

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Scuola di Medicina e Chirurgia - Dipartimento di Medicina - DIMED

Corso di Laurea in

Tecniche di Laboratorio Biomedico

Presidente: Chiarissimo Prof. Matteo Fassan

TESI DI LAUREA

STUDIO DI FLAVIVIRUS NEUROTROPI MEDIANTE L'UTILIZZO DI MODELLI *IN VITRO* DERIVATI DA CELLULE STAMINALI UMANE

Relatore: Prof.ssa Luisa Barzon

Correlatore: Dr.ssa Silvia Riccetti

Correlatore: Dr.ssa Emanuela Dal Molin

Laureando: Andrea Brugiolo

Matricola 1228586

*A mia sorella Alice, per avermi sempre sostenuto
e accompagnato in questo percorso universitario*

INDICE

1. Abstract	1
2. Introduzione	3
2.1 I flavivirus.....	3
2.1.1 Filogenesi dei flavivirus	3
2.1.2 Struttura e genoma dei flavivirus	4
2.1.3 Replicazione dei flavivirus.....	5
2.1.4 Neuropatogenesi virale.....	6
2.2 Meccanismi dell'immunità antivirale.....	8
2.2.1 Risposta immunitaria innata mediata dai RIG-I like receptors	8
2.2.2 Risposta immunitaria innata mediata dai Toll-Like receptors	9
2.3 West Nile Virus	9
2.3.1 Situazione epidemiologica del WNV in Italia nel giugno 2022.....	10
2.4 Usutu Virus.....	11
2.5 Modelli <i>in vitro</i> per lo studio della neuropatogenesi virale.....	12
3. Scopo della tesi.....	15
4. Materiali e metodi	17
4.1 Colture e linee cellulari.....	17
4.1.1 Linea cellulare Vero E6.....	17
4.1.2 Linea cellulare H9	17
4.2 Differenziamento delle cellule staminali H9 in neuroni.....	19
4.3 Virus	20
4.3.1 West Nile Virus	20
4.3.2 Usutu Virus	21
4.4 Infezione dei neuroni	21
4.5 Immunofluorescenza indiretta (IIF).....	22
4.6 Analisi della replicazione virale	23
4.6.1 Estrazione dell'RNA e RT-qPCR per l'analisi della cinetica virale	23
4.6.2 Titolazione virale: saggio TCID ₅₀	24
4.7 Analisi dell'espressione genica della risposta immunitaria innata	25
4.7.1 Estrazione dell'RNA dai pellet delle cellule infettate	25
4.7.2 Reazione di retrotrascrizione.....	26
4.7.3 PCR Real-Time	26
4.8 Analisi statistica.....	27
5. Risultati	29
5.1 Differenziamento della linea cellulare H9 in Neuroni.....	29
5.2 Identificazione della proteina virale E nelle cellule neuronali infettate mediante immunofluorescenza indiretta	31
5.3 Cinetica di replicazione di WNV1, WNV2 e USUV nei neuroni	35

5.3.1	Cinetica virale di WNV1, WNV2 e USUV nel surnatante cellulare	35
5.3.2	Confronto delle cinetiche di replicazione virale tra i due lignaggi di WNV.....	36
5.3.3	Confronto delle cinetiche di replicazione virale tra i due lignaggi di WNV e USUV 37	
5.4	Effetti dell'infezione dei flavivirus sull'espressione dei geni della risposta innata antivirale.....	39
6.	Discussione e conclusione.....	41
7.	Bibliografia.....	I
8.	ALLEGATI	VII
8.1	Produzione e titolazione virale	VII
8.1.1	Produzione virale.....	VII
8.1.2	Titolazione virale.....	VII
	RINGRAZIAMENTI	IX

1. Abstract

Introduzione: West Nile virus (WNV) e Usutu virus (USUV) sono flavivirus neurotropi filogeneticamente correlati che condividono cicli di trasmissione simili tra diverse specie di uccelli e zanzare appartenenti al genere *Culex*. USUV è considerato meno patogeno per l'uomo rispetto a WNV, anche se sono stati identificati casi con gravi complicanze neurologiche.

Scopo dello studio: Sviluppare un modello di infezione di neuroni *in vitro* basato sull'utilizzo di cellule staminali umane al fine di indagare e confrontare a livello fenotipico diversi lignaggi di WNV e USUV, i cui genotipi sono ben caratterizzati.

Materiali e metodi: Neuroni umani differenziati sono stati derivati da cellule staminali embrionali (linea cellulare H9) trasfettate con il gene inducibile della Neurogenina 2 (H9 AAVS1-TRE3G-NGN2). I neuroni sono stati successivamente infettati con WNV lineage 1, ceppo ITA/09 (GU011992), WNV lineage 2 ceppo AUT/08 (KF179640) e USUV lineage Europe 1 (AY453411) a una molteplicità di infezione (MOI) di 0,1. I surnatanti e i lisati cellulari sono stati raccolti 24h e 48h dopo l'infezione per indagare la cinetica di replicazione virale mediante RT-qPCR e saggio TCID₅₀ e lo studio dell'espressione di alcuni geni chiave della risposta immunitaria innata, inclusi RIG-I, TLR3, IRF-7, VIPERIN e MX-1. Inoltre, mediante immunofluorescenza indiretta, sono stati caratterizzati i neuroni (mediante anticorpi anti-TUJ-1) ed è stata valutata l'espressione di geni virali (mediante anticorpi anti-E protein).

