viruses are composed of one acidic and two basic polypeptides. *Virology*, 1980, 107: 302-05.

Hutchinson EC, von Kirchbach JC, Gog JR, Digard P. Genome packaging in influenza A virus. *J Gen Virol.* 2010 Feb;91(Pt 2):313-28. doi: 10.1099/vir.0.017608-0. Epub 2009 Dec 2. Review.

Hutchinson EC, Wise HM, Kudryavtseva K, Curran MD, Digard P. Characterisation of influenza A viruses with mutations in segment 5 packaging signals. *Vaccine.* 2009 Oct 23;27(45):6270-5. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.05.053

Hulse D.J., Webster R.G., Russel R.J., Perez D.R. Molecular determination within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. *J Virol*, 2004, 78: 9954-64.

Inglis S.C., Lamb R.A., Carroll A.R., Mahy B.W.J. Polypeptides specified by the influenza virus genome. I. Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. *Virology*, 1976, 74: 489-503.

Ito T., Suzuki Y., Takada A., Kawamoto A., Otsuki K., Masuada H., Suzuki T., Kida K., Kawaoka Y. Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantois influence human influenza virus receptor specificity and variant selection. *J Virol*, 1997, 71: 3357-62.

Jadhao SJ, Achenbach J, Swayne DE, Donis R, Cox N, Matsuoka Y. Development of Eurasian H7N7/PR8 high growth reassortant virus for clinical evaluation as an inactivated pandemic influenza vaccine. *Nucleic Acids Res.* 2012 Mar;40(5):2197-209. doi: 10.1093/nar/gkr985. Epub 2011 Nov 10.

Jin H., Leser G.P., Zhang J., Lamb R.A. Influenza virus hemagglutinin and neuraminidase cytoplasmic tails control particle shape. *EMBO J*, 1997, 16: 1236-47.

Joanne M Langley, Louise Frenette, Laurence Chu, Shelly McNeil, Scott Halperin, Ping Li, David Vaughn A randomized, controlled non-inferiority trial comparing A(H1N1)pmd09 vaccine antigen, with and without AS03 adjuvant system, co-administered or sequentially administered with an

inactivated trivalent seasonal **influenza** vaccine BMC Infect Dis. 2012; 12: 279. Published online 2012 October 30. doi: 10.1186/1471-2334-12-279

Wong JP, Christopher ME, Salazar AM, Sun LQ, Viswanathan S, Wang M, Saravolac EG, Cairns MJ. Broad-spectrum and virus-specific nucleic acid-based antivirals against influenza. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2010 Jan 1;2:791-800. Review.

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. 2001. Viral vector for gene therapy: the art of turning infectious agent into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, Vol 116, pp. 33-40

Kawaoka Y., Krauss S., Webster R.G. Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol*, 1989, 63: 4603-08.

Kawaoka Y., Cox N., Haller O. Orthomyxoviridae. In: Fauquet C., Mayo M.A., Maniloff J., eds *Virus Taxonomy: VIIIth Report of International Committee on Taxonomy of Viruses*. London: Elsevier Academic Press, 2005: 681-693.

Klenk H.D., Rott R., Orlich M., Blodorn J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology*, 1975, 68: 426-39.

Kobasa D., Takada A., Shinya K., Hatta M., Halfmann P., Theriault S., Suzuki H., Nishimura H., Mitamura K., Sugaya N., Usui T., Murata T., Maeda Y., Watanabe S., Suresh M., Suzuki T., Suzuki Y., Feldmann H., Kawaoka Y. Enhanced virulence of influenza A viruses with the haemagglutinin of the 1918 pandemic virus. *Nature*, 2004, 431: 703-7.

Kogure T., Suzuki T., Takahashi T., Miyamoto D., Hidari K., Chao-Tan Guo, Ito T., Kawaoka Y., Suzuki Y. Human trachea primary epithelial cells express both sialy(α 2-3)Gal receptor for human parainfluenza virus type 1 and avian influenza viruses, and sialy(α 2-6)Gal receptor for human influenza viruses. *Glycoconj J*, 2006, 23: 101-6.

Krug R.M., Etkind P.R. Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus–infected MDCK cells. *Virology*, 1973, 56: 334–48.

Krug R.M., Alonso-Caplen F.V., Julkunen I., Katze M.G. Expression and replication on the influenza virus genome. In Krug RM, *The influenza viruses*, 1989: 89-152.

