

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN

BIOTECNOLOGIE CELLULARI E MOLECOLARI - PROGETTO N°1:
BIOTECNOLOGIE, FARMACOLOGIA E TOSSICOLOGIA

Ciclo XXV

Settore Concorsuale di afferenza: 06/A3

Settore Scientifico disciplinare: MED/07

**Meccanismi replicativi e di regolazione
dell'espressione genica di Parvovirus B19**

Presentata da: Francesca Di Furio

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Santi Mario Spampinato

Prof. Giorgio Gallinella

Esame finale anno 2013

Indice

| | |
|---|----|
| PARVOVIRUS B19 | 7 |
| INTRODUZIONE | 8 |
| TASSONOMIA | 9 |
| VARIABILITÀ GENETICA..... | 11 |
| Varianti genotipiche..... | 12 |
| STRUTTURA DEL VIRUS..... | 15 |
| Organizzazione del genoma virale..... | 15 |
| Virione..... | 17 |
| CICLO VITALE..... | 19 |
| Fasi iniziali..... | 19 |
| Tropismo..... | 22 |
| Restrizione e permissività cellulare..... | 25 |
| Replicazione del genoma virale..... | 26 |
| Espressione del genoma virale..... | 28 |
| <i>Mappa di trascrizione</i> | 28 |
| <i>Regolazione dell'espressione genica</i> | 30 |
| Profilo di espressione..... | 32 |
| Proteine virali | 33 |
| <i>Proteine non strutturali</i> | 33 |
| <i>Proteine capsidiche</i> | 35 |
| Fasi finali..... | 36 |
| Sistemi cellulari non permissivi..... | 36 |
| Persistenza virali | 38 |
| La deregolazione del ciclo cellulare e la risposta al danno | 39 |
| Apoptosi e autofagia..... | 40 |
| EPIDEMIOLOGIA | 41 |
| Prevalenza..... | 41 |
| Trasmissione | 42 |
| PATOGENESI E MANIFESTAZIONI CLINICHE..... | 43 |
| Infezione sperimentale | 43 |
| Infezione asintomatica..... | 45 |

| | |
|--|----|
| Eritema infettivo | 45 |
| Sindrome poliartropatica | 45 |
| B19 e artrite reumatoide | 46 |
| Crisi aplastica | 46 |
| Neutropenia, Trombocitopenia e Pancitopenia..... | 47 |
| Disordine midollare cronico | 48 |
| <i>Sindromi immunodeficitarie congenite</i> | 48 |
| <i>Disordini linfoproliferativi</i> | 49 |
| <i>Sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS)</i> | 49 |
| <i>Pazienti trapiantati</i> | 50 |
| <i>Altri pazienti immunocompromessi</i> | 50 |
| Idrope fetale | 51 |
| Disordini neurologici | 52 |
| Cardiomiopatie e Miocarditi | 52 |
| Epatiti | 52 |
| Infezioni persistenti | 53 |
| TRATTAMENTO E PREVENZIONE | 54 |
| Sangue ed emoderivati | 54 |
| Trattamento | 55 |
| Farmaci antivirali e sviluppo di vaccini..... | 55 |
| MODELLI ANIMALI..... | 56 |
| RISPOSTA IMMUNITARIA | 57 |
| L'immunità innata..... | 57 |
| Immunità adattativa: Anticorpi..... | 57 |
| Immunità adattativa: Cellule..... | 59 |
| PRINCIPI DIAGNOSTICI | 61 |
| Diagnosi virologica | 61 |
| <i>Ricerca del DNA virale</i> | 61 |
| <i>Ibridazione in situ</i> | 61 |
| <i>Reazione polimerasica a catena (PCR)</i> | 62 |
| <i>Ricerca di antigeni virali</i> | 64 |
| Diagnosi sierologica | 64 |
| <i>Saggio immunoenzimatico (EIA)</i> | 65 |
| <i>Saggio di immunofluorescenza</i> | 65 |

| | |
|--|-----|
| <i>Saggio di Western Blot</i> | 66 |
| LA CROMATINA..... | 66 |
| MECCANISMI DI REGOLAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA..... | 69 |
| Epigenetica..... | 69 |
| La metilazione del DNA..... | 71 |
| Modificazione delle proteine istoniche..... | 73 |
| I microRNA..... | 74 |
| <i>Biogenesi e ruolo biologico dei microRNA</i> | 75 |
| <i>Identificazione di microRNA</i> | 77 |
| <i>Metodi di predizione di target</i> | 80 |
| Epigenetica e virus..... | 82 |
| LAVORO SPERIMENTALE | 90 |
| PREMESSA E SCOPO DEL LAVORO..... | 91 |
| MATERIALI E METODI I: ANALISI FUNZIONALE DI CLONI GENOMICI DI B19..... | 97 |
| Cloni genomici e subgenomici di Parvovirus B19..... | 97 |
| <i>Cloni genomici full-length</i> | 97 |
| <i>Cloni subgenomici</i> | 98 |
| <i>Cloni pCH</i> | 98 |
| <i>Cloni pCI0</i> | 99 |
| <i>Cloni pCJ0</i> | 99 |
| Preparazione del DNA plasmidico..... | 99 |
| Preparazione degli inserti per la nucleofezione..... | 100 |
| Cellule UT7EpoS1..... | 101 |
| Nucleofezione..... | 101 |
| Preparazione del lisato..... | 101 |
| Infezione..... | 102 |
| Estrazione degli acidi nucleici..... | 102 |
| Trattamento con DNasi | 102 |
| RealTime PCR..... | 103 |
| RT PCR RealTime..... | 104 |
| Quantificazione assoluta..... | 105 |
| Analisi della curva di melting..... | 105 |
| MATERIALI E METODI II: STUDIO DELLA METILAZIONE DEL GENOMA DI B19..... | 106 |
| Analisi bioinformatica | 106 |

| | |
|---|------------|
| Plasmidi..... | 106 |
| Metilazione in vitro e trattamento con bisolfito..... | 107 |
| RealTime metilazione specifica..... | 108 |
| Trasfezione e infezione..... | 109 |
| Cellule | 109 |
| Nucleofezione..... | 109 |
| Infezione..... | 110 |
| Estrazione degli acidi nucleici..... | 110 |
| RealTime PCR..... | 111 |
| Campioni biotici..... | 111 |
| MATERIALI E METODI III: STUDIO DELL'ASSOCIAZIONE DEL GENOMA DI B19 AGLI ISTONI | |
| CELLULARI..... | 113 |
| Cellule | 113 |
| Infezione..... | 113 |
| Chromatin Immunoprecipitation (ChiP)..... | 113 |
| RealTime PCR..... | 114 |
| Quantificazione assoluta..... | 114 |
| MATERIALI E METODI IV: STUDIO DEI MICRORNA NEL CORSO DELL'INFEZIONE..... | |
| 116 | |
| Cellule e Infezione | 116 |
| Estrazione dei microRNA..... | 116 |
| Amplificazione dei microRNA..... | 116 |
| Marcatura dei microRNA | 118 |
| Preparazione dei target: Generazione di un array B19-specifico..... | 119 |
| Ibridazione su array B19-specifico..... | 120 |
| Ibridazione su beads magnetiche..... | 122 |
| PCR end-point (Libreria a cDNA)..... | 122 |
| RISULTATI I: ANALISI FUNZIONALE DI CLONI GENOMICI DI B19..... | |
| 124 | |
| Preparazione degli inserti per la nucleofezione..... | 124 |
| RealTime PCR..... | 125 |
| Analisi della curva di melting..... | 125 |
| Quantificazione assoluta del DNA..... | 126 |
| RT PCR RealTime..... | 126 |
| Quantificazione assoluta degli RNA..... | 127 |
| Cloni full-length pCG01 e pCG10..... | 129 |

| | |
|--|-----|
| Cloni pCH..... | 130 |
| Cloni pCI0 e pCJ0..... | 131 |
| RISULTATI II: STUDIO DELLA METILAZIONE DEL GENOMA DI B19..... | 133 |
| Distribuzione di dinucleotidi CpG sul genoma di Parvovirus B19..... | 133 |
| RealTime metilazione specifica..... | 134 |
| Metilazione ed espressione genica del Parvovirus B19..... | 136 |
| Metilazione del genoma di B19 nel corso di infezione prolungata..... | 138 |
| Metilazione in campioni bioptici..... | 139 |
| RISULTATI III: STUDIO DELL'ASSOCIAZIONE DEL GENOMA DI B19 AGLI ISTONI | |
| CELLULARI..... | 142 |
| ChiP e RealTime PCR..... | 142 |
| RISULTATI IV: STUDIO DEI MICRORNA NEL CORSO DELL'INFEZIONE..... | 145 |
| Preparazione dei target: Generazione di un array B19-specifico..... | 145 |
| Ibridazione su array B19-specifico..... | 146 |
| Ibridazione su beads magnetiche e generazione di una libreria di cDNA..... | 147 |
| DISCUSSIONE | 150 |
| BIBLIOGRAFIA | 159 |

Parvovirus B19

Introduzione

La scoperta del parvovirus B19 avvenne in modo casuale nel 1974 in Inghilterra quando Yvonne Cossart e i suoi collaboratori stavano valutando in sieri di pazienti la presenza dell'antigene di superficie del virus dell'epatite B. Un nuovo virus venne riportato in 11 campioni, nove dei quali erano di donatori sani, uno appartenente a un paziente che aveva appena ricevuto un trapianto renale e infine un campione di un paziente con epatite acuta [Cossart et al., 1975]. Alcuni sieri (fra cui il campione 19 del pannello B codificato come B19) diedero risultati anomali, positivi alla contro-immunoelettroforesi, ma negativi ai più sensibili saggio di emagglutinazione passiva e a quello radioimmunologico. L'osservazione in microscopia elettronica mise in evidenza la presenza di particelle di dimensioni pari a 23 nm, simili ai parvovirus. In assenza di reattività antigenica crociata con i parvovirus Adeno-Associati o con i parvovirus animali questi virus furono inizialmente definiti "Serum parvovirus-like Virus" (SPLV). Fu ufficialmente nel 1985 a seguito dell'analisi delle sue caratteristiche molecolari e genetiche che questo virus venne riconosciuto come membro della famiglia Parvoviridae con il nome di Parvovirus B19 da parte del Comitato Internazionale sulla Tassonomia dei Virus (ICTV).

I primi isolati provenivano da campioni di donatori di sangue completamente asintomatici. Nel 1980 un breve episodio febbrile fu riscontrato in due soldati e il B19 fu rilevato nei loro sieri [Shneerson et al., 1980]. La prima malattia clinicamente significativa associata all'infezione da parvovirus B19 è stata una crisi aplastica transitoria in pazienti con anemia a cellule falciformi [Pattison et al., 1981]; due anni dopo l'eritema infettivo (quinta malattia) venne sieroepidemiologicamente correlato all'infezione da B19 in bambini sani ed è ad oggi l'agente epidemiologico accettato di tale patologia [Anderson et al., 1983]. Di lì a poco il parvovirus B19 è stato riconosciuto come responsabile di in una serie di situazioni patologiche, le cui manifestazioni dipendono da un insieme di fattori quali il potenziale patogeno del virus, la sua capacità di adattamento ai diversi ambienti cellulari e lo stato immunologico e fisiologico del paziente. Alla luce del tropismo del virus per i precursori eritroidi e del suo effetto citotossico su tali cellule, l'infezione può manifestarsi con una alterazione ematologica (cronica o acuta), tuttavia il virus è in grado di infettare anche altri tipi cellulari determinando in questo modo un ampio spettro di patologie da artropatie, che interessano per lo più gli adulti, ad alterazioni fetali in caso di trasmissione transplacentare, fino ad arrivare a miocarditi e a malattie reumatiche.

Tassonomia

La classificazione della famiglia Parvoviridae si basa su criteri morfologici e funzionali [Fauquet et al., 2001]. Tutti i virus classificati nella famiglia sono particelle virali prive di involucro lipidico, costituite da un capsido a morfologia icosaedrica (20-25 nm di diametro) formato da 60 subunità e contenente un'unica molecola di DNA monocatenario di circa 5000 nucleotidi.

La famiglia è attualmente divisa in due sottofamiglie: i virus degli insetti sono classificati nella sottofamiglia *Densovirinae*, mentre i virus dei vertebrati sono riuniti nella sottofamiglia *Parvovirinae*. All'interno di quest'ultima sottofamiglia, in base a diverse caratteristiche funzionali, sono distinti cinque diversi generi: Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus, Bocavirus e Amdovirus. Un sesto genere, Partetravirus, è stato proposto. I membri del genere Parvovirus possono replicare autonomamente in cellule in attiva divisione; la maggior parte dei Dependovirus hanno bisogno di un virus helper per replicare; gli Erythrovirus hanno bisogno invece di cellule eritroidi. Solo i virus appartenenti ai generi Dependovirus, Erythrovirus e Bocavirus sono noti infettare l'uomo. Il parvovirus B19, specie appartenente al genere Erythrovirus, è il membro principale della famiglia patogeno per l'uomo

In diverse specie una suddivisione in genotipi è stata necessaria per includere un elevato numero di varianti genetiche identificate recentemente mediante nuove tecniche molecolari di screening. Un'ulteriore distinzione in sottotipi è stata proposta e seppure non riconosciuta formalmente risulta utile per gli studi epidemiologici.

In passato si pensava che il Parvovirus B19 fosse una specie a bassa variabilità genetica; i primi studi di sequenziamento infatti evidenziarono una diversità genetica tra isolati piuttosto bassa, pari all'1-2% circa dell'intero genoma [Gallinella et al., 2003]. Questo quadro si è tuttavia modificato con l'identificazione dei primi isolati che mostravano una sostanziale divergenza rispetto agli isolati caratterizzati in precedenza [Nguyen et al., 1999; Nguyen et al., 2002; Hokynar 2002; Servant et al., 2002]. Le analisi filogenetiche delle sequenze disponibili in GenBank indicano che il gruppo degli Erythrovirus umani è verosimilmente più complesso di quanto ipotizzato inizialmente e potrebbe essere diviso in tre genotipi ben caratterizzati: i virus *B19-correlati* corrispondono al genotipo 1, le forme *LaLi* e *A6* appartengono al genotipo 2 e i virus *V9-correlati* (come D91.1) costituiscono il genotipo 3. L'importanza di questi ultimi due genotipi recentemente identificati, in termini di patogenicità e di proprietà antigeniche, resta però ancora da stabilire e numerosi studi si stanno muovendo in questa direzione. Inoltre è stata proposta una suddivisione in sottotipi: all'interno del genotipo 1 la maggior parte degli isolati rientrano nel sottotipo 1a, mentre solo pochi isolati

provenienti per lo più dall'Asia sono catalogati come sottotipo 1b [Toan et al., 2006]; per il genotipo 3 sono stati identificati due sottotipi il 3a e il 3b [Parsyan et al, 2007].

| Genere | Specie | Ospite naturale |
|-------------------------------|--|-------------------------------|
| Parvovirus | H-1 Virus | Roditori |
| | LuIII Virus | Roditori |
| | Bovine parvovirus | Bovini |
| | Minute Virus of Mice | Topo, ratto |
| | Porcine parvovirus | Maiale |
| | Feline parvovirus e varianti d'ospite | Gatto |
| | Feline Panleukopenia Virus | Cane |
| | Canine parvovirus | Visone |
| | Mink Enteritis Virus | Pollo |
| | Chicken parvovirus | Oca |
| | Goose parvovirus | Criceto |
| | Hamster parvovirus | Ratto |
| | Kilham rat virus | Coniglio |
| | Lapine parvovirus | Topo |
| | Murine parvovirus 1 | Maiale |
| | Porcine hokovirus | Procione |
| | Raccoon parvovirus | Ratto |
| | Rat minute virus 1a | Ratto |
| | Rat minute virus 1b | Ratto |
| Rat minute virus 1c | Ratto | |
| Bocavirus | Bovine bocavirus | Bovini |
| | Canine minute virus | Cane |
| | Chimpanzee bocavirus | Chimpanzee |
| | Feline bocavirus | Gatto |
| | Gorilla bocavirus 1 | Gorilla |
| | Human bocavirus 1 | Uomo |
| | Human bocavirus 2 | Uomo |
| | Human bocavirus 3 | Uomo |
| | Human bocavirus 4 | Uomo |
| | Porcine bocavirus 1 | Maiale |
| | Porcine bocavirus 2 | Maiale |
| Porcine bocavirus 3 | Maiale | |
| Amdovirus | Aleutian Mink Disease Virus | Visone, furetto, procione |
| Erythrovirus | Human parvovirus B19 <i>Genotype 1 (B19)</i> <i>Genotype 2 (Lali, A6)</i> <i>Genotype 3 (V9, D91.1)</i> | Uomo |
| | Chipmunk parvovirus | Roditori |
| | Simian parvovirus | Macaca Fascicularis |
| | Pig-tailed macaque parvovirus | Macaca Nemestrina |
| | Rhesus parvovirus | Macaca Mulatta |
| | Dependovirus | Adeno-Associated Virus type 1 |
| Adeno-Associated Virus type 2 | | Uomo |
| Adeno-Associated Virus type 3 | | Uomo |
| Adeno-Associated Virus type 4 | | Uomo |
| Adeno-Associated Virus type 5 | | Uomo |
| Adeno-Associated Virus type 6 | | Uomo |
| Adeno-Associated Virus type 7 | | Uomo |
| Adeno-Associated Virus type 8 | | Uomo |
| Bovine Adeno-Associated Virus | | Bovini |
| Canine Adeno-Associated Virus | | Cane |
| Equine Adeno-Associated Virus | | Cavallo |
| Ovine Adeno-Associated Virus | | Ovini |
| Avian Adeno-Associated Virus | | Uccelli |

Classificazione corrente della famiglia Parvoviridae, sottofamiglia Parvovirinae

Variabilità Genetica

Lo studio della variabilità genetica fra isolati di B19 è importante sia per comprendere meglio l'evoluzione del virus sia per l'identificazione di determinanti critici nell'interazione virus-cellula. Uno studio di allineamento globale, eseguito su 16 sequenze complete di isolati di virus B19 presenti nel database NCBI [Gallinella et al., 2003] e concentrato sulla regione interna di 4830 nt del genoma di B19, ha identificato 216 posizioni variabili: di queste, 69 sono presenti in più di un isolato (in genere tra due e otto) mentre 147 si rinvengono solo in singoli isolati; in particolare, 208 di questi polimorfismi implicano solo due differenti basi, a differenza delle restanti 8 posizioni che ammettono più basi.

| NCBI | Ref. | Isolato | Origine | Campione | Variabilità (nt) | Variabilità (%) |
|-----------|------|---------|-------------------|---------------|------------------|-----------------|
| NC_000883 | 1 | HV | Inghilterra, 1990 | Siero | 28/4830 | 0.58 |
| M24682 | 2 | Wi | Inghilterra, 1973 | Siero | 27/4830 | 0.56 |
| M13178 | 3 | Au | USA, 1982 | Siero | 16/4830 | 0.33 |
| Z68146 | 4 | Stu | Inghilterra, 1993 | Siero | 19/4830 | 0.39 |
| Z70528 | 5 | 2/II | Germania, 1994 | Siero | 23/4578 | 0.50 |
| Z70560 | 5 | I/1 | Germania, 1994 | Siero | 13/4621 | 0.28 |
| Z70599 | 5 | SP2 | Germania, 1994 | Siero | 28/4514 | 0.62 |
| AF113323 | 6 | SLE | Germania, 1997 | Siero | 31/4538 | 0.68 |
| AB030673 | 7 | N8 | Giappone, 1987 | Siero | 11/4628 | 0.24 |
| AB030693 | 7 | Mi | Giappone, 1999 | Midollo Osseo | 10/4663 | 0.21 |
| AB030694 | 7 | Rm | Giappone, 1999 | Midollo Osseo | 35/4663 | 0.75 |
| AF161223 | 8 | Kati 1 | Finlandia, 1999 | Sinovia | 27/4265 | 0.63 |
| AF161224 | 8 | Kati 2 | Finlandia, 1999 | Sinovia | 22/4265 | 0.52 |
| AF161225 | 8 | Kati 3 | Finlandia, 1999 | Sinovia | 29/4268 | 0.68 |
| AF161226 | 8 | Kati 4 | Finlandia, 1999 | Sinovia | 23/4279 | 0.54 |
| AY028237 | 9 | E.1.1 | Svezia, 2001 | Siero | 21/4513 | 0.47 |

Sequenze impiegate nello studio di allineamento globale

Dall'analisi del gruppo di isolati Kati1-4, ottenuti da sinovie di infezioni sia croniche che acute, è evidente una variabilità rientrante nella media che non presuppone una specificità tissutale di queste varianti. Questi dati indicano che, rispetto alla sequenza consenso HV, ogni isolato mostra uno stretto range di variabilità, compresa tra lo 0.21 e 0.75% (da 10 a 35 basi per isolato).

Allineamenti parziali effettuati a livello della regione del promotore, della NS e della VP (comprendente la VP1u e la VP1/VP2 comune) hanno poi evidenziato aspetti molto interessanti:

1. La regione del promotore risulta essere quella più liberamente variabile. Sono state riportate divergenze intorno allo 0.3% [Gareus et al., 1998] e oltre il 4% [Zakrzewska et al., 2001], senza osservare alterazioni delle sue caratteristiche funzionali.
2. La regione NS mostra solo una debole variabilità. Probabilmente la variabilità di questa regione può implicare una variazione delle caratteristiche funzionali della proteina, con possibili conseguenze sulla biologia del virus; in particolare [Hemanuer et al., 1996] sembra possa essere importante la sostituzione della cys 508 della proteina NS, da un punto di vista di persistenza dell'infezione e risposta immunitaria, anche se tuttavia le maggiori sostituzioni si osservano nella regione compresa tra gli aa 181 e 192 [Ishii et al., 1999].
3. Nella regione VP1u si riescono ad identificare due distinti domini: il primo mostra elevata variabilità e corrisponde alla regione che codifica per numerosi epitopi lineari neutralizzanti; il secondo è conservato e corrisponde al dominio della fosfolipasi virale (nt 3150-3327), essenziale per l'infettività del virus [Gallinella et al., 2003].
4. La regione VP1/2 invece mostra una variabilità nettamente inferiore ed estremamente omogenea.

Varianti genotipiche

Nel 1999 è stata riportata l'identificazione di un isolato virale [Nguyen et al., 1998; Nguyen et al., 1999], ritrovato nel siero di un bambino di 8 anni affetto da anemia aplastica associata a deficit di G6PDH, geneticamente distinto dal B19 e denominato V9. I test sierologici standard per il B19 non rivelarono la presenza del B19 in questi campioni dimostrando che la patologia era dovuta al V9, virus emergente che non presentava cross-reattività nei test B19-specifici sottolineando la necessità di tecniche specifiche per la ricerca del V9. La variabilità si estende lungo l'intero genoma, con una divergenza nucleotidica superiore al 12% tra V9 e B19.

Nel 2002 [Hokynar et al., 2002], in seguito ad uno studio su campioni di cute umana effettuato su 34 pazienti finlandesi, due ulteriori varianti di Erythrovirus sono emerse, indicate col nome di LaLi e HaAM. Peraltro queste varianti hanno mostrato una persistenza a livello cutaneo, mentre non sono state rinvenute in campioni di midollo osseo e sinovie; ciò indica una correlazione tra genotipo virale e tropismo tissutale. Questi due isolati differiscono tra loro per lo 0.3% della sequenza nucleotidica. Analisi di sequenza hanno dimostrato che questo nuovo virus presenta, a livello della sequenza codificante, una variabilità genetica del 10.8% rispetto alla sequenza di riferimento del B19 e dell'8.6% rispetto alla variante V9, mentre la divergenza a livello della regione non codificante è superiore ed è pari al 26.5% e 17.2% rispettivamente [Hokynar et al., 2002; Nguyen et

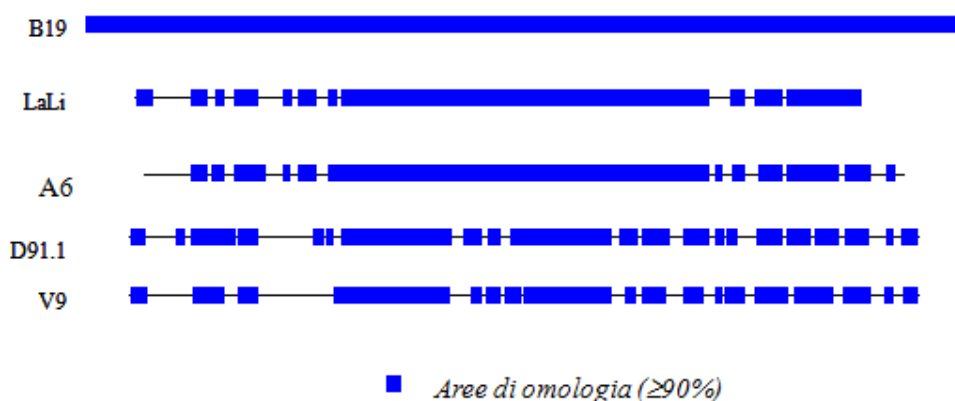
al., 2002].

Analisi filogenetiche e di allineamento degli isolati LaLi e V9 con la sequenza di consenso di B19 (Au) hanno permesso di stabilire che:

1. A livello del promotore le divergenze ammontano al 26.5% e 30,7% rispettivamente fra LaLi e Au e fra V9 e Au al e per la massima parte sono rappresentate da delezioni
2. Nella regione NS si osservano disomologie pari al 12.9% in nt e al 6% in aa fra LaLi e Au e pari al 13,4% e 5,8% fra V9 e Au.
3. Nella regione VP1u le differenze fra LaLi e B19 ammontano al 4.6% in nt e al 4.4% in aa, mentre nella regione VP1/2 comune si arriva al 9% in nt e all'2.1% in aa. Fra V9 e B19 la differenza nella VP1u è di circa 8,5% in nt e 6,6% in aa mentre nella regione VP1/2 è pari a 11,7% in nt e 3,1% in aa.

Lo studio condotto in Francia tra il 1999 e il 2001 [Servant et al., 2002] ha infine portato all'identificazione di 11 nuovi isolati, con parametri di restrizione omologhi al virus V9 e perciò ad esso correlabili. Un clone ottenuto da questi, denominato D91.1, è stato sequenziato ed impiegato in studi filogenetici. Dal confronto degli isolati V9, D91.1, LaLi e HaAM con 12 sequenze di virus B19 presenti in NCBI è emerso che:

1. La massima disomologia è osservata a livello della regione del promotore p6, con divergenze oscillanti tra il 19.8 e il 25.7%.
2. I virus V9 e D91.1 sono più diversi tra loro (5.3%) che non i diversi isolati B19 (tra lo 0.2 e l'1.1%), dai quali distano per un 14% in sequenza nucleotidica.
3. Il virus LaLi mostra disomologie nucleotidiche del 12% rispetto al B19 e del 9.3% rispetto al V9.



Nello studio sopra riportato sono stati presi in esame più di 1084 campioni di siero suddivisi, in base a parametri epidemiologici e clinici, in 5 gruppi: 396 sono risultati positivi, di cui 385 hanno

evidenziato parametri di restrizione per il B19, mentre i restanti 11 parametri V9 simili. Il fatto che 9 di questi 11 isolati provengano da campioni francesi, unitamente al mancato loro rinvenimento in altre zone, può far supporre che la loro circolazione sia limitata a questa area geografica, con una frequenza pari all'11.4%.

| Gruppo | Quadro clinico | Provenienza |
|---------------|---------------------------------------|----------------------|
| A | Pazienti HIV positivi | Francia, 1992 - 1997 |
| B | Idropi fetali | Francia, 1995 - 1997 |
| C | Gestanti con sintomi da infezione B19 | USA |
| D | Pazienti B19 positivi | Francia, 1972 - 1999 |
| E | Studio Prospettico | Francia, 1999 - 2001 |

Campioni di siero impiegati nello screening del 2002 in Francia [Servant et al., 2002]

Quasi contemporaneamente al precedente studio è stato riportato l'isolamento di una ulteriore variante di Erythrovirus umano, denominata A6, proveniente da un soggetto italiano HIV positivo affetto da anemia cronica [Nguyen et al., 2002]. Dal sequenziamento di due distinti cloni del virus A6 (omologhi per il 99.7% della sequenza nucleotidica) è stato possibile evidenziare un'omologia dell'87.8% per il virus B19 e del 92% per il virus V9, contro l'86.6% di omologia tra B19 e V9. Un dato importante emerso è che le differenze tra virus A6 e B19 risultano essere meno marcate da un punto di vista di sequenza amminoacidica, piuttosto che nucleotidica: ciò indica che parte delle variazioni sono sinonime. L'isolato A6, sulla base della sequenza nucleotidica, può essere fatto rientrare all'interno del genotipo 2, unitamente agli isolati LaLi e HaAM.

Alla luce dei risultati ottenuti è stata quindi proposta una suddivisione degli Erythrovirus umani in tre ben distinti genotipi, sulla base delle distanze genetiche emerse: i virus *B19-correlati* corrispondono al genotipo 1, le forme *LaLi* e *A6* appartengono al genotipo 2 e i virus *V9-correlati* (come *D91.1*) costituiscono il genotipo 3.

Tutti i genotipi sono in circolazione ma con una distribuzione geografica e temporale differente.

Il genotipo 1 è quello che circola maggiormente nelle diverse aree geografiche [Hubschen et al., 2009]. Il genotipo 2 è raro e sporadicamente può essere trovato in alcune zone geografiche inclusa l'Europa [Liefeldt et al., 2005; Cohen et al., 2006; Grabarczyk et al., 2011]. Il genotipo 3, si trova maggiormente in Africa occidentale, dove rappresenta il genotipo prevalente, e in quantità minore in altre regioni [Parsyan et al., 2007].

Se si analizza il virus presente nei tessuti in forma persistente segno di una passata infezione, il cosiddetto *bioportfolio*, il quadro è differente e fornisce un'idea della circolazione e dell'epidemiologia del virus in passato [Norja et al., 2006]. Seppure con differenze, tutti i genotipi

sono stati identificati nei tessuti, a conferma della capacità del Parvovirus B19 di stabilire persistenza. Stranamente il genotipo 2 è stato trovato nei tessuti con un'incidenza superiore rispetto a quella con cui si trova normalmente in circolazione [Schneider et al., 2008; Corcioli et al., 2008]. In Europa l'incidenza si è visto essere maggiore in soggetti adulti e minima in persone nate dopo il 1960-1970, quando invece inizia ad essere dominante il genotipo 1, suggerendo una sorta di sostituzione in quegli anni del genotipo 2 col genotipo 1.

La divergenza genetica fra genotipi è ancora oggetto di studio tuttavia dalla analisi delle sequenze di B19 raccolte nel tempo è stato possibile ipotizzare una rapida dinamica evolutiva, con una velocità di circa 10^{-4} nucleotidi sostituiti per posizione per anno [Shackelton et al., 2006]. Questa ipotesi è stata supportata da studi su un dataset di sequenze delle VP relative a isolati di B19 derivati da sangue o da tessuti, in cui è stata messa a confronto la velocità di cambiamento nella sequenza del virus in circolazione rispetto a quello presente nei tessuti [Norja et al., 2008]. Gli isolati da plasma presentavano una velocità di sostituzione pari a 4×10^{-4} e di sostituzione sinonima pari a 18×10^{-4} per sito per anno, un'elevata frequenza di mutazione che permette rapidi cambiamenti adattativi da parte del virus. Secondo queste stime il comune antenato delle varianti di B19 oggi circolanti risalirebbe al 1956-1959, compatibilmente con i dati relativi al bioportfolio. I dati invece relativi agli isolati di B19 derivati dai tessuti sono compatibili con l'idea che ci sia una lenta o assente mutazione di sequenza quando il virus stabilisce persistenza nei tessuti.

In conclusione l'elevata velocità di sostituzione nucleotidica unitamente alla rapida diffusione dell'infezione può portare a una veloce diversificazione degli isolati.

L'elevato rapporto tra sostituzioni sinonime e non sinonime, fa pensare ad una elevata pressione selettiva sul virus e al tempo stesso rende conto dell'uniformità di comportamento biologico e di immunogenicità fra i diversi genotipi [Ekman et al., 2007].

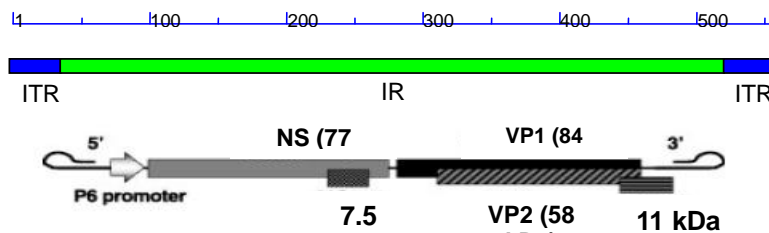
Struttura del virus

Organizzazione del genoma virale

La caratterizzazione del genoma del parvovirus B19 è stata inizialmente ottenuta analizzando il DNA virale purificato da siero infetto [Clewley, 1984; Summers et al., 1983]. Il virus è stato purificato dal siero mediante ultracentrifugazione su cuscino di saccarosio. La lisi dei virioni e la successiva purificazione del DNA virale mediante estrazione con fenolo-cloroformio hanno prodotto una molecola di DNA a doppia catena di dimensioni superiori a 5 kb, facilmente separabile nelle due catene singole mediante trattamento a 70°C o con alcali. La purificazione del DNA virale

in condizioni tali da prevenire la riassociazione delle catene ha prodotto invece molecole a singola catena in grado di riassociarsi *in vitro* nella forma a doppia catena. È stato così osservato che il genoma del parvovirus B19 consisteva in un'unica molecola lineare di DNA monocatenario, il che unitamente alla morfologia del virus e alle sue ridotte dimensioni hanno confermato l'appartenenza del B19 alla famiglia Parvoviridae. Inoltre si è visto che molecole di opposta polarità sono incapsidate separatamente con uguale frequenza, proprietà condivisa con Dependovirus [Crawford et al., 1969] e Densovirus [Kelly et al., 1977]. Non c'era tuttavia evidenza che l'infezione di B19 fosse dipendente dalla coinfezione di virus helper (come per i Dependovirus) nè vettori artropodi sembravano essere implicati nella trasmissione del B19 (come nel caso dei Densovirus). È stato invece riportato che il Parvovirus LuIII a differenza degli altri Parvovirus [Siegl, 1976] era in grado di impacchettare entrambi i filamenti con simile efficienza [Muller and Siegl, 1983]. Sulla base di queste osservazioni il B19 venne inizialmente classificato come appartenente al genere Parvovirus. La clonazione molecolare del genoma di B19, effettuata per la prima volta nel 1984, ha in seguito consentito di ottenere la sequenza nucleotidica completa e di analizzare l'organizzazione genomica del DNA virale, partendo da due differenti isolati virali: Wi dall'Inghilterra e Au dagli USA [Cotmore, Tattersall, 1984; Deiss et al., 1990; Shade et al., 1986]. L'intera molecola è lunga 5596 nt; sequenze terminali in ripetizione invertita di 383 nt fiancheggiano una sequenza interna unica di 4830 nt, contenente l'intera regione codificante del B19. I 365 nt distali nelle sequenze terminali contengono un asse di simmetria e formano un palindromo imperfetto, che può essere presente in due diversi arrangiamenti (denominati flip/flop), essendo ciascuno il complemento inverso dell'altro. Queste sequenze sono in grado di ripiegarsi su se stesse in un segmento bicatenario a forcina (hairpin); strutture terminali a forcina sono state osservate direttamente in microscopia elettronica [Mori et al., 1987; Zuccheri et al., 2001]. Le basi disappaiate nell'hairpin formano caratteristiche "bubbles" la cui dimensione e posizione sembra essere conservata tra i diversi isolati di B19 [Deiss et al., 1990; Zhi et al., 2004]. La presenza di questi disappaiamenti introduce delle distorsioni nelle strutture terminali in base alle quali i diversi isomeri possono essere distinti. Le precedenti osservazioni furono confermate tramite clonazione e sequenziamento di un ulteriore e differente isolato virale, Stu [Hicks et al., 1996], a partire dalla regione interna ed estendendosi ai terminali. Infine è stato più recentemente ottenuto un clone contenente l'intero genoma B19 dall'isolato HV, la cui sequenza completa si estende per tutto il genoma, compresi i terminali ed è stato inserito nel database NCBI [Gallinella, Venturoli, 1999]. L'organizzazione genomica del parvovirus B19 si discosta dagli altri parvovirus animali che di solito impacchettano con maggior frequenza le catene di polarità negativa (anti-messaggero) e i cui termini sono differenti fra di loro per sequenza e conformazione [Cotmore, Tattersall, 1987].

Il genoma di B19 ricorda invece quello dei parvovirus Adeno-Associati [Berns, Bohenzky, 1987]; in entrambi i casi sono presenti molecole di DNA di entrambe le polarità, incapsidate con uguale frequenza; in entrambi i casi una sequenza interna unica codificante è fiancheggiata da ripetizioni terminali che possono assumere una struttura secondaria complessa. I termini del B19 sono però di dimensioni maggiori dei termini dei virus Adeno-Associati, mentre in questi ultimi assumono una conformazione più complessa. È stato inoltre riportato che per gli AAV le regioni terminali sono essenziali per l'incapsidazione e l'integrazione nei cromosomi dell'ospite [Wang et al., 1996].



Organizzazione del genoma di parvovirus B19

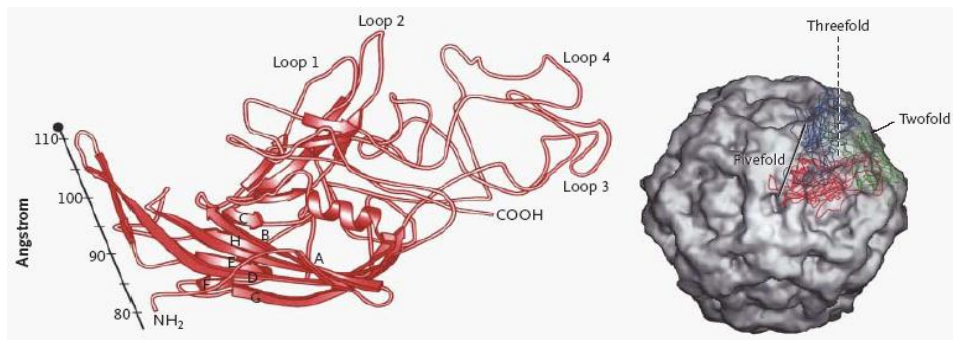
Il virione

Inizialmente studi biochimici condotti sui virioni hanno evidenziato caratteristiche in comune con altri Parvovirus, analogamente a questi il capsido del B19 è costituito da due proteine strutturali, per il 90-95 % dalla proteina capsidica minore VP2 e per la parte restante dalla proteina maggiore VP1 [Cotmore et al., 1986].

Studi di microscopia crioelettronica e di diffrazione ai raggi X condotti sui virioni generati mediante il sistema Baculovirus hanno permesso di ottenere i primi dati sperimentali circa la struttura dei capsidi [Agbandje et al., 1991; Agbandje et al., 1994; Kaufmann et al., 2004], confrontati successivamente con quelli ottenuti dagli studi sui virioni nativi cristallizzati [Kaufmann et al., 2008].

I dati suggeriscono una organizzazione del capsido analoga a quella di altri parvovirus. Il virione del B19 è un icosaedro costituito da 60 unità proteiche e ciascuna unità capsomerica ha una struttura di base che costituisce il nucleo centrale del capsido data da un foglietto β composto da 8 filamenti fra cui si interpongono anse che contribuiscono alla definizione della superficie esterna del virione.

Analogamente ad altri Parvovirus in corrispondenza di uno degli assi di simmetria, l'asse 5, è presente una struttura cilindrica che forma un canale di connessione fra l'interno del virione e l'esterno e i cui margini sono circondati da una depressione. In modo del tutto caratteristico, invece, il capsido del B19 possiede complessivamente una superficie rotonda e liscia.



Struttura tridimensionale della proteina capsidica VP1 e del virione

Data la ridotta presenza di VP1 nei virioni, la porzione N-terminale della VP1 (VP1u) non è stata determinata in cristallografia e quindi la struttura atomica precisa non è ancora nota. Diverse ipotesi sono state proposte circa la sua disposizione: la VP1u può essere disposta all'esterno ed essere riconosciuta dal sistema immunitario [Rosenfeld et al., 1992] o all'interno del capsido, come in altri membri della famiglia, con esternalizzazione in caso di danneggiamento del virione o nelle prime fasi di interazione con la cellula [Ros et al., 2006]. L'analisi comparata fra i virioni ottenuti mediante il sistema ricombinante basato sui Baculovirus e i virioni nativi ha messo in evidenza che in questi ultimi le porzioni della VP1u critiche per l'infezione e la risposta immunologica (il core enzimatico PLA2 e gli epitopi neutralizzanti) non sono in realtà esposte sul capsido, ma diventano accessibili solo a seguito di un riarrangiamento conformazionale, a differenza di quanto osservato invece per le particelle ricombinanti [Kawase et al., 1995]. La disposizione e i possibili riarrangiamenti conformazionali che coinvolgono la regione PLA(2) dotata di attività fosfolipasica sono critici per la l'efficace interazione del virus con la cellula [Zadori et al., 2001; Cnaan et al., 2004].

L'espressione delle proteine capsidiche è stata ottenuta in cellule eucariotiche dove si assemblano e formano particelle simil-virali, VLP, simili ai virioni nativi. In particolare, il sistema di espressione più utilizzato è quello basato sul Baculovirus in cellule di insetto che ha consentito l'ottenimento di rese elevate di proteine virali [Brown et al., 1991; Kajigaya et al., 1991].

L'espressione della proteina VP2 da sola è sufficiente per la formazione di capsidi morfologicamente regolari. La proteina VP1 da sola non è in grado di formare capsidi, ma piuttosto strutture irregolari; forme progressivamente troncate di VP1 tornano man mano a formare capsidi regolari. Il rapporto fra VP1 e VP2 appare fisso nei virioni autentici, ma sperimentalmente è possibile arricchire i virioni in VP1 dal 5% al 40%.

Ciclo vitale

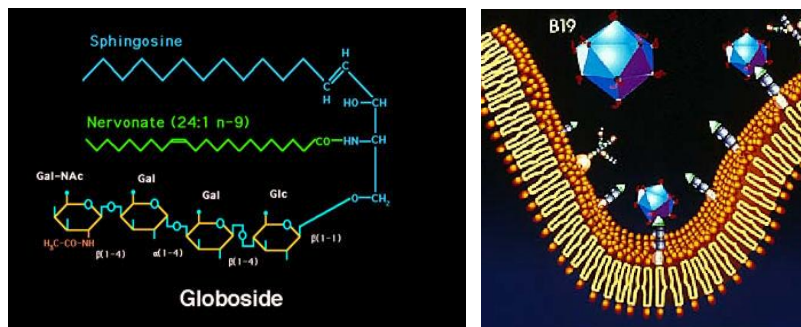
Fasi iniziali del ciclo vitale

Il ciclo vitale del B19 inizia con il riconoscimento da parte delle proteine capsidiche di uno specifico recettore presente sulle cellule bersaglio, che rappresenta un determinante critico per il tropismo del virus.

Come per altri virus animali anche per il parvovirus B19 è stata evidenziata un'attività emagglutinante nei confronti degli eritrociti umani e di altri primati [Brown, Cohen, 1992]. In questo caso, visto che le cellule bersaglio del B19 sono i precursori eritroidi, è stata ipotizzata l'identità fra la molecola agglutinante e il recettore virale. È stato quindi inizialmente utilizzato un saggio di inibizione dell'emagglutinazione per identificare la molecola cellulare coinvolta: capsidi ricombinanti prodotti in Baculovirus e dotati di attività emagglutinante sono stati preincubati con diverse frazioni della membrana eritrocitaria o di cellule UT-7 (permissive per il B19). Frazionamenti successivi hanno identificato un glicolipide neutro di membrana, il globotetraosilceramide, Gb4Cer o globoside, come molecola in grado di inibire selettivamente l'emagglutinazione da parte del B19.

La rilevanza biologica del legame fra capsidi e globoside è stata valutata mediante esperimenti di neutralizzazione dell'infettività su piastre di metilcellulosa. La presenza di un eccesso di globoside purificato o di un anticorpo anti-globoside, contemporaneamente alla incubazione delle cellule di midollo con il virus, è in grado di neutralizzare competitivamente l'infettività virale, risultato che permette di identificare tale molecola come recettore cellulare del B19.

È degno di nota il fatto che il globoside costituisca l'antigene del gruppo eritrocitario P. Il polimorfismo allelico all'interno di questo gruppo antigenico determina la comparsa, seppur a bassa frequenza, di fenotipi che non esprimono il globoside sulla membrana cellulare (fenotipo p). È stato visto che, durante l'infezione in vitro, tali cellule sono naturalmente resistenti e che individui di fenotipo p non hanno segni sierologici di infezione da B19. Questo esempio ha costituito il primo caso identificato di una popolazione naturalmente resistente a un'infezione virale per assenza geneticamente determinata del recettore cellulare [Brown et al., 1994]. Il fenomeno può essere visto come un esempio di coevoluzione fra ospite e patogeno, dove il polimorfismo può rappresentare in questo caso un vantaggio selettivo.



Struttura chimica del globoside e modello di interazione con il virus

Oltre che sui progenitori eritroidi il recettore è presente su diversi tipi di cellule come le cellule endoteliali della vena ombelicale (HUVEC) e i fibroblasti polmonari (NHLF) e può essere coinvolto nel legame del virus alla cellula; tuttavia il livello di espressione di tale recettore non è direttamente correlato all'efficienza di tale legame.

L'interazione fra il capside e il globoside è stata investigata in vitro: non sembra esserci interazione fra il virus e la superficie cellulare ricostruita il che suggerisce la necessità di una particolare distribuzione dei lipidi ad esempio in lipid rafts o la presenza di corecettori affinché ci sia un'interazione funzionale [Kaufmann et al., 2005].

Diversi studi documentano come la presenza del solo globoside sulla superficie cellulare non sia di per sé sufficiente per la corretta internalizzazione del virus.

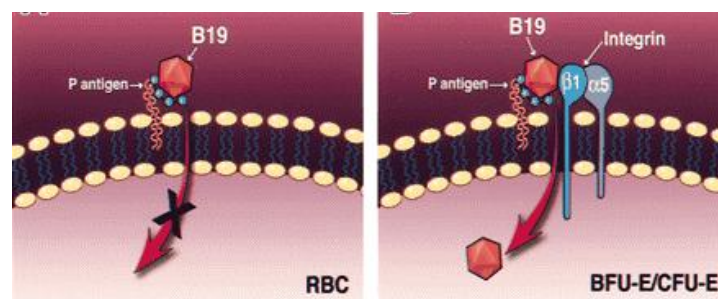
La linea cellulare eritroleucemica K562 pur presentando sulla membrana il globoside non permette il processo di penetrazione virale; tuttavia il cambiamento verso un fenotipo cellulare aderente ha reso possibile l'internalizzazione del virus. Questa osservazione ha portato alla scoperta di molecole che fungono da co-recettori, le integrine di tipo $\alpha 5\beta 1$, coinvolte nel legame e nell'internalizzazione del virus e presenti sulla superficie dei progenitori eritroidi e sperimentalmente inducibili sulle cellule K562. La funzione di tale corecettore può essere aumentata stabilizzando la conformazione ad alta affinità o inducendo la clusterizzazione dell'integrina $\beta 1$, a testimoniare il possibile ruolo del signalling ad essa associato nell'internalizzazione del B19 [Weigel-Kelley et al., 2003]. La funzione delle integrine sembra essere regolata in modo cellula-specifico attraverso la coespressione delle integrine: l'ingresso preferenziale del B19 nelle cellule progenitrici eritroidi è promosso da una robusta risposta dell'integrina $\beta 1$ aumentata dalla preclusterizzazione con le integrine $\beta 2$ e $\beta 3$ coesprese [Weigel-Kelley et al., 2006].

Sono state osservate deboli interazioni fra il B19 e glicolicosfingolipidi tessuto-specifici, diversi dal globoside tuttavia non è stato dimostrato il ruolo funzionale di nessuna di queste molecole [Cooling et al., 1995]. È stato invece identificato un possibile corecettore alternativo il Ku80 che pur essendo

una proteina nucleare è stata trovata sulla superficie delle cellule CD36, CD3 T e CD20 B, suggerendo come possibile target la linea linfoide [Munakata et al., 2005]. Tuttavia la valenza di tale corecettore nella patogenesi virale richiede ulteriori approfondimenti.

Si può ipotizzare un modello multistep di interazione in cui avviene un primo legame del virus al globoside, seguito da una più forte interazione con le integrine che porta infine all'internalizzazione del virus.

L'assenza delle integrine sulla superficie cellulare dei reticolociti (RBC: Red Blood Cells), su cui invece sono abbondanti le molecole di globoside spiega il mancato attacco del virione agli eritrociti maturi; mentre nei BFU-E/CFU-E, in cui i livelli sia di globoside che di integrine $\alpha 5\beta 1$ sono elevati, queste ultime possono attivarsi e innescare una cascata di eventi che consente una infezione virale produttiva. Questi aspetti sono attualmente oggetto di ulteriori approfondimenti.



Modello di interazione virus-cellula

Secondo alcuni studi la regione VP1u localizzata all'interno del capsido potrebbe subire un riarrangiamento nelle prime fasi di interazione con la cellula con successiva esposizione all'esterno [Ros et al., 2006]. L'esposizione della VP1u faciliterebbe l'internalizzazione e l'uncoating del virus. Nelle cellule UT7EpoS1 la maggior parte dei virioni si distacca a seguito dell'interazione col recettore acquistando una maggiore capacità di legame e una maggiore infettività, dovuta a un riarrangiamento conformazionale del capsido e a una maggiore accessibilità della VP1u. La capacità di interagire, staccarsi e riattaccarsi alla cellula sembrerebbe aumentare la possibilità di un'infezione produttiva [Bonsch et al., 2010].

I primi step del ciclo vitale del virus sono stati investigati nelle cellule UT7/Epo [Quattrocchi et al., 2012] in cui il virus e il recettore si associano ai lipid rafts e il virus è successivamente internalizzato mediante meccanismo di endocitosi clatrina dipendente. Il virus rapidamente diffonde attraverso il pathway di endocitosi raggiungendo il compartimento lisosomiale in pochi minuti, dove una elevata frazione viene degradata. Le vescicole di endocitosi non sono permeabilizzate suggerendo un rilascio del virus senza apparente danno della membrana.

Gli studi inerenti le fasi iniziali dell'infezione sono attualmente oggetto di studi più approfonditi.

Tropismo

Il Parvovirus B19 presenta un tropismo limitato ai precursori eritroidi, cellule suscettibili e permissive all'infezione del virus.

Inizialmente l'associazione fra l'infezione del Parvovirus B19 e i disturbi associati all'eritropoiesi suggerì che il principale bersaglio del virus potessero essere i precursori eritroidi. Successivi studi hanno poi confermato questa ipotesi, verificando l'inibizione dell'eritropoiesi in vitro da parte del virus e rivelando la presenza di componenti virali in colture di progenitori eritroidi infettati, e hanno condotto all'allestimento di sistemi cellulari in vitro per lo studio dell'infezione da B19.

Cellule di midollo osseo, coltivate su terreni semisolidi come la metilcellulosa, possono formare colonie generate dai precursori della serie eritroide (BFU-E e CFU-E), megacariocitaria (CFU-Meg) e granulo-monocitaria (CFU-GM). La preincubazione delle cellule con siero viremico portò ad una mancata formazione di colonie eritroidi, lasciando inalterate le colonie di derivazione granulo-monocitaria. L'effetto di questa inibizione poté essere annullato dalla preincubazione del siero viremico con siero contenente anticorpi anti-B19. La selettiva scomparsa delle colonie eritroidi è attribuibile al tropismo e al successivo effetto citotossico del virus [Mortimer et al., 1983].

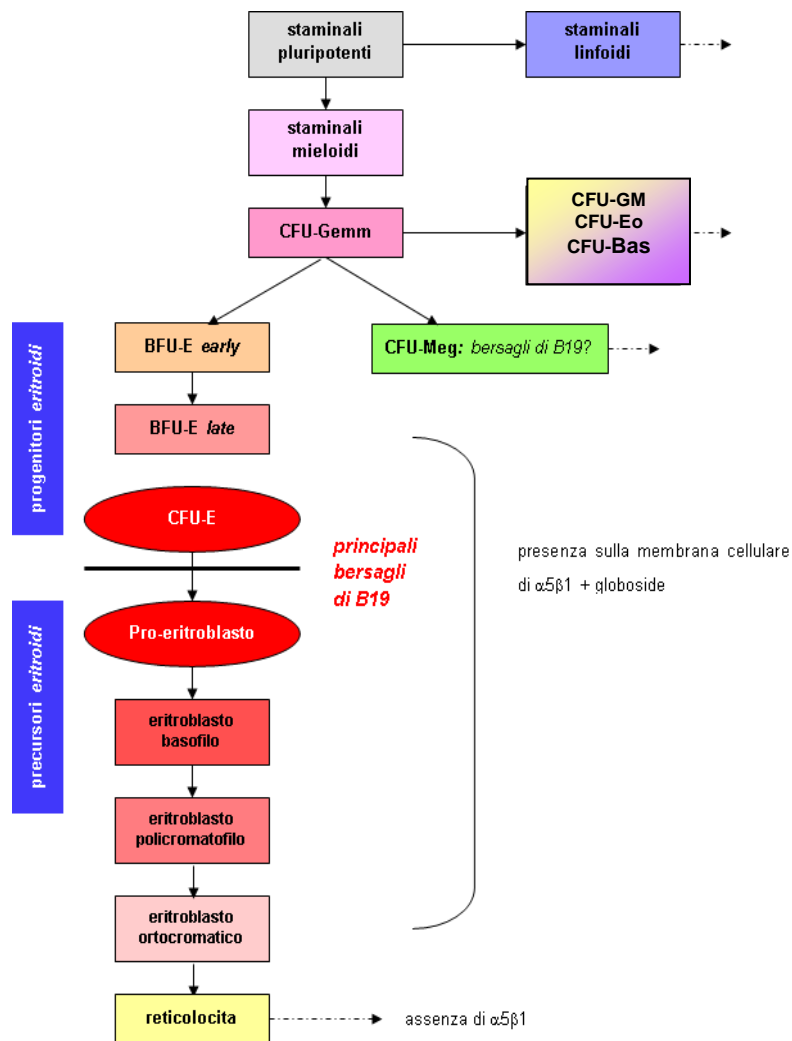
Cellule di midollo osseo coltivate in sospensione furono infettate con il Parvovirus B19. In questo caso le forme replicative del DNA virale furono evidenziate mediante Southern blotting esclusivamente nella frazione eritroide, mentre non erano presenti nella frazione mieloide o linfocitaria. Le cellule infettate erano inoltre evidenziabili mediante ibridazione in situ per la ricerca degli acidi nucleici virali o mediante immunofluorescenza per la ricerca delle proteine capsidiche [Ozawa et al., 1986; Ozawa et al., 1987; Young et al., 1984].

La propagazione del B19 in cellule del midollo osseo stimulate con eritropoietina è limitata; un arricchimento per i precursori eritroidi permette invece un maggiore grado di replicazione virale [Srivastava et al., 1988]. I precursori eritroidi del midollo osseo sono quelli prevalentemente utilizzati, ma precursori infettabili sono presenti anche nel sangue periferico [Schwarz et al., 1992], nel sangue di cordone ombelicale [Srivastava et al., 1992] e nel fegato fetale [Brown et al., 1992; Yaegashi et al., 1989]. Recentemente sono state messe a punto tecniche per la generazione di precursori eritroidi (EPCs) da cellule staminali ematopoietiche del sangue periferico (HSCs), sistema altamente permissivo e suscettibile all'infezione di B19 [Wong et al., 2008; Filippone et al., 2010].

Le cellule staminali non sono infettate, mentre i principali bersagli sono cellule della linea eritroide maggiormente differenziate, come BFU-E, CFU-E ed eritroblasti [Takahashi et al., 1990]. Anche i

megacarioblasti sembrano essere interessati dall'infezione, subendo un effetto citotossico senza essere permissivi per la replicazione virale [Srivastava et al., 1990].

La replicazione in linee cellulari continue di derivazione emopoietica è invece più ristretta. Linee cellulari di derivazione eritroleucemica come K562, TF1 o HEL non sono permissive alla replicazione virale, probabilmente perché troppo indifferenziate. La replicazione è stata invece ottenuta in una linea eritroleucemica (JK-1) con caratteristiche di spiccata differenziazione eritroide [Takahashi et al., 1993; Soderlund et al., 1995; Srivastava et al., 1990] e in altre linee cellulari con caratteristiche megacarioblastoidi (KU812Ep6, UT-7 e MB-02) [Miyagawa et al., 1999; Munshi et al., 1993; Shimomura et al., 1992]. Nelle cellule JK-1 lo stato di permissività è indipendente dalla eritropoietina; il trattamento con eritropoietina aumenta però il livello di permissività. Nelle altre linee il condizionamento con eritropoietina induce le cellule verso un differenziamento eritroide che consente la permissività cellulare. Mentre le MB-02 vanno incontro a differenziamento terminale, le KU812Ep6 e le UT-7 mantengono un fenotipo sostanzialmente immaturo, che consente di mantenere l'infezione in vitro per periodi prolungati.



Schema dell'eritropoiesi

La produzione di virioni in tutti i sistemi cellulari permissivi all'infezione di Parvovirus B19 rimane comunque molto limitata. Lo studio del ciclo infettivo del virus risulta limitato all'uso di colture primarie o a linee cellulari infettate con il virus nativo presente nel siero di campioni biologici.

Una soluzione alternativa data la limitata replicazione virale in vitro è l'utilizzo di cloni genomici con potere infettante come è stato fatto per altri virus quali gli Adenoassociati. Gli inserti escissi vengono trasfettati nelle cellule e valutata la loro capacità di generare virioni infettanti. Tale sistema permette sia uno studio sequenza-funzione del genoma virale sia la produzione di particelle ricombinanti per possibili applicazioni biotecnologiche. I primi tentativi hanno visto la produzione di cloni incompleti o riarrangiati, che non hanno mostrato alcuna funzionalità [Cotmore et al., 1984; Deiss et al., 1990]. È stato successivamente sviluppato un ibrido B19-AAV capace di generare particelle virali simili al B19 [Srivastava et al., 1989; Ponnazhagan et al., 1998]. Infine sono stati sviluppati cloni di B19 contenenti l'intero genoma che si sono dimostrati funzionali

generando particelle virali infettanti [Zhi et al., 2004; Filippone et al., 2008]. Questo sistema permette studi di espressione e di caratterizzazione delle proteine virali [Zhi et al., 2006], ma presenta una bassa resa in termini di produzione di progenie virale.

Restrizione e permissività cellulare

Lo studio dei fattori cellulari coinvolti nel regolare la permissività o la restrittività all'infezione virale rappresenta un campo di acceso interesse. Principale oggetto di studio per comprendere meglio questi aspetti sono stati diversi sistemi cellulari come le UT7EpoS1, cellule suscettibili all'infezione ma restrittive e a bassa resa; colture primarie di precursori eritroidi, modello che riproduce ciò che succede durante l'infezione naturale; sistemi cellulari diversi da quelli target che possono riprodurre in tipo di interazione presente in vivo e possono rappresentare sistemi manipolabili in vitro.

Fra i vari aspetti critici nel modulare la permissività al virus è stata presa in considerazione la richiesta di eritropoietina aggiunta alle colture cellulari necessaria non solo per la crescita cellulare ma anche perché promuove l'attivazione del recettore EpoR e l'innescamento del pathway sottostante che risulta necessario per la replicazione virale [Chen et al., 2010]. Questo probabilmente spiega almeno in parte la restrizione dell'infezione del B19 limitata ai precursori eritroidi.

Un'ulteriore aspetto critico per la replicazione virale preso in considerazione in diversi studi è la condizione di ipossia [Pillet et al., 2004], non dipendente dal pathway classico mediato da HIF α ma dai pathway di STAT5A e MEK/ERK. Questa condizione sembra mimare ciò che succede in vivo quando il virus infetta i precursori eritroidi del midollo osseo in un contesto naturalmente ipossico e dunque sembra rappresentare un'adattamento del virus all'ambiente.

La replicazione può inoltre essere supportata dalla funzione helper dell'Adenovirus. In diversi contesti cellulari permissivi e non, come le cellule UT7EpoS1 e 293, è stato visto che l'Adenovirus o l'espressione delle sue componenti E2a, E4orf6 e VA RNA permettono di aumentare la replicazione virale [Guan et al., 2009; Winter et al., 2012]; in particolare modo E4orf6 promuove la replicazione determinando un aumento della produzione delle proteine capsidiche e VA RNA promuove un incremento delle proteine capsidiche indipendentemente dalla replicazione.

Gli eventi che seguono l'attacco e la penetrazione del virus nelle cellule sensibili al B19 mostrano differenze nei sistemi cellulari utilizzati. Questo significa che esistono diversi gradi di permissività all'infezione e quindi differenti livelli di restrizione nel ciclo replicativo virale. Un primo livello è

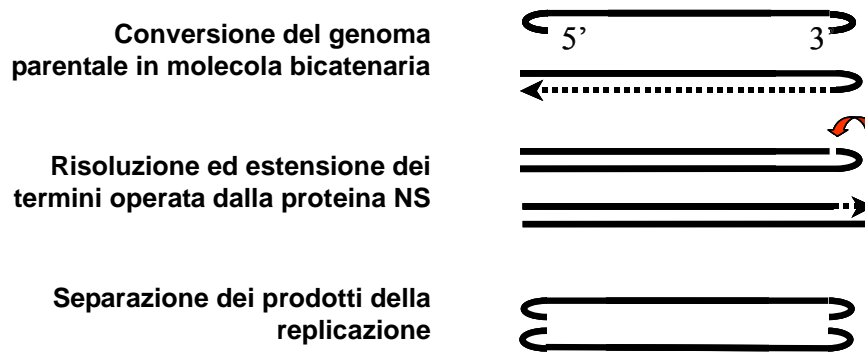
legato alla capacità della cellula ospite di promuovere la sintesi di riparo della singola catena del DNA parentale e quindi la conversione del DNA virale da catena singola in catena doppia, trascrivibile dalle RNA polimerasi cellulari. Un secondo livello di restrizione è invece legato alla sintesi delle proteine virali in presenza di un corredo completo di RNA messaggeri virus-specifici [Gallinella et al., 2000].

Replicazione del genoma virale

La replicazione del genoma di B19 avviene nel nucleo della cellula. Dal momento che il virus è di piccole dimensioni e la capacità codificante è limitata, per la sua replicazione dipende completamente dal macchinario cellulare e la formazione di progenie virale è limitata alle cellule in fase S. Recentemente sta emergendo l'idea che il virus abbia evoluto la capacità di modulare la progressione della cellula attraverso il ciclo cellulare, a suo vantaggio.

Il modello di replicazione proposto è lo stesso utilizzato per spiegare la replicazione del genoma dei parvovirus Adeno-Associati e cioè il modello di Cavalier-Smith [Berns, Bohenzky, 1987]. Il modello prevede che strutture terminali a forcina fungano da innesco per la sintesi di catene complementari alla catena originale, trasformando così una molecola a catena singola in una molecola a catena doppia. La conversione a dsDNA è il primo evento nella duplicazione del DNA ed è un importante determinante del ciclo vitale del virus [Gallinella et al., 2000]: cellule permissive e non permissive possono essere distinte sulla base della diversa capacità di promuovere e supportare la sintesi del filamento complementare. La catena originale viene poi tagliata in un punto opposto all'origine della sintesi da parte della proteina NS che insieme alla DNA polimerasi partecipa al completamento del duplex nella regione rimasta a filamento singolo mediante sintesi di riparo, ricostituendo così la terminazione originale. Tale modello comporta l'esistenza di forme replicative intermedie caratteristiche, che possono essere identificate a conferma della validità del modello stesso. In particolare, devono esistere molecole a doppia catena in cui una delle estremità sia costituita da un'ansa continua. Nel DNA di B19, entrambe le strutture a forcina terminali possono fungere da innesco per la sintesi delle catene complementari di DNA. Le prime conferme della validità del modello vennero da studi *in vitro* [Cotmore, Tattersall, 1984]: la DNA Polimerasi I di E.Coli estende la forcina terminale a partire dall'estremo 3' su entrambe le catene, convertendo il DNA virale a singola catena in una doppia catena con peso molecolare superiore a 5 kb. Il clivaggio di questa molecola con l'endonucleasi di restrizione *BamHI* (che taglia la molecola in un sito unico) produce due doppietti di bande in quantità equimolare, di 3.8-3.9 e 1.4-1.5 kbp rispettivamente. Per entrambi questi doppietti, la banda a peso molecolare inferiore corrisponde al

frammento terminale di innesco della sintesi, in cui la molecola di DNA forma un'ansa continua (forma "turn-around"); la banda a peso molecolare superiore corrisponde al frammento terminale opposto, in cui la molecola di DNA è completamente estesa in forma a doppia catena (forma "extended").