Risultati: Le cellule neuronali differenziate dalla linea H9 sono risultate permissive a tutti e tre i virus, come dimostrato dall'espressione della proteina virale E a 48h dall'infezione. La percentuale di cellule neuronali infettate da WNV (di entrambi i lignaggi) era maggiore rispetto alle cellule USUV-positive (circa il 10-13% delle cellule era positiva per entrambi i ceppi WNV vs circa il 2% di cellule USUV-positive). Le analisi di cinetica virale hanno mostrato come la capacità replicativa di USUV in queste cellule fosse significativamente inferiore rispetto a quella dei virus WNV lignaggio 1 e 2, i quali presentavano una cinetica di replicazione simile e molto efficiente, con titoli che hanno raggiunto 10¹¹ TCID₅₀/mL. L'analisi della risposta immunitaria innata delle cellule neuronali ha dimostrato l'induzione dell'espressione del gene antivirale Viperin rispetto al mock in risposta a WNV1 e WNV2 ma non in risposta ad USUV.

Conclusioni e prospettive future: Le cellule neuronali umane derivate da cellule staminali embrionali pluripotenti rappresentano un modello *in vitro* utile per studiare il neurotropismo dei flavivirus. Gli esperimenti di infezione eseguiti su questo modello hanno dimostrato che WNV lineage 1 e WNV lineage 2 infettano e replicano più efficientemente di USUV nei neuroni umani, inducendo una risposta immunitaria antivirale innata. Esperimenti di RNA-seq sono in corso per studiare più approfonditamente la risposta cellulare all'infezione virale. Sarà inoltre valutato l'effetto citopatico a time point più lunghi. Infine, saranno ampliati i modelli neuronali *in vitro*, al fine di studiare l'infezione di astrociti (target preferenziale di WNV *in vivo*), culture miste e organoidi cerebrale (culture 3D).

2. Introduzione

2.1 I flavivirus

Il genere *Flavivirus* appartiene alla famiglia *Flaviviridae* ed include virus a RNA a singolo filamento positivo (+)ssRNA. La maggior parte di questi virus sono classificati come arbovirus (dall'inglese *arthropod-borne viruses*) in quanto vengono trasmessi dal morso di un artropodo ematofago infetto (come le zanzare o le zecche). Molti di questi arbovirus infettano l'uomo in modo accidentale poiché non sono in grado di replicare a titoli sufficientemente alti per reinfectare altri artropodi necessari a protrarre il loro ciclo vitale.

2.1.1 Filogenesi dei flavivirus

Il nome Flavivirus deriva dal termine latino "*flavus*" (giallo), dal virus della febbre gialla (YFV) responsabile di una grave malattia che si manifesta clinicamente anche con l'ittero. Grazie alle analisi filogenetiche atte a determinare la relazione tra i differenti flavivirus, ne sono state riconosciute più di 70 specie, suddivise in 3 gruppi (cluster) e 14 sierocomplessi, distribuiti nei diversi clade¹. In base al tipo di vettore coinvolto, si possono distinguere i seguenti clusters: *mosquito-borne flavivirus* (MBF – flavivirus trasmessi da zanzare); il *tick-borne flavivirus* (TBF – flavivirus trasmessi dalla zecca); i virus no-known-vector (NKV), per i quali non è ancora stato identificato un vettore. Il cluster MBF comprende due gruppi di virus accomunati, oltre che dalla somiglianza genetica, dalle caratteristiche ecologiche e dal tropismo²:

- I virus neurotropi, che possono causare malattie encefaliche nell'uomo, sono trasmessi da zanzare del genere *Culex* e utilizzano gli uccelli come principali reservoir;
- I virus non neurotropi, che sono trasmessi da zanzare del genere *Aedes* e sono spesso associati a malattie emorragiche nell'uomo.

I flavivirus neurotropi includono Japanese encephalitis virus (JEV), West Nile virus (WNV), Saint Louis encephalitis virus (SLEV), Murray Valley encephalitis virus (MVEV) e Usutu virus (USUV). Questi virus sono principalmente veicolati da zanzare ornitofile del genere *Culex*, le quali sono attive durante il crepuscolo/notte, prevalentemente nella stagione estiva. Gli habitat delle zanzare *Culex* includono i liquami, le acque stagnanti, gli pneumatici e i sistemi di drenaggio. La distribuzione geografica di questi virus è fortemente influenzata dagli uccelli migratori, i quali una volta infettati, riescono a veicolare questi virus anche per lunghe distanze³. La trasmissione non avviene direttamente dall'uccello infetto all'uomo o da uomo a uomo mediante contatti casuali; infatti, gli esseri umani sono considerati ospiti accidentali.

I flavivirus non neurotropi veicolati da vettori del genere *Aedes*, invece, includono yellow fever virus (YFV), dengue virus (DENV) sierotipi 1, 2, 3 e 4 e Zika virus (ZIKV). Le zanzare della

specie *Aedes* possono riprodursi nelle cavità degli alberi e in altre forme di vegetazione e negli pneumatici delle automobili. Diversamente dalla specie *Culex*, queste zanzare sono attive principalmente al mattino presto o nel tardo pomeriggio (*A. Aegypti*) o in pieno giorno (*A. Albopictus*: la “zanzara tigre” asiatica).

