



UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
DIPARTIMENTO DI MEDICINA MOLECOLARE

**SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA  
INDIRIZZO UNICO  
CICLO XXVI**

TESI DI DOTTORATO

**Studio della modulazione dell'espressione  
genica mediata dai microRNA in cellule  
infettate da citomegalovirus umano**

**Direttore della Scuola :** Ch.mo Prof. Riccardo Manganelli

**Coordinatore d'indirizzo:** Ch.mo Prof. Riccardo Manganelli

**Supervisore :** Prof.ssa Luisa Barzon

**Dottoranda:** Carlotta Albonetti

# INDICE

<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>RIASSUNTO</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>CAPITOLO 1-INTRODUZIONE</b>	<b>9</b>
1.1 IL CITOMEGALOVIRUS UMANO	10
1.1.1 Herpesviridae	10
1.1.2 Struttura di HCMV	10
1.1.3 Genoma di HCMV ed espressione dei geni virali	12
1.1.4 Ciclo replicativo di HCMV e perturbazione del ciclo cellulare	14
1.1.4.1 Tropismo e permissività cellulare	14
1.1.4.2 Adesione e ingresso nella cellula ospite	15
1.1.4.3 Sfruttamento delle vie regolatorie del ciclo cellulare da parte di HCMV	16
1.1.4.4 Assemblaggio, maturazione e fuoriuscita dei virioni	17
1.1.5 Immunità antivirale e meccanismi di evasione della risposta immunitaria	17
1.2 I MICRORNA	19
1.2.1 Biogenesi e meccanismo d'azione	20
1.3 RUOLO DEI MICRORNA NEL CORSO DELLE INFEZIONI VIRALI	22
1.3.1 I microRNA virali	22
1.3.2 Conservazione e ortologi dei miRNA virali	24
1.3.3 Ruolo dei miRNA virali nelle infezioni virali	25
1.3.4 Ruolo dei miRNA cellulari nel controllo delle infezioni virali	26

1.4	RUOLO DEI MICRORNA CELLULARI E VIRALI NELL'INFEZIONE DA HCMV	27
1.4.1	I microRNA di HCMV	27
1.4.2	Target virali dei miRNA di HCMV	29
1.4.3	Target cellulari dei miRNA di HCMV	30
	<b>CAPITOLO 2-SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>33</b>
	<b>CAPITOLO 3-MATERIALI E METODI</b>	<b>35</b>
3.1	COLTURE CELLULARI	35
3.1.1	HEK 293-A	35
3.1.2	MRC-5	35
3.1.3	THP-1	35
3.2	PLASMIDI	36
3.2.1	pmirGLO Dual Luciferase miRNA Target Expression Vector	36
3.2.2	psilencer 4.1-CMV Hygro	37
3.3	PRECURSORI SINTETICI DEI MIRNA VIRALI	37
3.4	GENERAZIONE DI OLICONUCLEOTIDI <i>SPONGE</i> ANTI- HCMV-MIRNA	38
3.5	CEPPI VIRALI	38
3.5.1	Towne HCMV	38
3.5.2	ppUL32-EGFP-HCMV-TB40	39
3.6	PRODUZIONE E TITOLAZIONE DI HCMV	39
3.6.1	Produzione dello stock virale Towne HCMV	39
3.6.2	Determinazione del titolo virale	40
3.7	INFEZIONE DELLE CELLULE	40
3.8	TECNICHE DI TRASFEZIONE	41
3.9	OTTENIMENTO DI LINEE CELLULARI TRASFETTATE STABILMENTE	41

3.10	ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DELL'RNA	42
3.11	ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE RT-PCR E REAL-TIME RT-PCR	42
3.12	ANALISI DI ESPRESSIONE MEDIANTE MICROARRAY	43
3.12.1	Analisi mediante microarray di espressione dei miRNA	43
3.12.2	Analisi mediante microarray di espressione genica	43
3.12.3	Analisi statistica dei mircoarray	44
3.13	PREDIZIONE DEI TARGET DI MIRNA DI HCMV	44
3.13.1	Predizione bioinformatica dei target dei miRNA di HCMV	44
3.13.2	Predizione dei target dei miRNA di HCMV mediante correlazione dell'espressione dei miRNA virali con gli mRNA cellulari	45
3.14	SAGGIO DI ATTIVITÀ DELLA LUCIFERASI	45
3.15	ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA TRAMITE WESTERNBLOT	46
3.15.1	Estrazione delle proteine dal pellet cellulare e determinazione della concentrazione proteica totale	46
3.15.2	Western blot	46
3.16	SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE (MTT)	48
	<b>CAPITOLO 4- RISULTATI</b>	<b>49</b>
4.1	STUDIO DELLA CINETICA DI ESPRESSIONE DEI MIRNA DI HCMV	49
4.2	EFFETTO DELL'INFEZIONE DA HCMV SULL'ESPRESSIONE DEI MICRORNA CELLULARI	52
4.3	IDENTIFICAZIONE DEI TARGET DEI MIRNA DI HCMV	55
4.3.1	Analisi computazionale per la predizione dei target dei microRNA di HCMV	55
4.3.2	Analisi mediante tandem array per l'identificazione dei target dei microRNA di HCMV	58

4.4	VALIDAZIONE DEI TARGET CELLULARI DEI MICRORNA hcmv-miR-US25-2-3p E hcmv-miR-US25-2-5p	61
4.4.1	Saggio di attività della luciferasi	61
4.4.2	Analisi dell'espressione proteica dei target tramite Western blot	63
4.5	ANALISI DEGLI EFFETTI DI hcmv-miR-US25-2-3p SU PTBP1	68
4.5.1	Analisi degli effetti di hcmv-miR-US25-2-3p sullo <i>splicing</i> alternativo del gene FGFR2 mediato da PTBP1	69
4.6	ANALISI DEGLI EFFETTI DELL'INIBIZIONE DI PTBP1 DA hcmv-miR-US25-2-3p SULLA REPLICAZIONE DI HCMV	71
4.6.1	Saggio di attività della luciferasi	72
4.6.2	Saggio di proliferazione cellulare (MTT)	73
4.5.3	Replicazione di HCMV nelle cellule MRC-5 e MRC-5 anti hcmv-miR-US25-2-3p	74
	<b>CAPITOLO 5-DISCUSSIONE</b>	<b>77</b>
	<b>CAPITOLO 6-CONCLUSIONI</b>	<b>83</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>85</b>
	<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>99</b>
	<b>APPENDICE</b>	<b>101</b>

## RIASSUNTO

**Introduzione:** Ad oggi l'attività di pochi microRNA (miRNA) di citomegalovirus umano (HCMV) è stata studiata, e correlata con il ciclo replicativo virale e con l'evasione della risposta immunitaria. Scopo di questo studio è stata la caratterizzazione degli effetti dell'infezione e dei miRNA di HCMV sull'espressione dei miRNA e dell'mRNA umani della cellula ospite dopo l'infezione, e l'identificazione e validazione dei target cellulari dei miRNA di HCMV.

**Metodi:** È stata effettuata un'analisi mediante microarray per valutare la cinetica di espressione temporale 4, 8, 24, 48, 72 h.p.i. dei miRNA virali e cellulari, e dell'mRNA cellulare in un esperimento di infezione di cellule MRC-5 infettate con il ceppo Towne HCMV ad una MOI 2. mRNA e miRNA, cellulari e virali, differenzialmente espressi, sono stati selezionati secondo l'area della regione delimitata dai profili di espressione relativi al controllo e i casi post infezione. L'identificazione dei target dei miRNA di HCMV è stata fatta mediante un algoritmo di predizione computazionale, basato sulla complementarità di sequenze, e la correlazione dell'espressione dell'mRNA con l'espressione dei miRNA; la validazione dei target dei miRNA hcmv-miR-US25-2-3p e hcmv-miR-US25-2-5p è stata effettuata mediante saggi di luciferasi e western blot. Gli effetti di hcmv-miR-US25-2-3p sullo splicing alternativo PTBP1-dipendente sono stati studiati mediante real-time RT-PCR. L'effetto positivo di hcmv-miR-US25-2-3p sulla replicazione di HCMV è stato verificato in un modello knock-out per hcmv-miR-US25-2-3p.

**Risultati:** La maggior parte dei miRNA di HCMV è espressa fin dai primi stadi o entro 24 ore dopo l'infezione, in particolare, hcmv-miR-US25-2-3p è uno dei più espressi a partire da 4 ore dopo l'infezione e continua ad accumularsi nel tempo. L'espressione dei miRNA cellulari durante l'infezione da HCMV ha rivelato 68 miRNA cellulari differenzialmente espressi dopo l'infezione che sono stati raggruppati, con analisi di *clustering*, in 6 cluster di miRNA cellulari, coinvolti nella proliferazione e differenziazione cellulare e caratterizzati da cambiamenti coerenti nel profilo di espressione durante il decorso dell'infezione. I target

predetti sulla base della complementarità di sequenza di hcmv-miR-US25-2-3p PTBP1 , HDAC11 , HDAC4 e IFI30, sono significativamente inibiti dal miRNA sia nel saggio di attività della luciferasi che in Western Blot, mentre i target individuati mediante la correlazione di espressione di hcmv-miR-US25-2-5p, CD68 e Fas, non sono stati confermati da test di attività della luciferasi e dall'analisi dell'espressione proteica mediante Western Blot. È stata dimostrata l'inibizione di hcmv-miR-US25-2-3p sullo splicing alternativo PTBP1-dipendente dei trascritti della cellula ospite. Infine, il *knock-down* di hcmv-miR-US25-2-3p diminuisce la replicazione di HCMV.

**Conclusioni:** Un'analisi integrata dei miRNA virali e cellulari e dell' mRNA della cellula ospite, e l'identificazione di nuovi geni target per hcmv-miR-US25-2-3p coinvolti nella regolazione epigenetica dell'espressione genica virale e cellulare e nella risposta immunitaria innata ha permesso una maggiore comprensione della complessa interazione tra HCMV e cellula ospite nel corso di infezione.

## ABSTRACT

**Background:** The activity of only few human cytomegalovirus (HCMV) microRNAs (miRNAs) has been investigated so far and mainly involved in viral life cycle and evasion from host immune response. Aim of this study was to characterize the effects of HCMV infection and miRNAs on host human miRNA and mRNA expression profiles after infection; and the identification and validation of the cellular targets of HCMV miRNAs.

**Methods:** Microarray analysis of miRNA and mRNA temporal expression was done in time series, 4, 8, 24, 48, and 72 h.p.i. on MRC 5 cells infected with HCMV Towne strain. Differentially expressed mRNAs and miRNA both cellular and viral, were selected according to the area of the region bounded by the expression profiles related to control and post infection cases. Identification of HCMV miRNAs targets was done by sequence based prediction algorithms and expression based correlation; validation of hcmv-miR-US25-2-3p and hcmv-miR-US25-2-5p targets was performed by luciferase activity assays and western blot analysis. The effects of hcmv-miR-US25-2-3p on PTBP1-dependent alternative splicing was studied by Real time RT-PCR. The positive effect of hcmv-miR-US25-2-3p on HCMV replication was verified in a hcmv-miR-US25-2-3p knock out model.

**Results:** The majority of HCMV miRNAs was found to be expressed since the earliest stages or within 24 hours post infection, in particular hcmv-miR US25-2-3p was one of the most expressed since 4 hours post infection and continued to accumulate over time. Expression of cellular miRNAs during HCMV infection revealed 68 cellular miRNAs differentially expressed post infection that were grouped, by clustering analysis, into 6 clusters of cellular miRNAs, involved in proliferation and cell differentiation and characterized by coherent changes in expression profile during the time course of infection. Sequence-based predicted hcmv-miR-US25-2-3p targets PTBP1, HDAC11, HDAC4 and IFI30 were significantly inhibited by the miRNA both in luciferase activity assay and in western blot; while expression based correlated target of hcmv-miR-US25-2-5p target gene CD68 and Fas were not confirmed by luciferase activity assay and western blot. Hcmv-miR-US25-2-3p inhibition of host transcripts PTBP1-



dependent alternative splicing was demonstrated. Finally hcmv-miR-US25-2-3p knock-down decreases HCMV replication.

**Conclusion:** An integrated analysis of viral and cellular miRNAs and host mRNA and the identification of new targets genes for hcmv-miR-US25-2-3p involved in the epigenetic regulation of viral and host gene expression and in innate immune response allowed a further understanding of the complex interaction between HCMV and the host cell during infection.

# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

Il citomegalovirus umano (HCMV), o *herpes virus umano 5*, è un patogeno estremamente diffuso, responsabile di infezioni endemiche ed ubiquitarie che coinvolgono il 50-90% della popolazione nei paesi industrializzati e la quasi totalità degli individui nei paesi in via di sviluppo. Il virus è in grado di instaurare infezioni di tipo acuto, latente o persistente. Nella maggioranza degli individui immunocompetenti l'infezione risulta asintomatica o determina una sindrome simile a quella della mononucleosi, di cui HCMV rappresenta l'agente eziologico circa nell'8% dei casi [Grosse et al. 2008]. Tuttavia, in individui il cui sistema immunitario è depresso o immaturo, come nel caso della sindrome da immunodeficienza umana acquisita (AIDS), terapie immunosoppressive post trapianto e altri stati di immunodeficienza, l'infezione primaria da HCMV o la riattivazione dell'infezione latente può evolvere in patologie molto gravi tra cui polmoniti, epatiti, retiniti, leucopenia, ecc. La trasmissione transplacentare dell'infezione primaria durante la gravidanza o le infezioni neonatali nei prematuri portano a malformazioni congenite che si manifestano con ritardo mentale o sordità. Infine è stato suggerito un possibile coinvolgimento di HCMV in patologie infiammatorie del sistema cardiovascolare o dell'intestino, e nell'oncogenesi.

I miRNA sono la classe di RNA non codificante più studiata in anni recenti in quanto regolatori dell'espressione genica a livello post-trascrizionale, e svolgono un importante ruolo chiave nella regolazione genica durante importanti processi biologici cellulari; inoltre sono strumenti fondamentali nelle infezioni virali sfruttati per regolare i geni cellulari e propri per indurre dei cambiamenti metabolici, in grado di creare un ambiente cellulare ottimale per l'espressione genica e la replicazione del DNA, e per sfuggire alla risposta immunitaria antivirale.

Il presente studio indaga le interazioni tra HCMV e cellula ospite in corso di infezione focalizzandosi sulla modulazione dell'espressione genica cellulare e virale mediata dai microRNA di HCMV.

## 1.1 IL CITOMEGALOVIRUS UMANO

### 1.1.1 Herpesviridae

La famiglia degli herpesvirus (*Herpesviridae*), è costituita da grandi virus dotati di *envelope*, con genoma costituito da 120 fino a 240 kb a doppio filamento di DNA. Sono suddivisi in tre sottofamiglie:  $\alpha$ -herpesvirus,  $\beta$ -herpesvirus e  $\gamma$ -herpesvirus. Una caratteristica tipica, comune a tutti i virus della famiglia *Herpesviridae*, è la capacità di stabilire infezioni persistenti nell'organismo, circolarizzando il genoma virale, il quale può resistere in latenza in forma episomiale nell'ospite, mantenendo un livello minimo di espressione, grazie ad un delicato equilibrio tra evasione del sistema immunitario e immunosorveglianza. Il genoma virale è costituito da *open reading frame (orf)*, classificati come latenti o litici; temporalmente vengono ulteriormente suddivisi in: geni precocissimi (Immediate Early), che regolano la riattivazione del ciclo produttivo dalla latenza; geni precoci (Early) deputati alla sintesi di proteine necessarie alla replicazione del DNA virale; geni tardivi (Late), che codificano per proteine strutturali necessarie per la morfogenesi dei virioni maturi [Roizman and Sears, 1993].

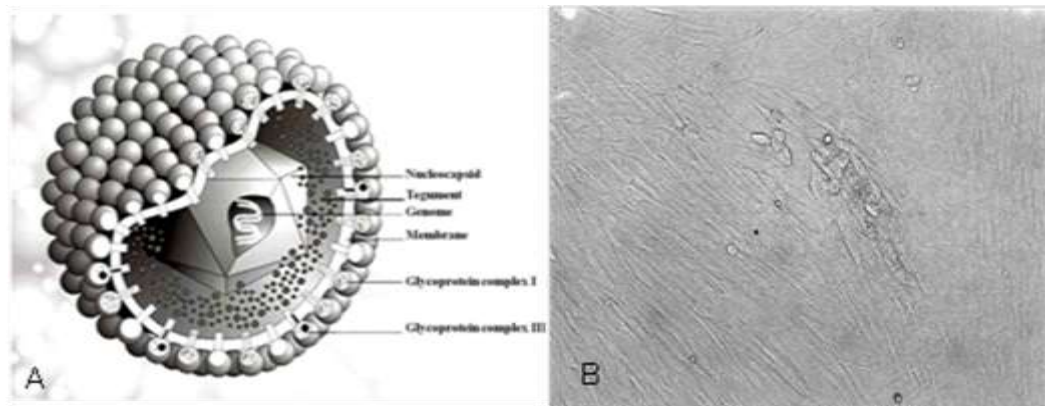
HCMV (HHV5) appartiene alla sotto-famiglia *betaerpesvirinae*, ed è caratterizzato dalla classica struttura e cinetica di espressione genica degli herpesvirus.

### 1.1.2 Struttura di HCMV

Il virione di HCMV è costituito da un nucleocapside icosaedrico contenente un genoma a doppio filamento lineare di DNA di circa 240 kbp codificante per circa 165 geni [Dolan et al. 2004] circondato dalla regione proteica amorfa definita tegumento che è a sua volta racchiuso da un'*envelope* a doppio strato fosfolipidico contenente diverse glicoproteine virali (Figura 1).

In aggiunta ai virioni infettivi, le colture cellulari infettate da HCMV producono altri due tipi di particelle: particelle con *envelope* non infettive (NIEPS) e i *dense bodies* (DB). Le particelle NIEPS sono molto simili ai virioni infettivi in quanto costituite da *envelope*, tegumento e nucleocapside ma sono prive del genoma virale; i *dense bodies* sono particelle costituite da *envelope* contenenti proteine del tegumento, tra le quali la più abbondante è pp65 (ppUL83), ma prive di capside e

quindi di DNA genomico [Kalejta et al. 2008]. La quantità relativa delle tre forme virali dipende dal numero dei passaggi in coltura cellulare e dal ceppo virale [Mocarski e Courcelle, 2001].



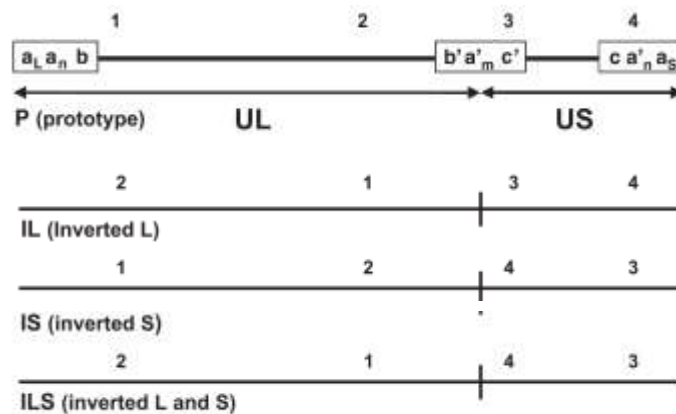
**Figura 1.** A) Rappresentazione schematica della struttura della particella virale di HCMV (da Gandhi & Khanna, 2004) e B) Effetto citopatico dell'infezione da HCMV su monostrato di fibroblasti umani (da Landolfo et al. 2003).

Più di 70 proteine virali sono presenti nel virione completo infettivo. La struttura più interna del virione, il capside, è formata da 162 capsomeri di cui 12 pentoni e 150 esoni costituiti da quattro proteine: UL86 (major capsid protein), UL48-49, UL85 (minor capsid protein), UL46 (minor capsid binding protein) [Britt et al. 2004]. L'envelope di HCMV contiene sei glicoproteine codificate dal virus le quali svolgono un ruolo essenziale nell'ingresso del virus nella cellula ospite, nella diffusione da cellula a cellula e nella maturazione del virus: gpUL55 (gB), gpUL73 (gN), gp UL74 (gO), gpUL75 (gH), UL100 (gM), e gpUL115 (gL). Il tegumento contiene più della metà delle proteine virali, molte delle quali ancora non completamente caratterizzate. La maggior parte delle proteine del tegumento sono fosforilate e in grado di interagire con le estremità citoplasmatiche delle proteine dell'envelope o con il capside [Kalejta et al. 2008]. Dopo il rilascio nel citoplasma, le proteine del tegumento diventano funzionalmente attive, e giocano un ruolo importante in tutte le fasi del ciclo virale, tra cui, l'ingresso del virus, l'espressione genica, l'evasione della risposta immunitaria, l'assemblaggio, la maturazione e l'uscita della particella virale, [Mocarski et al. 2007]. Ci sono diverse proteine del tegumento che sono di particolare interesse per il ruolo che svolgono nel ciclo di replicazione di HCMV, tra cui pp65, pp71, pp150, e pp28. Tra queste le più abbondanti sono pp150 (ppUL32, o fosfoproteina basica) e pp65, quest'ultima impiegata come target per test rapidi di diagnosi di infezione da

HCMV. Inoltre con la tecnologia *gene array*, all'interno di particelle virali sono stati identificati un sottogruppo di trascritti di HCMV denominati RNA del virione probabilmente situati nel tegumento e rilasciati nella cellula ospite nel momento dell'infezione. Il rilascio degli RNA del virione alla cellula ospite consente la loro espressione subito dopo l'entrata del virus in assenza di nuova trascrizione. Il loro significato funzionale non è noto [Bersnahan et al. 2000].

### 1.1.3 Genoma di HCMV ed espressione dei geni virali

Il genoma di HCMV è il più lungo dei genomi dei virus erpetici ed ha il più elevato contenuto di G+C; è suddiviso in due segmenti definiti *unique long* (UL) e *unique short* (US) delimitati da sequenze ripetute interne (IRS) e sequenze terminali ripetute (TRS) le quali mediano l'inversione delle regioni UL e US. Poiché ciascuna regione può essere orientata in entrambe le direzioni, la progenie virale contiene 4 isomeri del genoma (Figura 2).



**Figura 2.** Struttura dei quattro isomeri del genoma di HCMV. L'inversione delle regioni UL e US è mediata da sequenze ripetute dirette (*a*, *b*, *c*) situate alle estremità del genoma e da elementi ripetuti invertiti nella giunzione UL-US (*a'*, *b'*, *c'*). La sequenza ripetuta *a*, che consiste in un elemento diretto ad una estremità e in un elemento invertito nella giunzione UL/US, favorisce l'isomerizzazione del genoma in quanto contiene gli elementi *pac* (*packaging*) attivi in *cis*, necessari per il taglio del DNA. (da Landolfo et al. 2003).

Il genoma del ceppo di laboratorio AD169 è stato completamente sequenziato: l'analisi di questo genoma, lungo 230 kbp, dimostra la presenza di 225 ORF (open reading frames) da circa 100 o più aminoacidi [Novotny et al. 2001]. Queste ORF sono denominate sequenzialmente, secondo la loro posizione all'interno delle regioni uniche e ripetute. Nei ceppi di laboratorio Towne e Toledo sono state

identificate ulteriori ORF. Il confronto della sequenza aminoacidica di AD169 con quella del genoma di altri herpesvirus dimostra che i prodotti proteici di più di 40 ORF sono molto simili a proteine codificate dagli alpha- e gamma-herpesvirus [Karlín et al. 1994]. Di queste ORF conservate tra gli herpesvirus, circa il 25% codifica funzioni relative al metabolismo e replicazione del DNA virale ed il restante 75% è coinvolto nella maturazione ed organizzazione strutturale dei virioni. Ricerche di omologia di sequenza e studi sperimentali biochimici e genetici hanno consentito di assegnare una funzione soltanto ad alcune delle oltre 200 ORF. L'analisi del fenotipo di mutanti spontanei del ceppo AD169 con delezioni o inattivazioni in loci specifici ha stabilito tuttavia che i prodotti di più di 50 ORF non sono necessari per la replicazione virale produttiva in colture di fibroblasti. La funzione di molte ORF deve essere ancora caratterizzata ed è probabile che molta della capacità codificante virale sia evoluta per ottimizzare l'infezione e la disseminazione del virus, la crescita nei tessuti bersaglio, i meccanismi patogenetici e la capacità di evadere la risposta immunitaria dell'ospite [Landolfo et al. 2003]. L'espressione genica di HCMV inizia entro 1 ora p.i. senza sintesi proteica dall'origine virale (*oriLyt*). La replicazione del DNA di HCMV prosegue attraverso una iniziale circolarizzazione del genoma entro 4 ore p.i., seguito dalla sintesi del DNA mediante un meccanismo bidirezionale  $\theta$  a partire da una singola origine di replicazione (*oriLyt*), la quale poi si tramuta in una fase tardiva di replicazione del DNA in forma di *rolling circle* [Landolfo et al. 2003]. Durante l'infezione produttiva l'espressione del genoma di HCMV è controllata da una cascata di eventi trascrizionali che portano alla sintesi di tre categorie di proteine virali denominate precocissime (*immediate early*, IE), precoci (*early*, E) e tardive (*late*, L). I geni di HCMV sono trascritti nel nucleo delle cellule infettate ad opera della RNA polimerasi II e altri fattori trascrizionali cellulari stimolati da attivatori virali [Mocarski e Courcelle, 2001]. I geni IE comprendono i principali geni IE (MIE) UL122/123 (IE1 e IE2) e geni ausiliari, come UL36-UL38, UL115-UL119, IRS1/TRS1, e US3; le proteine MIE, da sole o in sinergia, sono necessarie per la successiva espressione agendo come *trans-* e *cis-*attivatori di geni virali. Inoltre, queste proteine hanno un effetto profondo sulla fisiologia della cellula infettata poiché regolano l'espressione di un gran numero di geni della cellula ospite. L'espressione dei geni E dipende dalla presenza di proteine IE

funzionali e non è influenzata dagli inibitori della replicazione del DNA virale; essi sono divisi in due sottoclassi: E e EL secondo il loro tempo di espressione: i geni E sono trascritti entro 4-8 ore p.i., i geni EL entro 8-24 ore p.i. I dati funzionali indicano che i geni codificano E la maggior parte delle proteine non strutturali, inclusi i fattori virali replicazione del DNA, enzimi di riparazione e proteine coinvolte nella evasione immune. Le proteine L sono l'ultima classe di prodotti genici espressi durante la replicazione di HCMV. La loro trascrizione inizia più di 24 ore p.i. e richiede la replicazione del DNA virale. L'espressione tardiva porta alla sintesi di due sottoclassi di proteine L in funzione del loro tempo di espressione e sensibilità a inibitori della replicazione del DNA virale. Le proteine L hanno un ruolo prevalentemente strutturali e contribuiscono principalmente all'assemblaggio e alla morfogenesi del virione [Fortunato e Spector, 1999; Mocarski e Courcelle, 2001].

#### **1.1.4 Ciclo replcativo di HCMV e perturbazione del ciclo cellulare**

HCMV esercita una profonda influenza su diversi processi cellulari, a partire dal *biasing* di vie metaboliche, in modo da avvantaggiare la replicazione virale [Chambers et al. 2010; Munger et al. 2008], al rimodellamento dell'apparato secretorio citoplasmatico [Das et al. 2007], alla riprogrammazione del ciclo cellulare e dei processi pro-apoptotici [Sanchez and Spector 2008] fino all'impiego di diversi sistemi per evitare il riconoscimento e l'eliminazione da parte del sistema immunitario dell'ospite [Mocarsky et al. 2004].

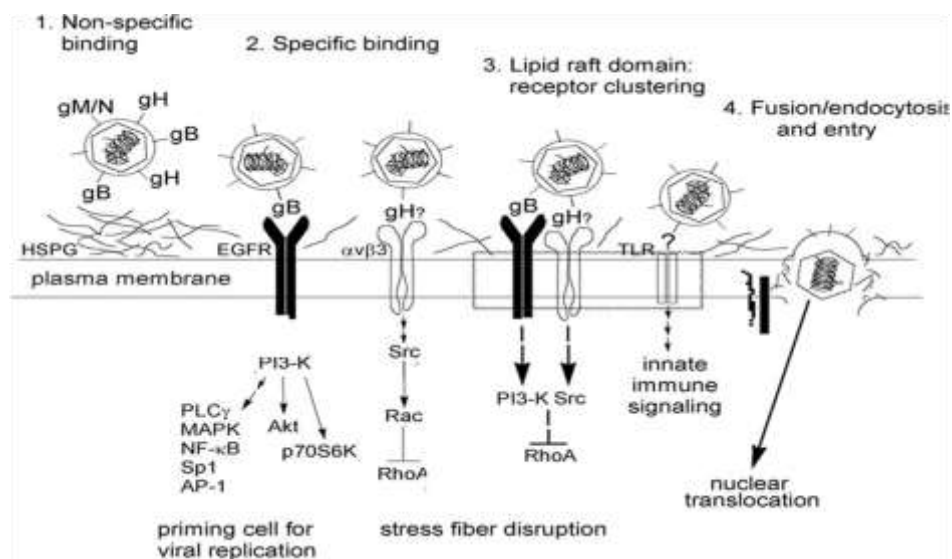
##### 1.1.4.1 Tropismo e permissività cellulare

Referti autoptici dimostrano che HCMV è in grado di infettare una vasta varietà di tessuti e si ritiene che replichi produttivamente in cellule epiteliali, endoteliali, muscolari lisce, mesenchimali, epatociti, granulociti e macrofagi derivati da monociti; infine il DNA virale latente, può essere rilevato nei progenitori dei macrofagi-granulociti nel midollo osseo e nei monociti periferici. Al contrario, in vitro, le uniche cellule completamente permissive per la replicazione di ceppi di laboratorio sono fibroblasti umani polmonari o cutanei, mentre isolati clinici replicano preferenzialmente su colture di cellule endoteliali. Alcune linee cellulari trasformate derivate da glioblastomi, come U373MG, così come le

cellule primarie muscolari lisce arteriose, supportano l'infezione produttiva, anche se a livelli inferiori rispetto a fibroblasti [Sinzger et al , 1995; Plachter et al, 1996]

#### 1.1.4.2 Adesione e ingresso nella cellula ospite

L'adesione e la penetrazione del virus sono rapidi ed efficienti sia in tipi cellulari permissivi che non permissivi. L'ingresso del virus è il risultato di una cascata di interazioni tra proteine virali e cellulari che culminano nella fusione dell'*envelope* del virione con la membrana plasmatica cellulare con un meccanismo indipendente dal pH. L'abilità di HCMV di infettare una grande varietà di tipi cellulari sembra essere dovuta all'utilizzo di recettori multipli o dall'interazione con molecole distribuite ubiquitariamente sulla superficie cellulare. La prima interazione transiente e non specifica tra HCMV e la cellula ospite è mediata dai proteoglicani eparan-solfato (HSPG) che interagiscono con le glicoproteine dell'*envelope* virale, tra le quali gB, e l'eterodimero gM/gN; successivamente gB lega in modo stabile il recettore per il fattore di crescita epidermico (EGFR) [Wang et al. 2003], e il co-recettore  $\alpha\beta3$ -integrina tramite il complesso eterotrimerico di glicoproteine dell'*envelope* gH/gL/gO e gB, che porta alla fusione delle membrane e promuove l'internalizzazione delle virus nel citoplasma [Compton, 2004]. Dopo l'entrata, la riduzione dell'attività e dei livelli di *steady-state* della GTPasi RhoA, un regolatore della riorganizzazione del citoscheletro, porta alla depolimerizzazione dei microfilamenti di actina che consente la traslocazione dei capsidi di HCMV al nucleo dove avviene la replicazione e la trascrizione del genoma virale [Evers et al. 2004].





**Figura 3.** Modello del meccanismo di adesione e ingresso di HCMV nella cellula ospite. Il legame non specifico di HCMV alla superficie della cellula è mediato dalle glicoproteine virali come gB che si legano a HSPG. Il legame specifico del gB alla tirosin-chinasi EGFR stimola più risposte proliferative cellulari e "attiva" la cellula ospite per la successiva replicazione virale. Il legame specifico a  $\alpha\beta3$ -integrina stimola la via di segnalazione che provoca la perturbazione delle fibre di stress. La fusione della membrana plasmatica cellulare con l'envelope di HCMV è probabilmente mediata dalle glicoproteine virali gB e gH, che consentono l'ingresso del virus. La perturbazione  $\alpha\beta3$ -mediata dei microfilamenti di actina facilita il transito del virus al nucleo. (modificato da Evers et al. 2004).

#### 1.1.4.3 Sfruttamento delle vie regolatorie del ciclo cellulare della cellula ospite da parte di HCMV

Gli effetti dell'infezione di HCMV sul ciclo cellulare cominciano con l'interazione tra le proteine del virione e i componenti del macchinario cellulare subito dopo l'entrata del virus. Il DNA virale viene trasportato nel nucleo e, se la cellula è in fase G0/G1, inizia la trascrizione dei geni IE. Le proteine precocissime IE1-72 e IE2-86 e due fosfoproteine del virione, ppUL69 e pp71 (UL82), sono state implicate nella mediazione dell'arresto del ciclo cellulare attuano i loro effetti dopo l'entrata del virus nella cellula. Esse sono in grado di interagire con i soppressori di crescita pRb, bp107, e p130 stimolando il fattore di trascrizione E2F, che promuove la progressione del ciclo cellulare dalla quiescenza (G0) alla fase S fino all'arresto in una fase di pseudo G1: in particolare pp71 media la degradazione, da parte del proteasoma, della famiglia di oncosoppressori Rb e [Kalejta et al. 2003]; IE-72 allenta il blocco della trascrizione mediato da p107, e consente il rilascio del complesso cycE/CDK2 [Zhang et al. 2003]; IE-86 cattura pRb e l'inibitore del ciclo cellulare p21 [Hacemeier et al. 1994].

Le cellule infettate da HCMV sono resistenti all'apoptosi nonostante la replicazione virale provochi un danno al DNA in grado da indurre l'apoptosi, in quanto numerose proteine virali mostrano un'attività anti apoptotica. Nelle primissime fasi di infezione la via di trasduzione del segnale PI3-K/Akt, attivata dall'ingresso del virus nella cellula ospite, ritarda l'insorgenza dell'apoptosi mediata da p53 promuovendo la sopravvivenza delle cellule [Sabbatini and McCormick 1999]; successivamente l'inibitore virale dell'apoptosi indotta da caspasi 8 (vICA) e l'inibitore virale mitocondriale dell'apoptosi (vMIA), trascritti rispettivamente dai geni HCMV UL36 e UL37, impediscono l'apoptosi Fas-mediata [Goldmacher et al. 1999; Skaletskaya et al. 2001]. Gli effetti anti-

apoptotici di HCMV possono consentire l'infezione virale prolungata, e forse facilitare l'infiammazione cronica.

#### 1.1.4.4. Assemblaggio, maturazione e fuoriuscita dei virioni

Terminata la replicazione del DNA virale e l'espressione dei geni *late* nel nucleo avviene la formazione dei capsidi di HCMV e l'impacchettamento del DNA genomico. La fase iniziale è l'interazione di pUL86 con la proteina *scaffold* AP pUL80.5 nel citoplasma; segue la sua traslocazione nel nucleo dove l'oligomerizzazione di questi complessi, catalizzata da AP, porta alla formazione degli esoni e dei pentoni, che interagiscono con i complessi pUL85-pUL46 per formare la struttura precursore del capside. La successiva associazione di questa struttura intermedia con pUL48.5 completa la formazione del capside, che diventa pronto per l'impacchettamento del DNA, dopo di che è rimossa AP. Durante la formazione dei capsidi, una serie di tagli proteolitici, catalizzati dalla proteina di assemblaggio pUL80a, porta alla maturazione del precursore UL80 in AP e alla dissociazione di UL86 da AP [Gibson, 1996]. L'accumulazione in inclusioni dei nucleocapsidi conferiscono al nucleo delle cellule infettate il tipico aspetto ad "occhio di gufo". I nucleocapsidi inizialmente gemmano dalla membrana perinucleare e acquisiscono un primo *envelope*, passando al citoplasma, i capsidi perdono l'*envelope* primario e maturano acquisendo il tegumento. Ricevono l'*envelope* definitivo gemmando in vescicole dell'apparato di Golgi, attraverso il quale sono trasportati alla superficie cellulare dove la fusione con la membrana plasmatica porta al rilascio della neoformata progenie virale a partire da 72 ore p.i. [Kalejta et al. 2008].