Mappa di replicazione del genoma di parvovirus B19

L'infezione *in vitro* di cellule di midollo osseo ha permesso un'ulteriore conferma di questo modello [Ozawa et al.,1986]. Il DNA di B19 è stato evidenziato a livello nucleare ed è stato caratterizzato per la presenza delle forme replicative: è costantemente presente una forma a doppia catena di 5.6 kb, che in seguito a clivaggio con *BamHI* produce i caratteristici doppietti a 3.8-3.9 e 1.4-1.5 kb. Effettuando un trattamento di denaturazione e rinaturazione rapida del DNA virale si ha una denaturazione specifica delle forme "extended", mentre le forme "turn-around" si ricostituiscono ("snap-back"), confermando così che si tratta di forme in cui un estremo è costituito da un filamento continuo di DNA. Analizzando il DNA virale presente a livello citoplasmatico, oppure purificato dal virus presente nel soprannatante, sono identificabili invece solo le forme a catena singola o a catena doppia derivate dalla riassociazione in soluzione durante il processo di purificazione (differenziabili perché non producono doppietti al clivaggio enzimatico e non vanno incontro a "snap-back"); queste non sono intermedi replicativi ma costituiscono invece i prodotti della replicazione del DNA virale.

Espressione del Genoma Virale

Mappa di trascrizione

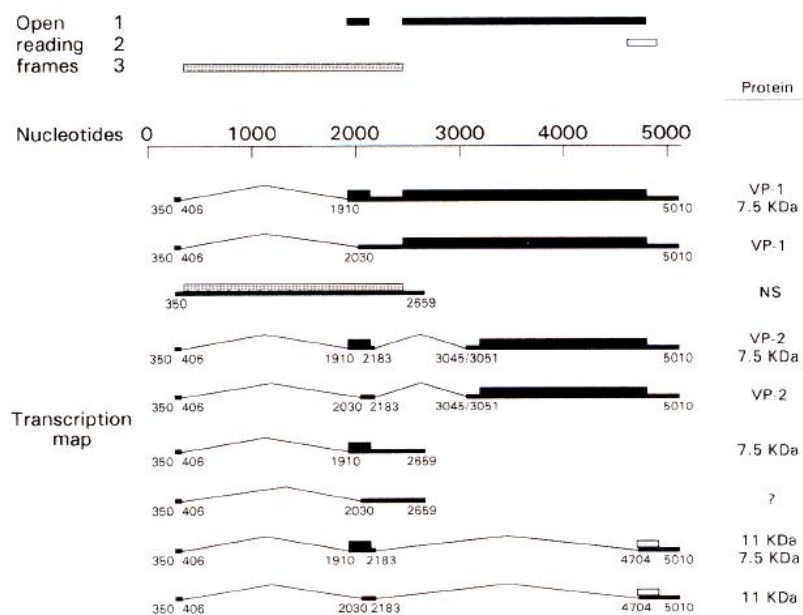
L'intermedio replicativo a doppio filamento funge da stampo per la trascrizione. La mappa trascrizionale del parvovirus B19 è stata inizialmente suggerita dallo studio della sequenza del DNA clonato [Shade et al., 1986] ed è risultata simile a quella degli altri parvovirus dei vertebrati: solo una delle due catene di DNA (la catena a polarità positiva) possiede moduli di lettura aperti in grado di codificare per le proteine virali; la parte sinistra del genoma codifica per la proteina non-strutturale, mentre la parte destra codifica per le proteine capsidiche. Per compensare le limitate dimensioni del genoma i Parvovirus sfruttano una serie di meccanismi per aumentarne il potenziale codificante, come ad esempio l'utilizzazione di tutti i tre moduli di lettura e la generazione di più messaggeri mediante splicing alternativo. La complessità trascrizionale del B19 rappresenta l'esempio estremo di questa ottimizzazione.

La mappa di trascrizione del B19 è stata ulteriormente studiata e determinata con maggiore precisione mediante l'analisi degli RNA messaggeri virali in cellule di midollo infettate con B19 ed è risultata unica fra i parvovirus conosciuti [Ozawa et al., 1987]. Esistono nove trascritti poliadenilati che derivano dalla presenza di due siti donatori di splicing ciascuno seguito da due siti accettori alternativi e dalla presenza di due siti di terminazione della trascrizione

Ciascun mRNA inizia con la medesima sequenza leader (nt 351), guidata da un singolo promotore in posizione 6 u.m. (P6). Di questi trascritti, tre terminano a metà del genoma, in corrispondenza di segnali di poliadenilazione insoliti (nt 2639/2645); fra questi il messaggero da 2.3 kb è l'unico che non subisce processi di splicing, mentre l'escissione di un introne (nt 406-1910/2030) produce due messaggeri da 0.7-0.8 kb, estremamente abbondanti. I rimanenti sei messaggeri terminano all'estremità destra del genoma, in corrispondenza di un sito canonico di poliadenilazione (nt.4990), e sono tutti rimaneggiati per rimozione di uno o due differenti introni. La rimozione del primo introne (nt 406-1910/2030) è comune per tutti i messaggeri, producendo una molecola da 3.1 kb; la rimozione di un secondo introne (nt 2183-3045) produce un messaggero da 2.2 kb, mentre la successiva rimozione di un secondo diverso introne (nt 2183-4704) produce messaggeri da 0.5-0.6 kb, ancora estremamente abbondanti.

La mappatura funzionale [Ozawa et al., 1988] è stata ottenuta mediante traduzione in vitro dopo selezione negativa dei messaggeri virali. Oligonucleotidi antisenso corrispondenti a diverse porzioni del genoma di B19 sono stati ibridati in vitro a RNA purificato da cellule di midollo infettate dal virus e gli ibridi RNA-Oligo generati sono stati degradati mediante RNasi H. I campioni di RNA sono poi stati utilizzati in sistemi di sintesi proteica in vitro e le proteine virus-specifiche prodotte

sono state identificate mediante immunoprecipitazione. Questi studi hanno confermato che il messaggero da 2.3 kb codifica per la proteina non-strutturale (NS), mentre i messaggeri da 3.1 e 2.2 kb codificano per le proteine capsidiche (VP1 e VP2 rispettivamente). La trascrizione del B19 è stata studiata anche mediante sistemi ibridi B19-SV40 espressi transitoriamente in cellule COS-7 [Beard et al., 1989]. Molecole chimeriche contenenti l'origine replicativa del virus SV40 possono replicarsi transitoriamente ma con elevata efficienza in cellule COS-7, consentendo così l'espressione di sequenze eterologhe. L'espressione di sequenze di B19 in questi vettori ha prodotto molecole di RNA e proteine indistinguibili dalle molecole autentiche, sia per la proteina non-strutturale sia per le proteine capsidiche. Infine, librerie genomiche di cDNA virale sono state allestite sia dal sistema in cellule COS-7, sia da cellule eritroleucemiche infettate con B19 [St Amand et al., 1991]. Queste librerie sono state utilizzate per la precisa mappatura e lo studio dell'espressione dei messaggeri a basso peso molecolare da 0.7-0.8 e 0.5-0.6 kb. In sistemi *in vitro* [St Amand, Astell, 1993], si è visto che i messaggeri da 0.5-0.6 kb dirigono la sintesi di una famiglia di molecole proteiche con peso molecolare attorno a 11 kDa (la variabilità dipende dall'utilizzo di segnali di inizio alternativi), evidenziabili anche nei lisati di cellule infettate da B19 e localizzate mediante immunofluorescenza nel nucleo e citoplasma delle cellule infette. Inoltre, si è visto che il modulo di lettura fra i nt 1910-2128, presente sia nei messaggeri da 0.8 kb, sia in quelli da 0.6 kb, è in grado di codificare per una proteina da 7 kDa. Questa proteina è anch'essa espressa in cellule infettate da B19, è presente in nucleo e citoplasma e la sua funzione non è ancora conosciuta [Luo, Astell, 1993].

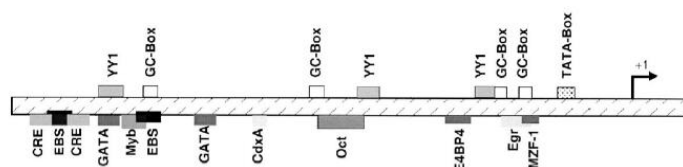


Mappa di trascrizione del parvovirus B19

Regolazione dell'espressione genica

La regolazione dell'espressione genica del B19 avviene a livello di inizio della trascrizione e a livello post-trascrizionale e dipende essenzialmente da tre elementi: (a) il promotore della trascrizione, con le sequenze regolative connesse; (b) i segnali di clivaggio e poliadenilazione dei messaggeri virali; (c) i segnali di splicing dei messaggeri virali.

Esiste un unico elemento promotore, situato a 6 u.m. (P6), in grado di dirigere la sintesi di tutti i trascritti virali; infatti, tutti i messaggeri virali iniziano nel medesimo sito in posizione nt 351. Il promotore è stato caratterizzato funzionalmente *in vitro* mediante esperimenti di "run-off", in cui un segmento compreso fra i nt 100-350 era in grado di dirigere la sintesi di mRNA virali [Blundell et al., 1987; Doerig et al., 1987]. Lo stesso segmento è in grado di dirigere l'espressione di geni eterologhi reporter (CAT o luciferasi) in plasmidi chimerici transfettati in cellule eucariotiche. La regolazione di questo promotore è complessa e non ancora del tutto chiarita. L'attività dipende da un sito canonico di riconoscimento per il fattore di trascrizione TFIID (TATA box) e da una regione a monte ricca di siti di riconoscimento per fattori di trascrizione cellulari; fra questi, i siti (GC boxes) di riconoscimento per il fattore Sp1 risultano necessari per l'attività del promotore [Blundell et al., 1989; Liu et al., 1991]. Sono stati identificati inoltre siti di legame per il fattore YY1 [Shimomura et al., 1993], per le proteine della famiglia Ets [Vassias et al., 1998], per la proteina Oct-1 [Raab et al., 2001] e Sp3 [Raab et al., 2002]. L'attività del promotore risulta inoltre regolata dall'ipossia [Pillet et al., 2004].



Siti di legame di fattori di trascrizione sul promotore del B19

In un ulteriore studio è stata valutata l'attività del promotore P6 e sono stati caratterizzati gli elementi regolatori del promotore clonando l'intera sequenza di P6 e diversi subframmenti in vettori di espressione a monte di un gene reporter codificante per la luciferasi [Gareus et al., 1998]. I vettori ricombinanti sono stati poi transfettati in diverse linee cellulari (epiteliali, eritroleucemiche, linfociti B e T) per studiare l'attività trascrizionale di P6. Da tale studio è emerso che gli elementi indispensabili per l'attività del promotore sono localizzati nelle regioni comprese tra i nt 100 e 190 e tra i nt 233 e 298 di P6. Inoltre transfettando il vettore di espressione contenente la sequenza P6 in cellule HeLa che portano stabilmente il gene codificante per l'NS sotto controllo di un promotore

inducibile, è stato notato un aumento dell'attività trascrizionale mediata da P6 in seguito all'induzione dell'espressione di NS. La regione compresa tra il nt 100 ed il 160 di P6 è risultata essenziale per l'azione transattivante di NS come essenziale è risultata la presenza di due elementi ricchi in GC arrangiati in tandem a monte del TATA box. Questi dati indicano che la transattivazione di P6 mediata da NS è dipendente dalla combinazione di molti fattori che comprendono la proteina NS stessa ma anche la presenza di siti di legame per fattori cellulari (ATF, NFkB/c-Rel e GC-box, Ets) [Raab et al., 2001; Raab et al., 2002; Vassias et al., 1998]. La regolazione da parte di NS sembra quindi mediata da fattori cellulari, tuttavia un possibile legame diretto al promotore è stato suggerito dall'immunoprecipitazione di un frammento del P6 mediante l'uso di un anticorpo anti-NS [Brown, 2006; Raab et al., 2002].

È stato visto come l'attività di questo promotore non sia di per sé specifica per un determinato tipo cellulare (in particolare per i precursori eritroidi), ma abbia invece livelli comparabili di attività in cellule permissive oppure non permissive per la replicazione virale [Liu et al., 1991].

La mappatura dei siti di poliadenilazione e delle giunzioni di splicing è avvenuta mediante clonazione e sequenziamento di librerie di cDNA ottenute da cellule eritroidi infettate [St Amand et al., 1991].

Esistono sul genoma due diversi segnali di clivaggio/poliadenilazione uno localizzato a metà del genoma e uno all'estremità destra. Nel centro del genoma ci sono due siti pAp1 e pAp2. Il processamento degli mRNA a livello del primo sito si basa sull'utilizzo di una sequenza non-consenso AUUAAA che richiede la partecipazione di elementi in *cis* ed è influenzato della sequenza adiacente AAUAAC. Tale sito è quello più utilizzato e genera la più abbondante classe di mRNA. Il sito pAp2 è invece un sito canonico AAUAAA, ma viene utilizzato con frequenza minore e genera mRNA alternativi fra cui probabilmente quello codificante per la proteina 9 kDa [Yoto et al., 2006]. Un segnale di sequenza canonica è situato all'estremità del genoma (pAd); questo elemento è utilizzato nella maturazione dei messaggeri che codificano per le proteine capsidiche. Il bilancio fra i messaggeri per la proteina non-strutturale e i messaggeri per le proteine capsidiche è regolato dal diverso utilizzo dei due distinti segnali di clivaggio e poliadenilazione [Liu et al., 1992; Guan et al., 2008]. I messaggeri per le proteine non-strutturali predominano quantitativamente sui messaggeri per le proteine capsidiche in sistemi cellulari non-permissivi, mentre la situazione è inversa in sistemi cellulari permissivi; l'instaurarsi di questo bilancio è inoltre legato alla replicazione del DNA virale.

Nei messaggeri che subiscono il processamento per splicing, la sequenza leader viene unita all'esone centrale compreso fra i siti accettori di splicing A1-1/A1-2 e il sito D2 donatore di

splicing. La sequenza di tale esone comprende una serie di siti enhancer dello splicing (ESE/IRE) riconosciuti dalle proteine SR. Il bilanciamento e la frequenza relativa nel riconoscimento dei diversi siti sono alla base del processamento dei pre-mRNA del B19 e della sua regolazione [Guan et al., 2011].

Il segnale di poliadenilazione situato internamente è utilizzato nella produzione di messaggeri di 2.3 kb, che codificano per la proteina non-strutturale; successivamente si può avere la rimozione del primo introne (nt 406-1910/2030) con produzione dei messaggeri da 0.5-0.6 kb codificanti per la 7.5 kDa. Il segnale di poliadenilazione situato all'estremità del genoma è utilizzato nella maturazione dei messaggeri che codificano per le proteine capsidiche. Si ha costantemente la rimozione del primo introne, con produzione di messaggeri di 3.1 kb in grado di codificare per la proteina VP1 e che per ulteriori processi di splicing, con rimozione di uno di due distinti introni (nt 2183-3045 o nt 2183-4704), possono dare origine ai messaggeri di 2.2 kb per la proteina capsidica VP2 o ai messaggeri di 0.7-0.8 kb in grado di codificare per la famiglia di proteine da 11 kDa.

Profilo di espressione

Le modalità di replicazione del DNA virale e della sintesi dei messaggeri possono presentare differenze a seconda dell'ambiente cellulare. Studi circa il profilo di espressione sono stati condotti in diversi sistemi, come ad esempio su colture sincronizzate di cellule UT-7 [Shimomura et al., 1993], su cellule UT-7/Epo S1 [Chisaka et al., 2003] e su progenitori eritroidi raccolti dal sangue periferico [Hemauer et al., 1999; Schwarz et al., 1992].

Dallo studio mediante Southern e Northern Blot su cellule UT7Epo sincronizzate e infettate, il primo evento riconoscibile è la produzione dei messaggeri virali (6 hpi), tra cui la trascrizione del messaggero di NS sembra essere predominante (6 hpi), seguita dalla sintesi proteica. La proteina NS, essendo coinvolta nella replicazione del virus, deve tornare prontamente nel nucleo. Dopo la replicazione virale evidenziata dalla produzione di intermedi replicativi alle 16 hpi, la trascrizione sembra essere più marcata con produzione delle proteine capsidiche (24 hpi), che a loro volta queste devono tornare nel nucleo per incapsidare il genoma neoformato.

Questi studi indicano la presenza di eventi precoci e tardivi che coinvolgono la trascrizione e la replicazione del genoma virale. Studi recenti basati sulla quantificazione mediante PCR quantitativa degli acidi nucleici virali prodotti nel corso dell'infezione hanno tuttavia portato a una rivalutazione di tale modello [Bonvicini et al., 2006; Bonvicini et al., 2008]. Nel sistema permissivo UT7EpoS1 il DNA aumenta fino alle 48 hpi mentre l'RNA compare già alle 2-6 hpi mostrando un aumento fino

alle 36-48 hpi che precede quello del DNA. Tutte le classi di mRNA sono costantemente rappresentate nel corso dell'infezione. Nel sistema non permissivo TF-1 invece il DNA non aumenta e sono evidenti solo i piccoli RNA non codificanti. Nelle cellule permissive dunque sia la replicazione che la trascrizione si verificano permettendo un completamento del ciclo replicativo virale; nel sistema non permissivo invece il genoma è presente ma in forma silente.

Sulla base di questi dati si può definire il genoma di B19 come una singola unità replicativo-trascrizionale con un duplice stato di espressione possibile (attivo e replicante o silente e non replicante), la cui replicazione e trascrizione insieme al processamento dei messaggeri rappresentano un unico insieme coordinato di eventi. L'utilizzo dei segnali di splicing e di poliadenilazione determina l'abbondanza relativa delle diverse specie di mRNA sintetizzate ed è piuttosto costante nel corso del ciclo; la principale differenza sta nell'utilizzo preferenziale del pAp e un minore processamento per splicing nelle prime fasi rispetto ad uno splicing più intenso assieme ad un bilanciamento nell'utilizzo di pAp/pAd nella fase tardiva, differenza probabilmente correlata all'inizio della replicazione del genoma [Guan et al., 2008].

Proteine virali

Proteine non-strutturali

La proteina non-strutturale del B19 (NS) è codificata dalla sequenza compresa fra i nt 435-2448 ed è trascritta da un mRNA di 2.3 kb; la proteina è composta da 671 aminoacidi. In colture di cellule di midollo infettate con B19, mediante immunoprecipitazione sono state identificate una proteina di 77 kDa e due forme minori di 52 kDa e 34 kDa, probabilmente prodotti di degradazione proteolitica. In immunoblotting questa proteina è stata rintracciata esclusivamente nella frazione nucleare, essendo invece assente nel citoplasma, nel sovrantante della coltura e nei virioni purificati [Ozawa, Young, 1987]. La proteina NS è prodotta nella fase precoce dell'infezione ma la sua espressione è rilevabile durante l'intero ciclo replicativo del virus.

Il gene per la proteina non-strutturale è moderatamente conservato nei parvovirus. Come per le proteine non-strutturali di altri parvovirus e dei poliomavirus, l'NS del B19 presenta un dominio elicastico (dominio SF3) associato a un dominio di legame dell'origine di replicazione: la proteina lega l'origine di replicazione dove "apre" il DNA che diventa così accessibile da parte degli enzimi coinvolti nella replicazione. La struttura del dominio SF3 è stata caratterizzata per altri virus ed è costituita da un foglietto con cinque filamenti beta affiancato da alfa eliche.

Studi di predizione funzionale e strutturale suggeriscono che oltre al dominio elicastico e un sito di legame all'origine di replicazione la proteina contenga un dominio nucleasico e uno transattivante,

rispettivamente coinvolti nella risoluzione degli intermedi replicativi e nella regolazione del suo stesso promotore [Doerig et al., 1990]. I meccanismi d'azione della proteina non strutturale sono svariati e sono ancora oggi oggetto di studio.

È stato osservato un effetto transattivante eterologo di NS su geni coinvolti nella risposta infiammatoria con la produzione ad esempio della citochina IL-6 mediante un meccanismo mediato da NF-κB in cellule K562 o con la produzione di TNF-α mediata dai motivi AP1 e AP2 presenti sul suo promotore in cellule U937 [Moffat et al., 1996; Fu et al., 2002].

È stato osservato che l'NS interagisce con promotori cellulari esercitando un effetto citotossico [Ozawa et al., 1988]. Da studi di mutagenesi è stato dimostrato che il dominio di legame per i nucleosidi trifosfato è critico per tale azione citotossica [Momoeda et al., 1994].

Nei precursori eritroidi CD36 è stato visto che il virus o la sola espressione della proteina NS possono indurre apoptosi mediata dalle caspasi 3, 6 e 8 e in parallelo l'accumulo delle cellule in fase G2. È inoltre stata osservata una sensibilizzazione delle cellule all'apoptosi indotta da TNF α in risposta all'espressione di NS, a suggerire una correlazione fra i due pathway [Sol et al., 1999]. Tali risultati sono stati confermati da studi sulle cellule UT7EpoS1 [Moffat et al., 1998].

Un'importante caratteristica che contraddistingue il B19 dagli altri parvovirus è la produzione di abbondanti RNA di piccole dimensioni [Ozawa et al., 1987; Beard et al., 1989] codificanti per le proteine non strutturali 11 kDa e 7,5 kDa, le cui ORFs si sovrappongono al 3' con le ORFs relative alla proteina VP ed NS rispettivamente. Tali proteine sono state localizzate sia nel nucleo che nel citoplasma di cellule infettate da B19. Inoltre è stata osservata una piccola ORF centrale all'interno della regione VP1u codificante per la proteina 9,5 kDa [Brown, 2006].

La 11 kDa è quella meglio caratterizzata delle piccole proteine. Il corrispondente mRNA clivato a livello del sito pAd e sottoposto allo splicing di due introni dà vita a una famiglia di proteine (85-94 aa), per la presenza di codoni di inizio multipli.

Diversi studi hanno messo in evidenza l'importanza di tale proteina nella replicazione e nell'infettività virale: la trasfezione di cellule UT7/Epo-S1 con plasmidi ricombinanti privi della sequenza codificante per la proteina 11 kDa ha messo in luce la sua importanza nell'efficace produzione delle proteine capsidiche e di particelle virali infettive [Zhi et al., 2006]. La proteina può inoltre interagire con i domini citoplasmatici di alcuni recettori interferendo con i meccanismi cellulari di trasduzione del segnale; ciò trova conferma nel fatto che la sequenza amminoacidica della 11 kDa presenta tre siti di legame dell'SH3 che ne permettono l'interazione con alcuni fattori cellulari, come ad esempio Grb2 e diverse chinasi [Fan et al., 2001]. Probabilmente l'11 kDa agisce alterando l'ambiente cellulare a vantaggio del virus e del completamento del suo ciclo replicativo È

stato infine osservato che la proteina 11 kDa gioca un ruolo chiave nell'induzione di apoptosi mediata dalla caspasi 10 in precursori eritroidi infettati dal B19 [Chen et al., 2010].

La 9 kDa (81 aa) non è stata ad ora rintracciata nelle cellule infette. La proteina sarebbe codificata a partire da un mRNA clivato a livello del sito pAp2 e sottoposto allo splicing di un solo introne. Dall'espressione in un sistema eterologo è stato osservato un suo possibile ruolo nella regolazione e transattivazione del promotore P6 [Dong et al., 2012].

La proteina 7.5 kDa (74 aa) è sintetizzata a partire da un messaggero clivato a livello del sito pAp e sottoposto alla rimozione del primo introne. Ad oggi non è ancora stata caratterizzata dal punto di vista funzionale.

Proteine capsidiche

Le proteine strutturali VP1 e VP2 sono codificate dalla sequenza compresa fra i nt 2444-4786 e 3125-4786 rispettivamente e sono trascritte dai messaggeri di 3.1 e 2.2 kb. Le due proteine sono codificate in maniera sovrapposta nella metà destra del genoma: la proteina VP1 è costituita da 781 aminoacidi, di cui i 554 aminoacidi terminali sono comuni alla proteina VP2, mentre i primi 227 sono codificati dalla regione sinistra della sequenza, definita come VP1 unica (VP1u). La regione comune VP1/VP2 è costituita da 8 filamenti beta disposti in due foglietti che formano un motivo "jolly-roll" e l'interazione fra i domini di questo motivo è critica per la formazione del capsido. Le proteine capsidiche sono state analizzate mediante elettroforesi, immunoprecipitazione ed immunoblotting in colture di cellule di midollo infette [Ozawa, Young, 1987]. Le proteine VP1 e VP2 sono state identificate come proteine da 84 kDa e 58 kDa rispettivamente. La proteina VP2 è maggiormente rappresentata, costituendo circa il 95% delle proteine capsidiche e fino al 5% delle proteine cellulari totali.

L'espressione delle proteine capsidiche e il loro accumulo avviene durante l'intero ciclo replicativo virale. La differenza nell'abbondanza delle proteine capsidiche dipende da una regolazione a livello postrascrizionale. La presenza nel messaggero della VP1 di multipli codoni di inizio fuori modulo a monte del codone effettivo di inizio riduce l'efficienza della sintesi proteica. Nel messaggero della VP2 queste sequenze sono eliminate dai processi di splicing, cosicché l'efficienza di sintesi proteica torna ad essere massimale [Ozawa et al., 1988]. Inoltre nel regolare la sintesi delle proteine capsidiche potrebbe avere un ruolo anche la regione 3' UTR dei rispettivi mRNA. In alcuni sistemi cellulari come le UT7Epo, la produzione delle VP non è efficiente ed è probabilmente limitata dalla regione 3' UTR dei corrispondenti mRNA che inibisce il caricamento sui ribosomi [Pallier et al., 1997]. Uno studio basato sulla ottimizzazione dei codoni, con sostituzione di alcuni codoni della

regione 3' UTR con altri codoni più comunemente utilizzati dalla cellula, ha permesso di aumentare la produzione di proteine capsidiche [Zhi et al., 2010], tuttavia si ipotizza un possibile ruolo di microRNA cellulari nel limitare la produzione delle proteine capsidiche agendo sugli mRNA virali [Berillo et al., 2012].

La VP2 sembra mediare il legame al recettore [Brown et al., 1993]. Nelle cellule infette entrambe le proteine sono localizzate sia nel citoplasma che nel nucleo, dove si ipotizza siano trasportate un segnale non convenzionale di localizzazione nucleare presente all'estremità C-terminale dalla VP1\VP2 [Pillet et al., 2003].

La regione unica della VP1 contiene un dominio conservato di attività fosfolipasica (PLA2), identificato anche in altri membri della famiglia Parvoviridae [Zadori et al., 2001]. Questo dominio sembra essere coinvolto nel rilascio e trasferimento del genoma virale dalla vescicola endocitica al nucleo [Suikkanen et al., 2003; Zadori et al., 2001].

Entrambe le proteine capsidiche contengono inoltre epitopi neutralizzanti [Kajigaya et al., 1991; Sato et al., 1991].

Fasi finali

Le ultime fasi del ciclo virale infettivo sono poco caratterizzate. Mediante un segnale non-convenzionale di localizzazione nucleare presente all'estremità C-terminale, le proteine VP vengono trasportate nel nucleo dove possono incorporare il genoma virale e assemblarsi in capsidi, che sono poi trasportati nel citoplasma. Queste fasi terminali del ciclo replicativo sono probabilmente rigidamente regolate e possono richiedere funzioni di supporto, come ad esempio quella ipotizzata per la proteina 11 kDa, che sembrerebbe essere critica per l'efficace produzione delle proteine capsidiche e di particelle virali infettive. La produzione di proteine VP sembra essere critica e non efficiente in alcuni sistemi cellulari, quindi un livello di restrizione per la replicazione virale può essere legato all'efficienza del processo di impacchettamento, maturazione e di uscita dei virioni dalla cellula.

Sistemi cellulari non permissivi

Il B19 infetta le cellule eritroidi ma nel tempo si sono accumulate evidenze circa la presenza del virus in linee non eritroidi nel corso dell'infezione naturale. I meccanismi tuttavia non sono ancora del tutto chiari e possono fornire importanti informazioni circa i problemi clinici associati all'infezione da B19.

La sindrome emofagocitica e la linfoadenite necrotizzante in cui le citochine proinfiammatorie come TNF α prodotte dai fagociti sono reponsabili della patologia si accompagnano talvolta all'infezione da B19 [Johnson et al., 2003; Larroche et al., 2002]. Lo studio dell'infezione in cellule con funzione fagocitica può fornire importanti informazioni. A seguito dell'infezione nella linea cellulare monocitica U937, modello sperimentale che riproduce l'infezione delle cellule APC, la replicazione virale è modesta così come la trascrizione dell'NS, mentre i livelli di mRNA delle VP non sono rilevabili, si tratta dunque di un'infezione abortiva. Allo stesso tempo è stato visto che i livelli di DNA e dell'mRNA dell'NS aumentano in presenza di IgG anti-B19, mostrando un effetto di rafforzamento anticorpo-dipendente. L'aggiunta di anticorpi inoltre causa l'aumento della produzione di TNF- α e quindi una rilevabile risposta proinfiammatoria [Munakata et al., 2006].

Al fine di determinare quali tipi cellulari possono essere coinvolti oltre alle cellule eritroidi nella eziologia di patologie dei tessuti connettivi associate all'infezione di B19 sono state utilizzate colture primarie di fibroblasti umani (HF) e cellule endoteliali (HUVEC). Queste cellule possono essere infettate, ma si osservano solo bassi livelli di mRNA di NS e VP e un aumento non significativo dei livelli di DNA virale. Le cellule HF e HUVEC potrebbero essere non permissive per la replicazione del virus B19 o alternativamente poche cellule probabilmente vengono infettate e la stimolazione con diversi fattori di crescita risulta dunque necessaria per un'infezione produttiva [Zakrewska et al., 2005].

Il meccanismo patogenetico in base al quale il B19 contribuisce alla cardiomiopatia infiammatoria è complesso ed è stato investigato saggiando gli effetti della proteina NS sulla linea cellulare endoteliale HMEC-1. Queste cellule a seguito dell'infezione o della sovraespressione dell'NS mostrano un'attivazione del pathway STAT3/PIAS3 con una conseguente sottoregolazione di geni associati alla risposta contro i virus. L'NS1 può così contribuire all'evasione della risposta immunitaria da parte del virus e allo stabilirsi di un'infezione persistente in cellule endoteliali [Duechting et al., 2008].

Alla luce della presenza di B19 in biopsie del miocardio di pazienti con miocarditi croniche e cardiomiopatie è stata valutata la possibile attivazione del B19 nelle cellule endoteliali mediante coinfezione con altri virus. La coinfezione con l'adenovirus ha portato almeno in parte a un superamento del blocco dell'espressione genica del B19 in queste cellule [Pozzuto et al., 2011]. Nel complesso, questi studi suggeriscono la rilevanza delle cellule endoteliali che possono costituire una diffusa popolazione di cellule bersaglio e un serbatoio per il virus.

Il DNA di B19 può essere rilevato nelle cellule sinoviali, ma i primi studi hanno indicato che si tratta di cellule non permissive alla replicazione del virus [Miki et al., 2002]. In studi successivi,

sono stati trovati il genoma virale e l'espressione delle VP nella sinovia con lesioni attive di pazienti con artrite reumatoide. In questo caso, i macrofagi, le cellule dendritiche follicolari, le cellule T e le cellule B sono state identificate come cellule bersaglio, ma non le cellule sinoviali. Cellule B19-negative come cellule del midollo osseo, delle tonsille e le cellule U937 si è visto che producono VP1 e maggiori livelli di IL-6 e TNF alpha quando coltivate insieme a cellule della sinovia RA. Questi dati suggeriscono un ruolo diretto del B19 nell'iniziazione e nella perpetuazione di sinovite associata ad artrite reumatoide, che porta a lesioni articolari [Takahashi et al.,1998].

Anche se i sinoviociti non sono permissivi per la replicazione virale, l'esposizione al B19V induce un fenotipo invasivo [Ray et al., 2001] probabilmente indotto dall'interazione diretta con la VP1, in particolar modo con il dominio PLA(2) [Lu et al., 2006]. L'incubazione di sinoviociti fibroblasto-simili (HFLSs) con la porzione VP1u, induce un aumento della produzione di prostaglandina E(2) e della ciclossigenasi Cox2. Quindi, anche in assenza di una infezione produttiva di sinoviociti, l'interazione con i capsidi di B19 contribuisce all'attivazione dei tali cellule e patogenesi inducendo una risposta infiammatoria nel compartimento sinoviale.

Persistenza virale

In vitro possono essere stabilite colture in grado di sostenere l'infezione di B19 per un periodo limitato di tempo come il sistema semipermissivo rappresentato dalle cellule UT7 o anche sistemi restrittivi come le cellule U937 [Shimomura et al. 2002; Bonvicini et al, 2012]. Questi sistemi possono rispecchiare ciò che accade in vivo, è stata infatti rilevata la presenza del DNA virale in diversi tessuti.

Il midollo osseo è l'organo bersaglio principale, tuttavia il DNA virale è stato riportato in vari tessuti come in quello linfoide, ad esempio milza, linfonodi e tonsille [Manning et al., 2007], nel fegato [Eis-Hubinger et al., 2001] e nel cuore [Modrow et al., 2006], nei tessuti sinoviali [Soderlund et al., 1997] e nella pelle [Bonvicini et al., 2010]. Infine, il virus è stato trovato anche nel cervello [Manning et al., 2007] e nei tessuti testicolari [Tolfvenstam et al., 2002]. Quindi, l'immagine iniziale di un virus capace di infezioni acute e rapidamente eliminato dalla risposta immunitaria ha lasciato il posto all'immagine di un virus con un ciclo vitale più complesso in grado di stabilire una interazione a lungo termine con le cellule ospiti [Norja et al., 2006].

Non vi sono ad oggi informazioni univoche circa la configurazione del genoma virale nei tessuti (forma episomiale piuttosto che integrata nel genoma cellulare; forma lineare o circolare) e tantomeno circa la sua capacità di formare strutture cromatiniche. Non è inoltre chiaro se il DNA

nei tessuti sia presente in forma integra [Hokynar et al., 2000] dal momento che la sua rilevazione avviene mediante PCR con amplificazione di segmenti distinti del genoma, che potrebbe quindi persistere in forma frammentata e non funzionale.

All'interno dei tessuti, si ipotizza il genoma virale sia presente silente [Corcioli et al., 2008] ed è plausibile che stabilisca un'infezione latente, con possibilità di riattivazione. In particolare si ipotizza un livello di regolazione epigenetico che potrebbe essere coinvolto nel silenziamento dell'espressione virale [Bonvicini et al., 2012], eventualmente consentendo la riattivazione in un secondo momento.

La deregolazione del ciclo cellulare e la risposta al danno al DNA

La definizione degli effetti che il virus può esercitare su diversi tipi cellulari, in funzione al suo ciclo replicativo, rappresenta un importante oggetto di studio.

Nelle cellule UT7/EpoS1, l'infezione da parte del B19 induce un arresto del ciclo cellulare in fase G(2)/M. In queste cellule si osserva un accumulo di ciclina A, ciclina B1 e cdc2 fosforilato e un aumento nell'attività chinasi del complesso cdc2-ciclina B1, simile a quello osservato a seguito del trattamento con inibitori mitotici; tuttavia la degradazione della lamina nucleare e la fosforilazione degli istoni H3 e H1 non sono state osservate, suggerendo che le cellule infette non entrano in fase M. La ciclina B1 si accumula nel citoplasma e la mancata importazione nucleare è inibita dal virus, con conseguente arresto del ciclo cellulare in fase G(2). Il controllo del ciclo è strettamente collegato all'attivazione del pathway apoptotico, dunque l'arresto indotto dal virus può essere l'evento critico alla base del danneggiamento delle cellule progenitrici eritroidi osservato nei pazienti con infezione da B19 [Morita et al., 2001].

In presenza di inibitori mitotici, il virus induce un arresto sia in fase G(2) che in G(1). Quest'ultimo viene indotto da NS che induce l'espressione di p21/WAF1, un'inibitore di chinasi ciclina-dipendente che a sua volta induce un arresto in G(1) p53-indipendente, mediato invece dall'interazione con il fattore di trascrizione Sp1 [Nakashima et al., 2004]. Anche in questo caso l'arresto in G(1) può essere un prerequisito per il danno apoptotico delle cellule progenitrici eritroidi al momento dell'infezione del B19 [Morita et al., 2003].

Anche nelle cellule EPC CD36 sono stati studiati gli effetti del virus sulla regolazione del ciclo cellulare e i fattori coinvolti sono stati ampiamente studiati mediante microarray. È stato dimostrato che il B19 agisce sui fattori di trascrizione E2F inducendo una riduzione dei fattori attivanti (E2F1-E2F3a) e un aumento dei fattori repressivi (E2F4-E2F8). In particolare NS1 interagisce con E2F4-

E2F5, aumentandone l'importazione nucleare e inducendo così un'arresto in G(2). L'arresto porta a un blocco del differenziamento cellulare e ad un aumento della replicazione e trascrizione virale mediata dai fattori di trascrizione della fase G(2) e/o da proteine di riparazione del DNA. Questo può portare all'attivazione del pathway di p53 e all'aumento di E2F7 e E2F8, come parte di una risposta al danno del DNA, che può contribuire a sua volta a bloccare la progressione del ciclo cellulare [Wan et al., 2010].

In alcuni studi è stato visto che la risposta al danno (DDR) è indotta dalla replicazione del genoma virale a doppio filamento ed è invece indipendente dall'espressione delle proteine virali. Il suo coinvolgimento nella regolazione della replicazione virale è stato esaminato in cellule EPC. L'infezione ha indotto una vasta gamma di risposte al danno al DNA mediate dalla fosforilazione delle chinasi a monte di ciascuno dei tre pathways di riparazione: DNA-PKcs, ATM (attivato da rotture a doppio filamento) e ATR (attivato da rotture a singolo filamento). ATM, ATR, DNA-PKcs e i rispettivi substrati a valle si è visto essere localizzati all'interno dei centri di replicazione virale. Il pathway di DNA-PKcs e in particolar modo il pathway ATR-Chk1 sono risultati necessari per la replicazione di B19 [Luo et al., 2011]. La DDR di per sé non determina un arresto del ciclo cellulare nella fase G(2)/M, che è invece, è indotto da NS tramite il suo dominio putativo di transattivazione con un meccanismo p53-indipendente [Lou et al., 2012].

Apoptosi e autofagia

I meccanismi molecolari che portano ad apoptosi durante l'infezione di B19 dei progenitori eritroidi sono stati studiati mediante espressione inducibile di NS in cellule UT7/Epo. È stato visto che le cellule a seguito di infezione o induzione di NS mostravano alterazioni morfologiche tipiche dell'apoptosi come la frammentazione della cromatina [Yaegashi et al., 1999]. L'apoptosi indotta veniva inibita dall'utilizzo di inibitori delle caspasi 3, 6 e 8, la cui attività era indotta dall'NS [Sol et al., 1999]. L'interazione Fas-FasL non è risultata coinvolta nell'apoptosi indotta da NS o dal B19 nelle cellule eritroidi, mentre queste cellule risultano sensibilizzate all'apoptosi indotta dal fattore di necrosi tumorale alfa (TNF- α), suggerendo così un collegamento fra le due vie apoptotiche attivate dal TNF- α e NS.

In linee cellulari non permissive derivate dal fegato, sia l'infezione di B19 sia l'espressione di NS hanno evidenziato l'attivazione delle caspasi 3 e 9 [Poole et al., 2006] e il trattamento con inibitori di tali caspasi significativamente inibiva l'apoptosi. La neutralizzazione del TNF- α o del ligando Fas non ha avuto invece alcun effetto sull'apoptosi indotta, analogamente a quanto osservato per la

linea COS-7.

Studi di mutagenesi nel dominio di legame dei nucleosidi trifosfato (NTP) dell'NS hanno portato a concludere che tale motivo è critico per l'induzione dell'apoptosi mediata da NS, sia in linee cellulari semipermissive come le UT7EpoS1 che non permissive come le HepG2 [Moffatt et al., 1998; Poole et al., 2004].

Da uno studio sulle cellule progenitrici eritroidi CD36 [Wong et al., 2008] è stato ipotizzato il ruolo della proteina 11 kDa di B19 nell'indurre l'apoptosi durante l'infezione, attraverso l'attivazione della caspasi 10 [Chen et al., 2010]. Il meccanismo alla base dell'induzione dell'apoptosi da parte della 11-kDa richiede tuttavia ulteriori indagini.

Inoltre, in cellule UT7/EpoS1 infettate è stato osservato un fenomeno di autofagia mitocondriale: un aumento significativo del rapporto fra le proteine LC3-II/LC3-I nelle cellule infette e l'analisi in microscopia confocale suggeriscono la formazione di un autofagosoma intracellulare la cui inibizione facilita notevolmente la morte cellulare B19 mediata. Dunque a seguito dell'infezione le cellule infettate possono migliorare la propria sopravvivenza mediante meccanismi d'autofagia [Nakashima et al., 2006].

Epidemiologia

Prevalenza

L'infezione da parvovirus B19 è comune ed è presente in tutto il mondo con alcune differenze a seconda delle regioni.

L'infezione è comunemente acquisita fra i 4 e i 10 anni di età; la prevalenza di anticorpi contro il parvovirus B19 aumenta con l'età, dal 2 al 10% nei bambini di età inferiore ai 5 anni, al 40 al 60% negli adulti di età superiore ai 20 anni e fino all'85% nei soggetti anziani [Servant-Delmas et al., 2010]. Il modello in base al quale gli anticorpi in risposta al virus sono mantenuti per tutta la vita garantendo una immunità protettiva è stato recentemente rivisto alla luce di un pattern più complesso della risposta sierologica giungendo alla conclusione che l'immunità protettiva può diminuire permettendo così una reinfezione [Goeyvaerts et al., 2011].

Studi effettuati in diversi paesi mostrano lo stesso tipo di epidemiologia, con una prevalenza leggermente superiore in paesi a clima tropicale rispetto ai paesi con clima temperato. Valori di sieroprevalenza estremamente bassi sono esclusivi di gruppi tribali isolati dell'Africa o Sudamerica; tuttavia periodiche epidemie in queste aree possono alzare notevolmente le percentuali [Nascimento

et al., 1990; Schwarz et al., 1989; de Freitas et al., 1990]. Gli studi epidemiologici considerano i tre genotipi un unico sierotipo e non ne distinguono pertanto la diversa distribuzione; in Africa Occidentale tuttavia la difficoltà nel discriminare fra popolazione reattiva e non reattiva è stata attribuita alla prevalenza del genotipo 3 [Parsyan et al., 2006].

L'infezione nei paesi a clima temperato è più comune nel tardo inverno, primavera o inizio estate. E sono presenti cicli annuali, con picchi epidemici ogni 4-5 anni e un corrispondente aumento nella incidenza delle principali manifestazioni cliniche del B19, come eritema infettivo o crisi aplastiche.

Trasmissione

Il DNA di B19 è stato evidenziato nelle secrezioni respiratorie e in particolar modo nella saliva dei pazienti al momento della viremia, suggerendo che il virus è trasmesso attraverso la via respiratoria [Chorba et al., 1986]. È stato sperimentalmente trasmesso mediante inoculo nel nasofaringe, ma non è stato identificato alcun sito replicativo a livello di tale tratto. Inoltre la presenza del virus in feci o urina non è stata dimostrata.

Il virus si trasmette prontamente tramite contatto ravvicinato. Il tasso di sieroconversione in episodi infettivi epidemici può essere intorno al 50%. La trasmissione è più frequente in ambiente scolastico o familiare [Gillespie et al., 1990], anche se non è da escludere la trasmissione in ambiente nosocomiale [Bell et al., 1989].

Nelle fasi viremiche il virus è presente in circolo ad alto titolo e pertanto l'infezione potrebbe essere trasmessa con il sangue, attraverso trasfusione e mediante emoderivati [Blumel et al., 2010]. Essendo privo di envelope lipidico, il B19 è resistente ai trattamenti chimici (con solventi/detergenti) e fisici (80°C per 72 ore) a cui sono di norma sottoposti i pool di plasma destinati alla produzione di emoderivati. Molti studi pertanto riportano casi di trasmissione virale mediata da fattori della coagulazione (VIII e IX) [Azzi et al., 1999], da IVIG, IMIG, albumina e altri prodotti ottenuti da un largo numero di donatori [Robertson, Erdman, 2000; Brown et al., 2001; Blumel et al., 2010]. La trasmissione del virus può inoltre avvenire per via transplacentare e pertanto il B19 dovrebbe essere sempre incluso nella valutazione del rischio di infezione fetale. La valutazione complessiva richiede di tenere conto di diversi aspetti quali il rischio di acquisizione dell'infezione da parte della madre, la percentuale di rischio di trasmissione materno-fetale (25-50%) e del rischio di morte fetale (10%) [Enders et al., 2004; Mossong et al., 2008].

Patogenesi e Manifestazioni Cliniche

Infezione sperimentale

Due studi effettuati mediante infezione di soggetti volontari hanno permesso inizialmente di definire il corso dell'infezione [Anderson et al., 1985; Potter et al., 1987]. In entrambi gli esperimenti, i volontari (9 e 3 rispettivamente) sono stati infettati con una inoculo intranasale di 10^8 particelle virali, seguiti poi giornalmente e sottoposti a studi virologici, ematologici e chimico-clinici. Successivamente si è poi visto che il profilo patogenetico del virus è più complesso e basato su una più articolata interazione fra il virus e l'ospite.

Dopo l'ingresso attraverso le vie respiratorie il virus entra in circolo. È stata evidenziata una persistenza del virus a livello delle tonsille ma non esiste ad oggi evidenza che queste possano rappresentare un punto di accesso per il virus [Manning et al., 2007].

Durante la fase iniziale, asintomatica o associata a sintomi generici, come malessere e febbre legati alla produzione di citochine, il virus raggiunge l'organo target, il midollo osseo ed esercita il suo effetto citopatico sui precursori eritroidi. Il virus non infetta i precursori più indifferenziati, il che garantisce un effetto transitorio sull'eritropoiesi, ma infetta le CD36 determinando il blocco del differenziamento e del ciclo cellulare e l'induzione dell'apoptosi. Inoltre le cellule megacarioblastoidi suscettibili all'infezione non sono permissive alla replicazione del B19, ma subiscono gli effetti citopatici del virus [Srivastava et al., 1990]. In questa fase il midollo osseo mostra segni caratteristici quali un'aplasia eritroide e la presenza di eritroblasti giganti. Intorno al giorno 10 dell'infezione sperimentale, all'esame morfologico il midollo osseo mostra una quasi totale deplezione dei precursori eritroidi a qualsiasi stadio di differenziamento; le BFU-E e CFU-E nel sangue periferico sono ridotte numericamente; il compartimento mieloide appare invece normale, ma viene evidenziata una riduzione di CFU-GM nel sangue periferico. Nella settimana successiva si verifica una caduta nella concentrazione emoglobinica, con modesta linfopenia, neutropenia e piastrinopenia.

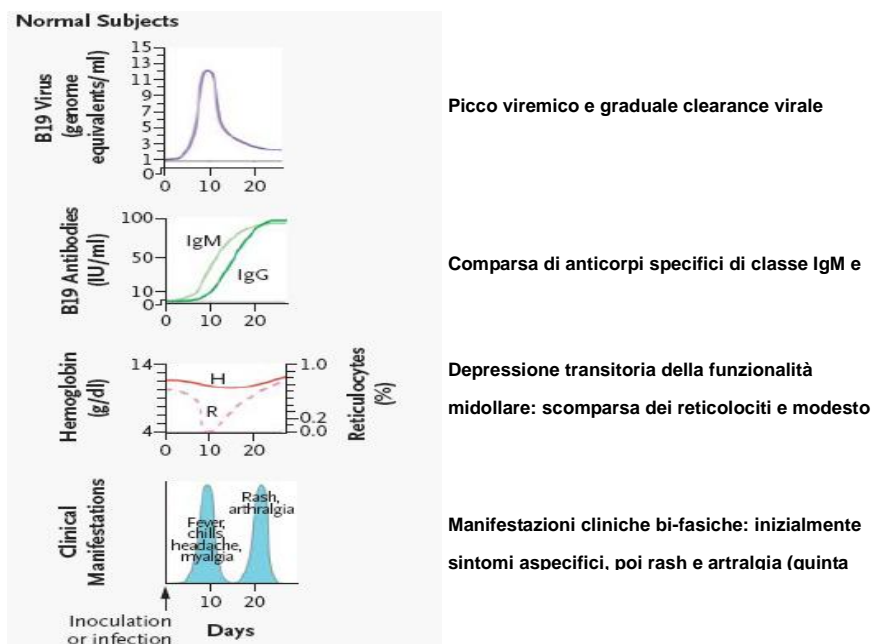
L'infezione produttiva dei precursori eritroidi del midollo permette il rilascio di grandi quantità di virus in circolo portando così a un picco viremico e alla distribuzione sistemica del virus, alla base delle svariate manifestazioni cliniche tardive. Il picco viremico si verifica intorno al giorno 9 con alti livelli di virus circolante fino a 10^{12} particelle/ml.

Il virus è rintracciato nelle secrezioni nasofaringee, esclusivamente in corrispondenza del picco viremico, mentre non è evidenziato nelle feci o nell'urina. La viremia si risolve in corrispondenza dell'insorgere della risposta immunitaria.

In corrispondenza della fase sistemica sembrano assumere un importante ruolo le cellule endoteliali che permettono l'ampia distribuzione del virus ed essendo non permissive rappresentano in linea di massima un sito di persistenza virale [Pozzuto et al., 2011]

In soggetti normali, l'infezione è limitata a un breve periodo di tempo ed è controllata dal sistema immunitario. La produzione di anticorpi neutralizzanti permette la progressiva *clearance* virale, che richiede circa 3-4 mesi a seguito dei quali bassi livelli di virus possono essere rintracciati anche per lungo tempo [Musiani et al., 1995; Lindblom et al., 2005; Lefrere et al., 2005]. Nell'infezione sperimentale è stato osservato, intorno al giorno 16, un picco nella produzione di IgM e la comparsa della risposta immunitaria IgG, accompagnati da sintomi come prurito seguito dall'insorgenza di un'eruzione cutanea maculo-papulare. Il rash si estende sugli arti, perdurando 2-4 giorni, ed è accompagnato da artralgia e lieve artrite per 4-6 giorni.

Alcune manifestazioni cliniche fra cui l'eritema sono considerate il risultato della formazione e deposito di immunocomplessi con successivo innesco di una risposta infiammatoria, il che mostra il contributo del sistema immunitario alla definizione del quadro patologico associato al virus.



Nel definire il processo patogenetico del virus è necessario prendere in considerazione diversi fattori come l'effetto citotossico e pro-apoptotico delle proteine virali, la stimolazione della risposta proinfiammatoria da parte di NS o del dominio PLA(2) e il sistema immunitario che può essere responsabile di meccanismi immunopatologici o autoimmunitari.

Infezione asintomatica

L'infezione da parvovirus B19 può decorrere in forma completamente asintomatica. In casi documentati in corso di epidemia, il B19 causò un'infezione asintomatica nel 25-32% dei contatti domestici di pazienti con infezione in atto [Wolf et al., 1989].

Eritema infettivo

L'eritema infettivo (quinta malattia) è la più comune manifestazione dell'infezione da B19. Mentre la quinta malattia è una malattia descritta già all'inizio del secolo, l'identificazione del B19 come agente eziologico è avvenuta solo nel 1983 a Londra, dopo che fu scoperta la presenza di anticorpi IgM in 31 bambini affetti da eritema [Anderson et al., 1983; Anderson et al., 1984].

L'infezione è caratterizzata da sintomi prodromici non-specifici, cui possono seguire febbre, mal di testa, o lievi sintomi intestinali. Da due a cinque giorni dopo appare la caratteristica eruzione cutanea a "guance schiaffeggiate", con rossore sulle guance e pallore periorale. Da uno a quattro giorni dopo compare il secondo stadio, con eruzione eritematosa maculopapulare su tronco e arti. Scomparendo, questa eruzione assume un tipico aspetto reticolato. Il rash può essere transiente, oppure ricorrere per settimane; l'aspetto può variare considerevolmente in intensità. Spesso sono presenti fastidiosi pruriti, specialmente alla pianta del piede.

Sindrome poliartropatica

Nel bambino l'infezione da B19 è di solito lieve e di breve durata e l'incidenza di artropatie è piuttosto limitata (<10%); negli adulti, specialmente in donne, può esserci artropatia in circa il 50% dei pazienti [Torok, 1992]. Le articolazioni possono essere dolenti e spesso mostrano ingrossamento e rigidità. La distribuzione è di solito simmetrica, con coinvolgimento soprattutto delle piccole articolazioni delle mani e del piede. I sintomi perdurano da 1 a 3 settimane, anche se in un 20% delle donne affette possono persistere o ricorrere per più di due mesi (anche fino a due anni). La forma cronica è generalmente autolimitante e non porta a danneggiamento delle articolazioni, tuttavia talvolta presenta criteri diagnostici caratteristici dell'artrite reumatoide con erosione delle articolazioni e produzione del fattore reumatoide [Moore 2000].

Non esiste inoltre correlazione fra alti livelli o persistenza di IgM anti B19 e la durata della sintomatologia.

B19 e artrite reumatoide

La correlazione fra il B19 e artropatie croniche distruttive come l'artrite reumatoide è attualmente oggetto di dibattito. È stata inoltre proposta la partecipazione del virus alla patogenesi di malattie reumatiche come la sindrome da fatica, la fibromialgia, il lupus sistemico eritematoso e la vasculite. Mancano tuttavia evidenze virologiche a supporto di tali ipotesi e i dati epidemiologici a riguardo risultano contrastanti [Kerr, 2000].

I sinoviociti non sono permissivi per il B19, tuttavia rispondono all'infezione acquistando un fenotipo invasivo [Miki et al., 1992; Ray et al., 2001]. Studi recenti hanno dimostrato la persistenza del DNA del B19 nelle membrane sinoviali di pazienti con artriti reumatoidi o artriti non caratterizzate, con evidenze sierologiche di infezione pregressa da parvovirus B19 [Cassinotti et al., 1998; Takahashi et al., 1998]. Tuttavia la sola presenza del DNA di B19 nelle membrane sinoviali non sembra essere una sufficiente evidenza eziologica di artropatia da B19 in quanto il DNA di B19 è stato riscontrato anche in un numero elevato di controlli sani [Soderlund et al., 1997]. La presenza del DNA di B19 è invece collegata all'espressione di proteine virali in cellule dendritiche, macrofagi e cellule linfatiche in tessuti di pazienti con artrite reumatoide ma non nelle cellule sinoviali e questi tipi cellulari potrebbero rappresentare target del virus. Il coinvolgimento dei linfociti inoltre è stato osservato anche nell'analisi di campioni relativi a pazienti con patologie croniche infiammatorie delle articolazioni [Mehraein et al., 2003].

Crisi aplastica

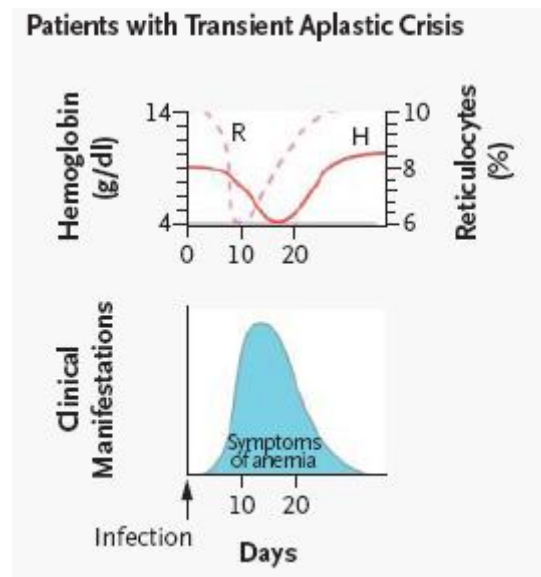
La crisi aplastica transitoria (TAC) è la cessazione improvvisa dell'eritropoiesi: dopo il picco viremico e la produzione di anticorpi specifici (IgM e IgG) si instaura una depressione acuta ma transitoria della funzionalità midollare con scomparsa dei precursori eritroidi e dei reticolociti e calo profondo dell'emoglobina [Saarinen et al., 1986].

La TAC è stata la prima malattia associata all'infezione da B19. I primi casi furono individuati in Inghilterra fra pazienti immigrati dalla Giamaica affetti da anemia falciforme [Pattison et al., 1981] e un'analisi retrospettiva dimostrò che più dell'80% delle crisi aplastiche in corso di anemia falciforme era associata ad infezione recente da parvovirus B19 [Serjeant et al., 1981].

La TAC dovuta al parvovirus B19 è stata descritta in un ampio spettro di disordini emolitici, come sferocitosi ereditaria [Kelleher et al., 1983], enzimopatie eritrocitarie [Duncan et al., 1983], talassemia [Brownell et al., 1986], anemie emolitiche autoimmuni [Smith et al., 1989]. La TAC può insorgere in condizioni di stress eritroide, come emorragie, deficienza di ferro [Lefrere, Bourgeois, ..

1986] o in seguito a trapianti di midollo o rene [Neild et al., 1986]. Episodi di anemia acuta sono stati riscontrati in pazienti normali [Hamon et al., 1988] e una caduta nel numero di reticolociti ed eritrociti è stata descritta dopo l'infezione di volontari, ma in questi casi è presente una sufficiente riserva emopoietica e i sintomi non sono evidenti.

L'infezione da B19 in pazienti ematologicamente normali può essere accompagnata da alterazioni in altre linee emopoietiche: possono essere presenti vari livelli di neutropenia e trombocitopenia [Doran, Teall, 1988]; mentre i casi di pancitopenia transitoria sono meno comuni [Hanada et al., 1988]. Anche se la malattia è normalmente autolimitante, i pazienti in crisi aplastica sono profondamente affetti. I sintomi includono non solo dispnea e stanchezza, ma anche scompenso cardiaco congestizio e necrosi severa del midollo osseo. Non trattata, la malattia può arrivare ad avere un decorso fatale; tipicamente, la crisi aplastica è trattabile mediante trasfusione e grazie allo sviluppo della risposta immunitaria rimane un evento unico nella vita del paziente.



Neutropenia, trombocitopenia e pancitopenia

L'infezione acuta da parvovirus B19 risulta spesso associata a fenomeni midollari di neutropenia e trombocitopenia. Il meccanismo di questi scompensi midollari non è chiaro. In molti casi questi disordini sono transienti e non clinicamente evidenti. Sono stati descritti però casi di porpora idiopatica trombocitopenica e porpora di Schoenlein-Henoch attribuiti ad infezione da B19: uno studio francese riporta che il 5% (3/61) dei pazienti con porpora idiopatica trombocitopenica mostrano segni evidenti di infezione recente da B19 [Lefrère et al., 1989]. Casi di pancitopenia transiente sono riscontrati meno frequentemente. Sono stati attribuiti all'infezione da B19 casi di

neutropenia cronica nei bambini, ma studi sierologici non sono stati in grado di confermare tale associazione [Hartman et al., 1994]. La sindrome emofagocitica, caratterizzata da iperplasi istiocitica, può comparire in caso di numerose infezioni non solo di natura virale ed è stata riscontrata anche in corso di infezione recente e persistente di B19 [Yufu et al., 1997]. L'emofagocitosi è solitamente una patologia benigna autolimitante.

Il ruolo del B19 in caso di eritroblastopenia transitoria dell'infanzia rimane da definire. La malattia colpisce i bambini di età compresa tra i 3 e i 4 anni e si manifesta con anemia, reticolocitopenia e diminuita presenza di precursori eritroidi [Hanada et al., 1989].

Disordine midollare cronico

Sindromi immunodeficitarie congenite

L'aplasia eritrocitaria pura (PRCA) è il risultato di un'infezione persistente da B19 ed è stata riportata in pazienti con sindromi immunodeficitarie congenite di diversa natura.

Il primo caso riportato fu quello di un bambino affetto da sindrome di Nezelof (difetto congenito combinato a cellule B e T), che presentò insorgenza acuta di anemia, reticolocitopenia e neutropenia [Kurtzman et al., 1987]. Alte concentrazioni di virus (10^8 particelle/ml) furono trovate nel siero in corrispondenza dell'insorgere dell'anemia, e si mantennero per 5 mesi. Pronormoblasti giganti, caratteristici dell'infezione da B19, furono identificati nel midollo e il virus fu identificato nelle cellule midollari mediante ibridazione *in situ*. Il paziente fu trattato con trasfusioni e immunoglobuline; la remissione dell'anemia si accompagnò alla scomparsa del virus dal siero, mentre ricadute successive coincisero con episodi viremici.

In un secondo caso, un bambino di 21 mesi con immunodeficienza variabile (CD4 linfopenia con livelli normali di immunoglobuline) si presentò con anemia [Parvovirus infection, leukaemia, and immunodeficiency, 1989]. Il midollo mostrava ipoplasia eritroide con pronormoblasti giganti e il DNA virale poté essere evidenziato nel siero. Il bambino rimase dipendente da trasfusioni per 7 mesi prima della remissione, ma ebbe una ricaduta 2 anni dopo.

In un terzo caso, una bambina di 12 mesi con immunodeficienza combinata grave (SCID) si presentò con anemia dovuta a infezione persistente da B19. Il DNA di B19 era presente nel siero, ma non furono evidenziate IgG; la bambina fu mantenuta sotto trasfusione (senza trattamento con immunoglobuline) fino alla morte avvenuta 3 anni dopo [Gahr et al., 1991].

Un caso di infezione persistente fu documentato in un paziente di 24 anni, da 10 anni con aplasia eritrocitaria pura; il DNA di B19 fu evidenziato mediante ibridazione nel siero e in cellule midollari,

e mediante ibridazione *in situ* in tessuti di milza prelevati tre anni prima. Il fratello gemello sviluppò PRCA contemporaneamente, ma morì per emosiderosi da trasfusione; anche in questo caso il DNA di B19 fu evidenziato mediante ibridazione *in situ* in sezioni di milza conservate. Il paziente fu trattato con immunoglobuline, ottenendo l'eliminazione del virus da midollo e sangue periferico. Anche se non esisteva una storia di aumentata suscettibilità alle infezioni, l'immunodeficienza si manifestava con anergia nella risposta cellulare.

L'infezione da parvovirus B19 può coinvolgere altre linee emopoietiche oltre a quella eritroide, come dimostrato anche in casi di infezione persistente. Un'aplasia granulocitaria ricorrente senza alterazioni evidenti dei precursori eritroidi fu associata a un caso di infezione cronica da B19, documentata dalla presenza di DNA virale nel siero. Anche in questo caso la persistenza virale venne associata ad una ridotta risposta immunitaria cellulo-mediata.

Disordini linfoproliferativi

Infezioni croniche da parvovirus B19 sono state descritte in pazienti immunocompromessi per disordini linfoproliferativi, prevalentemente in bambini affetti da leucemie linfoblastiche [Parvovirus infection, leukaemia, and immunodeficiency, 1989; Kurtzman et al., 1988]. In questi casi si presenta un'anemia persistente, senza i sintomi mediati da immunocomplessi quali eritema o artropatie. Altri componenti cellulari del midollo, quali megacarioblasti o linfoblasti, sono interessati e qualche paziente può essere pancitopenico. Il virus può essere evidenziato nel siero in maniera persistente o ricorrente e l'esame del midollo osseo permette solitamente di riconoscere i pronormoblasti giganti; i livelli di anticorpi specifici anti-B19 sono bassi o nulli. La somministrazione di immunoglobuline può essere benefica, anche se non curativa. La temporanea cessazione della terapia di mantenimento chemioterapica può portare alla risoluzione dell'anemia e in alcuni casi non si ha ricorrenza in corrispondenza della ripresa della terapia, suggerendo che la riduzione dell'immunosoppressione può consentire l'instaurarsi di una efficace risposta immunitaria nei confronti del virus.

Sindrome da immunodeficienza acquisita

La sindrome da immunodeficienza acquisita (AIDS) predispone all'infezione persistente da parvovirus B19. Da un primo rapporto [Frickhofen et al., 1990], in 7 pazienti positivi alla sierologia per HIV e con PRCA fu evidenziata un'infezione persistente da B19; il DNA di B19 fu rivelato nel siero mediante ibridazione per diversi mesi; anticorpi anti-B19 non furono rilevati in alcun paziente.

L'infusione di immunoglobuline portò al miglioramento clinico dell'anemia, accompagnato dalla produzione di anticorpi specifici e dalla comparsa di sintomi da immunocomplessi come il rash eritematoso. In tutti i pazienti il virus rimase comunque evidenziabile nel siero mediante amplificazione in PCR e in tre pazienti vi furono ricadute dell'anemia indotte dal B19, accompagnate da aumentata viremia.

In pazienti con AIDS le anomalie ematologiche sono comuni e la maggior parte dei soggetti presenta anemia, granulocitopenia e talvolta trombocitopenia. Queste alterazioni possono essere dovute a conseguenze immunologiche dell'infezione da HIV con depressione funzionale del midollo osseo oppure all'effetto di infezioni opportunistiche. L'infezione persistente da parvovirus B19 richiede quindi una precisa diagnosi differenziale [Anderson et al., 1985; Musiani et al., 1995].