2.1.2 Struttura e genoma dei flavivirus

Strutturalmente, questi virus sono composti da un pericapside esterno e un capsid più interno che a sua volta racchiude una sola molecola di RNA a polarità positiva. Il genoma dei flavivirus (figura 2.1) codifica per 3 proteine strutturali e 7 non strutturali (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, tutte implicate nella sintesi dell'RNA virale o nell'assemblaggio delle proteine⁴). I virioni maturi si presentano icosaedrici, di circa 40 nm di diametro. Il capsid virale è composto dalla proteina del nucleocapsid C (11 kDa), mentre il pericapsid contiene le proteine E dell'envelope (50 kDa) e prM (precursore di membrana, 26 kDa) o M (8 kDa) a seconda che i virioni siano immaturi o maturi. La glicoproteina E rappresenta la principale proteina di superficie del virione in quanto permette l'ancoraggio del virus al recettore di membrana della cellula ospite e la sua successiva fusione nel citosol e costituisce il principale bersaglio della risposta immunitaria dell'ospite. Il genoma dei flavivirus è composto da circa 10-12 kb, e presenta un unico Open Reading Frame (ORF), tradotto in una poliproteina che viene successivamente processata dalle proteasi cellulari e virali. L'ORF è affiancato alle estremità-5' e -3' dalle Untranslated regions (UTRs), coinvolte nei processi di replicazione. L'estremità 5' termina con un cap di tipo 1 ($m^7GpppAmp$ 7-metilguansina trifosfato, collegato all'estremità 5' dell'mRNA tramite un legame trifosfato $5' \rightarrow 5'$), mentre l'estremità 3' non è poliadenilata, a differenza degli mRNA cellulari, ma presenta una sequenza di dinucleotidi CU altamente conservata.

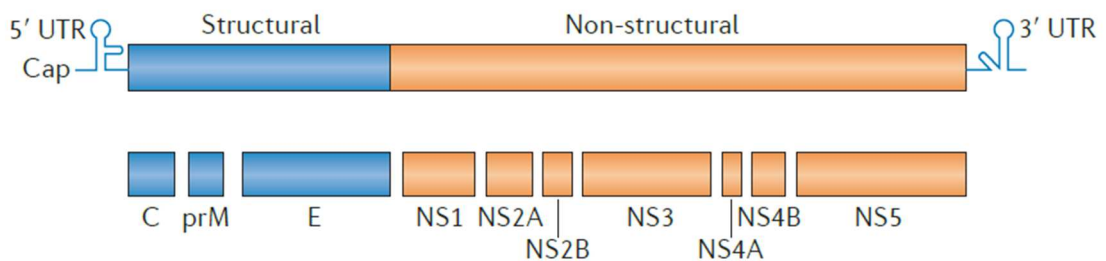


Figura 2.1 Schema del genoma dei flavivirus⁵

2.1.3 Replicazione dei flavivirus

L'ingresso dei flavivirus all'interno della cellula ospite avviene tramite endocitosi mediata dai recettori del mannosio, da glicosamminoglicani o dai recettori DC-SIGN (un recettore della lectina di tipo C presente sulla superficie sia dei macrofagi che delle cellule dendritiche) che interagiscono con la proteina E dell'envelope⁶. L'ambiente a basso pH che caratterizza l'interno della vescicola endosomiale innesca la fusione dell'envelope virale con la membrana della vescicola, favorendo la rimozione del rivestimento del virione e il rilascio del genoma virale nel citoplasma della cellula infetta. Successivamente, l'RNA viene dapprima tradotto in una singola poliproteina, che è poi scissa in proteine strutturali e non strutturali mature. Le proteine non strutturali (NS) formano un complesso di replicazione per la sintesi di filamenti intermedi di ssRNA a polarità negativa, che verranno utilizzati come template per la sintesi dei filamenti a polarità positiva. La proteina del capsid C è responsabile, invece, dell'incapsidazione dell'RNA genomico virale a polarità positiva, che si svolge a livello delle membrane del reticolo endoplasmatico ruvido (RER). Le proteine E e prM neosintetizzate vengono anch'esse incorporate nel virione immaturo e interagiscono tra loro per garantire il suo trasporto dal reticolo endoplasmatico verso l'esterno della cellula, proteggendo il virione dall'ambiente acido endosomiale. Grazie al taglio della proteina prM da parte di una proteasi cellulare chiamata furina, il virione viene convertito nella sua forma attiva matura e rilasciato dalla cellula.