#### **1.1.5 Immunità antivirale e meccanismi di evasione della risposta immunitaria**

Per coesistere con l'ospite, HCMV ha evoluto sistemi sofisticati di evasione del riconoscimento da parte del sistema immunitario ed è in grado di sfruttare specifiche funzioni del sistema immunitario per la sua stessa riattivazione e diffusione. L'attivazione della risposta immunitaria innata inizia al momento dell'adesione e dell'ingresso di HCMV; l'interazione tra il toll-like receptor 2 (TLR2) e le glicoproteine virali gB e gH porta alla sovraespressione di NFκB e

del fattore di regolazione dell'interferone 3 (IRF3) i quali portano infine alla produzione delle citochine infiammatorie e dell'interferone IFN- $\gamma$  [Boehme et al. 2006; Isaacson et al. 2008; Jackson et al. 2010]. I segnali mediati da citochine, chemochine e fattori di crescita orchestrano lo sviluppo ed il mantenimento della risposta immunitaria sia innata che adattativa all'infezione virale. L'infezione da HCMV induce la produzione di numerose citochine e chemochine, come IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , monocyte chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES (*regulated on activation, normal, T-cell expressed, and secreted*) [Compton et al. 2003].; inoltre durante la latenza produce un omologo dell'interleuchina 10 (cmvLA IL-10), che può contribuire alla soppressione della funzione delle cellule dendritiche e dei monociti ed alterare la loro capacità di attivare i linfociti T riducendo l'espressione delle molecole MHC di classe I e II [Jenkins et al. 2004, 2008; Spencer et al. 2002]. Il genoma di HCMV codifica due proteine omologhe delle chemochine, UL146 e UL147, le quali potrebbero reclutare i neutrofili nella sede di infezione, e quattro omologhi dei recettori delle chemochine, UL33, UL78, US27, US28, i quali sono in grado di legare chemochine come MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  [Penfold et al. 1999; Margulies et al. 1996; Gao et al. 1994]. Si ritiene che questi omologhi recettoriali riducano le concentrazioni extracellulari di citochine, inibendo così il reclutamento di cellule dell'infiammazione nei tessuti infettati. Sei geni di HCMV codificano per proteine (UL16, UL18, UL40, UL83, UL141 e UL142) in grado di sopprimere il riconoscimento delle cellule NK. Sebbene HCMV sia in grado di diminuire l'espressione endogena di molecole MHC I, codifica per un omologo di MHC I (UL18) e sovraesprime il gene cellulare HLA-E attraverso l'azione di UL40. L'interruzione delle normali connessioni intercellulari espone ligandi per recettori per l'attivazione delle cellule NK presenti sulla superficie delle cellule, in particolare CD155. HCMV supera questa vulnerabilità codificando una proteina (UL141) che sopprime a livello post-traduzionale l'espressione di CD155 sulla superficie cellulare. Infine due proteine, UL16 e UL142, agiscono in concerto per sopprimere presentazione di ligandi per il recettore NKG2D che attiva le cellule NK [Wilkinson et al. 2007]. Risulta quindi evidente come diverse proteine codificate da HCMV siano in grado di interferire in modo specifico con la presentazione dell'antigene, permettendo così

alla cellula infettata di evadere il riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici e CD4+ e la risposta umorale.

## 1.2 I MICRO RNA

I microRNA (miRNA) sono una numerosa classe di molecole di RNA a singolo filamento non codificanti, che con i meccanismi dell'*RNA interference*, svolgono un importante ruolo nella regolazione genica durante importanti processi biologici cellulari, quali ad esempio: lo sviluppo embrionale, la differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche, l'apoptosi, e lo sviluppo del cancro, e, per queste loro funzioni, sono caratterizzati da espressione tempo e tessuto specifica [Bartel, 2004; Garzon et al. 2006; Jovanovic et al. 2006; Kluiver et al. 2006].

Queste corte molecole di RNA, costituite da circa 16-22 nucleotidi, regolano l'espressione genica a livello post-trascrizionale in molti organismi eucarioti e anche in alcuni virus [Ambros et al. 2004; Gottwein et al. 2008]; sono altamente espressi e, all'interno del genoma, si trovano solitamente tra sequenze introniche o organizzati in cluster multicistronici, in deserti genici [Tanzer et al. 2004; Lagos et al. 2003]. I microRNA hanno importanti ruoli nel controllo di numerosi processi cellulari e rappresentano un sistema di regolazione genica estremamente efficiente in quanto continuamente in grado di adattarsi, nel corso dell'evoluzione, alle modifiche dei propri target. Per questa caratteristica flessibilità, i miRNA costituiscono un sistema di difesa ottimale contro le infezioni virali, anche se, negli animali, il ruolo specifico in questo processo, non è ancora definito [Dolken et al. 2005].

I miRNA sono stati osservati per la prima volta in *C.elegans*, in particolare il primo miRNA lin-4 è stato identificato a causa del suo ruolo in un difetto nello sviluppo embrionale; l'analisi funzionale del gene lin-4 ha rivelato che non codificava per una proteina, ma invece produceva due brevi trascritti di 24-60 nucleotidi di lunghezza lin-4 e let-7. Successivamente è stato dimostrato che lin-4 era in grado di indurre il silenziamento post-trascrizionale di lin-14, un gene il cui prodotto proteico è coinvolto nella regolazione temporale dello sviluppo dei *lineage* cellulari in *C.elegans*. Ulteriori lavori hanno dimostrato che il meccanismo di questa regolazione post-trascrizionale avveniva attraverso l'appaiamento del miRNA lin-4 alle sequenze complementare all'interno della

regione non tradotta 3' UTR di lin -14 [Lee et al. 1993; Ruvkun et al. 1991; Wightman et al. 1993]. Questa nuova inibizione dell'espressione genica mediata dall'RNA era considerato specifico di *C.elegans* fino alla scoperta che il miRNA let-7 è conservato in molti metazoi, compresi *D. melanogaster* e uomo [Pasquinelli et al. 2000; Reinhart et al. 2000; Slack et al. 2000]. Ad oggi sono stati identificati 2578 miRNA maturi umani [da miRBase: <http://www.mirbase.org/>].

### 1.2.1 Biogenesi e meccanismo d'azione

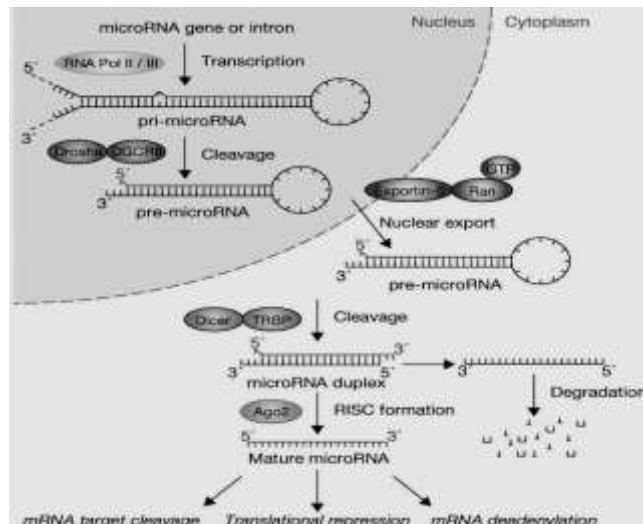
I miRNA derivano da lunghi trascritti poliadenilati e dotati di cap all'estremità 5', denominati *pri-miRNA*, generati dall'enzima RNA Polimerasi II [Cai et al. 2004; Lee et al. 2004], ed eccezionalmente dalla RNA Polimerasi III [Dolken et al. 2009]; questi assumono una caratteristica struttura secondaria a forcina, contenente la sequenza del miRNA maturo.

Il trascritto è inizialmente processato dall'enzima Ribonucleasi III-Drosha, che, con la proteina DGCR8 (Di George-syndrome critical-region protein 8), taglia la forcina di circa 60 nucleotidi, che viene definita *pre-miRNA*; questa viene quindi, esportata attivamente dal nucleo al citoplasma via RAN-GTP, attraverso il recettore nucleare Esportina 5 [Lund et al. 2004].

All'interno del citoplasma il *pre-miRNA* viene legato e clivato dalla RNasiIII, Dicer, generando il *duplex* miRNA/miRNA\* di circa 22 paia di basi [Bernstein et al. 2001; Hutvagner et al. 2004].

Questo *duplex* è caratterizzato dalla presenza di un gruppo fosfato all'estremità 5', e 2 nt all'estremità 3', in eccesso per ciascun filamento; solitamente il filamento che mostra l'accoppiamento più debole all'estremità 5' viene incorporato nel complesso RISC (RNA-induced silencing complex), mentre l'altro miRNA\* viene rilasciato, grazie all'intervento dell'enzima Elicasi, e degradato.

Il legame del miRNA maturo con il complesso RISC porta all'appaiamento con il bersaglio che può presentare perfetta o parziale complementarietà di sequenza.



**Figura 4.** Modello della biosintesi e del meccanismo di azione dei microRNA (da Winter et al. 2009).

Il grado di complementarietà delle sequenze tra miRNA e target ed il tipo di proteina Argonate (Ago 1-4), che fa parte del complesso, determinano il tipo di interazione, che può risultare nella degradazione del messaggero o nella repressione della traduzione.

Quando c'è perfetta omologia di sequenza, il complesso RISC, contenente la proteina Ago2, taglia il target in un punto corrispondente al centro del miRNA (nt10-11) portandolo alla rapida degradazione da parte delle esonucleasi, in modo simile al meccanismo di repressione dell'espressione genica esercitato dall'RNA interference [Zeng et al. 2003]. In genere questo tipo di azione è predominante nelle piante, mentre è raro per i miRNA animali [Brodersen et al. 2008], per i quali il principale meccanismo d'azione consiste nell'inibizione della traduzione del trascritto target. Questa azione è resa possibile, anche in caso di incompleta omologia di sequenza, quando avviene l'appaiamento di una breve sequenza dei nucleotidi 2-8 all'estremità 5' del miRNA altamente conservata, detta *seed*, con la sequenza 3' UTR del target, ciò costituisce il requisito minimo per la regolazione del target, per cui mutazioni puntiformi che ne disturbano l'appaiamento, come coppie G:U o la presenza di *buldge*, all'interno di questa regione possono determinare una notevole riduzione dell'efficienza di inibizione della traduzione [Doench e Sharp, 2004]. Insieme al blocco della traduzione, vi è un effetto di destabilizzazione dell'mRNA, che consiste nell'accorciamento della coda

poliadenilata al 5', e che porta al sequestro del messaggero all'interno dei p-body (processing-body) citoplasmatici, rendendolo inaccessibile per il macchinario della traduzione [Bregues et al.2005], dai quali sembra però essere rilasciato in determinate condizioni di stress cellulare, per essere nuovamente disponibile alla traduzione.

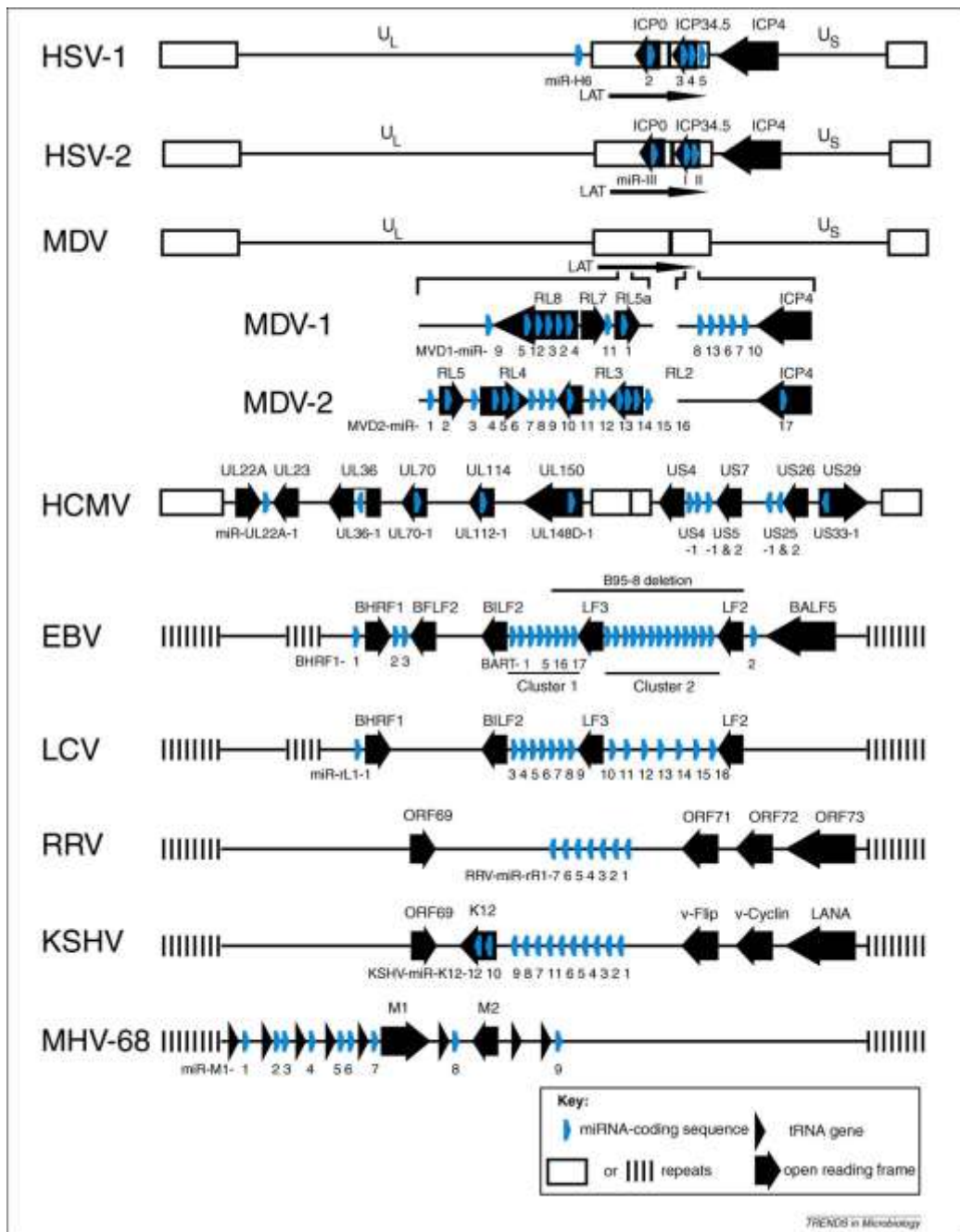
### **1.3 RUOLO DEI MICRORNA NEL CORSO DELLE INFEZIONI VIRALI**

Per la loro straordinaria adattabilità, l'assenza di immunogenicità e le ridotte dimensioni, che permettono il minimo investimento del patrimonio genetico, i miRNA sono strumenti fondamentali nelle infezioni virali, consentendo ai virus di regolare, allo stesso modo, il patrimonio genico cellulare e proprio, senza coinvolgere le proprie proteine potenzialmente immunogeniche in momenti fondamentali dell'infezione come l'evasione del sistema immunitario. In particolare, a differenza dei virus delle piante e degli insetti, i quali utilizzano i miRNA per spegnere le vie di silenziamento dell'*RNA interference*, i virus animali spesso sfruttano questi stessi meccanismi, per regolare i geni cellulari attraverso i propri miRNA.

#### **1.3.1 I microRNA virali**

I microRNA virali, fino ad ora conosciuti, derivano tutti da virus a replicazione nucleare con genoma a doppio filamento di DNA. Con l'eccezione del virus della varicella zoster (VZV) e dei virus HHV-3, HHV-6 e HHV-7 la maggior parte dei miRNA virali è codificata dagli herpes virus. Tra gli  $\alpha$ -herpesvirus, sono stati identificati rispettivamente 8 e 6 miRNA conservati in entrambi i virus dell'herpes simplex 1 e 2 (HSV-1, HSV-2); tra i  $\gamma$ -herpesvirus il virus di Epstein-Barr (EBV) codifica per almeno 25 miRNA [Boss et al. 2009], il virus del sarcoma di Kaposi (KSHV) codifica per 12 geni di miRNA da cui originano 17 miRNA maturi; infine tra i  $\beta$ -herpesvirus umani HCMV codifica per 15 precursori di miRNA da cui hanno origine 26 miRNA maturi [Stark et al. 2012]. I miRNA codificati dagli herpes virus rispecchiano strettamente i loro corrispettivi cellulari: nell'organizzazione genica, in quanto presentano una disposizione sia in cluster che in singolo gene; nella disposizione delle sequenze, sia all'interno di sequenze introniche che esoniche di geni codificanti proteine; e nella via di processamento,

in quanto sfruttano gli stessi meccanismi cellulari, senza coinvolgere proteine virali.



**Figura 5.** Localizzazione dei miRNA nei genomi di diversi Herpesvirus (da Boss et al. 2009).

Sono stati individuati miRNA anche in virus appartenenti alla famiglia degli *Adenoviridae* e dei *Poliomaviridae*, in particolare SV40. Ulteriori microRNA sono stati predetti da Pfeffer e collaboratori nel 2005, codificati dai virus a DNA a replicazione citoplasmatica, come i poxvirus, i quali, non avendo accesso



all'apparato nucleare responsabile della biogenesi dei miRNA, potrebbero aver sviluppato un meccanismo non convenzionale di processamento dei precursori [Pfeffer et al. 2005]. MicroRNA codificati da virus a RNA non sono stati, invece, sperimentalmente individuati e ciò può essere dovuto al fatto che l'escissione di miRNA porterebbe alla degradazione dell'RNA genomico, senza apportare quindi vantaggi evolutivi al virus.

### 1.3.2 Conservazione e ortologi dei miRNA virali

I miRNA possono subire una rapida evoluzione genica, infatti una singola mutazione puntiforme nella sequenza seed del miRNA può provocare un drammatico cambiamento dei geni bersaglio; per quanto riguarda le sequenze dei miRNA virali e dei loro target è stato osservato un elevato grado di conservazione, in particolare se fondamentali nel favorire il ciclo replicativo virale [Lewis et al.2005].

I miRNA virali non condividono alti livelli di omologia all'interno delle stesse famiglie virali, ma spesso sono codificati in regioni genomiche omologhe. La mancanza di omologia nelle sequenze di miRNA virali indica una più elevata frequenza di mutazioni e una più rapida evoluzione che consente un migliore adattamento alle condizioni ambientali all'interno dell'ospite.

Sono stati però individuati miRNA virali ortologi di miRNA cellulari: il miRNA miR-K12-11 condivide il 100% di omologia di sequenza *seed* con il miRNA cellulare, miR-155, identificato come *oncomir*, ovvero un microRNA con attività tumorigenica, essenziale per la differenziazione delle cellule B in plasmacellule: la capacità del virus di Kaposi di provocare la trasformazione neoplastica in linfoma delle cellule B, sembra quindi essere determinata da questo miRNA in grado di mimare le funzioni di miR155 (Figura 5)[Gottwein et al.2007; Skalsky et al. 2007].

```

UUAAUGCUUAGCCUGUGUCCGA      kshv-miR-K12-11
| | | | |
UUAAUGCUAAUCGUGAUAGGGGU      hsa-miR-155
  
```

**Figura 6.** Allineamento delle sequenze seed del miRNA di KSHV, miR-K12-11 e l'ortologo cellulare, miR-155 (le basi omologhe sono evidenziate) [Gottwein et al. 2007; Skalsky et al. 2007]. Abbreviazioni: hsa Homo Sapiens, human.

### **1.3.3 Ruolo dei miRNA virali nelle infezioni virali**

Da numerosi studi sembra essere chiaro come i microRNA virali svolgano un ruolo decisivo nell'instaurarsi delle infezioni da virus, agendo principalmente su due fronti: inibiscono target virali per instaurare la fase di latenza nell'ospite e regolano geni bersaglio cellulari per evadere il sistema immunitario e garantire la sopravvivenza della cellula ospite.

Per primi, nel 2004, Tuschl e collaboratori [Boss et al. 2009], scoprirono tre miRNA codificati dal virus di Epstein-Barr (EBV); ora ne sono stati identificati 25, altamente conservati all'interno della sottofamiglia raggruppati in due cluster localizzati all'interno dei geni BHRF e BART [Cai et al. 2006]. Tutti questi miRNA sono espressi ad elevati livelli nella fase di latenza e mostrano un ruolo fondamentale nella stabilizzazione della fase latente. Uno dei cinque miRNA di EBV, miR-BART2, codifica antisenso rispetto all'mRNA che codifica per la DNA polimerasi di EBV, chiamata anche BALF5; inibendo l'espressione della DNA polimerasi miR-BART2 è in grado di favorire l'ingresso del virus di latenza riducendo l'amplificazione del genoma virale in seguito all'infezione [Pfeffer et al. 2004]. Il miRNA miR-BART5 invece agisce sul gene cellulare pro-apoptotico, PUMA, inibendo, così la via dell'apoptosi, dipendente e indipendente da p53, e garantendo la sopravvivenza della cellula in cui il virus persiste in forma latente [Choy et al. 2008]. Infine BART 16, BART 17-5p e BART 1-5p hanno siti di legame predetti nella sequenza 3' UTR del gene virale LMP1 (latent membrane protein) espresso durante la latenza che agisce come un recettore costitutivamente attivo di TNF, essenziale per il processo di tumori genesi di EBV che porta ad un'aumentata sensibilità cellulare agli stimoli apoptotici: è possibile quindi che il virus utilizzi questi miRNA per bilanciare l'attività trasformante e proliferativa di LMP1 potenzialmente tossica per la cellula ospite. [Gottwein and Cullen 2008].

I virus dell'herpes simplex 1 e 2 codificano per miRNA localizzati in cluster in una regione genomica espressa durante la fase di latenza (geni LAT). I trascritti di questi microRNA sono stati identificati come antisenso di due geni fondamentali nell'instaurarsi del ciclo litico, ovvero il regolatore della trascrizione ICP0 e il fattore di neurovirulenza ICP34.5, e sono quindi in grado di spegnere l'espressione di questi due geni litici per attivare i geni LAT [Boss et al. 2009].

Tra i virus nucleari a DNA, gli Adenovirus umani codificano per alcuni microRNA derivanti dall'RNA non codificante di circa 160 nucleotidi, VA1, il quale è un breve trascritto prodotto dalla RNA Polimerasi III cellulare. Questo miRNA è espresso ad elevati livelli negli stadi tardivi dell'infezione e agisce come inibitore della protein-chinasi R, PKR, un sensore intracellulare per RNA a doppio filamento, attivo nella difesa cellulare anti virale [Gottwein e Cullen, 2008], inoltre compete con i miRNA cellulari per il sistema di trasporto Esportina 5 attraverso la membrana nucleare [Lu et al. 2004] consentendo al virus di evadere la risposta cellulare inibitoria.

Sullivan e collaboratori, nel 2005, hanno individuato un precursore di miRNA, nel genoma del poliomavirus SV40, in grado di originare due microRNA maturi, miR-S1 e miR-S2, espressi nelle fasi tardive dell'infezione virale; entrambi sono perfettamente complementari ad un trascritto precoce del virus, codificante l'antigene T, il quale non ha nessun coinvolgimento nel meccanismo di replicazione del virus, ma è responsabile del riconoscimento specifico da parte dei linfociti T citotossici, CTL[Sullivan et al. 2005]. L'azione del miRNA virale contro un trascritto codificato dal virus stesso contribuisce a garantirne la sopravvivenza, evadendo la risposta immunitaria e a supportare l'importanza di questo miRNA nel promuovere la sopravvivenza del virus nella cellula ospite contribuisce il fatto che omologhi di questo miRNA siano stati identificati e predetti nei genomi di altri membri dell famiglia *Poliomaviridae* quali SA12, BKV, JCV e MCV [Qi et al. 2006].

#### **1.3.4 Ruolo dei miRNA cellulari nel controllo delle infezioni virali**

I microRNA cellulari svolgono una duplice funzione nel determinare l'esito di un'infezione virale. Possono infatti essere indotti dal sistema di difesa antivirale innata mediato dall'interferone, INF, bloccando la replicazione dei virus (ad esempio i microRNA miR-196 e miR-448 inibiscono la replicazione del virus umano dell'epatite C, HCV, *in vitro* [Pendersen et al. 2007]), e in questo caso le loro sequenze sono spesso conservate tra tutti i vertebrati; oppure possono svolgere un ruolo chiave nel determinare il tropismo virale. Molti sono gli esempi di miRNA cellulari in grado di svolgere tale funzione: bassi livelli di espressione del microRNA miR-32 sembrano essere fondamentali per supportare la

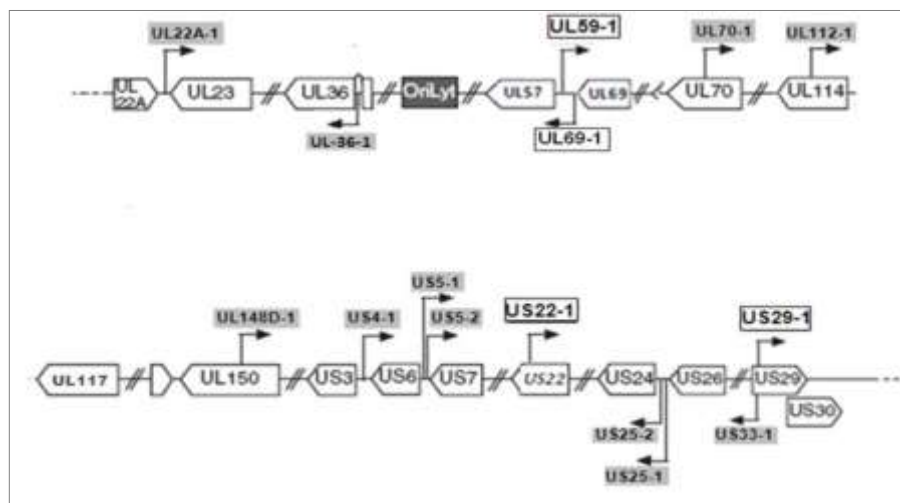
replicazione del retrovirus PFV in determinati tipi cellulari [Leicellier et al. 2005]. Studi bioinformatici hanno individuato 5 miRNA cellulari (miR-29 –a e –b, miR-149, miR-378) in grado di appaiarsi ai geni accessori di HIV-1 (nef, vpr, vpu, vif) determinanti per l'infettività, l'espressione del genoma virale e la produzione di progenie virale [Hariharan et al. 2005]; allo stesso tempo però, sembra che HIV-1 sia in grado di sfruttare la regolazione post trascrizionale mediata dai miRNA per mantenere la latenza nei linfociti T CD4+: l'integrazione del genoma virale nel genoma cellulare porta ad un silenziamento genico dei trascritti virali mediato dai miRNA cellulari miR-150, mir-28, mir-125b, mir-223, mir-382 che sembra far regredire allo stato quiescente le cellule CD4+ infettate consentendo la latenza del virus [Huang et al.2008]. Un ulteriore esempio di miRNA cellulare coinvolto nella modulazione dell'infezione virale è il microRNA miR-122 il quale riconosce come bersaglio la sequenza 5' UTR di HCV. MiR-122 è espresso ad alti livelli solo nel fegato dove regola la biosintesi del colesterolo e degli acidi grassi, ed è stato dimostrato sperimentalmente che la riduzione dell'espressione di tale miRNA provoca la riduzione della replicazione di HCV-1, e che il suo sito di legame è conservato nelle sequenze 5' UTR di tutti i genotipi di HCV [Jopling et al. 2005] e sembra quindi avere un ruolo determinante nel definire il tropismo del virus.

## **1.4 RUOLO DEI MICRORNA CELLULARI E VIRALI NELL'INFEZIONE DA HCMV**

### **1.4.1 I microRNA di HCMV**

Inizialmente i miRNA di HCMV sono stati identificati in isolati clinici mediante: la conferma con Northern blot di previsioni fatte sulla base di strutture *stem-loop* conservate tra HCMV e CCMV (*panine herpes virus 2*) [Grey et al. 2005; Grey and Nelson 2008], la previsione bioinformatica seguita da clonazione e sequenziamento di librerie di piccole specie di RNA presenti nelle cellule HCMV [Pfeffer et al. 2005], e attraverso una combinazione di clonaggi di piccoli RNA, analisi di sequenza, e poi Northern blotting [Dunn et al. 2005]. Nel 2005, Dunn e collaboratori [Dunn et al. 2005] individuarono per primi due precursori di miRNA, codificati dal citomegalovirus umano, localizzati nei loci UL23 e US24. In seguito con la tecnica del Northern Blot undici miRNA sono stati identificati

espressi durante l'infezione virale acuta, e quindi insieme ai geni precoci, raggiungendo il picco di espressione entro le 72 ore successive all'infezione [Grey et al. 2007]. Nel 2012 con l'integrazione di predizioni bioinformatiche con le tecnologie di *deep sequencing* ulteriori miRNA di HCMV sono stati identificati dai gruppi di Meshesha e di Stark portando ad un totale di 15 precursori di miRNA codificati da cui originano 25 miRNA maturi [Meshesha et al. 2012; Stark et al. 2012]. Essi sono denominati in base al gene sovrapposizione o il gene più vicino codificato a monte sullo stesso filamento del genoma virale. A differenza degli  $\alpha$ - e  $\gamma$ -herpesvirus, i miRNA codificati da HCMV hanno un'organizzazione dispersa all'interno del genoma, localizzati spesso all'interno di regioni intergeniche o come antisenso di *orf* codificanti (Figura 6). I miRNA di HCMV sono conservati fra i differenti ceppi virali [Dunn et al. 2005] ma non tra i membri della famiglia degli herpesvirus: solo CCMV che rappresenta il membro più vicino del genere, mostra di codificare per 10 dei precursori di HCMV sulla base della comparazione di sequenza ma non su dati sperimentali [Dolken et al. 2009].



**Figura 7.** Localizzazione dei microRNA nel genoma di HCMV. I microRNA conosciuti sono rappresentati dalle frecce nere, che ne indicano la posizione e l'orientamento rispetto agli open reading frame: 5 dei 15 precursori di HCMV mappano in codoni antisenso di ORF codificanti proteine, mentre i rimanenti non mappano in regioni conosciute del genoma, e infine miR-36-1 è localizzato in un introne. (da Meshesha et al. 2012).

#### 1.4.2 Target virali dei miRNA di HCMV

I microRNA di HCMV riconoscono sia geni bersaglio cellulari che virali e sono anche in grado di agire in modo sinergico sui propri target come dimostrato da Tirabassi e colleghi che hanno dimostrato l'azione sinergica dei miRNA miR-US5-1 e miR-US5-2 nella regolazione dell'espressione del gene virale US7 [Tirabassi et al. 2011].

Numerosi studi sono stati effettuati sul miRNA miR-UL112-1, per il quale sono stati validati numerosi target cellulari e virali, predetti con approcci bioinformatici. Il microRNA maturo è espresso ad elevati livelli nella fase precoce di espressione genica del virus, è conservato evolutivamente nel citomegalovirus umano e di scimpanzé, e svolge un ruolo fondamentale nel definire la corretta evoluzione temporale del ciclo virale, inducendo la fase di latenza e stabilendo, così, un'infezione persistente nell'ospite. Sono stati identificati siti multipli e funzionali di legame nella regione genomica *Major Immediate Early*, MIE, codificante per le due proteine virali *trans*-attivanti IE72 e IE86, espresse in seguito a fenomeni di splicing alternativo, essenziali per l'induzione dei geni precoci e tardivi e, quindi, per una replicazione virale efficiente. L'azione di inibizione svolta da questi mRNA precoci, risulta quindi fondamentale per l'induzione e il mantenimento della latenza, in quanto antagonizza i principali promotori del ciclo litico [Grey et al. 2007]. La sequenza di questo miRNA non è conservata tra membri diversi della famiglia degli Herpesvirus, ma è stata dimostrata la conservazione del target, il quale possiede, quindi, siti multipli per il legame dei diversi miRNA di HCMV, EBV, e KSHV. Infine, nel 2009 Stern-Ginossar e collaboratori [Stern-Ginossar et al. 2009] identificarono un ulteriore target per il miR-UL112-1, codificato dal filamento antisenso del genoma virale, UL114, il quale codifica per la proteina virale DNA-UracilGlicosilasi, enzima essenziale nella sintesi e riparazione del DNA virale; la perfetta complementarietà tra miRNA e 3' UTR, in questo caso, non porta alla degradazione del messaggero, ma conduce all'inibizione della traduzione del target, risultante nella ridotta capacità del virus di rimuovere i residui uracile dal DNA.

Sulla base del loro lavoro precedente che ha dimostrato che miR-US25-1 è uno dei miRNA di HCMV più fortemente espressi [Grey et al. 2005], il gruppo di Grey nel 2010 ha identificato alcuni bersagli cellulari di miR-US25-1 osservando per la prima volta che la maggior parte delle sequenze *seed* dei target di miR-

US25-1 sono localizzate nelle regioni 5' UTR piuttosto che nelle regioni 3'UTR. I geni target del miRNA oggetto di questo studio appartengono a un gruppo di geni cellulari regolatori della progressione del ciclo cellulare e dell'oncogenesi tra cui BRCC3, EID1, MAPRE2, CD147 e la ciclina E2. E' noto come l'infezione da citomegalovirus porti all'alterazione del ciclo cellulare, inducendo la riattivazione dallo stato di quiescenza, G<sub>0</sub>; la scoperta dei target di questo miRNA, contribuisce a spiegare il successivo blocco da parte del virus del ciclo cellulare nella fase S, in cui avviene la replicazione del DNA allo scopo di mantenere un ambiente maggiormente favorevole alla replicazione virale [Grey et al. 2010].

#### **1.4.3 Target cellulari dei miRNA di HCMV**

Nella fase di latenza all'interno dell'organismo, è fondamentale per il virus poter evadere il sistema di immunosorveglianza cellulare; in questo processo, oltre a numerose proteine virali sono coinvolti diversi microRNA.

Come già accennato nel paragrafo 1.1.5 di questo capitolo, anche se l'infezione da HCMV attiva efficientemente l'espressione di ligandi per il recettore NKG2D che attiva le cellule NK, il virus codifica per due proteine UL16, UL142 che reprimono la presentazione di questi ligandi sulla superficie cellulare, ma in questo processo è coinvolto anche il miRNA miR-UL112-1 [Wilkinson et al. 2008]. Il target è un mRNA cellulare che codifica per la proteina MCIB, un ligando, indotto dallo stress, per il recettore NKG2D, espresso da tutte le cellule *natural killer* (NK) e dai linfociti T citotossici e fondamentale per l'attivazione delle funzioni anti-virali e anti-tumorali. L'appaiamento del miRNA con la sequenza 3' UTR è altamente specifico e porta quindi alla sopravvivenza della cellula infettata [Stern-Ginossar et al. 2007]. A conferma del ruolo chiave del microRNA miR-UL112-1 nei meccanismi di evasione della risposta immunitaria da parte di HCMV, nel 2013 il gruppo di Q. Ruan ha identificato come ulteriore target il gene dell'interleuchina 32, IL-32, citochina associata all'induzione della risposta infiammatoria, indotta ad alti livelli nelle fasi precocissime dell'infezione virale [Huang et al. 2013]. Nell'importante processo di inibizione della presentazione degli antigeni virali alle cellule T CD8+ nelle fasi iniziali dell'infezione, intervengono ulteriori miRNA di HCMV: miR-US4-1, il cui target

è il gene ERAP1b il principale enzima responsabile del processamento degli antigeni [Kim et al. 2011]; e il miRNA miR-UL148D, specifico per il ceppo clinico Toledo, che inibisce la chemochina responsabile del reclutamento delle cellule T, degli eosinofili e dei basofili, RANTES [Kim et al 2012].





## CAPITOLO 2

### SCOPO DELLO STUDIO

La scoperta dell'RNA non-codificante, un gruppo eterogeneo di molecole di RNA caratterizzate dal fatto di non venire tradotte in proteine, ha rivoluzionato il dogma della biologia molecolare secondo il quale si procede dal DNA, all'RNA alle proteine. Dalla loro scoperta si sono aperti nuovi orizzonti per la ricerca biologica: di fondamentale importanza è risultato il meccanismo di regolazione dell'espressione genica dell'RNA-interference, il quale sfrutta la capacità di brevi molecole di RNA a doppio filamento, di legare molecole di mRNA con alta omologia di sequenza e di provocare l'inibizione della traduzione o la degradazione dell'mRNA bersaglio.

In questo sistema si inserisce la classe dei microRNA (miRNA), i quali sono stati individuati anche all'interno del genoma di virus a DNA, come gli herpes virus e gli adenovirus. La relazione funzionale tra i virus e i miRNA virali e cellulari ricopre un ruolo di notevole interesse nello studio dei meccanismi dell'infezione virale e di numerosi altri processi cellulari, come ad esempio la risposta immunitaria innata anti-virale e l'oncogenesi virale. La conoscenza di queste relazioni può condurre a nuovi approcci nelle terapie antivirali e nello sviluppo di farmaci di nuova concezione, e nella diagnostica e prognosi delle infezioni virali.