Pazienti trapiantati

L'infezione cronica da parvovirus B19 è stata descritta in seguito a trattamenti che richiedono forte immunosoppressione, ad esempio dopo il trapianto di cuore, di fegato o dopo trapianto renale [Gallinella et al., 1999; Torok, 1992]. Infezione cronica è stata evidenziata in due casi in seguito a trapianto allogenico di midollo osseo [Weiland et al., 1989]. Nel primo caso si sviluppò pancitopenia 9 mesi dopo il trapianto; il midollo osseo appariva ipocellulare, con presenza di pronormoblasti giganti e fu evidenziata una viremia prolungata per almeno 6 settimane; il paziente morì un mese dopo per insufficienza multipla ed emorragia cerebrale. Nel secondo caso si sviluppò PRCA 1 mese dopo il trapianto e il DNA di B19 fu evidenziato nel siero al momento dell'insorgenza del difetto; in questo caso il paziente guarì spontaneamente. In entrambi i casi non è nota la sorgente dell'infezione.

Altri pazienti immunocompromessi

Anemie prolungate sono state descritte in stati meno severi di compromissione immunitaria (conseguente a trattamento steroideo o chemioterapico); in questi casi si può avere uno sviluppo ritardato della risposta immunitaria, con caratteri atipici di persistenza della risposta IgM o dei sintomi da immunocomplessi [Graeve et al., 1989]. Si tratta probabilmente di pazienti al limite dello spettro di risposta in sistemi immunitari compromessi.

Idrope fetale

Da studi passati è nota la capacità del B19 di attraversare la barriera placentare e infettare il feto. È stato riportato un ampio numero di casi di infezione da parvovirus B19 in gravidanze concluse con esito avverso, aborto o idrope fetale [Anand et al., 1987; Woernle, et al., 1987]. I feti mostravano una reazione leucoeritroblastica nel fegato e presentavano grandi cellule chiare con corpi di inclusione eosinofili e marginazione della cromatina nucleare, caratteristiche che permisero una diagnosi provvisoria di infezione da B19. Da allora si è posta l'attenzione alla trasmissione materno-fetale considerando diversi aspetti quali il rischio di infezione intrauterino nelle donne incinta, e le possibili conseguenze.

È stato osservato che i trofoblasti placentari posseggono il recettore virale globoside e, seppur non permissivi alla replicazione virale, permettono la transitosi e il passaggio del virus al circolo ematico fetale. L'espressione del recettore varia nel corso della gestazione ed è massima nel primo semestre per poi significativamente ridursi fino a quasi scomparire nel terzo. L'effetto pro-infiammatorio e pro-apoptotico sui trofoblasti insieme all'infezione produttiva delle cellule endoteliali della placenta partecipano probabilmente al danno fetale [Jordan et al., 2001; Jordan et al., 2002; Pasquinelli et al., 2009]. Il virus a questo punto entra nel circolo e infetta i progenitori eritroidi ed è rilevato anche nei vasi sanguigni di diversi organi e nel liquido amniotico [Clwley et al., 1987; Zerbini et al., 1996; Bonvicini et al., 2009]. L'infezione dei progenitori eritroidi determina un blocco severo dell'eritropoiesi, data l'estensione del compartimento eritropoietico fetale e la ridotta risposta immunitaria, e porta ad anemia, ipossia tissutale, idrope non immune e morte fetale [de Jong et al., 2011; Lamont et al., 2011]. Inoltre i miociti fetali presentano il recettore virale e sono suscettibili all'infezione; pertanto la miocardite indotta dal virus può contribuire al danno fetale [Porter et al., 1988; O'Malley et al., 2003].

Gli effetti della trasmissione materno-fetale sono influenzati da diversi fattori: lo stato immunitario della madre; lo stadio gestazionale e di sviluppo dell'embrione. Le infezioni nella prima fase della gestazione sono spesso associate a morte fetale; nella parte centrale si manifesta come idrope fetale spesso autolimitante; infine la perdita e i danni al feto nel terzo trimestre sono più rari poiché il feto mostra maggiore resistenza ed è capace di sviluppare un'efficace risposta immunitaria.

Alcuni studi riportano associazioni tra infezione intrauterina e malformazioni congenite, come ad esempio anomalie agli occhi e al sistema nervoso, oltre che disordini midollari [Brown et al., 1994; Bonvicini et al., 2011; Puccetti et al., 2012].

Disordini neurologici

Prima della messa a punto di specifiche tecniche virologiche, sono stati riportati casi di sintomi neurologici associati a eritema infettivo. Da allora è stata rilevata la presenza di anticorpi specifici per il B19 e il DNA virale nel sangue e nel liquido cefalorachidiano in casi di encefalopatia e di meningite asettica [Heegaard et al., 1995; Zerbini et al., 1992]. Inoltre sono state osservate neuropatia e amiotrofia neuralgica dopo infezione col virus. Il meccanismo che porta alla comparsa di tali sintomi neurologici è sconosciuto, anche se la concomitante presenza di rash o artralgia, fa supporre un processo mediato dal sistema immunitario.

Cardiomiopatie e Miocarditi

Il parvovirus B19 ha acquistato importanza nel tempo come virus cardiotropico; il DNA virale è infatti rinvenuto nelle biopsie cardiache con frequenza elevata, superiore a quella relativa ad altri virus cardiotropici, come gli enterovirus. Il B19 si può considerare caratterizzato da *cardiotropismo* e si può pensare che la sua presenza in questo tessuto sia comune a qualsiasi individuo precedentemente infettato. Pertanto è difficile attribuire una diretta correlazione fra la presenza del DNA virale nel miocardio e la patogenesi di cardiomiopatie [Modrow et al., 2006].

È stato osservato il coinvolgimento del B19 in diversi casi di miocardite sia in età pediatrica che in età adulta [Schowengerdt et al., 1997; Dettmeyer et al., 2003; Bultmann et al., 2003; Kuhl et al., 2003]. Il virus sembrerebbe infettare le cellule endoteliali, causandone la disfunzione e portando in modo indiretto alla cardiomiopatia. La disfunzione delle cellule endoteliali può avvenire mediante un meccanismo virus-dipendente quale la replicazione virale o l'espressione delle proteine di B19 oppure può essere un effetto della risposta immunitaria innescata dal virus. Questa deregolazione a livello dell'endotelio porta a una risposta infiammatoria diretta responsabile del danno nel tessuto cardiaco [Mahrholdt et al., 2006; Bock et al., 2010].

Epatiti

L'aumento dei livelli di transaminasi epatiche si accompagna spesso alla quinta malattia e per questo motivo l'infezione da B19 è stata associata nei bambini a epatiti severe ma autolimitanti [Sokal et al., 1998; Pardi et al., 1998]. Numerosi studi escludono l'associazione tra B19 e epatiti acute e croniche [Notari et al., 2001; He et al., 2003; Arista et al., 2003], mentre altri ipotizzano una

relazione causale tra il virus e l'insufficienza epatica fulminante [Langnas et al., 1995].

Infezioni persistenti

Nei pazienti in cui il sistema immunitario non è in grado di controllare l'infezione, come in caso di immunodeficienze congenite o acquisite, il virus può stabilire un'infezione persistente. In soggetti immunocompetenti normalmente l'infezione da parvovirus B19 ha un decorso limitato e termina con la clearance del virus dall'organismo, ma in alcuni casi può instaurarsi un'infezione persistente in grado di causare aplasia midollare, pur in presenza di anticorpi contro il B19.

La presenza del virus è stata dimostrata in tessuti come il midollo osseo, la cute e la sinovia tramite saggi di nested-PCR. La ricerca del DNA virale in campioni di sangue e aspirati midollari ha dimostrato che è raro riscontrare la presenza costante di B19 nel sangue di pazienti con evidenza sierologica di una passata infezione, mentre è possibile ritrovare il genoma virale nel midollo osseo di individui con sintomi tipici dell'infezione (anemia o artriti) e in soggetti asintomatici nonostante la presenza di IgG anti-B19 [Cassinotti et al., 1997].

Studi recenti hanno inoltre verificato la persistenza del DNA virale nel tessuto sinoviale non solo di pazienti con artrite reumatoide o giovanile (manifestazioni che spesso accompagnano l'infezione primaria), ma anche in individui immunocompetenti, privi di artropatie e con anticorpi nei confronti del virus [Soderlund et al., 1997]. Al momento però non sono ancora state identificate le cellule in grado di ospitare il virus, anche se si ipotizza un coinvolgimento di cellule sinoviali con caratteristiche di cattura e presentazione dell'antigene, e rimane da stabilire quale sia il livello di funzionalità del genoma di B19 in queste cellule per quanto riguarda la sua capacità trascrizionale e replicativa [Hokynar et al., 2000].

La persistenza del virus a livello della cute è stata inizialmente documentata a partire dal campione bioptico di un ragazzo di 16 anni che aveva sviluppato un'orticaria cronica a seguito di un'infezione da parvovirus B19; questo studio ha messo inoltre in luce la presenza del DNA virale anche nella cute sana. Rimane da stabilire quale sia il sito esatto di persistenza virale [Vuorinen et al., 2002].

Le analisi molecolari su biopsie cutanee inoltre hanno permesso l'identificazione di un nuovo genotipo, la variante V9, che mostra un tropismo caratteristico per i tessuti cutanei [Hokynar et al., 2002].

Trattamento e prevenzione

L'infezione da Parvovirus B19 è considerata un'infezione benigna per lo più asintomatica. Tuttavia la presenza di complicanze ematologiche in soggetti con difetti ematologici o immunitari, le possibili manifestazioni reumatiche in soggetti sani e il rischio di trasmissione materno-fetale pone la necessità di un'accurata diagnosi e di approcci per la profilassi e la terapia.

Sangue ed emoderivati

La presenza nella fase iniziale dell'infezione di un alto titolo viremico in assenza di sintomi specifici, la clearance ritardata del virus dal sangue e la possibile insorgenza di infezioni croniche a basso titolo anticorpale possono rappresentare un rischio di trasmissione del virus attraverso l'uso di sangue ed emoderivati.

Due fattori principali vanno considerati nel determinare l'esito clinico di un'esposizione parenterale al virus e sono la quantità totale di virus trasfuso o infuso ai destinatari e lo stato immunitario dei pazienti.

Per quanto riguarda il primo aspetto, alcuni studi indicano possibili livelli di concentrazione virale necessari per la trasmissione dell'infezioni: in assenza di specifiche Ig nel donatore e nel ricevente, un livello soglia di circa 10^7 unità internazionali (UI) per ml sembra necessario perché avvenga l'infezione [Brown et al., 2001]. La presenza di Ig nel sangue del donatore o nel destinatario sembra avere un effetto protettivo. Complessivamente, tenendo conto della frequenza di unità di sangue ad alto titolo viremico e dei tassi di sieroprevalenza nella popolazione, la probabilità di infezione da singola esposizione a sangue o componenti del sangue è bassa [Yu et al., 2010; Hourfar et al, 2011] e non giustifica in termini di costi screening sui singoli donatori. I pazienti ad alto rischio con malattie ematologiche, deficienze immunitarie o le donne in stato di gravidanza possono invece utilizzare donazioni di sangue apposite, su cui è verificata l'assenza di virus B19 contaminante.

Una situazione completamente diversa è presente per i prodotti derivati dal sangue, generati da pool di donazioni. In questi casi, l'inclusione di unità ad alto titolo viremico avviene con elevata probabilità e la diluizione durante il processo di fabbricazione può non essere sufficiente per restare al di sotto di un livello soglia di sicurezza. Alti tassi di trasmissione dell'infezioni sono stati individuati in pazienti destinatari a rischio, emofiliaci e/o immunodeficienti [Parsyan et al., 2007].

Per ridurre il rischio di trasmissione del virus attraverso il sangue una soglia di sicurezza è stata indicata dagli enti di regolamentazione pari a 10^4 UI/ml e metodi quantitativi di rilevazione molecolare sono o dovrebbero essere utilizzati per rilevare la presenza di contaminazione sopra-soglia nei pool utilizzati. Inoltre nel processo di fabbricazione, fasi di inattivazione sono

normalmente introdotte per ridurre il rischio di trasmissione del virus. Il B19 è resistente a trattamenti con solventi/detergenti, ma solo relativamente resistente al trattamento termico, in particolare la suscettibilità al calore dipende dalle condizioni fisiche e di composizione del mezzo e dovrebbe essere presa in considerazione nelle fasi di produzione per aumentare ulteriormente la sicurezza del sangue e dei prodotti derivati [Blumer et al., 2010].

Trattamento

L'intervento terapeutico a seguito di infezione da B19 è ridotto e solo raramente può richiedere l'utilizzo di trattamenti sintomatici.

L'idrope fetale può risolvere spontaneamente o, in caso contrario, le trasfusioni intrauterine sono state utilizzate con apparente successo per la riduzione della mortalità fetale [Forestier et al., 1999; Fairley et al., 1995; Goodear et al., 1998]. Le artropatie croniche sintomatiche possono essere trattate con farmaci anti-infiammatori non steroidei. Nel caso di crisi aplastica transitoria, la trasfusione di eritrociti porta ad una soddisfacente concentrazione di emoglobina [Hamon et al., 1988]. In caso di infezione persistente l'immunizzazione passiva viene considerata come possibile approccio per ridurre il carico virale.

Preparati di IVIG ottenuti da grandi pool di donatori generalmente contengono livelli elevati di anticorpi anti-B19V neutralizzanti e possono essere utilizzati con successo [Mouthon et al., 2003]. Tuttavia normalmente non eliminano completamente il virus, l'effetto è quindi temporaneo e richiede cicli ripetuti di somministrazione. La clearance virale avviene solitamente quando il sistema immunitario del paziente sviluppa una propria risposta immunitaria completa, pertanto un approccio complementare all'uso di IVIG risulta opportuno.

Si deve inoltre considerare che non sono stati effettuati trial clinici per determinare un regime terapeutico ottimale per la somministrazione di IVIG in risposta all'infezione, quindi il trattamento è ad oggi empirico, così come anche la somministrazione profilattica di IVIG per prevenire la trasmissione trans-placentare. Queste limitazioni richiedono ulteriori studi per meglio comprendere l'efficacia dell'immunizzazione passiva a fine terapeutico o profilattico.

Farmaci Antivirali e Sviluppo di Vaccini

Nessuna terapia antivirale è stata sviluppata ad oggi. Il rationale per lo sviluppo di una terapia antivirale specifica sarebbe il trattamento delle infezioni croniche in pazienti immunodepressi o la riduzione degli aspetti infiammatori di infezioni acute o croniche.

L'NS o il dominio fosfolipidico della VP1u sono entrambi necessari per l'infettività virale e responsabili degli effetti patogenetici pertanto costituiscono potenziali target farmacologici. L'inibizione specifica della loro attività probabilmente comprometterebbe la capacità del virus di replicarsi, la citotossicità e l'attività proinfiammatoria virale. Le biotecnologie farmaceutiche insieme allo sviluppo di accurati metodi quantitativi per valutare la riduzione dell'infettività virale sono necessari per far proseguire la ricerca in questo campo.

Per lo sviluppo di un vaccino invece il razionale è principalmente quello di proteggere le popolazioni a rischio, come i pazienti con malattie ematologiche e le donne in età fertile.

Gli studi iniziali per lo sviluppo di un vaccino si sono basati sull'uso di VLP, capsidi vuoti espressi mediante baculovirus, costituiti dalle proteine virali VP1 e VP2 e antigenicamente simili ai virioni nativi. Queste particelle inducevano la formazione di anticorpi neutralizzanti in animali inoculati e la loro immunogenicità è stata valutata in porcellini d'India, topi e conigli. I risultati hanno evidenziato che la presenza della proteina VP1 è particolarmente importante per una potente attività neutralizzante; per questo motivo un potenziale vaccino ricombinante dovrebbe essere costituito dal capsido arricchito in VP1. I sieri di animali e di volontari sani immunizzati con un vaccino candidato hanno mostrato titoli di anticorpi neutralizzanti uguali o anche maggiori di quelli osservati durante l'infezione naturale. I risultati del trial di fase I sono stati promettenti e hanno mostrato l'immunogenicità del candidato vaccino e la relativa sicurezza negli esseri umani [Bansal et al., 1993; Ballou et al., 2003]. Gli studi di fase II hanno invece mostrato un'immunogenicità eccezionale [Bernstein et al., 2011]. Questi risultati pongono quindi la necessità di un ulteriore sviluppo di vaccini efficaci e sicuri.

Modelli animali

L'identificazione di virus all'interno del genere Erythrovirus capaci di infettare i primati ha reso disponibile la presenza di modelli animali per l'infezione da B19. In particolare l'isolamento del Simian Parvovirus (SPV) si è rivelato di grande aiuto per lo studio del B19. È stata identificata infatti tra i due virus una somiglianza genomica e un'uguale tendenza a infettare cellule di midollo osseo *in vitro*. Anche nel caso di SPV l'infezione è seguita da fenomeni patologici diversi, dipendenti dallo stato immunitario dell'animale ospite. L'infezione di animali immunocompromessi porta ad anemia cronica, mentre negli animali immunocompetenti si assiste ad un calo transitorio dei reticolociti [O'Sullivan et al., 1994]. Inoltre, come avviene per il B19, l'infezione di feti con un sistema immunitario immaturo, porta alla comparsa di idrope fetale [O'Sullivan et al., 1997].

Il modello animale del Simian Parvovirus è considerato particolarmente utile, al fine di una migliore comprensione circa la patofisiologia dell'idrope indotta dal B19 e per la scoperta di metodi ottimali per il trattamento dei feti infettati.

Risposta immunitaria

L'immunità innata

Il ruolo dell'immunità innata nel corso dell'infezione del B19 non è stato studiato in dettaglio. Analogamente ad altri virus, il B19 potrebbe essere riconosciuto attraverso i suoi determinanti (PAMPs) da recettori cellulari (PRR). Devono essere ancora definiti i componenti del virus che possono fungere da PAMPs, tuttavia le sue regioni terminali ricche in GC potrebbero essere riconosciute da recettori come il TLR9, presenti sui linfociti B e sulle cellule dendritiche.

Il CpG-ODN 2006 è un oligonucleotide con backbone fosfodiesterico contenente motivi CpG che nella forma non metilata sono riconosciuti dal recettore TLR9 e hanno una funzione immunostimolante. È stato visto che l'oligonucleotide è in grado di inibire selettivamente la crescita dei precursori eritroidi, inducendo un accumulo di cellule in fase S e G(2)/M, determinando un aumento di dimensioni della cellula e la frequenza di cellule apoptotiche, caratteristiche simili a quelle osservate nei progenitori eritroidi infettati da parvovirus B19. L'oligonucleotide inoltre presenta una sequenza consenso condivisa con il promotore P6 del B19 che è capace di inibire la crescita eritroide in una maniera sequenza-specifica e di downregolare l'espressione del recettore dell'eritropoietina, effetti indotti anche dal DNA di B19. Anche se non è stata osservata nelle cellule eritroidi la produzione di mRNA relativi al TLR9, questi risultati suggeriscono possibili meccanismi alternativi di inibizione dell'eritropoiesi da parte del virus [Guo et al., 2010].

Recentemente è stata valutata la variazione di espressione delle defensine e del Toll-like receptor in cellule COS-7 trasfettate con vettori codificanti per i prodotti di fusione EGFP-NS e EGFP-VP. Da tali studi è stato visto che NS così come VP2, anche se in maniera inferiore, inducono un aumento sia a breve che a lungo termine delle defensine e di TLR9. Quindi i risultati contribuiscono ulteriormente a definire il quadro relativo all'immunità innata nel corso dell'infezione di B19 [Hsu et al., 2011].

Immunità adattativa: Anticorpi

Gli anticorpi sono prodotti presto nel corso dell'infezione e normalmente sono in grado di

neutralizzare l'infettività virale e portare progressivamente all'eliminazione del virus. Nel corso dell'infezione sperimentale [Anderson et al., 1985], la comparsa delle IgM è stata osservata presto. Questi anticorpi possono persistere per mesi, a differenza delle IgG che compaiono dopo circa due settimane e persistono per tutta la vita. È stata inoltre evidenziata la presenza di immunoglobuline della classe IgA nei fluidi corporei [Erdman et al., 1991].

Lo sviluppo della risposta immunitaria prevede tipicamente una fase acuta con il riconoscimento dell'epitopo [Kaikkonen et al., 1999], seguita dallo sviluppo di anticorpi a maggiore avidità [Soderlund et al., 1995].

Le proteine del capsido virale sono i principali antigeni riconosciuti dal sistema immunitario e contengono epitopi neutralizzanti localizzati su diverse sequenze. Gli epitopi presenti nella regione VP comune sono principalmente conformazionali: un epitopo è situato all'estremità aminoterminale di VP2 (aa 38-87) [Yoshimoto et al., 1991], mentre altre 6 sono nella metà carbossiterminale di VP2 (aa 253-515) [Sato et al., 1991]. Gli epitopi nella regione VP1u sono svariati e sono prevalentemente lineari [Sato et al., 1991; Yoshimoto et al., 1991; Rosenfeld et al., 1992].

La maggior parte di questi epitopi è situata nelle anse interposte fra i fogli β -planari delle proteine capsidiche e sono quindi esposti sulla superficie esterna del virione.

La presenza della proteina VP1 nei capsidi ha due effetti: modifica la presentazione degli epitopi VP2 specifici e aggiunge epitopi propri alla superficie del virione. È stato osservato che anticorpi nei confronti di epitopi della proteina VP2, ottenuti immunizzando animali con capsidi costituiti unicamente da VP2, hanno una ridotta attività neutralizzante. Questi risultati fanno ipotizzare che la presenza della VP1 nei capsidi alteri la struttura del virione e abbia un effetto anche sulla presentazione antigenica [Bansal et al., 1993].

Durante la fase attiva o molto recente dell'infezione, gli anticorpi anti-epitopi lineari di VP1 compaiono insieme agli anticorpi anti-epitopi conformazionali di VP2 e sembrano persistere per mesi o anni nella maggior parte degli individui, probabilmente perché hanno un ruolo neutralizzante nei confronti di regioni delle proteine capsidiche coinvolte nell'attacco e internalizzazione del virus. Gli anticorpi diretti invece verso gli epitopi lineari di VP2, sono presenti in generale durante una fase attiva o molto recente dell'infezione e durante la fase convalescente, mentre si evidenziano soltanto nel 20% dei soggetti che mostrano segni di passata infezione [Manaresi et al., 1999; Musiani et al., 2000; Manaresi et al., 2001].

Uno studio mediante saggio immunoenzimatico Elispot ha indicato che la memoria dei linfociti B è mantenuta contro epitopi conformazionali di VP2 e contro epitopi lineari di VP1 ed è assente invece contro gli epitopi lineari della VP2, in accordo con quanto osservato testando la reattività del siero contro diversi antigeni di B19 [Corcoran et al., 2004].

Anticorpi anti-NS sono prodotti in risposta a infezione di B19 in una sottopopolazione di individui probabilmente a seguito di una stimolazione antigenica prolungata. La loro presenza, tuttavia, non è stata ad oggi collegata a una particolare condizione clinica [von Poblotski et al., 1995; Venturoli et al., 1998; Heegaard et al., 2002].

Lo sviluppo di un'attività neutralizzante è tipico di una risposta immunitaria efficace che si assume possa proteggere da infezioni secondarie; mentre l'incapacità di produrre anticorpi con efficace attività neutralizzante porta invece all'instaurarsi di infezioni persistenti in cui il virus è presente nell'organismo per lunghi tempi a bassi livelli [Kurtzman et al., 1989]. Nella maggior parte dei pazienti immunocompromessi non sono evidenziabili anticorpi specifici, mentre in altri esiste una risposta con caratteristiche di immaturità. Questi anticorpi reagiscono in saggi di cattura radioimmunologici, mentre non reagiscono all'immunoblot e ciò suggerisce che essi siano diretti verso epitopi di tipo conformazionale, ma non sono in grado di riconoscere quelli lineari. La scarsa reattività immunologica è in correlazione con una scarsa attività neutralizzante determinata in saggi di inibizione dell'infettività *in vitro*.

Immunità adattativa: Cellule

Il tipo prevalente di risposta immunitaria a seguito dell'infezione da parvovirus B19 è costituito dalla produzione di anticorpi con attività neutralizzante; tuttavia, l'instaurarsi di infezioni persistenti in soggetti con deficit immunologici a cellule T suggerisce che queste cellule giocano un ruolo altrettanto importante. È probabilmente l'interazione fra i tipi cellulari T e B a determinare lo sviluppo di uno stato immunitario pienamente competente.

La misurazione della proliferazione linfocitaria *in vitro* dopo stimolazione delle cellule mononucleate del sangue periferico con gli antigeni virali purificati VP1, VP2 e NS ha permesso di identificare una risposta mediata da linfociti CD4, MHC-II ristretta, diretta prevalentemente verso le proteine capsidiche [vonPoblotzky et al., 1996], come confermato successivamente in pazienti con recente e passata infezione da B19 [Franssilla et al., 2001].

La risposta proliferativa e citolitica delle cellule T CD8 è stata valutata a seguito di stimolazione *in vitro* con una libreria di peptidi disegnata in modo tale da coprire l'intera sequenza dell'NS. È stato così identificato il primo epitopo relativo al B19, la cui rilevanza funzionale è stata successivamente confermata [Tolfvenstam et al., 2001]. In un approccio più estensivo per l'identificazione di epitopi, un totale di 210 peptidi sovrapposti e sintetizzati in modo tale da coprire l'intera sequenza della proteina non strutturale NS, la regione VP1u e la regione comune VP1/VP2 sono stati utilizzati in

saggi di citotossicità e di stimolazione dei linfociti CD8 per valutare la loro rilevanza funzionale. Una serie di epitopi furono identificati, nove nella proteina NS e uno nella regione VP comune. La risposta dei CD8 a questi epitopi è stata osservata in soggetti con infezione acuta, mantenuta o addirittura aumentata nei mesi dopo la risoluzione della malattia acuta. Questi dati suggeriscono che le cellule T CD8 possono svolgere un ruolo di primo piano nel controllo dell'infezione del B19 [Norbeck et al., 2005].

Il ruolo centrale di tali cellule è stato confermato da uno studio sull'estensione della risposta dei CD8 durante e dopo l'infezione acuta, mediante l'utilizzo di complessi multimerici HLA-peptide. I risultati indicano una risposta sostenuta nel primo anno post-infezione nonostante la risoluzione dei sintomi clinici, con popolazioni di linfociti T specifiche per i singoli epitopi che rappresentano fino al 4% di tutte le cellule CD8, risposta che si può mantenere anche per anni dopo l'infezione a frequenze inferiori allo 0,5% di tutte le cellule CD8 [Isa et al., 2005].

Il ruolo delle cellule T helper nella risposta immune al B19 è stato inizialmente investigato usando VLPs ricombinanti, contenenti le due proteine strutturali VP1 e VP2 o la VP2 da sola, e la regione VP1u espressa in un sistema procariota. La capacità di questi antigeni di stimolare cellule Th a proliferare e a secernere IFN- γ e IL-10 è stata misurata in soggetti infetti con il B19 recentemente o in passato. In risposta alla VP1/2 e alla VP2 è stata osservata un'analoga proliferazione e produzione di IFN- γ e IL-10; la produzione di IFN- γ in risposta a VP1u è risultata molto forte tra i soggetti infettati di recente, ma assente tra i soggetti infettati in passato, in contrasto con la persistenza documentata di anticorpi anti-VP1u [Franssilla et al., 2004; Franssilla et al., 2005].

Per studiare la portata della risposta dei CD4 alle proteine del capside è stata usata una libreria di peptidi e il saggio Elispot per l'IFN- γ , anche in questo caso la risposta in soggetti con infezione acuta è stata confrontata con quella relativa a individui infettati in passato. Per i soggetti con infezione acuta si è osservata una risposta dei CD4 a diversi peptidi, in particolare verso la regione VP comune, con una riduzione nel corso del tempo [Kasprowicz et al., 2006].

È stata poi caratterizzata la produzione di citochine proinfiammatorie e di quelle specifiche della risposta T helper nel corso dell'infezione acuta. Un picco iniziale di citochine proinfiammatorie (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8) è stato osservato all'insorgenza dell'infezione acuta, così come l'induzione delle citochine specifiche della risposta Th1 (IL-2, IL-12 e IL-15) evidente nella fase iniziale e mantenuta in molti casi nel periodo di follow-up. Le citochine associate alla risposta Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10) e l'IFN- γ invece si sono mantenute a bassi livelli nel corso dello studio. Nonostante la mancanza di citochine Th2 i pazienti hanno sviluppato normali livelli di IgG specifiche, prodotte probabilmente in risposta a un basso livello di IL-6 e di altre citochine, come ad esempio TGF- β [Isa et al., 2007].

Nel complesso, le caratteristiche della risposta delle cellule T al B19 combinano aspetti tipici di virus capaci di infezioni litiche e di virus capaci di stabilire una infezione persistente. La piena caratterizzazione della risposta immunitaria è cruciale non solo per la comprensione dell'infezione, ma anche per lo sviluppo di approcci terapeutici e profilattici, quali lo sviluppo di un vaccino.

Principi diagnostici

Come per gli altri virus, la diagnosi di infezione da B19 può essere fatta direttamente, dimostrando la presenza del virus nell'organismo oppure indirettamente, evidenziando una risposta immunitaria specifica nei confronti del virus in questione.

Nel caso del B19, l'impossibilità di coltivare efficacemente il virus in sistemi cellulari *in vitro* impone di utilizzare mezzi di ricerca diversi dal semplice isolamento; è necessario evidenziare nei campioni clinici costituenti virali quali il genoma o la componente antigenica.

Il riscontro di una risposta immunitaria specifica nei confronti del parvovirus B19 ed in particolare nei confronti delle proteine capsidiche VP1 e VP2, fornisce informazioni indirette sull'infezione: la presenza di anticorpi di classe IgM è indicativa di infezione recente, mentre la presenza di IgG in assenza di IgM è indicativa di infezione passata e immunità nei confronti del virus.

Le analisi sono generalmente eseguite su campioni di siero e di plasma, tuttavia la ricerca delle componenti virali può avvenire anche su aspirati di midollo osseo o su campioni biotici, sul liquido amniotico in caso di presunta infezione fetale e su tessuti fetali e placentari in caso di morte fetale [Young, 2004].

Diagnosi virologica

Ricerca del DNA virale

La diagnosi di infezione da parvovirus B19 è affidata principalmente alla ricerca del DNA virale attraverso tecniche di amplificazione degli acidi nucleici: alti livelli di viremia sono riscontrabili solo durante la fase acuta dell'infezione e per un breve periodo, circa una settimana, mentre bassi livelli di DNA possono essere rivelati anche per sei mesi solo tramite PCR. Per questo motivo tecniche poco sensibili come l'ibridazione su filtro e su piastra non sono più utilizzate nella diagnosi di infezione; rimane tuttavia in uso l'ibridazione *in situ* in quanto permette di localizzare il DNA virale nel materiale in esame: cellule di midollo osseo, di sangue cordonale, liquido amniotico, tessuti fetali, cutanei, etc.

Ibridazione in situ

Questa tecnica di ricerca del DNA virale è utile non solo per confermare la diagnosi di infezione ma anche per lo studio della patogenesi delle malattie associate al B19, discriminando ad esempio infezioni produttive da casi di persistenza silente del virus. I campioni vengono opportunamente fissati e permeabilizzati per permettere l'ingresso delle sonde. Le sonde usate sono frammenti di DNA clonato o oligonucleotidi sintetici. Le sonde marcate con digossigenina sono le più usate, poiché dotate di maggiore specificità e sensibilità; la presenza del marcante è rivelata con metodo immunoenzimatico, con l'utilizzo di substrato cromogenico o chemiluminescente e l'osservazione, rispettivamente, mediante microscopio ottico o luminografo connesso a un microscopio ottico e a un computer.

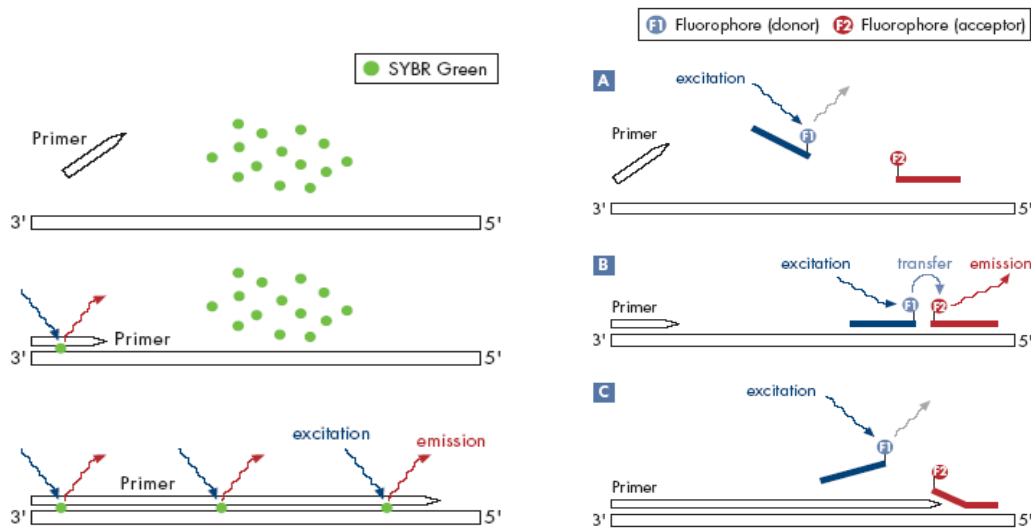
Reazione polimerasica a catena (PCR)

La PCR è la tecnica diagnostica più sensibile per rivelare la presenza del DNA virale; essa permette l'amplificazione di un numero minimo di copie genomiche, tipico degli stadi finali di infezione acuta o di infezioni persistenti. Inoltre per le reazioni di amplificazione possono essere utilizzate piccole aliquote di campioni di siero (eventualmente pretrattati), campioni cellulari o tissutali (previa lisi e/o purificazione del DNA).

Inizialmente sono stati sviluppati e sperimentati saggi di amplificazione del DNA di B19 in vari formati nel tentativo di ottenere una rivelazione quantitativa del DNA bersaglio, come la single-step PCR [Durigon et al., 1993; Koch et al., 1990], nested PCR [Musiani et al., 1993], PCR-ELISA, PCR-ELISA competitiva [Gallinella et al., 1997] e Real-Time PCR [Aberham et al., 2001].

La necessità di effettuare una determinazione quantitativa del carico virale di B19 (ad esempio nello screening di emoderivati o nel monitoraggio di infezioni persistenti) ha fatto sì che negli ultimi anni si sviluppasse tecniche diagnostiche di Real-Time PCR; questi saggi quantitativi risultano rapidi in quanto l'amplificazione del DNA bersaglio e la rivelazione dei prodotti di amplificazione sono combinati all'interno di un unico sistema. La reazione inoltre viene monitorata ciclo per ciclo e l'analisi quantitativa dei dati viene effettuata non al termine della reazione, come in una PCR end-point, bensì durante la fase esponenziale di accumulo dei prodotti, quindi risulta molto più accurata [Koppelman et al., 2004; Baylis et al., 2004].

Per la diagnosi di infezione di parvovirus B19 e la determinazione quantitativa del carico viremico sono disponibili in commercio saggi di real-time che utilizzano come sistema di rivelazione la fluorescenza: il colorante Sybr Green I e le sonde di ibridazione [Braham et al., 2004; Shorling et al., 2004; Harder et al., 2001]. Il Sybr Green I è una molecola fluorescente che è in grado di legarsi al DNA a doppia catena intercalandosi in esso. Il segnale di fluorescenza emesso è proporzionale alla quantità di acido nucleico presente nel campione in esame e viene registrato al termine della fase di estensione in ogni ciclo di amplificazione. Le sonde di ibridazione consistono invece in un sistema di rivelazione sequenza specifico. Si utilizzano due oligonucleotidi marcati con fluorocromi differenti che riconoscono due sequenze adiacenti sul DNA bersaglio. L'oligonucleotide a monte è marcato all'estremo 3' con fluorescina, mentre l'altro possiede in posizione 5' il fluorocromo LC Red 640 o LC Red 705. Durante la fase di annealing le due sonde riconoscono le rispettive regioni del DNA bersaglio e dal momento che i fluorocromi sono adiacenti, si verifica un trasferimento di energia per risonanza, detto FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer), dalla fluorescina eccitata dalla sorgente luminosa esterna al fluorocromo accettore (LC Red 640 o LC Red 705) che, eccitato, emette a sua volta un segnale fluorescente ad una lunghezza d'onda maggiore. In questo caso il segnale di fluorescenza viene registrato in ogni ciclo di amplificazione al termine della fase di annealing.



Real Time PCR in formato SybrGreen e FRET

La quantificazione dei prodotti di amplificazione ottenuti in PCR real time può essere assoluta o relativa. Una quantificazione assoluta richiede la costruzione di una curva di calibrazione mediante l'amplificazione di una serie di standard esterni a concentrazione nota; la concentrazione dei

campioni incogniti viene determinata per interpolazione sulla curva di calibrazione. Questo metodo non rivela l'eventuale presenza di inibitori della PCR, né tiene conto della variabilità tra campione e campione dovuta sia alla processazione del campione sia alla fase analitica, a meno che in ogni reazione di amplificazione non venga incluso anche un controllo interno che viene coamplificato. Una quantificazione relativa invece esprime la concentrazione di un campione come rapporto tra la sequenza bersaglio e una sequenza di riferimento che può essere esogena o endogena [Gallinella et al., 2004].

Dopo l'identificazione di Erythrovirus umani diversi dal genotipo B19 sono stati messi a punto saggi quantitativi per la discriminazione e la tipizzazione virale, con primer e sonde genotipo-specifiche [Schalasta et al., 2004; Hokynar et al. 2004; Liefeldt et al., 2005]. La

RealTime quantitativa con l'utilizzo di controlli interni rappresenta ad oggi lo standard analitico per la diagnosi molecolare di infezione da B19 [Gallinella et al., 2004; Manaresi et al., 2002; Gruber et al., 2001]. Tale sistema presenta due principali requisiti quali la rilevazione dei diversi genotipi di B19 e la quantificazione standardizzata e calibrata. Per il soddisfacimento di questi requisiti si può usufruire della presenza di standard definiti a livello internazionale ed allo stesso tempo si è vincolati da un pannello internazionale pensato e definito per valutare la capacità dei diversi saggi analitici di rilevare i tre genotipi di B19.

Ricerca degli antigeni virali

Le tecniche per la rilevazione del virus in campioni di siero mediante ricerca della componente antigenica hanno storicamente preceduto lo sviluppo delle tecniche per l'individuazione del DNA virale. In particolare, tecniche come la contro-immunoelettroforesi o la immunodiffusione hanno contribuito alla scoperta del virus ma non sono più comunemente utilizzate. Il saggio radioimmunologico volto alla ricerca antigenica può essere utilizzato, ma ha una specificità e una sensibilità nettamente inferiori alle tecniche di ibridazione molecolare. Tecniche di immunoelettromicroscopia sono utilizzabili per la conferma morfologica della presenza di virus in campioni di siero. E' possibile inoltre ricercare gli antigeni del virus nei campioni clinici (sangue periferico e liquido amniotico) impiegando saggi immunologici su filtro [Gentilomi et al., 1997; Gentilomi et al., 1998]. L'utilizzo di sieri immuni policlonali o di anticorpi monoclonali diretti verso le proteine VP1 e VP2 in tecniche di immunofluorescenza indiretta permette di evidenziare il virus in cellule infette di provenienza ematologica o in tessuti di origine fetale.

Diagnosi sierologica

La ricerca degli anticorpi prodotti in risposta all'infezione del B19 rappresenta ancora uno standard per la diagnosi di infezione.

Tecniche per la ricerca anticorpale sono dipese per lungo tempo dalla disponibilità di virus nativo; successivamente sono state sviluppate tecniche che si affidano ad antigeni prodotti in vitro in sistemi ricombinanti procariotici o eucariotici. Tali sistemi includono: cellule di E. Coli trasformate con plasmidi ricombinanti, che esprimono antigeni di B19 come proteine di fusione [Liu et al., 1991; Soderlund et al., 1995]; cellule di ovaio di Hamster cinese trasfettate con plasmidi ricombinanti che esprimono antigeni del B19 [Kajigaya et al., 1989]; cellule di mammifero COS-7 trasfettate con vettori di espressione derivati dall'SV40 contenenti sequenze che esprimono proteine del B19 [Cohen et al., 1995] e cellule di insetti (*Spodoptera frugiperda*) infettate con Baculovirus ricombinanti con sequenze del B19 [Brown et al., 1991; Kajigaya et al., 1991]. I sistemi procariotici producono proteine prive della loro conformazione nativa e pertanto utilizzabili per la ricerca di anticorpi che riconoscono epitopi lineari. I sistemi eucariotici invece consentono la produzione di proteine nella conformazione nativa e permettono dunque lo studio della risposta immunitaria contro epitopi conformazionali. Gli antigeni capsidici normalmente impiegati per una diagnosi sierologica di infezione da parvovirus B19 sono prodotti in cellule di insetto utilizzando il sistema dei Baculovirus [Brown et al., 1991]. Con questo sistema è possibile ottenere elevate quantità di particelle simil-virali, costituite dalle proteine VP1 e VP2 oppure unicamente dalle proteine VP2. Queste particelle presentano determinanti antigenici coincidenti con quelli presentati da particelle virali native, e quindi il loro impiego in tecniche di ricerca anticorpale garantisce risultati estremamente affidabili.

Saggio immunoenzimatico (EIA)

Il formato maggiormente impiegato si basa su tecniche immunoenzimatiche su micropiastra (formato ELISA). Per la ricerca di IgG specifiche si utilizza un saggio indiretto, mentre per la ricerca di IgM si preferisce un saggio di cattura delle IgM specifiche. Nel primo caso antigeni biotinilati sono ancorati a pozzetti rivestiti di streptavidina e fatti reagire con il siero in esame; la formazione di immunocomplessi è rivelata mediante anticorpi secondari coniugati all'enzima perossidasi. Nel secondo caso, anticorpi di classe IgM sono catturati da anticorpi anti-IgM ancorati a pozzetti di micropiastra; queste IgM legano poi antigeni biotinilati che verranno a loro volta riconosciuti utilizzando streptavidina coniugata all'enzima perossidasi.

Saggio di immunofluorescenza (IIF)

Reazioni di immunofluorescenza per la ricerca di anticorpi specifici di classe IgG o IgM possono essere allestite utilizzando come substrato le cellule di insetto trasfettate con vettori di Baculovirus esprimenti le proteine capsidiche di parvovirus B19 [Cohen et al., 1995]. In questo caso la reazione è di tipo indiretto (per la ricerca di IgM è opportuno procedere ad un pre-assorbimento delle IgG), e la formazione di immunocomplessi è evidenziata mediante anticorpi secondari coniugati a fluorocromo (FITC).

Saggio di Western Blot

Le proteine virali, oppure frammenti di esse, prodotte in sistemi procariotici, possono essere utilizzate come substrato antigenico in reazioni di immunoblot. Esistono sistemi commerciali che consentono lo studio della risposta anticorpale nei confronti delle proteine del parvovirus B19. In questo caso vengono ad essere evidenziati anticorpi di classe IgG o IgM diretti verso epitopi lineari, e non conformazionali, del capsido di B19. Tale tecnica è meno utilizzata della tecnica ELISA poiché è meno sensibile, più costosa e non è applicabile allo screening di un numero elevato di campioni.

Tuttavia è importante lo studio della risposta anticorpale nei confronti degli antigeni lineari del B19 in quanto a tutt'oggi non è ben nota la specifica risposta anticorpale, nelle diverse fasi di infezione, nei confronti di diverse regioni immunoreattive e di diversi epitopi lineari o conformazionali delle proteine capsidiche. Inoltre è dimostrato che la maggior parte degli epitopi neutralizzanti della VP1 sono epitopi lineari [Manaresi et al., 1999; Manaresi et al., 2001].

Anche la proteina non strutturale NS espressa in sistemi procariotici ed eucariotici [Venturoli et al., 1998; von Poblitzki et al., 1995] è usata in questo saggio per valutare la presenza di anticorpi specifici la cui correlazione con il corso dell'infezione tuttavia rimane controversa.

La cromatina

La cellula eucariotica contiene circa 2 metri di DNA, saldamente impacchettati per poter essere contenuti nel nucleo cellulare del diametro di circa 6 μm . La compattazione risultante di circa 10000 volte è mediata dalla interazione del DNA con proteine appartenenti a due gruppi: le proteine istoniche, le più numerose, e le proteine non istoniche. Il complesso nucleoproteico così costituito

prende il nome di *cromatina* [Alberts et al., 2002]. Si distinguono due tipi di cromatina: la struttura aperta o “eucromatina” si trova nelle regioni più attivamente trascritte del genoma; l’“eterocromatina” o cromatina condensata si trova nei telomeri, centromeri e nelle regioni non codificanti [Frenster, 1965].

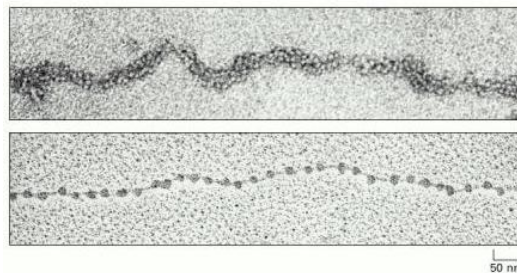
Gli istoni sono piccole proteine basiche (11-16 kDa), ricche in lisina e arginina, capaci quindi di forti interazioni elettrostatiche con il DNA carico negativamente, formando con questo un complesso stabile.

Gli istoni sono fra le proteine più conservate a livello evolutivo, i cui geni sono presenti in *cluster* e in copie multiple, probabilmente per garantire l’espressione di una quantità opportuna di queste proteine nel corso della replicazione cellulare [Marzluff et al., 2002].

Gli istoni sono di cinque tipi (H1, H2A, H2B, H3, H4) e la loro reciproca somiglianza fa pensare che possano originare da un comune antenato per duplicazione genetica e successiva divergenza.

Tali proteine sono costituite da un corpo globulare che interagisce con il DNA [Arents et al., 1991; Luger et al., 1997] e da una “coda” N-terminale non strutturata e protrudente che è soggetta a modificazioni covalenti, critiche per la struttura e la funzionalità della cromatina [Schroth et al., 1990].

Gli istoni partecipano al primo livello di organizzazione della cromatina, il nucleosoma [Kornberg, 1974]. Le prime evidenze circa l’esistenza di tali unità risale agli anni settanta: inizialmente prove di digestione mediante nucleasi mostrarono che la cromatina può essere degradata in frammenti di circa 200 bp [Hewish and Burgoyne, 1973] e a seguito di digestione più estensiva questi frammenti risultarono costituiti da DNA complessato con proteine [Rill and Van Holde, 1973; Sahasrabudde and Van Holde, 1974]. Inoltre all’osservazione in microscopia elettronica sotto specifiche condizioni sperimentali la cromatina appariva come una “collana di perle”, in cui il filo è rappresentato dal DNA mentre ciascuna perla corrisponde a quello che verrà poi definito “complesso nucleosomico” [Woodcock, 1973; Olins, A.L. & Olins, D.E., 1974].



Nucleosomi visti al microscopio elettronico (A) Cromatina isolata dai nuclei in interfase: fibra da 30 nm; (B) Cromatina decondensata: “collana di perle” (fibra da 10 nm)

Oggi sappiamo che ciascun nucleosoma consta di un “core” proteico formato da otto proteine istoniche – due copie di ciascuno degli istoni H2A, H2B, H3, H4 – attorno al quale si avvolge il DNA per circa 1.7 giri, equivalenti a 146 paia di basi [Luger et al., 1997].

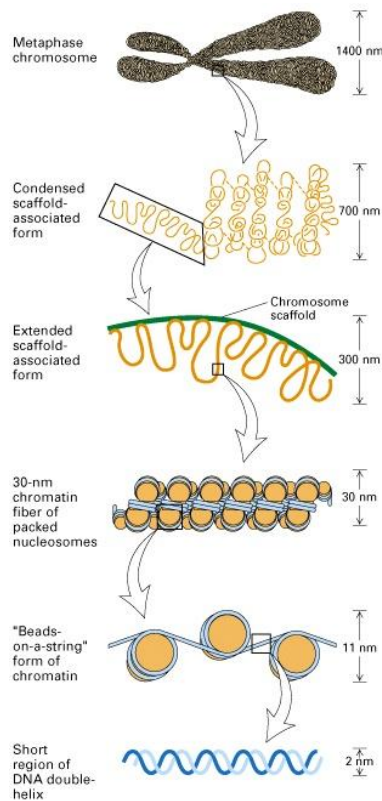
Da alcuni studi è stato osservato che la posizione dei nucleosomi non è casuale, ma è “scritta” nella sequenza primaria del DNA e può essere modulata dai complessi di rimodellamento della cromatina ATP-dipendenti, con un importante effetto in termini di accessibilità al DNA da parte di fattori trascrizionali [Davey et al., 2002].

La cromatina a questo livello iniziale di organizzazione forma una fibra dello spessore di 10 nm in cui i nucleosomi sono separati fra di loro da un DNA *linker* di lunghezza variabile (10-90 bp) a cui è associato l'istone H1. Questa proteina istonica è localizzata nel punto di ingresso e di uscita del DNA dal nucleosoma e sembra avere un ruolo critico nella stabilizzazione del nucleosoma stesso e nella formazione della struttura di ordine superiore.

Studi di microscopia elettronica dimostrarono che le fibre della cromatina isolate dalle cellule apparivano in diversi modi a seconda della concentrazione salina [Thoma et al., 1979]. È stato quindi ipotizzato che differenze conformazionali di questo tipo si verificano anche nel nucleo regolando così la trascrizione, passando da strutture più compatte e refrattarie alla trascrizione a strutture più “aperte” e permissive.

Al di sopra dei nucleosomi esistono, infatti, ulteriori livelli di organizzazione della cromatina. I nucleosomi sono impacchettati in una fibra del diametro di 30 nm, la cui struttura, tuttavia, è ancora oggetto di dibattito. Uno dei modelli proposti è quello del “solenoidale” in cui i nucleosomi sono connessi e arrangiati in modo lineare mediante il DNA linker ripiegato così da formare una elica di ordine superiore [Finch and Klug, 1976]. Un secondo modello invece è definito “zig-zag” e prevede che il DNA linker faccia avanti e indietro fra giri di elica adiacenti formati dai nucleosomi [Woodcock et al., 1984].

La fibra da 30 nm è ulteriormente condensata formando anse organizzate intorno ad uno “scaffold” costituito da proteine non istoniche; tuttavia anche in questo caso la struttura esatta è ad oggi sconosciuta [Mirkovitch, 1984].



Livelli di compattazione della cromatina

Malgrado l'elevato livello di compattazione, la struttura dei cromosomi è molto dinamica per rendere il DNA accessibile ad enzimi coinvolti in diversi processi.

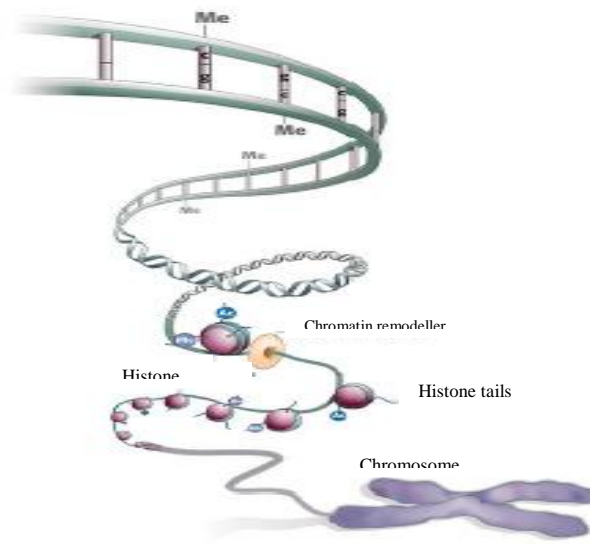
Principalmente si è posta l'attenzione su due processi che consentono cambiamenti reversibili a livello locale nella struttura della cromatina: le modificazioni enzimatiche delle code N-terminali degli istoni nucleosomici, che inducono un'alterazione dei contatti fra DNA e istoni con una conseguente variazione nell'impacchettamento e quindi nell'accessibilità del DNA localmente [Dou and Gorovsky 2000], e i complessi ATP dipendenti di rimodellamento della cromatina, che possono essere richiamati per affinità con specifiche modificazioni istoniche e determinare a loro volta modificazioni della cromatina non covalenti (ad esempio spostamento dei nucleosomi o introduzione di varianti istoniche) rendendo più o meno esposta una specifica sequenza al macchinario trascrizionale [Narlikar et al. 2002].

Meccanismi di regolazione dell'espressione genica

Epigenetica

Il termine “epigenetica” venne coniato dal biologo britannico Waddington nel 1942 per indicare l'interazione dell'ambiente con i geni, responsabile del manifestarsi di un certo fenotipo; solo con la scoperta del DNA come informazione genetica ereditabile il termine venne rivalutato e considerato seriamente. Nel tempo l'utilizzo della parola si è modificato evolvendosi in modo significativamente differente a seconda delle discipline e solo negli anni novanta si è diffuso l'utilizzo del concetto di “epigenetica” per indicare quei cambiamenti ereditari che tuttavia non coinvolgono modifiche nella sequenza del DNA. Il concetto di epigenetica oggi assume una valenza pratica, nell'ambito medico ad esempio, ed ha allo stesso tempo un importante impatto sulla nostra idea di ereditarietà ed evoluzione [Haig, 2004].

La complessa regolazione delle funzioni cellulari non si basa quindi esclusivamente sulla fitta rete di fattori trascrizionali, ma è anche il risultato degli effetti esercitati dalla cromatina e dalla sua struttura. La traduzione dell'informazione contenuta nel DNA è un processo complesso che coinvolge una serie di eventi su ciascuno dei quali possono intervenire i meccanismi di regolazione epigenetica, che possono agire ad esempio a livello della trascrizione così come a livello dello splicing o della traduzione [Gibney et al., 2010]. I meccanismi epigenetici esercitano il loro effetto innescando processi molecolari che promuovono o inibiscono la trascrizione oppure portano alla degradazione di trascritti già presenti nella cellula [MacDonald, 2012]. Nell'epigenetica rientrano diversi meccanismi come la metilazione delle isole CpG, le modificazioni degli istoni, il rimodellamento della cromatina e gli RNA non codificanti [Tollervey et al., 2012]. La coordinazione di questi eventi porta ad un complessivo profilo epigenetico che fornisce il suo contributo per l'attuazione del programma trascrizionale.



Livelli di regolazione epigenetica (Jones et al., 2008)

La metilazione del DNA

La metilazione è una modificazione biochimica del DNA che prevede il trasferimento di un gruppo metile da una molecola donatrice al DNA ed è presente in una notevole varietà di organismi nei quali opera in modo diverso. Nei procarioti la metilazione avviene sia sull'adenina che sulla citosina ed ha una funzione di difesa permettendo alla cellula di riconoscere il DNA esogeno poiché non metilato e degradarlo. Nel genoma dei mammiferi la metilazione interessa la citosina dei dinucleotidi citosina-guanina (CpG) e il suo ruolo è vario. Tale fenomeno sembra essere coinvolto in svariati processi quali ad esempio l'inattivazione del cromosoma X, l'imprinting genomico, la soppressione di elementi ripetitivi, il mantenimento dell'integrità genomica e il controllo dell'espressione tessuto-specifica, tutti eventi accomunati dal silenziamento dell'espressione genica [Song et al., 2005; Jaenisch, 1997; Colot and Rossignol, 1999]. Inoltre la deregolazione di tale meccanismo può dare origine a differenti patologie come l'instabilità a livello dei centromeri, la sindrome di Rett, l'immunodeficienza, l'autoimmunità ed essere coinvolta nello sviluppo di diversi tipi di cancro [Jones and Laird, 1999].

Nel genoma dei vertebrati fra il 60% e il 90% dei dinucleotidi CpG è metilato e tende a essere soggetto a una deaminazione che converte le citosine in timidine generando un mismatch che può essere più o meno correttamente riparato [Cheung and Lau, 2005]. La metilazione è invece praticamente assente nelle cosiddette isole CpG, cluster di dinucleotidi presenti a livello di numerosi promotori di geni housekeeping o tessuto-specifici, contenuti nelle cellule eucariotiche. La metilazione delle isole CpG è rigidamente ed ereditariamente repressa.

Questa modificazione avviene ad opera di enzimi chiamati metiltrasferasi (DNMT) che hanno un ruolo chiave nel mantenimento dello stato di metilazione e nella metilazione *ex novo*. Finora sono stati identificati quattro enzimi: DNMT1, DNMT2, DNMT3a e DNMT3b ed è stato inoltre scoperto DNMT3L, stimolatore di DNMT3a e DNMT3b. Questi ultimi sono responsabili della metilazione *ex novo* e sono altamente espressi nelle cellule embrionali. Il loro ruolo chiave nello sviluppo è stato evidenziato da uno studio su topi, in particolare un doppio mutante defettivo per l'espressione di entrambi gli enzimi presentava un fenotipo letale a differenza di quanto osservato in assenza di uno solo dei due enzimi, situazione in cui si presentava un fenotipo meno aggressivo [Okano et al., 1999]. È dunque evidente che le funzioni di DNMT3a e DNMT3b sono parzialmente sovrapposte, tuttavia i due enzimi hanno compiti diversi: DNMT3b è responsabile della metilazione delle regioni satellite pericentromeriche [Okano et al., 1999], mentre DNMT3a risulta importante per la metilazione dei geni a singola copia, dei retrotrasposoni e nell'imprinting genomico durante lo sviluppo della linea germinale [Bestor et al., 2004; Kaneda et al., 2004]. L'enzima DNMT1, invece, riconosce il DNA emi-metilato ed è essenziale per conservare il pattern di metilazione nel corso delle successive divisioni cellulari [Hermann et al., 2004b]. La simmetria del sito di metilazione CpG implica l'ereditabilità di tale modificazione: quando la citosina su uno dei due filamenti è metilata, viene metilata anche la stessa base sul filamento complementare. Dopo la replicazione semiconservativa del DNA DNMT1 interviene per aggiungere gruppi metile al nuovo filamento neosintetizzato in corrispondenza della posizione in cui il filamento opposto è metilato [Santos et al., 2005]. Questa metilasi sembra interagire con PCNA, il fattore di processività della DNA polimerasi, il che contribuirebbe ad accoppiare il mantenimento dello stato di metilazione alla replicazione del DNA [Leonhardt et al., 1992; Chuang et al., 1997]. Tuttavia la cinetica di DNMT1 è minore di quella della polimerasi e pertanto sembra improbabile un'interazione stabile fra DNMT1 e PCNA, che sembrerebbe invece essere altamente dinamica [Maga et al., 2003; Schermelleh et al., 2007].

L'enzima DNMT2 è la metiltrasferasi più conservata, ma la sua funzione è ancora oggetto di dibattito. Diversi studi supportano l'idea che oltre all'attività di DNA metiltrasferasi, fra l'altro piuttosto debole, DNMT2 sia anche in grado di metilare i tRNA, avendo probabilmente cambiato substrato nel corso dell'evoluzione [Jeltsch et al., 2006; Goll et al., 2006].

La metilazione, seppure considerata a lungo una modificazione epigenetica stabile, è invece soggetta a una dinamica attiva e passiva. La demetilazione passiva si verifica per la mancata attività di mantenimento della DNMT1 durante la replicazione del DNA, in condizioni patogenetiche. La demetilazione attiva coinvolge la rimozione enzimatica di gruppi metile attraverso diversi

meccanismi come l'escissione della 5 metilcitosina (5meC) mediata dalla DNA glicosilasi, la deaminazione della 5meC a timina seguita da riparazione per escissione della base (BER) per correggere il mismatch guanina/timina o la rimozione diretta della 5meC attraverso la riparazione per escissione del nucleotide (NER). Risultano tuttavia necessarie ulteriori evidenze a conferma di questi ed altri meccanismi di demetilazione che sono stati ipotizzati.

La metilazione del DNA è generalmente associata alla repressione dell'espressione genica: la posizione e densità di citosine metilate lungo il gene sono aspetti critici nella regolazione dell'espressione [Boyes and Bird 1992; Hsieh 1994].

La metilazione può interferire con la trascrizione mediante diversi meccanismi. Questa modificazione può fisicamente interferire con il legame di fattori di trascrizione al DNA [Watt et al., 1988]; in alternativa i gruppi metile possono richiamare altre proteine (Metil Binding Proteins, MBP) che inibiscono la trascrizione, come alcuni fattori di rimodellamento della cromatina che possono apportare modifiche alle code istoniche determinando un riarrangiamento e un compattamento della cromatina. Ad esempio, la proteina di legame al CpG metilato (MeCP2) e le proteine correlate (MBDs) riconoscono il gruppo metile e richiamano l'enzima istone deacetilasi (HDAC) che deacetila specifici residui degli istoni, portando ad un conseguente rimodellamento della cromatina che diventa meno accessibile e dunque alla repressione dell'espressione genica [Jaenisch and Bird, 2003].

Modificazione delle proteine istoniche

L'interazione fra il DNA e gli istoni è influenzata dalle modificazioni post-traduzionali apportate alle code N-terminali degli istoni stessi. Queste code sono non strutturate e flessibili e pertanto facilmente accessibili da parte di enzimi in grado di modificarle covalentemente inducendo un effetto sulla struttura della cromatina in modo diretto o indiretto: queste modificazioni possono alterare l'affinità dell'interazione istone-DNA o fornire siti di legame per fattori di regolazione trascrizionale o di rimodellamento della cromatina [Luger, 2005].

Le modificazioni più studiate sono l'acetilazione, la metilazione e la fosforilazione sono state tuttavia descritte anche altre modificazioni quali l'ubiquitinazione, la SUMOilazione e l'ADP ribosilazione.

Diverse modificazioni possono essere apportate sullo stesso residuo e una stessa modificazione può interessare diversi residui. L'insieme di tali modificazioni è stato ipotizzato possa rappresentare un "codice istonico" che funge da segnale per i complessi di rimodellamento della cromatina in

risposta a un determinato stimolo [Jenuwein, 2001]. Tale codice viene “letto” da complessi proteici contenenti bromodomini o cromodomini, in grado di riconoscere gli aminoacidi acetilati o metilati, rispettivamente. Queste interazioni portano ad un rimodellamento della cromatina attraverso un meccanismo ATP-dipendente, che consente l’“apertura” dei promotori ed il legame di fattori di trascrizione oppure la formazione di una struttura altamente repressa, quale l’eterocromatina.

Ad esempio, l’acetilazione della lisina 8 dell’istone H4 rappresenta un segnale per il legame del bromodominio presente nell’enzima SWI/SNF, che rimodella la cromatina mediante un meccanismo ATP-dipendente [Peterson and Laniel, 2004]. Il legame del cromodominio della proteina eterocromatinica HP1 a residui lisinici metilati porta invece al reclutamento dell’enzima DNA metiltrasferasi (DNMTs) che metila il DNA. Tale modificazione richiama a sua volta sia gli enzimi istone metiltrasferasi, sia gli enzimi istone deacetilasi (HDAC) e l’insieme di tutti questi eventi porta alla repressione dell’espressione genica.

L’acetilazione degli istoni è un fenomeno dinamico: l’aggiunta di gruppi acetile da parte di enzimi acetiltrasferasi (HAT) è generalmente associata all’espressione genica, mentre la rimozione di gruppi acetile si accompagna alla condensazione della cromatina ed al conseguente silenziamento genico ed è mediata dall’enzima istone deacetilasi (HDAC) reclutato sul DNA da fattori trascrizionali [Hebbes et al. 1988]. Un dinamico bilanciamento nell’azione di queste due classi di enzimi fa sì che i livelli di acetilazione rispondano agli stimoli a cui la cellula è sottoposta.

Molti coattivatori (Gcn5/PCAF, CBP/p300, SRC-1, etc.) e corepressori (mSin3a, NCor/SmRT, NURD/Mi-2, etc.) coinvolti nella trascrizione posseggono un’attività acetiltrasferasica o deacetilasica così da collegare direttamente l’acetilazione degli istoni alla regolazione trascrizionale [Grant et al., 1998]. Gli enzimi HDAC sono raggruppati in quattro classi, quelli appartenenti alla classe I sono quelli più ampiamente espressi e risiedono stabilmente nel nucleo cellulare. La diversità degli enzimi HDACs, analogamente alle HATs, riflette la loro capacità di riconoscere specifici profili di acetilazione, con conseguente regolazione di determinati geni [Peterson, 2002]. Il meccanismo d’azione delle HDACs prevede l’interazione di tali enzimi con diversi complessi proteici che reprimono la trascrizione e determinano la specificità delle HDACs, attraverso il legame a specifiche sequenze che devono essere deacetilate [de Ruijter et al., 2003].

La deacetilazione dell’aminoacido lisina è spesso seguita dalla metilazione degli stessi residui aminoacidici e/o di residui ad essi adiacenti. Questo evento porta alla formazione di una struttura cromatinica chiusa ovvero trascrizionalmente repressa.