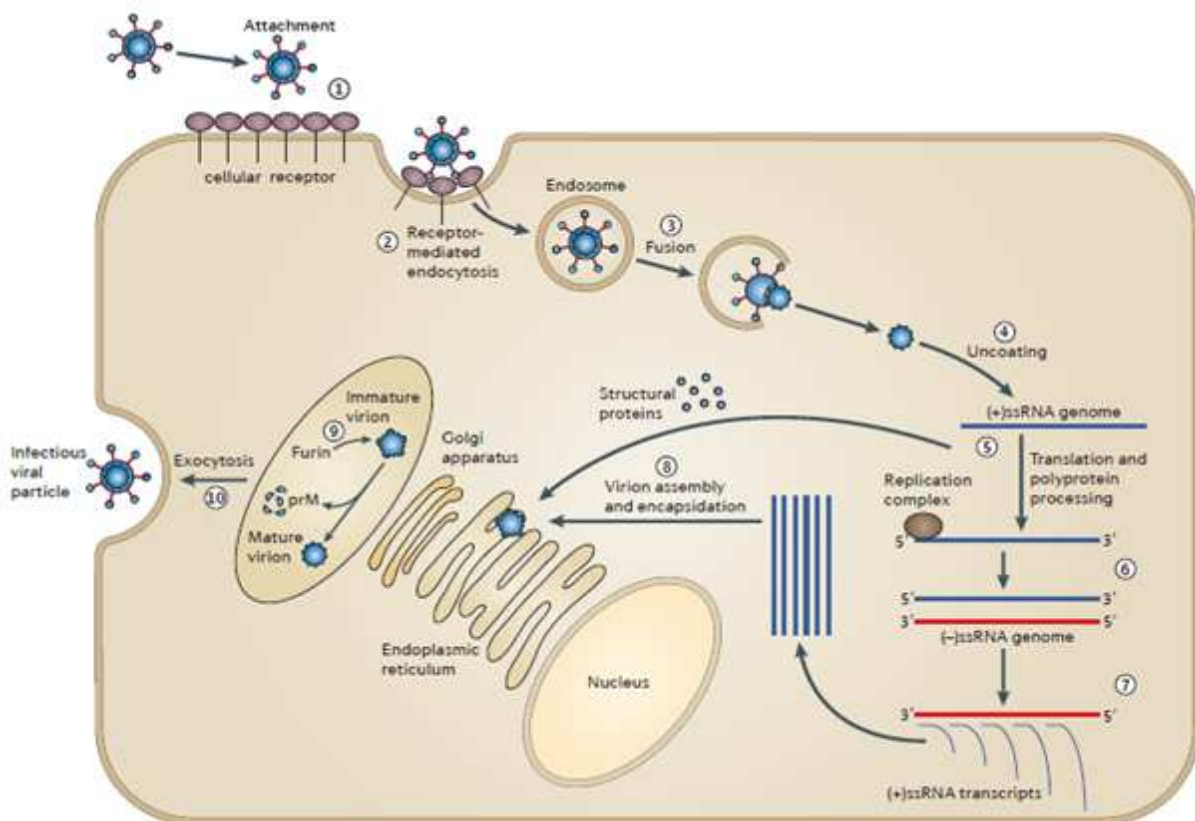


Figura 2.2 Processo di replicazione dei flavivirus⁵

2.1.4 Neuropatogenesi virale

Diversi membri del genere *Flavivirus* rappresentano importanti agenti patogeni umani in grado di alterare l'omeostasi del sistema nervoso centrale (SNC). I virus neurotropi possono infatti indurre disfunzioni neurologiche nell'individuo infetto, che possono aggravarsi e provocare gravi malattie infiammatorie che portano all'alterazione dell'architettura del SNC, associata ad una prognosi sfavorevole o addirittura fatale. I flavivirus come WNV, JEV, TBEV e USUV condividono un neurotropismo che consente loro di stabilire infezioni acute o persistenti. Attraverso uno studio condotto su modelli murini⁵, si è compreso come, a seguito di una puntura sottocutanea di una zanzara, i virus infettano per prime le cellule dendritiche residenti, i cheratinociti epidermici o le cellule di Langerhans. Le cellule dendritiche cutanee migrano poi verso i linfonodi drenanti regionali, dove il virus incontra i monociti, li infetta e replica ulteriormente. Tramite questa migrazione si instaura dunque una viremia che permette al virus di essere trasportato agli organi viscerali e periferici, tra i quali, milza, reni, fegato, e cervello. Una volta nel cervello, il virus può provocare malattie del SNC nell'ospite. Tra il sesto e l'ottavo giorno successivo all'infezione, il virus viene eliminato dagli organi periferici, ma persiste all'interno del cervello e del midollo spinale, grazie alla capacità del virus di oltrepassare la barriera ematoencefalica (BBB)⁵. Non sono ancora ben noti i meccanismi di ingresso dei flavivirus nel SNC attraverso la BBB^{7,8}; tuttavia, esistono diverse ipotesi a sostegno:

1. Attraversamento della BBB veicolato dai leucociti infetti.
2. Attraversamento diretto della BBB in seguito all'infezione delle cellule endoteliali dell'encefalo e la conseguente compromissione dell'integrità della barriera. L'ingresso del virus a livello endoteliale richiama citochine vasoattive, tra cui il fattore di necrosi tumorale (TNF) e l'interleuchina 1 β (IL-1 β), che causano la degradazione delle proteine delle giunzioni occludenti e la conseguente rottura della BBB⁷. In questo modo, le cellule immunitarie possono penetrare nel SNC causando infiammazione e consentendo al virus di accedere al cervello.
3. Ingresso mediato dal trasporto assonale retrogrado del virus in seguito all'infezione del sistema nervoso periferico. Un esempio è rappresentato dall'infezione dei nervi olfattivi, tramite cui il virus diffonde ai bulbi olfattivi ed entra nel SNC con un meccanismo che viene definito "a cavallo di Troia".