In questo studio è stato preso in analisi un modello *in vitro* di infezione da HCMV, principale virus responsabile di malformazioni congenite e di ritardo mentale nei neonati e causa di gravi complicanze, spesso fatali, negli individui immunocompromessi.

In particolare, gli obiettivi dello studio sono stati:

- Caratterizzazione del profilo di espressione dei miRNA virali durante il ciclo replicativo di HCMV, utilizzando le tecnologie di analisi dei microarray e di PCR quantitativa;

- Analisi dell'effetto dell'infezione da HCMV sul profilo di espressione dei microRNA cellulari;
- Predizione bioinformatica dei possibili target virali e cellulari e dei miRNA di HCMV;
- Identificazione di candidati geni cellulari target dei miRNA di HCMV attraverso la correlazione dei profili di espressione dei miRNA virale e degli mRNA cellulari
- Verifica sperimentale di alcuni geni target candidati dei miRNA hcmv-miR-US25-2-3p, e hcmv-miR-US25-2-5p .

## CAPITOLO 3

### MATERIALI E METODI

#### 3.1 COLTURE CELLULARI

##### 3.1.1 HEK 293-A

La linea cellulare umana HEK 293-A è stata originata a partire da cellule di tessuto renale embrionale ottenute da un feto sano abortito, trasfettate con il DNA di Adenovirus 5, in particolare la regione E1A, integrato a livello del cromosoma 19 [Graham et al. 1977]. Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) addizionato con siero fetale bovino, FBS (10%) e di penicillina-streptomicina (1%), e incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. Il tasso di subcoltivazione impiegato è stato pari a 1:12 con una frequenza di 3 volte a settimana.

##### 3.1.2 MRC-5

La linea cellulare MRC-5 (ATCC, CCL-171) è stata ottenuta a partire dal tessuto polmonare sano di un feto maschio di 14 settimane [Jacobs et al. 1970]. Le cellule MRC-5 crescono in coltura aderendo alle comuni plastiche dei contenitori per colture cellulari e proliferano assumendo una morfologia fibroblastoide, formando monostrati. Le cellule MRC-5 presentano la caratteristica di essere suscettibili all'infezione erpetica, particolarmente da HCMV. Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) addizionato con FBS (10%) e penicillina-streptomicina(1%), e incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. Il tasso di subcoltivazione impiegato è stato pari a 1:6 con una frequenza di 2 volte a settimana.

##### 3.1.3 THP-1

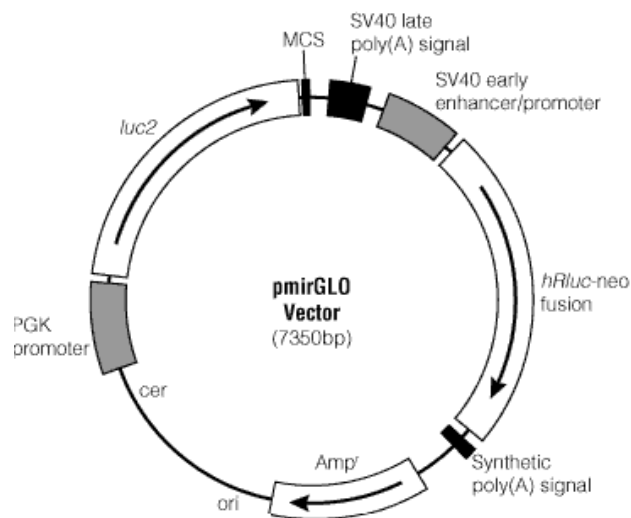
La linea cellulare THP-1 è stata derivata dal sangue periferico maschio umano di un 1 anno affetto da leucemia monocitica acuta [Tsuchiya et al. 1980]. Queste cellule mostrano una morfologia rotonda a singola cellula e sono coltivate in coltura continua in sospensione. Le cellule sono state coltivate in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640) addizionato con FBS (10%) , penicillina-

streptomicina (1%) e con 50 $\mu$ M di  $\beta$ -mercapto-etanolo, e incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. Sono state differenziate in macrofagi con l'utilizzo di forbolo 12-miristato 13-acetato (PMA) ad una concentrazione di 200nM con un periodo di incubazione di 48 ore. Le cellule sono state mantenute in coltura ad un livello di densità compreso tra 2x10<sup>5</sup> e 10<sup>6</sup> cellule/ml.

## 3.2 PLASMIDI

### 3.2.1 pmirGLO Dual Luciferase miRNA Target Expression Vector

Il vettore (*Promega, USA*) di 7350pb contiene il gene della luciferasi di *Firefly* (lucciola), *luc2* alla cui estremità 3' è inserito un sito MCS, sotto il controllo del promotore eucariotico universale PGK; e il gene *hRluc-neo* che esprime la luciferasi di *Renilla* e la resistenza alla neomicina sotto il controllo del promotore della trascrizione di SV40.

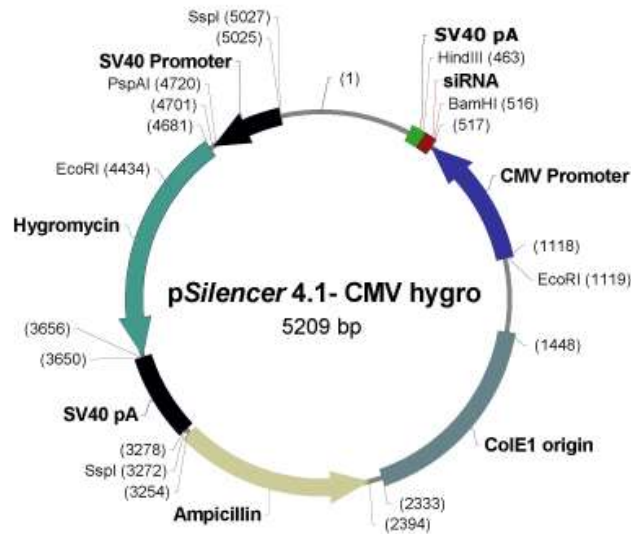


**Figura 8.** Rappresentazione schematica del vettore plasmidico pmirGLO (da Promega handbook).

Il vettore è stato clonato in cellule batteriche di *E. Coli* DH5 $\alpha$ , trasformate mediante shock termico, seminate sul terreno di selezione LB-Agar addizionato con 100 $\mu$ g/ml di Ampicillina.

### 3.2.2 psilencer 4.1-CMV Hygro

Il vettore (*Ambion, Life-Technologies, USA*) di 5209pb contiene un sito di multiclonaaggio (MSC) per l'inserzione di siRNA sotto il controllo del forte promotore eucariotico di CMV; e il gene per la resistenza all'igromicina sotto il controllo del promotore della trascrizione di SV40.



**Figura 9.** Rappresentazione schematica del vettore plasmidico psilencer 4.1-CMV Hygro. (da Ambion handbook).

Il vettore è stato clonato in cellule batteriche di *E. Coli* DH5 $\alpha$ , trasformate mediante shock termico, seminate sul terreno di selezione LB-Agar addizionato con 100 $\mu$ g/ml di Ampicillina.

### 3.3 PRECURSORI SINTETICI DEI miRNA VIRALI

HCMV-miR-US25-2-3p, HCMV-miR-US25-2-3p mutato e HCMV-miR-US25-2-5p. I precursori sintetici dei miRNA (*Ambion, USA*) si caratterizzano come piccoli RNA, parzialmente a doppio filamento, che mimano i precursori endogeni dei miRNA; una volta internalizzati nelle cellule trasfettate, subiscono il normale processamento dei miRNA endogeni. Le sequenze dei miRNA utilizzati in questo studio sono descritte in tabella 2.

**Tabella 2.** Sequenze nucleotidiche dei Pre-miR sintetici utilizzati in trasfezione transiente.

pre-miR	Sequenza (5'→3')
HCMV-miR-US25-2-3p	AUCCACUUGGAGAGCUCCCGCGG
HCMV-miR-US25-2-3p mutato	AACACGAUGGAGAGCUCCCGCGG
HCMV-miR-US25-2-5p	AGCGGUCUGUUCAGGUGGAUGA
HCMV-miR-US4	UGGACGUGCAGGGGAUGUCUG

### 3.4 GENERAZIONE DI OLIGONUCLEOTIDI *SPONGE* ANTI-HCMV-miRNA

Le sequenze degli oligonucleotidi usati per generare la *sponge* anti-HCMV-miR-US25-2-3p sono elencati di seguito nella Tabella 3.

**Tabella 3.** Sequenze degli oligonucleotidi utilizzati per la generazione di *sponge* anti-miRNA.

Nome	Sequenza
anti-miR-US25-2-3p For	GATCCGCGGGAGCTGGGAAGTGGATAGAGGCGGGAG CTGGGAAGTGGATAGAGGCGGGAGCTGGGAAGTGGATA
Anti-miR-US25-2-3p Rev	AGCTTATCCACTTCCCAGCTCCCGCCTCTATCCAC TTCCCAGCTCCCGCCTCTATCCACTTCCCAGCTCCCGCG
Anti-miR-US25-2-3p mutata For	GATCCCTGTGACTAGGGATCGTGTTAGAGCTGTGACT AGGGATCGTGTTAGAGCTGTGACTAGGGATCGTGTTA
Anti-miR-US25-2-3p mutata Rev	AGCTTAACACGATCCCTAGTCACAGCTCTAACACGATC CCTAGTCACAGCTCTAACACGATCCCTAGTCACAGG

Gli oligonucleotidi sono stati appaiati a 37°C per 1 ora , in seguito a denaturazione per 3 minti a 95°C, e inseriti nel vettore plasmidico *pSilencer 4.1-CMV Hygro* (Ambion, USA) Il plasmide *pSilencer-anti-miR-US25-2-3p* é stato trasfettato stabilmente in cellule MRC-5.

### 3.5 CEPPI VIRALI

#### 3.5.1 Towne HCMV

Il ceppo Towne di HCMV (ATCC, VR-977), appartenente alla famiglia degli *Herpesviridae* (*Betaherpesvirinae*, *Cytomegalovirus*, Human herpesvirus 5), è stato isolato nel marzo del 1970 dall'urina di un neonato di 2 mesi affetto da microcefalia ed epatosplenomegalia [Plotkin et al. 1975]. Il virus è stato adattato in laboratorio per l'infezione dei fibroblasti in coltura ed è stato attenuato mediante la propagazione fino a 125 passaggi sulla linea cellulare di fibroblasti umani embrionali di polmone WI-38. In colture cellulari *in vitro*, il ceppo Towne determina un effetto citopatico (CPE), evidenziato da spaziature tra le cellule, cellule di forma rotondeggiante e non adese. Viene raccomandato un livello di sicurezza di 2 (BL2) nel maneggiare il virus ed è richiesto un lungo periodo di tempo (10-11 giorni) di incubazione dello stock fornito prima della manifestazione dell'effetto citopatico.

### **3.5.2 ppUL32-EGFP-HCMV-TB40**

Il ceppo ppUL32-EGFP-HCMV-TB40 (ATCC®, VR-1578™) è un ceppo di HCMV ottenuto tramite ricombinazione *in vitro* con un plasmide che trasporta il gene UL32 di TB40 fuso con il gene per la GFP (*green fluorescent protein*): produce un virus maturo che esprime la GFP fusa all'estremità C terminale del la fosfoproteina pp150, prodotto del gene UL32 [Sampaio et al. 2005]. In colture cellulari dei fibroblasti *in vitro*, il ceppo determina un effetto citopatico (CPE), evidenziato da spaziature tra le cellule, cellule di forma rotondeggiante e non adese ed è possibile osservare la presenza delle particelle virali utilizzando un microscopio a fluorescenza. Viene raccomandato un livello di sicurezza di 2 (BL2) nel maneggiare il virus.

## **3.6 PRODUZIONE E TITOLAZIONE DI HCMV**

### **3.6.1 Produzione dello stock virale HCMV Towne**

Per la produzione dello stock virale concentrato di HCMV Towne sono state infettate le cellule permissive al virus con conseguente produzione virale. Alle cellule MRC-5 fatte crescere non a completa confluenza in fiasche T75, è stata aggiunta un'aliquota dello stock virale Towne conservato in azoto liquido corrispondente ad una molteplicità di infezione (MOI) pari a 0.1. Le fiasche sono state incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo circa 10-11 giorni,



osservato il caratteristico effetto citopatico evidenziato dalla presenza di cellule megaliche (ingrandite ed allargate), si procede alla raccolta del virus ed alla sua purificazione. Le cellule infettate sono state distaccate meccanicamente, per mezzo di *scrapers*. La sospensione cellulare è stata riposta in falcon da 50 ml e centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti a 4°C. Il surnatante è stato scartato in quanto il virus in esso contenuto possiede un titolo estremamente basso, mentre il pellet cellulare è stato risospeso in terreno di coltura e sottoposto a tre cicli di shock termico (un ciclo corrisponde a congelamento in azoto liquido per qualche minuto e scongelamento a 37°C per qualche minuto) e successivamente centrifugato (15' a 3000 rpm a 4°C) per eliminare i detriti cellulari. Lo stock virale concentrato è stato aliquotato in tubi da congelamento sterili e riposto a – 80°C e infine conservato in azoto liquido.

### **3.6.2 Determinazione del titolo virale**

La titolazione è stata eseguita mediante saggio delle placche. Sono stati infettati fibroblasti MRC-5 (150.000 cellule/pozzetto), seminati in piastre da 24 pozzetti, con 200 µl delle diluizioni seriali 1:10 dello stock virale da titolare (da 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-8</sup>) e lasciati in incubazione a 37° per 2h prima dell'aggiunta di una matrice di metilcellulosa, usata per impedire al virus di diffondere. Dopo circa 10 giorni le cellule sono state fissate e colorate con cristalvioletto e le placche contate al microscopio. Sono state esaminate solo le cellule infettate con le diluizioni 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>.

### **3.7 INFEZIONE DELLE CELLULE**

Le cellule MRC-5 subconfluenti sono state infettate con HCMV Towne alla MOI desiderata. L'infezione è stata eseguita sostituendo al medium di coltura, un medium privo di siero contenente la diluizione del virus. Dopo 2 ore il medium di infezione è stato rimosso e sostituito con il medium di coltura. Il controllo negativo (*mock*) è stato ottenuto trattando le cellule nello stesso modo senza però l'aggiunta del virus. A 4h, 8h, 24h, 72h dopo l'infezione, le cellule sono state raccolte per l'estrazione dell' RNA totale utilizzato nell'analisi con microarray. Per l'esperimento di replicazione virale e di espressione dei geni virali, le cellule sono state raccolte dopo 1, 3, 5, 7, 11 giorni dopo l'infezione. Per l'analisi della

proliferazione cellulare, le cellule sono state trattate con MTT dopo 0, 1, 3, 5, 7, 11 giorni dopo l'infezione.

### **3.8 TECNICHE DI TRASFEZIONE**

Le cellule HEK 293A giunte a subconfluenza sono state trasfettate con *Lipofectamine*™ 2000 (*Invitrogen, USA*) secondo i protocolli suggeriti dal produttore. Per le linee cellulari difficilmente trasfettabili è stata utilizzata la tecnica della Nucleofezione con *Nucleofector 4D* (*Lonza Cologne GmbH, D*) secondo il protocollo del produttore. Brevemente,  $6 \times 10^5$  cellule MRC-5 sono state risospese nel buffer di nucleofezione del kit P3 for Primary cell in presenza di 5µg di DNA plasmidico, e trasferite nella Nucleocuvetta nello strumento dove sono state trattate con il protocollo di nucleofezione per la linea cellulare NHD; immediatamente dopo la nucleofezione le cellule sono state poste in piastre da *6wells* in normale terreno di coltura. Le cellule THP-1 ( $2 \times 10^6$  cellule) sono state trasfettate utilizzando il kit P3 for Primary cell e il protocollo di nucleofezione per la linea cellulare THP-1; dopo la nucleofezione le cellule sono state lasciate in piastre da *6wells* in terreno di recovery costituito da RPMI 1640 addizionato con FBS (20%), penicillina-streptomina (1%), e amminoacidi non-essenziali (1%) e con 50µM di β-mercapto-etanolo. Dopo 4 ore il medium di recovery è stato sostituito dal normale terreno di coltura.

### **3.9 OTTENIMENTO DI LINEE CELLULARI TRASFETTATE STABILMENTE**

La selezione di cellule MRC-5 trasfettate stabilmente con il plasmide *pSilencer 4.1-CMV Hygro* è stata effettuata aggiungendo l'opportuna concentrazione di antibiotico Igromicina al normale terreno di coltura identificata mediante titolazione dell'igromicina tramite curva di morte cellulare. Le cellule MRC-5 sono state seminate ad una densità di  $5 \times 10^4$  cellule, dopo 24 ore differenti diluizioni di Igromicina da 10 a 1000µg/ml sono state aggiunte alle cellule; le cellule sono state coltivate per 14 giorni sostituendo il medium di coltura ogni due giorni; la concentrazione di utilizzo dell'igromicina su MRC-5 è risultata essere 20µg/ml. La selezione delle cellule MRC-5 è cominciata 48 ore dopo la trasfezione; entro 15 giorni è stata osservata la morte delle cellule non trasfettate

di controllo e ed è iniziato il ripopolamento delle piastre da parte delle cellule MRC-5 stabilmente trasfettate.

### 3.10 ESTRAZIONE E PURIFICAZIONE DELL'RNA CELLULARE

Dal pellet cellulare, è stato estratto l'RNA totale unitamente alla popolazione dei microRNA utilizzando il kit MirVana (*Ambion, USA*), secondo il protocollo del produttore. Per la misurazione quantitativa dell'RNA sintetizzato è stato utilizzato lo spettrofotometro effettuando una lettura a 260 nm (*NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, USA*). La valutazione qualitativa è stata effettuata mediante elettroforesi capillare su gel denaturante utilizzando microchip Agilent su apparecchiatura Agilent 2100 Bioanalyzer (*Agilent Technologies, USA*).

### 3.11 ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA MEDIANTE RT-PCR E REAL-TIME RT-PCR

L' RNA totale è stato trattato con Kit *Turbo DNA-Free™* (*Ambion, USA*) e retrotrascritti mediante MuLV (*Applied Biosystems, USA*).

Mediante real-time RT-PCR sono state valutate le variazioni nell'espressione di alcune varianti di splicing di geni cellulari amplificati utilizzando la metodica del SYBR Green. Le varianti di splicing analizzate sono: FGFR2e2, FGFR2IIIb, FGFR2IIIc, HMGA1, HMGA1 e2, GAPDH, GAPDH e6 ed GAPDH e7. Le sequenze dei primer utilizzati sono riportati in Tabella 4.

Negli esperimenti di time course di infezione, la titolazione di HCMV è stata eseguita mediante real time PCR quantitativa con sonde TaqMan (*Applied Biosystems, U.S.A.*), previa estrazione del DNA con estrattore automatico DNA NucliSens easyMAG (*BioMerieux, Fr*).

L'analisi dell'espressione dei miRNA è stata valutata in rapporto a quella di due normalizzatori appositamente scelti, ovvero i miRNA *housekeeping* RNU6B e RNU48 basandosi sull'impiego di kit *TaqMan® microRNA assay* (*Applied Biosystems, USA*).

**Tabella 4.** Sequenze oligonucleotidiche dei primer utilizzati in Real time-RT PCR per la valutazione dello splicing alternativo di FGFR2 regolato da PTBP1.

Gene	Primer Sense	Primer Antisense	Amplificato (bp)
------	--------------	------------------	------------------

hGAPDH	TTCGACAGTCAGCCGCATCTTCTT	CAGGCGCCCAATACGACCAAATC	110
hGAPDH e 6	GTGGAGTCCACTGGCGTCTTC	CTGATGATCTTGAGGCTGTTGTCA	158
hGAPDH e7	CAATGCCTCCTGCACCACCAACT	AGCGCCAGTAGAGGCAGGGATGAT	196
hHMGA1	CCCAGCGAAGTGCCAACACCTAAG	GCCCTCCTCTTCCTCCTTCTCCAGT	150
hHMGA1e2	GACTCCGAGCCGGGGCTATTCTG	CGGTGCTGGGCGCTGAGGAC	111
hFGFR2e6	TCCATCAATCACACGTACCACCTG	ACTCTACGTCTCCTCCGACCACTG	112
hFGFR2IIIb	AAGTGCTGGCTCTGTCAATGT	GTAGTCTGGGAAGCTGTAATCTC	161
hFGFR2IIIc	TGAGGACGCTGGGAATATACG	TAGTCTGGGAAGCTGTAATCTCCT	123

### 3.12 ANALISI DI ESPRESSIONE MEDIANTE MICROARRAY

#### 3.12.1 Analisi mediante microarray di espressione dei miRNA

È stato analizzato il profilo di espressione dei miRNA virali e cellulari, utilizzando la tecnologia Agilent; in particolare, la versione di microarray utilizzata è la *Human miRNA Microarray Kit (V2)*, contenente 866 sonde per miRNA umani e 89 per miRNA virali, mentre la marcatura dei campioni è stata eseguita con il sistema monocolor miRNA Complete Labeling and Hybridization Kit, contenente la cianina Cy3. Il protocollo di analisi dei microarray avviene su RNA totale comprendente la popolazione dei miRNA, in una quantità di partenza pari a 100 ng. Il metodo di marcatura prevede la ligazione della cianina Cy3 al 3' delle molecole di RNA del campione che avviene per 2 ore a 16°C. Dopo una fase di purificazione su colonnina, il campione viene seccato in una centrifuga a vuoto, risospeso in acqua RNase-free e buffer di ibridazione, vengono saturati i siti di legame aspecifico e dopo un'incubazione a 100°C per 5 minuti il campione è pronto per l'ibridazione; una volta assemblata la camera di ibridazione, essa viene posta in un forno per 20 ore a 55°C, in rotazione a 20 rpm. La scansione viene effettuata sullo *Scanner Agilent G2565 (Agilent Technologies, USA)*.

#### 3.12.2 Analisi mediante microarray di espressione genica

L'analisi dell'espressione dell' mRNA è stata effettuata utilizzando il kit Two-color Microarray-Based Gene Expression Analysis. Il campione è stato marcato con le cianine Cy5 e Cy3 utilizzando il kit Agilent RNA Spike -In. Gli esperimenti sono stati effettuati in duplicato ed è stata applicata l'inversione dei

fluorofori. La scansione è stata eseguita con il *scanner Agilent G2565 C* ( *Agilent Technologies, USA* ).

### **3.12.3 Analisi statistica dei microarray**

Per identificare i miRNA con espressione differenziale nelle cellule infettate da HCMV rispetto a quelle di controllo, nelle serie temporale, è stato impiegato il metodo di analisi sviluppato da Di Camillo e collaboratori (descritto in dettaglio in Di Camillo et al, *BMC Bioinformatics* 2007), che considera un gene essere differenzialmente espresso in modo statisticamente significativo quando l'area tra i profili delle serie temporali delle curve di espressione ha dimensioni superiori ad un livello soglia  $\theta$  (ovvero la dimensione dell'area che si ottiene nel caso di "ipotesi zero", cioè di geni non differenzialmente espressi). In un primo momento, per la selezione dei miRNA e degli mRNA statisticamente significativi si è adottato un P-value  $< 0.05$ , il quale è stato successivamente modificato applicando il metodo di correzione della *False Discovery Rate* (FDR), grazie al quale è stata incrementata la stringenza della selezione. Sui geni differenzialmente espressi è stata inoltre eseguita un'analisi di clustering gerarchico, al fine di raggruppare i miRNA con simile profilo temporale di espressione

## **3.13 PREDIZIONE DEI TARGET DI MIRNA DI HCMV**

### **3.13.1 Predizione bioinformatica dei target dei miRNA di HCMV**

La predizione bioinformatica dei target è stata effettuata con un software creato appositamente dal gruppo presso cui è stata sviluppata questa tesi integrando le predizioni di tre algoritmi esistenti Miranda, Pita e RNAHybrid. I tre sistemi basano le predizioni sul calcolo dell'energia libera sfruttando tre principi differenti. Le predizioni ottenute da questi tre algoritmi sono state integrate al fine di ottenere un *consensus* che possa incrementarne la validità predittiva. L'analisi, eseguita attraverso i tre programmi esistenti, è stata effettuata su una banca dati creata in house, che raccoglie tutte le sequenze 3' UTR di tutti i trascritti umani, selezionate a partire dal codone di stop di ciascun gene fino ad un massimo di 1000 nucleotidi a valle, e ottenute da *genebank*. Una volta effettuate le predizioni con i tre algoritmi, è stato utilizzato un ulteriore script, sviluppato in house, che permette di uniformare le predizioni dei tre software, determinando delle soglie di

cut-off per i valori di energia di legame, basate sulla percentuale in coppie CG, presenti nelle sequenze dei microRNA analizzati le quali rendono più stabile l'ibrido miRNA-target. Infine per ogni risultato che superi il valore soglia, e che sia predetto da almeno due dei tre algoritmi, è stata indagata l'eventuale presenza di siti di legame multipli nella stessa sequenza 3'UTR, per uno stesso miRNA.

### 3.13.2 Predizione dei target dei miRNA di HCMV mediante correlazione dell'espressione dei miRNA virali con mRNA cellulari

Partendo dai geni differenzialmente espressi in corso di infezione, sono stati correlati i profili temporali dei gene cellulari e dei miRNA virali utilizzando la correlazione statistica di *Pearson*. La selezione dei geni bersaglio significativamente negativamente correlati all'espressione dei miRNA virali è stata effettuata utilizzando una soglia su valori *p* pari a 0,05. L'analisi statistica dei dati ottenuti con i microarray è stata eseguita dal gruppo della Prof.ssa Di Camillo (Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione, Università di Padova, Padova).

### 3.14 SAGGIO DI ATTIVITÀ DELLA LUCIFERASI

Le sequenze 3'UTR dei geni bersaglio dei miRNA HCMV-miR-US25-2-3p e HCMV-miR-US25-2-5p, e le sequenze degli oligonucleotide sponge anti-HCMV-miR-US25-2-3p e sponge anti- HCMV-miR-US25-2-3p mutato sono stati clonati nel plasmide pmirGLO Dual Luciferase miRNA Target Expression Vector (*Promega, USA*). I prodotti di PCR (realizzate con le coppie di primer indicate in Tabella 5) sono stati purificati con kit QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen, Germania*), e digeriti con gli enzimi di restrizione (New England Biolabs, USA) per il clonaggio nel plasmide.

**Tabella 5.** Sequenze nucleotidiche dei primers utilizzati per amplificare in PCR le sequenze 3'UTR dei geni cellulari bersaglio dei miRNA HCMV-miR-US25-2-3p e HCMV-miR-US25-2-5p e le sequenze degli oligonucleotide sponge anti- HCMV-miR-US25-2-3p e anti- HCMV-miR-US25-2-3p mutato.

Gene	Primer Sense	Primer Antisense	Siti di taglio
HDAC11	GAGAGAGCTCCTCCTACTT TTCCCTGCTGGAAG	GAGACTCGAGATAGAGAT CCTCGCTGCCCTCT	SacI/ XhoI
PTBP1	GAGAGAGCTCCTTCTCCAA	GAGACTCGAGTGGAATA	SacI /XhoI

	GTCCACCATCTAGGG	TTGCTAGGCACAGACG	
IFI30	GAGATCTAGACCTTACCCT TGCTGCCAGTTGTA	GAGAGTCGACCATGGGGT GGAATTTTGTGTATC	XbaI/SalI
FAS	GAGAGAGCTCCAGTTACTG AACAGGCAGGC	GAGACTCGAGTGGTTCCAG GTATCTGCTTCAG	ScaI/XhoI
CD68	GAGAGAGCTCGCCCTGGT GCTTATTGCTTTC	GAGACTCGAGGCAGGACA AGGAAAACCCCG	SacI/XhoI
Sponge-anti- miR-US25-2- 3p	GAGATCTAGAGCTGGTTTA GTGAACCGTGG	GAGAGTCGACCTAGCGGC CGCATACAAAAA	XbaI/SalI
Sponge Anti- miR-US25-2- 3p mutata	GAGATCTAGAGCTGGTTTA GTGAACCGTGG	GAGAGTCGACCTAGCGGC CGCATACAAAAA	XbaI/SalI

Il saggio della luciferasi è stato effettuato su cellule HEK 293A trasfettate con 400ng di plasmide e 3pmoli di *pre-miR* (Ambion, US), con 1µl di *Lipofectamine*<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen, USA). Dopo 48 ore le cellule sono state lisate e addizionate dei substrati per la luciferasi con il kit *Dual-Glo Luciferase Assay System* (Promega, USA.) e analizzate al luminometro. I valori di intensità dell'emissione luminosa della luciferasi sono stati confrontati con il test statistico *t-Student*.

### 3.15 ANALISI DELL'ESPRESSIONE PROTEICA TRAMITE WESTERN BLOT

#### 3.15.1 Estrazione delle proteine da pellet cellulare e determinazione della concentrazione proteica totale

Il pellet di cellule HEK 293-A è stato risospeso in 250µl di *M-PER*<sup>TM</sup> *Mammalian Protein Extraction Reagent* (Pierce-Thermo Scientific, USA) in presenza di un cocktail di inibitori delle proteasi *Halt*<sup>TM</sup> *Combined Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktails* (Thermo Scientific, USA); i lisati così ottenuti sono stati sottoposti alla misurazione della concentrazione proteica con il kit *Pierce BCA*<sup>TM</sup> *Protein Assay Kit* (Pierce-Thermo Scientific, USA).

#### 3.15.2 Western blot

I lisati cellulari sono stati sottoposti ad elettroforesi monodimensionale SDS-PAGE e successivo trasferimento su una membrana PDVF (*Biorad, USA*). Al termine del trasferimento la membrana è stata saturata a temperatura ambiente con una soluzione al 5% v/v di albumina di siero bovino (BSA), 0.1% v/v di Tween e TBS (Tris Base 50mM, NaCl 150mM, pH 7.4-7.6), e successivamente è stata incubata con l'anticorpo primario diluito nella soluzione saturante; in seguito ai lavaggi effettuati in TBS con 0,1% v/v di Tween, le membrane sono state incubate per un' ora con l'anticorpo secondario diluito nella soluzione saturante. Le diluizioni e i tempi di incubazione degli anticorpi utilizzati sono riportati nella Tabella 6. La rivelazione è stata effettuata al *Versa Doc (Bio-Rad, USA)* o su lastra autoradiografica (*Sigma-Aldrich, USA*), in presenza del substrato *Lite@Blot (Euroclone Life Science, IT)*. Il livello di espressione delle proteine è stato misurato tramite analisi densitometrica utilizzando il software Image J.

**Tabella 6.** Lista e diluizioni degli anticorpi utilizzati in Western blot per la valutazione dell'espressione proteica di HDAC11, PTBP1, HDAC4, CD68 e Fas.

<b>Anticorpo primario</b>	<b>Diluizione</b>	<b>e</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>secondario</b>	<b>diluizione</b>
	<b>tempo</b>	<b>di</b>	<b>HRP-coniugato</b>		
	<b>incubazione</b>				
rabbit-Anti-HDAC11 ( <i>ab47036</i> <i>Abcam, UK</i> )	1:400 4°C	<i>overnight</i>	goat-Anti-rabbit <i>Abcam, UK</i> )	( <i>ab6721</i> )	1:3000
mouse-Anti-HnRNP1 (PTBP1) ( <i>sc-56701</i> <i>Santa Cruz</i> <i>Biotechnology, USA</i> )	1:100 4°C	<i>overnight</i>	goat-Anti-mouse <i>Santa Cruz Biotechnology,</i> <i>USA</i> )	( <i>sc-2005</i> )	1:2000
rabbit-Anti-HDAC4 ( <i>ab32534</i> <i>Abcam, UK</i> )	1:400 4°C	<i>overnight</i>	goat-Anti-rabbit <i>Abcam, UK</i> )	( <i>ab6721</i> )	1:3000
mouse –anti- CD68 ( <i>sc-17832</i> <i>Santa Cruz Biotechnology, CA,</i> <i>USA</i> )	1:100 4°C	<i>overnight</i>	goat-Anti-mouse <i>Abcam, UK</i> )	( <i>ab97023</i> )	1:5000
rabbit polyclonal to FAS ( <i>sc-715</i> <i>Santa Cruz Biotechnology, CA,</i> <i>USA</i> ),	1:300 1ora T.A.		goat- Anti-rabbit <i>Abcam, UK</i> )	( <i>Abcam,</i>	1:3000
mouse-anti-β-actin (A5441 <i>Sigma-Aldrich, USA</i> )	1:5000 1ora T.A.		goat-Anti-mouse <i>Abcam, UK</i> )	( <i>ab97023</i> )	1:10000
rat-anti-α-tubulin (ADB <i>Serotech</i> ,)	1:1000 1ora T.A.		goat-Anti-rat <i>Santa Cruz, USA</i> )	( <i>sc-2006</i> )	1:10000



### **3.16 SAGGIO DI PROLIFERAZIONE CELLULARE ( MTT )**

Le cellule MRC5 e MRC5 *anti-miR-US25-2-3p* sono state seminate in una piastra a 96 pozzetti ad una densità di  $7 \times 10^4$  cellule. Il giorno prima e 2 , 5 e 7 giorni dopo l'infezione sono state trattate con 5mg/ml di Thiazol Blu Tetrazolium Bromuro (MTT) (*Sigma-Aldrich, USA*) , e dopo 4 ore di incubazione a 37 ° C, sono stati trattati con 100µl di una soluzione di 10 % SDS e 0,01 N HCl; dopo 3 ore di incubazione a 37°C , è stata letta l'assorbanza a 620 nm. I valori di proliferazione cellulare sono stati confrontati con il test t di Student.

## CAPITOLO 4

### RISULTATI

In questo studio è stato analizzato in parallelo il profilo temporale di espressione degli mRNA cellulari e dei miRNA cellulari e virali in fibroblasti umani infettati da HCMV mediante analisi dei mRNA e dei miRNA microarray; è stato applicato un metodo combinato di predizione bioinformatica e di analisi dell'espressione di miRNA e potenziali mRNA target ottenuti dall'esperimento con microarray per identificare potenziali target dei miRNA di HCMV; sono stati validati sperimentalmente alcuni dei target predetti ed è stato dimostrato che hcmv-miR-US25-2-3p inibisce l'espressione di PTBP1, una proteina coinvolta nello splicing, e aumenta la sua stessa replicazione.

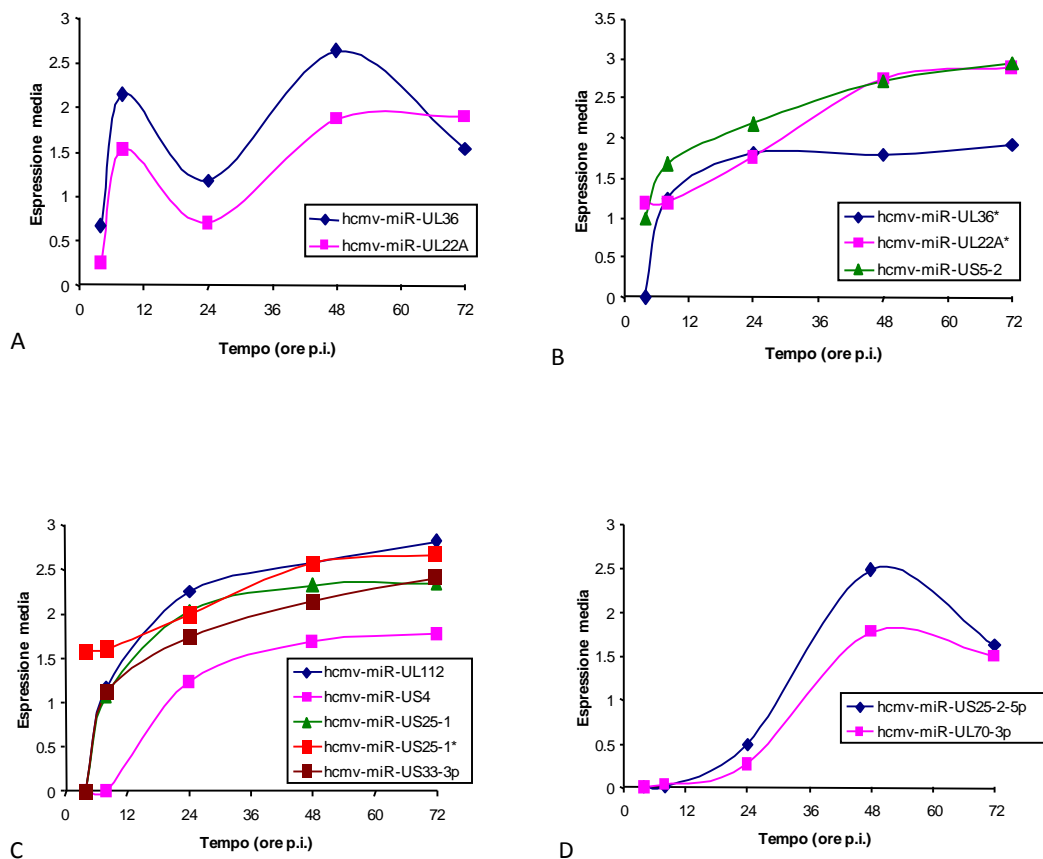
#### **4.1. STUDIO DELLA CINETICA DI ESPRESSIONE DEI miRNA DI HCMV**

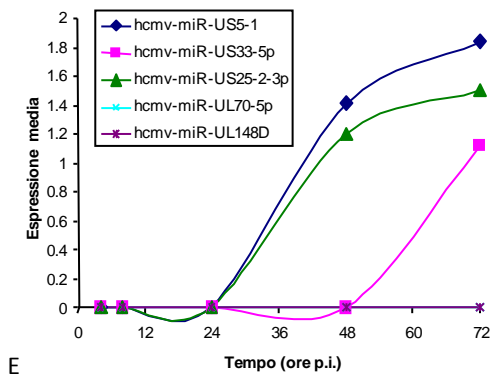
Per lo studio della cinetica di espressione dei miRNA di HCMV sono state seminate  $10^5$  cellule MRC-5 in terreno di coltura completo; dopo 24 ore sono state infettate in terreno di coltura privo di siero contenente la diluizione del virus corrispondente ad una M.O.I. 2. Il controllo negativo è stato ottenuto trattando le cellule nello stesso modo senza però l'aggiunta del virus (*mock infection*). Dopo 2 ore il medium di infezione è stato rimosso e sostituito con il medium di coltura. Le cellule sono state raccolte 4, 8, 24, 48, e 72 ore post-infezione. È stato estratto l'RNA totale comprendente anche i miRNA.