La metilazione può avvenire sia su residui di arginina che di lisina e ciascuno può essere mono-, bi- o tri-metilato [Bannister and Kouzarides, 2005]. Attualmente sono noti 17 residui di lisina e 7 residui di arginina soggetti a metilazione e ciò suggerisce l’esistenza di un cospicuo numero di

combinazioni, riconosciute in modo differente dalle proteine associate alla cromatina (CAPs) e quindi coinvolte in diversi *signalling*. Questo fa sì che la metilazione possa essere coinvolta sia nel silenziamento che nell'attivazione genica a seconda dei casi. La metilazione è sempre stata considerata una modificazione irreversibile, ma da studi più recenti è emersa l'esistenza di demetilasi che ad oggi sono oggetto di ulteriori studi [Shi et al., 2004; Anand and Marmorstein, 2007].

I microRNA

Il concetto di epigenetica è stato recentemente esteso a meccanismi basati su RNA compresi quelli regolati da piccoli RNA non codificanti come i microRNA. Queste molecole di 19-22 nucleotidi regolano negativamente l'espressione genica sequestrando specifici RNA messaggeri bersaglio o promuovendone la degradazione [He ed Hannon, 2004; Kim et al., 2005].

I microRNA risultano conservati tra specie evolutivamente vicine, ma esistono omologhi anche in specie più distanti, suggerendo che la loro funzione potrebbe essersi conservata nelle linee evolutive animali [Lim et al., 2003].

E' stato di recente dimostrato il loro ruolo cruciale nella regolazione di importanti processi fisiologici quali lo sviluppo, la proliferazione, il differenziamento, l'apoptosi, la risposta a differenti segnali extracellulari e di stress, il metabolismo e la morfogenesi del sistema nervoso, cardiovascolare e immunitario [Ambros et al., 2004; Kloosterman et al., 2006; Herranz et al., 2010]. Inoltre, numerosi studi negli ultimi anni hanno dimostrato il coinvolgimento dei miRNA in diverse patologie cardiovascolari come l'ipertrofia cardiaca [Catalucci et al., 2009], neurologiche come l'Alzheimer [Lukiw et al., 2007], nello sviluppo di obesità e diabete [Xie et al., 2009], ma soprattutto in diverse forme di cancro [Esquela-Kerscher, 2006; Beezhold et al., 2010].

La scoperta del primo microRNA risale al 1993 quando mediante studi sul nematode *Caenorhabditis elegans* venne identificato un piccolo RNA non codificante in grado di inibire nelle prime fasi dello sviluppo larvale l'espressione della proteina Lin-14 legandosi al suo mRNA e in particolar modo alla regione 3' UTR [Lee et al., 1993; Ha et al., 1996; Wightman et al., 1993; Moss et al., 1997]. Solo negli ultimi anni i miRNA sono entrati a far parte del complesso circuito della biologia cellulare, rivelando il loro ruolo chiave come modulatori dell'espressione genica. Attualmente, centinaia di miRNA sono stati predetti in animali, piante e virus attraverso differenti approcci. Solo nell'uomo sono stati individuati e validati sperimentalmente 721 miRNA, come riportato dal database miRBase (<http://www.mirbase.org>), che sulla base di ricerche bio-

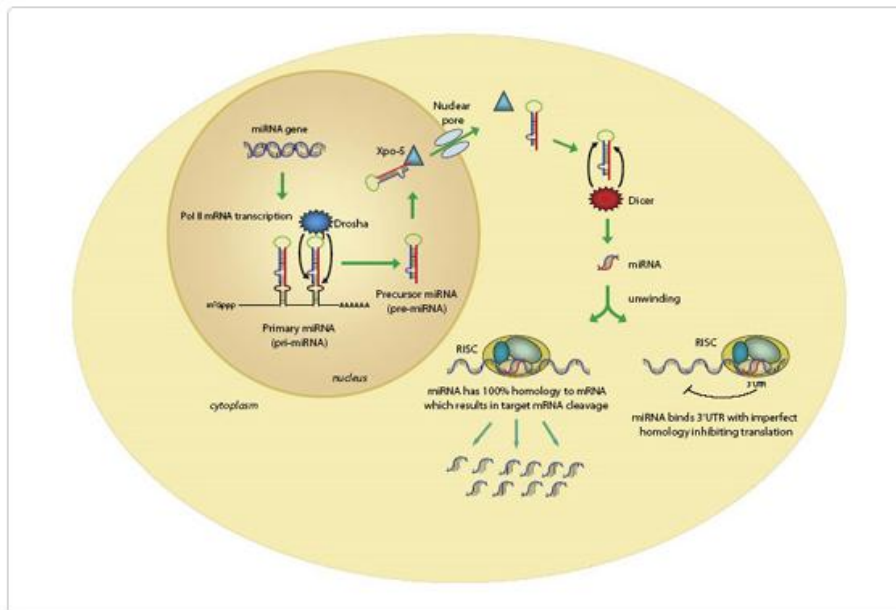
informatiche sembrano regolare dal 30% al 60% dei geni codificati dal genoma umano [Lewis et al., 2005; Friedman et al., 2009].

I geni per i microRNA possono essere localizzati nel genoma singolarmente o in cluster, trascritti come singola unità trascrizionale policistronica; possono essere sintetizzati a partire da regioni intergeniche (circa il 70%) o da sequenze introniche o esoniche di specifici geni [Kim et al., 2006; Rodriguez et al., 2004].

Biogenesi e ruolo biologico dei microRNA

La maggior parte dei microRNA viene trascritta dalla RNA polimerasi II sotto forma di lunghi trascritti primari caratterizzati da una complessa struttura a forcina, i pri-miRNA, di lunghezza variabile fino anche a diverse migliaia di basi. L'endonucleasi RNase III Drosha e il suo cofattore DGCR8 processano il pri-miRNA in pre-miRNA della lunghezza di 70-100 nucleotidi. Questi precursori, con la mediazione dell'Esportina 5, vengono esportati dal nucleo al citoplasma, dove uno step ulteriore di maturazione mediato dall'RNasi III Dicer genera un RNA a doppio filamento della lunghezza di circa 22 nucleotidi (miRNA/miRNA*) contenente sia il filamento che costituirà il microRNA maturo (miRNA) che il suo complementare (miRNA*) [He & Hannon, 2004]. Tale dsRNA viene legato dalle proteine Argonaute ed incorporato nel complesso proteico noto come "complesso che induce il silenziamento di RNA" (RISC). A questo punto, uno dei due filamenti (il filamento guida o miRNA) rimane legato alle proteine Argonaute e costituirà il miRNA maturo, mentre l'altro filamento sarà sottoposto a degradazione [Schwarz *et al.*, 2003; Khvorova *et al.*, 2003]. La stabilità termodinamica di entrambe le estremità del dsRNA è fondamentale per determinare quale sarà il filamento guida.

All'interno del RISC il miRNA maturo può appaiarsi con la sua estremità 5' (sequenza "seed") a sequenze complementari presenti in RNA messaggeri target, generalmente nella loro regione 3'UTR, e così ne regola l'espressione genica a livello post-trascrizionale. La regolazione da parte dei miRNA avviene attraverso due differenti meccanismi d'azione che variano a seconda della complementarità presente tra il microRNA ed il suo bersaglio: in presenza di una complementarità del 100%, l'appaiamento del microRNA determinerà la degradazione dell'mRNA target, meccanismo che avviene più di frequente nelle piante; quando invece la complementarità è imperfetta, l'appaiamento del microRNA al suo bersaglio porta al blocco della traduzione, senza degradazione ma generalmente con il sequestro dell'mRNA, meccanismo che avviene più di frequente negli animali.



Biogenesi dei microRNA

Identificazione di microRNA

Parallelamente al crescente interesse per il ruolo regolatorio dei microRNA è cresciuta la necessità di approcci validati che permettano di studiarne l'espressione e la funzione biologica.

L'identificazione è stata inizialmente basata sullo screening genetico con la costruzione di librerie a cDNA [Landgraf et al., 2007; Cummins and Velculescu, 2006]. La tecnica consiste nel frazionamento degli RNA cellulari mediante elettroforesi, seguito dal recupero della frazione a basso peso molecolare (≈ 20 nt) alla quale vengono legati adaptor all'estremità 3' e 5'. Questi RNA sono sottoposti a RT-PCR e i prodotti dell'amplificazione vengono clonati in vettori, generando così una libreria a cDNA che è sottoposta a sequenziamento. L'approccio in questione permette l'identificazione di microRNA *ex novo*, tuttavia presenta alcune limitazioni quali la difficoltà di identificare microRNA espressi a basso livello e la resistenza di alcuni microRNA ad essere clonati. I dati ottenuti richiedono l'integrazione con approcci bioinformatici per determinare l'origine genomica delle sequenze identificate, verificare che tali regioni codifichino per strutture ad hairpin e valutare se tali strutture sono conservate in altre specie. Una complicazione è data dal fatto che negli eucarioti le strutture ad hairpin sono comuni e diffuse nel genoma e inoltre non rappresentano l'unico requisito per i precursori dei microRNA [Lau et al., 2001; Lee et al., 2001].

Una recente alternativa al dispendioso sequenziamento capillare delle librerie a cDNA [Cummins et al. 2006; Pfeffer et al. 2005] è data dalla crescente disponibilità di piattaforme per il "deep sequencing" [Lu et al. 2007; Shendure and Ji, 2008], che permettono un massivo sequenziamento in

parallelo generando milioni di sequenze di microRNA a partire da un singolo campione. L'identificazione di microRNA mediante l'utilizzo delle piattaforme di deep sequencing ha il vantaggio, rispetto all'uso di altre metodiche, di rilevare anche microRNA espressi a basso livello o che mostrano una minima differenza fra i campioni analizzati, permette inoltre quantificazione assoluta e l'identificazione di nuove specie di microRNA. Esistono attualmente diverse piattaforme, come ad esempio Roche 454 e Illumina's Solexa6 che si distinguono per l'utilizzo di diversi sistemi di amplificazione e di sequenziamento. Parallelamente all'evoluzione delle tecniche di sequenziamento che generano una enorme mole di dati si sono evoluti programmi bioinformatici per l'interpretazione di tali risultati, come miRDeep, deepBase, miRExpress e miRanalyzer [Yang, J.H Shao, P., Zhou, H., Chen, Y.Q. & Qu, L.H. deepBase: a database for deeply annotating and mining deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38, D123-130. 55. Friedlander, M.R., et al. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat Biotechnol* 26, 407-415 (2008). 56. Wang, W.C., et al. miRExpress: analyzing high-throughput sequencing data for profiling microRNA expression. *BMC Bioinformatics* 10, 328 (2009). 57. Hackenberg, M., Sturm, M., Langenberger, D., Falcon-Perez, J.M. & Aransay, A.M. miRanalyzer: a microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. *Nucleic Acids Res* 37, W68-76 (2009). 58. Heid, C.A., Stevens].

Un ulteriore approccio classicamente utilizzato per valutare l'espressione di microRNA già annotati è l'analisi mediante Northern Blot [Sempere et al., 2004; Pall and Hamilton, 2008], metodica che prevede il frazionamento degli RNA su gel, il trasferimento dell'RNA su membrana e l'ibridazione con specifiche sonde marcate radioattivamente o con fluorocromi. Tuttavia questo metodo risulta piuttosto dispendioso in termini di tempo, richiede grandi quantità di materiale e fornisce solamente informazioni semiquantitative. L'introduzione di sonde a LNA ha permesso passi in avanti per l'ottimizzazione della metodica: la maggiore stabilità termica dell'LNA permette l'utilizzo di una più elevata temperatura di ibridazione e quindi una maggiore sensibilità e più rapidi tempi di sviluppo [Varallyay et al., 2008].

Lo studio dei miRNA è stato facilitato dall'avvento di tecniche highthroughput come ad esempio i microarrays [Krichevsky et al., 2003b]. In tale metodica l'RNA estratto viene marcato con fluorofori o biotina e ibridato su un array contenente sonde per diversi microRNA conosciuti, consentendo l'analisi di migliaia di campioni in un solo giorno e valutando la presenza di un'elevato numero di microRNA contemporaneamente. Un limite di tale metodica è dato dall'elevata quantità di materiale richiesto per il saggio e pertanto la pre-amplificazione mediante RT-PCR è spesso necessaria [Schmittgen et al., 2008]. Inoltre dal momento che l'affinità di legame è diversa per i diversi duplex microRNA-sonda, a una specifica temperatura di ibridazione utilizzata

per il saggio le sonde con T_m inferiore mostreranno un segnale ridotto, mentre quelle con T_m superiore mostreranno una minore specificità. L'analisi mediante microarray non dovrebbe essere utilizzata quindi per una valutazione quantitativa dei miRNA, ma per un confronto fra due diverse condizioni sperimentali; i dati ottenuti dovrebbero essere considerati come una guida e confermati mediante altri metodi.

Per la validazione dei dati ottenuti dai microarray viene particolarmente utilizzata la RealTime PCR [Shi et al., 2005; Benes et al., 2010; Varkonyi-Gasic et al., 2007]. Questa tecnica offre diversi vantaggi come l'elevata efficienza, la limitata quantità di campione richiesto per l'analisi, i costi ridotti e la capacità di rilevare anche microRNA espressi a basso livello. Esistono principalmente due approcci per la retro-trascrizione dei microRNA. I microRNA possono essere retrotrascritti utilizzando primer stem-loop che hanno una corta regione a singolo filamento complementare al 3' del microRNA e una regione a doppio filamento che rappresenta la sequenza universale. Il primer stem-loop permette di discriminare fra i microRNA e i pre-microRNA, genera infatti un ingombro sterico che impedisce il legame al precursore. Il prodotto di retrotrascrizione è poi usato come stampo per l'amplificazione con un primer microRNA specifico e un primer universale. Un secondo approccio si basa invece sull'aggiunta di un poli(A) al 3' dei microRNA; un primer costituito da un poli(T) e da una sequenza universale si appaia alla "coda" dei microRNA ed è utilizzato per la sintesi del cDNA e per la successiva fase di amplificazione insieme a un primer microRNA-specifico.

Un ulteriore approccio high-throughput è basato sull'utilizzo di biglie in citometria a flusso [Lu et al., 2005], metodo che grazie all'ibridazione in soluzione permette un'elevata specificità distinguendo fra microRNA correlati. I microRNA estratti sono sottoposti a ligazione con "adattatori" ad entrambe le estremità e ad amplificazione e marcatura con biotina mediante RT-PCR. I prodotti sono ibridati con biglie fluorescenti che portano sonde specifiche per i microRNA e vengono analizzati al citometro.

La rilevazione dei microRNA avviene anche mediante ibridazione in situ che permette una determinazione semi-quantitativa dei microRNA e la loro localizzazione nei tessuti [Kloosterman et al., 2006; Wienholds et al., 2005]; tuttavia le ridotte dimensioni di queste molecole rendono problematica tale applicazione. La recente introduzione di sonde a LNA ha permesso lo sviluppo di sistemi automatizzati per l'analisi di tessuti fissati in formalina o inclusi in paraffina.

L'ondata iniziale di clonazioni con la conseguente identificazione di nuovi microRNA ha permesso di definire una serie di segni distintivi circa la struttura di queste molecole, dando così slancio allo studio computazionale e alla ricerca mediante appositi software di sequenze genomiche da cui

possano avere origine i microRNA [Berezikov et al., 2005; Bentwich et al., 2005]. Sono stati sviluppati numerosi metodi computazionali per la predizione dei microRNA, ciascuno dei quali è generalmente seguito da validazione sperimentale dei candidati microRNA. I metodi sono classificati sulla base dei criteri utilizzati per la predizione: la maggior parte degli approcci utilizza le informazioni relative alla struttura secondaria, visto che i microRNA derivano da precursori con una struttura ad hairpin e questa rappresenta una delle principali caratteristiche dei pre-microRNA; molti software utilizzano il concetto di conservazione filogenetica, sia della sequenza che della struttura, per discriminare potenziali candidati da hairpin irrilevanti; altri metodi ancora valutano la termostabilità dell'hairpin, la similarità di sequenza e struttura e la posizione genomica rispetto a microRNA annotati.

I primi metodi computazionali sviluppati per la predizione dei microRNA si basavano sui criteri di conservazione, come ad esempio MirScan che identifica hairpin candidate sulla base della loro similarità con microRNA sperimentalmente validati. Altri software basati sul principio di conservazione sono Snarloop e MirSeeker, quest'ultimo riconosce pattern di conservazione dati ad esempio da una sequenza "loop" più divergente e una porzione "stem" più conservata. La stabilità termodinamica della struttura secondaria è un altro aspetto utilizzato per discriminare microRNA da altre hairpin, basato sul fatto che i microRNA, a differenza dei tRNA e rRNA, sembrano avere basse energie di folding [Bonnet et al., 2004]. RNAz è un software che combina i criteri di stabilità termodinamica e di conservazione della struttura secondaria per predire candidati microRNA [Washietl et al., 2005]. Recentemente si sono diffusi metodi basati sull'allineamento per identificare microRNA omologhi a quelli già noti [Legendre et al., 2005; Wang et al., 2005]; questi software ricercano sequenze genomiche che possono essere allineate a microRNA precedentemente caratterizzati sia in termini di sequenza che di struttura. Programmi bioinformatici basati sul criterio di conservazione e sulla ricerca di omologia con microRNA noti non permettono di identificare microRNA non conservati e al fine di superare questo limite sono stati sviluppati metodi *ab initio* che sfruttano solo criteri strutturali intrinseci dei microRNA per la predizione [Sewer et al., 2005; Xue et al., 2005]. Ciascuno di questi approcci determina dei "classificatori", caratteristiche che misurano quanto un microRNA è simile a microRNA noti. Mediante algoritmi di "apprendimento automatico" viene costruito un modello basato su un set di sequenze modello positive e negative che assegna un peso ai diversi "classificatori" la cui somma fornisce un punteggio complessivo che si traduce in un ottimale separazione fra risultati positivi, candidati microRNA, e risultati negativi. Un altro approccio è basato sull'analisi delle sequenze genomiche intorno a quelle codificanti per microRNA noti, dal momento che molti microRNA tendono ad essere organizzati in cluster.

Metodi per la predizione dei target

L'individuazione dei bersagli e dei pathway molecolari regolati dai microRNA rappresenta uno step fondamentale per far luce sull'ampio spettro di azioni biologiche esercitate dai microRNA. Nelle cellule animali c'è una parziale complementarietà fra microRNA e target e pertanto nei genomi esiste un'elevata quantità di possibili sequenze bersaglio. È quindi importante identificare quelle regioni che hanno maggiore probabilità di rappresentare dei target per i microRNA.

Lo sviluppo di metodi computazionali per la predizione di target rappresenta un attivo campo di studio; sono numerosi gli approcci emergenti e si basano su diversi presupposti.

Un criterio utilizzato per l'identificazione di target è la richiesta di un perfetto appaiamento nella regione "seed" (nucleotidi 2-8) al 5' del microRNA: siti target con perfetta complementarietà nella regione seed tendono ad essere conservati fra specie diverse e sembrano essere più affidabili [Lewis et al., 2003]. Inoltre è stato osservato sperimentalmente che l'appaiamento della sola regione "seed" è sufficiente in vitro per reprimere il gene target [Farh et al., 2005], poichè la regione seed è inclusa nel complesso RISC ed è responsabile dell'appaiamento all'mRNA target [Ameres et al., 2007].

Un secondo criterio si basa sul concetto che regioni target conservate fra specie sono più affidabili [Brennecke et al., 2005] e questo principio è stato incluso come filtro in diversi software di predizione [Krek et al., 2005; Lall et al., 2006; Grimson et al., 2007]. Questo criterio permette di aumentare la specificità della predizione, ma determina la perdita di alcuni target specie-specifici. Un'applicazione opposta del principio di conservazione è data dall'identificazione di nuovi microRNA partendo dall'analisi delle regioni 3'UTR conservate [Xie et al., 2005].

Un'altro presupposto per l'identificazione di sequenze target si basa sul fatto che negli animali queste sono principalmente localizzate nella regione 3'UTR degli mRNA: si ipotizza che data l'interferenza fra il macchinario di traduzione e quello coinvolto nella repressione, siti target nelle regioni codificanti non sarebbero funzionali. Tuttavia esistono dati discordanti che testimoniano la presenza di siti target nella regione 5'UTR e nella regione codificante [Tay et al., 2008; Axtell and Bowman, 2008; Brodersen and Voinnet, 2009; Breving and Esquela-Kerscher, 2009].

Un'ulteriore criterio utilizzato da diversi software è la riduzione dell'espressione dei geni target da parte dei microRNA: in un numero crescente di studi i microRNA sembrano influenzare l'espressione dei geni target a livello dei trascritti mediante un meccanismo di espressione esclusiva mutuale [Stark et al., 2005] o per degradazione e decadimento dell'mRNA bersaglio [Wu and Belasco, 2008]. Diversi approcci computazionali usano i dati di coespressione dei microRNA e dei geni target a supporto della predizione [Huang et al., 2007; Gennarino et al., 2009].

Alcuni dei programmi di predizione dei target più usati sono PicTar [Krek et al., 2005], MiRanda [John et al., 2004] e TargetScan [Lewis et al., 2005].

Il software TargetScan combina la predizione di struttura dell'eteroduplex miRNA-mRNA, basata sulla termodinamica, con un'analisi comparativa di sequenza, basata sul concetto di conservazione tra specie.

Il software miRanda si compone di tre fasi fondamentali: l'identificazione di una sequenza che può essere legata dal miRNA; il calcolo della energia libera per la formazione dell'eteroduplex miRNA-mRNA; l'analisi della conservazione evolutiva.

Con il software PicTar invece l'mRNA bersaglio viene prima predetto in base a una ottimale energia libera di legame e poi testato statisticamente usando un allineamento col genoma di otto vertebrati per filtrare i falsi positivi.

L'analisi in silico viene affiancata per i diversi software da un'analisi funzionale in vitro, al fine di dimostrare l'effettiva regolazione dei geni bersaglio da parte dei miRNA, e da studi con geni reporter, al fine di dimostrare l'interazione diretta tra il miRNA ed il sito complementare presente nell'mRNA bersaglio.

Epigenetica e Virus

Negli ultimi decenni l'interesse per i meccanismi epigenetici è stato promosso dall'evidente coinvolgimento di questi fenomeni in un elevato numero di processi biologici come la regolazione dell'espressione genica, l'imprinting, i riarrangiamenti del DNA, il silenziamento a livello della linea germinale, lo sviluppo e la stabilità cromosomica.

La costante esposizione degli esseri umani ai fattori ambientali influenza il loro genoma mediante meccanismi epigenetici. I virus si pensa abbiano un ruolo centrale nel modulare lo scenario epigenetico delle cellule infettate e conoscere l'impatto dell'infezione sul controllo epigenetico delle cellule ospiti è alla base di una migliore comprensione dell'interazione virus-cellula.

I virus usano i fattori di trascrizione e i regolatori epigenetici cellulari in modo tale da regolare la propria espressione genetica e quella dell'ospite. Oggi è noto ad esempio che alcuni virus usano meccanismi epigenetici per l'evasione dalla risposta immunitaria così da sopravvivere e propagarsi nell'ospite e che virus oncogeni spesso deregolano meccanismi epigenetici cellulari silenziando oncosoppressori e/o attivando oncogeni cellulari o virali.

Allo stesso tempo le cellule animali usano meccanismi epigenetici per tenere sotto controllo ed eliminare le infezioni virali. In sintesi, i processi epigenetici sono coinvolti nella maggior parte delle

interazioni virus-cellula.

Il ruolo della cromatina nella biologia virale dipende in grande misura dallo stile di vita del virus, tuttavia per tutti i virus che attraversano il nucleo l'interazione con la cromatina è inevitabile.

I virus a DNA che stabiliscono persistenza nei tessuti usano per replicarsi il macchinario cellulare e tendono ad avere una struttura cromatinica simile ai cromosomi cellulari, a differenza dei virus capaci di un'attiva replicazione che usano un macchinario di replicazione virale e tendono ad avere una composizione in nucleosomi eterogenea. I virus ad integrazione come l'HIV utilizzano differenti strategie nelle diverse fasi come ad esempio durante l'integrazione e la riattivazione. Infine i virus a RNA non formano strutture nucleosomali, ma possono a loro volta associarsi con la cromatina cellulare durante la replicazione e la trascrizione.

Il genoma di SV40 e del poliomavirus è assemblato in minicromosomi al termine del loro processo replicativo e visto che questi virus usano il macchinario replicativo cellulare si suppone che questi minicromosomi vengano assemblati con un meccanismo simile all'assemblamento dei nucleosomi sui cromosomi cellulari [Waga, S. et al., 1998].

L'Adenovirus invece codifica per la propria polimerasi e per proteine virali che promuovono la condensazione del genoma necessaria all'incapsidazione [de Jong, R.N. et al., 2003], tuttavia nelle prime fasi di replicazione nel nucleo il virus non sfugge all'assemblamento dei nucleosomi [Tate, V.E. and Philipson, L., 1979; Mirza M.A. and Weber J., 1982] che sembrerebbero necessari per il controllo temporale dell'espressione genica virale e per la stabilità del genoma nel corso dell'infezione persistente. I nucleosomi sono poi rimossi prima dell'incapsidazione del genoma nelle nuove particelle virali. Analoghe caratteristiche si osservano nel caso degli herpesvirus [Kent, J.R. et al., 2004]. Durante la fase acuta dell'infezione da parte dell'HSV i nucleosomi non formano una struttura ordinata come nella cromatina cellulare, ma gli istoni si associano con le regioni regolatorie a monte dei geni e presentano modificazioni post-traduzionali caratteristiche dei geni in attiva trascrizione (acetilazione della lisina 14 dell'istone H3, metilazione della lisina 4 e assenza di metilazione della lisina 9). La formazione di una struttura cromatinica permissiva è mediata dalla proteina VP16, importante attivatore dei geni IE che recluta l'apparato cellulare richiesto per modellare i nucleosomi che altrimenti inibirebbero la trascrizione nelle prime fasi. Nella fase latente, invece, il DNA di HSV assume una struttura più tipica della cromatina cellulare [Deshmane, S.L. and Fraser, N.W. (1989)]. La trascrizione di buona parte dei geni è silenziata ad eccezione del gene associato alla latenza LAT e si crede che durante questa fase la cromatina abbia un importante ruolo nel separare le regioni attive da quelle trascrizionalmente inattive, come testimoniano le modificazioni istoniche osservate in diversi studi [Kubat, N.J. et al., 2004]: le

regioni intorno al promotore LAT sono ricche di modificazioni tipiche della cromatina attiva, come l'acetilazione della lisina 9 e 14 dell'H3, rispetto ai geni non trascritti. Tali modificazioni sono state osservate anche nell'esone 5' a valle del promotore LAT che funziona da enhancer per la trascrizione di tale gene e mantiene uno stato permissivo della cromatina.

I virus che possono dare vita a infezioni a lungo termine (HBV, papillomavirus, herpesvirus) sembrano condividere analoghi meccanismi per il mantenimento del loro genoma allo stato episomiale all'interno della cellula, come la capacità di legare i cromosomi cellulari. È stato ad esempio identificato il fattore cellulare Brd4 associato alla cromatina che può fungere da recettore per la proteina E2 di HPV [You, J. et al., 2005], responsabile del mantenimento del genoma virale all'interno della cellula. I dettagli di questo meccanismo sono ancora oggetto di studio, ma eventi analoghi sono stati ipotizzati anche per EBV e KSHV [Sugden, B. and Leight, E.R., 2001].

Inoltre durante la latenza il genoma virale è generalmente assemblato in struttura nucleosomali simili a quelle della cromatina cellulare, ma ci sono alcune eccezioni come nel caso dell'origine di replicazione (OriP) dell'EBV. Nel corso della latenza, la proteina virale EBNA1 si lega alle ripetizioni in tandem presenti nell'OriP e tale legame risulta critico per la replicazione del DNA virale. Probabilmente, come osservato in vitro, il legame a OriP da parte di EBNA1 è mediato dalla sua capacità di destabilizzare il legame dei nucleosomi, che quindi risultano posizionati lateralmente rispetto al sito di legame della proteina [Avolio-Hunter et al., 2001; Wensing, B. et al., 2001].

Inoltre per i virus che stabiliscono latenza la struttura della cromatina contribuisce al mantenimento della quiescenza mediante soppressione dei geni litici: sia in EBV che in KSHV, i geni IE sembrano essere inibiti dalla deacetilazione istonica e dall'occlusione da parte dei nucleosomi nei siti di inizio trascrizione.

I virus a integrazione, invece, devono rompere la struttura della cromatina cellulare sia nella fase di integrazione che di riattivazione, tuttavia la comprensione di tale fenomeno è ancora incompleta [Pryciak, P.M. and Varmus, H.E., 1992; Pruss, D. et al., 1994]. Nel caso dell'HIV, l'integrasi lega il complesso BRG1 di rimodellamento dei nucleosomi che altera l'interazione fra nucleosomi e DNA e stimola l'integrazione virale [Kalpana, G.V. et al., 1994]; inoltre l'integrasi interagisce con l'acetiltrasferasi p300 di cui ne rappresenta un substrato. Questi dati mostrano come l'acetilazione degli istoni e dell'integrasi siano necessarie per l'integrazione virale [Cereseto, A. et al., 2005] e suggeriscono che la struttura compatta della cromatina potrebbe limitare l'integrazione virale.

Inoltre l'integrazione coinvolge la formazione di rotture del DNA a doppio filamento del cromosoma cellulare. La cromatina che circonda rotture a doppio filamento è generalmente arricchita nella variante istonica H2AX fosforilata [Jackson, S.P., 2002; Daniel et al., 2004];

tuttavia l'integrazione non è dipendente da H2AX poichè in alcuni studi è stata riscontrata integrazione virale anche in topi in cui tale variante istonica non era espressa.

Il silenziamento del genoma integrato mediato dalla struttura cromatinica sembra essenziale per lo stabilirsi di un'infezione latente e può avvenire nelle prime fasi dell'integrazione con meccanismi tipicamente cellulari [Williams, S.A. and Greene, W.C., 2005].

Il completamento del ciclo virale richiede la riattivazione del genoma integrato: la proteina TAT dell'HIV interagisce con fattori cellulari di rimodellamento della cromatina e di modificazione degli istoni, sottolineando l'importanza della manipolazione dei nucleosomi durante questa fase [Lusic, M. et al., 2003].

Esiste qualche evidenza circa l'interazione dei virus a RNA con gli istoni e un esempio è rappresentato dal virus dell'influenza [Garcia-Robles, I. et al., 2005]. Il complesso ribonucleoproteico (vRNP) insieme alla proteina della matrice (M1) vengono trasportati nel nucleo dove avviene la replicazione e la trascrizione. Le vRNPs risultano associate inizialmente alla cromatina cellulare e vengono rilasciate solo in un secondo momento probabilmente per effetto di un'interazione fra i nucleosomi e la proteina M1; questa lega le nuove molecole genomiche sintetizzate e ne facilita il trasporto indietro nel citoplasma [Zhirnov, O.P. and Klenk, H.D., 1997]. Questi studi suggeriscono che sia i virus a DNA che quelli a RNA devono mediare con la struttura cromatinica il completamento del loro ciclo vitale.

Un crescente numero di studi mostra come la metilazione dei siti CpG possa fortemente influenzare il ciclo vitale di diversi virus a DNA, anche se il ruolo esatto di tale fenomeno nel corso dell'infezione naturale non è ancora del tutto chiaro. Gli effetti della metilazione variano a seconda del virus e dipendono da svariati fattori. Si osservano differenze fra il ruolo che ha assunto nel corso dell'evoluzione per virus attivamente replicanti e virus in grado di integrarsi nel genoma della cellula. I primi sono spesso non metilati o ipo-metilati mentre i secondi mostrano una metilazione regolata e specifica. Differenze si osservano anche fra i virus di grandi dimensioni e i virus di piccole dimensioni, in base al diverso sito di replicazione e alla diversa capacità di codificare per il proprio macchinario replicativo e per proteine in grado di modulare i processi cellulari e la risposta immunitaria. Pertanto è necessario prendere in considerazione i singoli virus per analizzare la dinamica dello stato di metilazione e i suoi effetti sia sul virus che sulla cellula.

L'avanzamento delle tecniche ha permesso uno studio via via più dettagliato dello stato di metilazione fino a consentire un'analisi della distribuzione genomica dei siti di metilazione.

Per quanto concerne gli Adenovirus i primi studi basati su cromatografia e tecniche radioattive hanno mostrato che l'adenovirus di tipo 2 e 12 in attiva replicazione presentano una metilazione minima o assente [Gunthert et al., 1976], risultati confermati successivamente da studi basati su

endonucleasi metilazione-sensibili e da sequenziamento associato a trattamento con bisolfito [Vardimon et al., 1980; Wienhues et al., 1985; von Acken et al., 1979]. Molti studi inoltre si sono focalizzati sull'integrazione del genoma adenovirale per il suo potenziale oncogenico: il DNA integrato risulta metilato, ma la regolazione di tale fenomeno è ancora poco nota.

Risultati analoghi sono stati osservati per i polyomavirus [Winocour et al., 1965; Danos et al., 1980].

Il processo in base al quale i virus a integrazione sono de novo metilati è solo parzialmente compreso, ma è chiaro che il fenomeno è influenzato da diversi aspetti quali il momento e il sito dell'integrazione, dalla sequenza integrata e dal tipo cellulare [Orend et al., 1995; Hertz et al., 1999; Doerfler et al., 2005]. La metilazione de novo tende a iniziare in regioni confinate e poi a espandersi attraverso il genoma virale, come per l'adenovirus 12, la cui metilazione parte nella regione centrale del DNA virale e successivamente si diffonde fuori in entrambi le direzioni [Orend et al., 1991; Doerfler et al., 1993]. Non è noto quali fattori inizino la metilazione e nemmeno i determinanti del pattern sequenziale di metilazione; tuttavia il pattern di metilazione sembra essere sito specifico: i geni tardivi virali sono generalmente più soggetti alla metilazione rispetto ai geni precoci [Vardimon et al., 1980], mentre i promotori dei virus integrati sono frequentemente ipometilati, come osservato per l'adenovirus 12 [Doerfler et al., 1981 ; Doerfler et al., 1991]. La metilazione dei geni virali, in particolar modo a livello dei promotori, sembra essere reversibile, ma i meccanismi mediante i quali vengono demetilati devono ancora essere determinati.

Gli Herpesvirus durante la fase litica presentano uno stato di metilazione diverso rispetto alla fase latente, ma le differenze non sono state finora approfondite poichè la maggior parte degli studi si è concentrata sulla latenza del virus. Inoltre esistono differenze anche fra le sottofamiglie di Herpesvirus [Takacs et al., 2001]: l'alphaherpesvirus HSV risulta non metilato sia durante la replicazione attiva che durante la fase di latenza [Low et al., 1969; Lundberg et al., 2003; Kubat et al., 2004]; il gammaherpesvirus EBV invece è scarsamente metilato o non metilato affatto durante il ciclo litico, ma altamente metilato durante la latenza [Szyf et al., 1985].

La metilazione gioca un ruolo chiave nel ciclo vitale dell'EBV, in particolar modo nella transizione dal ciclo di infezione litico a quello latente [Tao et al., 2003; Ambinder et al., 1999]. L'antigene nucleare dell'EBV (EBNA) è espresso per un breve periodo durante l'infezione litica, dopodiché la sua trascrizione viene silenziata attraverso un'ipermetilazione dei suoi promotori, evento critico per lo stabilirsi di uno stato di latenza. La riattivazione del virus è invece mediata dall'espressione di geni IE come Zta and Rta, regolati dai rispettivi promotori Zp and Rp, quest'ultimo ipermetilato nel corso della latenza, rappresenta un importante regolatore dello stato di quiescenza. L'EBV sembra usare il silenziamento indotto dalla metilazione come meccanismo di evasione del sistema

immunitario, dunque l'importanza della metilazione in questo caso è ampiamente accettata a differenza degli altri herpesvirus per i quali il ruolo di tale fenomeno è ancora sotto studio.

Nei piccoli virus a DNA i siti CpG sono sottorappresentati e le ragioni possono essere molteplici: è possibile che la metilazione della citosine sia almeno in parte responsabile per questa sottorappresentazione; la limitata presenza di siti CpG può essere stata selezionata per evitare la metilazione da parte degli enzimi cellulari e quindi per massimizzare l'efficienza della traduzione o per ridurre la risposta immunitaria CpG mediata [Karlin et al., 1994; Shackelton et al., 2006]. Tuttavia gli studi inerenti questo gruppo di virus risultano limitati. I meccanismi di metilazione sono stati studiati sul sierotipo 2 (AAV2) che, in assenza del virus helper, si integra nel cromosoma 19 con la mediazione della proteina Rep, che riconosce le guanine nei motivi ripetuti GCTC presenti nell'hairpin terminale del genoma. La metilazione in vitro di tali guanine sembra inibire in modo efficace l'interazione DNA-proteina interferendo con l'integrazione in vivo [Weitzman et al., 1994]. Risultati analoghi sono stati osservati anche per l'AAV4 [Amiss et al., 2003], tuttavia non sono noti ad oggi i dettagli circa la modalità e il ruolo della metilazione nel corso dell'infezione naturale.

Gli effetti della metilazione sembrano essere correlati per molti virus alla tempistica della trascrizione: la metilazione è frequentemente associata ad una abolizione della funzione dei promotori virali tardivi, mentre i promotori precoci tendono ad essere meno soggetti all'effetto di repressione dovuto alla metilazione. Per esempio la metilazione in vitro con HpaII dei geni precoci dell' SV40 non porta a una repressione trascrizionale e i siti metilati sono successivamente persi mediante l'attiva replicazione, mentre l'espressione dei geni tardivi può essere efficientemente inibita dalla metilazione in vitro nella regione 5' [Subramaniani et al., 1982; Fradin et al., 1982].

Inoltre la metilazione sito specifica può essere coinvolta nella transizione dalla fase litica alla latenza in alcuni casi come per l'EBV, mentre non sembra partecipare allo switch dall'espressione dei geni precoci a quelli tardivi in virus come l'HSV e l'Adenovirus 2 [Kubat et al., 2004; Kammer et al., 1995].

I microRNA rappresentano a loro volta un importante aspetto nell'interazione virus-ospite; l'interazione mediata dai microRNA può avvenire in diversi modi e può andare a vantaggio sia del virus che della cellula. Si è visto che i virus codificano per propri microRNA la cui biogenesi è simile a quella dei microRNA cellulari e con queste piccole molecole possono dirottare il macchinario cellulare dell'RNAi responsabile del silenziamento genico per interferire sia con la regolazione dei geni cellulari che dei geni virali. Il primo microRNA virale è stato scoperto nelle cellule B infettate da Epstein-Barr [Pfeffer et al., 2004]; ad oggi più di 200 microRNA virali sono identificati e annotati nel Database miRBase (<http://www.mirbase.org>).

| Virus Family | Subfamily/Genus | Name | Host | Number of pre-miRNAs | References |
|--------------|-----------------------------------|--------|--------------|----------------------|---|
| Herpesvirus | α/Simplexvirus | HSV-1 | Human | 6 | Cui et al. 2006; Umbach et al. 2008 |
| | | HSV-2 | Human | 3 | Tang et al. 2008, 2009 |
| | α/Mardivirus | MDV-1 | Avian | 14 | Burnside et al. 2006; Yao et al. 2008 |
| | | MDV-2 | Avian | 17 | Yao et al. 2007 |
| | β/Cytomegalovirus | hCMV | Human | 11 | Grey et al. 2005; Pfeffer et al. 2005 |
| | | mCMV | Murine | 18 | Buck et al. 2007; Dölken et al. 2007 |
| | γ ₁ /Lymphocryptovirus | EBV | Human | 25 | Pfeffer et al. 2004; Cai et al. 2006, Grundhoff et al. 2006; Zhu et al. 2009 |
| | | rLCV | Simian | 16 | Cai et al. 2006 |
| | γ ₂ /Rhadinovirus | KSHV | Human | 12 | Cai et al. 2005; Pfeffer et al. 2005, Samols et al. 2005; Grundhoff et al. 2006 |
| | | RRV | Simian | 7 | Schäfer et al. 2007 |
| MHV68 | | Murine | 9 | Pfeffer et al. 2005 | |
| Polyomavirus | | SV40 | Simian | 1 | Sullivan et al. 2005 |
| | | SA12 | Simian | 1 | Cantalupo et al. 2005 |
| | | MCV | Simian | 1 | Seo et al. 2009 |
| | | BKV | Human | 1 | Seo et al. 2008 |
| | | JCV | Human | 1 | Seo et al. 2008 |
| | | mPy | Murine | 1 | Sullivan et al. 2009 |
| Adenovirus | | hAV | Human | 1 | Aparicio et al. 2006; Sano et al. 2006 |
| Ascovirus | | HvAV | Lepidopteran | 1 | Hussain et al. 2008 |

MicroRNA virali noti (Umbach and Cullen, Genes and Development, 2009)

I microRNA hanno diverse caratteristiche che li rendono particolarmente vantaggiosi per i virus. Anzitutto possono agire su bersagli specifici corrispondenti a geni cellulari o virali deregolandoli e stabilendo un ambiente cellulare favorevole alla replicazione virale [Stern-Ginossar, N., et al., 2007; Sullivan, C.S., et al., 2005; Skalsky, R.L., et al., 2005]. In secondo luogo i microRNA sono piccoli e le dimensioni dei pre-microRNA (<200 nt) sembrano ben conciliarsi con le limitate dimensioni dei genomi virali [Cullen, B.R., 2004]. Infine i microRNA non sono antigenici a differenza delle proteine e pertanto permettono al virus di evadere la risposta immunitaria. Rappresentano quindi uno strumento ideale per i virus per infettare e stabilire eventualmente una persistenza nell'ospite agendo su mRNA virali e cellulari.

Finora la famiglia herpesviridae sembra generare il maggior numero di microRNA virali [Pfeffer, S., et al., 2005; Cai, X., et al., 2005; Pfeffer, S., et al., 2004]. Altri virus codificanti microRNA sono l'SV40 [Sullivan, C.S., et al., 2005] e l'adenovirus [Sano, M. et al., 2006], tutti virus nucleari a DNA. Questo è una diretta conseguenza del fatto che Drosha e DGCR8, necessari per il processamento dei precursori sono localizzati nel nucleo [Lee, Y., et al., 2003] e i virus che replicano esclusivamente nel citoplasma non hanno accesso a tale macchinario e perciò non possono esprimere miRNA anche nel caso in cui codifichino per precursori [Zeng, Y. and B.R. Cullen, 2002]. Inoltre visto che il processamento prevede la distruzione del pri-miRNA a eccezione del miRNA maturo [Cai, X., et al., 2004] è improbabile che virus a RNA possano codificare per microRNA visto che il processamento risulterebbe in una distruzione del genoma virale stesso. Un'altra considerazione sta nel fatto che i microRNA agiscono sui livelli di mRNA target: pur in presenza di una completa inibizione della traduzione da parte dei microRNA, il pool preesistente di proteine deve essere significativamente degradato prima che un effetto sul fenotipo sia evidente e il processo può richiedere più o meno tempo a seconda della stabilità della proteina target limitando

così i possibili benefici per il virus dati dall'effetto del microRNA. Alla luce di queste considerazioni i virus più probabilmente coinvolti nella sintesi di microRNA si può supporre siano virus a DNA nucleari capaci di un'infezione persistente o latente. Per il virus HIV la produzione di microRNA è stata proposta da diversi gruppi [Klase et al., 2007; Omoto et al., 2004; Ouellet et al., 2008], ma non è stata confermata da altri e perciò rimane ampiamente dibattuta [Lin et al., 2007; Pfeffer et al., 2005]. Allo stesso modo le cellule producono una ampia gamma di microRNA che non solo regolano funzioni cellulari ma permettono una difesa antivirale. È stato dimostrato che topi privati dell'espressione di Dicer sono ipersuscettibili all'infezione del virus della stomatite vesicolare (VSV) data la mancanza di microRNA cellulari (miR-24 e miR-93) capaci rispettivamente di downregolare l'espressione della proteina virale maggiore e della fosfoproteina [Otsuka, M., et al., 2007].

Per quanto riguarda i Parvovirus e in particolare il B19 due lavori pongono l'attenzione sul possibile ruolo dei miRNA nell'interazione fra il virus e le cellule target.

Alcuni studiosi hanno identificato e descritto piccoli *stretch* di omologia di circa 17-26 nt fra il genoma di diversi Parvovirus (B19, MVM, KRV, RPV) e i rispettivi ospiti (H.Sapiens, M.Musculus, R.Norvegicus); si tratta di piccole sequenze che si presentano per lo più in regioni intergeniche o in regioni non codificanti di geni cellulari coinvolti in specifici pathway, noti per avere un ruolo importante durante l'infezione virale come ad esempio la regolazione del citoscheletro, dell'adesione cellulare e il pathway WNT. Queste regioni di omologia sono inoltre conservate all'interno delle diverse specie di Parvovirus analizzate, a suggerire un probabile vantaggio del virus nel mantenimento di tali sequenze nel corso dell'evoluzione e che queste sequenze possano essere biologicamente rilevanti per la patogenesi [Kerr et al., 2006]. L'ipotesi è che queste sequenze possano essere sfruttate dal virus per promuovere la propria persistenza mediante ad esempio la regolazione dell'espressione dei geni dell'ospite sfruttando il macchinario dell'RNAi. La possibilità che queste regioni di omologia rappresentino sequenze capaci di codificare per microRNA richiede approfondimenti.

Un secondo studio ha investigato le ragioni della limitata produzione di proteine capsidiche di B19 in cellule non permissive, mettendo in evidenza il possibile ruolo della regione 3' UTR dei corrispondenti mRNA nel reprimerne la sintesi, inibendo il caricamento dei ribosomi [Morinet et al., 1997]. Seppure una successiva prova di ottimizzazione dei codoni con sostituzione dei codoni della regione 3'UTR con altri più frequentemente utilizzati nella cellula ha permesso un aumento della produzione delle proteine capsidiche [Zhi et al. 2010], tuttavia si ipotizza un possibile contributo dei microRNA cellulari nel limitare la produzione delle proteine strutturali agendo sui corrispondenti RNA messaggeri e nello specifico sulla regione 3'UTR [Berillo et al., 2012].

Lavoro sperimentale

Premessa e scopo del lavoro

L'attività svolta nel corso del Dottorato di Ricerca in Biotecnologie Cellulari e Molecolari ha riguardato lo studio di meccanismi di regolazione dell'espressione genica e della replicazione di Parvovirus B19 nel corso dell'infezione in vitro.

Il Parvovirus B19 è implicato in una molteplicità di situazioni patologiche nell'uomo; l'evolversi dell'infezione e le sue manifestazioni sono dipendenti dallo stato fisiologico dell'ospite e dall'entità della sua risposta immunitaria contro il virus. Il B19 può causare infezioni asintomatiche o patologie acute come l'eritema infettivo (quinta malattia) nei bambini, artralgie transitorie negli adulti, crisi aplastiche in pazienti con anemia emolitica, infezioni persistenti associate ad aplasia midollare cronica in individui immunocompromessi, inoltre in caso di infezione materna in gravidanza la trasmissione transplacentare del virus può portare a idrope e a morte fetale.

Il Parvovirus B19 mostra uno specifico tropismo per la linea eritroide del midollo osseo. Le cellule staminali non sono suscettibili all'infezione, mentre i target cellulari maggiormente permissivi alla replicazione virale sono i progenitori BFU-E, CFU-E e gli eritroblasti [Takahashi et al., 1990]. I progenitori eritroidi possono essere ottenuti dal midollo e coltivati in vitro come sistema permissivo per la replicazione del B19 [Ozawa et al., 1986; Ozawa et al., 1987]. Precursori eritroidi infettabili sono presenti anche nel sangue periferico [Schwarz et al., 1992], nel cordone ombelicale [Srivastava et al., 1992] e nel fegato fetale [Yaegashi et al., 1989].

La replicazione del B19 in linee cellulari è più ristretta; è stata ottenuta in cellule eritroleucemiche, le JK-1 [Takahashi et al., 1993], in cui è evidente un differenziamento eritroide, e in altre linee cellulari con caratteristiche megacarioblastoidi come le KU812Ep6 [Miyagawa et al., 1999], le UT7/Epo [Shimomura et al., 1992] e le UT7/Epo-S1, un subclone delle UT7/Epo [Morita et al., 2001]. Per queste ultime linee cellulari, l'uso di eritropoietina induce un differenziamento in senso eritroide, tale però da mantenere un fenotipo immaturo e permettere così il mantenimento dell'infezione in vitro per lungo tempo.

Tuttavia anche i sistemi cellulari permissivi consentono solo un grado ridotto di replicazione virale e pertanto non permettono di ottenere grandi quantità di virus infettante. L'analisi in vitro del Parvovirus B19 e della patogenesi molecolare ad esso associata è quindi limitata e vincolata dalla disponibilità di sieri altamente viremici.

Al fine di bypassare i limiti associati alla replicazione del virus in coltura e disporre di un sistema in vitro per lo studio del Parvovirus B19, cloni plasmidici virali sono stati oggetto di studio per valutare la loro funzionalità e la capacità di generare particelle virali infettanti, in grado a loro volta

di cominciare un nuovo ciclo replicativo. Un approccio analogo è stato utilizzato per altri virus della famiglia come gli AAV. Diversi laboratori si sono occupati della progettazione di cloni genomici di B19 capaci di mimare il comportamento del virus nativo, importanti sia come fonte ricombinante di particelle virali sia come sistema manipolabile in vitro per analisi genetiche finalizzate ad una migliore comprensione della biologia del virus e dell'interazione virus-cellula. Diversi tentativi sono stati esplorati, tuttavia il genoma di B19 è risultato di difficile manipolazione. Nei primi tentativi sono stati generati cloni genomici riarrangiati ed incompleti che non hanno mostrato alcuna funzionalità [Cotmore et al., 1984; Deiss et al., 1990]. Solo in un secondo momento sono stati generati cloni genomici full-length che hanno invece evidenziato una competenza funzionale e la capacità di generare nuove particelle virali infettanti [Zhi et al., 2004; Filippone et al., 2008]. Tuttavia seppure utili per lo studio dell'espressione virale [Zhi et al., 2006], questi cloni non hanno consentito una elevata resa di particelle virali infettanti. Ulteriori studi risultano pertanto necessari per ottimizzare il sistema.

Parte del presente lavoro ha riguardato lo studio comparato di diversi cloni genomici di B19 e della loro capacità di produrre particelle virali infettanti, con l'obiettivo di caratterizzare le regioni terminali del virus e di identificare requisiti essenziali per la funzionalità delle stesse. A partire da una sequenza consenso, ottenuta mediante allineamento di diversi isolati di B19 così da ridurre la variabilità genetica, sono stati generati cloni contenenti una diversa estensione e combinazione di isomeri conformazionali delle regioni terminali che sono stati oggetto dell'analisi comparata. Per l'analisi sono stati utilizzati i cloni genomici full-length pHG10 e pHG01, che fungono da riferimento in quanto capaci di mimare il comportamento del virus wild type, e i cloni subgenomici pCH (nelle diverse combinazioni di isomeri conformazionali delle regioni terminali), pCI0 e pCJ0, contenenti frazioni progressivamente minori delle sequenze terminali, rispettivamente 190 bp per i cloni pCH, 141 bp per pCI0 e 19 bp per pCJ0. L'analisi funzionale dei cloni è avvenuta mediante quantificazione degli acidi nucleici virali prodotti a seguito di trasfezione degli inserti genomici in cellule UT7EpoS1 e a seguito dell'infezione delle stesse cellule con il surnatante post trasfezione, al fine di valutare la formazione di una progenie virale.

La penetrazione del B19 nella cellula è mediata dall'interazione delle proteine capsidiche con il recettore globoside, determinante critico del tropismo virale, e con il corecettore, le integrine di tipo $\alpha 5\beta 1$ [Brown et al., 1993; Weigel-Kelley et al., 2003]. A livello intracellulare, la replicazione virale è ristretta a seconda dei diversi tipi cellulari e anche all'interno della stessa popolazione cellulare. Il genoma del B19 di piccole dimensioni non codifica per gli enzimi e i fattori necessari alla replicazione del DNA virale, ne consegue pertanto che l'infezione del B19 è di tipo restrittivo e la formazione di una progenie virale è limitata a cellule in attiva replicazione (fase S), in quanto dotate

di fattori necessari alla sintesi del DNA virale, non ancora caratterizzati in dettaglio.

Gli eventi che seguono l'ingresso del virus mostrano inoltre differenze a seconda del sistema cellulare preso in considerazione ed esistono differenti livelli di restrizione in relazione alla capacità della cellula di supportare la replicazione, la trascrizione e quindi la traduzione dell'informazione genetica veicolata dal virus. Non sono ancora del tutto noti i fattori critici per il completamento del ciclo vitale dopo la penetrazione del virus nella cellula e ad oggi continuano ad essere oggetto di grande interesse, tuttavia sono stati proposti due diversi livelli di restrizione alla replicazione virale.

Un primo livello è legato alla capacità delle cellule di consentire la sintesi di riparo e quindi la conversione del DNA monocatenario a DNA a doppio filamento, trascrivibile dal macchinario cellulare. Un secondo livello di restrizione è invece legato alla completa sintesi delle proteine in presenza dell'intero corredo di RNA messaggeri virali.

Inoltre il B19 considerato da sempre un virus capace di infezione acuta e rapidamente eliminato del sistema immunitario, sembra tuttavia avere un ciclo vitale più complesso ed essere capace anche di un'interazione a lungo termine con l'ospite. Il DNA virale è stato infatti trovato nella sinovia, nella pelle, nel cuore e nei tessuti linfonodali in soggetti che hanno avuto un'infezione passata da B19, suggerendo la capacità di tale virus di instaurare una persistenza in vivo in numerosi tessuti. Allo stato attuale tuttavia non sono ancora noti i meccanismi in grado di condurre all'instaurarsi di una persistenza, né le caratteristiche funzionali del genoma virale in questo stato: non ci sono dati relativi né alla configurazione possibile assunta dal genoma virale nei tessuti (forma lineare o circolare; integrazione o stato episomiale; genoma integro o frammentato), né alla possibile formazione di strutture cromatiniche. Il genoma di B19 sembra persistere in forma silente nei tessuti e si ipotizza che meccanismi epigenetici di regolazione contribuiscano a tale silenziamento, partecipando probabilmente anche alla riattivazione in un secondo momento.

Nell'ambito virologico, c'è un crescente interesse per il possibile ruolo di eventi epigenetici nel regolare la replicazione e l'espressione virale e in particolar modo per meccanismi quali la metilazione del DNA virale e la sua associazione con i nucleosomi [Portela et al., 2010]. Allo stesso modo si crede che i virus stessi possano avere un ruolo critico nel modulare lo scenario epigenetico delle cellule infettate.

La metilazione è una delle principali modifiche epigenetiche che gioca un ruolo fondamentale nel controllo dell'espressione genica nel contesto cellulare.

Il ruolo della metilazione nel corso dell'infezione è stato approfondito per virus a DNA fra cui virus capaci di stabilire latenza, come quelli della famiglia Herpesviridae, o per virus capaci di integrarsi, come i Retroviridae. In generale è stata trovata una correlazione fra la metilazione a livello dei dinucleotidi CpG presenti sul genoma virale e aspetti associati alla funzionalità virale, come il

silenziamento dell'espressione genica e lo stabilirsi di uno stato di quiescenza da parte del virus [Hoelzer et al., 2008]. Poco si sa invece relativamente a virus in attiva replicazione come quelli della famiglia Parvoviridae che combinano aspetti tipici di un ciclo virale litico con aspetti di persistenza, il che rende questo modello infettivo particolarmente attraente per studi sull'epigenetica e sul suo ruolo nell'interazione virus-cellula.

Parte di questo studio ha riguardato l'analisi dello stato di metilazione del genoma di B19 e del suo possibile effetto sul ciclo replicativo virale. A tal fine è stata analizzata la presenza e la distribuzione di dinucleotidi CpG sul genoma virale mediante specifico software, EMBOSS CpGPlot. I possibili effetti della metilazione di questi siti sulla funzionalità virale sono stati valutati mediante trasfezione di DNA metilato e non metilato in cellule UT7EpoS1. La presenza di tale fenomeno nel corso dell'infezione è stata investigata inizialmente mediante infezione in vitro di due diversi sistemi cellulari con diverso grado di permissività per il virus, quali le cellule UT7EpoS1, sistema permissivo per la replicazione del B19, e le cellule U937, modello cellulare non permissivo. Successivamente l'analisi di campioni biotici positivi per la presenza del DNA di B19 ha permesso di valutare l'effettiva metilazione del genoma virale nel corso dell'infezione naturale.

Altri meccanismi potrebbero rappresentare un ulteriore livello di regolazione epigenetica dell'espressione genica virale, come il complessamento del genoma virale in strutture nucleosomali e le modificazioni delle proteine istoniche.

Il ruolo della cromatina nella biologia virale dipende dal ciclo vitale del virus, ma per tutti i virus che attraversano il nucleo l'interazione con la cromatina sembra inevitabile.

In alcuni casi la formazione di strutture cromatiniche inibisce l'espressione genica e la replicazione virale limitando l'accessibilità del DNA virale da parte di enzimi coinvolti in tali processi; in altri casi la complessazione agli istoni fornisce una struttura e un'organizzazione del genoma virale necessarie per il corretto completamento del ciclo vitale del virus. Dunque i virus in molti casi hanno acquisito numerosi meccanismi per manipolare la cromatina e assicurare la sopravvivenza e la propagazione del proprio genoma all'interno dell'ambiente cellulare.

L'identificazione dell'associazione agli istoni e di pattern di modificazione degli istoni associati ad un particolare virus o ad una particolare fase dell'infezione virale può fornire nuove importanti informazioni circa l'interazione fra il virus e la cellula.

Parte di questo studio ha riguardato l'analisi della possibile associazione del DNA di B19 agli istoni cellulari nel corso di un'infezione prolungata in cellule UT7EpoS1. Prelievi effettuati a diversi time-point post infezione sono stati sottoposti a immunoprecipitazione della cromatina (ChiP) con anticorpi in grado di riconoscere in modo specifico gli istoni cellulari. Il DNA associato alle proteine istoniche è stato successivamente analizzato mediante RealTime PCR per valutare la

presenza di sequenze genomiche relative al B19 nella frazione immunoprecipitata.

Il concetto di epigenetica si è recentemente esteso a meccanismi regolati da piccoli RNA non codificanti come i microRNA [Kim et al., 2005]. Dalla loro scoperta nel 1993 mediante studi condotti sul nematode *C.Elegans* [Lee et al., 1993] sono stati identificati circa 700 microRNA nell'uomo più diverse centinaia in altri animali, nelle piante e nei virus. I microRNA di origine virale ad oggi annotati sono circa 200, per lo più codificati da virus nucleari a DNA.

I microRNA virali hanno una biogenesi simile a quella dei microRNA cellulari e possono dirottare il macchinario cellulare dell'RNAi per interferire e silenziare l'espressione di geni virali e/o cellulari a proprio vantaggio. I microRNA rappresentano uno strumento ideale per i virus per infettare l'ospite ed eventualmente stabilire uno stato di persistenza date le limitate dimensioni di queste molecole e la loro natura non-immunogena [Stern-Ginossar et al., 2007; Sullivan et al., 2005; Cullen; 2004].

Le cellule a loro volta sembrano produrre un'estesa gamma di microRNA in grado di esercitare un'azione anti-virale, come evidenziato dai primi studi in cui si osservò ipersuscettibilità all'infezione del virus della stomatite vescicolare (VSV) da parte di topi privi del gene codificante per la nucleasi Dicer, poichè incapaci di esprimere alcuni microRNA inibitori delle proteine virali [Otsuka et al., 2007].

L'ipotesi che i microRNA possano assumere un importante significato nell'interazione fra il B19 e le cellule target deriva da diversi studi. In particolare in uno studio sono state investigate le ragioni della limitata produzione di proteine capsidiche di B19 in cellule non permissive, mettendo in evidenza il possibile ruolo della regione 3' UTR dei corrispondenti mRNA nel reprimerne la sintesi, inibendo il caricamento dei ribosomi [Pallier et al., 1997]. È stato suggerito un possibile contributo dei microRNA cellulari nel limitare la produzione delle proteine strutturali agendo sui 3'UTR dei corrispondenti RNA messaggeri [Berillo et al., 2012]. Questo studio pone quindi l'attenzione sul possibile ruolo dei microRNA nell'interazione B19-cellula e fornisce un primo orientamento per la ricerca di possibili microRNA prodotti in risposta all'infezione.

Parte del presente studio ha riguardato l'analisi dei microRNA prodotti in risposta all'infezione con un confronto diretto fra campione infetto e non infetto, valutando la presenza di RNA a basso peso molecolare con omologia di sequenza per il B19, che rappresentano potenzialmente microRNA di origine virale o di origine cellulare che abbiano come target gli mRNA virali.

È stato utilizzato un array generato su membrana di nylon immobilizzando sequenze sovrapposte relative all'intero genoma di B19 su cui sono stati ibridati i microRNA estratti dalle cellule, amplificati e marcati, così da mappare sul genoma virale eventuali microRNA con omologia di sequenza per il B19. Al fine di permettere un facile recupero dei microRNA con omologia per il genoma virale e poterli caratterizzare, è stato utilizzato un diverso approccio basato sull'ibridazione

fra i microRNA estratti dalle cellule e il DNA genomico di B19 immobilizzato su biglie rivestite di streptavidina. I microRNA ibridati sono stati eluiti dalle biglie, amplificati e modificati con l'inserimento di siti di restrizione necessari per la clonazione. In questo modo dopo eluizione dalle biglie è stato possibile un'analisi qualitativa dei microRNA isolati relativi al campione infetto e non infetto e allo stesso tempo è stato possibile il recupero di queste specie per la successiva caratterizzazione mediante clonazione e sequenziamento.

Materiali e Metodi - I

Analisi funzionale di cloni genomici di B19

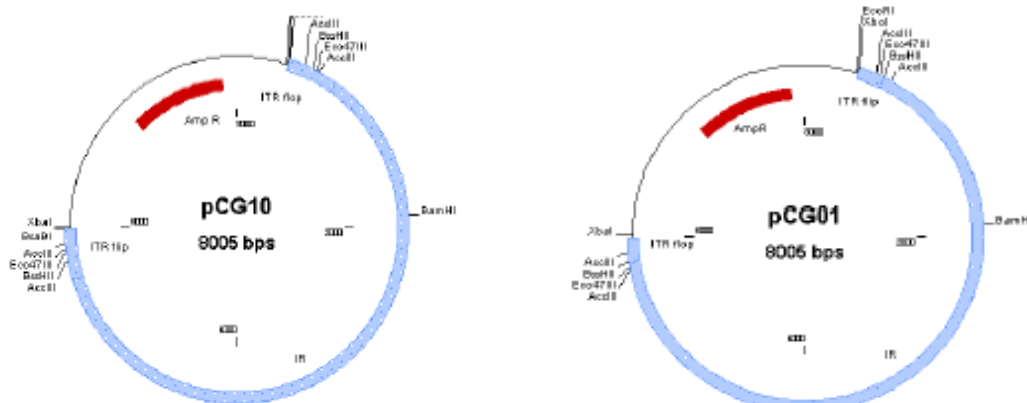
Cloni Genomici e Subgenomici di Parvovirus B19

I cloni genomici e subgenomici utilizzati per questo lavoro sono stati costruiti a partire da una sequenza sintetica (Mr.Gene GmbH, Regensburg). La sequenza è stata progettata come la sequenza consenso, ottenuta dall'allineamento delle sequenze di un insieme di isolati di B19 presenti nella banca dati del NCBI. L'utilizzo di tale sequenza consenso ha permesso di ridurre la variabilità genomica associata all'uso di differenti isolati virali.

Cloni genomici full-length

I cloni pCG01 e pCG10 (8005 nt) contengono come inserto il genoma completo di B19 e si differenziano per la diversa combinazione degli isomeri terminali (flop-flip e flip-flop rispettivamente). Il backbone è dato dal plasmide pMA.

Questi cloni sono stati generati a partire da cloni subgenomici precedentemente prodotti. Brevemente, per pCG10 sono stati utilizzati i cloni TR flip-LM e TR flop-R, da cui sono stati ricavati rispettivamente l'inserto sinistro e destro del genoma virale (rispetto al sito BamHI), con le rispettive mezze ITR (sito BssHII), in conformazioni opposte. Ciascuno di questi inserti è stato clonato su un altro plasmide che porta la parte mancante dell'ITR in modo da ricostituirne l'integrità, generando due plasmidi, ITR flip-LM e ITR flop-R. Da questi sono stati ottenuti rispettivamente l'inserto e il vettore necessari alla costruzione del plasmide finale, contenente l'intero genoma di B19. Una strategia analoga è stata utilizzata per generare il clone pCG01 a partire dai cloni TR flop-LM e TR flip-R.