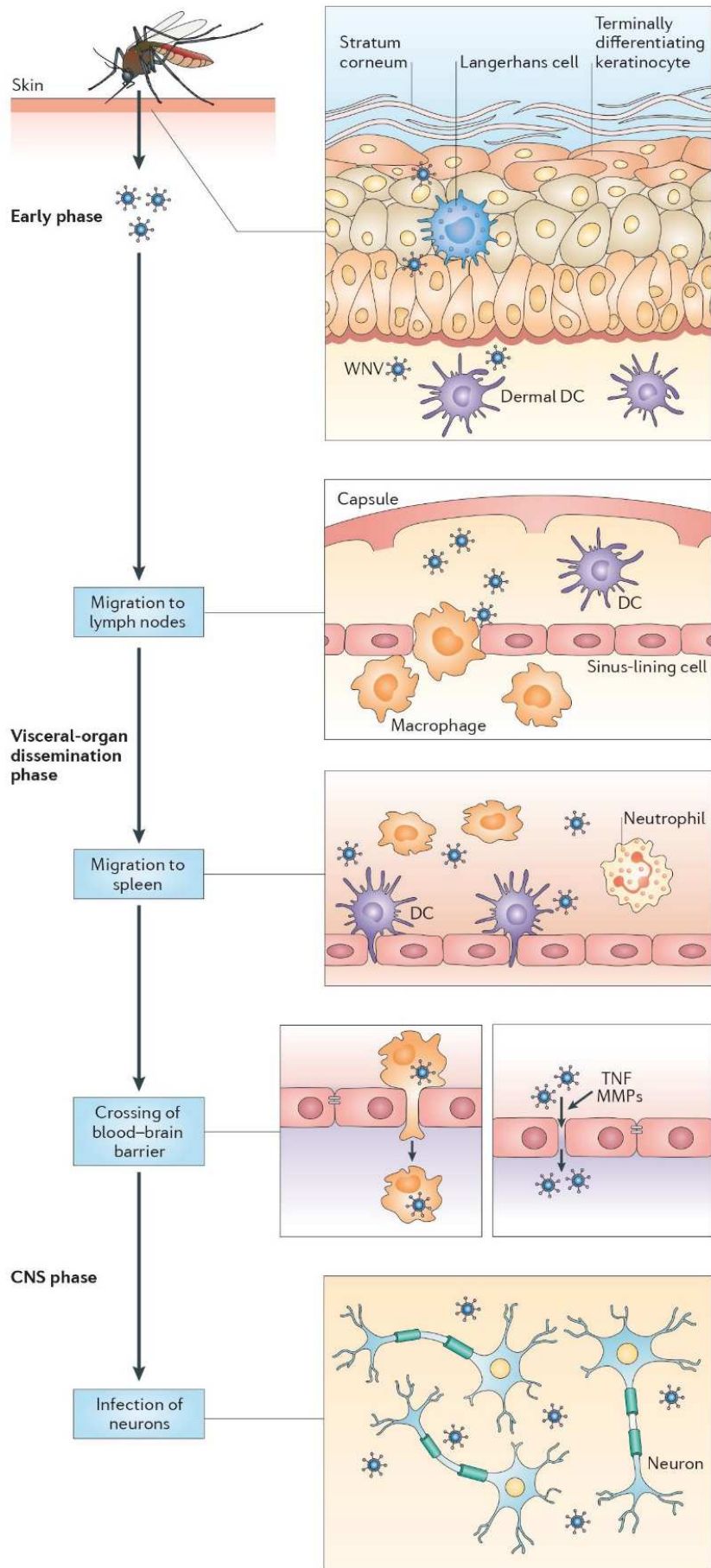


Figura 2.3 Rappresentazione grafica del meccanismo di patogenesi del West Nile Virus⁵

2.2 Meccanismi dell'immunità antivirale

Ogni infezione è seguita da una risposta caratteristica dell'ospite, volta alla protezione di sé stesso mediante i meccanismi difensivi del sistema immunitario. L'immunità può essere distinta in immunità innata, ovvero quella serie di meccanismi di difesa non specifici presenti fin dalla nascita di un individuo; e in immunità acquisita, in cui vi è una risposta specifica contro l'agente infettivo. Le difese antivirali innate sono essenziali per il controllo dell'infezione da flavivirus e includono la produzione di interferone (IFN) di tipo I e delle citochine pro-infiammatorie che inducono, a loro volta, l'espressione dei geni con funzione antivirale e la successiva attivazione della risposta immunitaria adattativa.

2.2.1 Risposta immunitaria innata mediata dai RIG-I like receptors

Uno dei meccanismi dell'immunità innata più importanti è quello mediato dai RIG-I like receptor (RLR)⁹, ovvero una famiglia di recettori citoplasmatici che includono RIG-I (retinoic acid-inducible gene I) e MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5). Questi recettori sono espressi fisiologicamente in quasi tutti i tipi cellulari del corpo umano e la loro espressione viene stimolata durante l'infezione virale e in risposta agli IFN di tipo I. RIG-I e MDA5 riconoscono dei pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP) e attivano degli effettori a valle che inducono la trascrizione dei geni bersaglio. I PAMP più comuni riconosciuti da RIG-I sono le molecole di dsRNA o ssRNA che possiedono un trifosfato in posizione 5'⁹. Quando il recettore lega l'RNA, avviene un cambiamento conformazionale di RIG-I, che provoca l'esposizione del dominio proteico CARD (Caspase Recruitment Domain), presente anche nella proteina di segnalazione antivirale mitocondriale MAVS¹⁰. L'interazione tra i domini CARD delle due proteine porta alla formazione di grandi aggregati funzionali costituiti da TRAF3 (TNF receptor-associated factor) e successivamente dal complesso IKK ϵ /TBK1. Il complesso IKK ϵ /TBK1 attiva i fattori regolatori di trascrizione dell'interferone IRF3 e IRF7, che inducono la produzione di IFN di tipo I (IFN α e IFN β) e gli IFN di tipo III (IFN λ)¹¹. Gli IFN di tipo I vengono rilasciati all'esterno della cellula e si legano ai recettori IFNAR¹² esposti sulla superficie cellulare della cellula che li ha prodotti, ma anche su quelle circostanti. Il legame con i recettori IFNAR attiva la cascata del segnale JAK-STAT (Janus kinase (JAK)-signal transducer and activator of transcription), che induce l'espressione dei geni ISG (interferon stimulated genes), i quali amplificano la risposta dell'INF e producono proteine volte alla limitazione della diffusione virale e la degradazione del materiale genetico, provocando la morte delle cellule infette, la protezione delle cellule circostanti e l'attivazione della risposta antivirale antigene-specifica.