I miRNA di HCMV analizzati sono stati: miR-UL22A, miR-UL36, miR-UL112, miR-U148D, miR-UL70-1-3p, miR-UL70-1-5p, miR-US5-2, miR-US5-1, miR-US4, miR-US25-2-3p, miR-US25-2-5p, miR-US25-1, miR-US33-3p, miR-US33-5p, miR-UL22a\*, miR-UL36\*, miR-US25-1\*.

È stato analizzato il profilo di espressione dei miRNA virali, utilizzando la tecnologia Agilent; in particolare, la versione di microarray utilizzata è la *Human miRNA Microarray Kit (V2)* (Agilent, USA), contenente 866 sonde per miRNA umani e 89 per miRNA virali.

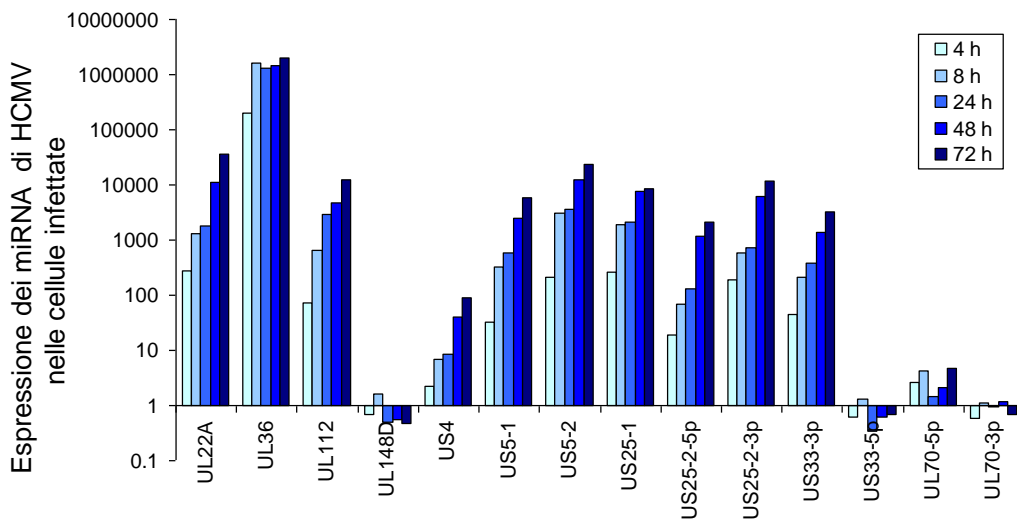
Durante l'infezione, i diversi miRNA virali hanno dimostrato differenti cinetiche di espressione. In particolare, i miR-UL36, miR-UL36\*, miR-UL22A, miR-UL22A\* e miR-US5-2, erano già espressi nelle fasi più precoci dell'infezione a partire dalle 4 ore p.i.; ma, mentre l'espressione di miR-US5-2, miR-UL36\* e miR-UL22A\* aumentava progressivamente nel tempo (Figura 10.A), miR-UL36 e miR-UL22A, mostrano un'espressione bifasica, raggiungendo un picco nelle 8 ore immediatamente successive all'infezione e, nuovamente, a 48 ore p.i., per poi decrescere a 72 ore p.i. (Figura 10.B). Altri miRNA erano espressi nelle fasi precoci del ciclo virale: miR-UL112, miR-US25-1, miR-US25-1\* e miR-US33-3p, erano rilevabili a 8 ore p.i., miR-US4 a 24 ore p.i., e progressivamente si accumulavano nel tempo dell'esperimento (Figura 10.C). miR-UL70-1-3p e miR-US25-2-5p raggiungevano il picco massimo di espressione a 48 ore dall'infezione, per poi calare (Figura 10.D); infine anche i miRNA miR-US25-2-3p, miR-US5-1 e miR-US33-5p mostravano un cinetica di espressione tardiva, essendo rilevabili a partire dalle 48-72 ore dall'infezione (Figura 10.E.)





**Figura 10.** Espressione dei microRNA di HCMV ottenuta tramite analisi con la tecnica dei microarray. L'analisi è stata effettuata su cellule MRC-5 infettate con il ceppo Towne HCMV con MOI 2.

A scopo di confermare i risultati ottenuti mediante la tecnica dei microarray, è stato effettuata l'analisi di *real-time* RT-PCR. L'espressione dei miRNA è stata rilevata con l'impiego di kit *TaqMan*<sup>®</sup> *microRNA assay* (Applied Biosystems, USA). L'espressione dei miRNA virali è stata valutata in rapporto a quella di due normalizzatori i miRNA cellulari *housekeeping* RNU6B e RNU48.

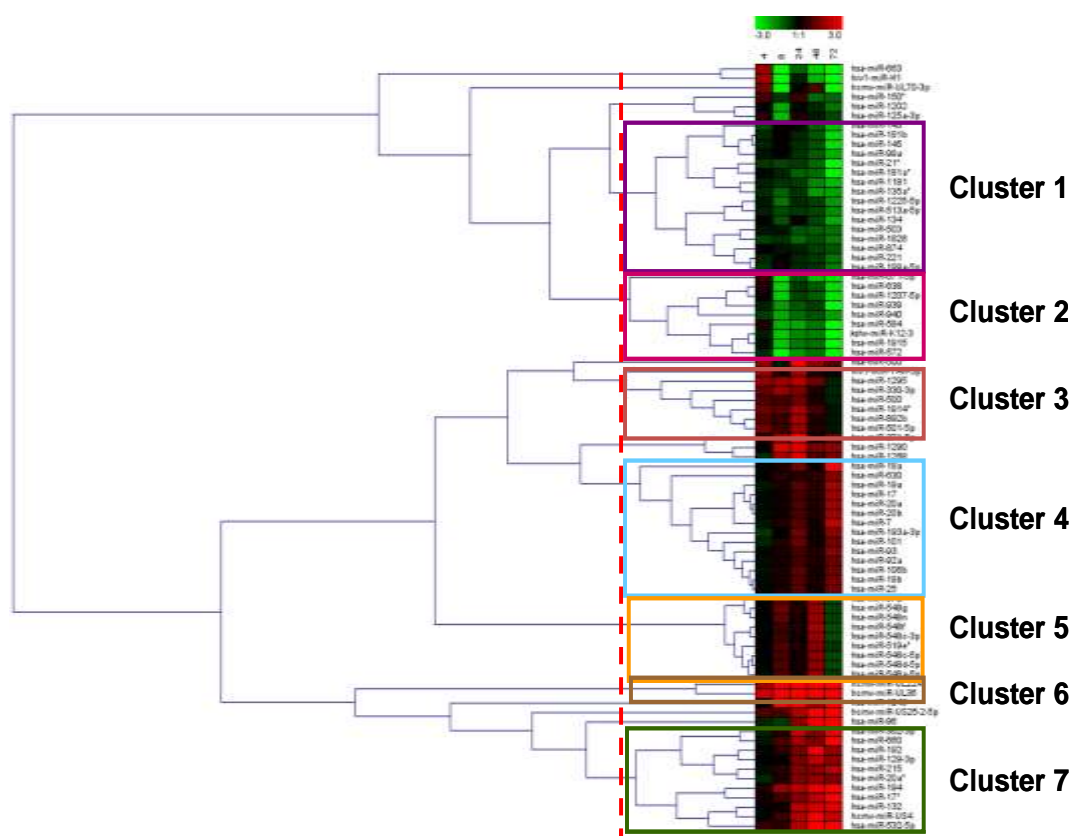


**Figura 11.** Analisi mediante Real Time RT-PCR dell'espressione dei miRNA di HCMV, in cellule MRC-5 infettate con il ceppo di HCMV Towne con MOI 2.

L'integrazione dei risultati ottenuti con microarray e real time RT-PCR ha mostrato il profilo cinetico di espressione miRNA durante l'infezione litica. Il maggior numero di miRNA di HCMV è viene espresso nelle prime fasi o entro 24 ore dalla insorgenza dell'infezione e continua ad accumularsi nel tempo. In particolare, miR-UL22A, miR-UL36, e miR-US5-2, miR-US25-1 e miR-US25-2-3p sono fortemente espressi a partire dalle fasi precosissime dell'infezione a 4 ore pi; miR-UL112, miR-US5-1, miR-US25-2-5p, miR-US4 e miR-US33-3p raggiungono un picco di espressione nella fase precoce dell'infezione. I miRNA miR-UL-70-1-3p, miR-US33-5p e miR-UL148D non erano rilevabili durante tutto il corso dell'esperimento (Figura 11).

#### **4.2 EFFETTO DELL'INFEZIONE DA HCMV SULL'ESPRESSIONE DEI microRNA CELLULARI**

Per studiare l'effetto dell'infezione da HCMV sull'espressione dei miRNA cellulari, le cellule MRC-5 sono state infettate con il ceppo Towne HCMV con una M.O.I. pari a 2; a 4, 8, 24, 48, 72 ore p.i. è stato raccolto l'RNA totale, comprendendo la popolazione dei miRNA, ed è stato analizzato con la tecnica dei microarray utilizzando *Human miRNA Microarray Kit (V2) (Agilent, USA)*. L'esperimento di infezione è stato eseguito in parallelo ad una falsa infezione (*mock infection*), utilizzata come controllo negativo su cui eseguire l'analisi statistica. I dati ottenuti dall'analisi dei microarray sono stati confrontati statisticamente con analisi di clustering con il metodo ANOVA. Su questi miRNA è stata eseguita analisi di clustering gerarchico al fine di identificare gruppi di miRNA cellulari con simile profilo temporale di espressione (Figura 12).

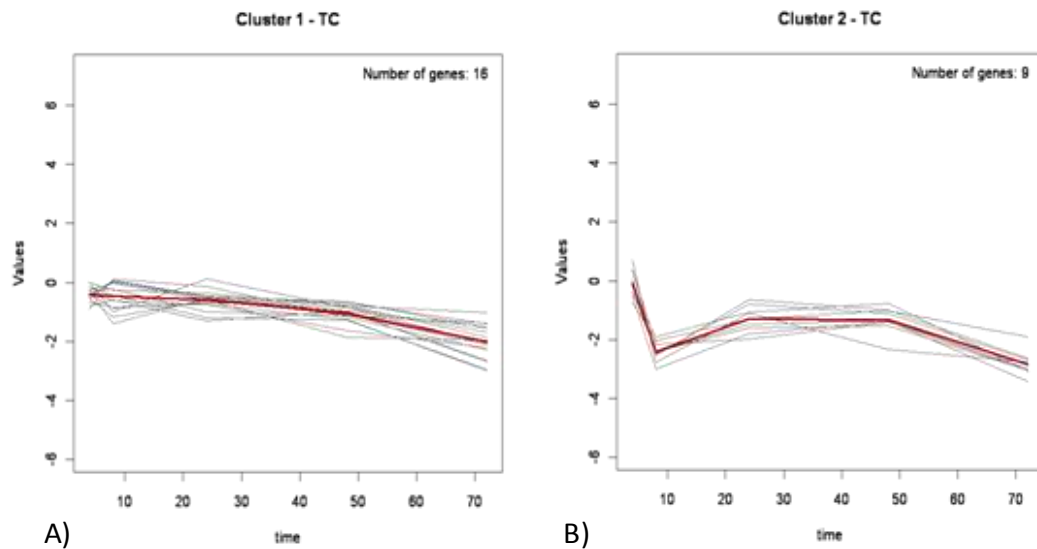


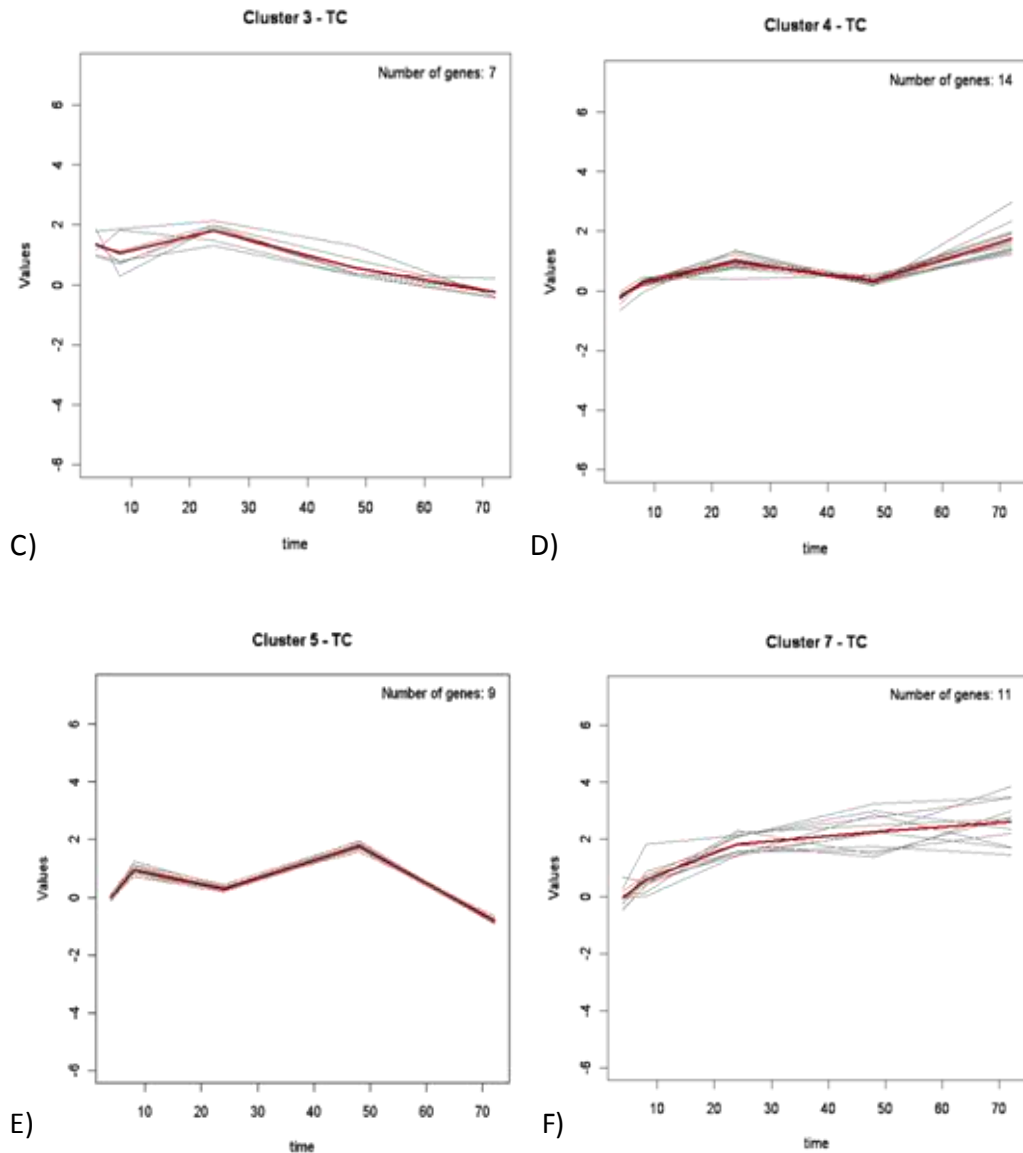
**Figura 12.** Clustering gerarchico dei microRNA modulati dall'infezione da HCMV.

Sono stati identificati 6 cluster:

- Il CLUSTER 1 comprende i miRNA gradualmente sottoespressi, specialmente a tempi tardivi dopo l'infezione: miR-143, miR-145, miR-181a\*, miR-181b, miR-199a-5p, miR-221, miR-99a, miR-21\*, miR-1181, miR-1225-5p, miR-513a-5p, miR-134, miR-503, miR-1826, miR-874 (Figura 13.A).
- Il CLUSTER 2 comprende i miRNA sottoespressi nelle fasi precoci dell'infezione: miR-671-5p, miR-638, miR-1207-5p, miR-939, miR-940, miR-584, miR-1915, miR-572 (Figura 13.B).
- Il CLUSTER 3 comprende i miRNA che subiscono una sovraespressione transiente a 24 ore post-infezione: miR-330-3p, miR-500, miR-501-5p, miR-892b, miR-1914\*, miR-1295 (Figura 13.C).

- Il CLUSTER 4 comprende microRNA che mostrano un profilo di espressione bimodale, in quanto sono sovraespressi in modo transiente a 24 ore post-infezione, e poi sono, nuovamente, notevolmente sovraespressi a 72 ore dall'infezione: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-20b, miR-92a, miR-106b, miR-93, miR-25; miR-630, miR-7, miR-193-2p, miR-101 (Figura 13.D).
- Il CLUSTER 5 comprende i miRNA che sono sovraespressi in modo transiente a 48 ore dopo l'infezione, ma che, al tempo di infezione di 72h, sono significativamente sottoespressi: miR-570, miR-519, miR-548 (Figura 13.E).
- Il CLUSTER 7 comprende i microRNA che sono notevolmente sovraespressi nelle fasi precoci, a 24 ore dall'infezione: miR-192, miR-194, miR-215, miR-129-3p, miR-132, miR-362-3p, miR-660, miR-17\*, miR-20a\*, miR-532-5p (Figura 13.F).





**Figura 13.** Cluster di microRNA cellulari modulati dall'infezione di HCMV Towne con MOI 2.  $p$ -value <0.05.

### 4.3 IDENTIFICAZIONE DEI TARGET DEI MIRNA DI HCMV

#### 4.3.1 Analisi computazionale per la predizione dei target dei microRNA di HCMV

Per la ricerca ed identificazione dei potenziali geni target umani e virali, dei microRNA del citomegalovirus umano, è stato applicato il metodo *meta-consensus* da noi sviluppato, il quale ha consentito di incrementare la sensibilità e la specificità predittiva degli algoritmi Pita, MiRanda e RNA-Hybrid. Una volta



effettuate le predizioni con i tre algoritmi, è stato utilizzato un ulteriore algoritmo sviluppato *in house*, che permette di uniformare le predizioni dei tre software. Questo algoritmo determina delle soglie di *cut-off* per i valori di energia di legame, basate sulla percentuale di coppie CG presenti nelle sequenze dei miRNA analizzati; inoltre, per ogni risultato superiore al valore soglia e predetto da almeno due dei tre algoritmi, è stata indagata l'eventuale presenza di siti di legame multipli per uno stesso miRNA nella stessa sequenza 3' UTR. Il sistema è stato applicato a tutte le sequenze 3'UTR umane e virali: nella Tabella 7 è riportato il numero di tutti i target predetti per ogni miRNA di HCMV.

**Tabella 7.** Numero di geni cellulari a virali bersaglio dei miRNA di HCMV predetti con sistema bioinformatico.

<b>HCMV miRNA</b>	<b>N. target umani</b>	<b>N. target virali</b>
miR-UL22A	1	4
miR-UL22A*	67	23
miR-UL36	4	14
miR-UL36*	84	34
miR-UL70-3p	16	15
miR-UL70-5p	76	24
miR-UL148D	36	45
miR-UL112	200	20
miR-US4	50	25
miR-US5-1	3	3
miR-US5-2	15	34
miR-US25-1	4	4
miR-US25-1*	4	7
miR-US25-2-3p	70	20
miR-US25-2-5p	144	73
miR-US33-3p	2	6
miR-US33-5p	15	10

Tra i miRNA codificati da HCMV, è stato studiato il microRNA hcmv-miR-US25-2-3p, per il quale è stato suggerito il coinvolgimento nella replicazione virale [Stern-Ginossar et al. 2009]. I target cellulari del miRNA hcmv-miR-US25-2-3p sono stati riportati nella Tabella 8, mentre in appendice sono riportate le

descrizioni di tutti i target cellulari e virali predetti per tutti i microRNA di citomegalovirus umano analizzati in questo studio.

**Tabella 8.** Descrizione dei target del miRNA hcmv-miR-US25-2-3p predetti tramite l'algoritmo *metaconsensus*, sviluppato *in house*, che integra le predizioni dei tre algoritmi Miranda, RNAhybrid e Pita (vengono riportati anche il numero di siti di legame multipli individuati dai tre algoritmi).-

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-33)	RNAhybrid (-34)	Pita (-20)
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita:</i>				
NM_001135672	Homo sapiens solute carrier family 25, member 44 (SLC25A44), transcript variant 2, mRNA.	8	4	6
NM_002613	Homo sapiens 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDPK1), transcript variant 1, mRNA.	13	3	5
NM_014655	Homo sapiens solute carrier family 25, member 44 (SLC25A44), transcript variant 1, mRNA.	8	4	6
NM_015395	Homo sapiens tectonin beta-propeller repeat containing 1 (TECPR1), mRNA.	7	3	1
NM_020751	Homo sapiens component of oligomeric golgi complex 6 (COG6), transcript variant 1, mRNA.	1	2	1
NM_031268	Homo sapiens 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDPK1), transcript variant 2, mRNA.	13	3	5
NM_033102	Homo sapiens solute carrier family 45, member 3 (SLC45A3), mRNA.	5	4	2
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_001008693	Homo sapiens cystatin 9 (testatin) (CST9), mRNA.	3	4	2
NM_001077238	Homo sapiens signal peptide peptidase-like 2B (SPPL2B), transcript variant 3, mRNA.	6	3	1
NM_001085454	Homo sapiens G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 1 (GIT1), transcript variant 1, mRNA.	5	4	1
NM_001136041	Homo sapiens histone deacetylase 11 (HDAC11), transcript variant 2, mRNA.	7	9	2
NM_001144900	Homo sapiens Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 7 (SMCR7), transcript variant 3, mRNA.	12	2	2
NM_001347	Homo sapiens diacylglycerol kinase, theta 110kDa (DGKQ), mRNA.	10	4	4
NM_001466	Homo sapiens frizzled homolog 2 (Drosophila) (FZD2), mRNA.	1	1	0
NM_002819	Homo sapiens polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1), transcript variant 1, mRNA.	7	4	1
NM_003025	Homo sapiens SH3-domain GRB2-like 1 (SH3GL1), mRNA.	8	1	0
NM_003496	Homo sapiens transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP), mRNA.	2	1	2
NM_004822	Homo sapiens netrin 1 (NTN1), mRNA.	12	4	3
NM_005170	Homo sapiens achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila) (ASCL2), mRNA.	5	4	1
NM_006037	Homo sapiens histone deacetylase 4 (HDAC4), mRNA.	9	3	1
NM_006332	Homo sapiens interferon, gamma-inducible protein 30 (IFI30), mRNA.	1	1	1
NM_006651	Homo sapiens complexin 1 (CPLX1), mRNA.	12	2	0
NM_012384	Homo sapiens glucocorticoid modulatory element binding protein 2 (GMEB2), mRNA.	11	2	3
NM_014030	Homo sapiens G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 1 (GIT1), transcript variant 2, mRNA.	5	4	1
NM_014747	Homo sapiens regulating synaptic membrane exocytosis 3 (RIMS3), mRNA.	8	4	2
NM_014869	Homo sapiens IQ motif and Sec7 domain 1 (IQSEC1), transcript variant 2, mRNA.	6	1	3
NM_015144	Homo sapiens zinc finger, CCHC domain containing 14 (ZCCHC14), mRNA.	4	2	2
NM_015154	Homo sapiens mesoderm development candidate 2 (MESDC2), mRNA.	2	1	1
NM_016352	Homo sapiens carboxypeptidase A4 (CPA4), mRNA.	3	1	0
NM_020184	Homo sapiens cyclin M4 (CNNM4), mRNA.	6	4	2

NM_022006	Homo sapiens FXYD domain containing ion transport regulator 7 (FXYD7), mRNA.	3	2	0
NM_024015	Homo sapiens homeobox B4 (HOXB4), mRNA.	7	4	1
NM_024827	Homo sapiens histone deacetylase 11 (HDAC11), transcript variant 1, mRNA.	7	9	2
NM_031990	Homo sapiens polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1), transcript variant 2, mRNA.	7	4	1
NM_031991	Homo sapiens polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1), transcript variant 3, mRNA.	7	4	1
NM_032108	Homo sapiens sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6B (SEMA6B), mRNA.	13	7	1
NM_032753	Homo sapiens retina and anterior neural fold homeobox 2 (RAX2), mRNA.	11	4	3
NM_032875	Homo sapiens F-box and leucine-rich repeat protein 20 (FBXL20), mRNA.	1	1	2
NM_033131	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 3A (WNT3A), mRNA.	23	9	0
NM_058169	Homo sapiens loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1 (LOH12CR1), mRNA.	4	3	5
NM_080552	Homo sapiens solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1 (SLC32A1), mRNA.	6	2	1
NM_138349	Homo sapiens tumor protein p53 inducible protein 13 (TP53I13), mRNA.	4	1	2
NM_138360	Homo sapiens leucine rich repeat containing 16B (LRRCL16B), mRNA.	3	1	0
NM_144696	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 125 (C1orf125), transcript variant 1, mRNA.	1	1	0
NM_152362	Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1 (TNFAIP8L1), mRNA.	4	3	2
NM_152988	Homo sapiens signal peptide peptidase-like 2B (SPPL2B), transcript variant 2, mRNA.	9	5	1
NM_173050	Homo sapiens signal peptide, CUB domain, EGF-like 1 (SCUBE1), mRNA.	5	2	1
NM_175847	Homo sapiens polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1), transcript variant 4, mRNA.	7	4	1
NM_175922	Homo sapiens proline rich 18 (PRR18), mRNA.	7	1	1
NM_176677	Homo sapiens hypothetical protein FLJ36208 (FLJ36208), mRNA.	7	4	1
NM_194326	Homo sapiens ribosomal protein S19 binding protein 1 (RPS19BP1), mRNA.	4	4	1
NM_198207	Homo sapiens LAG1 homolog, ceramide synthase 1 (LASS1), transcript variant 2, mRNA.	12	3	0
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da RNAhybrid e Pita:</i>				
NM_014957	Homo sapiens DENN/MADD domain containing 3 (DENND3), mRNA.	5	3	3
NM_183376	Homo sapiens arrestin domain containing 4 (ARRDC4), mRNA.	1	3	2
NM_198406	Homo sapiens progesterone and adiponectin receptor family member VI (PAQR6), transcript variant 2, mRNA.	3	4	1

### 4.3.2 Analisi mediante tandem array per l'identificazione dei target dei miRNA di HCMV

È stato adottato un secondo sistema di predizione di target cellulari per i miRNA virali. In questo caso la predizione basata sulla complementarità delle sequenze target con i rispettivi miRNA è stata implementata con la correlazione dei profili di espressione dei trascritti cellulari con i profili cinetici di espressione dei miRNA di HCMV.

Le cellule MRC-5 subconfluenti sono state infettate con HCMV Towne alla MOI 2, il controllo negativo (*mock*) è stato ottenuto trattando le cellule nello stesso modo senza però l'aggiunta del virus. A 4h, 8h, 24h, 72h dopo l'infezione, le cellule sono state raccolte per l'estrazione dell' RNA totale. È stato analizzato il profilo di espressione dei miRNA virali e cellulari, utilizzando la versione di microarray utilizzata è la *Human miRNA Microarray Kit (V2)*. L'analisi dell'espressione dell'mRNA è stata effettuata utilizzando il kit Two-color Microarray-Based Gene Expression Analysis. Il campione è stato marcato con le cianine Cy5 e Cy3 utilizzando il kit Agilent RNA Spike -In. Gli esperimenti sono stati effettuati in duplicato ed è stata applicata l'inversione dei fluorofori. La scansione è stata eseguita con lo scanner Agilent G2565 C (Agilent Technologies, USA).

Partendo dai geni differenzialmente espressi in corso di infezione, sono stati correlati i profili temporali dei geni cellulari e dei miRNA virali utilizzando la correlazione statistica di *Pearson*. La selezione dei geni bersaglio negativamente correlati all'espressione dei miRNA virali in modo statisticamente significativo è stata effettuata utilizzando una soglia su valori *p* pari a 0,05. Nella Tabella 9 sono descritti, come esempio, i trascritti cellulari la cui espressione decresce in modo significativo in relazione alla sovra-espressione del miRNA hcmv-miR-US25-2-5p.

**Tabella 9.** Vengono riportati i target cellulari del miRNA hcmv-miR-US25-2-5p individuati mediante la predizione bioinformatica di sequenza e la correlazione dei profili di espressione dei miRNA virali e dei trascritti cellulari in seguito ad infezione di cellule MRC-5 con HCMV Towne.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Pearson p.value
NM_030641	apolipoprotein L, 6	0,000328
NM_080881	drebrin 1	0,00189
NM_001078172	family with sequence similarity 127, member B	0,002087
NM_003102	superoxide dismutase 3, extracellular	0,003092
NM_014853	small G protein signaling modulator 2	0,004867
NM_016606	receptor accessory protein 2	0,005465
NM_001448	glypican 4	0,005561
NM_001031849	mannan-binding lectin serine peptidase 1 (C4/C2 activating component of Ra-reactive factor)	0,005827
NM_006476	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit G	0,006505

NM_001251	CD68 molecule	0,006574
NM_198194	Stomatin	0,00816
NM_004884	immunoglobulin superfamily, DCC subclass, member 3	0,00943
NM_012396	pleckstrin homology-like domain, family A, member 3	0,00984
NM_020713	zinc finger protein 512B	0,010434
NM_003639	inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase gamma	0,010972
NM_016546	complement component 1, r subcomponent-like	0,011938
NM_138764	BCL2-associated X protein	0,013306
NM_006675	tetraspanin 9	0,013665
NM_001078171	family with sequence similarity 127, member A	0,014105
NM_020248	catenin, beta interacting protein 1	0,014202
NM_007375	TAR DNA binding protein	0,015893
NM_004613	transglutaminase 2 (C polypeptide, protein-glutamine-gamma-glutamyltransferase)	0,016221
NM_138369	bioorientation of chromosomes in cell division 1	0,016407
NM_000492	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ATP-binding cassette sub-family C, member 7)	0,01652
NM_144778	muscleblind-like 2 (Drosophila)	0,017031
NM_052932	transmembrane protein 123	0,017682
NM_015493	KN motif and ankyrin repeat domains 2	0,019405
NM_016063	HD domain containing 2	0,021409
NM_014508	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3C	0,021554
NM_032603	lysyl oxidase-like 3	0,021625
NM_001202	bone morphogenetic protein 4	0,024767
NM_015289	vacuolar protein sorting 39 homolog (S. cerevisiae)	0,025997
NM_003320	tubby homolog (mouse)	0,027351
NM_178564	nuclear receptor binding protein 2	0,028089
NM_017857	slingshot homolog 3 (Drosophila)	0,028831
NM_001031617	COX19 cytochrome c oxidase assembly homolog (S. cerevisiae)	0,029737
NM_005928	milk fat globule-EGF factor 8 protein	0,02994
NM_001155	annexin A6	0,030777
NM_001456	filamin A, alpha (actin binding protein 280)	0,03222
NM_016582	solute carrier family 15, member 3	0,032831
NM_000043	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	0,035407
NM_021939	FK506 binding protein 10, 65 kDa	0,036877
NM_177403	RAB7B, member RAS oncogene family	0,037623
NM_001006634	Rho GTPase activating protein 17	0,038805
NM_024952	chromosome 14 open reading frame 159	0,039802
NM_007047	butyrophilin, subfamily 3, member A2	0,041012

NM_000302	procollagen-lysine 1, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	0,041088
NM_021198	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 1	0,041977
NM_153367	zinc finger, CCHC domain containing 24	0,042209
NM_003107	SRY (sex determining region Y)-box 4	0,044787
NM_014023	WD repeat domain 37	0,046722
NM_016357	LIM domain and actin binding 1	0,046995
NM_003128	spectrin, beta, non-erythrocytic 1	0,048794
NM_016121	potassium channel tetramerisation domain containing 3	0,04959

Complessivamente, 1034 geni bersaglio candidati sono stati predetti sulla base della complementarità delle sequenze per miR-US25-2-5p, tra questi 266 sono stati selezionati come differenzialmente espressi, ma solo 54 dei 266 geni selezionati erano inversamente correlati con il profilo di espressione del miRNA hcmv-miR-US25- 2-5p.

#### **4.4 VALIDAZIONE DEI TARGET CELLULARI DEI MIRNA hcmv-miR-US25-2-3p E hcmv-miR-US25-2-5p**

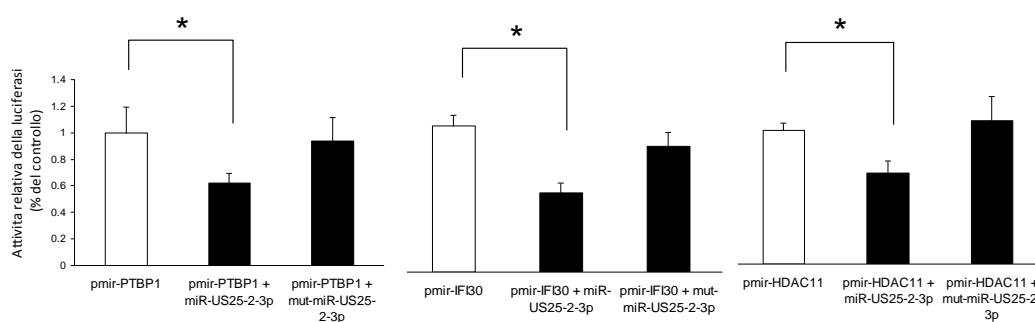
##### **4.4.1 Saggio di attività della luciferasi**

Per stabilire se il miRNA virale lega direttamente le sequenze 3' UTR, inibendone effettivamente la traduzione, è stato effettuato il saggio della luciferasi, il quale prevede l'inserzione delle sequenze 3' UTR a valle del gene della luciferasi *luc2* nel plasmide pmirGLO (*Promega, USA*) e la trasfezione del costrutto in cellule HEK 293-A, insieme al precursore del microRNA. Il saggio della luciferasi è stato effettuato su piastre da 96 *wells*, dove sono state seminate  $5 \times 10^4$  cellule HEK 293A per pozzetto. Le cellule sono state trasfettate con 400ng di plasmide e 3pmoli di pre-miR; dopo 48 ore le cellule sono state lisate e addizionate dei substrati per la luciferasi e analizzate al luminometro. I valori di intensità dell'emissione luminosa della luciferasi sono stati confrontati con il test statistico *t-Student*.

Tra i miRNA codificati da HCMV, è stato studiato il miR-US25-2-3p e in particolare sono stati validati i target perdetti solo sulla base della complementarità di sequenza: *PTBPI* (*polypyrimidine tract binding protein 1*),

definita anche *hnRNPI* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein1*), *HDAC11* (*histone deacetylase 11*) e *IFI30* (*interferon gamma-inducible protein 30*).