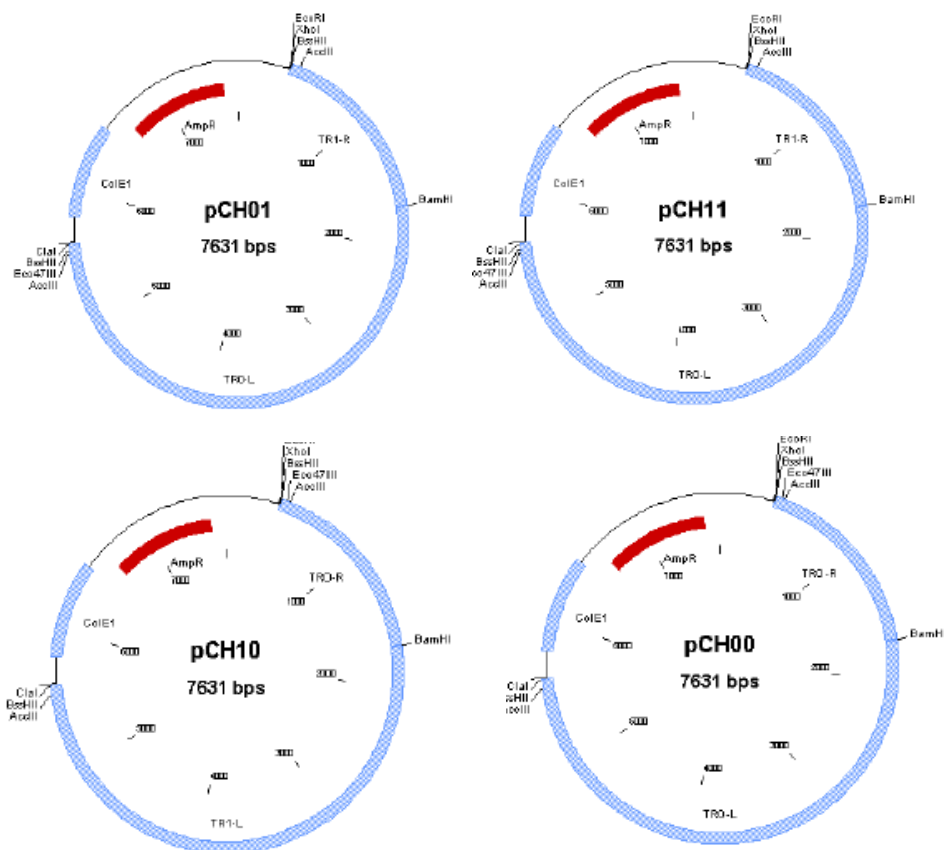


Cloni subgenomici

I cloni subgenomici sono stati generati a partire dai cloni full length mediante digestione con specifici enzimi di restrizione e presentano una progressiva deplezione delle regioni terminali.

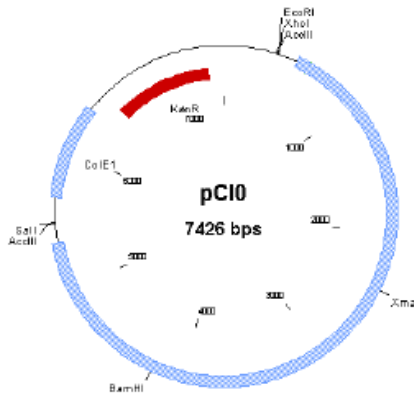
Cloni pCH

I cloni pCH (7631 nt) contengono un inserto virale di 5293 nt, corrispondente al genoma del B19 con solo una frazione delle ITR ottenuta dalla digestione con l'enzima di restrizione BssHIII nel punto di simmetria delle stesse (191-383 nt; 5214-5484 nt). I cloni pCH01, pCH10, pCH00, pCH11 si distinguono fra di loro per la diversa combinazione delle conformazioni dell'hairpin terminale.



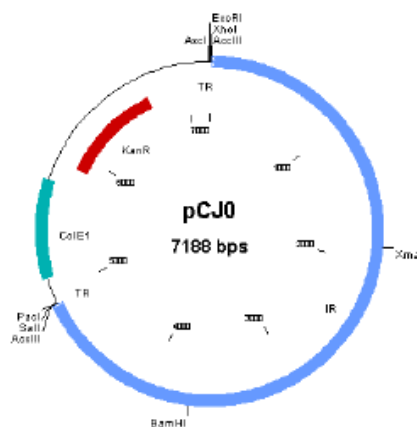
Clone pCI0

Il clone pCI0 (7426 nt) contiene un inserto virale di 5113 nt, corrispondente al genoma di B19 con una frazione delle ITR di 141 nt ottenuta dal taglio con l'enzima di restrizione AccIII (242-383 nt; 5214-5355 nt). L'estensione delle ITR è quindi ulteriormente ridotta rispetto ai cloni pCH con conseguente accorciamento delle sequenze palindromiche terminali e perdita delle asimmetrie nel palindromo.



Clone pCJ0

Il clone pCJ0 (7188 nt) contiene un inserto virale di 4869 nt corrispondente al genoma di B19 privo delle regioni palindromiche terminali e mantenimento di ITR ridotte a soli 19 nt, ottenuto dalla digestione con l'enzima di restrizione BsaWI (364-383 nt; 5214-5233 nt).



Preparazione del DNA plasmidico

Tutti i cloni sono stati preparati mediante trasformazione delle cellule batteriche SURE II (Stop Unwanted Rearrangements Events, *Stratagene*) con metodo heat shock. Una quantità di DNA plasmidico pari a 10 ng è stata usata per trasformare 30 µl di cellule. Dopo un'incubazione di 30 minuti in ghiaccio, le cellule sono state sottoposte a shock termico per 45 secondi a 42°C e riposte nuovamente in ghiaccio per 2 minuti. Sono stati in seguito aggiunti 200 µl di terreno SOC e si è proceduto a un'incubazione di 1 ora a 37°C in agitazione. Le cellule batteriche sono state quindi seminate su piastre LB-Agar Ampicillina e le colonie cresciute sono state espanse in terreno liquido LB-Ampicillina a 37°C.

Inizialmente, il DNA è stato purificato mediante kit miniprep (*Jetquick*) e controllato mediante

digestione con lo specifico enzima di restrizione nel sito di clonazione.

I cloni corretti sono stati preparati su larga scala mediante purificazione plasmidica con il sistema Pure Yield Plasmid Midiprep System (*Promega*).

Preparazione inserti per la nucleofezione

I plasmidi pCG01 e pCG10 sono stati sottoposti a digestione con gli enzimi di restrizione XhoI-XbaI per escindere gli inserti virali, che sono stati estratti da gel d'agarosio all'1% e purificati mediante il sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (*Promega*).

I cloni subgenomici di B19 sono stati amplificati mediante PCR al fine di generare gli inserti utilizzati per la successiva trasfezione.

Le diverse reazioni sono state allestite in modo analogo: le miscele di reazione sono state preparate in un volume finale di 50 μ l, contenenti FastStart DNA polimerasi (0,4 μ l), Buffer (5 μ l), dNTPs (1 μ l) templatato (10 ng), coppia di primer specifica per ciascun templatato (5 μ l) e H₂O a volume. È stato utilizzato un unico profilo di amplificazione comune ai diversi inserti.

| Primer | Sequenza |
|--------|------------------------------|
| HH1 | 5'CGCCGCTTGTCTTAGTGTCAAGGC'3 |
| HH0 | 5'CGCCGCTTGATCTTAGTGGACGTC'3 |

| Primer | Sequenza |
|--------|--------------------------------|
| HI0 | 5'GCGTCCGGAAGTCCC GCCACCGGAA'3 |
| HJ0 | 5'GCGTCCGGTGTCTTCTTTAAATTT'3 |

| Step | Temperatura | Tempo | n° Cicli |
|------------------------|-------------|---------------------|----------|
| Denaturazione iniziale | 94°C | 2 min | 1 |
| Denaturazione | 94°C | 15 sec | 10 |
| Annealing | 60°C | 30 sec | |
| Elongazione | 68°C | 4 min | |
| Denaturazione | 94°C | 15 sec | 20 |
| Annealing | 60°C | 30 sec | |
| Elongazione | 68°C | 4 min + 5 sec/ciclo | |
| Elongazione finale | 68°C | 7 min | 1 |

I prodotti di amplificazione sono stati purificati mediante il kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (*Promega*), quantificati allo spettrofotometro e analizzati su gel di agarosio all'1%.

Cellule UT-7/EpoS1

Le cellule utilizzate per l'analisi funzionale dei cloni genomici e subgenomici di B19 appartengono alla linea cellulare megacarioblastoide UT-7/EpoS1, sottoclone della linea UT-7/Epo. Le cellule sono state mantenute in terreno IMDM (Iscove's modified Dulbecco's medium) arricchito con 10% siero bovino fetale, 1% levoglutammina, penicillina, streptomina ed eritropoietina umana ricombinante (EPO) alla concentrazione di 2 U/ml, come fattore di crescita. Le cellule sono state fatte crescere a 37°C, al 5% di CO₂.

Nucleofezione

La trasfezione degli inserti virali è stata effettuata mediante nucleofezione, un tipo particolare di elettroporazione attraverso il quale il DNA viene direttamente iniettato nel nucleo, garantendo una maggiore efficienza. La tecnica è stata eseguita utilizzando il "Nucleofector Amaxa" (*Amaxa Biosystems Inc.*, Germany) secondo le condizioni precedentemente ottimizzate per la linea cellulare UT7EpoS1. Le cellule da utilizzare per la nucleofezione sono state messe in espansione il giorno precedente, tale da averle in fase esponenziale al momento dell'esperimento. Per ogni clone sono state utilizzate 2×10^6 cellule, centrifugate a 1000 rpm per 5 minuti, lavate con PBS e ulteriormente centrifugate. Il pellet ottenuto è stato risospeso in 100 µl di "Nucleofector Buffer"; per le cellule UT-7/EpoS1 è utilizzata la Solution R, unitamente al programma di nucleofezione T20, combinazione che garantisce una migliore efficienza, riducendo al minimo gli effetti citotossici della tecnica. Per ciascun clone, il volume cellulare è stato trasferito in apposita cuvetta nella quale sono stati aggiunti 2 µg del corrispondente inserto plasmidico. Le cellule sono state quindi nucleofettate e successivamente al volume della cuvetta sono stati aggiunti 0,5 ml di terreno completo preriscaldato. Gli 0,6 ml totali relativamente a ciascun clone sono stati trasferiti in piastra multi-well, alla quale erano stati preventivamente addizionati 2 ml di terreno preriscaldato per pozzetto. Le cellule trasfettate sono state incubate a 37°C per 72 ore. Volumi costanti di coltura, corrispondenti a 5×10^5 cellule, sono stati raccolti alle 2 hpt e 72 hpt per l'analisi degli acidi nucleici. Un'aliquota di cellule trasfettate è stata impiegata per la preparazione di un lisato cellulare per la successiva prova d'infezione.

Preparazione del lisato cellulare

Per ciascun clone una parte delle cellule trasfettate, pari a circa 1×10^6 cellule, è stata prelevata alle 72 hpt e sottoposta a lisi per il rilascio delle particelle virali. Brevemente, le cellule sono state centrifugate e il pellet cellulare è stato risospeso in 220 µl di terreno completo e sottoposto a 3-4

cicli di congelamento e scongelamento. Dopo centrifugazione a 10000 g per 10 minuti, il sovranatante è stato recuperato e trattato con DNasi (Roche) e RNasi (Roche) alla concentrazione di 1 U/ μ l, per 4 ore a 37 °C. Un aliquota del lisato pari a 20 μ l è stata conservata per l'analisi degli acidi nucleici. La parte restante del lisato è stata utilizzata per infettare cellule UT7/EpoS1.

Infezione

Per ogni clone 200 μ l del lisato sono stati utilizzati per infettare 3×10^5 cellule UT7/EpoS1. Le cellule sono state espanse il giorno prima dell'infezione, tale da averle in fase esponenziale al momento dell'esperimento. L'infezione è stata allestita in una provetta con fondo a U in cui sono stati messi a contatto la sospensione cellulare e il lisato e tale miscela è stata incubata in agitazione per 2 ore a 37°C. Le cellule sono state poi lavate in PBS ed espanse in IMDM alla concentrazione iniziale di 1×10^6 cellule/ml. Volumi costanti di cellule, equivalenti a 1×10^5 cellule, sono stati raccolti alle 2 hpi e 72 hpi per l'analisi degli acidi nucleici.

Estrazione degli acidi nucleici

Per ciascun clone sono stati estratti i prelievi post trasfezione (2 e 72 hpt), il lisato e i prelievi post infezione (2 e 72 hpi) mediante il sistema NucleoSpin® RNA II/NucleoSpin® RNA-DNA Buffer Set (*Macherey-Nagel*).

Brevemente, i campioni sono stati lisati in 350 μ l di buffer RA1 e 3.5 μ l di β -mercaptoetanololo e il lisato è stato caricato su colonnina per ridurre la viscosità. Dopo centrifugazione a 11000 g per 1 minuto, alla frazione di scolo è stato aggiunto etanolo 70 % (350 μ l) per facilitare il legame degli acidi nucleici alla colonnina su cui è stato caricato ciascun campione. Dopo i lavaggi il DNA e l'RNA sono stati eluiti separatamente e in modo sequenziale. Il DNA è stato eluito selettivamente con una soluzione a bassa concentrazione salina (100 μ l di DNA Elute); l'RNA invece è rimasto legato alla membrana e sottoposto a digestione con DNasi per rimuovere il DNA residuo. Dopo ulteriori lavaggi l'RNA è stato eluito in H₂O RNase-free (60 μ l).

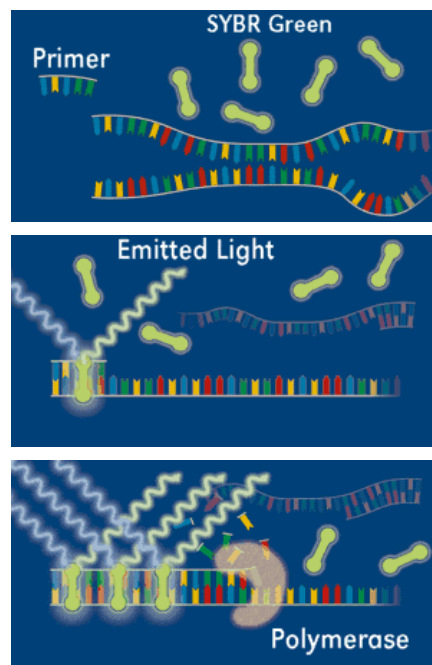
Trattamento con DNasi

L'RNA estratto è stato trattato con DNasi (TurboDNasefree, *Ambion*) al fine di degradare il DNA residuo. La digestione è stata effettuata in un volume totale di 70 μ l: a 50 μ l di estratto sono stati aggiunti 7 μ l di buffer, 1 μ l di DNasi e H₂O fino a volume. La reazione è stata incubata in agitazione vigorosa a 37°C per 2 ore, al termine delle quali è stato aggiunto nuovamente 1 μ l di DNasi. Il trattamento è proseguito per altre 2 ore a 37°C. La reazione è stata poi inattivata per aggiunta di 0,2

volumi di reagente di inattivazione con una incubazione di 2 minuti a 25°C in agitazione. Dopo aver centrifugato per 1,5 minuti a 12000 rpm, il sovranatante, contenente gli RNA, è stato recuperato e utilizzato per le analisi.

Real Time PCR

L'analisi del DNA virale è avvenuta mediante PCR real-time quantitativa, utilizzando il sistema QuantiTect SYBRGreen PCR (*Qiagen*) e lo strumento Rotorgene 3000 (*CORBETT Research*). Il monitoraggio della reazione di amplificazione è stato condotto mediante rilevazione, sul canale FAM/Sybr dello strumento, del segnale di fluorescenza emessa dal fluorocromo SybrGreen che si intercala nelle molecole bicateinarie di DNA che si accumulano progressivamente. L'acquisizione della fluorescenza avviene ad ogni ciclo al termine dello step di elongazione.



Rilevazione mediante SybrGreen

L'amplificazione con il sistema QuantiTect SYBRGreen PCR (*Qiagen*) è avvenuta in un volume totale di reazione pari a 20 µl contenenti 10 µl di Master Mix 2X (contenente l'enzima HotStarTaq DNA Polimerasi, il fluorocromo SYBRGreen, il Buffer e i dNTPs), 1 µl di primer (0,5 µM), 5µl di DNA estratto e 4µl di H₂O.

Per l'analisi del DNA virale è stata utilizzata una coppia di primer contigui, coppia 2 (2210-2355), il cui prodotto di amplificazione ha una lunghezza di 146 bp. Inoltre per la normalizzazione dei dati,

gli estratti sono stati amplificati con una coppia di primer specifici per il gene che codifica l'RNA ribosomiale 18S (primer S1-A1 che generano un amplicone di 145 bp).

La sequenza dei primer e il programma di amplificazione utilizzati sono di seguito riportati:

| Primer Coppia 2 | |
|------------------------|------------------------------|
| 2210 senso | 5'- CGCCTGGAACACTGAAACCC -3' |
| 2355 antisenso | 5'- GAAACTGGTCTGCCAAAGGT -3' |

| Primer Coppia 18S | |
|--------------------------|------------------------------|
| S1 senso | 5'- CGGACAGGATTGACAGATTG -3' |
| A1 antisenso | 5'- TGCCAGAGTCTCGTTCGTTA -3' |

| Step | Temperatura | Tempo | n° Cicli |
|----------------------------------|--------------------|--------------|-----------------|
| Attivazione iniziale | 95°C | 15 min | 1 |
| Denaturazione | 95°C | 20 sec | 40 |
| Annealing | 55°C | 20 sec | |
| Elongazione / Prima acquisizione | 72°C | 15 sec | |
| Seconda acquisizione | 78°C | 15 sec | |
| Melting | 95°C 65°C-95°C | 0,1°C/sec | 1 |
| Raffreddamento | 30°C | | |

Real Time RT PCR

Gli RNA estratti sono stati analizzati mediante il sistema di retrotrascrizione-amplificazione QuantiTect SYBRGreen RT-PCR (*Qiagen*). Per ciascuno campione sono state allestite due reazioni in parallelo, in presenza (RT+) o in assenza (RT-) della retrotrascrittasi nella miscela di reazione.

L'amplificazione è stata condotta in un volume di reazione totale di 20 µl contenenti 10 µl di RT Master Mix (2X), 2 µl di primer (1 µM), 5 µl di estratto, 0,2 µl di QuantiTect RT Mix (miscela contenente retrotrascrittasi ricombinanti espresse da E.Coli, aggiunta solo nei campioni RT+) e H₂O a volume.

Per la reazione di retrotrascrizione-amplificazione sono stati utilizzati i primer della coppia 2 (2210-2355), in grado di amplificare una regione compresa nell'esone centrale, presente in tutti gli mRNA del virus. Gli estratti sono inoltre stati amplificati con la coppia di primer specifica per l'RNA Ribosomiale 18S (primer S1-A1), per la normalizzazione dei dati.

Il profilo di amplificazione è equivalente a quello impostato per l'analisi del DNA con una fase aggiuntiva, relativa alla retrotrascrizione iniziale, della durata di 30 minuti a 55°C.

Quantificazione assoluta

I dati di fluorescenza acquisiti sono stati analizzati per ogni clone ai diversi time-point. Per ogni reazione è stato individuato un valore detto crossing point (Cp), espresso come ciclo di amplificazione corrispondente al punto di intersezione tra la fase esponenziale di accumulo dei prodotti di amplificazione ed un livello di fluorescenza (threshold) definito in modo arbitrario. Il valore di Ct ottenuto per ciascuna reazione è funzione del numero di copie bersaglio presenti inizialmente nel campione.

La quantificazione assoluta sia per il DNA che per l'RNA virale è avvenuta per interpolazione dei dati relativi ai diversi campioni con curve di calibrazione generate in precedenza mediante l'amplificazione di diluizioni scalari di un bersaglio a concentrazione nota a DNA o RNA, corrispondente alla sequenza interna genomica del B19. I dati sono stati calcolati come numero di copie di DNA/RNA virale normalizzato per il numero di cellule, tenendo conto per ciascun campione DNA/RNA ribosomiale del 18S, parallelamente amplificato.

Per analizzare le variazioni nella quantità di DNA/RNA virale post-nucleofezione e post-infezione, sono state calcolate le variazioni su base logaritmica fra le 2 e 72 ore.

Analisi della curva di melting

Per una conferma della specificità dei prodotti di amplificazione il sistema è predisposto per l'analisi delle curve di melting. Parte del segnale di fluorescenza rilevato può essere dovuto al legame del fluorocromo intercalante a prodotti come eventuali primer-dimeri, piuttosto che al DNA di interesse. Tuttavia ogni prodotto di DNA bicitenario ha una propria T_m (temperatura alla quale il 50% del DNA si trova allo stato denaturato mentre il restante 50% allo stato bicitenario nativo, detta Temperatura di melting) dipendente da parametri come la lunghezza del frammento amplificato e la sua composizione in basi; di conseguenza i prodotti aspecifici sono stati discriminati rispetto a quelli attesi mediante l'analisi della curva di melting. I primer dimeri, ad esempio, essendo di breve lunghezza generalmente denaturano a temperature molto più basse, fornendo così una curva facilmente distinguibile da quella del DNA target.

Materiali e Metodi II

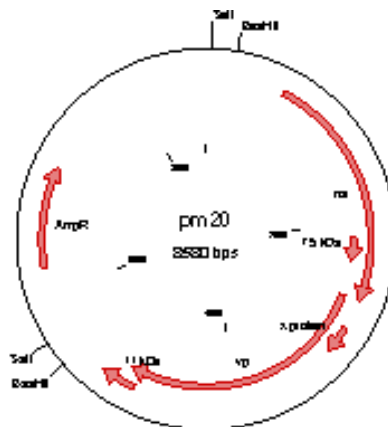
Studio della metilazione del genoma di B19

Analisi Bioinformatica

Il genoma di Parvovirus B19 è stato analizzato per la presenza e la distribuzione di dinucleotidi CpG mediante il programma online EMBOSS CpG Plot messo a disposizione dall'EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/cpgplot/index.html>). È stata sottomessa la sequenza consenso del B19, genotipo 1, e analizzata utilizzando i parametri di default del programma (lunghezza della finestra di 100 nt; rapporto dinucleotidi CpG osservati/attesi di 0.6; percentuale minima di C+G pari al 50%; lunghezza minima di 200 nt).

Plasmidi

Il clone pB19-M20, già disponibile in laboratorio, (messo a disposizione da K.Brown), contiene l'intero genoma di B19 ed è stato costruito a partire dall'isolato J35 (GenBank ID: AY386330).



Per gli esperimenti di trasfezione l'inserto genomico è stato escisso mediante digestione con l'enzima di restrizione Sal-HF (*New England Biolabs*), separato dal vettore mediante elettroforesi e purificato da gel mediante il sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (*Promega*). L'inserto virale così ottenuto è stato nucleofettato nella forma nativa e metilata (come descritto successivamente).

Il plasmide pEGFP-P6, già disponibile in laboratorio, è stato generato per amplificazione con primer specifici (contenenti i siti di restrizione XhoI e BamHI) del frammento genomico 233-582 nt contenente il promotore P6 del B19 e successiva clonazione del frammento nel plasmide pEGFP-1

(*Invitrogen*). Per gli esperimenti di trasfezione il plasmide pEGFP-P6 è stato linearizzato mediante l'enzima XhoI, defosforilato mediante fosfatasi alcalina e digerito con BamHI per il rilascio dell'inserto virale. Inserto (contenente il promotore P6 di B19) e vettore (contenente il gene EGFP) sono stati separati su gel e purificati. I due segmenti sono stati separatamente sottoposti a metilazione in vitro (come descritto successivamente) e ligati fra loro in diverse combinazioni (T4 Ligase, *New England Biolabs*). I prodotti di ligazione sono stati separati su gel e purificati mediante il sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (*Promega*).

Metilazione in vitro e trattamento con bisolfito

L'inserto genomico di B19, il plasmide pEGFP-P6 e le sue due frazioni, vettore (pEGFP) e inserto (P6), separatamente sono stati sottoposti a metilazione in vitro mediante l'enzima CpG Metiltrasferasi M.SssI (*New England Biolabs*). Per ciascuna reazione 1 µg di DNA è stato metilato con 4 unità di M.SssI in un volume totale di reazione di 20 µl per 2 ore a 37°C. La reazione di metilazione è stata ripetuta due volte.

| Reagente | Conc.Finale | Volume (20 µl tot) |
|-----------------|-------------|--------------------|
| H2O | - | 14 µl |
| NEBuffer 10X | 1X | 2.2 µl |
| SAM (1.6 mM) | 0.1 mM | 1.2 µl |
| DNA | 1 µg | 1 µl |
| M.SssI (4 U/µl) | 4 U | 1 µl |

La reazione è stata inattivata per incubazione a 65°C per 20 minuti. Il DNA metilato è stato purificato mediante il sistema Wizard SV Gel and PCR Clean-Up (*Promega*) e sottoposto a trattamento con bisolfito mediante uso del MethylCode™ Bisulfite Conversion Kit (*Invitrogen*) che converte le citosine non metilate in timine.

Brevemente, un volume di 20 µl di DNA è stato trattato con 130 µl di CT Conversion Reagent, per 10 minuti a 98°C e 2,5 ore a 64°C. Al campione sono stati poi aggiunti 600 µl di Binding Buffer ed è stato caricato su colonnina. Dopo centrifugazione per 1 minuto a 13.200 rpm, la frazione di scolo è stata eliminata. A questo punto è stato effettuato un lavaggio con 100 µl di Wash Buffer per 1 minuto a 13.200 rpm e successivamente sono stati aggiunti 200 µl di Desulphonation Buffer con incubazione a RT per 20 minuti. Trascorsi i 20 minuti sono stati effettuati due lavaggi con 200 µl di Wash Buffer e infine il campione è stato eluito con aggiunta di 10 µl di Elution Buffer. Il DNA

trattato è stato conservato a -20°C.

L'avvenuta metilazione e la conversione mediante trattamento con bisolfito sono state verificate mediante RealTime metilazione specifica e sequenziamento.

RealTime Metilazione Specifica

Per analizzare lo stato di metilazione nella regione terminale del genoma di B19 è stato messo a punto un saggio di RealTime PCR metilazione specifico, in grado di amplificare in modo selettivo il DNA trattato con bisolfito e discriminare tra DNA metilato e non metilato.

Sullo strand positivo del genoma di B19 trattato con bisolfito sono state disegnate la coppia di primer BSP (0218-0423), capace di riconoscere il DNA convertito con bisolfito indipendentemente dallo stato di metilazione, e le coppie MSP (0218-0350 Met e 0218-0350 Unmet), in grado di distinguere selettivamente il DNA metilato da quello non metilato



| Primer | Sequenza (5'-3') | Senso | Target |
|--|---------------------------|---------|--|
| 0218 | GTTGGTTTAGAGTTAATTTAATTT | forward | Comune per il DNA modificato da bisolfito |
| 0350UnMet | ACCAATCACCACCAATAACA | reverse | Specifico per il DNA non metilato , modificato da bisolfito |
| 0350 Met | GCCGATCGCCGCCGATAAACG | reverse | Specifico per il DNA metilato , modificato da bisolfito |
| 0423 | AAATAACTACCCATTTACATAAAAC | reverse | Comune per il DNA modificato da bisolfito |
| In grassetto sono evidenziate le basi specifiche per il DNA modificato da bisolfito: C → T sulla catena 'sense' G → A sulla catena 'antisense' | | | |

Il saggio di RealTime PCR metilazione specifica è stato validato utilizzando degli standard. Un target relativo alla sequenza di B19 è stato preparato per escissione dell'inserto dal plasmide pB19-

M20 e sottoposto a metilazione in vitro. Il DNA sia nella forma nativa che metilata è stato sottoposto a trattamento con bisolfito. Per la generazione di curve di calibrazione sono state preparate diluizioni scalari del target metilato e non metilato, sottoposto o meno a trattamento con bisolfito. La performance analitica dei primer BSP e MSP è stata saggiata mediante amplificazione in triplicato delle diluizioni di standard comprese nel range fra 10^2 e 10^8 copie/reazione.

L'analisi del DNA metilato è avvenuta mediante il sistema QuantiTect SYBRGreen PCR (*Qiagen*) e l'utilizzo dello strumento Rotorgene 3000 (*CORBETT Research*). L'amplificazione è avvenuta in un volume totale di reazione pari a 20 μ l contenenti 10 μ l di Master Mix 2X (contenente l'enzima HotStarTaq DNA Polimerasi, il fluorocromo SYBRGreen, il Buffer e i dNTPs), 1 μ l di primer (0,5 μ M), 2,5 μ l di estratto di DNA e 6,5 μ l di H₂O. L'amplificazione è avvenuta secondo il seguente profilo:

| Step | Temperatura | Tempo | n° Cicli |
|----------------------------------|---------------------|-----------|----------|
| Attivazione iniziale | 95°C | 15 min | 1 |
| Denaturazione | 95°C | 30 sec | 40 |
| Annealing | 57°C | 30 sec | |
| Elongazione / Prima acquisizione | 72°C | 15 sec | |
| Seconda acquisizione | 80°C | 15 sec | |
| Melting | 95°C 60°C - 90°C | 0.1°C/sec | 1 |
| Raffreddamento | 30°C | | |

Il monitoraggio della reazione di amplificazione è stato condotto mediante rilevazione sul canale FAM/Sybr dello strumento del segnale di fluorescenza emessa dal fluorocromo SybrGreen che si intercala nelle molecole bicatinarie di DNA che si accumulano progressivamente.

La specificità dei prodotti di amplificazione è stata confermata mediante l'analisi della curva di melting e mediante analisi elettroforetica degli amplificati.

Trasfezione e Infezione

Cellule

Le cellule UT7/EpoS1 sono state coltivate in IMDM (*Cambrex*), integrato con 10% FCS e 2U/ml Epo, 1% levoglutammina, 1% streptopenicillina, a 37°C e CO₂ al 5%. Le cellule U937 sono state coltivate in RPMI (*Cambrex*) con aggiunta di FBS 10%, a 37°C e CO₂ al 5%.

Nucleofezione

La nucleofezione di cellule UT7/EpoS1 con l'insero genomico di B19, metilato e non metilato, e

con il plasmide pEGFP-P6, in diversa combinazione di frammenti pEGFP e P6 metilati e non metilati, è stata eseguita secondo il protocollo illustrato precedentemente.

Brevemente, 1×10^6 cellule sono state risospese in 100 μ l di buffer di nucleofezione (Solution R) e trasferite in una cuvetta dove è stato aggiunto 1 μ g di DNA. La nucleofezione è stata eseguita con il programma T20. Le cellule nucleofettate, alle quali sono stati aggiunti 0.5 ml di terreno completo preriscaldato, sono state trasferite in piastra, dove erano stati precedentemente aggiunti 2 ml di terreno completo, e incubate a 37°C.

Nel caso della trasfezione con l'inserto genomico di B19 volumi costanti di coltura (0.5 ml) sono stati raccolti alle 2, 24, 48 e 72 hpt per l'estrazione degli acidi nucleici e la successiva analisi in RealTime PCR. Le cellule trasfettate con il plasmide pEGFP-P6 sono state raccolte alle 72 hpt, per l'osservazione al microscopio a fluorescenza.

Infezione

L'infezione di cellule UT7EpoS1, modello permissivo per l'infezione del B19, e di cellule U937, modello non permissivo, è stata condotta come descritto in precedenza. Brevemente, le cellule sono state incubate alla densità di 10^7 cell/ml in presenza di siero viremico ad una MOI di 10^3 geq/cell. Dopo l'adsorbimento del virus (2 ore a 37°C), le cellule sono state lavate e incubate a 37°C ad una densità di 10^6 cellule/ml. Volumi costanti di cellule (0.5 ml) sono stati recuperati a diversi time point fra 0 hpi-3 dpi e ogni 3 giorni fra i 6 dpi e 48 dpi.

Estrazione degli acidi nucleici totali

Aliquote corrispondenti a 1×10^5 cellule per i prelievi post nucleofezione e a 5×10^5 cellule per quelli post infezione sono state centrifugate a 4000 rpm per 5 minuti e sottoposte ad estrazione degli acidi nucleici totali mediante fenolo/cloroformio e degli RNA mediante il kit RNA Totaly (*Ambion*).

Per la purificazione degli acidi nucleici totali, il pellet cellulare è stato risospeso in 500 μ l di Buffer di lisi (100 mM NaCl, 10 mM TrisCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 1% SDS) e 5 μ l di Proteinasi K 100 μ g/ml. Dopo un'incubazione a 50°C per 1 ora sono stati aggiunti 500 μ l di fenolo/cloroformio/alcol isoamilico. Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente ed una centrifugazione a 13.000 rpm per 5 minuti, è stata recuperata la fase acquosa dell'estratto e a questa sono stati aggiunti 500 μ l di cloroformio. Dopo una breve incubazione è stata nuovamente raccolta la fase acquosa e sottoposta a precipitazione con etanolo assoluto e NaAcetato (3M, pH 5.5). Dopo un'incubazione di 15 minuti a -70°C e una centrifugazione a 13000 rpm per 15 minuti a 4°C, il pellet è stato lavato con etanolo al 70%, risospeso in 50 μ l di H₂O e conservato a -20°C fino al momento delle analisi. Per l'analisi dello stato di metilazione, una frazione del DNA estratto è stata sottoposta al

trattamento con bisolfito come precedentemente descritto.

Per la purificazione degli RNA, il pellet cellulare è stato risospeso in 500 µl di Denaturation Solution e successivamente sono stati aggiunti 500 µl di fenolo/cloroformio/alcol isoamilico. Dopo un'incubazione in ghiaccio per 5 minuti ed una centrifugazione a 13000 rpm per 5 minuti a 4°C, è stata recuperata la fase acquosa e a questa sono stati aggiunti 500 µl di fenolo/cloroformio acido e 50 µl di volume di NaAcetato 3M pH5.5. Dopo una incubazione di 5 minuti in ghiaccio ed una centrifugazione di 15 minuti a 13.200 rpm a 4°C, è stata recuperata la fase acquosa alla quale sono stati aggiunti 500 µl di isopropanolo. La soluzione è stata incubata a -20°C o.n.. Dopo una centrifugazione per 15 minuti a 13.200 rpm a 4°C e un lavaggio in etanolo 70%, il pellet è stato risospeso in 50 µl di H₂O.

L'RNA estratto è stato trattato con 1 µl di DNA-free Turbo (*Ambion*). Dopo un'incubazione di 2 ore a 37°C in agitazione vigorosa è stato aggiunto nuovamente 1 µl di DNasi e la miscela di reazione è stata incubata per altre 2 ore. Dopo l'aggiunta di 0,2 µl di Inactivation Reagent, la miscela di reazione è stata centrifugata a per 1,5 minuti a 12000 rpm e il sovrantante è stato recuperato e conservato a -20°C fino al momento delle analisi.

Real-Time PCR

Per la analisi quantitativa di DNA e RNA virali sono stati utilizzati i protocolli descritti in precedenza.

Per l'analisi dello stato di metilazione 10 µl di estratto (0.2 volumi) sono stati trattati con bisolfito e amplificati in parallelo con le coppie di primer specifiche per il DNA metilato e non metilato. Le coppie di primer e il profilo di amplificazione usati sono stati precedentemente descritti.

Campioni Bioptici

Per valutare un eventuale stato di metilazione del genoma di B19 nel corso dell'infezione in vivo, sono stati analizzati campioni bioptici positivi per il DNA di B19, divisi in due gruppi di biopsie: 14 campioni derivati da analisi diagnostiche di routine, trovati positivi per la presenza di DNA di B19 e con segni di infezione produttiva documentati da ibridazione in situ e immunofluorescenza; 11 biopsie cutanee positive per la presenza del genoma di B19 ma senza alcuna segno di infezione produttiva.

I campioni sono stati sottoposti a estrazione del DNA con QIAmp DNA mini kit (*Qiagen*), secondo le istruzioni del kit. Una frazione del campione (0.1 volume) è stata direttamente analizzata in Realtime PCR per la quantificazione del DNA virale con la coppia 2. Per la determinazione della

quota metilata invece 0.2 volumi dei campioni sono stati sottoposti a trattamento con bisolfito e successivamente amplificati con le coppie di primer MSP o BSP. A partire dagli stessi campioni trattati con bisolfito, sono stati ottenuti prodotti di amplificazione con la coppia di primer MSP che sono stati ulteriormente analizzati mediante sequenziamento.

Materiali e Metodi - Parte III

Studio dell'associazione del genoma di B19 agli istoni cellulari

Cellule

È stata utilizzata per le analisi la linea cellulare UT7EpoS1, coltivata nelle condizioni descritte in precedenza.

Infezione

L'infezione delle cellule UT7EpoS1 è stata condotta secondo il protocollo descritto precedentemente. Brevemente, $1,5 \times 10^7$ cellule sono state infettate con siero viremico alla MOI di 5×10^2 geq/cell.. La miscela virus-cellule alla densità di 10^7 cellule/ml è stata separata in diverse aliquote disposte in tubi col fondo a U, incubati per 2 ore a 37°C in agitazione vigorosa. Al termine della fase di adsorbimento le aliquote sono state riunite, le cellule sono state sottoposte a due lavaggi con PBS e sono state piastrate alla densità iniziale di 1×10^6 cellule/ml. Le piastre sono state incubate a 37°C . Aliquote da $2,5 \times 10^6$ cellule sono state raccolte quotidianamente dalle 0 hpi alle 72 hpi e una volta ogni tre giorni dai 6 dpi fino ai 18 dpi e sottoposte a fissazione mediante paraformaldeide 1%. I campioni sono stati raggruppati in due pool: i campioni della fase precoce (2 hpi – 72 hpi) e i campioni della fase tardiva (6 dpi- 18 dpi), per un totale di 10^7 cellule per ciascun pool. Parallelamente sono state raccolte e fissate 10^7 cellule non infettate come riferimento.

Chromatin Immunoprecipitation (ChiP)

I due pool di cellule infette e le cellule non infette sono state sottoposte a immunoprecipitazione della cromatina mediante l'EpiQuik Chromatin Immunoprecipitation Kit (*Epigentek*), secondo il protocollo del kit. Brevemente, le singole aliquote raccolte a ciascun time-point sono state sottoposte a cross-linking mediante paraformaldeide 1%, per fissare il legame proteine-DNA. Le cellule sono state pellettate e conservate a -80°C fino alla raccolta completa di tutti i prelievi e solo allora sono state raggruppate in pool. I due pool e il controllo negativo sono stati sottoposti a lisi e il DNA è stato frammentato mediante sonicazione con 3-4 impulsi ciascuno di 10 sec intervallato di 30 secondi dal successivo. Le strip usate per la prova sono state preventivamente rivestite con gli anticorpi di interesse; oltre all'anticorpo anti RNA polimerasi II (controllo positivo) fornito dal kit,

sono stati utilizzati i seguenti anticorpi per il saggio: IgG di coniglio (controllo negativo fornito dal kit); anti Histone Pan, diretto verso un epitopo comune a tutti gli istoni (*Upstate Millipore*); anti Histone H4 Pan (*Upstate Millipore*), capace di riconoscere l'istone H4 indipendentemente dal suo stato di modificazione. Per ciascun campione 100 µl (1/5 del volume totale) sono stati incubati con l'anticorpo immobilizzato su piastra (1 µg/100 µl di campione) a RT per 60 minuti. I pozzetti sono stati lavati per rimuovere il DNA non legato, mentre il DNA immobilizzato è stato trattato con proteinasi K per la revertire il crosslink fra DNA e proteine. Il DNA dopo opportuno lavaggio in colonnina è stato eluito in un volume di circa 20 µl utilizzati per l'analisi successiva in RealTime. Per ciascun pool inoltre 5 µl del DNA sonicato (1/100 del totale) sono stati tratti e trattati analogamente a quanto descritto in precedenza ma senza lo step di immunoprecipitazione con anticorpo, al fine di quantificare il DNA input presente nel campione di partenza.

RealTime PCR

Il DNA immunoprecipitato è stato analizzato mediante RealTime PCR utilizzando il sistema QuantiTect SYBRGreen PCR (*Qiagen*) e lo strumento Rotorgene (*CORBETT Research*).

Per ciascuna reazione sono stati amplificati 4 µl (1/5) del DNA immunoprecipitato in un volume totale di reazione pari a 20 µl: 10 µl di Master Mix 2X, 1 µl di primer (0,5 µM), 4µl di DNA e 5µl di H₂O.

Per l'analisi del DNA virale è stata utilizzata la coppia di primer 2210-2355 e la coppia 4899-5014. In parallelo è stata valutata l'immunoprecipitazione del DNA cellulare come riferimento, amplificando i campioni con la coppia di primer specifica per il gene ribosomiale 18S (primer S1-A1).

La sequenza dei primer 4899-5014 è riportata di seguito; la sequenza della coppia di primer 2210-2355, dei primer S1-A1 e il profilo di amplificazione sono stati precedentemente descritti.

| | Primer Coppia 4899-5014 |
|-----------------------|--------------------------------|
| 4899 senso | 5'- ACACCACAGGCATGGATACG -3' |
| 5014 antisenso | 5'- TGGGCGTTTAGTTACGCATC -3' |

Quantificazione assoluta

Per i diversi campioni sono stati acquisiti i segnali di fluorescenza, utilizzati dal software per calcolare il valore di crossing point (Cp), funzione del numero di copie bersaglio presenti in

partenza.

La quantificazione assoluta per il DNA sia virale e che cellulare è avvenuta per interpolazione su rette di calibrazione costruite mediante l'amplificazione di diluizioni scalari di un bersaglio a concentrazione nota a DNA rispettivamente virale o cellulare. I dati sono stati calcolati come numero di copie di DNA virale o come quantità (ng) di DNA ribosomiale.

Le quantità assolute sono state utilizzate per determinare le percentuali di DNA immunoprecipitato: il segnale dell'immunoprecipitazione specifica (mediante anti Histone Pan o anti H4 Pan) è stato diviso per il segnale relativo all'input (identico volume di campione sottoposto allo stesso protocollo ma senza utilizzo di alcun anticorpo) e a tale valore è stato sottratto il segnale di fondo (immunoprecipitazione con IgG di coniglio).

Per una conferma della specificità dei prodotti di amplificazione il sistema è predisposto per l'analisi delle curve di melting.

Materiali e Metodi - Parte IV

Studio dei microRNA nel corso dell'infezione

Cellule e infezione

La produzione di microRNA nel corso dell'infezione di Parvovirus B19 è stata valutata su cellule UT7EpoS1 infettate con siero viremico alla MOI di 10^3 geq/cellula, secondo il protocollo precedentemente descritto. Alle 72 hpi aliquote da 2×10^6 cellule sono state raccolte e conservate a -80°C , insieme ad aliquote di cellule non infette, per le successive analisi.

Estrazione degli smallRNA

Le cellule sono state sottoposte a estrazione degli RNA totali e al successivo arricchimento per gli smallRNA.

Per la purificazione degli RNA totali è stato utilizzato il ToTALLY RNA™ Kit (*Ambion*), secondo il protocollo descritto in precedenza.

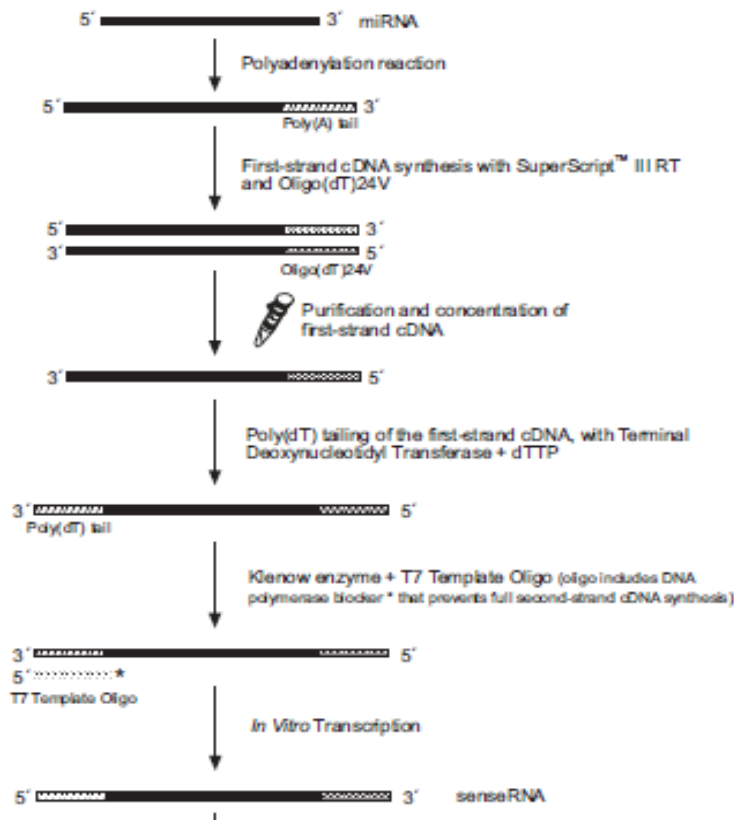
L'eluato è stato poi utilizzato per l'isolamento degli smallRNA (<200 nt) mediante il Purelink microRNA Isolation Kit (*Invitrogen*). Brevemente, all'RNA totale (50 μl) è stato aggiunto il Binding Buffer L3 (300 μl) ed etanolo 70% (300 μl) per un volume totale di circa 600 μl e la miscela così ottenuta è stata caricata su colonnina e centrifugata a 12000 g per 1 minuto. La frazione di scolo è stata recuperata e a questa sono stati aggiunti 700 μl di etanolo 96% così da ottenere una concentrazione finale di etanolo del 70%. Il tutto è stato trasferito in un'altra colonnina, per un'ulteriore step di centrifugazione. La colonnina è stata lavata con 500 μl di buffer di lavaggio (W5) e sottoposta ad eluizione con 50 μl H₂O.

Gli smallRNA eluiti sono stati quantificati allo spettrofotometro, determinando l'assorbanza a 260 nm.

Amplificazione dei microRNA

Affinchè i campioni fossero sufficientemente arricchiti in microRNA, gli smallRNA estratti sono stati amplificati mediante l'NCode™ miRNA Amplification Kit (*Invitrogen*), un sistema di amplificazione lineare dei microRNA.

Brevemente, 30 ng di smallRNA sono stati poliadenilati con la Poly A Polimerasi in un volume totale di 25 μ l (18 μ l di smallRNA, 2,5 μ l di Buffer, 2,5 μ l di $MnCl_2$, 1 μ l ATP 60 mM, 1 μ l Poly A Polimerase) a 37°C per 15 minuti e utilizzati per la sintesi del primo strand di cDNA. Per la retrotrascrizione è stata usata la retrotrascrittasi SuperScript III in un volume di reazione di 50 μ l (25 μ l di smallRNA poliadenilati, 2 μ l di Oligo dT, 10 μ l di Buffer, 5 μ l DTT, 2,5 μ l dNTPs, 1 μ l RNaseOUT, 2 μ l SuperScript, 2,5 μ l H_2O) con incubazione a 46°C per 1 ora. La miscela è stata sottoposta a degradazione dei microRNA a 65°C per 30 minuti. Lo strand di cDNA sintetizzato è stato purificato su colonnina e successivamente modificato al 3' per incorporare una coda di timidine aggiunta dalla Transferasi Terminale in un volume di reazione di 20 μ l (10 μ l di cDNA, 2 μ l di Buffer, 4 μ l dTTP, 2 μ l di Trasferasi Terminale, 2 μ l H_2O), con incubazione a 37°C per 3 minuti e successiva inattivazione a 80°C. La coda di timidine così aggiunta è servita per sintetizzare e permettere l'annealing del promotore della T7 polimerasi utilizzando l'enzima Klenow e uno oligo specifico per il promotore: il cDNA è stato incubato a 37°C per 10 minuti con 2 μ l dell'Oligo T7 e sono successivamente stati aggiunti 1 μ l di Buffer, 1 μ l di dNTPs e 1 μ l di Klenow. La reazione è stata incubata a temperatura ambiente per 30 minuti e successivamente inattivata a 65°C per 10 minuti. L'amplificazione è avvenuta mediante trascrizione in vitro con l'aggiunta di 7 μ l di enzima T7, 6 μ l di NTPs e 4 μ l di Buffer con incubazione o/n a 37°C. I microRNA amplificati sono infine stati purificati su colonnina e quantificati allo spettrofotometro.



NCode™ miRNA Amplification System (Invitrogen)

Parte degli smallRNA estratti sono stati convertiti in cDNA a doppio filamento. Il primo filamento è stato sintetizzato secondo il protocollo riportato in precedenza. Al cDNA è stata aggiunta una coda di adenine mediante Trasferasi Terminali (10 µl di cDNA, 2 µl di Buffer, 4 µl dATP 10 µM, 2 µl di Trasferasi Terminale, 2 µl H₂O) con incubazione a 37°C per 3 minuti e successiva inattivazione a 80°C. La coda di poliA è stata utilizzata per la sintesi del secondo filamento di cDNA mediante l'utilizzo di TAQ polimerasi e di Oligo(24)dT.

Marcatura dei microRNA

I microRNA amplificati sono stati marcati con biotina mediante il LabIT miRNA Labeling kit (*Mirus*), secondo le istruzioni del kit.

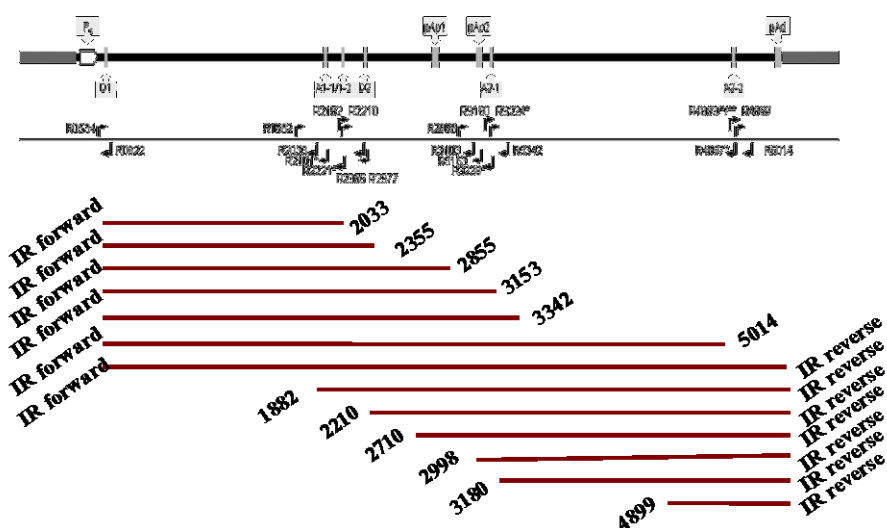
Brevemente, 1 µg di smallRNA è stato diluito in 86 µl di H₂O a cui sono stati aggiunti 10 µl di Buffer e 4 µl di LabelIT Reagent, il tutto è stato incubato a 37°C per 1 ora. La reazione è stata poi stoppata con l'aggiunta di 10 µl di reagente inattivante e purificata su colonnina. L'eluizione finale è avvenuta in 30 µl.

L'efficienza della marcatura è stata verificata mediante sviluppo su blot con streptavidina coniugata a fosfatasi alcalina e aggiunta del substrato colorimetrico NBT/BCIP.

Preparazione target: Generazione di un array B19-specifico

Sono stati preparati target a DNA a partire dalla sequenza genomica del B19, mediante PCR end-point con l'utilizzo di specifici primer.

Le sequenze target sono state progettate in modo tale da essere sovrapposte e coprire l'intera regione interna del genoma virale:



Come template per la preparazione dei target è stato utilizzato il plasmide pCJ0 contenente la sequenza genomica del B19, priva delle regioni terminali. L'amplificazione è avvenuta con l'enzima FastStart Taq DNA Polymerase, in un volume totale di 50 μ l (5 ng di template, 5 μ l di buffer, 1 μ l di dNTPs, 5 μ l di primer mix, 0.4 μ l di FastStart e H₂O a volume). Per ciascun target sono stati usati primer specifici; in generale, è stato utilizzato un primer che lega a una estremità del genoma (IR forward o reverse) in combinazione con primer che riconoscono regioni progressivamente più interne. I diversi primer utilizzati sono riportati nelle tabelle seguenti:

| Primer Forward | | Primer Reverse | |
|----------------|--------------------------|----------------|-----------------------------|
| IR Forw | AGCGGGCTTTTTTCCCGCCTTATG | IR Rev | TAAAGCGCAACAACATAATTTTTTAAC |
| 1882 | GCGGGAACACTACAACAACACT | 2033 | GTCCAGCTTTGTGCATTAC |
| 2210 | CGCCTGGAACACTGAAACCC | 2355 | GAAACTGGTCTGCCAAAGGT |
| 2710 | GTTACTGGAACAGACTTAGA | 2855 | CAGTTTCGTGAACTGTGCAG |
| 2998 | CCCGGTACTAACTATGTTGG | 3153 | CTCTTCATCTGCTACAGTCC |
| 3180 | TGGGTTTCAAGCACAAGTAG | 3342 | TGCACCAGTGCTGGCTTCTG |
| 4899 | ACACCACAGGCATGGATACG | 5014 | TGGGCGTTTAGTTACGCATC |

Il profilo di amplificazione è stato adattato nei diversi casi in relazione alla lunghezza dell'amplificato (diversa durata e temperatura della fase di estensione). In generale il profilo utilizzato è stato il seguente:

| Step | Temperatura | Tempo | n° Cicli |
|------------------------|-------------|------------------|----------|
| Denaturazione iniziale | 94°C | 2 min | 1 |
| Denaturazione | 94°C | 15 sec | 10 |
| Annealing | 50°C | 30 sec | |
| Elongazione | 68°C – 72°C | 1 min - 4 min | |
| Denaturazione | 94°C | 15 sec | 20 |
| Annealing | 50°C | 30 sec | |
| Elongazione | 68°C – 72°C | 1 min - 4 min | |
| | | + 5 sec/ciclo | |
| Estensione finale | 68°C – 72°C | 7 min | 1 |

I target generati sono stati controllati su gel d'agarosio all'1% e spottati su membrana di nylon (Nylon+, *Amersham*) in quantità equimolare (10^9 copie/spot) mediante apparecchio Bio Dot (*Biorad*). Dopo filtrazione, la membrana è stata incubata prima con buffer di denaturazione (NaOH 0,4 M e NaCl 0,6 M) e di seguito con buffer di neutralizzazione STE 1X (0,15 M NaCl; 0,01 M TrisCl pH7.5; 0,001 M EDTA), per 10 minuti a temperatura ambiente. Il DNA è stato quindi fissato sulla membrana ai raggi UV per 5 minuti.

In parallelo è stata spottata una sequenza specifica per lo snRNA U6 come controllo positivo (5'GCAGGGGCCATGCTAATCTTCTCTGTATCG3')[Pfeffer et al., 2004].

Ibridazione su array B19 specifico

L'ibridazione su membrana fra i target specifici per il B19 e i microRNA è stata ottimizzata per diversi parametri (composizione del buffer di ibridazione e temperature di ibridazione e lavaggio).

I target utilizzati per la messa a punto del protocollo (prodotto di amplificazione IR forw – IR rev; IR forw – 3342; 3180 – IR rev) sono stati fissati su membrana, come precedentemente descritto, e per ciascuno di questi sono state spottate sedici repliche così da testare su ogni target diverse condizioni sperimentali.

Le diverse repliche sono state sottoposte ad una preincubazione in buffer di ibridazione (il buffer DIG Easy Hyb Granules, Roche, per tutte le repliche tranne una per la quale è stata usata una soluzione costituita da SSC 5X / SDS 0.5%) per 30 minuti a temperatura ambiente e successivamente messe a contatto con 5 ml dello stesso buffer contenente una sonda biotinilata alla concentrazione di 100 pmoli/ml. Metà delle repliche relative ai diversi target sono state incubate con una sonda oligonucleotidica specifica per il B19 di 20 nt, con un diverso grado di omologia per i target utilizzati (con identità di sequenza per due target e con parziale omologia per il terzo, con il quale condivide un frammento di 8 nt); l'altra metà dei blot è stata incubata con un oligonucleotide sintetico EC01 di 20 nt, che non condivide alcuna similarità di sequenza con i target immobilizzati:

| | |
|-------------------|----------------------|
| Oligo B19 | TCAACCCCAACTAACAGTTC |
| Oligo EC01 | TATTTCCTCTGCTACTTGTC |

Le membrane sono state incubate con la miscela di ibridazione o/n a diverse temperature (RT – 45°C – 55°C). Tutte le repliche sono state sottoposte a un lavaggio in buffer SSC 1X (0.15 M NaCl; 0.015 M Na-Citrato pH 7) – SDS 0,1 % a temperatura ambiente per 30 minuti e a due ulteriori lavaggi a temperature diverse a seconda dei blot (RT – 50°C – 65°C), ciascuno di un'ora. Le condizioni testate sono riassunte in tabella:

| | | | | | | | | |
|----------------------------|----|------|------|-----------------------|------|------|------|------|
| Temp di Ibridazione | RT | RT | RT | RT (SSC5X/SDS0.5%) | 45°C | 45°C | 55°C | 55°C |
| Temp di Lavaggio | RT | 50°C | 65°C | 65°C | RT | 50°C | RT | 50°C |

I filtri sono stati successivamente incubati per 30 minuti a RT con streptavidina coniugata a fosfatasi alcalina diluita in buffer di bloccaggio e sottoposti a due lavaggi di 10 minuti con soluzione di TrisCl 0.1M pH 7.5 e NaCl 0.15M. Lo sviluppo è avvenuto per aggiunta del substrato

colorimetrico NBT/BCIP diluito 1:50 in una soluzione di TrisCl 0.1M pH 9.5, NaCl 0.1M e MgCl₂ 0.05M ed è stato successivamente stoppato con H₂O distillata.

Ottimizzate le condizioni è stata allestita la prova di ibridazione fra i diversi target di B19 preparati e spottati su membrana in duplicato e i microRNA amplificati e marcati, relativi sia alle cellule infette che alle non infette, per un'analisi comparata.

Ibridazione su Beads Magnetiche

È stato generato un target full length di B19 biotinilato, mediante amplificazione in PCR con la coppia di primer IR forward biotinilato/IR reverse secondo il profilo precedentemente descritto. Il prodotto di PCR è stato visualizzato su gel all'1% e la marcatura è stata verificata su blot mediante streptavidina coniugata con fosfatasi alcalina e successivo sviluppo con substrato colorimetrico NBT/BCIP.

La sequenza genomica biotinilata del B19, catturata con biglie magnetiche rivestite di streptavidina (Dynabeads® M-280 Streptavidin – *Invitrogen*), è stata utilizzata per una prova di ibridazione con il cDNA preparato a partire dai microRNA estratti da cellule infette e non infette.

Nel dettaglio, il cDNA a doppio filamento generato a partire da 2×10^6 cellule è stato aggiunto alla provetta contenente il target biotinilato di B19 (1 µg), per un volume totale di 20 µl. Dopo denaturazione per 5 minuti a 95°C, la miscela è stata raffreddata in ghiaccio e alla provetta sono stati aggiunti 30 µl di buffer di ibridazione (DIG Easy Hyb Granules – *Roche*). L'ibridazione è stata condotta a 50°C o/n in agitazione e sono state successivamente aggiunte le biglie preventivamente preparate: 10 µl equivalenti a 100 µg di biglie sono stati recuperati mediante un separatore magnetico di particelle, lavati tre volte con buffer di lavaggio (5 mM TrisCl pH 7,5; 0,5 mM EDTA; 1 M NaCl) e risospesi in 20 µl di buffer di lavaggio 2X. La miscela di ibridazione è stata incubata insieme alle biglie per 2 ore a RT in agitazione per consentire l'immobilizzazione degli ibridi cDNA-DNA di B19 biotinilato. Dopo opportuni lavaggi (x4), l'eluizione dei cDNA ibridati è avvenuta per incubazione a 95°C per 5 minuti in 50 µl di H₂O.

PCR EndPoint (Libreria a cDNA)

Le molecole di cDNA eluite dalle biglie sono state analizzate in PCR end-point e i prodotti di amplificazione generati sono stati visualizzati in elettroforesi.

La miscela di amplificazione è stata allestita con TAQ polimerasi e con l'utilizzo dei primer

Oligo(24)dT o Oligo dT Eco-Sma (quest'ultimo fornisce i siti di digestione per gli enzimi EcoRI e SmaI), in un volume totale di reazione di 100 µl (50 µl di target, 10 µl di primer 10 µM, 10 µl di buffer, 2 µl di dNTPs, 0.5 µl di TAQ polimerasi e H₂O a volume).

Gli amplificati sono stati visualizzati su gel d'agarosio al 2% e i prodotti <200 nt sono stati recuperati da gel mediante il sistema Wizard PCR - Gel CleanUP (*Promega*) e ulteriormente analizzati mediante amplificazione in PCR:

| | |
|-------------------------|---|
| Oligo dT | 5'- TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT -3' |
| Oligo dT Eco Sma | 5'- ATTCTACCCGGGAATTC TTTTTTTTTTTTTTTTTTTT VN -3' |

Il profilo di amplificazione ottimizzato e utilizzato per le analisi è il seguente:

| Step | Temperatura | Tempo | n° Cicli |
|------------------------|--------------------|--------------|-----------------|
| Denaturazione iniziale | 95°C | 2 min | 1 |
| Denaturazione | 95°C | 15 sec | 45 |
| Annealing | 50°C | 15 sec | |
| Elongazione | 72°C | 30 sec | |
| Estensione finale | 72°C | 7 min | 1 |

Risultati - I

Analisi funzionale di cloni genomici di B19

Differenti cloni plasmidici del genoma di Parvovirus B19 sono stati utilizzati per uno studio di relazione fra sequenza e funzione relativamente alle regioni terminali del genoma virale, al fine determinare i requisiti essenziali per la funzionalità delle stesse. In particolare, sono stati utilizzati cloni con una diversa estensione e combinazione di isomeri delle regioni terminali per un'analisi comparativa circa la capacità di questi cloni di mantenere intatta la propria funzionalità se trasfettate in cellule permissive e di conseguenza generare una progenie virale a sua volta infettante.

I cloni plasmidici di B19 sono stati ottenuti per sintesi a partire da una sequenza consenso di B19 disegnata mediante allineamento di diversi isolati virali, così da ridurre la variabilità biologica associata al loro utilizzo.

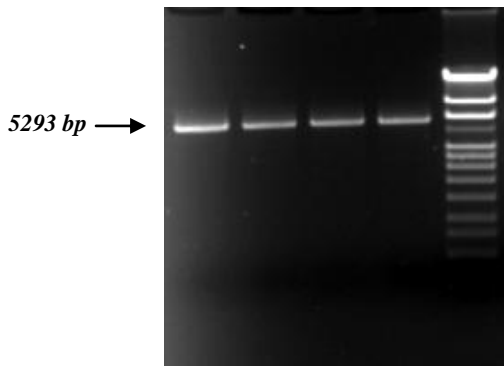
I cloni full length pCG01 e pCG10 contenenti le regioni terminali integre e utilizzati come riferimento sono stati precedentemente costruiti per combinazione di cloni subgenomici intermedi.

I cloni contenenti una porzione progressivamente ridotta delle regioni terminali (pCH, pCI0, pCJ0 rispettivamente 191, 141 e 19 nt delle TR) sono stati successivamente generati a partire dai cloni full length per digestione con specifici enzimi di restrizione e riclonazione in vettore plasmidico.

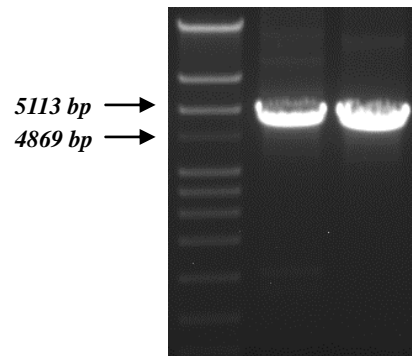
Le proprietà funzionali e in particolare la capacità di tali cloni di generare particelle virali infettanti è stata valutata mediante analisi quantitativa degli acidi nucleici virali prodotti dopo trasfezione e successiva infezione in cellule UT7EpoS1.

Preparazione degli inserti per la trasfezione

Gli inserti da utilizzare per la trasfezione di cellule UT7EpoS1 sono stati preparati a partire dai cloni subgenomici mediante amplificazione in PCR con l'utilizzo di specifici primer. I prodotti di amplificazione sono stati verificati su gel d'agarosio all'1% e purificati mediante il sistema Wizard SV PCR Gel Clean up (*Promega*).

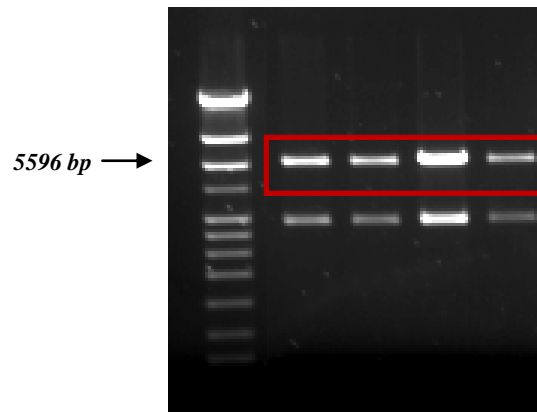


Inserti amplificati da pCH00, pCH01, pCH10, pCH11



Inserti amplificati da pC10 e pCJ0

Per quanto concerne i cloni full length pCG01 e pCG10 gli inserti sono stati recuperati mediante digestione con enzimi di restrizione XhoI-XbaI e purificati da gel mediante il sistema Wizard PCR Gel CleanUp (*Promega*):



Recupero inserti da pCG01- pCG10 mediante digestione con XhoI-XbaI

Real-time PCR

Gli inserti relativi ai diversi cloni sono stati trasfettati in cellule UT7EpoS1 e alle 2 e 72 hpt sono stati prelevati volumi costanti di coltura per le successive analisi. Una frazione delle cellule trasfettate è stata sottoposta a lisi per il rilascio delle particelle virali neo-costituitesi e il lisato è stato utilizzato per infettare cellule UT7EpoS1. Alle 2 e 72 hpi volumi costanti di coltura sono stati recuperati per la quantificazione degli acidi nucleici.