2.2.2 Risposta immunitaria innata mediata dai Toll-Like receptors

Un'altra cascata del segnale della risposta immunitaria innata molto importante è mediata dai Toll-like receptor (TLRs)¹³ situati sulla membrana citoplasmatica e in altre membrane interne, come quella endosomiale. Analogamente agli RLR, i TLRs riconoscono i PAMP. Esistono più di dieci diversi tipi di recettori TLR, di questi, solo TLR3, TLR7 e TLR8 riconoscono specificatamente gli acidi nucleici. TLR3, ad esempio, riconosce l'RNA a doppio filamento nei compartimenti endosomiali e successivamente recluta una molecola adattatore contenente il dominio TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β) che attiva i fattori di trascrizione IRF3, IRF7 e NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) che inducono la trascrizione dei geni dell'IFN di tipo I e delle citochine pro-infiammatorie¹³. TLR7 e TLR8, invece, sono espressi anche all'interno del compartimento endosomiale e riconoscono l'RNA a singolo filamento. Una volta legato l'RNA, questi TLR reclutano MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88), che a sua volta attiva i fattori di trascrizione IRF7 e NF- κ B¹³, con il successivo innesco dell'espressione dell'IFN di tipo I e delle citochine pro-infiammatorie.

2.3 West Nile Virus

West Nile virus appartiene al sierocomplesso del Japanese encephalitis virus (JEV) assieme a Murray Valley encephalitis virus (MVEV), Saint Louis encephalitis virus (SLEV) e Usutu virus (USUV)². Isolato per la prima volta in Uganda nel 1937, dal sangue di una donna con sintomatologia febbrile proveniente dal distretto di West Nile (da cui deriva il nome West Nile disease), oggi il WNV risulta endemico in Africa, in Nord America, in Europa e in Asia Occidentale, dove provoca ogni anno focolai di malattia neuroinvasiva sia nell'uomo che negli equidi¹⁴. Il WNV è mantenuto in natura da un ciclo primario di trasmissione uccello-zanzara-uccello (ciclo endemico) in cui le zanzare ornitofile adulte (vettori) si infettano pungendo uccelli viremici (ospiti amplificatori o serbatoio/*reservoir*)¹⁵. Una volta che la zanzara ha ingerito il virus, questo si diffonde nel suo organismo, dove si replica localizzandosi a livello delle ghiandole salivari per poi essere trasmesso ad un altro uccello. Il ciclo secondario (ciclo epidemico) si manifesta quando le zanzare femmine adulte sono capaci di trasmettere il virus ad ospiti accidentali, come il cavallo e l'essere umano¹⁶, che entrano quindi nel ciclo di trasmissione e vengono interessati dall'infezione. Sebbene la trasmissione principale del virus sia mediata dalle zanzare del genere *Culex* di specie *modestus* e specie *pipiens*, sono stati documentati casi di infezione causate da trasfusioni di sangue o di plasma, trapianti d'organi, trasmissione madre-feto in gravidanza, consumo di latte materno umano, per via percutanea in ambiente di laboratorio ed esposizione congiuntivale in ambito lavorativo^{17,18}.

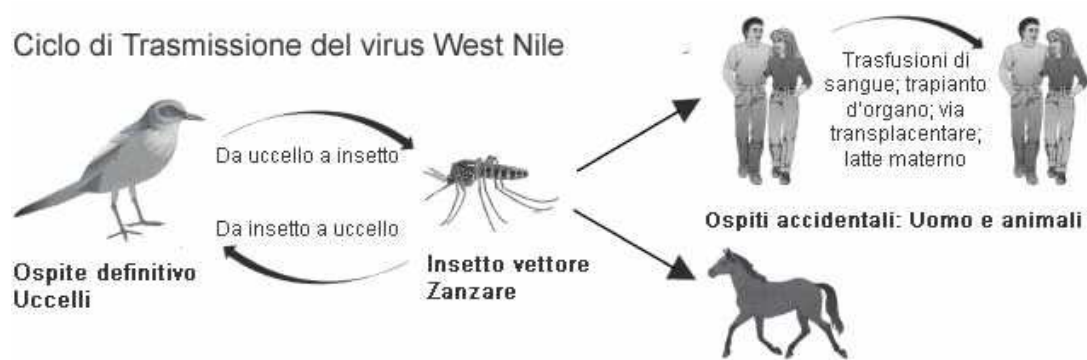


Figura 2.5 Schema riassuntivo del ciclo di trasmissione del West Nile Virus.

Circa l'80% delle persone infette da WNV sono asintomatiche o presentano manifestazioni subcliniche. Nelle aree endemiche, circa il 20% dei soggetti colpiti manifesta una sindrome simil-influenzale che include febbre, cefalea, dolori muscolari ed articolari, congiuntivite, rash cutanei (solitamente a livello del tronco, sulle estremità e sulla testa), linfadenopatia, anoressia, nausea, dolori addominali, diarrea e sindromi respiratorie. Meno dell'1% delle persone infettate presenta grave sintomatologia neurologica, tra cui meningite, encefalite e paralisi flaccida acuta¹⁹. Questa progressione neuroinvasiva viene denominata West Nile neuroinvasive disease (WNND).