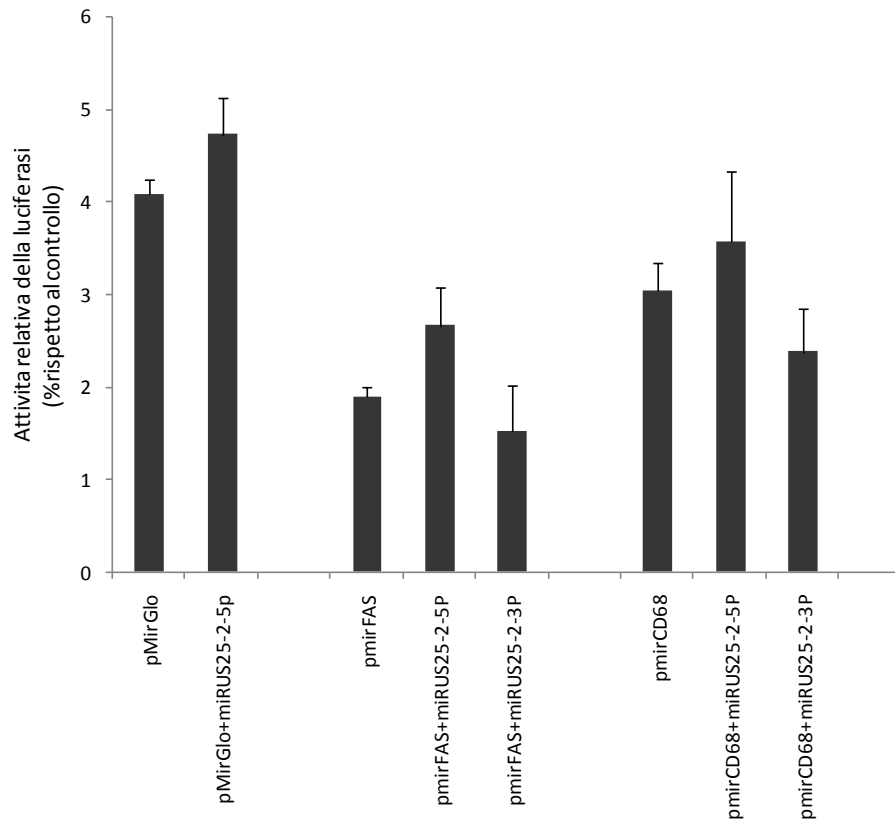
E' stata osservata una diminuzione statisticamente significativa dell'attività del gene reporter luciferasi, quando era fuso sia con PTBP che con HDAC1, che con IFI30 (Figura 14 ). Per confermare l'inibizione specifica dei tre target ad opera di miR-US25-2-3p, è stato effettuato lo stesso saggio della luciferasi co-trasfettando le cellule HEK-293A con il costrutto plasmidico ed il miRNA mutato nella sequenza *seed*: in questo caso l'eventuale riduzione dell'attività del gene reporter non è risultata statisticamente significativa.



**Figura 14.** Saggio di attività della luciferasi. Le sequenze 3'UTR di HDAC11, PTBP1 e IFI30 sono state clonate nel plasmide pmirGLO (Promega, USA), che è stato successivamente co-trasfettato nelle cellule HEK293A con i precursori dei miRNA miR-US25-2-3p, e miR-US25-2-3p mutato.

\*P <0.05 rispetto al controllo non trasfettato.

Per il miRNA hcmv-miR-US25-2-5p sono stati analizzati i target FAS (*TNF receptor superfamily, member 6*) e CD68 individuati sulla base della correlazione di profili di espressione di miRNA virale e potenziali mRNA target cellulari.



**Figura 15.** Saggio di attività della luciferasi. Le sequenze 3'UTR di Fas e CD68 sono state clonate nel plasmide pmirGLO (Promega, USA), che è stato successivamente co-trasfettato nelle cellule HEK293A con i precursori dei miRNA miR-US25-2-5p, e miR-US25-2-3p usato come controllo negativo.

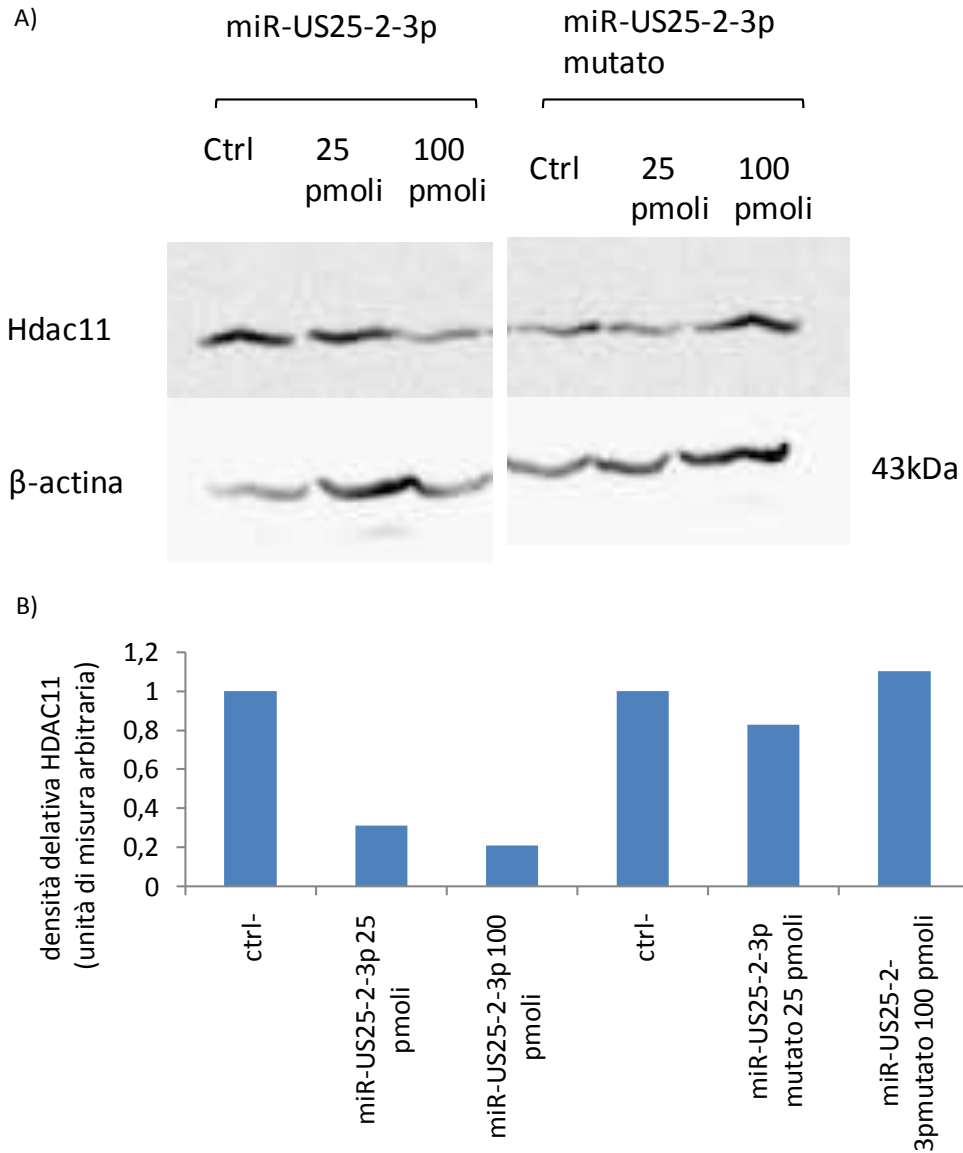
Non è stata osservata alcuna riduzione statisticamente significativa dell'espressione del gene reporter luciferasi, quando fusa sia con Fas o CD68 in presenza dei miRNA hcmv-miR-US25-2-5p o hcmv-miR-US25-2-3p (Figura 15).

#### 4.4.2 Analisi dell'espressione proteica dei target tramite Western blot

Per la validazione dei target del miRNA miR-US25-2-3p è stata valutata l'espressione proteica dei target tramite la tecnica del Western blot. A tal scopo,  $3 \times 10^5$  cellule HEK-293A sono state trasfettate con 25 pmoli e 100 pmoli di precursore pre-miR-US25-2-3p. Il miRNA hcmv-miR-US25-2-3p mutato nella sequenza *seed* è stato utilizzato come controllo per verificare la specificità dell'azione inibitoria del miRNA virale sull'espressione della proteina. Dopo 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state raccolte e sono state estratte le proteine come descritto nella sezione 3.15.1 di questa tesi. È stata effettuata l'analisi

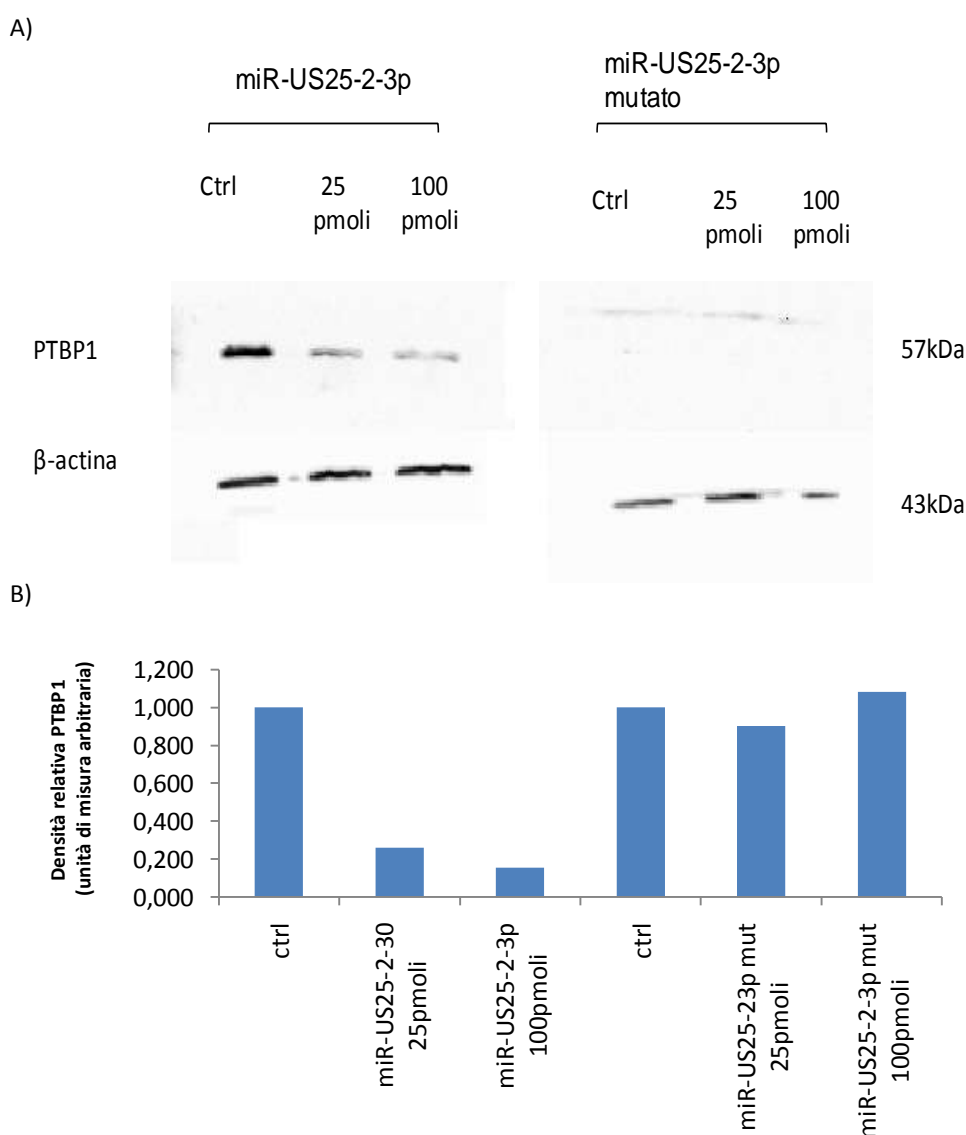


mediante Western Blot utilizzando gli anticorpi Anti-HDAC11 (1:400; ab47036 *Abcam,UK*), Anti-hnRNP1 (PTBP1) (1:100; sc-56701 *Santa Cruz CA, USA*), e anti HDAC4 (1:1000; ab32534 *Abcam, UK*).



**Figura 16.** Riduzione dell'espressione proteica di HDAC11 da parte di hcmv-miR-US25-2-3p. Le cellule HEK293A sono state trasfettate rispettivamente con i miRNA hcmv-miR-US25-2-3p e hcmv-miR-US25-2-3p mutato: A) analisi mediante western blot; B) analisi densitometrica delle bande rilevate mediante western blot (l'espressione di  $\beta$ -actina è stata utilizzata per normalizzare i dati; i valori mostrati sono calcolati come rapporto con il controllo negativo non trasfettato). I dati qui riportati sono rappresentativi di tre repliche sperimentali.

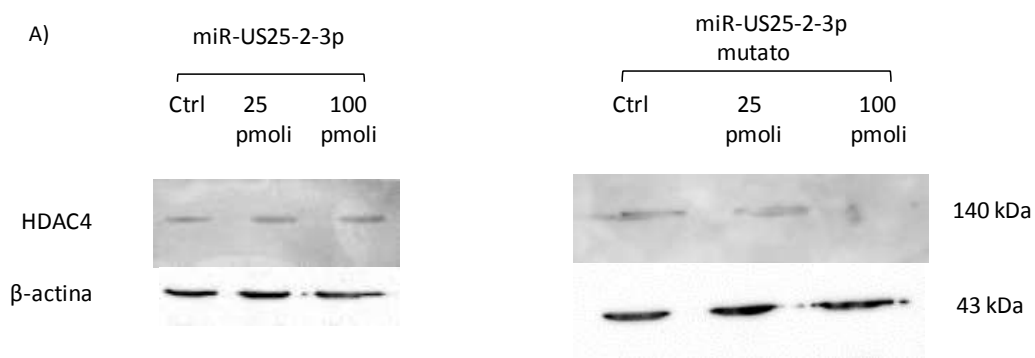
I risultati dell'analisi di western blot effettuata per HDAC11 hanno dimostrato la riduzione dell'espressione proteica del gene bersaglio in presenza di hcmv-miR-US25-2-3p già a partire da basse concentrazioni (25pmoli) di miRNA trasfettato; mentre non sono stati osservati effetti sull'espressione proteica di HDAC11 in presenza del miRNA mutato nella sequenza *seed* (Figura 16.A). I valori densitometrici di HDAC11 sono stati normalizzati con quelli della  $\beta$ -actina (Figura 16.B).



**Figura 17.** Riduzione dell'espressione proteica di PTBP1 da parte di hcmv-miR-US25-2-3p. Le cellule HEK293A sono state trasfettate rispettivamente con i miRNA hcmv-miR-US25-2-3p e hcmv-miR-US25-2-3p mutato: A) analisi mediante western blot; B) analisi densitometrica delle bande rilevate mediante western blot (l'espressione di  $\beta$ -actina è stata utilizzata per normalizzare i

dati; i valori mostrati sono calcolati come rapporto con il controllo negativo non trasfettato). I dati qui riportati sono rappresentativi di tre repliche sperimentali.

I risultati dell'analisi di western blot effettuata per PTBP1 hanno dimostrato la riduzione dell'espressione proteica del gene bersaglio in presenza di hcmv-miR-US25-2-3p già a partire da basse concentrazioni (25pmoli) di miRNA trasfettato e in modo dose-dipendente; mentre non sono state osservate variazioni dell'espressione proteica di PTBP1 in presenza del miRNA mutato nella sequenza *seed* (Figura 17.A). I valori densitometrici di PTBP1 sono stati normalizzati con quelli della  $\beta$ -actina (Figura 17.B).



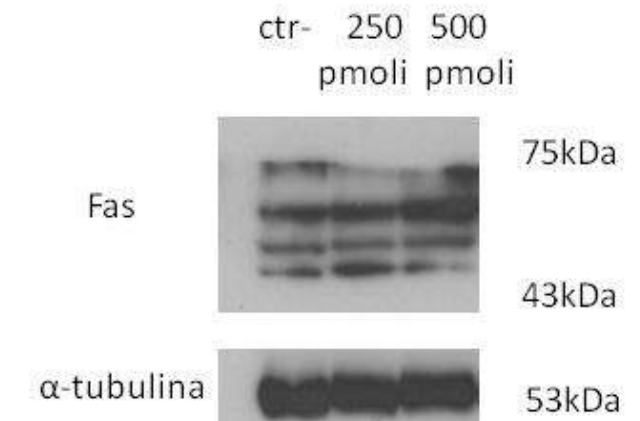
**Figura 18.** Riduzione dell'espressione proteica di HDAC4 da parte di hcmv-miR-US25-2-3p. Le cellule HEK293A sono state trasfettate rispettivamente con i miRNA hcmv-miR-US25-2-3p e hcmv-miR-US25-2-3p mutato: A) analisi mediante western blot.

I risultati dell'analisi di western blot effettuata per HDAC4 hanno dimostrato la riduzione dell'espressione proteica del gene bersaglio in presenza di hcmv-miR-US25-2-3p a concentrazioni di miRNA trasfettato più elevate (100pmoli), rispetto agli altri due target PTBP1, e HDAC11; mentre non sono stati osservati effetti sull'espressione proteica di HDAC4 in presenza del miRNA mutato nella sequenza *seed* (Figura 16.A). I valori densitometrici di HDAC4 sono stati normalizzati con quelli della  $\beta$ -actina (Figura 18.B).

È stata effettuata l'analisi dell'espressione proteica anche per i geni bersaglio candidati per il miRNA hcmv-miR-US25-2-5p individuati come descritto nella paragrafo 4.2.2 di questo capitolo.

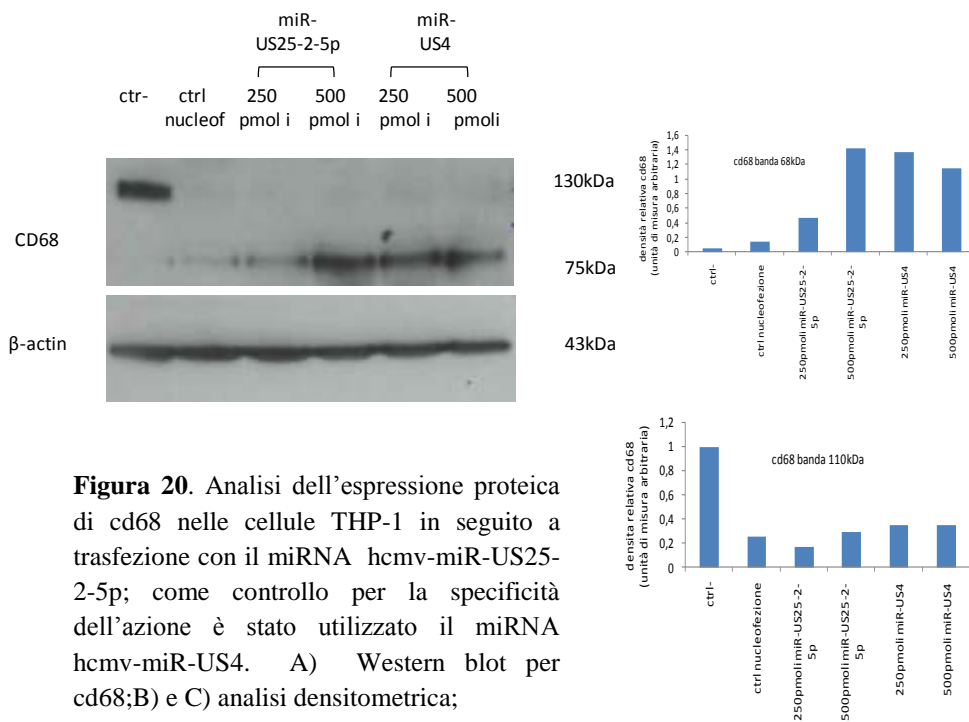
Per l'analisi dell'effetto di hcmv-miR-US25-2-3p è stata utilizzata la linea cellulare THP-1, in grado di esprimere CD68 e FAS. Le cellule THP-1 sono state

nucleofettate in quantità di  $2,5 \times 10^6$  con 250 e 500 pmoli di precursore sintetico del miRNA hcmv-miR-US25-2-5p. A 48h post-trasfezione le cellule sono state raccolte e sono state estratte le proteine come descritto nella sezione 3.15.1 di questa tesi. È stata effettuata l'analisi mediante Western blot utilizzando gli anticorpi mouse-anti-CD68 (1:100; *Santa Cruz Biotechnology, USA*), rabbit-anti FAS (1:300; *Santa Cruz Biotechnology, USA*).



**Figura 19.** Analisi dell'espressione proteica di Fas nelle cellule THP-1 in seguito a trasfezione con il miRNA hcmv-miR-US25-2-5p.

I risultati dell'analisi di western blot effettuata per Fas, riportati in Figura 19, non hanno dimostrato alcuna riduzione dell'espressione proteica del gene bersaglio in presenza di hcmv-miR-US25-2-5p, che sembra invece aumentare in presenza di dosi crescenti del miRNA.



**Figura 20.** Analisi dell'espressione proteica di cd68 nelle cellule THP-1 in seguito a trasfezione con il miRNA hcmv-miR-US25-2-5p; come controllo per la specificità dell'azione è stato utilizzato il miRNA hcmv-miR-US4. A) Western blot per cd68; B) e C) analisi densitometrica;

I risultati dell'analisi di western blot (Figura 20) non hanno dimostrato alcuna riduzione dell'espressione proteica della variante di trascrizione 2 di cd68 (70kDa) e anche in presenza del miRNA che sembra invece aumentare in presenza di dosi crescenti del microRNA hcmv-miR-US25-2-5p, e del miRNA usato come controllo negativo hcmv-miR-US4; mentre la variante di trascrizione 1, corrispondente all'isoforma di maggiore peso molecolare (banda di circa 130 kDa), sembra essere totalmente assente in seguito alla nucleofezione con il microRNA. Questi risultati suggeriscono che il cambiamento di espressione delle isoforme di cd68 osservate siano dovute al protocollo di nucleofezione.

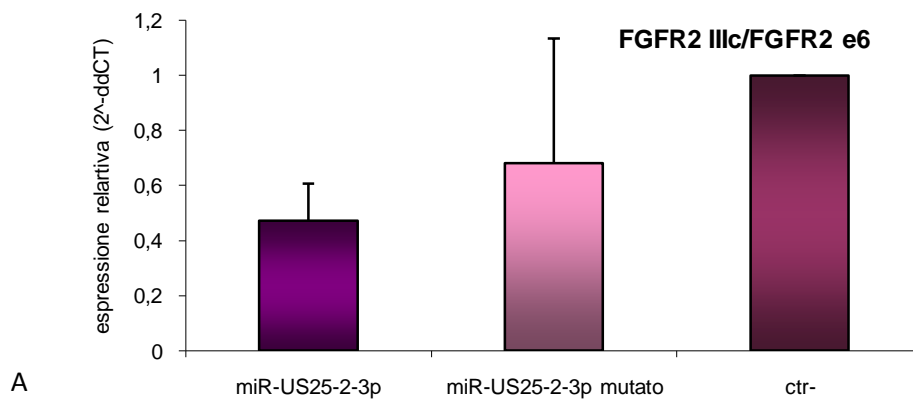
#### 4.5 ANALISI DEGLI EFFETTI DI hcmv-miR-US25-2-3p SU PTBP1

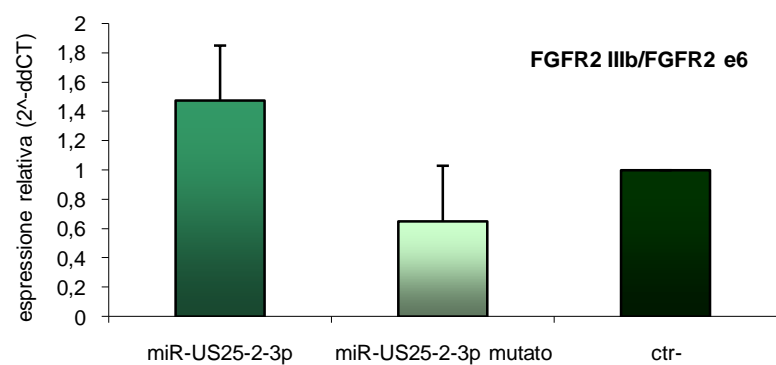
PTBP1 è un importante regolatore cellulare dell'espressione genica in quanto agisce come modulatore dello *splicing* alternativo per molti geni sia cellulari che virali. Il fattore di crescita dei fibroblasti umani recettore (FGFR2) gene è un modello *splicing* alternativo stabilito in cui gli esoni IIIB e IIIC subiscono *splicing* alternativo mutuamente esclusive, regolato da PTBP [Luco et al. 2010]. Per studiare l'inibizione funzionale del PTBP1 da parte di miR-US25-2-3p, è stato istituito un sistema real time RT-PCR per indagare la modulazione dello *splicing*

di FGFR2 in cellule HEK 293A, dove le due varianti di *splicing* vengono normalmente prodotte in misura equivalente.

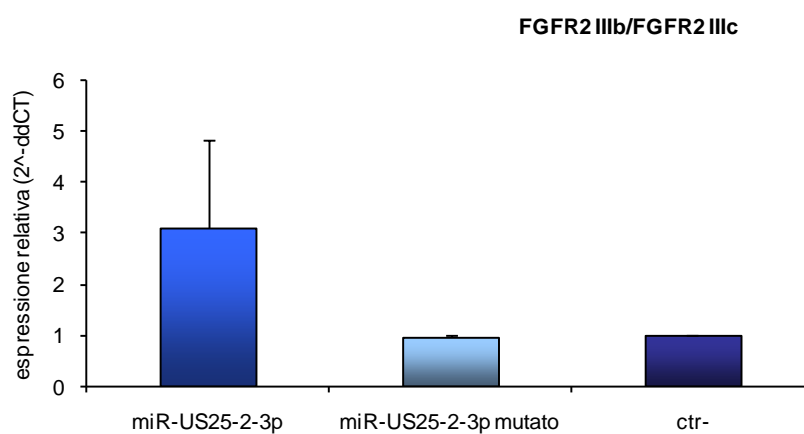
#### 4.5.1 Analisi degli effetti di hcmv-miR-US25-2-3p sullo *splicing* alternativo del gene FGFR2 mediato da PTBP1

Le cellule HEK 293-A sono state seminate 24 ore prima della trasfezione ad una densità di  $2 \times 10^5$  cellule/pozzetto. Le cellule sono state trasfettate con 100 pmoli di precursore sintetico del miRNA HCMV-miR-US25-2-3p e HCMV-miR-US25-2-3p mutato, 48 ore dopo la trasfezione le cellule sono state raccolte e l'RNA totale è stato e trattato come descritto nel paragrafo 3.10 di questa tesi. 10 $\mu$ g di RNA totale sono stati retrotrascritti in cDNA usando primer random. La real time-PCR è stata effettuata con *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, USA) utilizzando sequenze primer che riconoscono specificamente le varianti di *splicing* FGFR2IIIb e FGFR2IIIc. HMGA1 esone 2 è stato utilizzato come controllo di *splicing* alternativo PTB-indipendente, e GAPDH esoni e6 ed e7 come controllo di *splicing* costitutivo.

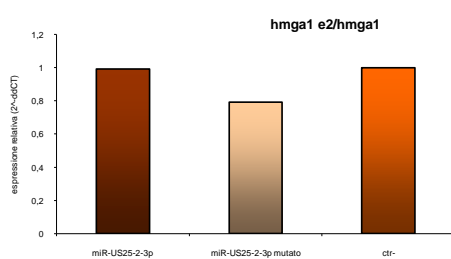




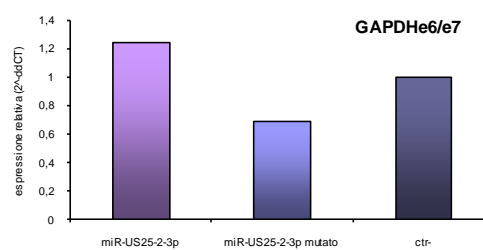
B



C



D



E

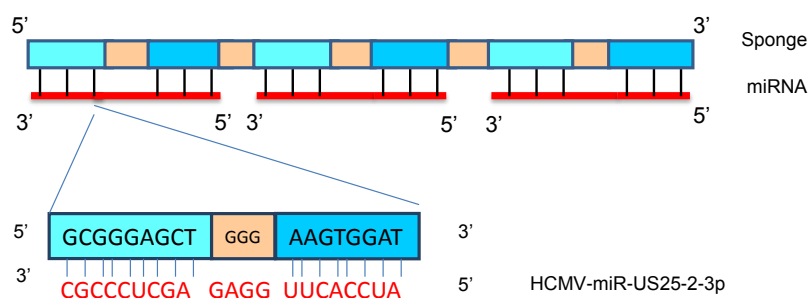
**Figura 21.** Analisi mediante real time RT-PCR dell'espressione delle varianti di *splicing* del gene FGFR2 nelle cellule HEK 293A trasfettate rispettivamente con i microRNA hcmv-miR-US25-2-3p e hcmv-miR-US25-2-3p mutato; D) la variante di *splicing* HMGA1e2 è stata analizzata come controllo degli eventi di *splicing* indipendenti da PTBP1; E) il rapporto tra le varianti di *splicing* GAPDHe6 a GAPDHe7 è stato usato come controllo dello *splicing* costitutivo. I dati sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti.

La presenza del miRNA miR-US25-2-3p, inibendo PTBP1, causa la diminuzione dell'espressione della variante di *splicing* IIIc del gene FGFR2 (Figura 21.A) e l'aumento dell'espressione della variante di *splicing* IIIb del gene FGFR (Figura 21.B); è quindi stato osservato un aumento del rapporto tra le varianti di *splicing* del gene FGFR2 IIIb/IIIc (Figura 21.C). Lo *splicing* indipendente da PTBP1 dell'esone e2 del gene HMGA1 e lo *splicing* costitutivo degli esoni e6 ed e7 del gene GAPDH, non subiscono variazioni significative in presenza del miRNA (Figure 21.D, e 21.E).

#### 4.6 ANALISI DEGLI EFFETTI DELL' INIBIZIONE DI PTBP1 DA hcmv-miR-US25-2-3p SULLA REPLICAZIONE DI HCMV

È stato dimostrato che, in cellule HCMV, PTBP1 abbassa titolo virale, in quanto reprime la traduzione del più abbondante gene precocissimo immediato, il pre-mRNA MIE (Major Immediate Early) inibendo il suo *splicing* [Cosme *et al.* 2009].

Per completare l'analisi dell'effetto di HCMV-miR-US25-2-3p sulla replicazione del virus *in vitro*, è stato prodotto un sistema di inibizione del miRNA. Un oligonucleotide specifico, chiamato *sponge*, è stato progettato per catturare il miRNA sottraendolo dal suo target specifico. Le *sponge* anti-miRNA sono inibitori competitivi specifici per i miRNA, che agiscono come bersaglio "esca" per il miRNA eliminando l'effetto di inibizione della traduzione sull'mRNA bersaglio [Ebert *et al.* 2007].



**Figura 22.** Rappresentazione schematica del meccanismo d'azione della sponge anti-miRNA.

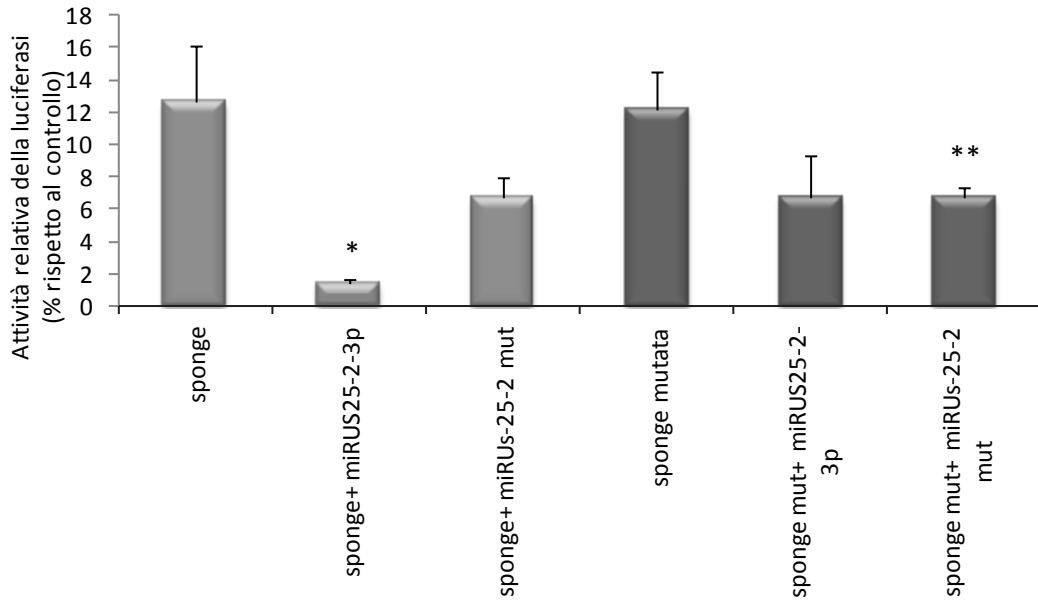
Ripetizioni tandem della sequenza *seed* e dell'estremità 3' del miRNA hcmv-miR-US25-2-3p sono state clonate nel vettore plasmidico *pSilencer 4.1-CMV Hygro*



come descritto nel paragrafo 3.2.2 di questa tesi. Il plasmide così ottenuto, pSilencer-antimiR-US25-2-3p, è stato trasfettato in cellule MRC-5 utilizzando la tecnologia del *Nucleofector 4D* (*Lonza Cologne GmbH, D*): 5µg di ogni plasmide sono stati nucleofettati in  $6 \times 10^5$  cellule utilizzando il kit P2 per cellule primarie, e di protocollo nucleofezione per la linea cellulare NHDF; 48 ore dopo trasfezione è stata avviata la selezione con igromicina utilizzando una concentrazione di antibiotico di 20µg/ml, entro 15 giorni è stata osservata completa morte della cultura del controllo e le cellule MRC-5 stabilmente trasfettate hanno iniziato a ripopolare le piastre di coltura. È stata ottenuta la linea cellulare MRC-5 anti-miR-US25-2-3p.

#### **4.6.1 Saggio di attività della luciferasi**

La complementarietà tra il miRNA hcmv-miR-US25-2-3p e la *sponge* anti-miRNA è stata testata con il saggio della luciferasi utilizzando pmirGLO Dual Luciferase miRNA Target Expression Vector (*Promega, USA*) contenente al 3' UTR la sequenza della *sponge* anti-miRNA. Le cellule HEK 293-A sono state tassfettate con 400 ng di plasmide e 3 pmol di pre-miR sintetico; 48h dopo la trasfezione è stata misurata l'attività della luciferasi. I valori di intensità dell'emissione luminosa della luciferasi sono stati confrontati con il test statistico *t-Student*.



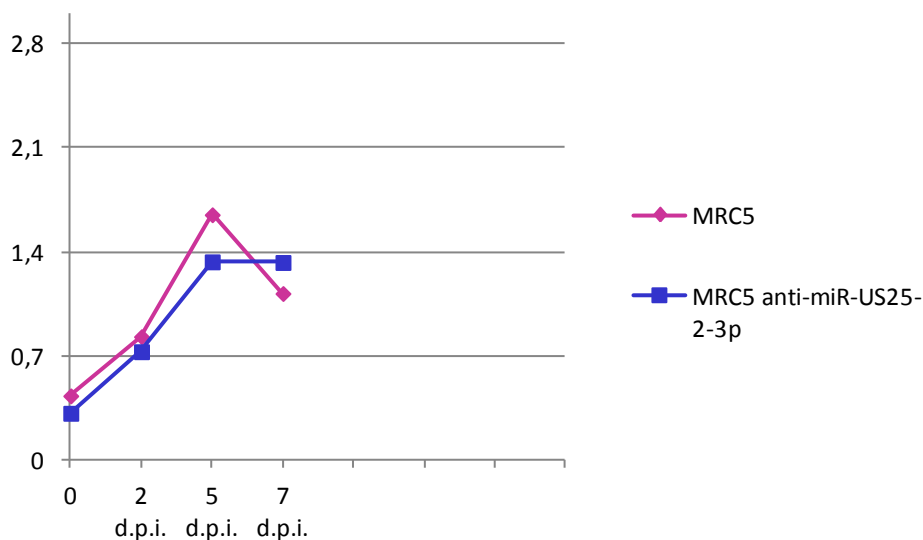
**Figura 23.** Saggio di attività della luciferasi. Il plasmide *pmirGLO* contenente la sequenza delle *sponge* anti miR-US25-2-3p è stato co-trasfettato con i precursori dei microRNA miR-US25-2-3p e miR-US25-2-3p mutato. Il plasmide *pmirGLO* contenente la sequenza delle *sponge mutata* è stato co-trasfettato con i precursori dei microRNA miR-US25-2-3p, e miR-US25-2-3p mutato. \*P <0.05 rispetto al plasmide *pmirGLO-sponge* non co-trasfettato; \*\*P <0.05 rispetto al plasmide *pmirGLO-sponge mutata* non co-trasfettato.