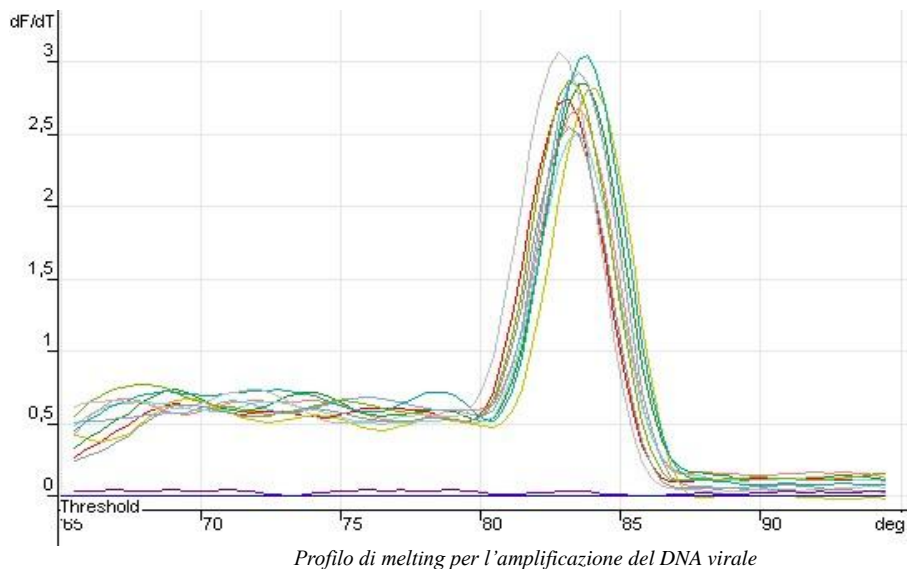
Per ciascun clone i campioni raccolti post trasfezione, il lisato e i campioni post infezione sono stati sottoposti a estrazione ed analisi degli acidi nucleici virali mediante PCR RealTime.

L'analisi del DNA è stata effettuata mediante real-time PCR in formato SYBRGreen, utilizzando una coppia di primer, specifica per il genoma di B19 (coppia 2, 2210-2355), e una coppia relativa al

DNA ribosomiale 18S (S1-A1), per la normalizzazione dei dati.

I segnali di fluorescenza sono stati elaborati dal sistema ed espressi come valore di Ct, posizionando la threshold ad un livello pari a 0,1.

La specificità dei primer e l'eventuale formazione di primer dimeri sono state determinate mediante analisi delle curve di melting dei diversi campioni, che hanno evidenziato un unico picco relativo al prodotto specifico di interesse:



Quantificazione assoluta DNA

La quantificazione del DNA virale presente in ogni campione è avvenuta per interpolazione sulla curva di calibrazione ottenuta precedentemente dall'amplificazione di diluizioni scalari di un bersaglio a DNA contenente la sequenza interna del B19. I valori ottenuti mediante interpolazione sono stati normalizzati mediante per il DNA ribosomiale relativo ai diversi campioni.

Per analizzare le variazioni nella quantità di DNA post-nucleofezione e post-infezione, sono stati calcolati i logaritmi e le variazioni su base logaritmica fra le 2 e 72 ore per i diversi cloni.

Analisi del RNA mediante Real Time PCR

L'analisi degli RNA virali prodotti nel corso della trasfezione e dell'infezione è stata effettuata mediante un sistema di retrotrascrizione-amplificazione in formato SYBRGreen con l'utilizzo della coppia 2 di primer, specifica e comune per tutti gli RNA di B19, e la coppia (S1-A1) relativa all'RNA ribosomiale 18S, per la normalizzazione dei dati. I segnali di fluorescenza sono stati elaborati dal sistema ed espressi come valore di Ct, avendo posizionato la threshold ad un livello pari a 0,1.

Quantificazione assoluta RNA

Gli RNA virali sono stati quantificati in modo assoluto per interpolazione sulla curva di calibrazione ottenuta precedentemente con l'amplificazione di diluizioni scalari di un bersaglio a RNA contenente la sequenza di B19 e tenendo conto della differenza nella quantificazione fra la reazione RT+ e la reazione RT-. I valori delle concentrazioni assolute ottenuti mediante interpolazione sono stati normalizzati per l'RNA ribosomiale 18S relativo ai diversi campioni.

Per analizzare le variazioni nella quantità di RNA post-nucleofezione e post-infezione, sono stati calcolati i logaritmi e le variazioni su base logaritmica fra le 2 e 72 ore per i diversi cloni.

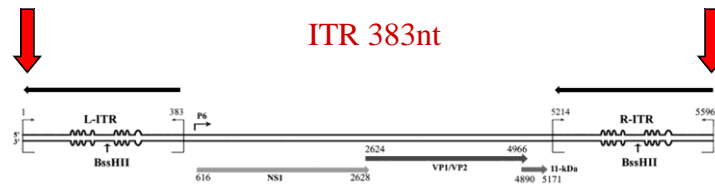
Nella tabella sottostante sono riportati i valori quantitativi per DNA e RNA virali, ottenuti per interpolazione sulle curve di calibrazione e normalizzazione mediante il ribosomiale 18S, per i diversi inserti virali trasfettati e nei diversi campioni sottoposti ad analisi.

Nei pannelli che seguono per i singoli cloni sono riportate sia in tabella che in istogramma le variazioni del DNA ed RNA virali fra le 2 e 72 ore post trasfezione e post infezione espresse su base logaritmica.

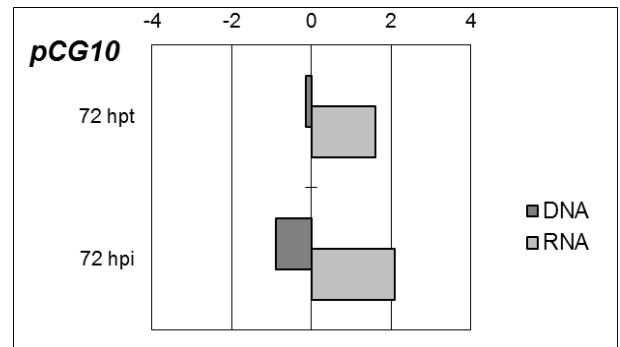
| | | 2 hpt | 72 hpt | Lys | 2 hpi | 72 hpi |
|--------------|-------|----------|----------|----------|----------|----------|
| pCG01 | DNA | 1,39E+08 | 5,23E+07 | 2,76E+06 | 7,80E+05 | 1,29E+05 |
| | RNA | 1,34E+06 | 3,06E+07 | 5,50E+04 | 8,04E+03 | 5,14E+05 |
| | Ratio | 9,64E-03 | 5,84E-01 | 2,00E-02 | 1,03E-02 | 3,98E+00 |
| pCG10 | DNA | 1,24E+08 | 9,03E+07 | 2,65E+06 | 5,64E+05 | 7,12E+04 |
| | RNA | 6,96E+05 | 2,81E+07 | 5,61E+04 | 9,55E+02 | 1,18E+05 |
| | Ratio | 5,61E-03 | 3,11E-01 | 2,12E-02 | 1,69E-03 | 1,65E+00 |
| pCH11 | DNA | 3,09E+08 | 1,31E+08 | 2,46E+05 | 3,77E+04 | 4,42E+03 |
| | RNA | 2,54E+05 | 2,98E+07 | 4,52E+03 | 2,06E+02 | 9,23E+00 |
| | Ratio | 8,22E-04 | 2,27E-01 | 1,84E-02 | 5,46E-03 | 2,09E-03 |
| pCH00 | DNA | 2,14E+08 | 1,59E+08 | 2,99E+05 | 1,28E+05 | 6,42E+03 |
| | RNA | 4,92E+04 | 5,32E+06 | 2,01E+04 | 1,25E+02 | 1,63E+01 |
| | Ratio | 2,30E-04 | 3,34E-02 | 6,74E-02 | 9,76E-04 | 2,54E-03 |
| pCH01 | DNA | 1,88E+08 | 1,30E+08 | 2,37E+05 | 6,65E+04 | 1,57E+04 |
| | RNA | 2,82E+04 | 8,11E+06 | 4,79E+05 | 6,21E+01 | 9,19E+03 |
| | Ratio | 1,50E-04 | 6,22E-02 | 2,02E+00 | 9,34E-04 | 5,83E-01 |
| pCH10 | DNA | 2,27E+08 | 5,06E+07 | 3,48E+05 | 8,46E+04 | 7,95E+03 |
| | RNA | 1,57E+04 | 2,57E+07 | 1,19E+04 | 1,68E+02 | 1,57E+04 |
| | Ratio | 6,92E-05 | 5,08E-01 | 3,43E-02 | 1,98E-03 | 1,97E+00 |
| pCI0 | DNA | 8,93E+07 | 5,48E+07 | 1,70E+05 | 2,24E+04 | 3,07E+03 |
| | RNA | 8,62E+03 | 1,12E+06 | 8,69E+03 | 4,33E+02 | 1,18E+02 |
| | Ratio | 9,65E-05 | 2,04E-02 | 5,10E-02 | 1,94E-02 | 3,85E-02 |
| pCJ0 | DNA | 1,47E+08 | 8,95E+07 | 6,81E+04 | 9,34E+03 | 1,93E+03 |
| | RNA | 2,60E+02 | 2,92E+05 | 4,62E+03 | 1,74E+02 | 1,73E+01 |
| | Ratio | 1,77E-06 | 3,26E-03 | 6,79E-02 | 1,86E-02 | 9,00E-03 |

Valori quantitativi di DNA e RNA virali relativi ai campioni post-trasfezione e post-infezione per i diversi cloni (copie genomiche/10000 cellule)

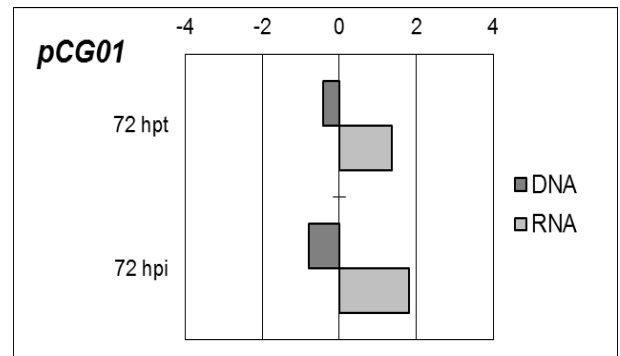
Cloni full-length pCG01 e pCG10



| pCG10 | | 72 hpt | 72 hpi |
|-------|-------|--------|--------|
| | DNA | -0,13 | -0,90 |
| | RNA | 1,6 | 2,09 |
| | Ratio | 1,7 | 3 |

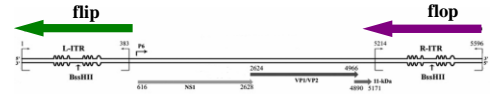
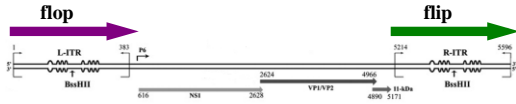
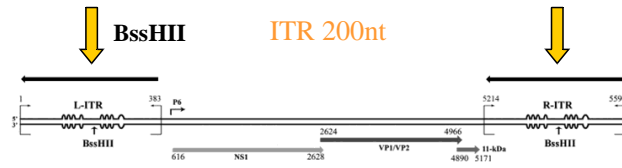


| pCG01 | | 72 hpt | 72 hpi |
|-------|-------|--------|--------|
| | DNA | -0,4 | -0,8 |
| | RNA | 1,3 | 1,8 |
| | Ratio | 1,7 | 2,5 |



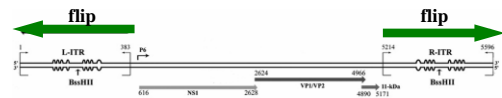
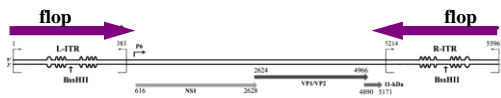
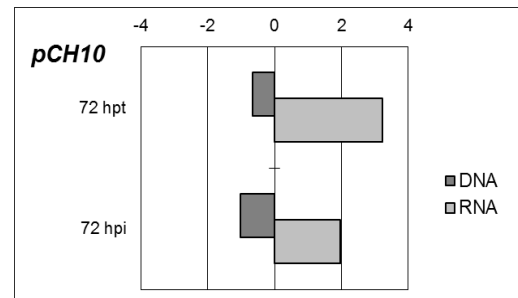
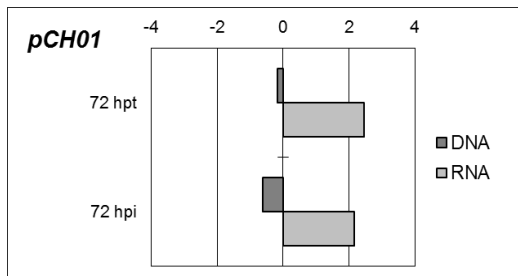
I cloni full length pCG01 e pCG10, contenenti l'intero genoma di B19 con regioni terminali integre rispettivamente nelle combinazioni di isomeri flop-flip e flip-flop, fungono da riferimento per l'analisi funzionale dei cloni. Dopo trasfezione, non si osserva alcun aumento del DNA virale, poiché la quantità di DNA nucleofettata nelle cellule è saturante; è invece evidente un consistente incremento degli RNA fra le 2 e 72 hpt (+1.6 e +1.3 Log). La capacità trasducente e la competenza funzionale del virus presente nel lisato sono state valutate mediante infezione di cellule UT7EpoS1 e dimostrate da un aumento particolarmente marcato dell'attività trascrizionale fra le 2 e 72 hpi (+2 e +1.8 Log). Non si osserva invece attività replicativa a seguito dell'infezione: probabilmente la replicazione è presente, ma in un limitato numero di cellule il che ne rende difficile la rilevazione. Complessivamente i dati mostrano la funzionalità degli inserti full-length CG01 e CG10.

Cloni pCH



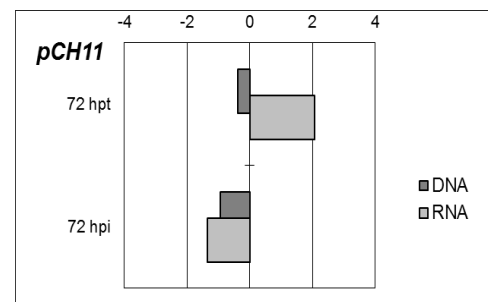
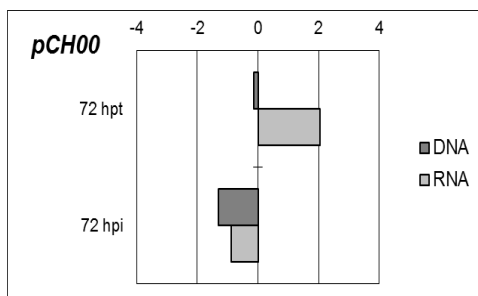
| pCH01 | | 72 hpt | 72 hpi |
|-------|-------|--------|--------|
| | DNA | -0,16 | -0,63 |
| | RNA | 2,46 | 2,17 |
| | Ratio | 2,6 | 2,8 |

| pCH10 | | 72 hpt | 72 hpi |
|-------|-------|--------|--------|
| | DNA | -0,65 | -1,03 |
| | RNA | 3,21 | 1,97 |
| | Ratio | 3,8 | 3 |



| pCH00 | | 72 hpt | 72 hpi |
|-------|-------|--------|--------|
| | DNA | -0,12 | -1,30 |
| | RNA | 2,03 | -0,88 |
| | Ratio | 2,1 | 0,4 |

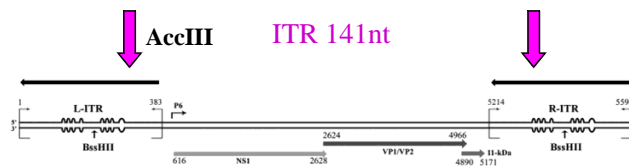
| pCH11 | | 72 hpt | 72 hpi |
|-------|-------|--------|--------|
| | DNA | -0,37 | -0,93 |
| | RNA | 2,07 | -1,35 |
| | Ratio | 2,440 | -0,4 |



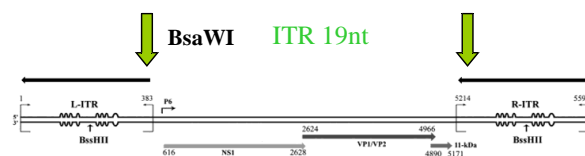
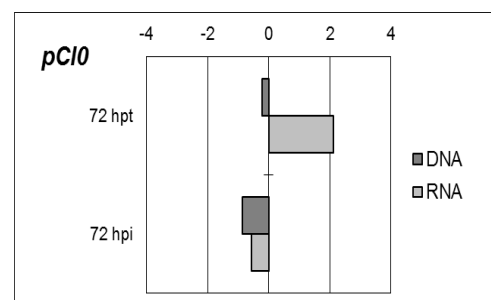
I cloni pCH contengono le porzioni interne delle regioni terminali fino all'asse di simmetria delle stesse e si differenziano fra di loro per la diversa combinazione degli isomeri terminali.

Dopo trasfezione degli inserti e successiva infezione, la loro attività si è dimostrata essere dipendente dalla conformazione delle regioni terminali. Per nessun clone si è osservata attività replicativa post trasfezione seppur in presenza di attività trascrizionale (+2,4 Log per CG01; +3,2 Log per CG10; +2 Log per CH00; +2 Log per CH11). Dopo infezione invece il comportamento varia fra i diversi cloni e solo per gli inserti CH01 e CH10 si osserva una significativa attività trascrizionale fra le 2 e 72 hpi (+2,1 e +2 Log). Gli inserti CH00 e CH11 hanno invece perso totalmente la funzionalità non evidenziando nè attività replicativa né trascrizionale.

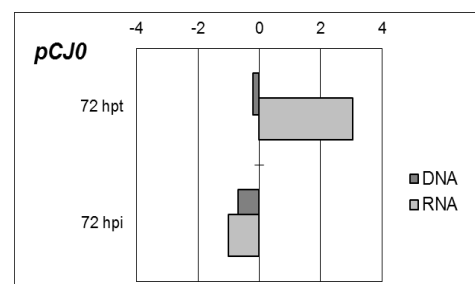
Clone pCI0 e pCJ0



| pCI0 | | 72 hpt | 72 hpi |
|------|-------|--------|--------|
| | DNA | -0,2 | -0,86 |
| | RNA | 2,1 | -0,56 |
| | Ratio | 2,3 | 0,3 |



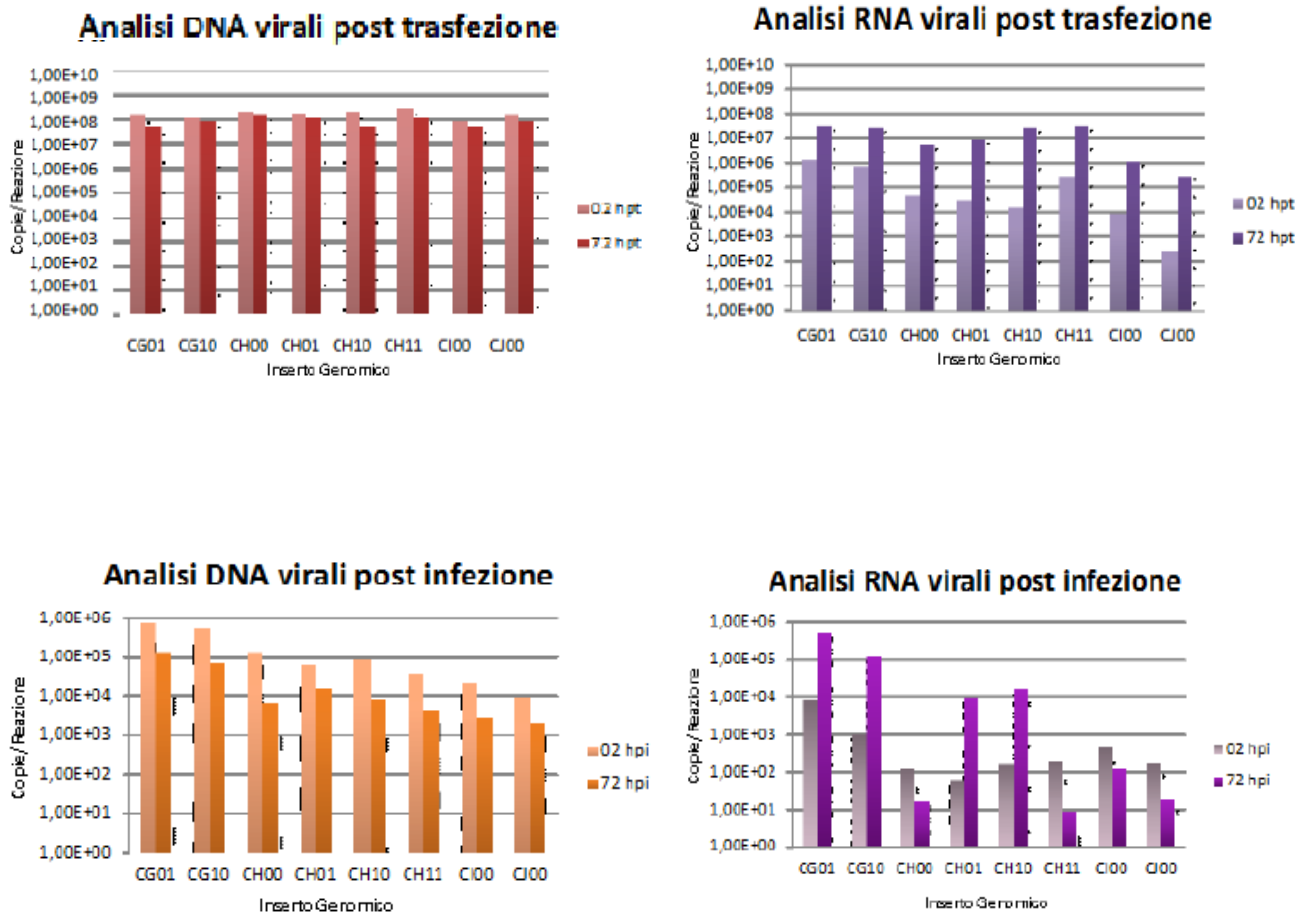
| pCJ0 | | 72 hpt | 72 hpi |
|------|-------|--------|--------|
| | DNA | -0,2 | -0,69 |
| | RNA | 3 | -1,00 |
| | Ratio | 3,2 | -0,3 |



I cloni pCI0 e pCJ0 presentano una ulteriore riduzione delle regioni terminali (141 nt e 19 nt rispettivamente).

Dopo trasfezione per nessuno dei due inserti è stato registrata alcuna variazione del DNA virale mentre si è verificato un importante aumento nella produzione di RNA tra le 2 e le 72 hpt (+2,3 e 3 Log). La capacità trasducente seppure ridotta è stata mantenuta ma è stata completamente abolita qualsiasi attività funzionale per entrambi i cloni a seguito dell'infezione.

I grafici seguenti riassumono per tutti gli inserti ai diversi time-point le quantità assolute di DNA ed RNA virale, ottenute mediante interpolazione su curve di calibrazione e normalizzazione con il DNA/RNA ribosomiale 18S:



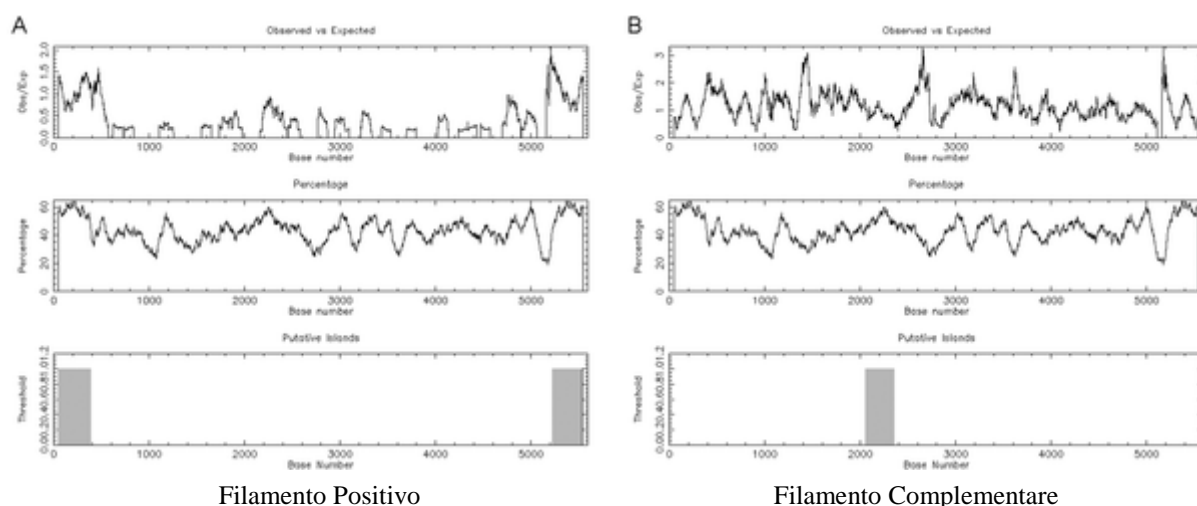
Risultati II

Studio della Metilazione del Genoma di B19

Distribuzione di dinucleotidi CpG sul genoma di Parvovirus B19

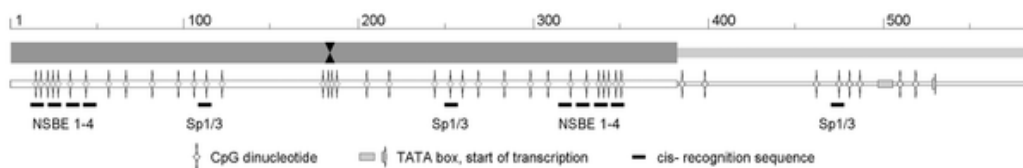
La sequenza genomica del B19 è stata analizzata per la presenza e la distribuzione di dinucleotidi CpG mediante il software EMBOSS CpG Plot, disponibile sul sito dell'EMBL-EBI.

È stata sottomessa una sequenza consenso relativa al B19, genotipo 1, analizzata mediante i parametri di default del programma (lunghezza della finestra di 100 nt; rapporto dinucleotidi CpG osservati/attesi di 0.6; percentuale minima di C+G pari al 50%; lunghezza minima di 200 nt). È stata evidenziata la presenza di cluster di dinucleotidi CpG nelle regioni terminali (1-383 e 5214-5596 nt) sul filamento positivo e nell'esone centrale sul filamento complementare (2060-2355 nt). Tali caratteristiche qualificano le regioni terminali del genoma di B19 come isole CpG.



Distribuzione di dinucleotidi CpG sul genoma di B19 (a) Distribuzione del rapporto dinucleotidi CpG osservati/attesi; (b) distribuzione C+G %; (c) identificazione e distribuzione di ipotetiche isole CpG

In particolare, nella regione terminale di sinistra sono state individuate 34 coppie di dinucleotidi fra cui il cluster presente nel punto di simmetria dell'hairpin (179-188 nt) e due cluster presenti in posizioni distali simmetriche (14-28 nt e 338-352 nt), in corrispondenza delle quali si trovano siti di legame per fattori coinvolti nella regolazione della trascrizione, come i fattori Sp e la proteina NS. La distribuzione di dinucleotidi CpG e la presenza di siti di legame per fattori trascrizionali nella regione terminale di sinistra sono raffigurati nella successiva immagine:



Presenza e distribuzione di dinucleotidi CpG e di siti di legame per fattori trascrizionali nella regione terminale sinistra

Al di fuori della regione terminale sono presenti dinucleotidi CpG nel promotore, in corrispondenza del sito di inizio della trascrizione e, con distribuzione più rara, nell'esone centrale.

Alla luce di tali presupposti ci siamo concentrati sullo studio della metilazione dei dinucleotidi CpG presenti nella regione terminale di sinistra e il possibile ruolo nella regolazione dell'espressione genica virale.

Realtime PCR Metilazione Specifica

Per valutare lo stato di metilazione della regione terminale di sinistra è stata messa a punto una RealTime PCR metilazione specifica, in grado cioè di amplificare solo il DNA trattato con bisolfito e discriminare fra DNA metilato e non metilato.

Sul filamento senso del B19 sono state disegnate la coppia di primer BSP, capace di amplificare in modo selettivo il DNA trattato con bisolfito, indipendentemente dallo stato di metilazione, e le coppie MSP (MSP met e MSP non met) capaci di discriminare il DNA metilato dal non metilato.

Il saggio è stato validato mediante l'uso di standard generati per estrazione dell'inserto genomico dal plasmide pB19-M20, metilati in vitro e sottoposti sia nella forma nativa sia in quella metilata a trattamento con bisolfito.

I parametri analitici relativi ai primer MSP e BSP sono stati calcolati mediante amplificazione di diluizioni scalari del target di B19 metilato e non metilato, trattato o meno con bisolfito.

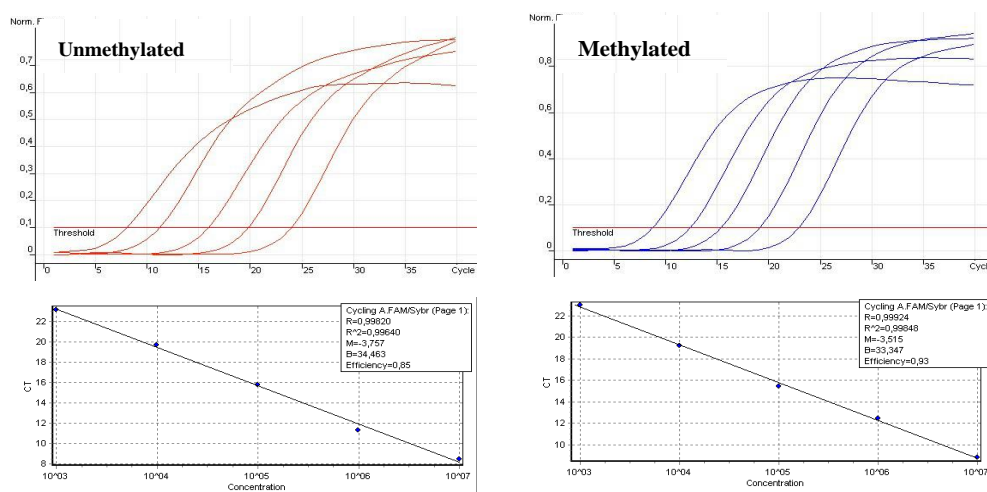
Dai dati ottenuti è evidente la capacità dei primer BSP di amplificare in modo specifico il DNA convertito con bisolfito, con un'efficienza comparabile per le sequenze metilate e non metilate.

Per i primer MSP è stata osservata un'amplificazione selettiva del DNA metilato o non metilato a seconda della coppia utilizzata. In tabella sono schematizzati i parametri analitici relativi alle coppie MSP e BSP:

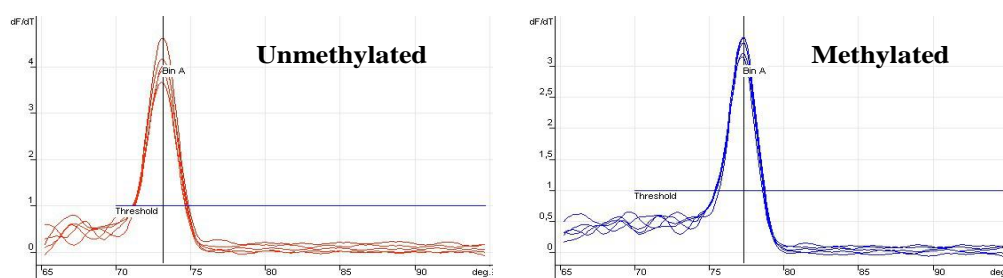
| Target ^a | Primers | Range dinamico | Efficienza | Tm |
|---------------------|--|----------------------------------|------------|--------------------|
| Non metilato | BSP 0218-0423 | 10 ² -10 ⁸ | 1.85 | 74.80 |
| | MSP 0218-0350 UnMet | 10 ² -10 ⁸ | 1.84 | 73.15 |
| | MSP 0218-0350 Met | > 10 ⁸ | -- | -- |
| Metilato | BSP 0218-0423 | 10 ² -10 ⁸ | 1.90 | 77.00 |
| | MSP 0218-0350 UnMet | > 10 ⁴ ^b | -- | 74.00 ^b |
| | MSP 0218-0350 Met | 10 ² -10 ⁸ | 1.83 | 76.80 |
| a) | inserto virale escisso da pB19-M20, trattato con bisolfito | | | |
| b) | amplificazione di bersaglio residuale, non completamente metilato in vitro da M.SssI | | | |

È quindi possibile ottenere una quantificazione del DNA metilato (coppia MSP met) e non metilato (coppia MSP non met) per interpolazione su curve di calibrazione ottenute mediante amplificazione degli standard. Le curve di calibrazione sono riportate di seguito.

Inoltre mediante il rapporto fra DNA met/(DNA met+DNA non met) fornisce l'indice di metilazione, quale misura del grado di metilazione del DNA presente nel campione.



I prodotti di amplificazione dei primer BSP e delle due diverse coppie MSP hanno inoltre mostrato profili di melting diversi, dato un diverso contenuto in basi, permettendo quindi una conferma della specificità dei prodotti di amplificazione:



Profilo di Melting dei prodotti di amplificazione ottenuti con la coppia MSP non met e MSP met

Gli amplificati BSP sono stati utilizzati per il sequenziamento e il cromatogramma generato ha confermato sia la totale conversione a seguito di trattamento con bisolfito che la presenza di citosine metilate e quindi non convertite (immagine non riportata).

Metilazione ed espressione genica del Parvovirus B19

L'effetto della metilazione del genoma di B19 sulle funzionalità del virus è stato valutato mediante trasfezione del DNA di B19, nativo oppure metilato in vitro, in cellule UT7EpoS1.

L'inserto relativo al genoma di B19 è stato exciso dal plasmide pB19-M20 e nucleofettato in cellule UT7EpoS1 nella forma nativa o metilata in vitro (1 µg di DNA /10⁶ cellule. Volumi costanti di coltura sono stati raccolti fra le 2 hpt e le 72 hpt per l'estrazione degli acidi nucleici e la successiva analisi in RealTime PCR.

Per l'analisi quantitativa del DNA ed RNA virale l'estratto è stato direttamente amplificato con la coppia di primer 2210-2355. Per determinare la quota metilata di DNA virale una parte dell'estratto è stata sottoposta a trattamento con bisolfito e amplificata con le coppie di primer MSP.

Dai dati ottenuti è evidente che il DNA non metilato resta non metilato a seguito della trasfezione (Indice di Metilazione <0,001), mentre il DNA metilato è demetilato, ma solo in minima parte (Indice di Metilazione compreso fra 0,93 e 0,97).

Non si osserva alcuna variazione nei livelli di DNA fra il campione di cellule trasfettate con DNA metilato e non metilato. È invece osservabile una riduzione del rapporto RNA/DNA di circa 1-1.5 logaritmi a seguito di trasfezione del DNA metilato, il che testimonia una correlazione fra la metilazione del DNA virale e l'espressione genica di B19 .

| Nucleofezione | Campione | B19 DNA | Indice Met | B19 RNA | RNA/DNA |
|-----------------------------|-------------|----------|------------|----------|----------|
| pB19-M20 Non Met | 2 h | 1.44E+06 | <0.001 | 8.32E+05 | 5.78E-01 |
| | 24 h | 1.49E+06 | <0.001 | 3.86E+07 | 2.60E+01 |
| | 48 h | 5.49E+05 | <0.001 | 1.17E+10 | 2.13E+04 |
| | 72 h | 1.23E+05 | <0.001 | 1.34E+10 | 1.09E+05 |
| pB19-M20 Met | 2 h | 1.14E+06 | 0.969 | 2.42E+04 | 2.12E-02 |
| | 24 h | 1.09E+06 | 0.972 | 1.99E+06 | 1.82E+00 |
| | 48 h | 1.03E+06 | 0.955 | 2.19E+09 | 2.13E+03 |
| | 72 h | 2.56E+05 | 0.929 | 1.58E+09 | 6.18E+03 |

Quantificazione degli acidi nucleici virali e dello stato di metilazione (Methylation Index) post trasfezione

Per valutare in modo diretto l'effetto della metilazione nella regione terminale di sinistra sull'espressione genica del virus, è stato trasfettato in cellule UT7EpoS1 il plasmide pEGFP-P6, in

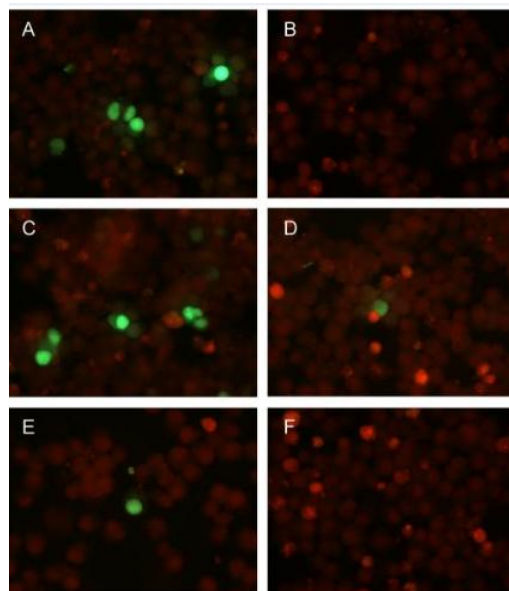
cui il gene reporter EGFP è posto sotto il controllo del promotore P6 di B19 (la sequenza genomica 183-530 nt contenente il promotore è stata clonata a monte del gene reporter).

Il plasmide è stato nucleofettato nella forma metilata in vitro o non metilata e a 72 hpt è stata valutata in entrambi i campioni l'attività del gene reporter mediante osservazione al microscopio. Nelle cellule in cui è stato trasfettato il plasmide metilato non si è osservata l'espressione del gene EGFP suggerendo una possibile correlazione fra la metilazione del promotore P6 e la perdita dell'attività trascrizionale.

Tuttavia per discriminare l'effetto specifico della metilazione dei dinucleotidi CpG del promotore P6 rispetto ai siti CpG presenti nel gene EGFP, le due componenti, l'inserto (P6) e il vettore (pEGFP), sono state recuperate separatamente e metilate in vitro. I due frammenti sono stati poi ligati nuovamente nelle diverse combinazioni metilato-non metilato e i prodotti così ottenuti sono stati purificati e trasfettati in cellule UT7EpoS1.

Alle 72 hpt è stata valutata l'espressione del gene reporter mediante osservazione al microscopio: sia nel caso in caso di metilazione del solo vettore (pEGFP) sia in presenza di metilazione del solo inserto (P6) è evidente un'importante riduzione del segnale rispetto al plasmide nativo. Il segnale di fluorescenza è del tutto assente nel caso in cui entrambi i frammenti siano metilati.

È dunque confermato l'effetto della metilazione del promotore P6 nel silenziare l'espressione del gene reporter e dunque nel regolare negativamente la sua stessa attività.



Effetto della metilazione del plasmide pEGFP sull'espressione del gene reporter EGFP in cellule UT7/EpoS1. Plasmide pEGFP-P6 nativo (A) o metilato in vitro (B). Prodotti derivati dalla ligazione fra il promotore P6 non metilato (C e E) o metilato (D e F) e il vettore pEGFP-1 non metilato (C e D) o metilato (E e F).

Metilazione del genoma di B19 nel corso di infezione prolungata

Dopo aver messo in evidenza una correlazione fra la metilazione delle isole CpG nella regione terminale di sinistra e la regolazione dell'espressione del B19, abbiamo valutato la possibile presenza e il ruolo di questo fenomeno nel corso di un infezione in vitro.

È stata allestita una infezione prolungata in due diversi contesti cellulari: la linea UT7EpoS1, ambiente cellulare permissivo per il virus e la linea U937, ambiente cellulare non permissivo. Le cellule sono state infettate ad una MOI di 10^3 geq/cellula e sono stati raccolti volumi costanti quotidianamente fra le 0 hpi a 72 hpi e ogni tre giorni, fra i 6 dpi e 48 dpi. I prelievi sono stati sottoposti a estrazione degli acidi nucleici ed amplificazione per l'analisi del DNA e RNA virale mediante i primer della coppia 2. Per l'analisi dello stato di metilazione, analogamente a quanto fatto per i campioni post nucleofezione, una frazione dell'estratto è stata trattata con bisolfito e amplificata con i primer MSP. I risultati sono riportati nella seguente tabella:

| Infezione | Campione | B19 DNA | Indice Met | B19 RNA | RNA/DNA |
|---------------------|---------------|----------|------------|----------|----------|
| Cellule UT7EpoS1 | 0 dpi | 8.63E+04 | <0.001 | 1.81E+03 | 2.10E-02 |
| | 1 dpi | 1.46E+05 | <0.001 | 2.23E+08 | 1.53E+03 |
| | 3 dpi | 1.18E+08 | <0.001 | 3.46E+05 | 2.93E-03 |
| | 6 dpi | 7.19E+08 | 0.002 | 4.04E+06 | 5.62E-03 |
| | 9 dpi | 2.22E+08 | 0.001 | 9.80E+06 | 4.41E-02 |
| | 12 dpi | 1.99E+08 | 0.001 | 7.95E+05 | 3.99E-03 |
| | 15 dpi | 5.56E+06 | 0.001 | 1.33E+05 | 2.39E-02 |
| | 20 dpi | 4.21E+05 | 0.002 | 1.85E+04 | 4.39E-02 |
| | 24 dpi | 1.12E+05 | 0.003 | 8.46E+03 | 7.58E-02 |
| | 27 dpi | 1.39E+04 | 0.031 | 1.29E+02 | 9.28E-03 |
| Cellule U937 | 0 dpi | 8.98E+05 | 0.009 | 3.79E+03 | 4.22E-03 |
| | 1 dpi | 3.93E+04 | 0.009 | 3.68E+03 | 9.36E-02 |
| | 3 dpi | 4.77E+04 | 0.008 | ND | ND |
| | 6 dpi | 2.20E+04 | 0.013 | ND | ND |
| | 9 dpi | 3.85E+05 | 0.041 | 1.70E+03 | 4.42E-03 |
| | 12 dpi | 2.16E+05 | 0.168 | ND | ND |
| | 15 dpi | 2.61E+04 | 0.205 | 2.49E+03 | 9.54E-02 |
| | 20 dpi | 1.01E+04 | 0.229 | ND | ND |
| | 24 dpi | 3.63E+03 | 0.336 | 1.51E+03 | 4.16E-01 |
| 27 dpi | 2.37E+03 | 0.423 | ND | ND | |

Il DNA virale usato come input è stato analizzato e presenta una quota trascurabile di metilazione (Indice di metilazione di 10^{-4}) che nel corso dei time point si è andata modificando in modo differente nei due diversi sistemi cellulari.

Nel dettaglio, per la linea UT7EpoS1 è stata rilevata la presenza del DNA virale fino a 27 dpi con i livelli massimi osservati fra i 2 e 15 dpi. La quota di DNA metilato aumenta nei diversi time point ma si mantiene a livelli minimi (Indice di metilazione compreso fra $<0,001$ e $0,03$).

Per quanto concerne l'RNA virale è rilevabile fino al 24 dpi raggiungendo i massimi valori fra 1 dpi e 9 dpi.

Nelle cellule U937 il DNA virale è presente fino ai 27 dpi ma subisce una riduzione nel corso dei time point, suggerendo l'assenza di replicazione virale. Il livello di metilazione aumenta nel corso dell'infezione raggiungendo Indice di metilazione pari a $0,3-0,4$ fra i 24 e 27 dpi.

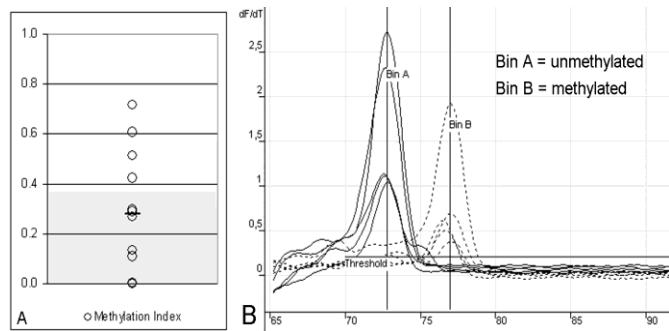
L'attività trascrizionale sembra essere assente, non essendo stati rilevati significativi livelli di RNA virale nel corso dell'infezione.

Metilazione in campioni biotici

È stato valutato un possibile stato di metilazione del genoma di B19 nel corso dell'infezione in vivo mediante analisi di biopsie, già risultate positive per la presenza di DNA virale. In particolare sono stati analizzati due gruppi di campioni: 14 biopsie provenienti da analisi diagnostiche di routine in cui è stata dimostrata una infezione produttiva del virus mediante ibridazione in situ (rivelazione del DNA virale) e immunofluorescenza (rivelazione degli antigeni virali); 12 biopsie cutanee nelle quali è stato rilevato il genoma ma senza segni di infezione produttiva. I campioni sono stati estratti, trattati con bisolfito e amplificati in RealTime con i primer della coppia MSP e BSP.

Relativamente al primo gruppo di campioni nella maggior parte dei casi sono state utilizzate sia le coppia MSP che BSP. In diversi campioni sono stati osservati elevati livelli di metilazione come evidenziato in figura nella quale è riportato l'Indice di metilazione delle diverse biopsie:

| Sample (Date) | Tissue | Clinical setting | Viral load | Met Index |
|-------------------|------------|------------------|------------|-----------|
| A.29 (07/09/2008) | Placenta | IUFD | 1.36E+03 | 0.111 |
| GA.1 (06/07/2006) | Placenta | IUFD | 6.33E+06 | <0.001 |
| BE.1 (12/06/2007) | Duodenum | Aplastic crisis | 6.97E+03 | 0.005 |
| AP.1 (02/03/2005) | Ileum | IBD | ND | ND |
| AP.2 (20/10/2005) | Ileum | IBD | ND | ND |
| CM.1 (15/01/2009) | Myocardium | Myocarditis | 1.08E+03 | 0.136 |
| CM.2 (18/02/2009) | Myocardium | Myocarditis | 3.17E+02 | 0.287 |
| FV.1 (19/04/2010) | Myocardium | Myocarditis | 7.62E+03 | 0.511 |
| ML.1 (21/02/2005) | Myocardium | Myocarditis | 2.43E+02 | 0.268 |
| ML.2 (23/02/2005) | Myocardium | Myocarditis | 1.06E+03 | 0.296 |
| ML.3 (09/03/2005) | Myocardium | Myocarditis | 6.09E+04 | 0.004 |
| MN.1 (08/11/2005) | Myocardium | Myocarditis | 4.00E+03 | 0.423 |
| MN.2 (23/11/2005) | Myocardium | Myocarditis | 2.33E+03 | 0.714 |
| MN.3 (04/01/2007) | Myocardium | Myocarditis | 4.76E+03 | 0.605 |

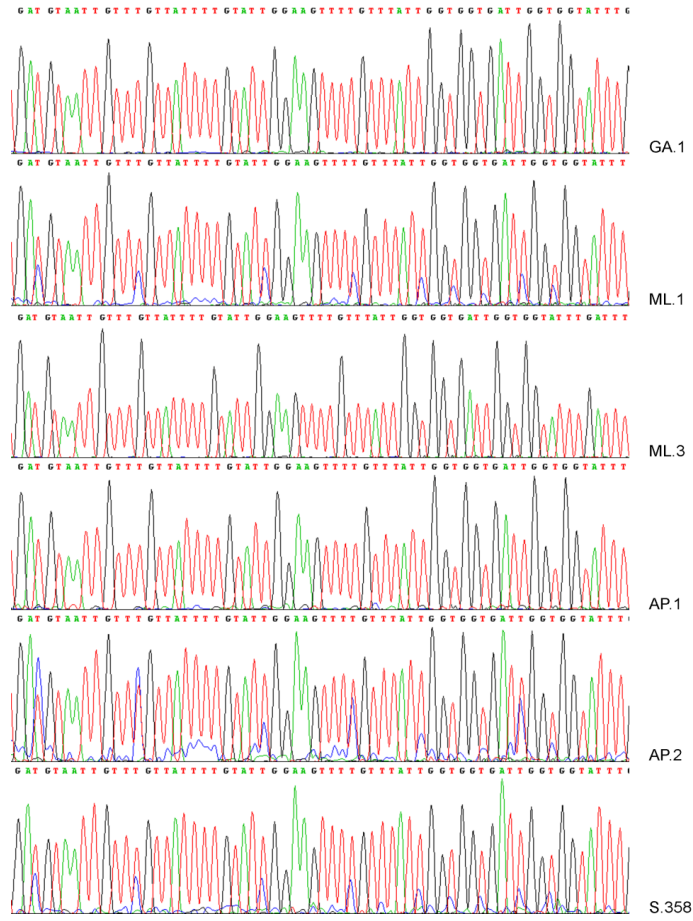


Indice di metilazione del DNA di B19 presente nelle biopsie

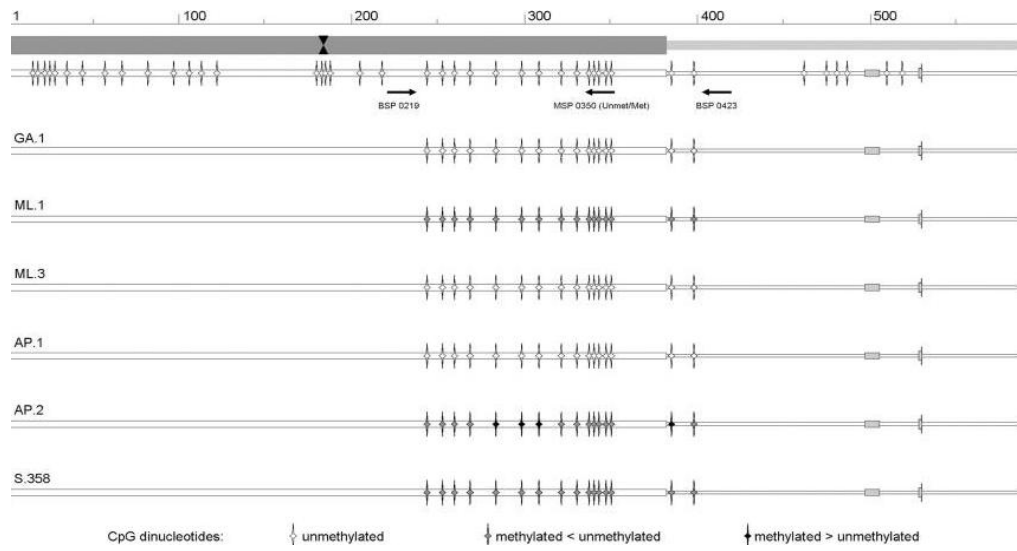
La metilazione del genoma di B19 risulta essere particolarmente significativa in campioni di miocardio prelevati da pazienti con endomiocarditi. Inoltre avendo a disposizione per alcuni pazienti il campione relativo alla fase acuta di infezione e quello relativo alla fase remissiva è stato osservato un livello di metilazione superiore in quest'ultimo caso, quando il virus cioè aveva stabilito persistenza nei tessuti. Fanno eccezione i campioni ML poiché nei prelievi precoci ML1 e ML2 è evidente un grado di metilazione superiore rispetto al campione tardivo ML3, come mostrano le immagini seguenti.

In due campioni di placenta (es. GA.1) non è stato osservato un livello di metilazione significativo così come in una biopsia duodenale. Un risultato diverso è invece stato osservato per due biopsie di un paziente con patologia infiammatoria intestinale, per le quali data la bassa disponibilità di materiale è stata possibile solo l'amplificazione con la coppia BSP. Dal cromatogramma ottenuto si evince un livello più accentuato di metilazione nel prelievo relativo alla fase remissiva dell'infezione (AP2) rispetto a quello della fase iniziale (AP1).

Per quanto concerne le biopsie cutanee solo per una (S358) è stato possibile l'amplificazione con la coppia BSP e il successivo sequenziamento: si osserva anche in questo caso una importante quota di dinucleotidi metilati, come riportato nel grafico derivato dal cromatogramma.



Cromatogramma e distribuzione dei dinucleotidi CpG metilati nelle biopsie



Risultati III

Studio dell'associazione del genoma di B19 agli istoni cellulari

La possibile associazione del genoma di B19 con gli istoni cellulari è stata valutata a seguito dell'infezione di cellule UT7EpoS1 mediante una prova di immunoprecipitazione della cromatina. Il DNA immunoprecipitato è stato poi analizzato mediante RealTime PCR

ChiP e RealTime PCR

Le cellule UT7EpoS1 sono state infettate alla dose di 5×10^2 geq/cellula. Quantità costanti di cellule sono state prelevate a intervalli di 24 ore fra le 0 hpi e le 72 hpi e a intervalli di 3 giorni fra i 6 dpi e i 18 dpi. I campioni sono stati successivamente raggruppati in due pool: i campioni della fase precoce (2hpi – 72 hpi) e quelli della fase tardiva (6 dpi – 18 dpi) sono stati raggruppati separatamente, per un totale di 10^7 cellule/pool. È stata inoltre analizzato in parallelo un campione di cellule non infette come riferimento (10^7 cellule).

I campioni sono stati sottoposti a cross-linking con paraformaldeide 1%, lisi, sonicazione e a successiva immunoprecipitazione con anticorpi specifici: l'anticorpo anti Histone Pan (*Upstate Millipore*) in grado di riconoscere un epitopo comune a tutti gli istoni e l'anti H4 Pan (*Upstate Millipore*) che riconosce l'istone H4 indipendentemente dal suo stato di modificazione. È stata inoltre effettuata sui diversi campioni l'immunoprecipitazione con anticorpo aspecifico IgG di topo, per determinare il segnale di fondo. Parallelamente una frazione di DNA sonicato (1/100) è stata trattata analogamente agli altri campioni ma senza utilizzo di alcun anticorpo, al fine di determinare il segnale 'input', presente nel campione in partenza.

Mediante PCR RealTime è stata valutata l'associazione del DNA virale agli istoni mediante amplificazione di due diverse regioni del genoma virale (regione centrale con la coppia di primer 2210-2355 e la regione terminale con i primer 4899-5014). È stato inoltre valutato il livello di immunoprecipitazione del gene relativo all'RNA Ribosomiale 18S, usato come riferimento.

I valori di DNA virale e cellulare dopo immunoprecipitazione sono stati quantificati in modo assoluto mediante interpolazione con curve standard ottenute in precedenza mediante amplificazione di diluizioni scalari di target a DNA a concentrazione nota.

I valori assoluti sono stati usati per determinare la percentuale di immunoprecipitazione, calcolata come rapporto fra il DNA immunoprecipitato in modo specifico (con anticorpo anti istone pan o anti H4 pan) e il DNA input (DNA virale\cellulare presente nel campione di partenza) a cui è stata

sottratta la frazione immunoprecipitata aspecificamente (mediante IgG).

In tabella sono riportati i valori assoluti di DNA virale/cellulare insieme alle percentuali di immunoprecipitazione specifica determinate in base all'input al netto del background (immunoprecipitazione con IgG).

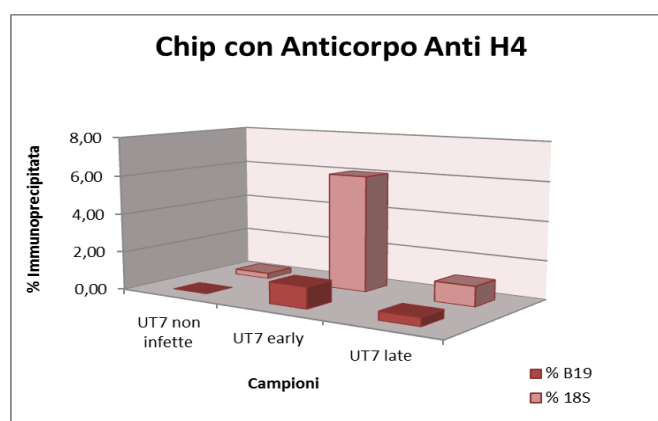
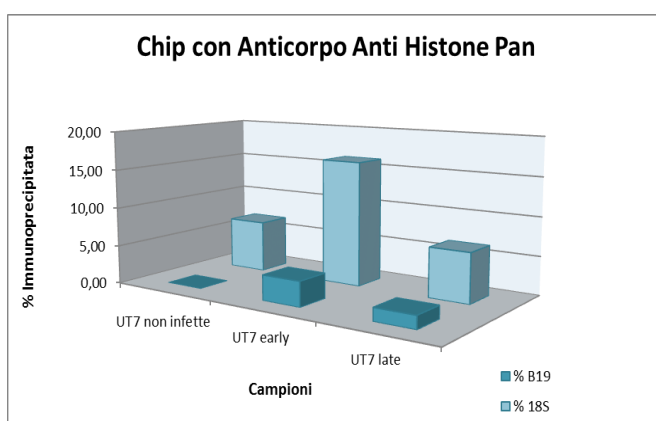
DNA virale

| | INPUT (copie genomiche) | ANTI HISTONE PAN | ANTI H4 |
|-------------------|-------------------------|-------------------|-------------------|
| UT7 no inf | 3,68E+04 | 0,00E+00 (0 %) | 0,00E+00 (0 %) |
| UT7 early | 1,00E+08 | 3,23E+06 (3,23 %) | 1,12E+06 (1,12 %) |
| UT7 late | 1,93E+07 | 3,21E+05 (1,66 %) | 8,59E+05 (0,44 %) |

Ribosomiale18S

| | INPUT (ng) | ANTI HISTONE PAN | ANTI H4 |
|-------------------|------------|------------------|---------------|
| UT7 no inf | 17,3 | 1,17 (6,72 %) | 0,05 (0,29%) |
| UT7 early | 39 | 6,25 (16,19 %) | 1,7 (5,3 %) |
| UT7 late | 20 | 1,2 (6,43 %) | 0,22 (1,10 %) |

In grafico è riportato per i due anticorpi anti istone pan e anti H4 pan il rapporto fra il DNA immunoprecipitato in modo specifico e l'input, al netto del segnale aspecifico, sia per quanto concerne il DNA virale che per quello cellulare.

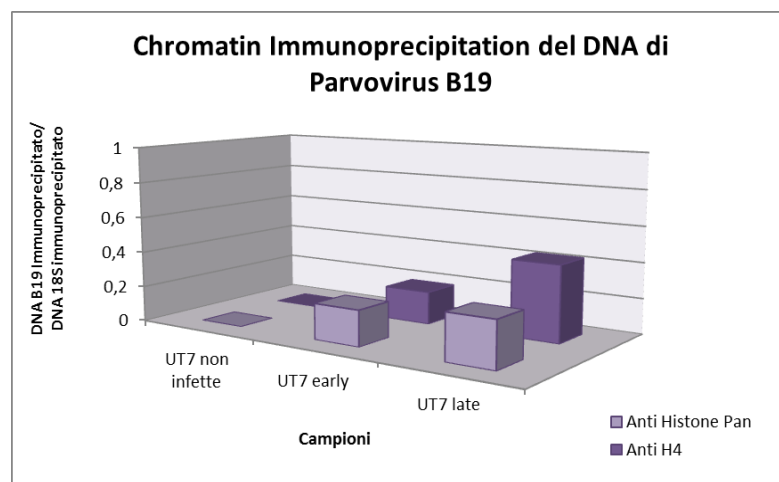


I risultati ottenuti sia con l'anti H4 Pan che con l'anti Histone Pan, mettono in evidenza una significativa immunoprecipitazione del DNA virale, in modo indipendente dalla regione considerata: i dati infatti ottenuti con la coppia 2210-2355 sono infatti sovrapponibili a quelli

relativi all'amplificazione con la coppia 4899-5014 (dati non riportati).

L'immunoprecipitazione del DNA virale è presente sia nel campione precoce che in quello tardivo; tuttavia nel pool precoce si osserva un segnale di immunoprecipitazione superiore sia per il DNA virale (4,9 % Anti istone - 2,8 % Anti H4 nel campione precoce rispetto a 1,76 % - 0,55% nel campione tardivo) che per quello cellulare (18,1 % Anti istone - 6,2 % Anti H4 nel campione precoce rispetto a 1,3 % - 0,2% nel campione tardivo).

Per i diversi campioni la quota di DNA virale immunoprecipitata è stata infine espressa come arricchimento rispetto al DNA cellulare immunoprecipitato, mediante normalizzazione per il DNA ribosomiale e i valori ottenuti confermano anche in questo caso la consistente immunoprecipitazione del DNA di B19.



Risultati - Parte IV

Studio dei microRNA nel corso dell'infezione

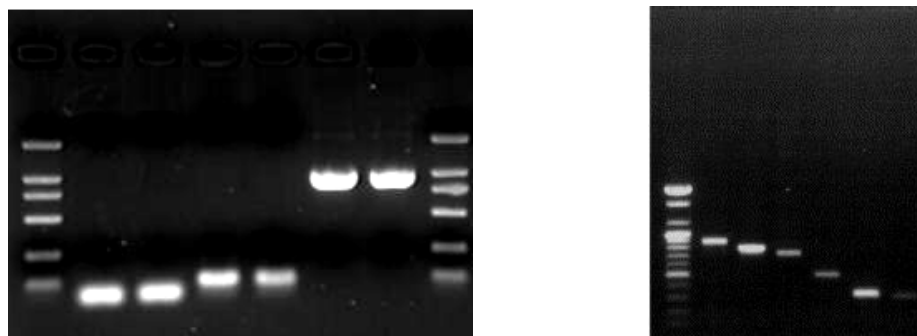
È stato avviato lo studio su un possibile ruolo di microRNA nel corso dell'infezione di B19, sia riguardo alla possibile presenza di microRNA cellulari in grado di modulare il profilo di espressione virale, sia riguardo a eventuali microRNA prodotti dal virus stesso.

Analisi bioinformatiche non hanno consentito di individuare omologie significative, quindi si è seguito un approccio sperimentale per individuare possibili interazioni fra miRNA e specifiche regioni del genoma virale. A tale fine i microRNA estratti da cellule infette e non infette sono stati analizzati per la presenza di specie con omologia di sequenza per il B19 mediante ibridazione con sequenze genomiche del virus immobilizzate su membrana o su biglie magnetiche.

Le cellule UT7EpoS1 sono state infettate con siero viremico, alle 72 hpi aliquote da 2×10^6 di cellule infette sono state raccolte parallelamente a un pari numero di cellule non infette e sono state sottoposte all'estrazione degli smallRNA. Questi sono stati amplificati e marcati e successivamente utilizzati per ibridazione con target specifici per il B19 immobilizzati su membrana di nylon.

Preparazione dei target: Generazione di un array B19-specifico

I target specifici per il B19 sono stati progettati in modo tale da essere sovrapposti e coprire l'intero genoma virale. Tali prodotti sono stati generati in PCR a partire dal clone pCJ0 (contenente l'intera sequenza genomica di B19 priva delle regioni terminali) mediante l'utilizzo di specifici primer. Gli ampliconi sono stati verificati su gel d'agarosio all'1%:



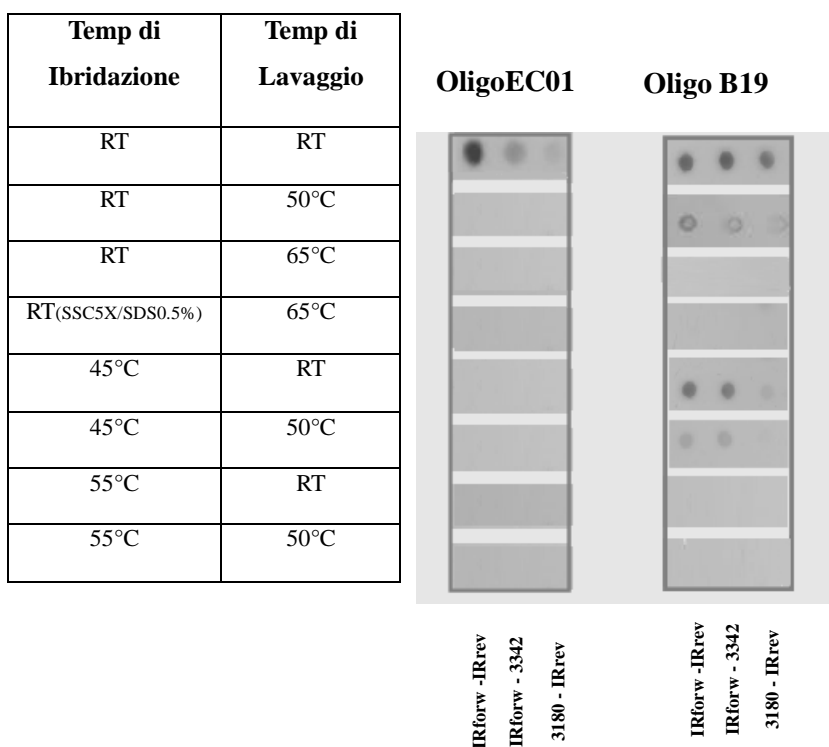
Gel di verifica dei target specifici per il B19 utilizzati per ibridazione su membrana

Parallelamente è stato generato un target full length di B19 biotinilato su uno dei due filamenti (amplificato mediante i primer IR forward bio-IR reverse), immobilizzato su biglie magnetiche rivestite di streptavidina e utilizzato successivamente per l'ibridazione con i microRNA/ds cDNA.