Sulla base dei dati della sequenza nucleotidica, i ceppi di WNV sono stati filogeneticamente classificati in 9 lignaggi²⁰. Di questi cui solo i lignaggi 1 e 2, sono stati associati a malattie nell'uomo e nei cavalli²¹, mentre altri lignaggi sono stati rilevati sporadicamente nelle zanzare e negli uccelli, ma non associati a malattie umane. Il lignaggio 1 è distribuito principalmente in Nord Africa, in Europa centro-meridionale e in Nord America²¹. Il lignaggio 2, invece, fino alla metà degli anni 2000 era prevalente in Africa subsahariana e in Madagascar, dove ha causato lievi malattie febbrili negli esseri umani, raramente progredite in malattie gravi e tipicamente non associate a focolai. Tuttavia, negli anni successivi, è stato identificato in uccelli selvatici in Ungheria, per poi diffondersi in Europa centrale e Orientale, con casi riscontrati anche in Italia²². Entrambi i lignaggi, ad oggi, sono considerati endemici in Europa sudorientale. Tutti gli altri lignaggi, invece, sono caratterizzati da scarsa patogenicità e presentano notevoli differenze genetiche con i ceppi dei lignaggi 1 e 2²³.

2.3.1 Situazione epidemiologica del WNV in Italia nel giugno 2022

A causa della forte ondata di caldo che ha colpito l'Europa durante la primavera del 2022, è stato riscontrato un inizio anticipato della trasmissione stagionale di WNV (solitamente rilevata da metà luglio), seguito da un aumento di epidemie e dalla diffusione di queste in un'area geografica più ampia. Già all'inizio di giugno il sistema di sorveglianza per l'infezione da WNV, che comprende anche la sorveglianza di USUV²⁴, ha rilevato in Veneto le prime infezioni da WNV nelle zanzare, negli uccelli e successivamente anche negli esseri umani. Il sistema di sorveglianza

è gestito dal Ministero della Salute e combina la sorveglianza umana con quella veterinaria ed entomologica²⁵. L'obiettivo di questa sorveglianza integrata è quello di rilevare tempestivamente l'attività di WNV e USUV ed attivare di conseguenza adeguate misure di risposta per prevenire la trasmissione all'uomo, nonché identificare le aree ad alto rischio di malattia. La sorveglianza è attiva tutto l'anno e viene potenziata durante la stagione di trasmissione, dall'inizio di maggio alla fine di novembre. Il primo rilevamento di un pool di zanzare *Culex* positivo per WNV lignaggio 2 è avvenuto il 7 giugno 2022²⁴, innescando di conseguenza lo screening mediante test NAT dei donatori di sangue, cellule, organi e tessuti. In questo modo, il 18 giugno 2022 è stato identificato il primo donatore di sangue WNV-positivo²⁴ nella provincia di Venezia. Due giorni dopo la donazione, il donatore ha riportato solamente dei sintomi simil-influenzali, durati all'incirca 3 giorni. L'infezione da WNV è stata poi confermata anche in un paziente con encefalite della provincia di Padova, che ha sviluppato sintomi il 28 giugno²⁴. In entrambi i casi, nel sangue e nelle urine dei pazienti è stato rilevato l'RNA virale mentre nel siero gli anticorpi anti-WNV della classe IgM. Il sequenziamento del genoma effettuato sui campioni di questi pazienti ha identificato WNV lignaggio 2 nel primo donatore di sangue e WNV lignaggio 1 nel paziente affetto da encefalite²⁴. Questi risultati hanno dimostrato una co-circolazione di entrambi i lignaggi nel territorio. Da giugno al 21 settembre 2022 sono stati segnalati in Italia 517 casi umani confermati di infezione da WNV; di questi: 253 si sono manifestati nella forma neuro-invasiva, 79 casi asintomatici (di cui 78 identificati in donatori di sangue), 174 casi di febbre, e altri 11 casi sintomatici. Tra i confermati sono stati notificati 28 decessi. Nello stesso periodo sono stati segnalati 5 casi di infezione da USUV (4 donatori di sangue e 1 caso di febbre)²⁶.

2.4 Usutu Virus

Come WNV, USUV appartiene al sierocomplesso del Japanese encephalitis virus (JEV). USUV, il cui nome deriva da un fiume sudafricano (il Grande Usutu), è stato isolato per la prima volta nel 1959 in zanzare della specie *Culex neavei* in Sudafrica e da allora è stato identificato in molti Paesi dell'Africa sub-Sahariana. Secondo studi filogenetici basati sulla sequenza del gene NS5, i ceppi di USUV possono essere suddivisi in otto lignaggi: tre africani e cinque europei^{27,28}. Questo virus, come WNV, è mantenuto in natura da un ciclo endemico primario di trasmissione zanzara-uccello-zanzara, ma può infettare l'uomo e il cavallo mediante puntura di zanzare femmina della specie *Culex*. Nell'uomo, USUV è stato isolato per la prima volta nel 1982 nella Repubblica Centro-Africana in un paziente che mostrava una sintomatologia febbrile e rash cutaneo. Le prime evidenze sulla presenza del virus in Europa risalgono al 1996, quando si verificò un'epidemia che coinvolse i merli comuni in Italia, nella regione Toscana, e al 2001, quando il virus causò la morte

di diverse specie di uccelli in Austria²⁹. Negli ultimi anni, USUV si è diffuso in diversi paesi dell'Europa centrale e occidentale, endemici anche per WNV (poiché entrambi i virus sono trasmessi principalmente da *Culex spp*¹⁴), e la sua circolazione è aumentata in modo significativo, destando preoccupazione per i possibili rischi alla salute umana che il virus può comportare. I sintomi dell'infezione da USUV negli esseri umani variano dal rash cutaneo, la febbre e la cefalea, fino a gravi e complicanze neurologiche (meningite o meningoencefalite)³⁰.