Il saggio ha dimostrato la riduzione statisticamente significativa dell'attività della luciferasi quando fusa con la sequenza della *sponge* anti-hcmv-miR-US25-2-3p in presenza del microRNA hcmv-miR-US25-2-3p, e della *sponge* mutata in presenza del microRNA hcmv-miR-US25-2-3p mutato; lo stesso saggio effettuato co-trasfettando il plasmide contenente la *sponge* anti-hcmv-miR-US25-2-3p ed il miRNA mutato nella sequenza *seed* ha mostrato una riduzione dell'attività del gene reporter non statisticamente significativa (Figura 23).

#### 4.6.2 Saggio di proliferazione cellulare (MTT)

Il saggio per la valutazione della proliferazione cellulare è stato eseguito in modo da escludere un effetto collaterale anti proliferativo della *sponge* anti-hcmv-miR-US25-2-3p, trasfettata stabilmente nella linea cellulare MRC-5, che potrebbe introdurre un *bias* nella valutazione dell'effetto del miRNA sulla replicazione virale.

Le cellule MRC5 e MRC5-anti-miRUS25-2-3p sono state seminate ad una densità di  $7 \times 10^4$  cellule in terreno di coltura completo. Le cellule sono state infettate con il ceppo Towne di HCMV ad una molteplicità di infezione di 1 PFU/cellula. Le cellule sono state trattate con 5mg/ml di thiazol Blu Tetrazolium bromuro (MTT) il giorno prima e 2, 5 e 7 giorni dopo l'infezione. I valori di proliferazione cellulare sono stati confrontati con il test t di Student.



**Figura 24.** Analisi della proliferazione cellulare delle linee cellulari MRC5 e MRC5 anti-miR-US25-2-3p in seguito all'infezione con il ceppo HCMV Towne a M.O.I.1 PFU/cellula.

Il saggio MTT (Figura 24) non ha evidenziato differenze statisticamente significative nella proliferazione cellulare nelle cellule MRC-5 trasfettate stabilmente con la *sponge* anti-hcmv-miR-US25-2-3p rispetto alla linea cellulare MRC-5 di controllo.

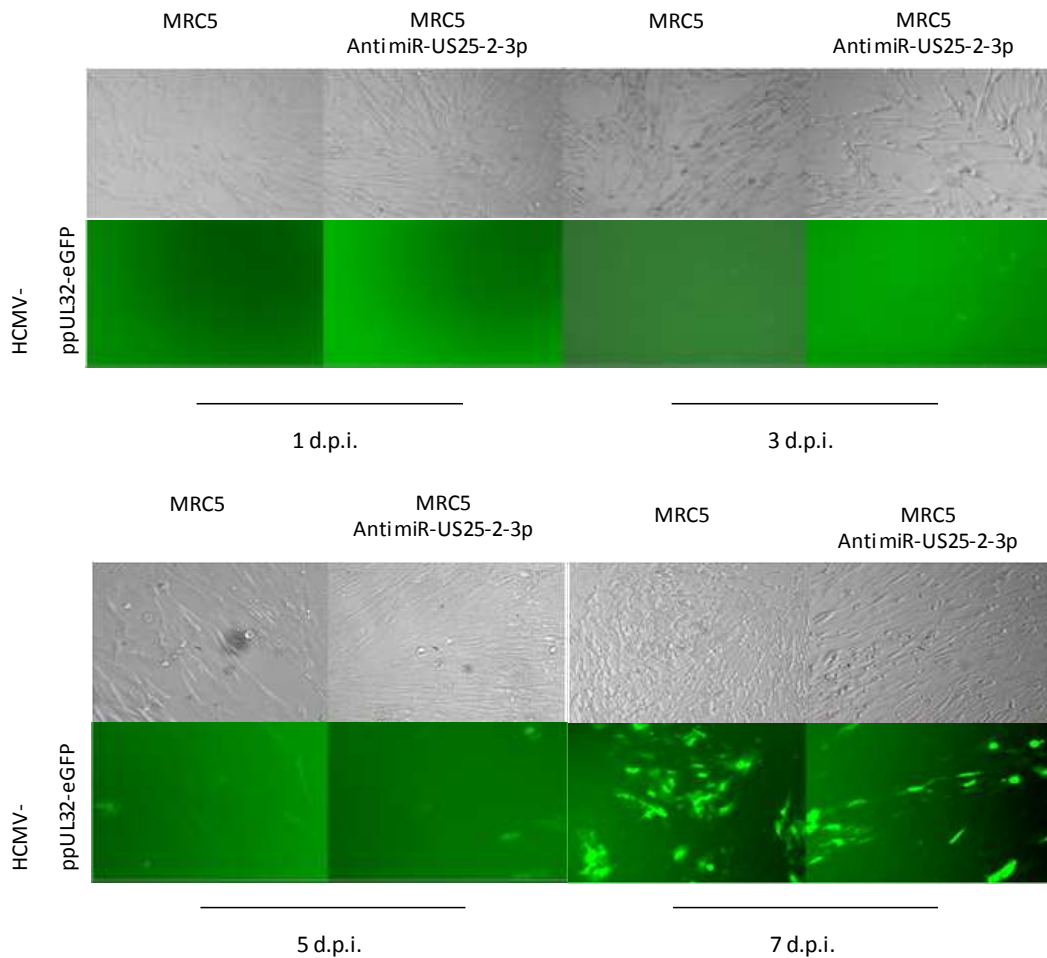
#### 4.6.3 Replicazione di HCMV nelle cellule MRC5 e MRC5 anti miR-US25-2-3p

Le cellule MRC5 e MRC5-anti-miRUS25-2-3p sono state seminate ad una concentrazione di  $7 \times 10^4$  cell/well in DMEM privo di siero. Dopo 24 ore, le cellule sono state infettate con il ceppo HCMV Towne ppUL32-eGFP ad una MOI di 1 PFU/cellula, dopo 2 ore di incubazione a 37 ° C, il medium di infezione è stato sostituito da una normale terreno di coltura; le cellule sono state osservate durante

tutto il decorso dell'infezione per valutare l'espressione HCMV ppUL32-eGFP e l'effetto citopatico virale al microscopio a fluorescenza.

Le cellule MRC-5 esprimenti la *sponge* anti-miR-US25-2-3p mostravano una notevole riduzione dell'espressione della proteina virale tardiva ppUL32-eGFP rispetto alle coltura di controllo: in particolare la differenza tra le due linee cellulari era evidente e significativa nelle fasi più tardive dell'infezione (7 d.p.i.) (Figura 25).

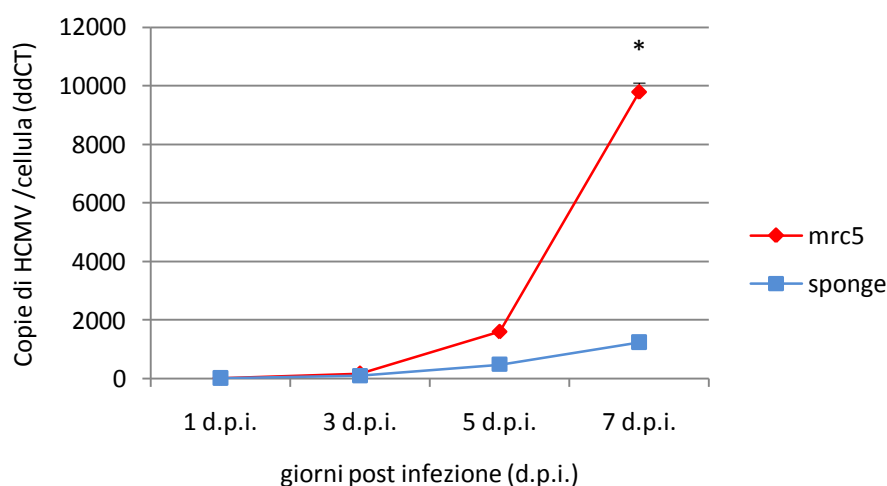
L'aspetto più evidente dell'effetto *sponge*-anti-hcmv-miR-US25-2-3p è la notevole riduzione dell'effetto citopatico caratteristico del citomegalovirus sui fibroblasti in coltura. A 7 giorni dall'infezione i fibroblasti MRC-5 che esprimono stabilmente la *sponge* anti-miRNA mostrano ancora una forma allungata, senza aumento delle dimensioni (citomegalia) e corpi inclusi a livello nucleare, caratteristiche evidenti invece nelle cellule MRC-5 di controllo.



**Figura 25.** Effetto citopatico ed espressione della proteina di HCMV ppUL32-eGFP nelle cellule MRC5 e MRC5-anti miR-US25-2-3p infettate con il ceppo virale HCMV Towne-ppUL32-eGFP a M.O.I. 1 PFU/cell.

1, 3, 5 e 7 giorni post infezione le cellule infettate sono state raccolte e il DNA è stato estratto utilizzando un estrattore automatico DNA NucliSens easyMAG (BioMerieux, Fr) ed è stata eseguita la real time-RT PCR quantitativa per valutare il titolo virale di HCMV.

L'infezione delle cellule MRC-5 che esprimono stabilmente la *sponge*-anti miR-US25-2-3p (MRC5-anti-miRUS25-2-3p) e delle cellule MRC5 di controllo con il virus Towne ppUL32-eGFP ad una M.O.I. di 1 PFU/cell dimostra una riduzione statisticamente significativa del titolo virale che risulta evidente con il progredire dell'infezione (Figura 26).



**Figura 26.** Real time PCR quantitativa effettuata sul DNA estratto dalle cellule MRC-5 e MRC-5-anti miR-US25-2-3p infettate con il ceppo virale HCMV Towne ppUL32-eGFP con M.O.I. 1 PFU/cellula; le cellule sono state raccolte 1, 3, 5 e 7 d.p.i.; i dati riportati sono rappresentativi di due repliche sperimentali, entrambe statisticamente significative; \* p-value<0,05.

Concludendo, gli esperimenti effettuati sulla replicazione di HCMV nelle cellule che esprimono la *sponge* inibente il miRNA hcmv-miR-US25-2-3p dimostrano il ruolo del miRNA nel promuovere la replicazione di HCMV.

## CAPITOLO 5

### DISCUSSIONE

Il citomegalovirus umano (HCMV) esercita una profonda influenza su diversi processi cellulari, a partire dalla modificazione di vie metaboliche, in modo da avvantaggiare la replicazione virale, al rimodellamento dell'apparato secretorio citoplasmatico, alla riprogrammazione del ciclo cellulare e dei processi pro-apoptotici, fino all'impiego di diversi sistemi per evitare il riconoscimento e l'eliminazione da parte del sistema immunitario dell'ospite. Inoltre, è ormai stato dimostrato come anche i miRNA giochino un ruolo chiave in queste interazioni tra virus e cellula ospite. Lo scopo di questa tesi è stato quello di approfondire l'indagine sul ruolo dei miRNA virali e l'azione di rimodellamento dell'espressione dei geni cellulari da parte di HCMV nel corso dell'infezione.

I miRNA di HCMV analizzati in questo studio sono: miR-UL22A, miR-UL36, miR-UL112, miR-UL70-1-3p, miR-UL70-1-5p, miR-US5-2, miR-US5-1, miR-US4, miR-US25-2-3p, miR-US25-2-5p, miR-US25-1, miR-US33-3p, miR-US33-5p, miR-UL22a\*, miR-UL36\*, miR-US25-1\*, miR-U148D.

Nel 2005 Grey e collaboratori studiarono l'espressione di un gruppo di miRNA di HCMV e dimostrarono che i miRNA miR-UL36 e miR-UL70-1 seguivano una cinetica di tipo precocissimo, mentre i miRNA miR-US4-1, miR-US5-1 e miR-US5-2 venivano espressi nelle fasi successive e si accumulavano durante il ciclo vitale del virus [Grey et al. 2005]. I risultati ottenuti in questa tesi, concordano con lo studio di Grey, ma completano la caratterizzazione del profilo cinetico di espressione di tutti i miRNA di HCMV descritti in miRBase fino al 2012; inoltre concordano con lavori successivi pubblicati da Stark e Meshesha [Meshesha et al. 2012; Stark et al. 2012].

La maggior parte dei miRNA di HCMV è espressa nelle prime fasi o entro 24 ore dalla insorgenza dell'infezione e continua ad accumularsi nel tempo. In particolare, miR-UL22A, miR-UL36, e miR-US5-2, miR-US25-1 e miR-US25-2-3p sono fortemente espressi a partire dalle fasi precosissime dell'infezione a 4 ore pi; miR-UL112, miR-US5-1, miR-US25-2-5p, miR-US4 e miR-US33-3p

raggiungono un picco di espressione nella fase precoce dell'infezione e continuano ad accumularsi nel tempo.

A questo punto è stato quindi fondamentale ricercare i potenziali target di ciascun miRNA. I miRNA espressi precocemente sembrano mostrare un ampio e piuttosto eterogeneo gruppo di target coinvolti in diverse vie regolatorie, come l'attivazione della risposta immunitaria, il controllo del ciclo cellulare, e la regolazione dei processi oncogenici.

Particolarmente interessanti sono risultati i target cellulari del miRNA miR-US25-2-3p PTBP1, HDAC11, HDAC4 e IFI30, validati sperimentalmente in questo studio.

PTBP1, altrimenti nota come hnRNP1, è una ribonucleoproteina coinvolta nella repressione dello splicing dei pre-mRNA di numerosi geni cellulari; essa compete per il legame con i tratti polipirimidinici negli introni dei mRNA immaturi in fase di processamento, antagonizzando il fattore di splicing U2AF [Cosme et al. 2009]. Le quattro isoforme della proteina PTBP alterano la stabilità dell'mRNA, agendo anche su altri livelli come la poliadenilazione e l'inizio della traduzione, tanto da essere state definite chaperoni dell'RNA, in grado di reclutare o allontanare altri fattori responsabili del metabolismo dell'RNA [Sawicka et al. 2008]. Poiché le proteine PTBP interagiscono con un grande numero di mRNA, è probabile che siano coinvolte nella regolazione di numerose funzioni cellulari: mentre le proteine PTBP sembrano migliorare la traduzione e la replicazione di virus a RNA interagendo con sequenze virali IRES [Song et al. 2006], è stato dimostrato che in cellule infettate da HCMV, PTBP1 interviene ad abbassare il titolo virale, poiché reprime la traduzione del più abbondante dei geni precocissimi, il pre-mRNA MIE (Major Immediate Early) che deve subire un processo di *splicing* per poter essere esportato al citoplasma ed essere tradotto [Cosme et al. 2009]. L'infezione con HCMV di cellule Hep-2, in cui l'espressione di PTBP1 era stata soppressa stabilmente, ha mostrato un aumento della produzione di diverse proteine HCMV e aumentata replicazione virale rispetto alle cellule di controllo [Cosme et al. 2009].

In questa tesi è stato dimostrato come il miRNA miR-US25-2-3p sia in grado di inibire la traduzione di PTBP1, riducendone notevolmente il livello di espressione proteica, e inibendone funzionalmente l'attività di modulazione dello splicing.

Infine il modello di knock-out del miRNA hcmv-miR-US25-2-3p, prodotto grazie alla creazione di una linea cellulare che esprimeva stabilmente un inibitore competitivo del miRNA virale, definito *sponge*, ha permesso di confermare il ruolo del miRNA nella promozione della replicazione di HCMV. Questi dati sembrano essere discordanti rispetto alle rilevazioni fatte da Stern-Ginossar nel 2009, che aveva proposto per i miRNA hcmv-miR-US25-2 e hcmv-miR-US25-1, un ruolo nella riduzione della replicazione virale. In realtà le osservazioni di Stern-Ginossar, oltre a dimostrare un effetto minore da parte del miR-US25-2 rispetto al miR-US25-1, erano limitate all'osservazione dell'azione del miRNA fino a 96 ore dopo l'infezione [Stern-Ginossar et al. 2009], e dai dati ottenuti in questa tesi è possibile vedere come l'effetto di promozione della replicazione virale si manifesti e risulti evidente superati 5 giorni dall'infezione. Concludendo le osservazioni ottenute in questa tesi possono andare a completare e approfondire le precedenti osservazioni sul miRNA hcmv-miR-US-25-2-3p, e delineano per tale miRNA un ruolo emergente, insieme agli altri miRNA espressi nella fase litica del ciclo vitale di HCMV, nei meccanismi di promozione della replicazione virale e dell'evasione dell'immunosorveglianza da parte del citomegalovirus umano.

HDAC11 fa parte della classe di enzimi istone-deacetilasi, i quali svolgono un ruolo centrale nella modificazione della struttura della cromatina, e quindi nella regolazione della trascrizione; questa molecola, in particolare, regola negativamente l'espressione del gene codificante per IL-10 (interleuchina-10), inibendone la trascrizione. È stato dimostrato che la sovraespressione del gene HDAC11, inibisce IL-10, portando all'attivazione delle *antigen presenting cell* (APC), le quali inducono l'attivazione delle cellule T-naive, e la conseguente risposta immunitaria [Villagra et al.2009]; inoltre è stato dimostrato che la secrezione di IL-10 cellulare, insieme alla produzione dell'omologo virale cmvIL-10, favoriscono il mantenimento dell'infezione latente di HCMV, mediante l'attenuazione della risposta immune [Chang et al. 2010; Poole et al. 2011]; alla luce delle osservazioni riportate in letteratura, i dati ottenuti potrebbero suggerire un ruolo per il miRNA hcmv-miR-US25-2-3p nella promozione dell'evasione dalla sorveglianza immunitaria, e dell'instaurarsi della latenza nelle cellule infettate.



IFI30 è un enzima tiolo-riduttasi lisosomiale espresso costitutivamente da tutte le APC e indotto dall'aumento dell'espressione dell'interferone- $\gamma$  su altri tipi cellulari, come i linfociti T citotossici, responsabili principali della risposta immunitaria antivirale, e la sua attivazione è necessaria nel processo di presentazione dell'antigene da parte del complesso di restrizione MHC-II [West et al. 2013]. La significativa inibizione di questo gene da parte del miRNA hcmv-miR-US25-2-3p potrebbe indicare un ulteriore meccanismo utilizzato dal virus nel processo di evasione della risposta immunitaria da parte del virus.

HDAC4 appartiene alla classe II della famiglia istone deacetilasi. Gli istoni svolgono un ruolo critico nella regolazione trascrizionale, progressione del ciclo cellulare, e negli eventi di sviluppo. L'acetilazione/deacetilazione degli istoni altera la struttura cromosomica e colpisce l'accesso al DNA dei fattori di trascrizione. È quindi possibile ipotizzare che l'inibizione di questa istone deacetilasi favorisca la trascrizione del DNA virale nel corso del ciclo replicativo di HCMV.

I dati ottenuti relativamente a questi tre target (HDAC11, HDAC4 e IFI30) rivelano l'efficacia del sistema di predizione *metaconsensus* sviluppato *in house*, basato sulla complementarità della sequenza tra miRNA e 3'UTR del gene bersaglio, in quanto i tre candidati target sono risultati tutti significativamente inibiti dal microRNA hcmv-miR-US25-2-3p; andranno ulteriormente eseguiti studi approfonditi per valutare l'inibizione funzionale di tali target.

Ulteriori analisi vanno invece eseguite sui dati di correlazione dell'espressione dei miRNA virali con i mRNA cellulari allo scopo di aumentare la specificità della predizione. Sarà quindi necessario valutare il profilo di espressione dei miRNA cellulari in seguito all'over-espressione del miRNA virale di interesse, come può essere per questa tesi il miRNA hcmv-miR-US25-2-5p, e durante l'infezione in presenza di inibitori del miRNA come descritto in letteratura [Ziegelbauer et al. 2009].

Infine Wang e collaboratori nel 2008, hanno dimostrato la modulazione da parte di HCMV dei miRNA cellulari, che influenzano la sua replicazione [Wang et al. 2008]. Nel presente studio sono stati identificati 6 cluster di microRNA cellulari, coinvolti nella proliferazione e nel differenziamento cellulare, che subiscono un significativo aumento o riduzione in seguito all'infezione da HCMV. Come già

osservato da Wang e coll., diversi miRNA inclusi nello stesso cluster hanno la stessa sequenza *seed* e/o sono coinvolti nella regolazione di geni bersaglio comuni. Ad esempio, il cluster 4 comprende miRNA del miR-17-92 cluster e il miR-106b-25 di cluster, che hanno la sequenza *seed* identica, e cluster 7 include miR-192, miR-194 e miR-215, che hanno identica sequenza *seed* e sono azionati direttamente da p53 [Braun et al. 2008].

Le fasi precoci dell'infezione da HCMV mostrano la riduzione dell'espressione di miRNA con funzioni di oncosoppressione, come mir-584, appartenente al cluster 2, la cui inibizione potrebbe favorire la traslocazione di HCMV al nucleo. È stato dimostrato infatti che miR-584 è in grado di ridurre l'espressione di ROCK1 [Ueno et al. 2011] un effettore di RhoA, con un ruolo centrale nella formazione dei microfilamenti di actina [Leung et al. 1996] che come è noto in seguito all'ingresso di HCMV nella cellula, vengono perturbati per consentire la traslocazione dei capsidi di HCMV al nucleo e quindi la replicazione del DNA virale [Evers et al. 2004].

In corso di infezione è stato osservato un aumento precoce seguito da una notevole riduzione nelle fasi più tardive a partire da 48 h.p.i., dell'espressione di miRNA che influenzano la trascrizione e la maturazione dell'mRNA come il cluster 5, rappresentato dalla famiglia dei miR-548 e miR-519, probabilmente a favorire il processo di espressione genica del virus. Tra i target di miR-519 infatti si trovano le proteine RBP (RNA-binding proteins), regolatrici critiche dell'espressione genica in quanto influenzano lo splicing del pre-mRNA, il capping dell'estremità 5', la poliadenilazione al 3', il trasporto nucleare, il trasporto verso il citoplasma e la traduzione [Abdelmohsen et al. 2008]. Altra famiglia di microRNA cellulari la cui espressione risulta indotta 24ore dopo l'infezione virale è rappresentata dal cluster 7; appartiene a questa famiglia il miRNA miR-132 il quale è in grado di regolare negativamente l'espressione del coattivatore trascrizionale p300 e inibire la risposta immunitaria e antivirale sia nel corso di infezioni da KSHV, HSV-1 e HCMV [Lagos et al. 2010].

Infine nelle fasi precoci e nuovamente nella fase tardiva dell'infezione HCMV induce progressivamente l'espressione di miRNA che interferiscono con l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi e sono spesso sovraespressi nei tessuti tumorali (cluster 4). Appartiene a questo gruppo la famiglia di miRNA miR-17-92 (miR-

17, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a, miR-20b, and miR-92a), regolati da dal protooncogene c-Myc, , la cui espressione è stimolata, insieme a *fos*, *jun* in seguito all'infezione da HCMV [Boldogh et al. 1991] e responsabili della regolazione di numerosi grnei coinvolti nel controllo della proliferazione cellulare o dell'apoptosi. Target del miRNA miR-19, ad esempio, è l'oncosoppressore PTEN [Olive et al. 2009] il quale regola negativamente la via PI3K/Akt, un importante via di segnalazione che promuove la sopravvivenza della cellula infettata, e che infatti viene attivata dall'infezione da HCMV in seguito all'interazione tra la glicoproteina dell'envelope virale gB e il recettore cellulare EGFR [Evers et al. 2004]; altre funzioni pro-sopravvivenza o anti-apoptotiche di questa famiglia di miRNA, sono sostenute dai miR-92a il quale agisce come inibitore del gene proapoptotico Bim [Li uet al. 2013].

## CAPITOLO 6

### CONCLUSIONI

Il presente studio ha portato alla caratterizzazione completa dei 17 microRNA maturi di citomegalovirus umano, annotati in miRBase fino al 2012, che con eccezione dei miR-UL148D, e miR-UL70-5p che non sono stati rilevati in corsi di infezione, vengono tutti espressi a partire dalle fasi precoci dell'infezione virale.

È stato inoltre utilizzato un sistema bioinformatico di predizione di geni target, basato sulla complementarità di sequenza tra miRNA e sequenza 3'UTR, che ha portato all'individuazione di quattro candidati geni bersaglio (HDA11, HDAC4,IFI30, e PTBP1) per il microRNA hcmv-miR-US25-2-3p, che sono stati confermati sperimentalmente. Lo studio funzionale del target PTBP1 ha dimostrato la capacità del miRNA di inibire l'attività di regolazione dello splicing; infine il modello di knock-out del miRNA hcmv-miR-Us25-2-3p, , ha permesso di confermare il ruolo del miRNA nella promozione della replicazione di HCMV. Si delinea per tale miRNA un ruolo emergente, insieme agli altri miRNA espressi nella fase litica del ciclo vitale di HCMV, nei meccanismi di promozione della replicazione virale e dell'evasione dell'immunosorveglianza da parte del citomegalovirus umano.

La seconda parte di questo studio ha portato all'individuazioni di classi di miRNA cellulari che subiscono una significativa deregolazione in seguito all'infezione da citomegalovirus umano *in vitro*, i quali sono coinvolti in vie di segnalazione che possono interferire con il ciclo replicativo del virus a partire dalla fase di ingresso nella cellula ospite e traslocazione al nucleo, all'alterazione del ciclo cellulare alla replicazione e trascrizione del DNA virale, alla maturazione dell'mRNA allo scopo.

Concludendo questo studio offre un ulteriore approfondimento sulle interazioni tra virus e cellula ospite mediate da microRNA, che promuovono la replicazione litica virale e l'evasione della risposta immunitaria.



## CAPITOLO 7

### **BIBLIOGRAFIA**

Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, Gorospe M. miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(51): 20297-302.

Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004; 431: 350-355.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-231.

Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, and Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-366.

Boehme KW, Guerrero M, and Compton T. Human cytomegalovirus envelope glycoproteins B and H are necessary for TLR2 activation in permissive cells. *Immunol* 2006;177 (10): 7049-7102.

Boldogh I, AbuBakar S, Deng CZ, and Albrecht T. Transcriptional activation of cellular oncogenes fos, jun, and myc by human cytomegalovirus. *J Virol* 1991; 65: 1568-71

Boss IW, Plaisance KB, Renne R..Role of virus-encoded micro RNAs in herpesvirus biology. *Trends Microbiol* 2009; 17: 544–553.

Braun CJ, Zhang X, Savelyeva I, Wolff S, Moll UM, Schepeler T, Ørntoft TF, Andersen CL, Dobbstein M. p53-Responsive micrornas 192 and 215 are capable of inducing cell cycle arrest. *Cancer Res* 2008;68(24):10094-104.

Bregues M, Teixeira D, Parker R. Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* 2005; 310: 486-489.

Bresnahan WA, Shenk T. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* ; 288: 2373– 2376.

Britt WJ and Boppana S. Human Cytomegalovirus Virion Proteins. *Human Immunology* 2004; 65: 395-402.

Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O. widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* 2008; 320: 1185-1190.

Cai X, Hagedorn CH, and Cullen BR. Human miRNA are processed from capped, polyadenilated transcript that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10: 1957-1966.

Cai X, Schäfer A, Lu S, Bilello JP, Desrosiers RC, Edwards R, Raab-Traub N, and Cullen BR. Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog* 2006; 2: e23.

Cai X, Lu S, Zhang Z, Gonzalez CM, Damania B, Cullen BR. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2005; 102: 5570–5575.

Choy EY, . An Epstein-Barr virus-encoded microRNA targets PUMA to promote host cell survival. *J Exp Med* 2008; 205: 2551-2560.

Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW, Belko J, Latz E, Golenbock DT, and Finberg RW. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 2003; 77: 4588–96.

Compton T. Receptors and immune sensor: the complex entry path of human cytomegalovirus. *Trend Cell Biol* 2004; 14 (1): 5-8.

Cruz Cosme RS, Yamamura Y, and Tang Q. Roles of polypirimidine tract binding protein in major immediate-early gene expression and viral replication of human cytomegalovirus. *J Virol* 2009; 83 (7): 2839-2850.

Doench JG, and Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 2004; 18; 504–511.

Dolan A, Cunningham C, Hector RD, et al. Genetic content of wild-type human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 2004; 85: 1301–1312.

Dölken L, Pfeffer S, Koszinowski UH. Cytomegalovirus microRNAs. *Virus Genes* 2009; 38: 355-364.

Dunn W, Trang P, Zhong Q, Yang E, Van Belle C and Liu F. Human cytomegalovirus expresses novel microRNAs during productive viral infection. *Cell Microbiol* 2005; 7(11): 1684-1695.

Evers DL, Wang X, Huang ES. Cellular stress and signal transduction responses to human cytomegalovirus infection. *Microbes and Infection* 2004; 6: 1084–1093.

Gao JL, Murphy PM. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 28539–42.

Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, and Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12: 580– 587.

Gibson W. Structure and assembly of the virion. *Intervirology* 1996; 39: 389–400.

Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Dionne CA, Kedersha NL, Vater CA, Han JW, Lutz RJ, Watanabe S, McFarland CED, Kieff ED, Mocarski ES, and Chittenden T. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12536–12541.



Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, Frenzel C, Majoros WH, Chi JT, Braich R, Manoharan M, Soutschek J, Ohler U, and Cullen BR. A viral microRNA function as an ortholog of cellular miR-155. *Nature* 2007; 450: 1096-1099.

Gottwein E, and Cullen BR. Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host Microbe* 2008; 3(6): 375.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36 (1): 59–74.

Grey F, Antoniewicz A, Allen E, Saugstad J, McShea A, Carrington J C, and Nelson J. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J Virol* 2005; 79:12095–12099.

Grey F, Meyers H, White EA, Spector DH, and Nelson J. A human cytomegalovirus-encoded microRNA regulates expression of multiple viral genes involved in replication. *PLoS Pathog* 2007;3: e163.

Grey F, and Nelson J. Identification and function of human cytomegalovirus microRNAs. *J Clin Virol* 2008; 41: 186–191.

Grey F, Tirabassi R, Meyers H, Wu G, McWeeney S, Hook L, and Nelson JA. A viral microRNA downregulates multiple cell cycle genes through mRNA 5'UTRs. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1000967.

Grosse SD, Ross DS, and Dollard SC. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection as a cause of permanent bilateral hearing loss: a quantitative assessment. *J Clin Virol* 2008; 41: 57-62.

Grundhoff A, Sullivan CS, Ganem D. A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma-herpesviruses. *RNA* 2006; 12: 733–750.

Hagemeyer C, Caswell R, Hayhurst G, Sinclair J and Kouzarides T. Functional interaction between the HCMV IE2 transactivator and the retinoblastoma protein. *EMBO J* 1994; 13: 2897–2903.

Hariharan M, Scaria V, Pillai B, and Brahmachari SK. Targets for human encoded microRNAs in HIV genes. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 337: 1214-1218.

Huang J, Wang F, Argyris E, Chen K, Liang Z, Tian H, Huang W, Squires K, Verlinghieri G, and Zhang H. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nat Med* 2007; 13 :1241-1247.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, and Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; 293: 834-838.

Inomata M, Tagawa H, Guo YM, Kameoka Y, Takahashi N, Sawada K. MicroRNA-17-92 down-regulates expression of distinct targets in different B-cell lymphoma subtypes. *Blood*. 2009 Jan 8;113(2):396-402.

Isaacson MK, Juckem LK, and Compton T. Virus entry and innate immune activation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008; 325: 85-100.

Jackson SE, Gavin MM, and Wills MR. Human cytomegalovirus immunity and immune evasion. *Virus Res* 2011; 157: 151-160.

Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature*. 1970; 227(5254):168-70.

Jenkins C, Abendroth A, and Slobedman B. A novel viral transcript with homology to human interleukin-10 is expressed during latent human cytomegalovirus infection. *J Virol* 2004; 78 (3): 1440-1447.

Jenkins C, Garcia W, Godwin MJ, Spencer JV, Stern JL, Abendroth A, and Slobedman B. <immunomodulatory properties of viral homolog of human

interleukin-10 expressed by human cytomegalovirus during latent phase of infection. *J Virol* 2008;82 (7): 3736-3750.

Jopling CL, Lancaster AM, Lemon SM, and Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 2005; 309: 1577-1581.

Jovanovic M, and Hengartner MO. miRNAs and apoptosis: RNAs to die for. *Oncogene* 2006; 25: 6176–6187.

Kalejta RF, Bechtel JT, and Shenk T. Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors. *Mol Cell Biol* 2003; 23:1885–1895.

Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72:249-265.

Karlin S, Mocarski ES, and Schachtel GA. Molecular evolution of herpesviruses: genomic and protein sequence comparisons. *J Virol* 1994; 68: 1886–1902.

Kluiver J, Kroesen BJ S, Poppema S, and Van den Berg A. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia* 2006; 20: 1931–1936.

Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratrix F, Fabani M, Milne RS, Gotch F, Boshoff C. miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat Cell Biol.* 2010; 12(5):513-9.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, and Tuschl T. New miRNAs from mouse and human. *RNA* 2003; 9: 175-179.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75: 843–854.

Lee S, Song J, Kim S, Kim J, Hong Y, Kim Y, Kim D, Baek D, and Ahn K. Selective degradation of host MicroRNAs by an intergenic HCMV noncoding RNA accelerates virus production. *Cell Host Microbe* 2013;13(6):678-90.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Back SH, and Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-4060.

Leicellier CH, Dunoyer P, and Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosides, indicates that thousand of human genes are microRNA target. *Cell* 2005; 120: 15-20.

Leung T, Chen XQ, Manser E, Lim L. The p160 RhoA-binding kinase ROK alpha is a member of a kinase family and is involved in the reorganization of the cytoskeleton. *Mol Cell Biol.* 1996 Oct;16(10):5313-27.

Lewis BP, Burge CB, and Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120: 15–20.

Li Y, Li Y, Zhang H, Chen Y MicroRNA-mediated positive feedback loop and optimized bistable switch in a cancer network Involving miR-17-92. *PLoS One.* 2011;6(10):e26302.

Liu J, Wu CP, Lu BF, Jiang JT. Mechanism of T cell regulation by microRNAs. *Cancer Biol Med.* 2013;10(3):131-137.

Lu M, and Shenk T. Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle. *J Virol* 1999; 73:676–683.

Lu S, Cullen BR. Adenovirus VA1 noncoding RNA can inhibit small interfering RNA and microRNA biogenesis. *J Virol* 2004; 78: 12868-12876.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursor. *Science* 2004; 303: 95-98.

Margulies BJ, Browne H, Gibson W. Identification of the human cytomegalovirus G protein-coupled receptor homologue encoded by UL33 in infected cells and enveloped virus particles. *J Virol* 1996; 225: 111–25.

Maul GC, Negorev D, Bell P, and Ishov AM. Review: properties and assembly mechanism of ND10, PML bodies, or PODs. *J Struct Biol* 2000; 129: 278-287.

Mocarski ES and Courcelle CT. Cytomegalovirus and their replication. In D. Knipe, & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* 2001 ( pp. 2629-2673). Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.

Mocarski ES, Shenk T, Pass RF. Cytomegaloviruses. In D. Knipe, & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* 2007 ( pp. 2701–2772). Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.

Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, Tabi Z. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 2002; 99: 2913–21.

Novotny J, Rigoutsos I, Coleman D, Shenk T. In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. *J Mol Biol* 2001; 310: 1151–1166.

Olive V, Bennett MJ, Walker JC, Ma C, Jiang I, Cordon-Cardo C, Li QJ, Lowe SW, Hannon GJ, and He L. miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* 2009;23(24):2839-49

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000;408: 86–89.

Pass R F. Cytomegalovirus. In D. Knipe, & P. Howley (Eds.), *Fields Virology* 2001 ( pp. 2675–2705). Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins.

Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, David M. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 2007; 449: 919–922.

Penfold ME, Dairaghi DJ, Duke GM et al. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 9839–44.

Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, John B, Enright AJ, Marks D, Sander C, and Tuschl T. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 2004; 304: 734-736.

Plachter B, Sinzger C, and Jahn G. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* 1996; 46: 195– 261.

Plotkin SA, Furukawa T, Zygraich N and Huygelen C. Candidate cytomegalovirus strain for human vaccination. *Infection and Immunity* 1975; 12: 521-527.

Poole E, McGregor Dallas SR, Colston J, Joseph RS, Sinclair J. Virally induced changes in cellular microRNAs maintain latency of human cytomegalovirus in CD34<sup>+</sup> progenitors. *J Gen Virol* 2011;92(Pt 7):1539-49.

Portal D, Rosendorff A, and Kieff E. Epstein-Barr nuclear antigen leader protein coactivates transcription through interaction with histone deacetylase 4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(51):19278-83.