Lamb R.A., Krug R.M. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication, *In* B.N. Fields, D.M. Knipe, and P.M. Howley (ed.), *Fields Virology*, 1996, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa, pp. 1353-1395.

Lazarowitz S.G., Compans R.W., Choppin P.W. Influenza virus structural and nonstructural proteins in infected cells and their plasma membranes. *Virology*, 1971, 46: 830-43.

Le TH, Nguyen NT. Evolutionary dynamics of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 HA clades and vaccine implementation in Vietnam. *Clin Exp Vaccine Res.* 2014 Jul;3(2):117-27. doi: 10.7774/cevr.2014.3.2.117. Epub 2014 Jun 20.

Lipatov A.S., Govorkova E.A., Webby R.J., Ozaki H., Peiris M., Guan Y., Poon L., Webster R.G. Influenza: emergence and control. *Virology*, 2004, 78: 8951-59.

Liu M., He S., Walker D., Zhou N., Perez D.R., Mo B., Li F., Huang X., Webster R.G., Webby R.J. The influenza virus gene pool in a poultry market in South central China. *Virology*, 2003, 305: 267-75.

Loregian A, Mercorelli B, Nannetti G, Compagnin C, Palù G. Antiviral strategies against influenza virus: towards new therapeutic approaches. *Cell Mol Life Sci.* 2014 Oct;71(19):3659-83. doi: 10.1007/s00018-014-1615-2. Epub 2014 Apr 4. Review.

Luo G., Chung J., Palese P. Alterations of the stalk of the influenza virus neuraminidase: deletions and insertions. *Virus Res*, 1993, 29: 141-53.

Marsh GA, Rabadán R, Levine AJ, Palese P. Highly conserved regions of influenza A virus polymerase gene segments are critical for efficient viral RNA packaging. *J Virol.* 2008 Mar;82(5):2295-304. Epub 2007 Dec 19.

Matrosovich M., Tuzilov A., Bovin N., Gambaryan A., Klimov A., Castrucci M.R., Donatelli I., Kawaoka Y. Early alterations of the receptor-binding properties of H1,H2 and H3 avian influenza virus hemagglutinins after their introduction into mammals. *J Virol*, 2000, 74: 8502-12.

Matrosovich M.N., Krauss S., Webster R.G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. *Virology*, 2001, 281: 156-62.

Matrosovich M., Suzuki T., Hirabayashi Y., Garten W., Webster R., Klenk H.D. Gangliosides are not essential for influenza virus infection. *Glycoconj J*, 2006, 23: 107-13.

Medina RA, García-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol.* 2011 Jul 11;9(8):590-603. doi: 10.1038/nrmicro2613. Review.

Mescalchin A. and Tobias Restle *Oligomeric Nucleic Acids as Antivirals *Molecules* 2011, 16, 1271-1296; doi:10.3390/molecules16021271

Mitnaul L.J., Matrosovich M.N., Castrucci M.R., Tuzikov A.B., Bovin N.V., Kobasa D., Kawaoka Y. Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol*, 2000, 74: 6015-20.

Muratore G, Goracci L, Mercorelli B, Foeglein Á, Digard P, Cruciani G, Palù G, Loregian A. Small molecule inhibitors of influenza A and B viruses that act by disrupting subunit interactions of the viral polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012 Apr 17;109(16):6247-52. doi: 10.1073/pnas.1119817109. Epub 2012 Apr 2.

Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., Horimoto, T., Kida, H., Kawaoka, Y., 2006. Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *J. Virol.* 80, 2318–2325.

Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., Suzuki Y., Tateno Y., Nakajima K. Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology*, 1991, 182: 475-85.

Nakajima K., Desselberger U., Palese P. Recent human influenza A (H1N1) viruses are closely related genetically to strains isolated in 1950. *Nature (London)*, 1978, 274: 334-9.

Neumann G., Brownlee G.G., Fodor E., Kawaoka Y. Orthomyxovirus replication, transcription and polyadenylation. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2004, 283: 121-43.

Neumann G., Kawaoka Y. Host range restriction and pathogenicity in the context of Influenza pandemic, *EID*, 2006, 12: 4232-8.

Nicholls J.M., Chan M.C., Chan W.Y., Wong H.K., Cheung C.Y., Kwong D.L., Wong M.P., Chui W.H., Poon L.L., Tsao S.W., Guan Y, Peiris J.S. Tropism of avian influenza A (H5N1) in the upper and lower respiratory tract. *Nat Med*, 2007, 13: 147-9.