Ibridazione su array B19-specifico

I target generati per l'ibridazione su membrana di nylon sono stati spottati in quantità equimolare (10^9 copie/spot), filtrati mediante apparecchio Bio Dot (*Biorad*), denaturati e fissati agli UV.

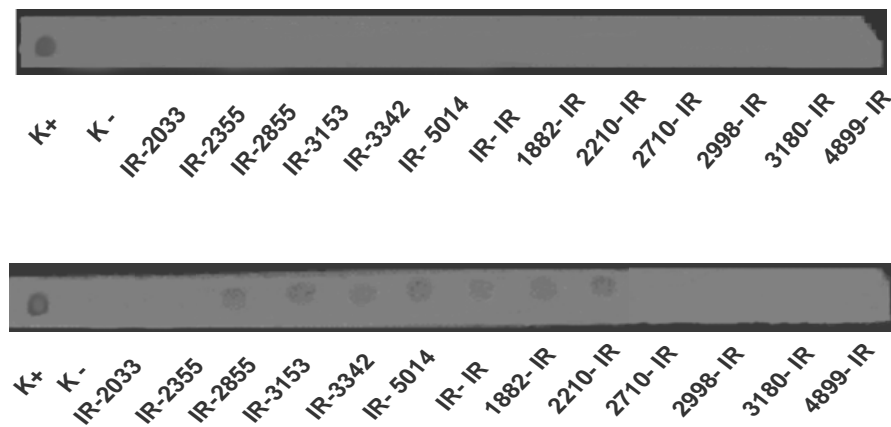
Sono stati inizialmente ottimizzati i parametri di ibridazione (composizione del buffer di ibridazione e temperature di ibridazione e lavaggio) utilizzando alcuni dei target preparati: gli amplificati IR forward-IR reverse, IR forward-3342, 3180-IR reverse sono stati spottati in sedici repliche così da testare su ognuno diverse condizioni sperimentali. Tali target sono stati sottoposti ad ibridazione con due diverse sonde a DNA biotinilate di 20 nt: una specifica per il B19, con un diverso grado di omologia per i target immobilizzati (con identità di sequenza per due target e solo parziale omologia per il terzo, con il quale condivide un frammento di 8 nt), e l'altra relativa a un bersaglio sintetico EC01 (senza alcuna omologia per i target utilizzati). L'avvenuta ibridazione è stata rivelata mediante aggiunta di streptavidina coniugata a fosfatasi alcalina e substrato colorimetrico NBT/BCIP.



Sono state testate diverse condizioni di ibridazione al fine di ottimizzare il protocollo e ridurre il segnale aspecifico, mantenendo un livello di stringenza che permetta la rivelazione anche di ibridi ottenuti per parziale omologia di sequenza (ibridazione dell'oligo di B19 con il target 3180-IR rev, con una omologia di sequenza di 8 nt).

Sulla base di questi risultati si è proceduto alla ibridazione fra i 13 target relativi al B19 e i microRNA amplificati e marcati, per un'analisi comparativa fra il campione infetto e non infetto.

I target immobilizzati in quantità equimolare ciascuno in duplice copia sono stati ibridati con microRNA estratti da cellule infette e con microRNA da cellule non infette con incubazione o/n a 45°C in buffer DIG Easy Hyb Granules (*Roche*). I lavaggi sono stati effettuati tutti a RT e si è proceduto successivamente con lo sviluppo mediante aggiunta di streptavidina-fosfatasi alcalina e substrato colorimetrico NBT/BCIP.

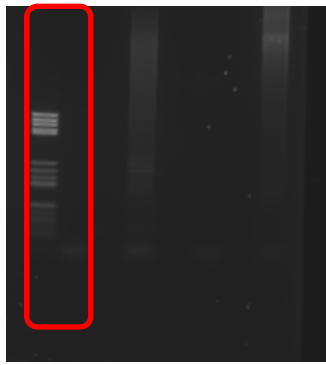


È evidente nel campione infetto un segnale di avvenuta ibridazione nella regione genomica compresa fra i 2210 nt e 2710 nt, assente invece nel campione non infetto. Il risultato in questione suggerisce la presenza di smallRNA con omologia di sequenza per il B19 che rappresentano potenzialmente microRNA cellulari capaci di legare mRNA virali codificati a partire da questa regione o microRNA virali sintetizzati a partire da tale sequenza.

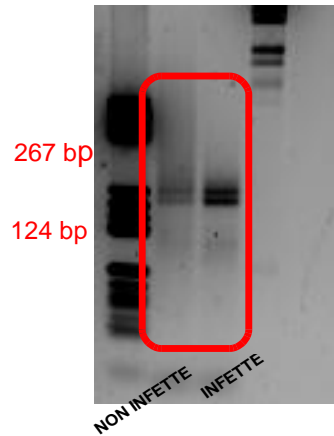
Ibridazione su biglie magnetiche e Generazione di una Libreria di cDNA

Parte dei microRNA estratti da cellule infette e non infette sono stati utilizzati per generare cDNA a doppio filamento poi ibridati con una sequenza genomica biotinilata del B19, con successiva cattura degli ibridi mediante biglie magnetiche rivestite di streptavidina (Dynabeads® M-280 Streptavidin – *Invitrogen*). Questo ha permesso un'analisi comparativa fra il campione infetto e non infetto e un facile recupero dei cDNA con omologia di sequenza per il B19.

Le molecole di cDNA ibridate sono state quindi eluite e amplificate in PCR mediante i primer Oligo(24)T in grado di amplificare in modo specifico il cDNA generato a partire dai microRNA, poichè possiede specifiche tail terminali che ne consentono l'amplificazione. Un'aliquota del prodotto di amplificazione è stata caricata su gel d'agarosio al 2%:



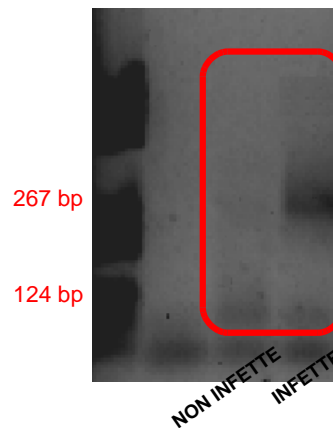
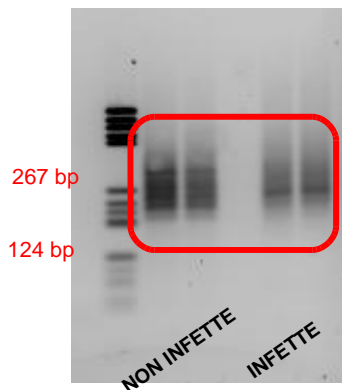
Ottimizzazione del profilo di amplificazione dei cDNA/smallRNA



Amplificato con primer OligodT dopo eluizione dalle biglie

I due campioni mostrano differenze nel profilo di amplificazione, tuttavia in entrambi i casi è presente del segnale ad alto peso molecolare probabilmente relativo a molecole residue di dimensioni maggiore estratte e processate contestualmente agli smallRNA.

Per ridurre la quota residuale a maggiore peso molecolare i prodotti <200 nt sono stati recuperati da gel mediante il sistema Wizard PCR - Gel CleanUP (*Promega*) e analizzati in PCR endpoint mediante primer Oligo(24)dT o Oligo dT Eco-Sma, quest'ultimo fornisce i siti di digestione per gli enzimi EcoRI e SmaI necessari per la clonazione. I prodotti di amplificazione sono stati visualizzati su gel d'agarosio al 2%:



Amplificato con oligo dT e oligo dT Eco-Sma dopo recupero da gel

L'amplificazione con Oligo(24)dT ha permesso di verificare il recupero selettivo di cDNA a basso peso molecolare, dopo l'arricchimento per dimensioni mediante recupero da gel. È evidente un differente profilo di amplificazione fra il campione infetto e non infetto, differenza ancor più marcata nel caso dell'amplificazione con Oligo dT Eco Sma: nel campione infetto è stata rilevata la

presenza di uno smear a basso peso molecolare che è stato recuperato in previsione di una successiva clonazione e caratterizzazione mediante sequenziamento.

Discussione

Il lavoro di ricerca svolto durante i tre anni di dottorato ha riguardato lo studio di meccanismi replicativi e di regolazione dell'espressione genica di Parvovirus B19.

In vitro, solo un limitato numero di linee cellulari è in grado di sostenere la replicazione virale, come le UT7/Epo-S1, subclone di una linea cellulare megacarioblastoide, che rappresenta il sistema in vitro più sensibile all'infezione. Tuttavia anche in queste cellule la produzione della progenie virale risulta limitata.

L'analisi in vitro delle caratteristiche biologiche del Parvovirus B19 e della patogenesi molecolare ad esso associata è quindi limitata e vincolata dalla disponibilità di sieri altamente viremici.

Al fine di bypassare tale limite e disporre di un sistema in vitro per lo studio del B19, negli ultimi decenni cloni plasmidici virali sono stati oggetto di studio per valutare la loro funzionalità e la capacità di generare particelle virali infettanti. Questi cloni sono importanti sia come fonte ricombinante di particelle virali, sia come sistema manipolabile in vitro per analisi genetiche finalizzate ad una migliore comprensione della biologia del virus e dell'interazione virus-cellula. Diversi tentativi sono stati esplorati in passato e in alcuni casi hanno portato alla costruzione di cloni genomici full-length con competenza funzionale, capaci di generare nuove particelle virali infettanti [Zhi et al., 2004]. Questi cloni risultano utili per approfondire caratteristiche del genoma e delle proteine di B19. Uno studio sul clone pB19-M20 basato sulla mutagenesi sistemica dei codoni di inizio delle diverse ORFs ha permesso di approfondire l'importanza di tali sequenze codificanti per la competenza funzionale del genoma clonato [Zhi et al., 2006]. Un ulteriore studio basato sul confronto fra tre cloni ottenuti da diversi isolati virali (pB19-M20, pB19-FL e pB19-HG1) ha contribuito a definire il ruolo critico del dominio fosfolipasico nella regione VP1u per il mantenimento dell'infettività virale [Filippone et al., 2008]. Questi cloni tuttavia non consentono una elevata resa di particelle virali infettanti; sono pertanto necessari ulteriori studi sulla funzionalità virale per l'ottimizzazione del sistema dei cloni genomici aumentandone le rese e per una migliore comprensione della biologia del B19.

Parte del presente lavoro ha riguardato lo studio comparato di diversi cloni genomici di B19 e della loro capacità di produrre particelle virali infettanti, con l'obiettivo di caratterizzare le regioni terminali del virus e di identificare i requisiti essenziali per la funzionalità delle stesse.

I cloni genomici e subgenomici utilizzati sono stati costruiti a partire da una sequenza sintetica. La sequenza è stata progettata come la sequenza consenso, ottenuta dall'allineamento delle sequenze di

un insieme di isolati di B19 presenti nella banca dati del NCBI, il che ha permesso di ridurre la variabilità genomica associata all'uso di differenti isolati virali.

Per l'analisi sono stati utilizzati cloni contenenti una diversa estensione e combinazione di isomeri delle regioni terminali: i cloni pHG10 e pHG01, che contengono il genoma intero di B19 e fungono da riferimento in quanto capaci di mimare il comportamento del virus wild type; i cloni subgenomici pCH (nelle diverse combinazioni di isomeri conformazionali delle regioni terminali), pCI0 e pCJ0, che contengono frazioni progressivamente minori delle sequenze terminali, rispettivamente 190 bp, 141 bp e 19 bp.

Il DNA plasmidico utilizzato per la trasfezione è stato preparato mediante trasformazione del ceppo batterico Sure II, mutagenizzato in modo tale da inattivare le vie enzimatiche in grado di catalizzare riarrangiamenti del DNA esogeno. L'utilizzo di questo ceppo batterico è critico visto che svariati tentativi operati in passato al fine di clonare il genoma intero del B19 non hanno avuto successo causa l'instabilità delle sequenze terminali nelle cellule batteriche usate nella fase iniziale di propagazione. Per la trasfezione in cellule UT7EpoS1, sono stati utilizzati i soli inserti genomici il che è stato visto in passato permette di aumentare l'efficienza della metodica. La trasfezione inoltre è stata effettuata mediante nucleofezione, un tipo particolare di elettroporazione, che permette l'inserimento di materiale genetico direttamente nel nucleo delle cellule consentendo una maggiore efficienza di trasfezione e una maggiore vitalità delle cellule trasfettate, rispetto ad altri metodi classicamente utilizzati.

A seguito di trasfezione in cellule UT7EpoS1, i cloni ricombinanti, genomici e subgenomici, sono stati analizzati per l'attività replicativa, trascrizionale e per la loro capacità di portare alla produzione di particelle virali infettanti, mediante infezione di UT7EpoS1 con il lisato post trasfezione.

L'analisi quantitativa degli acidi nucleici virali è stata effettuata mediante RealTime PCR sui campioni post trasfezione e post infezione ed ha evidenziato la diversa capacità funzionale dei cloni.

I cloni pCG01 e pCG10 contenenti l'intero genoma di B19 rispettivamente nelle combinazioni di isomeri terminali flop-flip e flip-flop sono stati utilizzati come riferimento per l'analisi funzionale. Dopo trasfezione la quantità di DNA presente nelle cellule UT7EpoS1 è saturante e pertanto non si osserva alcuna variazione di DNA fra le 2 e 72 hpt, mentre è evidente un consistente aumento dell'RNA virale (+1,6 e +1,3 Log). La capacità trasducente e la competenza funzionale dei virioni presenti nel lisato post-trasfezione sono state valutate mediante infezione di cellule UT7EpoS1 ed evidenziate da un aumento dell'RNA fra le 2 e 72 hpi (+2 e +1,8 Log). Non si osserva invece alcuna attività replicativa dopo infezione; probabilmente la replicazione avviene, ma in un numero limitato

di cellule il che ne rende difficile la rilevazione.

I cloni pCH contengono metà delle regioni terminali fino all'asse di simmetria delle stesse e si differenziano fra di loro per la diversa combinazione di isomeri terminali. Per nessuno di questi cloni si è osservata attività replicativa post-trasfezione pur in presenza di attività trascrizionale (+2,4 Log pCH01; +3,2 Log pCH10; +2 Log pCH11; +2 Log pCH00). A seguito di infezione invece il comportamento ha mostrato una dipendenza dalla combinazione degli isomeri terminali: solo i cloni pCH01 e pCH10 hanno mantenuto un'importante attività trascrizionale fra le 2 e 72 hpi (+2,1 e +2 Log). I cloni pCH00 e pCH11 invece hanno perso totalmente la loro funzionalità e non hanno evidenziato né attività replicativa né trascrizionale post-infezione.

I cloni pCI0 e pCJ0 presentano un'ulteriore riduzione delle regioni terminali (140 nt e 19 nt rispettivamente). Dopo trasfezione per nessuno dei due cloni è stata osservata attività replicativa; per ciò che concerne la produzione di RNA virali, seppure in presenza di quantità assolute inferiori rispetto agli altri cloni, si è osservato un consistente aumento dei trascritti fra le 2 e 72 hpt (+2,3 e +3 Log). La capacità trasducente è stata mantenuta anche se ridotta, mentre è stata abolita qualsiasi attività funzionale dopo infezione per entrambi i cloni.

Dai risultati ottenuti è evidente l'esistenza di un criterio minimo per la funzionalità delle regioni terminali in termini di estensione delle stesse. Dai risultati ottenuti i cloni full-length sembrano condividere un analogo comportamento funzionale con i cloni contenenti metà delle regioni terminali fino all'asse di simmetria delle stesse, suggerendo che la minima estensione per la funzionalità delle regioni terminali è basata su requisiti di simmetria per la generazione di hairpin complete nel genoma a singolo filamento. Come possibile spiegazione, un evento di self-priming o una ricombinazione intra/inter-molecolare fra gli inserti dopo trasfezione potrebbero permettere la ricostituzione di regioni terminali integre, attive come innesco per la replicazione virale. Un'ulteriore riduzione delle regioni terminali (pCI0 e pCJ0) impedisce la ricostituzione di hairpin integre abolendo dunque la competenza funzionale del genoma.

Un altro aspetto critico per la funzionalità dei cloni è la asimmetria degli isomeri delle regioni terminali. Se si prendono in considerazione i cloni pCH, solo quelli con una distribuzione eterogenea flip-flop (pCG01 e pCG10) hanno mostrato una competenza funzionale, simile a quella osservata per i cloni full-length, sottolineando che la presenza e la distribuzione di basi asimmetriche sono aspetti critici nel ricostituire la competenza funzionale delle regioni terminali. Probabilmente anche in questo caso si può ipotizzare un evento di ricombinazione che permetterebbe la rigenerazione di regioni terminali integre.

Il ciclo vitale del B19 inizia con il riconoscimento da parte delle proteine capsidiche del recettore globoside e del corecettore, le integrine di tipo $\alpha 5\beta 1$, che si è visto essere necessarie alla penetrazione del virus nella cellula [Weigel-Kelley et al., 2003]. Dopo internalizzazione la

replicazione virale è di tipo restrittivo e la formazione di progenie virale è limitata a cellule in fase S, in quanto dotate di fattori necessari alla sintesi del DNA virale. Gli eventi che seguono l'ingresso del virus mostrano ulteriori differenze a seconda del sistema cellulare preso in considerazione ed esistono differenti livelli di restrizione in relazione alla capacità della cellula di supportare la replicazione, la trascrizione e quindi la traduzione dell'informazione genetica veicolata dal virus. Ad oggi, tuttavia, non sono ancora del tutto noti i fattori critici per il completamento del ciclo vitale del virus e quindi continuano ad essere oggetto di studio e di grande interesse.

Inoltre il B19 considerato da sempre un virus capace di un'infezione litica e acuta, sembra in realtà avere un ciclo vitale più complesso ed essere capace anche di un'interazione a lungo termine con le cellule dell'ospite e di instaurare una persistenza in vivo in numerosi tessuti. Allo stato attuale tuttavia non sono ancora noti i meccanismi in grado di condurre all'instaurarsi di una persistenza, nè le caratteristiche funzionali del genoma virale in questo stato. Il genoma di B19 sembra persistere in forma silente nei tessuti e si ipotizza che meccanismi epigenetici di regolazione contribuiscano a tale silenziamento, partecipando probabilmente anche alla riattivazione in un secondo momento.

La metilazione è una delle principali modifiche epigenetiche che gioca un ruolo fondamentale nel controllo dell'espressione genica. Tale modificazione interessa le citosine dei dinucleotidi CpG, la cui frequenza nel genoma dei vertebrati è inferiore rispetto all'atteso: i dinucleotidi CpG metilati tendono a essere soggetti a una deaminazione che converte le citosine in timidine generando un mismatch che può essere o meno correttamente riparato [Cheung and Lau, 2005]. I dinucleotidi CpG sono organizzati principalmente in cluster, le cosiddette "isole CpG", presenti a livello di numerosi promotori di geni cellulari e critici nella regolazione dell'espressione genica.

Il ruolo della metilazione nel corso dell'infezione è stato approfondito per virus a DNA fra cui virus capaci di stabilire latenza, come gli Herpesviridae, o per virus capaci di integrarsi, come i Retroviridae [Hoelzer et al., 2008]; poco si sa invece relativamente a virus in attiva replicazione come quelli della famiglia Parvoviridae che combinano aspetti tipici di un ciclo virale litico con aspetti di persistenza.

Le regioni terminali del genoma di B19 posseggono caratteristiche tipiche delle isole CpG come evidenziato dall'analisi mediante il software Emboss CpG Plot, utilizzato per valutare la presenza e la distribuzione di dinucleotidi CpG sul genoma virale. È stato ipotizzato che la metilazione delle regioni ITR, e in particolar modo quella di sinistra contenente l'unico promotore virale P6, abbia un ruolo critico nella regolazione dell'espressione genica virale. È stata trovata per diversi virus una correlazione fra la metilazione dei dinucleotidi CpG sul genoma e aspetti associati alla funzionalità virale, come il silenziamento dell'espressione genica e lo stabilirsi di uno stato di quiescenza da parte del virus. Anche per il B19 si può ipotizzare un ruolo della metilazione nel silenziamento del

ciclo litico e nello stabilirsi di un stato di persistenza virale, aspetti che sono stati oggetto di questo studio.

Lo stato di metilazione del genoma virale è stato analizzato mediante un saggio di RealTime PCR metilazione-specifica, che ha permesso una quantificazione della metilazione della regione ITR di sinistra. Seppure la tecnica si limiti all'analisi di una specifica regione, presenta diversi vantaggi quale una determinazione quantitativa accurata dello stato di metilazione della regione di interesse e la possibilità di rilevare anche minime frazioni di DNA metilato, a differenza dei metodi di analisi della metilazione basati sul sequenziamento.

L'effetto della metilazione del genoma di B19 sull'espressione genica virale è stato valutato mediante trasfezione di DNA metilato in vitro e non metilato in cellule UT7EpoS1. Inizialmente è stata osservata una minima, ma rilevabile demetilazione del DNA trasfettato nella forma metilata, il che probabilmente è da imputare al bilanciamento fra la replicazione del DNA virale e il mantenimento dello stato di metilazione sulle molecole genomiche neosintetizzate da parte degli enzimi cellulari. Dai risultati ottenuti si evince una differenza di attività trascrizionale fra il DNA trasfettato nella forma non metilata e il DNA metilato, per il quale è evidente una minore produzione di messaggeri virali, ad indicare il possibile ruolo della metilazione nel silenziamento dell'espressione genica virale. Tale ipotesi è stata supportata da una successiva prova basata sull'utilizzo del gene reporter EGFP sotto il controllo del promotore virale P6 nella forma metilata e non metilata. La metilazione dell'ITR di sinistra contenente il promotore P6 può plausibilmente ostacolare il legame di fattori di trascrizione cellulari o dell'NS virale necessario per promuovere la trascrizione dei geni virali, determinando in questo modo un effetto di silenziamento.

La metilazione del genoma virale e i suoi effetti sul ciclo vitale del virus stesso sono stati valutati a seguito di infezione prolungata in vitro in due sistemi cellulari, le cellule UT7EpoS1 e le U937, con diverso grado di permissività per il B19. Nelle UT7EpoS1, sistema cellulare permissivo per il B19, si è osservata una perdita di attività replicativa e trascrizionale solo a time-point tardivi in corrispondenza dei quali si rileva un livello di metilazione minimo. Diversa è la situazione per le U937, sistema cellulare non permissivo per la replicazione di B19: il DNA virale si mantiene a livelli bassi, ma costanti con un progressivo e significativo aumento della quota metilata. In questa ultima linea cellulare inoltre non viene rilevata alcuna attività trascrizionale.

La presenza di tale fenomeno epigenetico è stata valutata inoltre nel corso dell'infezione naturale, mediante l'analisi di campioni bioptici relativi a diversi tessuti: è stata evidenziata la metilazione del genoma virale in tali campioni che è probabilmente indicativa dello stabilirsi di una persistenza virale nei tessuti e suggerisce il ruolo dell'epigenetica nel regolare il corso dell'infezione naturale.

Alla luce di tali risultati è possibile ipotizzare che il DNA virale in condizioni di attiva replicazione

in sistemi permissivi non sia metilato, mentre in sistemi cellulari non permissivi l'assenza di attività replicativa e trascrizionale può correlare con la metilazione del genoma virale che probabilmente partecipa al silenziamento dell'espressione genica e allo stabilirsi di uno stato di persistenza del virus. Inoltre la metilazione dei dinucleotidi CpG è coinvolta nel riconoscimento da parte del sistema immunitario e in particolare della risposta innata; la metilazione del genoma virale può quindi essere utilizzata dal virus anche per evadere la risposta immunitaria e indurre una condizione di tolleranza da parte dell'ospite.

La metilazione del DNA e in generale i meccanismi epigenetici di regolazione dell'espressione genica virale hanno probabilmente un importante ruolo nell'adattamento del virus all'ambiente in cui si trova e possono essere determinanti critici nel definire l'esito finale dell'infezione messa in atto dal virus.

Le metilazione del genoma rappresenta un livello di regolazione dell'espressione genica del virus, tuttavia è necessario prendere in considerazione la complessa rete di meccanismi epigenetici di regolazione considerando anche altri aspetti come il complessamento del genoma virale in strutture nucleosomali e le modificazioni delle proteine istoniche.

Recenti studi hanno dimostrato che per diversi virus la formazione di strutture cromatiniche ha un importante ruolo che dipende e varia in base al ciclo vitale del virus. Per il B19 non si hanno informazioni circa un'eventuale associazione del genoma virale con gli istoni; parte di questo studio ha pertanto riguardato un'analisi preliminare circa la possibile complessazione del DNA di B19 con le proteine istoniche cellulari nel corso di un'infezione prolungata in cellule UT7EpoS1.

I prelievi raccolti dopo infezione sono stati organizzati in due pool "precoce" e "tardivo" e sottoposti all'immunoprecipitazione della cromatina con anticorpi specifici per gli istoni cellulari (anticorpo anti-istone pan e anticorpo anti-istone H4). In assenza di indicazioni iniziali inerenti la tempistica di un possibile complessamento del B19 con gli istoni e la composizione delle strutture nucleosomali (strutture "classiche" come quelle cellulari piuttosto che una composizione eterogenea), si è scelto di raggruppare i prelievi dei diversi time-point in due pool e utilizzare anticorpi generici, che riconoscono rispettivamente un epitopo comune a tutti gli istoni o l'H4 indipendentemente dal suo stato di modificazione post-traduzionale. In questo modo l'obiettivo è stato quello di avere una panoramica generale della complessazione con gli istoni nel corso dell'infezione, che fornisse quindi un orientamento iniziale per poi approfondire i dettagli in modo più mirato in un secondo momento.

L'analisi mediante RealTime PCR ha permesso di determinare la frazione di DNA immunoprecipitata in modo specifico (tenendo cioè conto della quantità di DNA input presente nel campione in partenza ed al netto della quota immunoprecipitata aspecificamente) mettendo in

evidenza l'associazione di una quota del DNA di B19 con gli istoni. Se confrontata con il DNA ribosomiale cellulare usato come riferimento, l'associazione del DNA di B19 alle proteine istoniche risulta piuttosto consistente ed inoltre non mostra una differenza significativa fra i due diversi anticorpi utilizzati (per il campione "precoce" la frazione di DNA virale immunoprecipitata rispetto al ribosomiale è pari a 0,18 con l'Anti-H4 e 0,2 con l'Anti-istone Pan; per il campione "tardivo" il rapporto è di 0,42 e 0,25 rispettivamente). Se si considerano i valori assoluti, il campione "precoce" presenta valori superiori di DNA immunoprecipitato sia cellulare che virale rispetto al campione "tardivo", il che porta ad ipotizzare una maggiore accessibilità della cromatina nelle prime fasi che seguono l'ingresso del virus nella cellula. Inoltre per l'analisi in RealTime PCR sono state prese in considerazione diverse coppie di primer relative a diverse regioni genomiche di B19, ma non si sono osservate sostanziali differenze il che suggerisce un probabile coinvolgimento dell'intero genoma nell'interazione con le proteine istoniche.

Questi studi rappresentano prove preliminari, i cui risultati incoraggianti aprono la strada ad ulteriori approfondimenti circa la dinamica dell'interazione fra il DNA di B19 e gli istoni e il ruolo che questa complessazione potrebbe assumere nel ciclo vitale del virus.

Il concetto di epigenetica inoltre si è recentemente esteso a meccanismi regolati da piccoli RNA non codificanti come i microRNA.

Nel tempo si sono accumulate evidenze che testimoniano sia la produzione di microRNA con azione anti-virale da parte delle cellule sia la produzione di microRNA da parte di virus stessi. La maggior parte dei microRNA virali identificati è codificata da virus nucleari a DNA e in particolar modo dagli Herpesvirus. Non ci sono evidenze circa la produzione di microRNA da parte dei Parvovirus, tuttavia si è gradualmente fatta strada l'ipotesi che i microRNA possano assumere un importante significato nell'interazione fra il B19 e le cellule target. In particolar modo, in uno studio sono state approfondite le ragioni della limitata produzione di proteine capsidiche di B19 in cellule non permissive, mettendo in evidenza il possibile ruolo della regione 3'UTR dei corrispondenti mRNA nel reprimerne la sintesi, inibendo il caricamento dei ribosomi [Pallier et al., 1997]. A riguardo è stato ipotizzato un possibile contributo dei microRNA cellulari nel limitare la produzione delle proteine capsidiche agendo sui corrispondenti 3'UTR [Berillo et al., 2012], il che contribuisce ad accrescere l'interesse circa il possibile ruolo dei microRNA nell'interazione fra il B19 e la cellula.

Parte del presente studio ha riguardato l'analisi dei microRNA eventualmente prodotti in risposta all'infezione di B19. Dal momento che l'utilizzo di analisi bioinformatiche non ha permesso di ottenere risultati significativi, è stato utilizzato un approccio sperimentale. A tale fine i microRNA estratti da cellule infette e non infette sono stati analizzati per la presenza di specie con omologia di

sequenza per il B19 mediante ibridazione con sequenze genomiche del virus immobilizzate su membrana o su biglie magnetiche.

È stata utilizzata una membrana di nylon per generare un dot-blot DNA array specifico per il B19 che dopo un'iniziale messa a punto è stato impiegato per valutare l'espressione di microRNA nei campioni. I microRNA estratti dal campione di cellule infettate e non infettate sono stati amplificati, marcati e ibridati sull'array su cui sono state preventivamente immobilizzate sequenze di DNA relative al genoma di B19. Tali sequenze sono state disegnate in modo da essere sovrapposte fra di loro e coprire l'intero genoma virale al fine di consentire la mappatura sul genoma di B19 di eventuali specie di interesse. Gli ibridi sono stati infine rilevati mediante reazione colorimetrica.

È stata rilevata una significativa differenza di segnale fra il campione infetto e il non infetto nella regione genomica compresa fra i 2210 nt e 2710 nt: si tratta potenzialmente di microRNA presenti solo o comunque in quantità maggiore nel campione infetto (non è stato rilevato alcun segnale nel campione non infetto) di natura cellulare, diretti verso messaggeri virali codificati a partire da questa regione, o di origine virale, generati a partire da tale sequenza.

Il dato potrebbe essere interessante se si considera che tale regione corrisponde ad una porzione centrale del genoma di B19 ricca in elementi che regolano il processamento degli RNA messaggeri virali: in posizione 2183 nt è presente il sito donatore di splicing del secondo e terzo introne coinvolto anche nella produzione della proteina capsidica VP2, mentre in posizione 2639 nt è presente il sito prossimale di poliadenilazione pAp1 utilizzato da diversi RNA messaggeri fra cui quello codificante per l'NS. Il passo successivo sarà una mappatura più fine di questa regione per localizzare in modo dettagliato sul genoma di B19 tale specie e arrivare ad una sua caratterizzazione e identificazione.

Al fine di permettere un facile recupero di microRNA con omologia di sequenza per il genoma di B19 e favorirne la caratterizzazione, è stato utilizzato un diverso approccio basato sull'ibridazione fra i microRNA estratti dalle cellule e il DNA genomico di B19 immobilizzato su biglie rivestite di streptavidina. I microRNA ibridati sono stati eluiti e amplificati con l'inserimento di siti di restrizione necessari per la successiva clonazione. In questo modo è stata possibile un'analisi qualitativa comparata dei microRNA isolati dal campione infetto e non infetto e allo stesso tempo è stato possibile il recupero di queste specie per una successiva caratterizzazione mediante sequenziamento. Dall'analisi qualitativa mediante elettroforesi si nota una differenza nel pattern dei microRNA amplificati fra il campione infetto e il non infetto ed in particolare è stata identificata una banda a basso peso molecolare presente solo nel campione infetto che è stata recuperata e usata per la clonazione e verrà caratterizzata mediante sequenziamento.

L'approccio utilizzato ha fornito risultati preliminari che appaiono promettenti, ma richiedono ulteriore approfondimento; allo stesso tempo l'ottimizzazione di questo approccio potrebbe fornire un'importante alternativa ai metodi classicamente utilizzati per lo studio dei microRNA che

presentano differenti limiti, basti pensare alle tecniche basate su ibridazione che, analogamente alla RealTime PCR, richiedono la conoscenza delle sequenze dei microRNA di interesse per disegnare specifiche sonde il che rende questi approcci inadatti alla scoperta di microRNA *ex novo*; allo stesso tempo l'avvento dei microarray rappresenta un potente strumento per lo studio dei microRNA ma il loro utilizzo è limitato a pochi laboratori data la necessità di equipaggiamento e reagenti costosi, mentre approcci analoghi a quello illustrato, basati sull'ibridazione su membrana, una volta ottimizzati, possono essere facilmente utilizzati come tecnica di routine e rappresentare una interessante e comoda alternativa per lo studio del profilo di espressione dei microRNA.

Il lavoro di ricerca svolto ha fornito interessanti risultati e nuovi spunti per il proseguimento futuro delle indagini, seguendo due principali direzioni: da un lato il lavoro è stato orientato verso lo sviluppo di un sistema ricombinante per la produzione di virioni *in vitro*, importante per studi di correlazione sequenza-funzione e quindi per una migliore comprensione della biologia del virus; dall'altro lato è stato finalizzato ad approfondire l'interazione virus-cellula mediante lo studio di meccanismi epigenetici e del ruolo che questi potrebbero assumere nell'adattamento del virus all'ambiente circostante.

Bibliografia

- Parvovirus infection, leukaemia, and immunodeficiency [letter]. *Lancet*. 1989. 1:101-2.
- Aberham C, Pendl C, Gross P, Zerlauth G, Gessner M. A quantitative, internally controlled real-time PCR Assay for the detection of parvovirus B19 DNA. *J Virol Methods*. 2001 Apr;92(2):183-91.
- Agbandje, M. S. Kajigaya, R. McKenna, N. S. Young, and M. G. Rossmann. 1994. The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. *Virology*. 203:106-15.
- Agbandje M, McKenna R, Rossmann MG, Kajigaya S, Young NS. Preliminary X-ray crystallographic investigation of human parvovirus B19. *Virology*, 1991, 184:170-4
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002.
- Ameres SL, Martinez J, Schroeder R. Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*. 2007 Jul 13;130(1):101-12.
- Anand R, Marmorstein R. Structure and mechanism of lysine-specific demethylase enzymes. *J Biol Chem*. 2007 Dec 7;282(49):35425-9. Epub 2007 Sep 26
- Ambinder,R.F., Robertson,K.D. and Tao,Q. (1999) DNA methylation and the Epstein–Barr virus. *Semin. Cancer Biol.*, 9, 369–375. 72.
- Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):350-5
- Amiss,T.J., McCarty,D.M., Skulimowski,A. and Samulski,R.J.(2003) Identification and characterization of an adeno-associated virus integration site in CV-1 cells from the African green monkey.*J. Virol.*, 77, 1904–1915.
- Anand, A. E. S. Gray, T. Brown, J. P. Clewley and B. J. Cohen. 1987. Human parvovirus infection in pregnancy and hydrops fetalis. *N Engl J Med*. 316:183-6.
- Anderson, M. J. P. G. Higgins, L. R. Davis, J. S. Willman, S. E. Jones, I. M. Kidd, J. R. Pattison and D. A. Tyrrell. 1985. Experimental parvoviral infection in humans. *J Infect Dis*. 152:257-65.
- Anderson, M. J. S. E. Jones, S. P. Fisher-Hoch, E. Lewis, S. M. Hall, C. L. Bartlett, B. J. Cohen, P. P. Mortimer and M. S. Pereira. 1983. Human parvovirus, the cause of erythema infectiosum (fifth disease). *Lancet*. 1:1378.
- Anderson, M. J. I. M. Kidd, S. E. Jones, J. R. Pattison, M. H. Grieco, M. Lange, E. Buimovici-Klein, and L. Z. Cooper. 1985. Parvovirus infection and the acquired immunodeficiency syndrome [letter]. *Ann Intern Med*. 102:275.
- Anderson, M. J., E. Lewis, I. M. Kidd, S. M. Hall, and B. J. Cohen. 1984. An outbreak of erythema infectiosum associated with human parvovirus infection. *J Hyg (Lond)*. 93:85-93.

Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Nov 15;88(22):10148-52.

Arista S, De Grazia S, Di Marco V, Di Stefano R, Craxì A. Parvovirus B19 and "cryptogenic" chronic hepatitis. *J Hepatol*. 2003 Mar;38(3):375-6.

Avolio-Hunter TM, Lewis PN, Frappier L. Epstein-Barr nuclear antigen 1 binds and destabilizes nucleosomes at the viral origin of latent DNA replication. *Nucleic Acids Res*. 2001 Sep 1;29(17):3520-8.

Axtell MJ, Bowman JL. Evolution of plant microRNAs and their targets. *Trends Plant Sci*. 2008 Jul;13(7):343-9. doi: 10.1016/j.tplants.2008.03.009. Epub 2008 May 22.

Azzi, A., M. Morfini, and P. M. Mannucci. 1999. The transfusion-associated transmission of parvovirus B19. *Transfus Med Rev*. 13:194-204.

Bannister AJ, Kouzarides T. Reversing histone methylation. *Nature*. 2005 Aug 5;436(7054):1103-6.

Bansal, G. P., J. A. Hatfield, F. E. Dunn, A. A. Kramer, F. Brady, C. H. Riggin, M. S. Collett, K. Yoshimoto, S. Kajigaya, and N. S. Young. 1993. Candidate recombinant vaccine for human B19 parvovirus. *J Infect Dis*. 167:1034-44.

Baylis SA, Ma L, Padley DJ, Heath AB, Yu MW, Collaborative Study G. Collaborative study to establish a World Health Organization International genotype panel for parvovirus B19 DNA nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays. *Vox Sang*, 2012, 102:204-11.

Baylis SA, Shah N, Minor PD. Evaluation of different assays for the detection of parvovirus B19 DNA in human plasma. *J Virol Methods*. 2004 Oct;121(1):7-16.

Beard, C., J. St Amand, and C. R. Astell. 1989. Transient expression of B19 parvovirus gene products in COS-7 cells transfected with B19-SV40 hybrid vectors. *Virology*. 172:659-64.

Beezhold KJ, Castranova V, Chen F. Microprocessor of microRNAs: regulation and potential for therapeutic intervention. *Mol Cancer*. 2010 Jun 1;9:134. doi: 10.1186/1476-4598-9-134.

Bell, L. M., S. J. Naides, P. Stoffman, R. L. Hodinka, and S. A. Plotkin. 1989. Human parvovirus B19 infection among hospital staff members after contact with infected patients. *N Engl J Med*. 321:485-91

Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods*. 2010 Apr;50(4):244-9. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.026. Epub 2010 Jan 28

Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett*. 2005 Oct 31;579(26):5904-10. Epub 2005 Sep 30.

- Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E. Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):21-4.
- Berillo O, Khailenko V, Ivashchenko A, Perlmutter-Shoshany L, Bolshoy A. miRNA and tropism of human parvovirus B19. *Comput Biol Chem*, 2012, 40:1-6.
- Berns, K. I., and R. A. Bohenzky. 1987. Adeno-associated viruses: an update. *Adv Virus Res.* 32:243-306.
- Bernstein DI, El Sahly HM, Keitel WA, Wolff M, Simone G, Segawa C, Wong S, Shelly D, Young NS, Dempsey W. Safety and immunogenicity of a candidate parvovirus B19 vaccine. *Vaccine*, 2011, 29:7357-63
- Bestor TH, Bourc'his D. Transposon silencing and imprint establishment in mammalian germ cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2004;69:381-7
- Blumel J, Burger R, Drost C, Groner A, Gurtler L, Heiden M, Hildebrandt M, Jansen B, Montag-Lessing T, Offergeld R, Pauli G, Seitz R, Schlenkrich U, Schottstedt V, Strobel J, Willkommen H, von Konig CH. Parvovirus B19 - Revised. *Transfus Med Hemother*, 2010, 37:339-350.
- Blundell, M. C., and C. R. Astell. 1989. A GC-box motif upstream of the B19 parvovirus unique promoter is important for in vitro transcription. *J Virol.* 63:4814-23.
- Blundell, M. C., C. Beard, and C. R. Astell. 1987. In vitro identification of a B19 parvovirus promoter. *Virology.* 157:534-8
- Bock CT, Klingel K, Kandolf R. Human parvovirus B19-associated myocarditis. *N Engl J Med*, 2010, 362:1248-9.
- Bonnet E, Wuyts J, Rouzé P, Van de Peer Y. Evidence that microRNA precursors, unlike other non-coding RNAs, have lower folding free energies than random sequences. *Bioinformatics.* 2004 Nov 22;20(17):2911-7. Epub 2004 Jun 24.
- Bonsch C, Zuercher C, Lieby P, Kempf C, Ros C. The globoside receptor triggers structural changes in the B19 virus capsid that facilitate virus internalization. *J Virol*, 2010, 84:11737-46.
- Bonvicini F, Puccetti C, Salfi NC, Guerra B, Gallinella G, Rizzo N, Zerbini M. Gestational and fetal outcomes in B19 maternal infection: a problem of diagnosis. *J Clin Microbiol*, 2011, 49:3514-8.
- Bonvicini F, Manaresi E, Gallinella G, Gentilomi GA, Musiani M, Zerbini M. Diagnosis of fetal parvovirus B19 infection: value of virological assays in fetal specimens. *Bjog*, 2009, 116:813-7.
- Bonvicini F, Filippone C, Delbarba S, Manaresi E, Zerbini M, Musiani M, Gallinella G. Parvovirus B19 genome as a single, two-state replicative and transcriptional unit. *Virology*, 2006, 347:447-54.
- Bonvicini F, Filippone C, Manaresi E, Zerbini M, Musiani M, Gallinella G. Functional analysis and quantitative determination of the expression profile of human parvovirus B19. *Virology*, 2008, 381:168-77.

Bonvicini F, Manaresi E, Di Furio F, De Falco L, Gallinella G. Parvovirus B19 DNA CpG dinucleotide methylation and epigenetic regulation of viral expression. *PLoS One*, 2012, 7:e33316.

Bonvicini F, La Placa M, Manaresi E, Gallinella G, Gentilomi GA, Zerbini M, Musiani M. Parvovirus B19 DNA is commonly harboured in human skin. *Dermatology*, 2010, 220:138-42.

Boyes J, Bird AEMBO J. Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. 1992 Jan;11(1):327-33.

Braham S, Gandhi J, Beard S, Cohen B. Evaluation of the Roche LightCycler parvovirus B19 quantification kit for the diagnosis of parvovirus B19 infections. *J Clin Virol*. 2004 Sep;31(1):5-10.

Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005 Mar;3(3):e85.

Breving K, Esquela-Kerscher A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Aug;42(8):1316-29. doi: 10.1016/j.biocel.2009.09.016. Epub 2009 Sep 30.

Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Feb;10(2):141-8. doi: 10.1038/nrm2619. Epub 2009 Jan 15

Brown, C. S., J. W. Van Lent, J. M. Vlak, and W. J. Spaan. 1991. Assembly of empty capsids by using baculovirus recombinants expressing human parvovirus B19 structural proteins. *J Virol*. 65:2702-6.

Brown, K. E., S. M. Anderson, and N. S. Young. 1993. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science*. 262:114-7.

Brown, K. E., and B. J. Cohen. 1992. Haemagglutination by parvovirus B19. *J Gen Virol*. 73:2147-9.

Brown, K. E., S. W. Green, J. Antunez de Mayolo, J. A. Bellanti, S. D. Smith, T. J. Smith, and N. S. Young. 1994. Congenital anaemia after transplacental B19 parvovirus infection. *Lancet*. 343:895-6.

Brown, K. E., J. R. Hibbs, G. Gallinella, S. M. Anderson, E. D. Lehman, P. McCarthy, and N. S. Young. 1994. Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). *N Engl J Med*. 330:1192-6

Brown, K. E., J. Mori, B. J. Cohen, and A. M. Field. 1991. In vitro propagation of parvovirus B19 in primary foetal liver culture. *J Gen Virol*. 72:741-5.

Brown, K. E., N. S. Young, and L. H. Barbosa. 2001. Parvovirus B19: implications for transfusion medicine. Summary of a workshop. *Transfusion*. 41:130-5.

Brownell, A. I., D. A. McSwiggan, W. D. Cubitt, and M. J. Anderson. 1986. Aplastic and hypoplastic episodes in sickle cell disease and thalassaemia intermedia. *J Clin Pathol*. 39:121-4.

- Bultmann BD, Klingel K, Sotlar K, Bock CT, Baba HA, Sauter M, Kandolf R. Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: an endothelial cell-mediated disease. *Hum Pathol*, 2003, 34:92-5.
- Cai, X., et al., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. 102(15): p.5570-5. .
- Cai, X., et al., Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog*, 2006. 2(3): p. e23.
- Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, 2004. 10(12): p. 1957-66
- Canaan S, Zadori Z, Ghomashchi F, Bollinger J, Sadilek M, Moreau ME, Tijssen P, Gelb MH. Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A2. *J Biol Chem*, 2004, 279:14502-8.
- Cassinotti P, Weitz M, Siegl G Human parvovirus B19 infections: routine diagnosis by a new nested polymerase chain reaction assay. *J Med Virol*. 1993 Jul;40(3):228-34.
- Cassinotti, P., G. Siegl, B. A. Michel, and P. Bruhlmann. 1998. Presence and significance of human parvovirus B19 DNA in synovial membranes and bone marrow from patients with arthritis of unknown origin. *J Med Virol*. 56:199-204.
- Catalucci D, Gallo P, Condorelli G. MicroRNAs in cardiovascular biology and heart disease. *Circ Cardiovasc Genet*. 2009 Aug;2(4):402-8
- Cereseto, A. et al., 2005, Acetylation of HIV-1 integrase by p300 regulates viral integration. *EMBO J*. 24, 3070–3081
- Chen AY, Guan W, Lou S, Liu Z, Kleiboeker S, Qiu J. Role of erythropoietin receptor signaling in parvovirus B19 replication in human erythroid progenitor cells. *J Virol*, 2010, 84:12385-96.
- Chen AY, Zhang EY, Guan W, Cheng F, Kleiboeker S, Yankee TM, Qiu J. The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. *Blood*, 2010, 115:1070-80.
- Cheung P, Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol*. 2005 Mar;19(3):563-73. Epub 2005 Jan 27.
- Chisaka H, Morita E, Tada K, Yaegashi N, Okamura K, Sugamura K. Establishment of multifunctional monoclonal antibody to the nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19. *J Infect*. 2003 Oct;47(3):236-42.
- Chorba, T., P. Coccia, R. C. Holman, P. Tattersall, L. J. Anderson, J. Sudman, N. S. Young, E. Kurczynski, U. M. Saarinen, R. Moir, and et al. 1986. The role of parvovirus B19 in aplastic crisis and erythema infectiosum (fifth disease). *J Infect Dis*. 154:383-93.

- Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF. Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*. 1997 Sep 26;277(5334):1996-2000.
- Clewley, J. P. 1984. Biochemical characterization of a human parvovirus. *J Gen Virol*. 65:241-5.
- Clewley, J. P., B. J. Cohen, and A. M. Field. 1987. Detection of parvovirus B19 DNA, antigen, and particles in the human fetus. *J Med Virol*. 23:367-76.
- Cohen, B. J., A. M. Field, J. Mori, K. E. Brown, J. P. Clewley, J. St Amand, and C. R. Astell. 1995. Morphology and antigenicity of recombinant B19 parvovirus capsids expressed in transfected COS-7 cells. *J Gen Virol*. 76:1233-7.
- Cohen BJ, Gandhi J, Clewley JP. Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. *J Clin Virol*, 2006, 36:152-5.
- Colot, Rossignol. Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device, 1999
- Cooling LL, Koerner TA, Naides SJ. Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of parvovirus B19. *J Infect Dis*, 1995, 172:1198-205.
- Corcioli F, Zakrzewska K, Rinieri A, Fanci R, Innocenti M, Civinini R, De Giorgi V, Di Lollo S, Azzi A. Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. *J Med Virol*, 2008, 80:2005-11.
- Corcoran A, Mahon BP, Doyle S. B cell memory is directed toward conformational epitopes of parvovirus B19 capsid proteins and the unique region of VP1. *J Infect Dis*, 2004, 189:1873-80.
- Cossart, Y. E., A. M. Field, B. Cant, and D. Widdows. 1975. Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet*. 1:72-3.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1987. The autonomously replicating parvoviruses of vertebrates. *Adv Virus Res*. 33:91-174.
- Cotmore, S. F., and P. Tattersall. 1984. Characterization and molecular cloning of a human parvovirus genome. *Science*. 226:1161-5.
- Cotmore SF, McKie VC, Anderson LJ, Astell CR, Tattersall P. Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. *J Virol*, 1986, 60:548-57.
- Crawford LV, Follett EA, Burdon MG, McGeoch DJ. The DNA of a minute virus of mice. *J Gen Virol*. 1969 Jan;4(1):37-46.
- Cullen, B.R., 2004, Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*, 2004. 16(6): p. 861-5
- Cummins JM, Velculescu VE. Implications of micro-RNA profiling for cancer diagnosis. *Oncogene*. 2006 Oct 9;25(46):6220-7.

- Daniel, R. et al. (2004) Histone H2AX is phosphorylated at sites of retroviral DNA integration but is dispensable for postintegration repair. *J. Biol. Chem.* 279, 45810–45814
- Danos, O., Katinka, M. and Yaniv, M. (1980) Molecular cloning, refined physical map and heterogeneity of methylation sites of papilloma virus type 1a DNA. *Eur. J. Biochem./FEBS*, 109, 457–461.
- Danos, O., Katinka, M. and Yaniv, M. (1982) Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.*, 1, 231–236.
- Davey CA, Sargent DF, Luger K, Maeder AW, Richmond TJ. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol.* 2002 Jun 21;319(5):1097-113.
- De Freitas, R. B., D. Wong, F. Boswell, M. F. de Miranda, A. C. Linhares, J. Shirley, and U. Desselberger. 1990. Prevalence of human parvovirus (B19) and rubella virus infections in urban and remote rural areas in northern Brazil. *J Med Virol.* 32:203-8
- Deiss, V., J. D. Tratschin, M. Weitz, and G. Siegl. 1990. Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. *Virology.* 175:247-54.
- de Jong EP, Walther FJ, Kroes AC, Oepkes D. Parvovirus B19 infection in pregnancy: new insights and management. *Prenat Diagn*, 2011, 31:419-25.
- de Jong, R.N. et al., Adenovirus DNA replication: protein priming, jumping back and the role of the DNA binding protein DBP. 2003. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 272, 187–211
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J.* 2003 Mar 15;370(Pt 3):737-49.
- Deshmane, S.L. and Fraser, N.W., During latency, herpes simplex virus type 1 DNA is associated with nucleosomes in a chromatin structure. *J. Virol.* 63, 1989, 943–947
- Dettmeyer R, Kandolf R, Baasner A, Banaschak S, Eis-Hubinger AM, Madea B. Fatal parvovirus B19 myocarditis in an 8-year-old boy. *J Forensic Sci*, 2003, 48:183-6.
- Doerfler, W. (1991) Patterns of DNA methylation—evolutionary vestiges of foreign DNA inactivation as a host defense mechanism. A proposal. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 372, 557–564.
- Doerfler, W. (1981) DNA methylation—a regulatory signal in eukaryotic gene expression. *J. Gen. Virol.*, 57, 1–20
- Doerfler, W. (2005) On the biological significance of DNA methylation. *Biochemistry*, 70, 505–524
- Doerfler, W. (1993) Adenoviral DNA integration and changes in DNA methylation patterns: a different view of insertional mutagenesis. *Prog. in Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 46, 1–36

- Doerig, C., P. Beard, and B. Hirt. 1987. A transcriptional promoter of the human parvovirus B19 active in vitro and in vivo. *Virology*. 157:539-42.
- Doerig, C., B. Hirt, J. P. Antonietti, and P. Beard. 1990. Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. *J Virol*. 64:387-96.
- Dong Y, Huang Y, Wang Y, Xu P, Yang Y, Liu K, Tijssen P, Peng J, Li Y. The effects of the 11 kDa protein and the putative X protein on the p6 promoter activity of Parvovirus B19 in Hela cells. *Virus Genes*, 2012.
- Doran, H. M., and A. J. Teall. 1988. Neutropenia accompanying erythroid aplasia in human parvovirus infection. *Br J Haematol*. 69:287-8.
- Dou Y, Gorovsky MA. Phosphorylation of linker histone H1 regulates gene expression in vivo by creating a charge patch *Mol Cell*. 2000 Aug;6(2):225-31.
- Duechting A, Tschope C, Kaiser H, Lamkemeyer T, Tanaka N, Aberle S, Lang F, Torresi J, Kandolf R, Bock CT. Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells. *J Virol*, 2008, 82:7942-52.
- Duncan, J. R., C. B. Potter, M. D. Cappellini, J. B. Kurtz, M. J. Anderson, and D. J. Weatherall. 1983. Aplastic crisis due to parvovirus infection in pyruvate kinase deficiency. *Lancet*. 2:14-6.
- Durigon EL, Erdman DD, Gary GW, Pallansch MA, Torok TJ, Anderson LJ. Multiple primer pairs for polymerase chain reaction (PCR) amplification of human parvovirus B19 DNA. *J Virol Methods*. 1993 Oct;44(2-3):155-65.
- Eis-Hübinger AM, Reber U, Abdul-Nour T, Glatzel U, Lauschke H, Pütz U. Evidence for persistence of parvovirus B19 DNA in livers of adults. *J Med Virol*. 2001 Oct;65(2):395-401.
- Ekman A, Hokynar K, Kakkola L, Kantola K, Hedman L, Bonden H, Gessner M, Aberham C, Norja P, Miettinen S, Hedman K, Soderlund-Venermo M. Biological and immunological relations among human parvovirus B19 genotypes 1 to 3. *J Virol*, 2007, 81:6927-35.
- Enders M, Weidner A, Zoellner I, Searle K, Enders G. Fetal morbidity and mortality after acute human parvovirus B19 infection in pregnancy: prospective evaluation of 1018 cases. *Prenat Diagn*. 2004 Jul;24(7):513-8.
- Erdman, D. D., M. J. Usher, C. Tsou, E. O. Caul, G. W. Gary, S. Kajigaya, N. S. Young, and L. J. Anderson. 1991. Human parvovirus B19 specific IgG, IgA, and IgM antibodies and DNA in serum specimens from persons with erythema infectiosum. *J Med Virol*. 35:110-5.
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006 Apr;6(4):259-69
- Fairley CK, Smoleniec JS, Caul OE, Miller E. Observational study of effect of intrauterine transfusions on outcome of fetal hydrops after parvovirus B19 infection. *Lancet*. 1995 Nov 18;346(8986):1335-7.

- Farh KK, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP, Burge CB, Bartel DP. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science*. 2005 Dec 16;310(5755):1817-21. Epub 2005 Nov 24.
- Fan MM, Tamburic L, Shippam-Brett C, Zagrodny DB, Astell CR. The small 11-kDa protein from B19 parvovirus binds growth factor receptor-binding protein 2 in vitro in a Src homology 3 domain/ligand-dependent manner. *Virology*, 2001, 291:285-91.
- Filippone C, Franssila R, Kumar A, Saikko L, Kovanen PE, Soderlund-Venermo M, Hedman K. Erythroid progenitor cells expanded from peripheral blood without mobilization or preselection: molecular characteristics and functional competence. *PLoS One*, 2010, 5:e9496.
- Filippone C, Zhi N, Wong S, Lu J, Kajigaya S, Gallinella G, Kakkola L, Soderlund-Venermo M, Young NS, Brown KE. VP1u phospholipase activity is critical for infectivity of full-length parvovirus B19 genomic clones. *Virology*, 2008, 374:444-52.
- Finch JT, Klug A Solenoidal model for superstructure in chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1976 Jun;73(6):1897-901.
- Forestier F, Tissot JD, Vial Y, Daffos F, Hohlfeld P Br Haematological parameters of parvovirus B19 infection in 13 fetuses with hydrops foetalis. *J Haematol*. 1999 Mar;104(4):925-7.
- Fradin, A., Manley, J.L. and Prives, C.L. (1982) Methylation of simian virus 40 Hpa II site affects late, but not early, viral gene expression. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 79, 5142–5146.
- Franssila R, Hokynar K, Hedman K. T helper cell-mediated in vitro responses of recently and remotely infected subjects to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus B19. *J Infect Dis*, 2001, 183:805-9.
- Franssila R, Hedman K. T-helper cell-mediated interferon-gamma, interleukin-10 and proliferation responses to a candidate recombinant vaccine for human parvovirus B19. *Vaccine*, 2004, 22:3809-15.
- Franssila R, Auramo J, Modrow S, Mobs M, Oker-Blom C, Kapyla P, Soderlund-Venermo M, Hedman K. T helper cell-mediated interferon-gamma expression after human parvovirus B19 infection: persisting VP2-specific and transient VP1u-specific activity. *Clin Exp Immunol*, 2005, 142:53-61.
- Frenster JH. A model of specific de-repression within interphase chromatin. *Nature*. 1965 Jun 19;206(990):1269-70.
- Frickhofen, N., J. L. Abkowitz, M. Safford, J. M. Berry, J. Antunez-de-Mayolo, A. Astrow, R. Cohen, I. Halperin, L. King, D. Mintzer, and et al. 1990. Persistent B19 parvovirus infection in patients infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1): a treatable cause of anemia in AIDS. *Ann Intern Med*. 113:926-33.

- Friedlander, M.R., et al. Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat Biotechnol* 26, 407-415. 2008.
- Friedman JM, Jones PA. MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease. *Swiss Med Wkly*. 2009 Aug 22;139(33-34):466-72. doi: smw-12794.
- Fu Y, Ishii KK, Munakata Y, Saitoh T, Kaku M, Sasaki T. Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J Virol*, 2002, 76:5395-403.
- Gahr, M., A. Pekrun, and H. Eiffert. 1991. Persistence of parvovirus B19-DNA in blood of a child with severe combined immunodeficiency associated with chronic pure red cell aplasia. *Eur J Pediatr*. 150:470-2.
- Gallinella G, E. Manaresi, S. Venturoli, G. L. Grazi, M. Musiani, and M. Zerbini. 1999. Occurrence and clinical role of active parvovirus B19 infection in transplant recipients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 18:811-3.
- Gallinella, G., E. Manaresi, E. Zuffi, S. Venturoli, L. Bonisi, G. P. Bagnara, M. Musiani, and M. Zerbini. 2000. Different patterns of restriction to B19 parvovirus replication in human blast cell lines. *Virology*. 278:361-7.
- Gallinella G, Zuffi E, Gentilomi G, Manaresi E, Venturoli S, Bonvicini F, Cricca M, Zerbini M, Musiani M. Relevance of B19 markers in serum samples for a diagnosis of parvovirus B19-correlated diseases. *J Med Virol*. 2003 Sep;71(1):135-9.
- Gallinella, G., M. Zerbini, M. Musiani, S. Venturoli, G. Gentilomi, and E. Manaresi. 1997. Quantitation of parvovirus B19 DNA sequences by competitive PCR: differential hybridization of the amplicons and immunoenzymatic detection on microplate. *Mol Cell Probes*. 11:127-33.
- Gallinella G, Bonvicini F, Filippone C, Delbarba S, Manaresi E, Zerbini M, Musiani M. Calibrated real-time PCR for evaluation of parvovirus B19 viral load. *Clin Chem*, 2004, 50:759-62.
- Garcia-Robles, I. et al., 2005. Interaction of influenza virus proteins with nucleosomes. *Virology* 332, 329–336
- Gareus, R., A. Gigler, A. Hemauer, M. Leruez-Ville, F. Morinet, H. Wolf, and S. Modrow. 1998. Characterization of cis-acting and NS1 protein-responsive elements in the p6 promoter of parvovirus B19. *J Virol*. 72:609-16.
- Gennarino VA, Sardiello M, Avellino R, Meola N, Maselli V, Anand S, Cutillo L, Ballabio A, Banfi S. MicroRNA target prediction by expression analysis of host genes. *Genome Res*. 2009 Mar;19(3):481-90. doi: 10.1101/gr.084129.108. Epub 2008 Dec 16
- Gentilomi, G., M. Musiani, M. Zerbini, G. Gallinella, S. Venturoli, and E. Manaresi. 1997. Dot immunoperoxidase assay for detection of parvovirus B19 antigens in serum samples. *J Clin Microbiol*. 35:1575-8.

- Gentilomi, G., M. Zerbini, G. Gallinella, S. Venturoli, E. Manaresi, R. Morandi, and M. Musiani. 1998. B19 parvovirus induced fetal hydrops: rapid and simple diagnosis by detection of B19 antigens in amniotic fluids. *Prenat Diagn.* 18:363-8.
- Gibney ER, Nolan CM Epigenetics and gene expression. *Heredity (Edinb)*. 2010 Jul;105(1):4-13. doi: 10.1038/hdy.2010.54. Epub 2010 May 12.
- Gillespie, S. M., M. L. Cartter, S. Asch, J. B. Rokos, G. W. Gary, C. J. Tsou, D. B. Hall, L. J. Anderson, and E. S. Hurwitz. 1990. Occupational risk of human parvovirus B19 infection for school and day-care personnel during an outbreak of erythema infectiosum. 263:2061-5.
- Goeyvaerts N, Hens N, Aerts M, Beutels P. Model structure analysis to estimate basic immunological processes and maternal risk for parvovirus B19. *Biostatistics*, 2011, 12:283-302.
- Goll MG, Kirpekar F, Maggert KA, Yoder JA, Hsieh CL, Zhang X, Golic KG, Jacobsen SE, Bestor TH. Methylation of tRNAAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*. 2006 Jan 20;311(5759):395-8.
- Goodear M, Hayward C, Crowther C. Foetal intracardiac transfusion for the treatment of severe anaemia due to human parvovirus B-19 infection. *Australas Radiol*. 1998 Aug;42(3):275-7.
- Grabarczyk P, Kalinska A, Kara M, Wieczorek R, Ejduk A, Sulkowska E, Golebiowska-Staroszczyk S, Matysiak M, Baylis SA, Brojer E. Identification and characterization of acute infection with parvovirus B19 genotype 2 in immunocompromised patients in Poland. *J Med Virol*, 2011, 83:142-9.
- Graeve, J. L., P. A. de Alarcon, and S. J. Naides. 1989. Parvovirus B19 infection in patients receiving cancer chemotherapy: the expanding spectrum of disease. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 11:441-4.
- Grant PA, Schieltz D, Pray-Grant MG, Steger DJ, Reese JC, Yates JR 3rd, Workman JL. A subset of TAF(II)s are integral components of the SAGA complex required for nucleosome acetylation and transcriptional stimulation. *Cell*. 1998 Jul 10;94(1):45-53.
- Grey, F., et al., Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J Virol*, 2005. 79(18): p. 12095-9. 61.
- Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*. 2007 Jul 6;27(1):91-105.
- Gruber F, Falkner FG, Dorner F, Hammerle T. Quantitation of viral DNA by real-time PCR applying duplex amplification, internal standardization, and two-color fluorescence detection. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67:2837-9.
- Guan W., Wong S., Zhi N., Qiu J., 2009. The genome of human Parvovirus B19 can replicate in nonpermissive cells with the help of adenovirus genes and produces infectious virus. *J Virol* 83, 9541-53

- Guan W, Cheng F, Huang Q, Kleiboeker S, Qiu J. Inclusion of the central exon of parvovirus B19 precursor mRNA is determined by multiple splicing enhancers in both the exon and the downstream intron. *J Virol*, 2011, 85:2463-8.
- Guan W, Huang Q, Cheng F, Qiu J. Internal polyadenylation of the parvovirus B19 precursor mRNA is regulated by alternative splicing. *J Biol Chem*, 2011, 286:24793-805.
- Guan W, Cheng F, Yoto Y, Kleiboeker S, Wong S, Zhi N, Pintel DJ, Qiu J. Block to the production of full-length B19 virus transcripts by internal polyadenylation is overcome by replication of the viral genome. *J Virol*, 2008, 82:9951-63.
- Gunthert,U., Schweiger,M., Stupp,M. and Doerfler,W. (1976) DNA methylation in adenovirus, adenovirus-transformed cells, and host cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 73, 3923–3927.
- Guo YM, Ishii K, Hirokawa M, Tagawa H, Ohyagi H, Michishita Y, Ubukawa K, Yamashita J, Ohteki T, Onai N, Kawakami K, Xiao W, Sawada K. CpG-ODN 2006 and human parvovirus B19 genome consensus sequences selectively inhibit growth and development of erythroid progenitor cells. *Blood*, 2010, 115:4569-79.
- Ha I, Wightman B, Ruvkun G. A bulged lin-4/lin-14 RNA duplex is sufficient for *Caenorhabditis elegans* lin-14 temporal gradient formation. *Genes Dev.* 1996 Dec 1;10(23):3041-50.
- Hackenberg, M., Sturm, M., Langenberger, D., Falcon-Perez, J.M. & Aransay, A.M. miRanalyzer: a microRNA detection and analysis tool for next-generation sequencing experiments. *Nucleic Acids Res* 37, W68-76. 2009
- Haig D. The (dual) origin of epigenetics. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2004;69:67-70.
- Hamon, M. D., A. C. Newland, and M. J. Anderson. 1988. Severe aplastic anaemia after parvovirus infection in the absence of underlying haemolytic anaemia [letter]. *J Clin Pathol.* 41:1242.
- Hanada, T., K. Koike, C. Hirano, T. Takeya, T. Suzuki, Y. Matsunaga, and H. Takita. 1989. Childhood transient erythroblastopenia complicated by thrombocytopenia and neutropenia. *Eur J Haematol.* 42:77-80.
- Hanada, T., K. Koike, T. Takeya, T. Nagasawa, Y. Matsunaga, and H. Takita. 1988. Human parvovirus B19-induced transient pancytopenia in a child with hereditary spherocytosis. *Br J Haematol.* 70:113-5.
- Harder TC, Hufnagel M, Zahn K, Beutel K, Schmitt HJ, Ullmann U, Rautenberg P. New LightCycler PCR for rapid and sensitive quantification of parvovirus B19 DNA guides therapeutic decision-making in relapsing infections. *J Clin Microbiol.* 2001 Dec;39(12):4413-9.
- Hartman KR, Brown KE, Green SW, Young NS Lack of evidence for parvovirus B19 viraemia in children with chronic neutropenia. *Br J Haematol.* 1994 Dec;88(4):895-6.
- He Z, Zhuang H, Wang X, Song S, Dong Q, Yan J, Buehring GC, Luo G. Retrospective analysis of non-A-E hepatitis: possible role of hepatitis B and C virus infection. *J Med Virol.* 2003 Jan;69(1):59-65.

- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004 Jul;5(7):522-31. Review. No abstract available. Erratum in: *Nat Rev Genet.* 2004 Aug;5(8):631.
- Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO J.* 1988 May;7(5):1395-402.
- Heegaard ED, Rasksen CJ, Christensen J. Detection of parvovirus B19 NS1-specific antibodies by ELISA and western blotting employing recombinant NS1 protein as antigen. *J Med Virol*, 2002, 67:375-83
- Heegaard, E. D., N. A. Peterslund, and A. Hornsleth. 1995. Parvovirus B19 infection associated with encephalitis in a patient suffering from malignant lymphoma. *Scand J Infect Dis.* 27:631-3.
- Hemauer A, von Poblitzki A, Gigler A, Cassinotti P, Siegl G, Wolf H, Modrow S. Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. *J Gen Virol.* 1996 Aug;77 (Pt 8):1781-5.
- Hemauer A, Gigler A, Gareus R, Reichle A, Wolf H, Modrow S. Infection of apheresis cells by parvovirus B19. *J Gen Virol.* 1999 Mar;80 (Pt 3):627-30.
- Hermann A, Goyal R, Jeltsch A. The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *J Biol Chem.* 2004 Nov 12;279(46):48350-9. Epub 2004 Aug 31
- Herranz H, Cohen SM. MicroRNAs and gene regulatory networks: managing the impact of noise in biological systems. *Genes Dev.* 2010 Jul 1;24(13):1339-44. doi: 10.1101/gad.1937010.
- Hertz, J.M., Schell, G. and Doerfler, W. (1999) Factors affecting de novo methylation of foreign DNA in mouse embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.*, 274, 24232–24240.
- Hewish DR, Burgoyne LA Chromatin sub-structure. The digestion of chromatin DNA at regularly spaced sites by a nuclear deoxyribonuclease. *Biochem Biophys Res Commun.* 1973 May 15;52(2):504-10
- Hicks KE, Cubel RC, Cohen BJ, Clewley JP. Sequence analysis of a parvovirus B19 isolate and baculovirus expression of the non-structural protein. *Arch Virol.* 1996;141(7):1319-27.
- Hoelzer K, Shackelton LA, Parrish CR. Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:2825–2837
- Hokynar K, Söderlund-Venermo M, Pesonen M, Ranki A, Kiviluoto O, Partio EK, Hedman K. A new parvovirus genotype persistent in human skin. *Virology.* 2002 Oct 25;302(2):224-8.
- Hokynar K, Brunstein J, Soderlund-Venermo M, Kiviluoto O, Partio EK, Kontinen Y, Hedman K. Integrity and full coding sequence of B19 virus DNA persisting in human synovial tissue. *J Gen Virol*, 2000, 81:1017-25.

- Hokynar K, Norja P, Laitinen H, Palomäki P, Garbarg-Chenon A, Ranki A, Hedman K, Söderlund-Venermo M. Detection and differentiation of human parvovirus variants by commercial quantitative real-time PCR tests. *J Clin Microbiol.* 2004 May;42(5):2013-9
- Hourfar MK, Mayr-Wohlfart U, Themann A, Sireis W, Seifried E, Schrezenmeier H, Schmidt M. Recipients potentially infected with parvovirus B19 by red blood cell products. *Transfusion*, 2011, 51:129-36.
- Hsieh CL. Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density. *Mol Cell Biol.* 1994 Aug;14(8):5487-94.
- Hsu GJ, Tzang BS, Tsai CC, Chiu CC, Huang CY, Hsu TC. Effects of human parvovirus B19 on expression of defensins and Toll-like receptors. *Chin J Physiol*, 2011, 54:367-76.
- Huang JC, Babak T, Corson TW, Chua G, Khan S, Gallie BL, Hughes TR, Blencowe BJ, Frey BJ, Morris QD. Using expression profiling data to identify human microRNA targets. *Nat Methods.* 2007 Dec;4(12):1045-9. Epub 2007 Nov 18.
- Hubschen JM, Mihneva Z, Mentis AF, Schneider F, Aboudy Y, Grossman Z, Rudich H, Kasymbekova K, Sarv I, Nedeljkovic J, Tahita MC, Tarnagda Z, Ouedraogo JB, Gerasimova AG, Moskaleva TN, Tikhonova NT, Chitadze N, Forbi JC, Faneye AO, Otegbayo JA, Charpentier E, Muller CP. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. *J Clin Microbiol*, 2009, 47:3735-8.
- Isa A, Norbeck O, Hirbod T, Lundqvist A, Kasprowicz V, Bowness P, Klenerman P, Broliden K, Tolfvenstam T. Aberrant cellular immune responses in humans infected persistently with parvovirus B19. *J Med Virol*, 2006, 78:129-33.
- Isa A, Kasprowicz V, Norbeck O, Loughry A, Jeffery K, Broliden K, Klenerman P, Tolfvenstam T, Bowness P. Prolonged activation of virus-specific CD8+T cells after acute B19 infection. *PLoS Med.* 2005 Dec;2(12):e343. Epub 2005 Nov 1.
- Isa A, Lundqvist A, Lindblom A, Tolfvenstam T, Broliden K. Cytokine responses in acute and persistent human parvovirus B19 infection. *Clin Exp Immunol*, 2007, 147:419-25.
- Ishii KK, Takahashi Y, Kaku M, Sasaki T. Role of human parvovirus B19 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Jpn J Infect Dis.* 1999 Oct;52(5):201-7
- Jackson, S.P., 2002, Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 687–696
- Jaenisch DNA methylation and imprinting: why bother? *Trends Genet.*, 13 (1997), pp. 323–329
- Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003 Mar;33 Suppl:245-54.

- Jeltsch A, Nellen W, Lyko F. Two substrates are better than one: dual specificities for Dnmt2 methyltransferases. *Trends Biochem Sci.* 2006 Jun;31(6):306-8. Epub 2006 May 6
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science.* 2001 Aug 10;293(5532):1074-80.
- John B, Enright AJ, Aravin A, Tuschl T, Sander C, Marks DS. Human MicroRNA targets. *PLoS Biol.* 2004 Nov;2(11):e363. Epub 2004 Oct 5.
- Johnson LB, Pasumarthy A, Saravolatz LD. Parvovirus B19 infection presenting with necrotizing lymphadenitis. *Am J Med.* 2003 Mar;114(4):340-1.
- Jones, Laird. Cancer-epigenetics comes of age *Nat. Genet.*, 21 (1999), pp. 163–167
- Jordan JA, Huff D, DeLoia JA. Placental cellular immune response in women infected with human parvovirus B19 during pregnancy. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2001, 8:288-92.
- Jordan JA, Butchko AR. Apoptotic activity in villous trophoblast cells during B19 infection correlates with clinical outcome: assessment by the caspase-related M30 Cytodeath antibody. *Placenta*, 2002, 23:547-53
- Kaikkonen L, Lankinen H, Harjunpaa I, Hokynar K, Soderlund-Venermo M, Oker-Blom C, Hedman L, Hedman K. Acute-phase-specific heptapeptide epitope for diagnosis of parvovirus B19 infection. *J Clin Microbiol*, 1999, 37:3952-6.
- Kajigaya, S., H. Fujii, A. Field, S. Anderson, S. Rosenfeld, L. J. Anderson, T. Shimada, and N. S. Young. 1991. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88:4646-50.
- Kajigaya, S., T. Shimada, S. Fujita, and N. S. Young. 1989. A genetically engineered cell line that produces empty capsids of B19 (human) parvovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86:7601-5.
- Kalpana, G.V. et al., 1994, Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homolog of yeast transcription factor SNF5. *Science* 266, 2002–2006
- Kammer,C. and Doerfler,W. (1995) Genomic sequencing reveals absence of DNA methylation in the major late promoter of adenovirus type 2 DNA in the virion and in productively infected cells. *FEBS Lett.*, 362, 301–305.
- Kaneda M, Sado T, Hata K, Okano M, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H. Role of de novo DNA methyltransferases in initiation of genomic imprinting and X-chromosome inactivation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2004;69:125-9.
- Karlin,S., Ladunga,I. and Blaisdell,B.E. (1994) Heterogeneity of genomes: measures and values. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 12837–12841.
- Kasprowicz V, Isa A, Tolfvenstam T, Jeffery K, Bowness P, Klenerman P. Tracking of peptide-specific CD4+ T-cell responses after an acute resolving viral infection: a study of parvovirus B19. *J*

Viol, 2006, 80:11209-17.

Kaufmann B, Simpson AA, Rossmann MG. The structure of human parvovirus B19. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101:11628-33.

Kaufmann B, Chipman PR, Kostyuchenko VA, Modrow S, Rossmann MG. Visualization of the externalized VP2 N termini of infectious human parvovirus B19. *J Virol*, 2008, 82:7306-12.

Kaufmann B, Baxa U, Chipman PR, Rossmann MG, Modrow S, Seckler R. Parvovirus B19 does not bind to membrane-associated globoside in vitro. *Virology*, 2005, 332:189-98.

Kawase M, Momoeda M, Young NS, Kajigaya S. Most of the VP1 unique region of B19 parvovirus is on the capsid surface. *Virology*. 1995 Aug 20;211(2):359-66.

Kelleher, J. F., N. L. Luban, P. P. Mortimer, and T. Kamimura. 1983. Human serum "parvovirus": a specific cause of aplastic crisis in children with hereditary spherocytosis. *J Pediatr*. 102:720-2.

Kelly DC, Barwise AH, Walker IO. DNA contained by two densovirus viruses. *J Virol*. 1977 Jan;21(1):396-407.

Kent, J.R. et al., During lytic infection herpes simplex virus type 1 is associated with histones bearing modifications that correlate with active transcription. *J. Virol*. 78, 2004, 10178–10186

Kerr JR. Pathogenesis of human parvovirus B19 in rheumatic disease. *Ann Rheum Dis*, 2000, 59:672-83.

Kerr JR, Boschetti N. Short regions of sequence identity between the genomes of human and rodent parvoviruses and their respective hosts occur within host genes for the cytoskeleton, cell adhesion and Wnt signalling. *J Gen Virol*. 2006 Dec;87(Pt 12):3567-75.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):209-16. Erratum in: *Cell*. 2003 Nov 14;115(4):505.

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005 May;6(5):376-85.

Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. *Trends Genet*. 2006 Mar;22(3):165-73. Epub 2006 Jan 30.

Klase, Z., Kale, P., Winograd, R., Gupta, M.V., Heydarian, M., Berro, R., McCaffrey, T. and Kashanchi, F. (2007) HIV-1 TAR element is processed by Dicer to yield a viral micro-RNA involved in chromatin remodeling of the viral LTR. *BMC Mol Biol*, 8, 63.

Kloosterman WP, Plasterk RH. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell*. 2006 Oct;11(4):441-50.

Kloosterman WP, Wienholds E, de Bruijn E, Kauppinen S, Plasterk RH. In situ detection of miRNAs in animal embryos using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nat Methods*. 2006 Jan;3(1):27-9.

- Koch, W. C., and S. P. Adler. 1990. Detection of human parvovirus B19 DNA by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 28:65-9.
- Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science.* 1974 May 24;184(4139):868-71
- Kornberg RD, Thomas JO. Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science.* 1974 May 24;184(4139):865-8
- Koppelman MH, Cuypers HT, Emrich T, Zaaijer HL. Quantitative real-time detection of Parvovirus B19 DNA in plasma. *Transfusion.* 2004 Jan;44(1):97-103.
- Krek A, Grün D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet.* 2005 May;37(5):495-500. Epub 2005 Apr 3.
- Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, Khrapko K, Kosik KS. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA.* 2003 Oct;9(10):1274-81. Erratum in: *RNA.* 2004 Mar;10(3):551
- Kubat, N.J. et al., The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript (LAT) enhancer/rcr is hyperacetylated during latency independently of LAT transcription. *J. Virol.* 78, 2004, 12508–12518;
- Kubat, N.J. et al. Specific histone tail modification and not DNA methylation is a determinant of herpes simplex virus type 1 latent gene expression. *J. Virol.* 78, 2004, 1139–1149
- Kuhl U, Pauschinger M, Bock T, Klingel K, Schwimmbeck CP, Seeberg B, Krautwurm L, Poller W, Schultheiss HP, Kandolf R. Parvovirus B19 infection mimicking acute myocardial infarction. *Circulation,* 2003, 108:945-50.
- Kurtzman, G., N. Frickhofen, J. Kimball, D. W. Jenkins, A. W. Nienhuis, and N. S. Young. 1989. Pure red-cell aplasia of 10 years' duration due to persistent parvovirus B19 infection and its cure with immunoglobulin therapy [see comments]. *N Engl J Med.* 321:519-23.
- Kurtzman, G. J., B. Cohen, P. Meyers, A. Amunullah, and N. S. Young. 1988. Persistent B19 parvovirus infection as a cause of severe chronic anaemia in children with acute lymphocytic leukaemia. *Lancet.* 2:1159-62.
- Kurtzman, G. J., K. Ozawa, B. Cohen, G. Hanson, R. Oseas, and N. S. Young. 1987. Chronic bone marrow failure due to persistent B19 parvovirus infection. *N Engl J Med.* 317:287-94.
- Lall S, Grün D, Krek A, Chen K, Wang YL, Dewey CN, Sood P, Colombo T, Bray N, Macmenamin P, Kao HL, Gunsalus KC, Pachter L, Piano F, Rajewsky N. A genome-wide map of conserved microRNA targets in *C. elegans*. *Curr Biol.* 2006 Mar 7;16(5):460-71. Epub 2006 Feb 2.
- Lamont RF, Sobel JD, Vaisbuch E, Kusanovic JP, Mazaki-Tovi S, Kim SK, Uldbjerg N, Romero R. Parvovirus B19 infection in human pregnancy. *Bjog,* 2011, 118:175-86.

Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foà R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Müller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1401-14.

Langnas AN, Markin RS, Cattral MS, Naides SJ. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology*. 1995 Dec;22(6):1661-5.

Larroche C, Scieux C, Honderlick P, Piette AM, Morinet F, Blétry O. Spontaneous resolution of hemophagocytic syndrome associated with acute parvovirus B19 infection and concomitant Epstein-Barr virus reactivation in an otherwise healthy adult. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2002 Oct;21(10):739-42. Epub 2002 Sep 26.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):858-62

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843-54.

Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001 Oct 26;294(5543):862-4.

Lee, Y., et al., 2003. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003. 425(6956): p. 415-9. 20. Cullen, B.R., Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell*, 2004. 16(6): p. 861-5

Lefrere, J. J., and H. Bourgeois. 1986. Human parvovirus associated with erythroblastopenia in iron deficiency anaemia [letter]. *J Clin Pathol*. 39:1277-8.

Lefrère JJ, Couroucé AM, Kaplan C. Parvovirus and idiopathic thrombocytopenic purpura. *Lancet*. 1989 Feb 4;1(8632):279

Lefrère JJ, Servant-Delmas A, Candotti D, Mariotti M, Thomas I, Brossard Y, Lefrère F, Girot R, Allain JP, Laperche S. Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2890-5. Epub 2005 Jun 23.

Legendre M, Lambert A, Gautheret D. Profile-based detection of microRNA precursors in animal genomes. *Bioinformatics*. 2005 Apr 1;21(7):841-5. Epub 2004 Oct 27.

Leonhardt H, Page AW, Weier HU, Bestor TH. A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*. 1992 Nov 27;71(5):865-73.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005 Jan 14;120(1):15-20

- Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*. 2003 Dec 26;115(7):787-98.
- Liefeldt L, Plentz A, Klempa B, Kershaw O, Endres AS, Raab U, Neumayer HH, Meisel H, Modrow S. Recurrent high level parvovirus B19/genotype 2 viremia in a renal transplant recipient analyzed by real-time PCR for simultaneous detection of genotypes 1 to 3. *J Med Virol*, 2005, 75:161-9.
- Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science*. 2003 Mar 7;299(5612):1540
- Lin, J. and Cullen, B.R. (2007) Analysis of the interaction of primate retroviruses with the human RNA interference machinery. *J Virol*, 81, 12218-12226.
- Lindblom A, Isa A, Norbeck O, Wolf S, Johansson B, Broliden K, Tolfvenstam T Slow clearance of human parvovirus B19 viremia following acute infection. *Clin Infect Dis*. 2005 Oct 15;41(8):1201-3. Epub 2005 Sep 2.
- Liu, J. M., H. Fujii, S. W. Green, N. Komatsu, N. S. Young, and T. Shimada. 1991. Indiscriminate activity from the B19 parvovirus p6 promoter in nonpermissive cells. *Virology*. 182:361-4.
- Liu, J. M., S. W. Green, T. Shimada, and N. S. Young. 1992. A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. *J Virol*. 66:4686-92.
- Lou S, Luo Y, Cheng F, Huang Q, Shen W, Kleiboeker S, Tisdale JF, Liu Z, Qiu J. Human parvovirus B19 DNA replication induces a DNA damage response that is dispensable for cell cycle arrest at phase G2/M. *J Virol*, 2012, 86:10748-58.
- Low, M., Hay, J. and Keir, H.M. (1969) DNA of herpes simplex virus is not a substrate for methylation in vivo. *J. Mol. Biol.*, 46, 205-207.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 9;435(7043):834-8.
- Lu J, Zhi N, Wong S, Brown KE. Activation of synoviocytes by the secreted phospholipase A2 motif in the VP1-unique region of parvovirus B19 minor capsid protein. *J Infect Dis*, 2006, 193:582-90.
- Lu C, Meyers BC, Green PJ. Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing. *Methods*. 2007 Oct;43(2):110-7.
- Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Waye MM, Richmond TJ. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol*. 1997 Sep 26;272(3):301-11.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997 Sep 18;389(6648):251-60.

- Luger K, Hansen JC. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr Opin Struct Biol.* 2005 Apr;15(2):188-96
- Lukiw WJ. Micro-RNA speciation in fetal, adult and Alzheimer's disease hippocampus. *Neuroreport.* 2007 Feb 12;18(3):297-300.
- Lundberg,P., Welander,P., Han,X. and Cantin,E. (2003) Herpes simplex virus type 1 DNA is immunostimulatory in vitro and in vivo. *J. Virol.*, 77, 11158–11169.
- Luo, W., and C. R. Astell. 1993. A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. *Virology.* 195:448-55.
- Luo Y, Lou S, Deng X, Liu Z, Li Y, Kleiboeker S, Qiu J. Parvovirus B19 infection of human primary erythroid progenitor cells triggers ATR-Chk1 signaling, which promotes B19 virus replication. *J Virol*, 2011, 85:8046-55
- Lusic, M. et al., 2003. Regulation of HIV-1 gene expression by histone acetylation and factor recruitment at the LTR promoter. *EMBO J.* 22, 6550–6561
- Macdonald WA. Epigenetic mechanisms of genomic imprinting: common themes in the regulation of imprinted regions in mammals, plants, and insects. *Genet Res Int.* 2012;2012:585024. doi: 10.1155/2012/585024. Epub 2012 Feb 15.
- Maga G, Hubscher U Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners . *J Cell Sci.* 2003 Aug 1;116(Pt 15):3051-60.
- Mahrholdt H, Wagner A, Deluigi CC, Kispert E, Hager S, Meinhardt G, Vogelsberg H, Fritz P, Dippon J, Bock CT, Klingel K, Kandolf R, Sechtem U. Presentation, patterns of myocardial damage, and clinical course of viral myocarditis. *Circulation*, 2006, 114:1581-90.
- Manaresi E, Gallinella G, Zuffi E, Bonvicini F, Zerbini M, Musiani M. Diagnosis and quantitative evaluation of parvovirus B19 infections by real-time PCR in the clinical laboratory. *J Med Virol*, 2002, 67:275-81.
- Manaresi, E., G. Gallinella, M. Zerbini, S. Venturoli, G. Gentilomi, and M. Musiani. 1999. IgG immune response to B19 parvovirus VP1 and VP2 linear epitopes by immunoblot assay. *J Med Virol.* 57:174-8.
- Manaresi, E., E. Zuffi, G. Gallinella, G. Gentilomi, M. Zerbini, and M. Musiani. 2001. Differential IgM response to conformational and linear epitopes of parvovirus B19 VP1 and VP2 structural proteins. *J Med Virol.* 64:67-73.
- Manaresi E, Pasini P, Gallinella G, Gentilomi G, Venturoli S, Roda A, Zerbini M, Musiani M. Chemiluminescence Western blot assay for the detection of immunity against parvovirus B19 VP1 and VP2 linear epitopes using a videocamera based luminograph. *J Virol Methods*, 1999, 81:91-9.
- Manning A, Willey SJ, Bell JE, Simmonds P. Comparison of tissue distribution, persistence, and molecular epidemiology of parvovirus B19 and novel human parvoviruses PARV4 and human bocavirus *J Infect Dis.* 2007 May 1;195(9):1345-52. Epub 2007 Mar 21.

- Marzluff WF, Duronio RJ Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Dec;14(6):692-9
- Mehraein Y, Lennerz C, Ehlhardt S, Venzke T, Ojak A, Remberger K, Zang KD. Detection of parvovirus B19 capsid proteins in lymphocytic cells in synovial tissue of autoimmune chronic arthritis. *Mod Pathol*, 2003, 16:811-7.
- Miki NP, Chantler JK. Non-permissiveness of synovial membrane cells to human parvovirus B19 in vitro. *J Gen Virol*, 1992, 73:1559-62.
- Miller, M.D. and Bushman, F.D. (1995) HIV integration. Ini1 for integration? *Curr. Biol.* 5, 368–370
- Mirkovitch J, Mirault ME, Laemmli UK. Organization of the higher-order chromatin loop: specific DNA attachment sites on nuclear scaffold. *Cell.* 1984 Nov;39(1):223-32.
- Mirza, M.A. and Weber, J. (1982) Structure of adenovirus chromatin. *Biochim. Biophys. Acta* 696, 76–86
- Miyagawa, E., T. Yoshida, H. Takahashi, K. Yamaguchi, T. Nagano, Y. Kiriya, K. Okochi, and H. Sato. 1999. Infection of the erythroid cell line, KU812Ep6 with human parvovirus B19 and its application to titration of B19 infectivity. *J Virol Methods.* 83:45-54.
- Modrow S. Parvovirus B19: the causative agent of dilated cardiomyopathy or a harmless passenger of the human myocardium? *Ernst Schering Res Found Workshop.* 2006;(55):63-82
- Moffatt S, Yaegashi N, Tada K, Tanaka N, Sugamura K. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. *J Virol*, 1998, 72:3018-28.
- Moffatt S, Tanaka N, Tada K, Nose M, Nakamura M, Muraoka O, Hirano T, Sugamura K. A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. *J Virol*, 1996, 70:8485-91.
- Momoeda M, Wong S, Kawase M, Young NS, Kajigaya S. A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. *J Virol*, 1994, 68:8443-6.
- Moore TL. Parvovirus-associated arthritis. *Curr Opin Rheumatol.* 2000 Jul;12(4):289-94.
- Mori, J., P. Beattie, D. W. Melton, B. J. Cohen, and J. P. Clewley. 1987. Structure and mapping of the DNA of human parvovirus B19. *J Gen Virol.* 68:2797-806.
- Morita E, Tada K, Chisaka H, Asao H, Sato H, Yaegashi N, Sugamura K. Human parvovirus B19 induces cell cycle arrest at G(2) phase with accumulation of mitotic cyclins. *J Virol*, 2001, 75:7555-63.
- Morita E, Nakashima A, Asao H, Sato H, Sugamura K. Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase. *J Virol*, 2003, 77:2915-21.

- Mortimer, P. P., R. K. Humphries, J. G. Moore, R. H. Purcell, and N. S. Young. 1983. A human parvovirus-like virus inhibits haematopoietic colony formation in vitro. *Nature*.302:426-9.
- Moss EG, Lee RC, Ambros V The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell*. 1997 Mar 7;88(5):637-46.
- Mossong J, Hens N, Friederichs V, Davidkin I, Broman M, Litwinska B, Siennicka J, Trzcinska A, VAN Damme P, Beutels P, Vyse A, Shkedy Z, Aerts M, Massari M, Gabutti G. Parvovirus B19 infection in five European countries: seroepidemiology, force of infection and maternal risk of infection. *Epidemiol Infect*. 2008 Aug;136(8):1059-68. Epub 2007 Oct 24.
- Mouthon L, Lortholary O. Intravenous immunoglobulins in infectious diseases: where do we stand? *Clin Microbiol Infect*, 2003, 9:333-8.
- Muller DE, Siegl G. Maturation of parvovirus LuIII in a subcellular system. I. Optimal conditions for in vitro synthesis and encapsidation of viral DNA. *J Gen Virol*. 1983 May;64(Pt 5):1043-54.
- Munakata Y, Saito-Ito T, Kumura-Ishii K, Huang J, Kodera T, Ishii T, Hirabayashi Y, Koyanagi Y, Sasaki T. Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. *Blood*, 2005, 106:3449-56
- Munakata Y, Kato I, Saito T, Kodera T, Ishii KK, Sasaki T. Human parvovirus B19 infection of monocytic cell line U937 and antibody-dependent enhancement. *Virology*, 2006, 345:251-7.
- Munshi, N. C., S. Zhou, M. J. Woody, D. A. Morgan, and A. Srivastava. 1993. Successful replication of parvovirus B19 in the human megakaryocytic leukemia cell line MB-02. *J Virol*. 67:562-6.
- Musiani, M., A. Azzi, M. Zerbini, D. Gibellini, S. Venturoli, K. Zakrzewska, M. C. Re, G. Gentilomi, G. Gallinella, and M. La Placa. 1993. Nested polymerase chain reaction assay for the detection of B19 parvovirus DNA in human immunodeficiency virus patients. *J Med Virol*. 40:157-60.
- Musiani, M., M. Zerbini, G. Gentilomi, G. Rodorigo, V. De Rosa, D. Gibellini, S. Venturoli, and G. Gallinella. 1995. Persistent B19 parvovirus infections in haemophilic HIV-1 infected patients. *J Med Virol*. 46:103-8.
- Musiani M, Manaresi E, Gallinella G, Venturoli S, Zuffi E, Zerbini M. Immunoreactivity against linear epitopes of parvovirus B19 structural proteins. Immunodominance of the amino-terminal half of the unique region of VP1. *J Med Virol*, 2000, 60:347-52.
- Munnes,M., Schetter,C., Holker,I. and Doerfler,W. (1995) A fully 50-CG-30 but not a 50-CCGG-30 methylated late frog virus 3 promoter retains activity. *J. Virol.*, 69, 2240–2247.
- Nakashima A, Tanaka N, Tamai K, Kyuuma M, Ishikawa Y, Sato H, Yoshimori T, Saito S, Sugamura K. Survival of parvovirus B19-infected cells by cellular autophagy. *Virology*, 2006, 349:254-63.
- Nakashima A, Morita E, Saito S, Sugamura K. Human Parvovirus B19 nonstructural protein transactivates the p21/WAF1 through Sp1. *Virology*, 2004, 329:493-504.

- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell*. 2002 Feb 22;108(4):475-87
- Nascimento, J. P., M. M. Buckley, K. E. Brown, and B. J. Cohen. 1990. The prevalence of antibody to human parvovirus B19 in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 32:41-5.
- Neild, G., M. Anderson, S. Hawes, and B. T. Colvin. 1986. Parvovirus infection after renal transplant [letter]. *Lancet*. 2:1226-7.
- Nguyen QT, Sifer C, Schneider V, Alloume X, Servant A, Bernaudin F, Auguste V, Garbarg-henon A. Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. *J Clin Microbiol*. 1999 Aug;37(8):2483-7.
- Nguyen QT, Sifer C, Schneider V, Bernaudin F, Auguste V, Garbarg-Chenon A. Detection of an erythrovirus sequence distinct from B19 in a child with acute anaemia. *Lancet*. 1998 Nov 7;352(9139):1524.
- Nguyen QT, Wong S, Heegaard ED, Brown KE. Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. *Virology*. 2002 Sep 30;301(2):374-80.
- Norbeck O, Isa A, Pohlmann C, Broliden K, Kasprowicz V, Bowness P, Klenerman P, Tolfvenstam T. Sustained CD8+ T-cell responses induced after acute parvovirus B19 infection in humans. *J Virol*, 2005, 79:12117-21.
- Norja P, Hokynar K, Aaltonen LM, Chen R, Ranki A, Partio EK, Kiviluoto O, Davidkin I, Leivo T, Eis-Hubinger AM, Schneider B, Fischer HP, Tolba R, Vapalahti O, Vaheri A, Soderlund-Venermo M, Hedman K, Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue, in *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006: United States. p. 7450-3
- Norja P, Eis-Hubinger AM, Soderlund-Venermo M, Hedman K, Simmonds P. Rapid sequence change and geographical spread of human parvovirus B19: comparison of B19 virus evolution in acute and persistent infections. *J Virol*, 2008, 82:6427-33.
- Notari EP 4th, Orton SL, Cable RG, Grindon AJ, Lenes BA, Williams AE, McMillan KM, Trouern-Trend JJ, Wolf-Nugent JS, Xu YL, Dodd RY; ARCNET Program. Seroprevalence of known and putative hepatitis markers in United States blood donors with ALT levels at least 120 IU per L. *Transfusion*. 2001 Jun;41(6):751-5.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999 Oct 29;99(3):247-57.
- Olins AL, Olins DE. Spheroid chromatin units (v bodies). *Science*. 1974 Jan 25;183(4122):330-2.
- O'Malley A, Barry-Kinsella C, Hughes C, Kelehan P, Devaney D, Mooney E, Gillan J. Parvovirus infects cardiac myocytes in hydrops fetalis. *Pediatr Dev Pathol*, 2003, 6:414-20.
- Omoto, S., Ito, M., Tsutsumi, Y., Ichikawa, Y., Okuyama, H., Brisibe, E.A., Saksena, N.K. and Fujii, Y.R. (2004) HIV-1 nef suppression by virally encoded microRNA. *Retrovirology*, 1, 44.

- Orend,G., Kuhlmann,I. and Doerfler,W. (1991) Spreading of DNA methylation across integrated foreign (adenovirus type 12) genomes in mammalian cells. *J. Virol.*, 65, 4301–4308.
- Orend,G., Knoblauch,M., Kammer,C., Tjia,S.T., Schmitz,B., Linkwitz,A., Meyer,G., Maas,J. and Doerfler,W. (1995) The initiation of de novo methylation of foreign DNA integrated into a mammalian genome is not exclusively targeted by nucleotide sequence. *J. Virol.*, 69, 1226–1242.
- O'Sullivan MG, Anderson DC, Fikes JD, Bain FT, Carlson CS, Green SW, Young NS, Brown KE. Identification of a novel simian parvovirus in cynomolgus monkeys with severe anemia. A paradigm of human B19 parvovirus infection. *J Clin Invest.* 1994 Apr;93(4):1571-6.
- O'Sullivan, M. G., D. K. Anderson, J. A. Goodrich, H. Tulli, S. W. Green, N. S. Young, and K. E. Brown. 1997. Experimental infection of cynomolgus monkeys with simian parvovirus. *J Virol.* 71:4517-21.
- Otsuka, M., et al., Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in Dicer1- deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*, 2007. 27(1): p. 123-34
- Ouellet, D.L., Plante, I., Landry, P., Barat, C., Janelle, M.E., Flamand, L., Tremblay, M.J. and Provost, P. (2008) Identification of functional microRNAs released through asymmetrical processing of HIV-1 TAR element. *Nucleic Acids Res*, 36, 2353-2365.
- Ozawa, K., J. Ayub, and N. Young. 1988. Functional mapping of the genome of the B19 (human) parvovirus by in vitro translation after negative hybrid selection. *J Virol.* 62:2508-11.
- Ozawa, K., J. Ayub, and N. Young. 1988. Translational regulation of B19 parvovirus capsid protein production by multiple upstream AUG triplets. *J Biol Chem.* 263:10922-6.
- Ozawa, K., G. Kurtzman, and N. Young. 1987. Productive infection by B19 parvovirus of human erythroid bone marrow cells in vitro. *Blood.* 70:384-91.
- Ozawa, K., G. Kurtzman, and N. Young. 1986. Replication of the B19 parvovirus in human bone marrow cell cultures. *Science.* 233:883-6.
- Pall GS, Hamilton AJ.Improved northern blot method for enhanced detection of small RNA *Nat Protoc.* 2008;3(6):1077-84.
- Pallier C, Greco A, Le Junter J, Saib A, Vassias I, Morinet F. The 3' untranslated region of the B19 parvovirus capsid protein mRNAs inhibits its own mRNA translation in nonpermissive cells. *J Virol*, 1997, 71:9482-9.
- Pardi, D. S., Y. Romero, L. E. Mertz, and D. D. Douglas. 1998. Hepatitis-associated aplastic anemia and acute parvovirus B19 infection: a report of two cases and a review of the literature. *Am J Gastroenterol.* 93:468-70.
- Parsyan A, Szmaragd C, Allain JP, Candotti D. Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes *J Gen Virol.* 2007 Feb;88(Pt 2):428-31.

- Parsyan A, Kerr S, Owusu-Ofori S, Elliott G, Allain JP. Reactivity of genotype-specific recombinant proteins of human erythrovirus B19 with plasmas from areas where genotype 1 or 3 is endemic. *J Clin Microbiol*, 2006, 44:1367-75.
- Parsyan A, Candotti D. Human erythrovirus B19 and blood transfusion - an update. *Transfus Med*, 2007, 17:263-78
- Pasquinelli G, Bonvicini F, Foroni L, Salfi N, Gallinella G. Placental endothelial cells can be productively infected by Parvovirus B19. *J Clin Virol*, 2009, 44:33-8.
- Pattison, J. R., S. E. Jones, J. Hodgson, L. R. Davis, J. M. White, C. E. Stroud, and L. Murtaza. 1981. Parvovirus infections and hypoplastic crisis in sickle-cell anaemia. *Lancet*. 1:664-5.
- Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol*. 2004 Jul 7;14(14):R546-51.
- Peterson CL. HDAC's at work: everyone doing their part. *Mol Cell*. 2002 May;9(5):921-2.
- Pfeffer S, Lagos-Quintana M, Tuschl T. Cloning of small RNA molecules. *Curr Protoc Mol Biol*. 2005 Nov;Chapter 26:Unit 26.4.
- Pfeffer, S., et al., 2005, Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods*, 2005. 2(4): p. 269-76.
- Pfeffer, S., et al., Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*, 2004. 304(5671): p. 734-6.
- Pillet S, Annan Z, Fichelson S, Morinet F. Identification of a nonconventional motif necessary for the nuclear import of the human parvovirus B19 major capsid protein (VP2). *Virology*. 2003 Feb 1;306(1):25-32.
- Pillet S, Le Guyader N, Hofer T, NguyenKhac F, Koken M, Aubin JT, Fichelson S, Gassmann M, Morinet F. Hypoxia enhances human B19 erythrovirus gene expression in primary erythroid cells. *Virology*, 2004, 327:1-7.
- Pirot, T. et al. (2001) Close but distinct regions of human herpesvirus 8 latency-associated nuclear antigen 1 are responsible for nuclear targeting and binding to human mitotic chromosomes. *J. Virol*. 75, 3948–3959
- Ponnazhagan S, Weigel KA, Raikwar SP, Mukherjee P, Yoder MC, Srivastava A. Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythroid cell-specific delivery and expression of transduced genes. *J Virol*, 1998, 72:5224-30.
- Poole BD, Zhou J, Grote A, Schiffenbauer A, Naides SJ. Apoptosis of liver-derived cells induced by parvovirus B19 nonstructural protein. *J Virol*. 2006 Apr;80(8):4114-21.
- Poole BD, Karenyi YV, Naides SJ Parvovirus B19-induced apoptosis of hepatocytes. *J Virol*. 2004 Jul;78(14):7775-83.

- Portela A, Esteller M. Epigenetic modifications and human disease. *Nat Biotechnol.* 2010;28:1057–1068
- Porter, H. J., T. Y. Khong, M. F. Evans, V. T. Chan, and K. A. Fleming. 1988. Parvovirus as a cause of hydrops fetalis: detection by in situ DNA hybridisation. *J Clin Pathol.* 41:381-3.
- Potter, C. G., A. C. Potter, C. S. Hatton, H. M. Chapel, M. J. Anderson, J. R. Pattison, D. A. Tyrrell, P. G. Higgins, J. S. Willman, H. F. Parry, and et al. 1987. Variation of erythroid and myeloid precursors in the marrow and peripheral blood of volunteer subjects infected with human parvovirus (B19). *J Clin Invest.* 79:1486-92.
- Pozzuto T, von Kietzell K, Bock T, Schmidt-Lucke C, Poller W, Zobel T, Lassner D, Zeichhardt H, Weger S, Fechner H. Transactivation of human parvovirus B19 gene expression in endothelial cells by adenoviral helper functions. *Virology*, 2011, 411:50-64.
- Pruss, D. et al. (1994) The influence of DNA and nucleosome structure on integration events directed by HIV integrase. *J. Biol. Chem.* 269, 25031–25041
- Pruss, D. et al. (1994) Human immunodeficiency virus integrase directs integration to sites of severe DNA distortion within the nucleosome core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5913–5917
- Pryciak, P.M. and Varmus, H.E., 1992, Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell* 69, 769–780
- Puccetti C, Contoli M, Bonvicini F, Cervi F, Simonazzi G, Gallinella G, Murano P, Farina A, Guerra B, Zerbini M, Rizzo N. Parvovirus B19 in pregnancy: possible consequences of vertical transmission. *Prenat Diagn*, 2012, 32:897-902.
- Quattrocchi S, Ruprecht N, Bonsch C, Bieli S, Zurcher C, Boller K, Kempf C, Ros C. Characterization of the early steps of human parvovirus B19 infection. *J Virol*, 2012, 86:9274-84.
- Raab U, Bauer B, Gigler A, Beckenlehner K, Wolf H, Modrow S. Cellular transcription factors that interact with p6 promoter elements of parvovirus B19. *J Gen Virol.* 2001 Jun;82(Pt 6):1473-80.
- Raab U, Beckenlehner K, Lowin T, Niller HH, Doyle S, Modrow S. NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. *Virology.* 2002 Feb 1;293(1):86-93.
- Ray NB, Nieva DR, Seftor EA, Khalkhali-Ellis Z, Naides SJ. Induction of an invasive phenotype by human parvovirus B19 in normal human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum*, 2001, 44:1582-6.
- Rill R, Van Holde KE. Properties of nuclease-resistant fragments of calf thymus chromatin. *J Biol Chem.* 1973 Feb 10;248(3):1080-3.
- Robertson BH, Erdman DD. Non-enveloped viruses transmitted by blood and blood products. *Dev Biol (Basel).* 2000;102:29-35
- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004 Oct;14(10A):1902-10. Epub 2004 Sep 13

- Ros C, Gerber M, Kempf C. Conformational changes in the VP1-unique region of native human parvovirus B19 lead to exposure of internal sequences that play a role in virus neutralization and infectivity. *J Virol*. 2006 Dec;80(24):12017-24. Epub 2006 Oct 4.
- Rosenfeld, S. J., K. Yoshimoto, S. Kajigaya, S. Anderson, N. S. Young, A. Field, P. Warrenner, G. Bansal, and M. S. Collett. 1992. Unique region of the minor capsid protein of human parvovirus B19 is exposed on the virion surface. *J Clin Invest*. 89:2023-9.
- Saarinen, U. M., T. L. Chorba, P. Tattersall, N. S. Young, L. J. Anderson, E. Palmer, and P. F. Coccia. 1986. Human parvovirus B19-induced epidemic acute red cell aplasia in patients with hereditary hemolytic anemia. *Blood*. 67:1411-7.
- Sahasrabudde CG, Van Holde KE. The effect of trypsin on nuclease-resistant chromatin fragments. *J Biol Chem*. 1974 Jan 10;249(1):152-6
- Santos KF, Mazzola TN, Carvalho HF. The prima donna of epigenetics: the regulation of gene expression by DNA methylation. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Oct;38(10):1531-41. Epub 2005 Sep 6.
- Sato H, Hirata J, Furukawa M, Kuroda N, Shiraki H, Maeda Y, Okochi K. Identification of the region including the epitope for a monoclonal antibody which can neutralize human parvovirus B19. *J Virol*, 1991, 65:1667-72.
- Sato, H., J. Hirata, N. Kuroda, H. Shiraki, Y. Maeda, and K. Okochi. 1991. Identification and mapping of neutralizing epitopes of human parvovirus B19 by using human antibodies. *J Virol*. 65:5485-90.
- Schermelleh L, Haemmer A, Spada F, Rösing N, Meilinger D, Rothbauer U, Cardoso MC, Leonhardt H. Dynamics of Dnmt1 interaction with the replication machinery and its role in postreplicative maintenance of DNA methylation. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(13):4301-12. Epub 2007 Jun 18.
- Schneider B, Hone A, Tolba RH, Fischer HP, Blumel J, Eis-Hubinger AM. Simultaneous persistence of multiple genome variants of human parvovirus B19. *J Gen Virol*, 2008, 89:164-76.
- Schowengerdt KO, Ni J, Denfield SW, Gajarski RJ, Bowles NE, Rosenthal G, Kearney DL, Price JK, Rogers BB, Schauer GM, Chinnock RE, Towbin JA. Association of parvovirus B19 genome in children with myocarditis and cardiac allograft rejection: diagnosis using the polymerase chain reaction. *Circulation*, 1997, 96:3549-54. 257.
- Schroth GP, Yau P, Imai BS, Gatewood JM, Bradbury EM. A NMR study of mobility in the histone octamer. *FEBS Lett*. 1990 Jul 30;268(1):117-20
- Schwarz, T. F., S. Serke, B. Hottentrager, A. von Brunn, H. Baurmann, A. Kirsch, W. Stolz, D. Huhn, F. Deinhardt, and M. Roggendorf. 1992. Replication of parvovirus B19 in hematopoietic progenitor cells generated in vitro from normal human peripheral blood. *J Virol*. 66:1273-6.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003 Oct 17;115(2):199-208.

Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol*. 2004;5(3):R13. Epub 2004 Feb 16.

Serjeant, G. R., J. M. Topley, K. Mason, B. E. Serjeant, J. R. Pattison, S. E. Jones, and R. Mohamed. 1981. Outbreak of aplastic crises in sickle cell anaemia associated with parvovirus-like agent. *Lancet*. 2:595-7.

Servant-Delmas A., Lefrere J. J., Morinet F., Pillet S., 2010. Advances in human B19 erythrovirus biology. *J Virol* 84, 9658-65

Servant A, Laperche S, Lallemand F, Marinho V, De Saint Maur G, Meritet JF, Garbarg-Chenon A. Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. *J Virol*. 2002 Sep;76(18):9124-34.

Sewer A, Paul N, Landgraf P, Aravin A, Pfeffer S, Brownstein MJ, Tuschl T, van Nimwegen E, Zavolan M. Identification of clustered microRNAs using an ab initio prediction method. *BMC Bioinformatics*. 2005 Nov 7;6:267

Shackelton, L.A., Parrish, C.R. and Holmes, E.C. (2006) Evolutionary basis of codon usage and nucleotide composition bias in vertebrate DNA viruses. *J. Mol. Evol.*, 62, 551–563

Shackelton LA, Holmes EC. Phylogenetic evidence for the rapid evolution of human B19 erythrovirus. *J Virol*, 2006, 80:3666-9.

Shade, R. O., M. C. Blundell, S. F. Cotmore, P. Tattersall, and C. R. Astell. 1986. Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. *J Virol*. 58:921-36.

Schmittgen TD, Lee EJ, Jiang J, Sarkar A, Yang L, Elton TS, Chen C. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA. *Methods*. 2008 Jan;44(1):31-8

Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol*. 2008 Oct;26(10):1135-45

Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques*. 2005 Oct;39(4):519-25.

Shimomura, S., N. Komatsu, N. Frickhofen, S. Anderson, S. Kajigaya, and N. S. Young. 1992. First continuous propagation of B19 parvovirus in a cell line. *Blood*. 79:18-24.

Shimomura, S., S. Wong, K. E. Brown, N. Komatsu, S. Kajigaya, and N. S. Young. 1993. Early and late gene expression in UT-7 cells infected with B19 parvovirus. *Virology*. 194:149-56.

Shneerson, J. M., P. P. Mortimer, and E. M. Vandervelde. 1980. Febrile illness due to a parvovirus. *Br Med J*. 280:1580.

- Schorling S, Schalasta G, Enders G, Zauke M. Quantification of parvovirus B19 DNA using COBAS AmpliPrep automated sample preparation and LightCycler real-time PCR *J Mol Diagn.* 2004 Feb;6(1):37-41.
- Siegl G, Gautschi M Multiplication of parvovirus LuIII in a synchronized culture system. III. Replication of viral DNA. *J Virol.* 1976 Mar;17(3):841-53.
- Skalsky, R.L., et al., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR- 155. *J Virol*, 2007. 81(23): p. 12836-45. 56. Gottwein, E., et al., A viral microRNA functions as an orthologue
- Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet.* 2007;8:272–285
- Smith, M. A., N. S. Shah, and J. S. Lobel. 1989. Parvovirus B19 infection associated with reticulocytopenia and chronic autoimmune hemolytic anemia. *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 11:167-9.
- Soderlund, M., C. S. Brown, W. J. Spaan, L. Hedman, and K. Hedman. 1995. Epitope type-specific IgG responses to capsid proteins VP1 and VP2 of human parvovirus B19. *J Infect Dis.* 172:1431-6.
- Soeda,E., Arrand,J.R., Smolar,N. and Griffin,B.E. (1979) Sequence from early region of polyoma virus DNA containing viral replication origin and encoding small, middle and (part of) large T antigens. *Cell*, 17, 357–370.
- Soderlund, M., R. von Essen, J. Haapasaari, U. Kiistala, O. Kiviluoto, and K. Hedman. 1997. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet.* 349:1063-5.
- Sokal EM, Melchior M, Cornu C, Vandenbroucke AT, Buts JP, Cohen BJ, Burtonboy G. Acute parvovirus B19 infection associated with fulminant hepatitis of favourable prognosis in young children. *Lancet.* 1998 Nov 28;352(9142):1739-41.
- Sol N, Le Junter J, Vassias I, Freyssonier JM, Thomas A, Prigent AF, Rudkin BB, Fichelson S, Morinet F. Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. *J Virol*, 1999, 73:8762-70.
- Song, F., Smith, J.F., Kimura, M.T., Morrow, A.D., Matsuyama, T., Nagase, H., Held, W.A. (2005). Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. A.*, 102: 3336-3341.
- Srivastava CH, Zhou S, Munshi NC, Srivastava A, Parvovirus B19 replication in human umbilical cord blood cells. *Virology.* 1992 Aug;189(2):456-61.
- Srivastava, A., E. Bruno, R. Briddell, R. Cooper, C. Srivastava, K. van Besien, and R. Hoffman. 1990. Parvovirus B19-induced perturbation of human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood.* 76:1997-2004.

Srivastava CH, Samulski RJ, Lu L, Larsen SH, Srivastava A. Construction of a recombinant human parvovirus B19: adeno-associated virus 2 (AAV) DNA inverted terminal repeats are functional in an AAV-B19 hybrid virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, 86:8078-82

St Amand, J., and C. R. Astell. 1993. Identification and characterization of a family of 11-kDa proteins encoded by the human parvovirus B19. *Virology*. 192:121-31.

St Amand, J., C. Beard, K. Humphries, and C. R. Astell. 1991. Analysis of splice junctions and in vitro and in vivo translation potential of the small, abundant B19 parvovirus RNAs. *Virology*. 183:133-42.

Stark A, Brennecke J, Bushati N, Russell RB, Cohen SM. Animal MicroRNAs confer robustness to gene expression and have a significant impact on 3'UTR evolution. *Cell*. 2005 Dec 16;123(6):1133-46.

Stern-Ginossar, N., et al., Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science*, 2007. 317(5836): p. 376-81

Subramanian, K.N. (1982) Effect of in vitro methylation at CpG sites on gene expression in a genome functioning autonomously in a vertebrate host. *Nucleic Acids Res.*, 10, 3475–3486.

Sugden, B. and Leight, E.R., 2001, Molecular mechanisms of maintenance and disruption of virus latency. In *Epstein-Barr Virus and Human Cancer (Curr. Topics in Microbiol. Immunol.) (Vol. 258)* (Takada, K., ed.), pp. 3–11, Springer-Verlag

Suikkanen S, Aaltonen T, Nevalainen M, Vällilehto O, Lindholm L, Vuento M, Vihinen-Ranta M Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol*. 2003 Oct;77(19):10270-9

Sullivan, C.S., et al., SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, 2005. 435(7042): p. 682-6.

Summers, J., S. E. Jones, and M. J. Anderson. 1983. Characterization of the genome of the agent of erythrocyte aplasia permits its classification as a human parvovirus. *J Gen Virol*. 64:2527-32.

Szyf, M., Eliasson, L., Mann, V., Klein, G. and Razin, A. (1985) Cellular and viral DNA hypomethylation associated with induction of Epstein-Barr virus lytic cycle. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 82, 8090–8094

Tabor, E., M. Y. Yu, I. Hewlett, and J. S. Epstein. 2000. Summary of a workshop on the implementation of NAT to screen donors of blood and plasma for viruses. *Transfusion*. 40:1273-5.

Takacs, M., Segesdi, J., Balog, K., Mezei, M., Toth, G. and Minarovits, J. (2001) Relative deficiency in CpG dinucleotides is a widespread but not unique feature of Gammaherpesvirinae genomes. *Acta Microbiol, Immunol. Hungarica*, 48, 349–357.

Takahashi, T., K. Ozawa, K. Takahashi, S. Asano, and F. Takaku. 1990. Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation. *Blood*. 75(3):603-10.

- Takahashi, T., K. Ozawa, K. Takahashi, Y. Okuno, Y. Muto, F. Takaku, and S. Asano. 1993. DNA replication of parvovirus B19 in a human erythroid leukemia cell line (JK-1) in vitro. *Arch Virol.* 131:201-8.
- Takahashi, Y., C. Murai, S. Shibata, Y. Munakata, T. Ishii, K. Ishii, T. Saitoh, T. Sawai, K. Sugamura, and T. Sasaki. 1998. Human parvovirus B19 as a causative agent for rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:8227-32.
- Tao, Q. and Robertson, K.D. (2003) Stealth technology: how Epstein–Barr virus utilizes DNA methylation to cloak itself from immune detection. *Clin. Immunol.*, 109, 53–63.
- Tate, V.E. and Philipson, L., 1979, Parental adenovirus DNA accumulates in nucleosome-like structures in infected cells. *Nucleic Acids Res.* 6, 2769–2785
- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature.* 2008 Oct 23;455(7216):1124-8.
- Thoma F, Koller T, Klug A. Involvement of histone H1 in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. *J Cell Biol.* 1979 Nov;83(2 Pt 1):403-27
- Toan NL, Duechting A, Kremsner PG, Song le H, Ebinger M, Aberle S, Binh VQ, Duy DN, Torresi J, Kandolf R, Bock CT. Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. *J Gen Virol.* 2006 Oct;87(Pt 10):2941-9.
- Tolfvenstam T, Papadogiannakis N, Andersen A, Akre O. No association between human parvovirus B19 and testicular germ cell cancer. *J Gen Virol.* 2002, 83:2321-4.
- Tolfvenstam T, Oxenius A, Price DA, Shacklett BL, Spiegel HM, Hedman K, Norbeck O, Levi M, Olsen K, Kantzanou M, Nixon DF, Broliden K, Klenerman P. Direct ex vivo measurement of CD8(+) T-lymphocyte responses to human parvovirus B19. *J Virol.* 2001, 75:540-3.
- Tollervey JR, Lunyak VV. Epigenetics: judge, jury and executioner of stem cell fate. *Epigenetics.* 2012 Aug;7(8):823-40. doi: 10.4161/epi.21141. Epub 2012 Jul 18.
- Torok, T. J. 1992. Parvovirus B19 and human disease. *Adv Intern Med.* 37:431-55.
- Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nat Protoc.* 2008;3(2):190-6. doi: 10.1038/nprot.2007.528.
- Vardimon, L., Kuhlmann, I., Doerfler, W. and Cedar, H. (1981) Methylation of adenovirus genes in transformed cells and in vitro influence on the regulation of gene expression? *Eur. J. Cell Biol.*, 25, 13–15.
- Vardimon, L., Gunthert, U. and Doerfler, W. (1982) In vitro methylation of the BsuRI (50-GGCC-30) sites in the E2a region of adenovirus type 2 DNA does not affect expression in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol. Cell. Biol.*, 2, 1574–1580.
- Vardimon, L., Neumann, R., Kuhlmann, I., Sutter, D. and Doerfler, W. (1980) DNA methylation and viral gene expression in

adenovirus-transformed and -infected cells. *Nucleic Acids Res.*, 8,2461–2473.

Varkonyi-Gasic E, Wu R, Wood M, Walton EF, Hellens RP. Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods*. 2007 Oct 12;3:12.

Vassias, I., U. Hazan, Y. Michel, C. Sawa, H. Handa, L. Gouya, and F. Morinet. 1998. Regulation of human B19 parvovirus promoter expression by hGABP (E4TF1) transcription factor. *J Biol Chem*. 273:8287-93.

Venturoli, S., G. Gallinella, E. Manaresi, G. Gentilomi, M. Musiani, and M. Zerbini. 1998. IgG response to the immunoreactive region of parvovirus B19 nonstructural protein by immunoblot assay with a recombinant antigen. *J Infect Dis*. 178:1826-9.

von Acken,U., Simon,D., Grunert,F., Doring,H.P. and Kroger,H.(1979) Methylation of viral DNA in vivo and in vitro. *Virology*, 99,152–157.

Von Poblitzki A, Hemauer A, Gigler A, Puchhammer-Stockl E, Heinz FX, Pont J, Laczika K, Wolf H, Modrow S. Antibodies to the nonstructural protein of parvovirus B19 in persistently infected patients: implications for pathogenesis. *J Infect Dis*, 1995, 172:1356-9.

Von Poblitzki, A., C. Gerdes, U. Reischl, H. Wolf, and S. Modrow. 1996. Lymphoproliferative responses after infection with human parvovirus B19. *J Virol*. 70:7327-30.

Von Poblitzki, A., A. Gigler, B. Lang, H. Wolf, and S. Modrow. 1995. Antibodies to parvovirus B19 NS-1 protein in infected individuals. *J Gen Virol*. 76:519-27.

Vuorinen T, Lammintausta K, Kotilainen P, Nikkari S. Presence of parvovirus B19 DNA in chronic urticaric and healthy human skin. *J Clin Virol*. 2002 Aug;25(2):217-21.

Waga, S. et al. and Stillman, B. (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem*. 67, 721–751

Wan Z, Zhi N, Wong S, Keyvanfar K, Liu D, Raghavachari N, Munson PJ, Su S, Malide D, Kajigaya S, Young NS. Human parvovirus B19 causes cell cycle arrest of human erythroid progenitors via deregulation of the E2F family of transcription factors. *J Clin Invest*, 2010, 120:3530-44.

Wang X, Zhang J, Li F, Gu J, He T, Zhang X, Li Y. MicroRNA identification based on sequence and structure alignment. *Bioinformatics*. 2005 Sep 15;21(18):3610-4. Epub 2005 Jun 30.

Wang, W.C., et al. miRExpress: analyzing high-throughput sequencing data for profiling microRNA expression. *BMC Bioinformatics* 10, 328 (2009)

Wang XS, Ponnazhagan S, Srivastava A. Rescue and replication of adeno-associated virus type 2 as well as vector DNA sequences from recombinant plasmids containing deletions in the viral inverted terminal repeats: selective encapsidation of viral genomes in progeny virions. *J Virol*. 1996 Mar;70(3):1668-77.

- Watt F, Molloy PL. Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* 1988 Sep;2(9):1136-43.
- Washietl S, Hofacker IL, Lukasser M, Hüttenhofer A, Stadler PF. Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nat Biotechnol.* 2005 Nov;23(11):1383-90.
- Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Srivastava A. Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. *Blood.* 2003, 102:3927-33.
- Weigel-Kelley KA, Yoder MC, Chen L, Srivastava A. Role of integrin cross-regulation in parvovirus B19 targeting. *Hum Gene Ther.* 2006, 17:909-20.
- Weiland, H. T., M. M. Salimans, W. E. Fibbe, P. M. Kluin, and B. J. Cohen. 1989. Prolonged parvovirus B19 infection with severe anaemia in a bone marrow transplant patient [letter]. *Br J Haematol.* 71:300.
- Weitzman, M.D., Kyostio, S.R., Kotin, R.M. and Owens, R.A. (1994) Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 5808–5812.
- Wensing, B. et al., 2001, Variant chromatin structure of the OriP region of Epstein-Barr virus and regulation of EBER1 expression by upstream sequences and OriP. *J. Virol.* 75, 6235–6241
- Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, Horvitz HR, Kauppinen S, Plasterk RH. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science.* 2005 Jul 8;309(5732):310-1. Epub 2005 May 26
- Wienhues, U. and Doerfler, W. (1985) Lack of evidence for methylation of parental and newly synthesized adenovirus type 2 DNA in productive infections. *J. Virol.*, 56, 320–324.
- Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):855-62
- Winocour, E., Kaye, A.M. and Stollar, V. (1965) Synthesis and transmethylation of DNA in polyoma-infected cultures. *Virology*, 27, 156–169.
- Winter K, von Kietzell K, Heilbronn R, Pozzuto T, Fechner H, Weger S. Roles of E4orf6 and VA I RNA in adenovirus-mediated stimulation of human parvovirus B19 DNA replication and structural gene expression. *J Virol*, 2012, 86:5099-109.
- Woernle, C. H., L. J. Anderson, P. Tattersall, and J. M. Davison. 1987. Human parvovirus B19 infection during pregnancy. *J Infect Dis.* 156:17-20.
- Wong S, Zhi N, Filippone C, Keyvanfar K, Kajigaya S, Brown KE, Young NS. Ex vivo-generated CD36+ erythroid progenitors are highly permissive to human parvovirus B19 replication. *J Virol*, 2008, 82:2470-6.

Woodcock CL, Frado LL, Rattner JB. The higher-order structure of chromatin: evidence for a helical ribbon arrangement. *J Cell Biol.* 1984 Jul;99(1 Pt 1):42-52.

Wu L, Belasco JG. Examining the influence of microRNAs on translation efficiency and on mRNA deadenylation and decay. *Methods Enzymol.* 2008;449:373-93. doi: 10.1016/S0076-6879(08)02418-X

Xie H, Sun L, Lodish HF. Targeting microRNAs in obesity. *Expert Opin Ther Targets.* 2009 Oct;13(10):1227-38

Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature.* 2005 Mar 17;434(7031):338-45. Epub 2005 Feb 27.

Xue C, Li F, He T, Liu GP, Li Y, Zhang X. Classification of real and pseudo microRNA precursors using local structure-sequence features and support vector machine. *BMC Bioinformatics.* 2005 Dec 29;6:310.

Yaegashi N, Niinuma T, Chisaka H, Uehara S, Moffatt S, Tada K, Iwabuchi M, Matsunaga Y, Nakayama M, Yutani C, Osamura Y, Hirayama E, Okamura K, Sugamura K, Yajima A. Parvovirus B19 infection induces apoptosis of erythroid cells in vitro and in vivo. *J Infect,* 1999, 39:68-76.

Yaegashi, N., H. Shiraishi, T. Takeshita, M. Nakamura, A. Yajima, and K. Sugamura. 1989. Propagation of human parvovirus B19 in primary culture of erythroid lineage cells derived from fetal liver. *J Virol.* 63(6):2422-6.

Yang, J.H Shao, P., Zhou, H., Chen, Y.Q. & Qu, L.H. deepBase: a database for deeply annotating and mining deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 38, D123-130.

Yoshimoto, K., S. Rosenfeld, N. Frickhofen, D. Kennedy, R. Hills, S. Kajigaya, and N. S. Young. 1991. A second neutralizing epitope of B19 parvovirus implicates the spike region in the immune response. *J Virol.* 65:7056-60.

Yoto Y, Qiu J, Pintel DJ. Identification and characterization of two internal cleavage and polyadenylation sites of parvovirus B19 RNA. *J Virol,* 2006, 80:1604-9.

You, J. et al., Inhibition of E2 binding to Brd4 enhances viral genome loss and phenotypic reversion of bovine papillomavirus-transformed cells. *J. Virol.* 79, 2005, 14956–14961

You, J. et al. (2004) Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell* 117, 349–360

Young, N., M. Harrison, J. Moore, P. Mortimer, and R. K. Humphries. 1984. Direct demonstration of the human parvovirus in erythroid progenitor cells infected in vitro. *J Clin Invest.* 74:2024-32.

Young NS, Brown KE. Parvovirus B19. *N Engl J Med.* 2004 Feb 5;350(6):586-97.

- Yu MY, Alter HJ, Virata-Theimer ML, Geng Y, Ma L, Schechterly CA, Colvin CA, Luban NL. Parvovirus B19 infection transmitted by transfusion of red blood cells confirmed by molecular analysis of linked donor and recipient samples. *Transfusion*, 2010, 50:1712-21
- Yufu, Y., M. Matsumoto, T. Miyamura, J. Nishimura, H. Nawata, and K. Ohshima. 1997. Parvovirus B19-associated haemophagocytic syndrome with lymphadenopathy resembling histiocytic necrotizing lymphadenitis (Kikuchi's disease). *Br J Haematol*. 96:868-71.
- Zadori Z, Szelei J, Lacoste MC, Li Y, Garipey S, Raymond P, Allaire M, Nabi IR, Tijssen P. A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell*, 2001, 1:291-302.
- Zakrzewska K, Cortivo R, Tonello C, Panfilo S, Abatangelo G, Giuggioli D, Ferri C, Corcioli F, Azzi A. Human parvovirus B19 experimental infection in human fibroblasts and endothelial cells cultures. *Virus Res*, 2005, 114:1-5.
- Zeng, Y. and B.R. Cullen, 2002. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *Rna*, 2002. 8(7): p. 855-60
- Zerbini, M., M. Musiani, G. Gentilomi, S. Venturoli, G. Gallinella, and R. Morandi. 1996. Comparative evaluation of virological and serological methods in prenatal diagnosis of parvovirus B19 fetal hydrops. *J Clin Microbiol*. 34:603-8.
- Zerbini, M., M. Musiani, S. Venturoli, G. Gallinella, D. Gibellini, G. Gentilomi, and M. La Placa. 1992. Different syndromes associated with B19 parvovirus viraemia in paediatric patients: report of four cases. *Eur J Pediatr*. 151:815-7.
- Zhi N, Wan Z, Liu X, Wong S, Kim DJ, Young NS, Kajigaya S. Codon optimization of human parvovirus B19 capsid genes greatly increases their expression in nonpermissive cells. *J Virol*. 2010 Dec;84(24):13059-62. doi: 10.1128/JVI.00912-10. Epub 2010 Oct 13
- Zhi N, Zadori Z, Brown KE, Tijssen P. Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19. *Virology*, 2004, 318:142-52.
- Zhi N, Mills IP, Lu J, Wong S, Filippone C, Brown KE. Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. *J Virol*, 2006, 80:5941-50.
- Zhi N, Wan Z, Liu X, Wong S, Kim DJ, Young NS, Kajigaya S. Codon optimization of human parvovirus B19 capsid genes greatly increases their expression in nonpermissive cells. *J Virol*, 2010, 84:13059-62.
- Zuccheri, G., A. Bergia, G. Gallinella, M. Musiani, and B. Samori. 2001. Scanning force microscopy study on a single-stranded DNA: the genome of parvovirus B19. *ChemBiochem*. 2:199-204.