Qi P, Han J, Lu Y, Wang C and Bu F. Virus-Encoded microRNAs: Future Therapeutic Targets? *Cell Molec Immunol* 2006; 3(6): 411-419.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000;403: 901–906.

Ruvkun G, Wightman B, Bürglin T, Arasu P. Dominant gain-of-function mutations that lead to misregulation of the *C. elegans* heterochronic gene lin-

14, and the evolutionary implications of dominant mutations in pattern-formation genes. *Development Suppl.* 1991;1: 47–54

Sabbatini P and McCormick F. Phosphoinositide 3-OH kinase (PI3K) and PKB/Akt delay the onset of p53-mediated, transcriptionally dependent apoptosis, *J Biol Chem* 1999; 274: 24263–24269

Samols MA, Hu J, Skalsky RL, Renne R. Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J Virol* 2005; 79: 9301–9305.

Sampaio KL, Cavnac Y, Stierhof YD, Sinzger C. Human cytomegalovirus labeled with green fluorescent protein for live analysis of intracellular particle movements. *J Virol* 2005; 79(5):2754-67.

Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski AS, Goldmacher VS. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation, *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 7829–7834.

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

Sinzger C, Kahl M, Laib K, Klingel K, Rieger P, Plachter B, and Jahn G. (2000). Tropism of human cytomegalovirus for endothelial cells is determined by a post-entry step dependent on efficient translocation to the nucleus. *J Gen Virol* 81, 3021– 3035.

Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarsky ES, and Goldmacher VS. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sca USA* 2001; 98: 7829-7834.

Skalsky, R.L., Cullen, B.R., 2010. Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu Rev Microbiol* 2010;64:123-41.

Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz HR, Ruvkun G.. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol. Cell* 2000;5: 659–669.

Song Y, Tzima E, Ochs K, Bassili G, Trusheim H, Linder M, Preissner KT, and Niepmann M. Evidence for an RNA chaperone function of polypyrimidine tract-binding protein in picornavirus translation. *RNA* 2005; 11(12):1809-24.

Spencer JV, Lockridge KM, Barry PA, Lin G, Tsang M, Pendolf ME, and Schall TJ. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 2002; 76 (3): 1285-1292.

Stenberg RM, Fortney J, Barlow SW, Magrane BP, Nelson JA and Ghazal P. Promoter-specific trans activation and repression by human cytomegalovirus immediate-early proteins involves common and unique protein domains. *J Virol* 1990; 64: 1556-1565.

Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmerman A, Wolf DG, Saleh N, Biton M, Horvitz E, Prokocimer Z, Prichard M, Hann G, Goldman-Wohl D, Greenfield C, Yagel S, Hengel H, Altuvia Y, Margalit H, and Mandelboim O. Host immune system gene targeting by viral miRNA. *Science* 2007; 317: 376-381.

Stern-Ginossar N, Saleh N, Goldberg MD, Prichard M, Wolf DG, and Mandelboim O. Analysis of human cytomegalovirus-encoded micro-RNA activity during infection. *J Virol* 2009; 83(20): 10684-10693 .

Sawicka K, Bushell M, Spriggs KA, Willis AE. Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochem Soc Trans* 2008; 36: 641-647.

Tanzer A, and Stadler PF. Molecular evolution of a miRNA cluster. *J Mol Biol* 2004; 339: 327-335



Tirabassi R, Hook L, Landais I, Grey F, Meyers H, Hewitt H, and Nelson J. Human cytomegalovirus US7 is regulated synergistically by two virally encoded microRNAs and by two distinct mechanisms. *J Virol* 2011; 85 (22): 11938-11944.

Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 1980; 26(2): 171–6.

Ueno K, Hirata H, Shahryari V, Chen Y, Zaman MS, Singh K, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R. Tumour suppressor microRNA-584 directly targets oncogene Rock-1 and decreases invasion ability in human clear cell renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2011 Jan 18;104(2):308-15.

Wang X, Huong SM, Chiu ML, Raab-Traub N, and Huang ES. Epidermal growth factor receptor is a cellular receptor for human cytomegalovirus, *Nature* 2003; 424: 456–461.

West LC, Cresswell P. Expanding roles for GILT in immunity. *Curr Opin Immunol* 2013; 25(1):103-8.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Post transcriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75: 855–862.

Winter J, Jung S, Sarina Keller, Gregory RI and Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* 2009;11: 228 – 234.

Zhang Z, Huong SM, Wang X, Huang DY, Huang ES. Interactions between human cytomegalovirus IE1-72 and cellular p107: functional domains and mechanisms of up-regulation of cyclin E/cdk2 kinase activity. *J Virol* 2003; 77: 12660–12670.

Zeng Y, Yi R, and Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanism. Proc Natl Acad Sca USA 2003; 100: 9779-9784.

Ziegelbauer JM, Sullivan CS, and Ganem D. Tandem array-based expression screens identify host mRNA targets of virus-encoded microRNAs. Nat Genet 2009; 41 (1): 130-134.

Maul GC, Negorev D, Bell P, and Ishov AM. Review: properties and assembly mechanism of ND10, PML bodies, or PODs. J Struct Biol 2000; 129: 278-287.

miRBase: <http://www.mirbase.org/>.



## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare la Prof.ssa Luisa Barzon e il Prof. Giorgio Palù per avermi dato la possibilità di intraprendere questo percorso e per la supervisione di tutto il lavoro.

Desidero inoltre ringraziare le persone che hanno collaborato a questo progetto: le Dott.sse Barbara Di Camillo e Tiziana Sanavia del Dipartimento di Ingegneria dell'Informazione, per l'analisi statistica dei dati dei microarray; il Dott. Enrico Lavezzo e, in particolare, la Dott.ssa Marta Trevisan che è stata per me un punto di riferimento fondamentale aiutandomi nell'impostazione e nella realizzazione del lavoro.

Un ringraziamento va a tutti i colleghi del laboratorio, le Dott.sse Giulia Costanzi, Marta Trevisan, Elektra Peta, Laura Squarzon e Giulia Masi, e i Dott. Alessandro Sinigaglia ed Enrico Lavezzo per avermi offerto il loro sostegno, i loro preziosi consigli e la loro amicizia.

Infine il ringraziamento più grande va alla mia famiglia, che mi ha sostenuta, incoraggiata e “sopportata” in tutti questi anni di studio e lavoro e a cui dedico questa tesi.



## APPENDICE

Vengono riproposte le predizioni dei target virali e cellulari dei miRNA di HCMV effettuate con l'algoritmo *metaconsensus*, sviluppato *in house*, che integra le predizioni dei tre algoritmi Miranda, RNAhybrid e Pita (vengono riportati anche il numero di siti di legame multipli individuati dai tre algoritmi).

### 1 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-UL22A.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-28)	RNAhybrid (-30)	Pita (-15)
<i>Target di miR-UL22A con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
<i>Target di miR-UL22A con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_001012508	Homo sapiens shadow of prion protein homolog (zebrafish) (SPRN), mRNA.		2	1
<i>Target di miR-UL22A con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
<i>Target di miR-UL22A con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				

### 2 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-UL22A.

ID	Miranda (-23)	RNAhybrid (-25)	Pita (-8)
<i>Target di miR-UL22A con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
UL21Acomplement	1	1	2
UL23complement	1	1	1
UL24complement	1	1	1
UL38complement	1	2	1
<i>Target di miR-UL22A con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
<i>Target di miR-UL22A con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
<i>Target di miR-UL22A con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			

### 3 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-UL22A\*.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-25)	RNAhybrid (-27)	Pita (-12)
<i>Target di miR-UL22A* con almeno 1 un sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
NM_001010915	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase-like A domain containing 2 (PTPLAD2), mRNA.		1	1
NM_001128204	Homo sapiens sulfatase 1 (SULF1), transcript variant 4, mRNA.		1	1
NM_001128205	Homo sapiens sulfatase 1 (SULF1), transcript variant 1, mRNA.		1	1
NM_001128206	Homo sapiens sulfatase 1 (SULF1), transcript variant 2, mRNA.		1	1
NM_001130929	Homo sapiens PL-5283 protein (PL-5283), mRNA.		1	1
NM_005838	Homo sapiens glycine-N-acyltransferase (GLYAT), nuclear gene encoding		1	2

	mitochondrial protein, transcript variant 2, mRNA.			
NM_015170	Homo sapiens sulfatase 1 (SULF1), transcript variant 3, mRNA.	1	1	1
NM_020863	Homo sapiens zinc finger and AT hook domain containing (ZFAT), transcript variant ZFAT-1, mRNA.	1	1	1
NM_021809	Homo sapiens TGFB-induced factor homeobox 2 (TGIF2), mRNA.	1	1	5
NM_032558	Homo sapiens hippocampus abundant transcript-like 1 (HIATL1), mRNA.	1	3	3
NM_207405	Homo sapiens chromosome 4 open reading frame 50 (C4orf50), mRNA.	1	1	2
<i>Target di miR-UL22A* con almeno 1 sitodi legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_001001480	Homo sapiens keratin associated protein 5-5 (KRTAP5-5), mRNA.	1	2	2
NM_001039500	Homo sapiens von Willebrand factor A domain containing 5B1 (VWA5B1), mRNA.	1	1	2
NM_001127214	Homo sapiens acyl-CoA synthetase family member 3 (ACSF3), transcript variant 2, mRNA.	1	2	2
NM_001142588	Homo sapiens nuclear transcription factor Y, gamma (NFYC), transcript variant 1, mRNA.	1	1	1
NM_001142777	Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7 (HSD3B7), transcript variant 2, mRNA.	3	4	7
NM_001142778	Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7 (HSD3B7), transcript variant 3, mRNA.	3	4	7
NM_002618	Homo sapiens peroxisomal biogenesis factor 13 (PEX13), mRNA.	2	1	3
NM_012121	Homo sapiens CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 4 (CDC42EP4), mRNA.	2	2	3
NM_014223	Homo sapiens nuclear transcription factor Y, gamma (NFYC), transcript variant 2, mRNA.	1	1	1
NM_014720	Homo sapiens STE20-like kinase (yeast) (SLK), mRNA.	1	2	2
NM_016512	Homo sapiens sperm associated antigen 11B (SPAG11B), transcript variant A, mRNA.	1	1	1
NM_032788	Homo sapiens zinc finger protein 514 (ZNF514), mRNA.	1	4	4
NM_032822	Homo sapiens family with sequence similarity 136, member A (FAM136A), mRNA.	1	1	1
NM_058206	Homo sapiens sperm associated antigen 11B (SPAG11B), transcript variant B, mRNA.	1	1	1
NM_145166	Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 47 (ZBTB47), mRNA.	1	1	1
NM_174917	Homo sapiens acyl-CoA synthetase family member 3 (ACSF3), transcript variant 1, mRNA.	1	3	3
<i>Target di miR-UL22A* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
NM_002864	Homo sapiens pregnancy-zone protein (PZP), mRNA.	1	1	2
NM_015472	Homo sapiens WW domain containing transcription regulator 1 (WWTR1), mRNA.	1	0	1
NM_017412	Homo sapiens frizzled homolog 3 (Drosophila) (FZD3), mRNA.	1	0	1
NM_152570	Homo sapiens leucine rich repeat and Ig domain containing 2 (LINGO2), mRNA.	1	0	1
NM_153810	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 46 (C10orf46), mRNA.	1	1	1
<i>Target di miR-UL22A* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				
NM_000579	Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5), transcript variant A, mRNA.	1	2	1
NM_001010000	Homo sapiens Rho GTPase activating protein 28 (ARHGAP28), transcript variant 1, mRNA.	1	1	2
NM_001024463	Homo sapiens histidine acid phosphatase domain containing 2A (HISPPD2A), transcript variant 4, mRNA.	1	1	3
NM_001100168	Homo sapiens chemokine (C-C motif) receptor 5 (CCR5), transcript variant B, mRNA.	1	2	1
NM_001957	Homo sapiens endothelin receptor type A (EDNRA), mRNA.	2	2	3
NM_002140	Homo sapiens heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK), transcript variant 1, mRNA.	1	3	3
NM_014659	Homo sapiens histidine acid phosphatase domain containing 2A (HISPPD2A), transcript variant 2, mRNA.	1	1	3
NM_016019	Homo sapiens LUC7-like 2 (S. cerevisiae) (LUC7L2), mRNA.	1	1	2
NM_018413	Homo sapiens carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 11 (CHST11), mRNA.	0	1	2

NM_024625	Homo sapiens zinc finger CCCH-type, antiviral 1 (ZC3HAV1), transcript variant 2, mRNA.	0	1	3
NM_152441	Homo sapiens F-box and leucine-rich repeat protein 14 (FBXL14), mRNA.	1	1	2
NM_152749	Homo sapiens ataxin 7-like 1 (ATXN7L1), transcript variant 2, mRNA.	2	1	2

#### 4 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-UL22A\*.

ID	Miranda (-20)	RNAhybrid (-22)	Pita (-5)
<i>Target di miR-UL22A* con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
UL10	1	1	2
UL11	1	1	1
UL18	1	1	1
UL19	1	1	1
UL23complement	1	1	1
UL34	3	2	3
UL45complement	1	1	1
UL87	1	3	3
US24complement	1	1	3
<i>Target di miR-UL22A* con almeno 1 siti di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL111A	2	1	1
UL115complement	1	1	1
US19complement	1	3	3
<i>Target di miR-UL22A* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
RL1	1	2	4
RL1complement	1	2	4
UL69complement	1	2	2
<i>Target di miR-UL22A* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			
RL12complement	0	3	2
RL13complement	0	2	2
UL7	0	1	1
UL8	0	1	1
UL94	0	3	2
UL97	0	2	4
US28	0	1	1



## 5 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-UL36.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-27)	RNAhybrid (-28)	Pita (-14)
<i>Target di miR-UL36 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
NM_001677	Homo sapiens ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide (ATP1B1), transcript variant 1, mRNA.	1	3	1
NM_003702	Homo sapiens regulator of G-protein signaling 20 (RGS20), transcript variant 2, mRNA.	1	4	3
NM_170587	Homo sapiens regulator of G-protein signaling 20 (RGS20), transcript variant 1, mRNA.	1	4	3
<i>Target di miR-UL36 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
<i>Target di miR-UL36 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
NM_021809	Homo sapiens TGFB-induced factor homeobox 2 (TGIF2), mRNA.	2	2	2
<i>Target di miR-UL36 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				

## 6 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-UL36.

ID	Miranda (-22)	RNAhybrid (-23)	Pita (-6)
<i>Target di miR-UL36 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
UL131complement	4	10	4
UL36complement	2	7	2
UL37complement	1	7	3
UL55complement	2	6	1
<i>Target di miR-UL36 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
RL13complement	1	2	2
UL132complement	3	9	6
UL97	1	5	3
US26complement	1	7	1
<i>Target di miR-UL36 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
UL124	1	9	2
UL38complement	1	1	1
UL45complement	2	3	1
UL50complement	2	5	1
US24complement	4	2	3
US6complement	1	7	4
<i>Target di miR-UL36 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			

## 7 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-UL36\*.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-27)	Rnahybrid (-28)	Pita (-14)
<i>Target di miR-UL36* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
NM_001 017919	Homo sapiens RCC1 domain containing 1 (RCCD1), transcript variant 2, mRNA.	2	5	4
NM_001 040280	Homo sapiens CD83 molecule (CD83), transcript variant 2, mRNA.	2	8	3
NM_001 135775	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 7 (C9orf7), transcript variant 2, mRNA.	3	7	9
NM_004 233	Homo sapiens CD83 molecule (CD83), transcript variant 1, mRNA.	2	8	3
NM_017 586	Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 7 (C9orf7), transcript variant 1, mRNA.	3	7	9
NM_018 271	Homo sapiens threonine synthase-like 2 ( <i>S. cerevisiae</i> ) (THNSL2), mRNA.	2	3	3
NM_018 420	Homo sapiens solute carrier family 22, member 15 (SLC22A15), mRNA.	1	2	3
NM_024 894	Homo sapiens nucleolar protein 10 (NOL10), mRNA.	2	5	6
NM_033 544	Homo sapiens RCC1 domain containing 1 (RCCD1), transcript variant 1, mRNA.	2	5	4
NM_133 474	Homo sapiens zinc finger protein 721 (ZNF721), mRNA.	2	3	4
NM_145 056	Homo sapiens dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 3 ( <i>Xenopus laevis</i> ) (DACT3), mRNA.	1	5	3
<i>Target di miR-UL36* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_001 006638	Homo sapiens RAB37, member RAS oncogene family (RAB37), transcript variant 2, mRNA.	1	9	4
NM_001 033952	Homo sapiens calcitonin-related polypeptide alpha (CALCA), transcript variant 2, mRNA.	1	1	1
NM_001 039211	Homo sapiens ATPase family, AAA domain containing 3C (ATAD3C), mRNA.	1	5	1
NM_001 083537	Homo sapiens family with sequence similarity 86, member B1 (FAM86B1), transcript variant 1, mRNA.	1	4	3
NM_001 099	Homo sapiens acid phosphatase, prostate (ACPP), transcript variant 1, mRNA.	1	4	4
NM_001 104925	Homo sapiens protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2 (PCMTD2), transcript variant 2, mRNA.	1	4	3
NM_001 142497	Homo sapiens mixed lineage kinase domain-like (MLKL), transcript variant 2, mRNA.	1	3	2
NM_001 144952	Homo sapiens sidekick homolog 2 (chicken) (SDK2), mRNA.	1	6	1
NM_001 741	Homo sapiens calcitonin-related polypeptide alpha (CALCA), transcript variant 1, mRNA.	1	1	1
NM_003 185	Homo sapiens TAF4 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 135kDa (TAF4), mRNA.	3	2	1
NM_004 110	Homo sapiens ferredoxin reductase (FDXR), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 2, mRNA.	1	4	1
NM_004 393	Homo sapiens dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1) (DAG1), mRNA.	2	7	7
NM_005 297	Homo sapiens melanin-concentrating hormone receptor 1 (MCHR1), mRNA.	2	6	2
NM_006 033	Homo sapiens lipase, endothelial (LIPG), mRNA.	1	10	2
NM_006 705	Homo sapiens growth arrest and DNA-damage-inducible, gamma (GADD45G), mRNA.	1	2	2
NM_013 373	Homo sapiens zinc finger, DHHC-type containing 8 (ZDHHC8), mRNA.	2	5	3
NM_014 360	Homo sapiens NK2 homeobox 8 (NKX2-8), mRNA.	3	6	3
NM_014 960	Homo sapiens arylsulfatase G (ARSG), mRNA.	1	4	2
NM_016 183	Homo sapiens mRNA turnover 4 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) (MRTO4), mRNA.	1	8	4
NM_018 257	Homo sapiens protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2 (PCMTD2), transcript variant 1, mRNA.	1	4	3
NM_021 646	Homo sapiens zinc finger protein 500 (ZNF500), mRNA.	1	5	2
NM_021 982	Homo sapiens SEC24 family, member A ( <i>S. cerevisiae</i> ) (SEC24A), mRNA.	1	3	2
NM_024 417	Homo sapiens ferredoxin reductase (FDXR), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA.	1	4	1
NM_025 125	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 57 (C10orf57), mRNA.	1	4	4

NM_138 697	Homo sapiens taste receptor, type 1, member 1 (TAS1R1), transcript variant 2, mRNA.	2	1	1
NM_144 999	Homo sapiens leucine rich repeat containing 45 (LRR45), mRNA.	2	2	3
NM_152 649	Homo sapiens mixed lineage kinase domain-like (MLKL), transcript variant 1, mRNA.	1	3	2
NM_177 539	Homo sapiens taste receptor, type 1, member 1 (TAS1R1), transcript variant 1, mRNA.	2	2	2
NM_199 262	Homo sapiens Sp6 transcription factor (SP6), mRNA.	2	8	1
NM_201 400	Homo sapiens family with sequence similarity 86, member A (FAM86A), transcript variant 1, mRNA.	2	5	5
NM_201 598	Homo sapiens family with sequence similarity 86, member A (FAM86A), transcript variant 2, mRNA.	2	5	5
<i>Target di miR-UL36* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda Pita</i>				
<i>Target di miR-UL36* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita:</i>				
NM_001 033575	Homo sapiens dual specificity phosphatase 28 (DUSP28), mRNA.	2	2	2
NM_001 098833	Homo sapiens ataxin 7-like 3 (ATXN7L3), transcript variant 2, mRNA.	1	5	4
NM_001 099289	Homo sapiens SH3 domain containing ring finger 3 (SH3RF3), mRNA.	5	9	5
NM_004 200	Homo sapiens synaptotagmin VII (SYT7), mRNA.	3	7	3
NM_004 642	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 2 associated protein 1 (CDK2AP1), mRNA.	1	1	1
NM_020 198	Homo sapiens coiled-coil domain containing 47 (CCDC47), mRNA.	1	3	3
NM_020 218	Homo sapiens ataxin 7-like 3 (ATXN7L3), transcript variant 1, mRNA.	1	5	4
NM_144 658	Homo sapiens dedicator of cytokinesis 11 (DOCK11), mRNA.	1	2	3
NM_144 781	Homo sapiens programmed cell death 2 (PDCD2), transcript variant 2, mRNA.	1	5	2
NM_153 612	Homo sapiens heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 5 (HS3ST5), mRNA.	1	5	3
NM_178 842	Homo sapiens LAG1 homolog, ceramide synthase 3 (LASS3), mRNA.	2	5	3

## 8 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-UL36\*.

ID	Miranda (-22)	RNAhybrid (-23)	Pita (-6)
<i>Target di miR-UL36* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
RL12	1	4	2
RL13	1	4	2
RL13complement	1	2	2
UL105	2	1	2
UL43complement	2	2	2
UL80	1	3	2
UL80_5	1	3	2
UL84complement	2	1	1
US26complement	1	5	2
US3complement	2	5	7
<i>Target di miR-UL36* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL29complement	1	2	0

UL37complement	1	5	3
UL44complement	4	3	3
UL57complement	2	2	3
UL72complement	1	2	0
UL82complement	1	4	2
UL97	1	3	3
US15complement	1	5	4
US2complement	3	3	2
<i>Targeti di miR-UL36* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda Pita</i>			
UL10	2	0	2
UL121complement	1	4	1
UL21Acomplement	2	2	2
UL26complement	2	2	2
UL27complement	5	3	6
UL47	3	2	3
UL88	2	0	1
UL9	2	0	4
US14complement	1	1	1
US24complement	4	2	3
<i>Targeti di miR-UL36* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita:</i>			
UL130complement	2	3	3
UL38complement	1	3	1
UL76	1	6	2
UL95	2	3	2
US28	1	4	1

## 9 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-UL70-3p.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-39)	RNAhybrid (-40)	Pita (-27)
<i>Targeti di miR-UL70-3p con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
NM_001005476	Homo sapiens plakophilin 4 (PKP4), transcript variant 2, mRNA.	2	9	1
NM_001159286	Homo sapiens histone deacetylase 10 (HDAC10), transcript variant 2, mRNA.	8	2	8
NM_003628	Homo sapiens plakophilin 4 (PKP4), transcript variant 1, mRNA.	2	9	1
NM_032019	Homo sapiens histone deacetylase 10 (HDAC10), transcript variant 1, mRNA.	8	2	8

<i>Target di miR-UL70-3p con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_001037553	Homo sapiens 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3 (AGPAT3), transcript variant 2, mRNA.	11	14	5
NM_003685	Homo sapiens KH-type splicing regulatory protein (KHSRP), mRNA.	4	16	7
NM_020132	Homo sapiens 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 3 (AGPAT3), transcript variant 1, mRNA.	11	14	5
NM_021619	Homo sapiens PR domain containing 12 (PRDM12), mRNA.	16	5	13
NM_138356	Homo sapiens Src homology 2 domain containing F (SHF), mRNA.	9	3	6
NM_152769	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 26 (C19orf26), mRNA.	14	4	9
NM_178449	Homo sapiens parathyroid hormone 2 (PTH2), mRNA.	1	2	0
<i>Target di miR-UL70-3p con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
<i>Target di miR-UL70-3p con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				
NM_000774	Homo sapiens cytochrome P450, family 2, subfamily F, polypeptide 1 (CYP2F1), mRNA.	5	6	3
NM_001024845	Homo sapiens solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9 (SLC6A9), transcript variant 3, mRNA.	19	11	9
NM_006934	Homo sapiens solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9 (SLC6A9), transcript variant 1, mRNA.	19	11	9
NM_058238	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 7B (WNT7B), mRNA.	11	8	6
NM_201649	Homo sapiens solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, glycine), member 9 (SLC6A9), transcript variant 2, mRNA.	19	11	9

## 10 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-UL70-3p.

ID	Miranda (-34)	RNAhybrid (-35)	Pita (-17)
<i>Target di miR-UL70-3p con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
UL117complement	17	6	4
UL82complement	14	7	3
UL83complement	13	6	5
UL86complement	13	6	3
<i>Target di miR-UL70-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL111A	14	6	2
UL43complement	12	8	1
UL48	16	6	0
UL74complement	8	7	2
US17complement	15	14	1
US20complement	17	12	2
<i>Target di miR-UL70-3p con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
IRS1	23	8	4
UL44complement	16	7	2
UL70complement	15	8	12

UL89complement	19	11	3
<i>Target di miR-UL70-3p con almeno 1 sito di legame sotto al valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			
UL23complement	8	14	2

## 11 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-UL70-5p.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-33)	RNAhybr id(-35)	Pita (-21)
<i>Target di miR-UL70-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
NM_0044 31	Homo sapiens EPH receptor A2 (EPHA2), mRNA.	4	3	2
<i>Target di miR-UL70-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_0007 19	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit (CACNA1C), transcript variant 18, mRNA.	8	8	2
NM_0010 01791	Homo sapiens chromosome 10 open reading frame 55 (C10orf55), mRNA.	13	7	7
NM_0010 04354	Homo sapiens NOTCH-regulated ankyrin repeat protein (NRARP), mRNA.	12	3	4
NM_0010 77427	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 1 (LYPD1), transcript variant 2, mRNA.	6	5	2
NM_0010 77523	Homo sapiens adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit (AP3D1), transcript variant 1, mRNA.	6	2	1
NM_0010 85372	Homo sapiens chromosome 11 open reading frame 83 (C11orf83), mRNA.	4	3	2
NM_0011 14331	Homo sapiens chloride channel 7 (CLCN7), transcript variant 2, mRNA.	5	2	1
NM_0011 29827	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit (CACNA1C), transcript variant 2, mRNA.	8	8	2
NM_0011 44872	Homo sapiens coiled-coil domain-containing protein 42B (LOC387885), mRNA.	6	3	1
NM_0011 46343	Homo sapiens PQ loop repeat containing 1 (PQLC1), transcript variant 2, mRNA.	9	9	1
NM_0011 46345	Homo sapiens PQ loop repeat containing 1 (PQLC1), transcript variant 3, mRNA.	9	8	1
NM_0012 87	Homo sapiens chloride channel 7 (CLCN7), transcript variant 1, mRNA.	5	2	1
NM_0016 26	Homo sapiens v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2 (AKT2), mRNA.	8	5	2
NM_0028 68	Homo sapiens RAB5B, member RAS oncogene family (RAB5B), mRNA.	2	4	0
NM_0038 97	Homo sapiens immediate early response 3 (IER3), mRNA.	7	7	4
NM_0039 36	Homo sapiens cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 2 (p39) (CDK5R2), mRNA.	8	4	3
NM_0039 38	Homo sapiens adaptor-related protein complex 3, delta 1 subunit (AP3D1), transcript variant 2, mRNA.	6	2	1
NM_0047 62	Homo sapiens cytohesin 1 (CYTH1), transcript variant 1, mRNA.	7	6	2
NM_0147 54	Homo sapiens phosphatidylserine synthase 1 (PTDSS1), mRNA.	2	5	1
NM_0156 94	Homo sapiens zinc finger protein 777 (ZNF777), mRNA.	4	4	0
NM_0161 76	Homo sapiens stromal cell derived factor 4 (SDF4), transcript variant 2, mRNA.	3	3	1
NM_0165 47	Homo sapiens stromal cell derived factor 4 (SDF4), transcript variant 1, mRNA.	6	4	1
NM_0174 56	Homo sapiens cytohesin 1 (CYTH1), transcript variant 2, mRNA.	7	6	2
NM_0201 34	Homo sapiens dihydropyrimidinase-like 5 (DPYSL5), mRNA.	7	9	5
NM_0207 64	Homo sapiens CASK interacting protein 1 (CASKIN1), mRNA.	9	9	2
NM_0208 62	Homo sapiens leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing 1 (LRFN1), mRNA.	8	3	5
NM_0245 27	Homo sapiens abhydrolase domain containing 8 (ABHD8), mRNA.	7	2	4
NM_0248 88	Homo sapiens plasticity-related gene 2 (PRG2), mRNA.	2	1	0
NM_0250 78	Homo sapiens PQ loop repeat containing 1 (PQLC1), transcript variant 1, mRNA.	9	8	1

NM_0320 28	Homo sapiens testis-specific serine kinase 1B (TSSK1B), mRNA.	6	2	1
NM_0581 97	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4) (CDKN2A), transcript variant 3, mRNA.	5	3	1
NM_0784 87	Homo sapiens cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4) (CDKN2B), transcript variant 2, mRNA.	8	3	3
NM_1445 86	Homo sapiens LY6/PLAUR domain containing 1 (LYPD1), transcript variant 1, mRNA.	6	5	2
NM_1533 50	Homo sapiens F-box and leucine-rich repeat protein 16 (FBXL16), mRNA.	9	2	0
NM_1723 67	Homo sapiens tumor suppressor candidate 5 (TUSC5), mRNA.	9	8	5
NM_1788 30	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 47 (C19orf47), mRNA.	5	3	1
NM_1994 60	Homo sapiens calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1C subunit (CACNA1C), transcript variant 1, mRNA.	8	8	2
<i>Target di miR-UL70-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda,Pita</i>				
NM_1980 75	Homo sapiens leucine rich repeat containing 56 (LRRC56), mRNA.	7	4	2
NM_2033 04	Homo sapiens mex-3 homolog D (C. elegans) (MEX3D), mRNA.	7	4	3
<i>Target di miR-UL70-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				
NM_0145 54	Homo sapiens SUMO1/sentrin specific peptidase 1 (SENPI1), mRNA.	2	1	1
NM_0246 53	Homo sapiens PRKR interacting protein 1 (IL11 inducible) (PRKRIP1), mRNA.	9	3	2
NM_1774 03	Homo sapiens RAB7B, member RAS oncogene family (RAB7B), mRNA.	6	5	1

## 12 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-UL70-5p.

ID	Miranda (-28)	RNAhybrid (-30)	Pita (-12)
<i>Target di miR-UL70-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
UL114complement	9	2	3
UL115complement	7	5	7
UL26complement	6	5	4
UL33	8	4	8
UL47	8	4	7
UL86complement	10	2	6
UL87	11	4	4
UL91	12	5	4
UL92	10	7	3
miR-UL70-5p targets with at least 1 site above the threshold predicted by Miranda and RNAhybrid:			
UL11	8	5	8
UL112	7	8	4
UL34	7	6	10
UL48Acomplement	7	4	4
UL49complement	7	3	3
UL94	8	8	6

UL97	12	7	6
US17complement	4	5	2
US26complement	5	5	6
<i>Target di miR-UL70-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda,Pita</i>			
UL102	7	2	2
UL20	9	7	5
UL40complement	6	5	5
UL80	9	9	6
UL80_5	9	9	6
<i>Target di miR-UL70-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			
UL29complement	9	5	5

### 13 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-UL112.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-29)	RNAhybrid (-31)	Pita (-17)
<i>Target di miR-UL112 con almeno 1 sito di legame sotto il livello soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
NM_001001694	Homo sapiens interleukin 17 receptor E-like (IL17REL), mRNA.	6	1	3
NM_002198	Homo sapiens interferon regulatory factor 1 (IRF1), mRNA.	1	2	1
NM_006788	Homo sapiens ralA binding protein 1 (RALBP1), mRNA.	2	2	4
<i>Target di miR-UL112 con almeno 1 sito di legame sotto il livello soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_000234	Homo sapiens ligase I, DNA, ATP-dependent (LIG1), mRNA.	1	2	1
NM_001008215	Homo sapiens chromosome 2 open reading frame 64 (C2orf64), mRNA.	1	5	0
NM_001029870	Homo sapiens ankyrin repeat domain 56 (ANKRD56), mRNA.	2	1	1
NM_001130524	Homo sapiens adaptor-related protein complex 1, mu 1 subunit (AP1M1), transcript variant 1, mRNA.	5	3	2
NM_001131055	Homo sapiens histamine receptor H2 (HRH2), transcript variant 1, mRNA.	4	2	2
NM_003294	Homo sapiens tryptase alpha/beta 1 (TPSAB1), mRNA.	2	1	1
NM_005879	Homo sapiens TRAF interacting protein (TRAIPI), mRNA.	1	1	2
NM_005894	Homo sapiens CD5 molecule-like (CD5L), mRNA.	1	4	2
NM_006590	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 39 (USP39), mRNA.	1	1	1
NM_015230	Homo sapiens ArfGAP with RhoGAP domain, ankyrin repeat and PH domain 2 (ARAP2), mRNA.	1	3	0
NM_015722	Homo sapiens calcyon neuron-specific vesicular protein (CALY), mRNA.	1	1	1
NM_022112	Homo sapiens tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1 (TP53AIP1), mRNA.	4	2	3
NM_032493	Homo sapiens adaptor-related protein complex 1, mu 1 subunit (AP1M1), transcript variant 2, mRNA.	5	3	2
NM_178841	Homo sapiens ring finger protein 166 (RNF166), mRNA.	3	2	4
NM_207306	Homo sapiens KIAA0495 (KIAA0495), mRNA.	2	2	1
<i>Target di miR-UL112 con almeno 1 sito di legame sotto il livello soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
NM_004783	Homo sapiens TAO kinase 2 (TAOK2), transcript variant 1, mRNA.	4	1	1
NM_024731	Homo sapiens kelch-like 36 (Drosophila) (KLHL36), mRNA.	1	0	2
NM_025227	Homo sapiens bactericidal/permeability-increasing protein-like 1 (BPIL1), mRNA.	1	0	1



NM_1451 85	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase 7 (MAP2K7), mRNA.	2	1	4
<i>Target di miR-UL112 con almeno 1 sito di legame sotto il livello soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				
NM_0006 24	Homo sapiens serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antitrypsin), member 5 (SERPINA5), mRNA.	2	2	2
NM_0010 42632	Homo sapiens sorting nexin family member 21 (SNX21), transcript variant 3, mRNA.	3	1	2
NM_0010 42633	Homo sapiens sorting nexin family member 21 (SNX21), transcript variant 4, mRNA.	3	1	2
NM_0012 44	Homo sapiens tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8 (TNFSF8), mRNA.	1	2	4
NM_0155 84	Homo sapiens polymerase (DNA-directed), delta interacting protein 2 (POLDIP2), mRNA.	5	2	3
NM_0190 08	Homo sapiens Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 7-like (SMCR7L), mRNA.	2	2	2
NM_0308 83	Homo sapiens olfactory receptor, family 2, subfamily H, member 1 (OR2H1), mRNA.	2	1	3

#### 14 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-UL112.

ID	Miranda Sites (-24)	RNAhybrid sites (-26)	Pita sites (-9)
<i>Target di miR-UL112 con almeno 1 sito di legame sotto il livello soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
IRS1	3	5	4
RL5A	3	1	3
RL5Acomplement	3	1	3
RL6	4	2	2
RL6complement	4	2	2
UL112	3	4	4
UL115complement	5	1	2
UL23complement	3	5	4
UL29complement	6	3	4
UL31	2	3	2
UL41Acomplement	2	2	1
UL42complement	1	3	2
UL43complement	4	4	5
US14complement	6	1	7
US17complement	7	4	4
US3complement	1	3	2
<i>Target di miR-UL112 con almeno 1 sito di legame sotto il livello soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL105	2	5	4
UL36complement	3	2	2
US23complement	4	2	3
<i>Target di miR-UL112 con almeno 1 sito di legame sotto il livello soglia predetto da Miranda, Pita</i>			

RL12complement	1	2	5
UL11	5	1	4
UL117complement	5	2	7
UL119complement	4	1	6
UL130complement	3	0	1
UL21Acomplement	2	1	1
UL30complement	7	3	6
UL4	5	3	2
UL70complement	4	1	3
UL86complement	3	1	5
UL9	2	2	4
UL95	6	1	4
UL96	5	2	4
US12complement	3	3	3
US16complement	5	3	1
US24complement	4	2	1
US8complement	4	1	2
<i>Target di miR-UL112 con almeno 1 sito di legame sotto il livello soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			
UL120complement	2	3	6
UL121complement	3	3	5
UL123complement	1	3	5
UL72complement	1	1	2
UL77	6	3	1
UL82complement	3	2	4
UL89complement	4	3	5
US21complement	1	3	4
US22complement	3	4	5