Nicholson K.G., Wood J.M., Zambon M.C. Influenza. *The Lancet*, 2003, 362: 1733-45.

Noda T., Sagara H., Yen A., Takada A., Kida H., Cheng R.H., Kawaoka Y. Architecture of ribonucleoprotein complexes in influenza A virus particles. *Nature*, 2006, 439: 490-2.

Okomo-Adhiambo M, Fry AM, Su S, Nguyen HT, Elal AA, Negron E, Hand J, Garten RJ, Barnes J, Xiyang X, Villanueva JM, Gubareva LV, Oseltamivir-Resistant Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses, United States, 2013-14.; 2013–14 US Influenza Antiviral Working Group. (*Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):136-41. doi: 10.3201/eid2101.141006.

O'Neill R.E., Talon J., Palese P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J*, 1998, 17: 288-96.

Qinshan Gao, Yi-Ying Chou, Sultan Doğanay, Reza Vafabakhsh, Taekjip Ha, Peter PaleseThe Influenza A Virus PB2, PA, NP, and M Segments Play a Pivotal Role during Genome Packaging *J Virol*. 2012 July; 86(13): 7043–7051. doi: 10.1128/JVI.00662-12

Perez D.R., Lim W., Seiler J.P., Yi. G., Peiris M., Shortridge K.F., Webster R.G. Role of quail in the interspecies transmission of H9 influenza A viruses: molecular change on HA that correspond to adaption from ducks to chickens. *Virology*, 2003, 77: 3148-56.

Puthavathana P., Auewarakul P., Charoenying P.C., Sangsiriwut K., Pooruk P., Boonnak K., Khanyok R., Thawachsupa P., Kijphati R., Sawanpanyalert P. Molecular characterization of the complete genome of influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J Gen Virol*, 2005, 86: 423-33.

Richardson J.C., Akkina R.K. NS2 protein of influenza virus is found in purified virus and phosphorylated in infected cells. *Arch Virol*, 1991, 116: 69-80.

Rogers G.N., Paulson J.C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*, 1983, 127: 361-73.

Rogers O.N., Paulson J.C., Daniels R.S., Skehel J.J., Wilson I.A., Wiley D.C. Single aminoacid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature*, 1983, 304: 76-8.

Rossmann JS, Jing X, Leser GP, Lamb RA. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*. 2010 Sep 17;142(6):902-13. doi: 10.1016/j.cell.2010.08.029

Rott R., Klenk H.D., Nagai Y., Tashiro M. Influenza viruses, cell enzymes, and pathogenicity. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 152: S16-S19.

Russell R.J., Stevens D.J., Haire L.F., Gamblin S.J., Skehel J.J. Avian and human receptor binding by hemagglutinins of influenza A viruses. *Glycoconj J*, 2006, 23: 85-92.

Ryan-Poirier K., Suzuki Y., Bean W.J., Kobasa D., Takada A., Ito T., Kawaoka Y. Changes in H3 influenza A virus receptor specificity during replication in humans. *Virus Res*, 1998, 56: 169-176.

Sauter N.K. Hanson J.E, Glick G.D.,Brown J.H.,Crowther R.L.,Park S.J., Skehel J.J., Wiley D.C. Binding of influenza virus hemagglutinin to analogs of its cell-surface receptor, sialic acid: analysis by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and X-ray crystallography. *Biochemistry*, 1992, 31: 9609.

Scholtissek C., Rohde W., Von Hoyningen V., Rott R. On the origin of the human influenza virus subtype H2N2 and H3N2. *Virology*, 1978, 87: 13-20.

Scholtissek C., Stech J., Krauss S., Webster R.G. Cooperation between the hemagglutinin of the avian viruses and the matrix protein of human influenza A viruses. *J Virol* , 2002, 76: 1781-6.

Seo S.H., Hoffmann E., Webster R.G. Lethal H5N1 influenza viruses escape host anti-viral cytokine responses. *Nat Med*, 2002, 8: 950-4.

Seo S.H., Hoffmann E., Webster R.G. The NS1 gene of H5N1 influenza viruses circumvents the host anti-viral cytokine responses. *Virus Res*, 2004, 103: 107-13.

Shinya K., Ebina M., Yamada S., Ono M., Kawaoka Y. Avian flu: virus receptor in the human airway. *Nature*, 2006, 440: 435-6.

Skehel J.J., Wiley D.C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: The influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 2000, 69: 531-69.

Skehel J.J. Polipeptide synthesis in influenza virus-infected cells. *Virology*, 1972, 49: 23-36.

Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P. A virus obtained from influenza patients. *The Lancet*, 1933, i:66-8.

Snyder M.H., Buckler-White A.J., London W.T., Tierney E.L., Murphy B.R. The avian influenza virus nucleoprotein gene and a specific constellation of avian and human virus polymerase genes each specify attenuation of avian/human influenza A/Pintail/79 reassortant viruses from monkeys. *J Virol*, 1987, 61: 2857-63.

Srinivasakumar N. 2001. HIV-1 vector systems. *Somat Cell Mol Gen*, Vol 26, pp. 51-81 7

Steinhauer D.A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*, 1999, 258: 1-20.

Stevens J., Blixt O., Tumpey T.M., Taubenberger J.K., Paulson J.C.M, Wilson I.A. Structure and Receptor specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 influenza virus. *Science*, 2006, 312: 404-10.

Subbarao E.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. Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science*, 1998, 279: 393-6.

Fujisaki S, Takashita E, Yokoyama M, Taniwaki T, Xu H, Kishida N, Sato H, Tashiro M, Imai M, Odagiri T. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Nov 3. pii: S0006-291X(12)02087-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.095.

Tarus B, Bertrand H, Zedda G, Di Primo C, Quideau S, Slama-Schwok A. Structure-based design of novel naproxen derivatives targeting monomeric nucleoprotein of Influenza A virus. *J Biomol Struct Dyn*. 2014 Nov 19:1-14.

Van Riel D., Munster V.J., de Wit E., Rimmelzwaan G.F., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Kuiken T. H5N1 virus attachment to lower respiratory tract. *Scienze*, 2006, 312: 399.

Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. *Viral vectors: a look back and ahead on gene transfer technology.* *New Microbiol.* 2013 Jan;36(1):1-22. Epub 2013 Jan 1.

Varghese J.N., McKimm-Breschkin J.L., Caldwell J.B., Kortt A.A., Colman P.M. The structure of the complex between Influenza virus neuraminidase and sialic acid, the viral receptor. *Proteins*, 1992, 14: 327-32.

Yu C, Yu Y, Xu Z, Li H, Yang D, Xiang M, Zuo Y, Li S, Chen Z, Yu Z. *Mol Med Rep.* 2015 Apr;11(4):2825-30. doi: 10.3892/mmr.2014.3105. Epub 2014 Dec 17. Antisense oligonucleotide targeting human telomerase mRNA increases the radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cells.

Wanyi Li, Xiaofan Yang, Yan Jiang, Baoning Wang, Yuan Yang, Zhonghua Jiang. Inhibition of influenza A virus replication by RNA interference targeted against the PB1 subunit of the RNA polymerase gene *Arch Virol* (2011)156:1979–1987 DOI 10.1007/s00705-011-1087-8

Walker J.A., Sakaguchi T., Matsuda Y., Yoshida T., Kawaoka Y. Location and character of the cellular enzyme that cleaves the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. *Virology*, 1992, 190: 278-87.

Wan H., Perez D.R. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. *Virology*, 2005, 346: 278-86.

Wan H., Perez D.R. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. *Virology*, 2006, 346: 278-86.

Webster R.G, Laver W.G. Determination of the number of nonoverlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin with monoclonal antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance. *Virology*, 1980, 104: 139-48.

Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol*, 1992, 56: 152-79.

Webster R.G., Guan Y., Peiris M., Walker D., Krauss S., Zhou N.N., Govorkova E.A., Ellis T.M., Dyrting K.C., Sit T., Perez D.R., Shortridge K.F. Characterization of H5N1 influenza viruses that continue to circulate in geese in southeastern China. *J Virol*, 2002, 76:118-26.

Wiley D.C., Wilson I.A., Skehel J.J. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza hemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature*, 1981, 289: 373-78.

Winter G., Fields S. Nucleotide sequence of human influenza A/PR/8/34 segment 2. *Nucleic Acids Res*, 1982, vol 10: 2135-43.

Zambon M.C. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob chemoter*, 1999, 44: 3-9.

Zhao G, Miao Y, Guo Y, Qiu H, Sun S, Kou Z, Yu H, Li J, Chen Y, Jiang S, Du L, Zhou Y. Hum Vaccin Immunother. 2014 Nov 1:0. [Epub ahead of print]Development of a heat-stable and orally delivered recombinant M2e-expressing *B. subtilis* spore-based influenza vaccine.Hum Vaccin Immunother. 2014 Nov 1:0. [Epub ahead of print]