## 15 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-US4.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-32)	RNAhybrid (-34)	Pita (-20)
<i>Target di miR-US4 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
NM_000577	Homo sapiens interleukin 1 receptor antagonist (IL1RN), transcript variant 3, mRNA.	2	3	3

NM_003 916	Homo sapiens adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit (AP1S2), mRNA.	1	3	5
NM_014 971	Homo sapiens EFR3 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> ) (EFR3B), mRNA.	4	6	4
NM_022 006	Homo sapiens FXFD domain containing ion transport regulator 7 (FXFD7), mRNA.	4	1	3
NM_182 552	Homo sapiens WD repeat domain 27 (WDR27), mRNA.	1	2	1
<i>Target di miR-US4 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_001 042780	Homo sapiens troponin T type 3 (skeletal, fast) (TNNT3), transcript variant 3, mRNA.	5	1	0
NM_001 080395	Homo sapiens apoptosis-associated tyrosine kinase (AATK), mRNA.	12	1	2
NM_002 735	Homo sapiens protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, beta (PRKAR1B), mRNA.	6	2	0
NM_002 755	Homo sapiens mitogen-activated protein kinase kinase 1 (MAP2K1), mRNA.	2	3	3
NM_005 354	Homo sapiens jun D proto-oncogene (JUND), mRNA.	6	3	0
<i>Target di miR-US4 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
NM_000 402	Homo sapiens glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), transcript variant 1, mRNA.	6	0	2
NM_001 020818	Homo sapiens myeloid-associated differentiation marker (MYADM), transcript variant 1, mRNA.	2	3	2
NM_001 146283	Homo sapiens transcription factor 7-like 2 (T-cell specific, HMG-box) (TCF7L2), transcript variant 3, mRNA.	7	1	2
NM_003 660	Homo sapiens protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 3 (PPFIA3), mRNA.	8	3	3
NM_004 051	Homo sapiens 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1 (BDH1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA.	3	4	4
NM_005 236	Homo sapiens excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4 (ERCC4), mRNA.	1	4	3
NM_017 715	Homo sapiens zinc finger protein 3 (ZNF3), transcript variant 1, mRNA.	3	3	1
NM_020 695	Homo sapiens REX1, RNA exonuclease 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> ) (REXO1), mRNA.	6	0	1
NM_023 076	Homo sapiens unkempt homolog ( <i>Drosophila</i> )-like (UNKL), transcript variant 1, mRNA.	6	1	4
NM_138 373	Homo sapiens myeloid-associated differentiation marker (MYADM), transcript variant 2, mRNA.	2	3	2
NM_203 314	Homo sapiens 3-hydroxybutyrate dehydrogenase, type 1 (BDH1), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 3, mRNA.	3	4	4
<i>Target di miR-US4 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				
NM_000 445	Homo sapiens plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa (PLEC1), transcript variant 1, mRNA.	7	2	2
NM_001 453	Homo sapiens forkhead box C1 (FOXC1), mRNA.	2	3	2
NM_005 614	Homo sapiens Ras homolog enriched in brain (RHEB), mRNA.	4	4	3
NM_012 190	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1 (ALDH1L1), mRNA.	2	1	1
NM_145 283	Homo sapiens nucleoredoxin-like 2 (NXNL2), mRNA.	3	3	2
NM_173 561	Homo sapiens unc-5 homolog C ( <i>C. elegans</i> )-like (UNC5CL), mRNA.	4	2	2
NM_201 378	Homo sapiens plectin 1, intermediate filament binding protein 500kDa (PLEC1), transcript variant 2, mRNA.	7	2	2

## 16 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-US4.

ID	Miranda (-27)	RNAhybrid (-29)	Pita (-11)
<i>Target di miR-US4 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
UL124	4		2
UL51complement	7	3	1
UL72complement	9	4	2

UL84complement	3	4	2
UL86complement	10	2	3
US20complement	7	2	2
US6complement	7	5	3
<i>Target di miR-US4 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL119complement	12	3	0
UL130complement	5	4	2
UL40complement	3	3	3
UL49complement	4	3	4
UL80	3	2	3
UL80_5	3	2	3
US12complement	11	2	1
<i>Target di miR-US4 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
UL41Acomplement	10	4	3
UL42complement	12	4	3
UL43complement	10	1	2
UL50complement	8	3	2
UL55complement	4	8	3
US22complement	4	2	3
US28	4	2	2
<i>Target di miR-US4 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			
UL2complement	1	7	2
UL98	6	3	5
UL99	4	4	5
US13complement	13	7	4

## 17 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-US5-1.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-30)	RNAhybrid (-32)	Pita (-18)
<i>Target di miR-US5-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
<i>Target di miR-US5-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
<i>Target di miR-US5-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda Pita</i>				
<i>Target di miR-US5-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				
NM_003202	Homo sapiens transcription factor 7 (T-cell specific, HMG-box) (TCF7), transcript variant 1, mRNA.	1	2	2

## 18 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-US5-1.

ID	Miranda (-25)	RNAhybrid (-27)	Pita (-10)
<i>Target di miR-US5-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
US7complement	2	2	1
<i>Target di miR-US5-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL25	1	2	1
<i>Target di miR-US5-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda Pita</i>			
UL21Acomplement	1	2	2
<i>Target di miR-US5-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			

## 19 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-US5-2.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-25)	RNAhybrid (-27)	Pita (-12)
<i>Target di miR-US5-2 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
NM_0026 96	Homo sapiens polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G (POLR2G), mRNA.	1	2	1
<i>Target di miR-US5-2 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_0034 30	Homo sapiens zinc finger protein 91 (ZNF91), mRNA.	1	3	1
NM_0059 86	Homo sapiens SRY (sex determining region Y)-box 1 (SOX1), mRNA.	1	4	0
NM_0219 46	Homo sapiens BCL6 co-repressor-like 1 (BCORL1), mRNA.	1	3	1
NM_0250 72	Homo sapiens prostaglandin E synthase 2 (PTGES2), transcript variant 1, mRNA.	1	1	0
NM_1989 38	Homo sapiens prostaglandin E synthase 2 (PTGES2), transcript variant 2, mRNA.	1	1	0
NM_1989 40	Homo sapiens prostaglandin E synthase 2 (PTGES2), transcript variant 4, mRNA.	1	1	0
<i>Target di miR-US5-2 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
NM_0011 31062	Homo sapiens SAP30-like (SAP30L), transcript variant 2, mRNA.	1	3	2
NM_0011 31063	Homo sapiens SAP30-like (SAP30L), transcript variant 3, mRNA.	1	3	2
NM_0190 51	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein L50 (MRPL50), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	1	2	1
NM_0246 32	Homo sapiens SAP30-like (SAP30L), transcript variant 1, mRNA.	1	3	2
<i>Target di miR-US5-2 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				
NM_0011 30991	Homo sapiens hypoxia up-regulated 1 (HYOU1), transcript variant 2, mRNA.	1	1	1
NM_0063 89	Homo sapiens hypoxia up-regulated 1 (HYOU1), transcript variant 1, mRNA.	1	1	1
NM_0181 45	Homo sapiens family with sequence similarity 82, member A2 (FAM82A2), mRNA.	1	2	2
NM_1731 99	Homo sapiens nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3 (NR4A3), transcript variant 4, mRNA.	1	3	1

## 20 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-US5-2.

ID	Miranda(-20)	RNAhybrid (-22)	Pita (-5)
<i>Target di miR-US5-2 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
RL10	1	5	2
RL10complement	1	5	2

UL26complement	1	5	2
UL27complement	1	3	1
UL89complement	1	3	2
UL9	1	7	2
UL92	1	3	2
US16complement	1	5	1
US7complement	3	6	3
<i>Target di miR-US5-2 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL117complement	2	2	0
UL130complement	1	6	0
UL20	1	3	1
UL35	1	7	2
UL52	1	3	0
UL56complement	1	7	2
US13complement	1	6	1
US14complement	1	3	0
US19complement	2	5	2
<i>Target di miR-US5-2 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
RL5A	1	4	3
RL5Acomplement	1	4	3
RL6	1	5	2
RL6complement	1	5	2
TRS1complement	1	4	2
UL103complement	1	2	1
UL104complement	2	3	1
UL128complement	1	4	2
UL32complement	1	4	1
UL40complement	1	3	1
UL41Acomplement	1	4	1
UL74complement	1	3	1
UL8	1	7	4
UL93	1	1	2
<i>Target di miR-US5-2 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			

IRS1	0	4	2
UL123complement	0	8	4

## 21 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-US25-1.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-33)	RNAhybrid (-35)	Pita (-21)
<i>Target di miR-US25-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
<i>Target di miR-US25-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_000071	Homo sapiens cystathionine-beta-synthase (CBS), mRNA.	2	1	1
NM_002688	Homo sapiens septin 5 (SEPT5), mRNA.	7	1	1
NM_003959	Homo sapiens huntingtin interacting protein 1 related (HIP1R), mRNA.	4	2	1
NM_198491	Homo sapiens family with sequence similarity 92, member B (FAM92B), mRNA.	1	1	0
<i>Target di miR-US25-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
<i>Target di miR-US25-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				

## 22 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-US25-1.

ID	Miranda (-28)	RNAhybrid (-30)	Pita (-12)
<i>Target di miR-US25-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
UL87	3	4	3
UL96	7	3	1
US1complement	7	4	4
<i>Target di miR-US25-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
<i>Target di miR-US25-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
<i>Target di miR-US25-1 con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			
US23complement	1	2	2

## 23 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-US25-1\*.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-31)	RNAhybrid (-32)	Pita (-18)
<i>Target di miR-US25-1* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
<i>Target di miR-US25-1* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_001135610	Homo sapiens PR domain containing 2, with ZNF domain (PRDM2), transcript variant 4, mRNA.	8	1	2
NM_013401	Homo sapiens RAB3A interacting protein (rabin3)-like 1 (RAB3IL1), mRNA.	5	1	1
NM_016276	Homo sapiens serum/glucocorticoid regulated kinase 2 (SGK2), transcript variant 2, mRNA.	1	1	0
NM_170693	Homo sapiens serum/glucocorticoid regulated kinase 2 (SGK2), transcript variant 1, mRNA.	1	1	0
<i>Target di miR-US25-1* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				

*Target dimiR-US25-1\* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita*

## 24 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-US25-1\*.

ID	Miranda (-26)	RNAhybrid (-27)	Pita (-10)
<i>Target dimiR-US25-1* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
UL26complement	2	1	4
UL27complement	4	1	2
<i>Target dimiR-US25-1* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL44complement	9	2	1
UL83complement	9	2	1
UL97	5	4	4
US8complement	1	1	1
<i>Target dimiR-US25-1* con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
UL13	10	0	6

## 25 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-US25-2-3p.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-33)	RNAhybrid (-34)	Pita (-20)
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita:</i>				
NM_001135672	Homo sapiens solute carrier family 25, member 44 (SLC25A44), transcript variant 2, mRNA.	8	4	6
NM_002613	Homo sapiens 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDPK1), transcript variant 1, mRNA.	13	3	5
NM_014655	Homo sapiens solute carrier family 25, member 44 (SLC25A44), transcript variant 1, mRNA.	8	4	6
NM_015395	Homo sapiens tectonin beta-propeller repeat containing 1 (TECPR1), mRNA.	7	3	1
NM_020751	Homo sapiens component of oligomeric golgi complex 6 (COG6), transcript variant 1, mRNA.	1	2	1
NM_031268	Homo sapiens 3-phosphoinositide dependent protein kinase-1 (PDPK1), transcript variant 2, mRNA.	13	3	5
NM_033102	Homo sapiens solute carrier family 45, member 3 (SLC45A3), mRNA.	5	4	2
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_001008693	Homo sapiens cystatin 9 (testatin) (CST9), mRNA.	3	4	2
NM_001077238	Homo sapiens signal peptide peptidase-like 2B (SPPL2B), transcript variant 3, mRNA.	6	3	1
NM_001085454	Homo sapiens G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 1 (GIT1), transcript variant 1, mRNA.	5	4	1
NM_001136041	Homo sapiens histone deacetylase 11 (HDAC11), transcript variant 2, mRNA.	7	9	2
NM_001144900	Homo sapiens Smith-Magenis syndrome chromosome region, candidate 7 (SMCR7), transcript variant 3, mRNA.	12	2	2
NM_001347	Homo sapiens diacylglycerol kinase, theta 110kDa (DGKQ), mRNA.	10	4	4
NM_001466	Homo sapiens frizzled homolog 2 (Drosophila) (FZD2), mRNA.	1	1	0
NM_002819	Homo sapiens polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1), transcript variant 1, mRNA.	7	4	1
NM_003025	Homo sapiens SH3-domain GRB2-like 1 (SH3GL1), mRNA.	8	1	0
NM_003496	Homo sapiens transformation/transcription domain-associated protein (TRRAP), mRNA.	2	1	2



NM_0048 22	Homo sapiens netrin 1 (NTN1), mRNA.	12	4	3
NM_0051 70	Homo sapiens achaete-scute complex homolog 2 (Drosophila) (ASCL2), mRNA.	5	4	1
NM_0060 37	Homo sapiens histone deacetylase 4 (HDAC4), mRNA.	9	3	1
NM_0063 32	Homo sapiens interferon, gamma-inducible protein 30 (IFI30), mRNA.	1	1	1
NM_0066 51	Homo sapiens complexin 1 (CPLX1), mRNA.	12	2	0
NM_0123 84	Homo sapiens glucocorticoid modulatory element binding protein 2 (GMEB2), mRNA.	11	2	3
NM_0140 30	Homo sapiens G protein-coupled receptor kinase interacting ArfGAP 1 (GIT1), transcript variant 2, mRNA.	5	4	1
NM_0147 47	Homo sapiens regulating synaptic membrane exocytosis 3 (RIMS3), mRNA.	8	4	2
NM_0148 69	Homo sapiens IQ motif and Sec7 domain 1 (IQSEC1), transcript variant 2, mRNA.	6	1	3
NM_0151 44	Homo sapiens zinc finger, CCHC domain containing 14 (ZCCHC14), mRNA.	4	2	2
NM_0151 54	Homo sapiens mesoderm development candidate 2 (MESDC2), mRNA.	2	1	1
NM_0163 52	Homo sapiens carboxypeptidase A4 (CPA4), mRNA.	3	1	0
NM_0201 84	Homo sapiens cyclin M4 (CNNM4), mRNA.	6	4	2
NM_0220 06	Homo sapiens FXFD domain containing ion transport regulator 7 (FXFD7), mRNA.	3	2	0
NM_0240 15	Homo sapiens homeobox B4 (HOXB4), mRNA.	7	4	1
NM_0248 27	Homo sapiens histone deacetylase 11 (HDAC11), transcript variant 1, mRNA.	7	9	2
NM_0319 90	Homo sapiens polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1), transcript variant 2, mRNA.	7	4	1
NM_0319 91	Homo sapiens polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1), transcript variant 3, mRNA.	7	4	1
NM_0321 08	Homo sapiens sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6B (SEMA6B), mRNA.	13	7	1
NM_0327 53	Homo sapiens retina and anterior neural fold homeobox 2 (RAX2), mRNA.	11	4	3
NM_0328 75	Homo sapiens F-box and leucine-rich repeat protein 20 (FBXL20), mRNA.	1	1	2
NM_0331 31	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 3A (WNT3A), mRNA.	23	9	0
NM_0581 69	Homo sapiens loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 1 (LOH12CR1), mRNA.	4	3	5
NM_0805 52	Homo sapiens solute carrier family 32 (GABA vesicular transporter), member 1 (SLC32A1), mRNA.	6	2	1
NM_1383 49	Homo sapiens tumor protein p53 inducible protein 13 (TP53I13), mRNA.	4	1	2
NM_1383 60	Homo sapiens leucine rich repeat containing 16B (LRRC16B), mRNA.	3	1	0
NM_1446 96	Homo sapiens chromosome 1 open reading frame 125 (C1orf125), transcript variant 1, mRNA.	1	1	0
NM_1523 62	Homo sapiens tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8-like 1 (TNFAIP8L1), mRNA.	4	3	2
NM_1529 88	Homo sapiens signal peptide peptidase-like 2B (SPPL2B), transcript variant 2, mRNA.	9	5	1
NM_1730 50	Homo sapiens signal peptide, CUB domain, EGF-like 1 (SCUBE1), mRNA.	5	2	1
NM_1758 47	Homo sapiens polypyrimidine tract binding protein 1 (PTBP1), transcript variant 4, mRNA.	7	4	1
NM_1759 22	Homo sapiens proline rich 18 (PRR18), mRNA.	7	1	1
NM_1766 77	Homo sapiens hypothetical protein FLJ36208 (FLJ36208), mRNA.	7	4	1
NM_1943 26	Homo sapiens ribosomal protein S19 binding protein 1 (RPS19BP1), mRNA.	4	4	1
NM_1982 07	Homo sapiens LAG1 homolog, ceramide synthase 1 (LASS1), transcript variant 2, mRNA.	12	3	0
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da RNAhybrid e Pita:</i>				
NM_0149 57	Homo sapiens DENN/MADD domain containing 3 (DENND3), mRNA.	5	3	3
NM_1833 76	Homo sapiens arrestin domain containing 4 (ARRDC4), mRNA.	1	3	2
NM_1984 06	Homo sapiens progesterone and adiponectin receptor family member VI (PAQR6), transcript variant 2, mRNA.	3	4	1

## 26 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-US25-2-3p.

ID	Miranda(-28)	RNAhybrid (-29)	Pita(-12)
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita:</i>			
UL21Acomplement	6	1	2
UL32complement	9	1	3
UL80	11	3	4
UL80_5	11	3	4
UL92	7	1	2
US28	8	4	2
US3complement	9	3	4
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL26complement	8	2	0
UL48	9	2	3
UL96	7	3	1
US1complement	11	4	2
US26complement	11	1	1
US30	9	2	1
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
UL105	6	3	1
UL25	6	1	1
UL46complement	8	1	2
UL91	5	1	2
UL99	8	1	3
US21complement	4	0	1
<i>Target di miR-US25-2-3p con almeno un sito di legame sopra al valore soglia predetto da RNAhybrid e Pita:</i>			
UL74complement	2	1	2

## 27 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-US25-2-5p.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-29)	RNAhybrid (-31)	Pita (-17)
<i>Target di miR-US25-2-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
NM_001044264	Homo sapiens microseminoprotein, prostate associated (MSMP), mRNA.	1	1	1

NM_001 078171	Homo sapiens family with sequence similarity 127, member A (FAM127A), mRNA.	8	5	6
NM_001 078173	Homo sapiens family with sequence similarity 127, member C (FAM127C), mRNA.	6	6	5
NM_001 100626	Homo sapiens ER lipid raft associated 1 (ERLIN1), mRNA.	5	3	1
NM_001 142272	Homo sapiens RAB11 family interacting protein 3 (class II) (RAB11FIP3), transcript variant 2, mRNA.	5	5	4
NM_001 795	Homo sapiens cadherin 5, type 2 (vascular endothelium) (CDH5), mRNA.	2	3	2
NM_003 332	Homo sapiens TYRO protein tyrosine kinase binding protein (TYROBP), transcript variant 1, mRNA.	1	1	2
NM_005 600	Homo sapiens nitrilase 1 (NIT1), mRNA.	1	2	1
NM_005 677	Homo sapiens collagen-like tail subunit (single strand of homotrimer) of asymmetric acetylcholinesterase (COLQ), transcript variant I, mRNA.	3	6	3
NM_005 892	Homo sapiens formin-like 1 (FMNL1), mRNA.	4	3	1
NM_006 459	Homo sapiens ER lipid raft associated 1 (ERLIN1), mRNA.	5	3	1
NM_006 999	Homo sapiens polymerase (DNA directed) sigma (POLS), mRNA.	5	8	2
NM_012 096	Homo sapiens adaptor protein, phosphotyrosine interaction, PH domain and leucine zipper containing 1 (APPL1), mRNA.	1	3	2
NM_014 700	Homo sapiens RAB11 family interacting protein 3 (class II) (RAB11FIP3), transcript variant 1, mRNA.	5	5	4
NM_016 022	Homo sapiens anterior pharynx defective 1 homolog A (C. elegans) (APH1A), transcript variant 2, mRNA.	5	3	4
NM_080 538	Homo sapiens collagen-like tail subunit (single strand of homotrimer) of asymmetric acetylcholinesterase (COLQ), transcript variant II, mRNA.	3	6	3
NM_198 125	Homo sapiens TYRO protein tyrosine kinase binding protein (TYROBP), transcript variant 2, mRNA.	1	1	2
NM_198 682	Homo sapiens glycophorin E (GYPE), transcript variant 2, mRNA.	4	3	1
<i>Target di miR-US25-2-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_0 00738	Homo sapiens cholinergic receptor, muscarinic 1 (CHRM1), mRNA.	9	5	4
NM_0 00906	Homo sapiens natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atrionatriuretic peptide receptor A) (NPR1), mRNA.	2	1	2
NM_0 01031	Homo sapiens inverted formin, FH2 and WH2 domain containing (INF2), transcript variant 2, mRNA.	4	2	3
NM_0 01033				
667	Homo sapiens lymphocyte antigen 9 (LY9), transcript variant 2, mRNA.	7	5	2
NM_001 039468	Homo sapiens MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2), transcript variant 3, mRNA.	2	5	2
NM_001 039469	Homo sapiens MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2), transcript variant 4, mRNA.	2	6	2
NM_001 039772	Homo sapiens hypothetical protein LOC643923 (LOC643923), mRNA.	1	3	0
NM_001 039905	Homo sapiens chromosome 15 open reading frame 56 (C15orf56), mRNA.	3	9	1
NM_001 098482	Homo sapiens CREB regulated transcription coactivator 1 (CRTC1), transcript variant 3, mRNA.	11	7	7
NM_001 098509	Homo sapiens small G protein signaling modulator 2 (SGSM2), transcript variant 2, mRNA.	6	4	5
NM_001 101654	Homo sapiens CXXC finger 1 (PHD domain) (CXXC1), transcript variant 1, mRNA.	3	3	1
NM_001 122772	Homo sapiens ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2 (AGAP2), transcript variant 1, mRNA.	5	7	1
NM_001 122779	Homo sapiens family with sequence similarity 124B (FAM124B), transcript variant 1, mRNA.	2	3	0
NM_001 135055	Homo sapiens transketolase (TKT), transcript variant 2, mRNA.	2	4	2
NM_001 142777	Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7 (HSD3B7), transcript variant 2, mRNA.	7	9	2
NM_001 142778	Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7 (HSD3B7), transcript variant 3, mRNA.	7	9	2
NM_001 143979	Homo sapiens nudE nuclear distribution gene E homolog 1 (A. nidulans) (NDE1), transcript variant 1, mRNA.	4	2	0
NM_001 279	Homo sapiens cell death-inducing DFFA-like effector a (CIDEA), transcript variant 1, mRNA.	1	2	1
NM_001 670	Homo sapiens armadillo repeat gene deletes in velocardiiofacial syndrome (ARVCF), mRNA.	4	5	2

NM_001 687	Homo sapiens ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, delta subunit (ATP5D), nuclear gene encoding mitochondrial protein, transcript variant 1, mRNA.	5	2	0
NM_001 897	Homo sapiens chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4), mRNA.	5	4	3
NM_002 103	Homo sapiens glycogen synthase 1 (muscle) (GYS1), mRNA.	3	3	3
NM_002 237	Homo sapiens potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1 (KCNG1), mRNA.	4	1	1
NM_002 513	Homo sapiens non-metastatic cells 3, protein expressed in (NME3), mRNA.	3	1	1
NM_002 596	Homo sapiens PCTAIRE protein kinase 3 (PCTK3), transcript variant 3, mRNA.	4	3	2
NM_002 611	Homo sapiens pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2 (PDK2), mRNA.	6	4	0
NM_003 724	Homo sapiens jerky homolog (mouse) (JRK), transcript variant 1, mRNA.	7	4	2
NM_004 210	Homo sapiens neuralized homolog (Drosophila) (NEURL), mRNA.	5	6	4
NM_004 914	Homo sapiens RAB36, member RAS oncogene family (RAB36), mRNA.	7	3	3
NM_004 954	Homo sapiens MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2), transcript variant 2, mRNA.	2	5	2
NM_006 181	Homo sapiens netrin 3 (NTN3), mRNA.	1	1	0
NM_006 464	Homo sapiens trans-golgi network protein 2 (TGOLN2), mRNA.	1	4	0
NM_012 309	Homo sapiens SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2 (SHANK2), transcript variant 1, mRNA.	3	2	4
NM_012 398	Homo sapiens phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type I, gamma (PIP5K1C), mRNA.	7	4	3
NM_014 593	Homo sapiens CXXC finger 1 (PHD domain) (CXXC1), transcript variant 2, mRNA.	3	3	1
NM_014 630	Homo sapiens zinc finger protein 592 (ZNF592), mRNA.	3	4	3
NM_014 643	Homo sapiens zinc finger protein 516 (ZNF516), mRNA.	4	3	2
NM_014 770	Homo sapiens ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 2 (AGAP2), transcript variant 2, mRNA.	5	7	1
NM_014 853	Homo sapiens small G protein signaling modulator 2 (SGSM2), transcript variant 1, mRNA.	6	4	5
NM_014 940	Homo sapiens MON1 homolog B (yeast) (MON1B), mRNA.	3	6	1
NM_015 321	Homo sapiens CREB regulated transcription coactivator 1 (CRTCL1), transcript variant 1, mRNA.	11	7	7
NM_017 490	Homo sapiens MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2), transcript variant 1, mRNA.	2	5	2
NM_017 668	Homo sapiens nude nuclear distribution gene E homolog 1 (A. nidulans) (NDE1), transcript variant 2, mRNA.	4	2	0
NM_020 338	Homo sapiens zinc finger, MIZ-type containing 1 (ZMIZ1), mRNA.	3	6	1
NM_020 829	Homo sapiens KIAA1432 (KIAA1432), transcript variant 1, mRNA.	1	2	0
NM_021 149	Homo sapiens coactosin-like 1 (Dictyostelium) (COTL1), mRNA.	7	4	3
NM_022 489	Homo sapiens inverted formin, FH2 and WH2 domain containing (INF2), transcript variant 1, mRNA.	4	2	4
NM_023 944	Homo sapiens cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 12 (CYP4F12), mRNA.	1	1	1
NM_024 527	Homo sapiens abhydrolase domain containing 8 (ABHD8), mRNA.	3	3	2
NM_025 081	Homo sapiens KIAA1305 (KIAA1305), mRNA.	3	5	3
NM_025 193	Homo sapiens hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 7 (HSD3B7), transcript variant 1, mRNA.	6	4	3
NM_032 298	Homo sapiens synaptotagmin III (SYT3), mRNA.	1	1	0
NM_058 167	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast) (UBE2J2), transcript variant 2, mRNA.	5	6	4
NM_138 783	Homo sapiens zinc finger protein 653 (ZNF653), mRNA.	4	4	1
NM_145 654	Homo sapiens RAD52 motif 1 (RDM1), transcript variant 1, mRNA.	2	4	2
NM_153 018	Homo sapiens zinc finger protein 3 homolog (mouse) (ZFP3), mRNA.	2	4	3
NM_153 215	Homo sapiens chromosome 3 open reading frame 45 (C3orf45), mRNA.	4	4	3
NM_153 264	Homo sapiens collagen, type XXIX, alpha 1 (COL29A1), mRNA.	3	3	0
NM_194 315	Homo sapiens ubiquitin-conjugating enzyme E2, J2 (UBC6 homolog, yeast)	5	6	4

	(UBE2J2), transcript variant 1, mRNA.			
NM_198074	Homo sapiens olfactory receptor, family 2, subfamily C, member 3 (OR2C3), mRNA.	6	7	4
NM_198289	Homo sapiens cell death-inducing DFFA-like effector a (CIDEA), transcript variant 2, mRNA.	1	2	1
NM_207360	Homo sapiens zinc finger CCCH-type containing 12D (ZC3H12D), mRNA.	8	7	6
NM_212503	Homo sapiens PCTAIRE protein kinase 3 (PCTK3), transcript variant 1, mRNA.	4	3	2
<i>Target di miR-US25-2-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
NM_001039697	Homo sapiens small nuclear RNA activating complex, polypeptide 3, 50kDa (SNAPC3), mRNA.	3	2	1
NM_001040446	Homo sapiens myotubularin related protein 12 (MTMR12), mRNA.	3	4	3
NM_006569	Homo sapiens cell growth regulator with EF-hand domain 1 (CGREF1), mRNA.	4	2	3
NM_031309	Homo sapiens scratch homolog 1, zinc finger protein (Drosophila) (SCRT1), mRNA.	8	4	3
NM_177403	Homo sapiens RAB7B, member RAS oncogene family (RAB7B), mRNA.	4	0	3
<i>Target di miR-US25-2-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				
NM_000695	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2 (ALDH3B2), transcript variant 1, mRNA.	8	7	3
NM_001003940	Homo sapiens Bcl2 modifying factor (BMF), transcript variant 1, mRNA.	3	4	2
NM_001031615	Homo sapiens aldehyde dehydrogenase 3 family, member B2 (ALDH3B2), transcript variant 2, mRNA.	8	7	3
NM_001037160	Homo sapiens cystin 1 (CYS1), mRNA.	4	4	3
NM_001078172	Homo sapiens family with sequence similarity 127, member B (FAM127B), transcript variant 1, mRNA.	6	4	3
NM_001080543	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 29 (C19orf29), transcript variant 1, mRNA.	7	4	4
NM_001130029	Homo sapiens RELT-like 2 (RELL2), transcript variant 2, mRNA.	4	1	2
NM_002131	Homo sapiens high mobility group AT-hook 1 (HMGA1), transcript variant 2, mRNA.	2	2	1
NM_003102	Homo sapiens superoxide dismutase 3, extracellular (SOD3), mRNA.	5	3	4
NM_003392	Homo sapiens wingless-type MMTV integration site family, member 5A (WNT5A), mRNA.	2	3	1
NM_005269	Homo sapiens GLI family zinc finger 1 (GLI1), mRNA.	1	1	1
NM_012285	Homo sapiens potassium voltage-gated channel, subfamily H (eag-related), member 4 (KCNH4), mRNA.	3	4	1
NM_012317	Homo sapiens leucine zipper, down-regulated in cancer 1 (LDOC1), mRNA.	6	2	5
NM_018028	Homo sapiens sterile alpha motif domain containing 4B (SAMD4B), mRNA.	2	3	4
NM_032951	Homo sapiens MLX interacting protein-like (MLXIPL), transcript variant 1, mRNA.	5	3	2
NM_033503	Homo sapiens Bcl2 modifying factor (BMF), transcript variant 2, mRNA.	3	4	2
NM_145899	Homo sapiens high mobility group AT-hook 1 (HMGA1), transcript variant 1, mRNA.	2	2	1
NM_173828	Homo sapiens RELT-like 2 (RELL2), transcript variant 1, mRNA.	4	1	2
NM_198526	Homo sapiens zinc finger protein 710 (ZNF710), mRNA.	8	7	4

## 28 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-US25-2-5p.

ID	Miranda (-24)	RNAhybrid (-26)	Pita (-9)
<i>Target di miR-US25-2-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
IRS1	9	4	7
RL	4	2	2
RL10complement	4	2	2

UL100complement	6	7	3
UL102	3	3	3
UL11	12	8	7
UL112	5	3	6
UL117complement	3	4	2
UL128complement	1	1	1
UL13	6	12	5
UL15A	6	7	1
UL24complement	8	9	5
UL29complement	5	8	3
UL4	9	7	2
UL48	7	7	4
UL55complement	5	9	3
UL57complement	8	7	7
UL70complement	7	4	3
UL72complement	7	7	3
UL76	10	10	1
UL86complement	7	13	6
UL89complement	4	5	5
UL91	6	6	3
UL95	14	9	6
US10complement	7	7	3
US13complement	6	6	5
US14complement	8	7	2
US23complement	7	5	5
US24complement	7	5	1
US27	6	6	2
US31	5	4	3
US6complement	3	4	3
<i>Target di miR-US25-2-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
RL13complement	5	4	3
UL1	4	4	0

UL111A	2	4	0
UL115complement	11	5	3
UL23complement	3	7	1
UL30complement	8	6	2
UL47	8	6	5
UL50complement	5	8	3
UL82complement	6	4	4
UL83complement	7	10	4
UL87	5	4	3
UL92	5	7	3
UL94	2	3	2
UL96	12	7	6
US15complement	9	5	2
US16complement	4	9	1
US17complement	5	9	0
US19complement	4	4	1
US20complement	6	10	1
US21complement	5	6	2
US26complement	6	5	4
US28	4	7	3
US30	5	8	4
US9complement	4	7	1
<i>Target di miR-US25-2-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
UL123complement	5	3	3
UL124	3	2	2
UL14	5	6	1
UL43complement	5	4	2
UL85complement	6	5	4
US18complement	5	7	2
US32	3	1	1
<i>Target di miR-US25-2-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			
UL119complement	7	11	4

UL120complement	6	5	2
UL25	4	6	5
UL27complement	6	5	3
UL74complement	3	5	1

## 29 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-US33-3p.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-31)	RNAhybrid (-33)	Pita (-19)
<i>Target di miR-US33-3p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
<i>Target di miR-US33-3p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				
NM_001130726	Homo sapiens coiled-coil domain containing 149 (CCDC149), transcript variant 2, mRNA.		1	5 1
NM_032207	Homo sapiens chromosome 19 open reading frame 44 (C19orf44), mRNA.		5	9 6
<i>Target di miR-US33-3p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
<i>Target di miR-US33-3p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				

## 30 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-US33-3p.

ID	Miranda(-26)	RNAhybrid (-28)	Pita(-10)
<i>Target di miR-US33-3p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
US1complement	2	3	7
US28	1	3	5
US2complement	4	2	7
<i>Target di miR-US33-3p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL116complement	2	3	3
UL119complement	3	6	2
<i>Target di miR-US33-3p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
UL100complement	3	3	3
<i>Target di miR-US33-3p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			

## 31 Descrizione dei target cellulari predetti per hcmv-miR-US33-5p.

ID	DESCRIZIONE DEL TARGET	Miranda (-35)	RNAhybrid (-36)	Pita (-23)
<i>Target di miR-US33-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>				
NM_213566	Homo sapiens DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide (DFFA), transcript variant 2, mRNA.		5	8 2
<i>Target di miR-US33-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>				



NM_0010 37334	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase) (USP14), transcript variant 2, mRNA.	1	8	2
NM_0051 51	Homo sapiens ubiquitin specific peptidase 14 (tRNA-guanine transglycosylase) (USP14), transcript variant 1, mRNA.	1	8	2
NM_0149 01	Homo sapiens ring finger protein 44 (RNF44), mRNA.	12	2	0
NM_0180 67	Homo sapiens MAP7 domain containing 1 (MAP7D1), mRNA.	5	3	1
NM_0227 50	Homo sapiens poly (ADP-ribose) polymerase family, member 12 (PARP12), mRNA.	4	7	4
NM_0247 57	Homo sapiens euchromatic histone-lysine N-methyltransferase 1 (EHMT1), transcript variant 1, mRNA.	8	5	2
NM_0327 92	Homo sapiens zinc finger and BTB domain containing 45 (ZBTB45), mRNA.	6	2	1
NM_0528 38	Homo sapiens septin 1 (SEPT1), mRNA.	4	1	1
NM_1525 31	Homo sapiens chromosome 3 open reading frame 21 (C3orf21), mRNA.	5	4	1
NM_1758 84	Homo sapiens hypothetical protein FLJ36031 (FLJ36031), mRNA.	6	5	2
<i>Target di miR-US33-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>				
<i>Target di miR-US33-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>				
NM_0201 70	Homo sapiens nicalin homolog (zebrafish) (NCLN), mRNA.	13	5	1

## 32 Descrizione dei target virali predetti per hcmv-miR-US33-5p.

ID	Miranda (-30)	RNAhybrid(-31)	Pita (-14)
<i>Target di miR-US33-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid e Pita</i>			
UL1	6	13	1
US18complement	11	6	3
US28	12	12	2
<i>Target di miR-US33-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, RNAhybrid</i>			
UL102	12	8	1
UL103complement	10	8	0
UL25	16	6	2
UL78	13	7	1
US10complement	16	12	2
<i>Target di miR-US33-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da Miranda, Pita</i>			
UL74complement	4	10	4
<i>Target di miR-US33-5p con almeno 1 sito di legame sotto il valore soglia predetto da RNAhybrid, Pita</i>			
UL124	5	3	1