USUV e WNV sono virus geneticamente, antigenicamente ed epidemiologicamente correlati, ma il loro impatto sulla salute umana e animale differisce sostanzialmente: mentre USUV è associato a elevata mortalità negli uccelli e le segnalazioni nell'uomo sono limitate e sporadiche, WNV ha la capacità di indurre forme cliniche neuroinvasive gravi nell'uomo e rappresenta un rischio per la sanità pubblica³¹. Studi sierologico-epidemiologici hanno mostrato come la circolazione di USUV nell'uomo sia in realtà più comune di WNV in alcune regioni endemiche in cui circolano entrambi i virus^{32,33}, a fronte però di un numero minore di casi d'infezione grave.

2.5 Modelli *in vitro* per lo studio della neuropatogenesi virale

Lo studio del cervello umano rappresenta una grande sfida a causa della sua inaccessibilità. Per tale motivo, sono stati sviluppati dei modelli *in vitro* che “imitano” la situazione umana *in vivo*. La costruzione di questi modelli ha lo scopo principale di studiare la fisiopatologia delle malattie neuronali, anche causate da agenti patogeni; di identificare nuovi biomarcatori, ma anche di studiare l'efficacia di farmaci in via di sviluppo³⁴.

Esistono numerose tipologie di modelli *in vitro*, che possono essere utilizzati in maniera differente a seconda delle diverse patologie che si vanno a valutare; tra questi troviamo le *slice cerebrali*, ovvero fette di cervello animale mantenute in liquido cerebro-spinale artificiale freddo. L'uso delle *slice cerebrali* consente, ad esempio, lo studio elettrofisiologico dei neuroni in condizioni controllate³⁴.

Un ulteriore approccio di studio *in vitro* prevede invece la creazione di una coltura primaria di neuroni dissociati, sezionando un tessuto del sistema nervoso *in vivo*, separando le singole cellule ottenute e facendo crescere queste *in vitro*³⁵. Entrambe le metodiche implicano l'utilizzo di materiale cerebrale animale. L'utilizzo di modelli animali *in vivo*, come *in vitro*, per il confronto con la controparte umana, non è mai del tutto corretto, a causa di importanti differenze macroscopiche e microscopiche presenti nella struttura del sistema nervoso³⁴. Per tale motivo, sono stati sviluppati dei modelli *in vitro* basati su cellule umane, che “imitano” la situazione *in vivo*. Al fine di ottenere neuroni *in vitro* senza dover realizzare delle colture primarie di neuroni dissociati umani, è stata sfruttata la tecnologia del differenziamento cellulare indotto. Tra i modelli disponibili troviamo il differenziamento di cellule staminali pluripotenti (hPSC) o di fibroblasti

umani in neuroni³⁶. Il potenziale differenziamento delle PSC *in vitro* in qualsiasi tipologia di cellula desiderata è una tecnologia molto promettente che potrebbe rivoluzionare lo studio delle malattie umane.

Le PSC sono in grado, per definizione, di auto-rinnovarsi in coltura, mantenendo però la capacità di differenziare in derivati di tutti e tre i foglietti embrionali (endoderma, mesoderma ed ectoderma) e quindi generare potenzialmente ogni tipo di cellula adulta. Queste possono essere di due tipi:

- **Cellule Staminali Embrionali (ESC)**, ottenute dalla massa cellulare interna (ICM, *inner cell mass*) della blastocisti umana (epiblasto) derivata da un pre-impianto *in vitro*³⁷. Grazie all'isolamento dell'epiblasto dall'embrione e la successiva coltura *in vitro*, le cellule diventano cellule staminali embrionali in grado di propagarsi indefinitamente generando cellule sempre uguali a sé stesse, e di differenziarsi in tutti i tipi di cellule adulte.
- **Cellule Staminali Pluripotenti Indotte (iPSC)**, ottenute invece dalla riprogrammazione di cellule somatiche, mediante espressione ectopica di fattori di trascrizione specifici. In questo caso, dunque, vengono inseriti all'interno del genoma di cellule differenziate adulte dei fattori di trascrizione che, se stimolati, permettono la trasformazione in cellule pluripotenti³⁸.

Entrambe le tipologie di PSC possono essere differenziate in diversi tipi cellulari grazie all'attività di fattori di trascrizione che inducono segnali specifici, ai quali le cellule pluripotenti dell'embrione rispondono durante il differenziamento *in vivo*. Questo approccio offre dunque l'opportunità di ottenere un'ampia varietà di tipi cellulari, in quantità potenzialmente illimitate, al fine di sviluppare modelli *in vitro* affidabili, ridurre i tempi di studio e l'utilizzo di modelli animali. Tuttavia, questi modelli presentano delle limitazioni legate prevalentemente alle procedure complesse, variabili e molto lunghe utilizzate, ma anche date dalla variabilità fenotipica delle diverse linee cellulari di derivazione utilizzate³⁶. Per affrontare queste problematiche, sono stati sviluppati degli approcci che consentono la produzione rapida e riproducibile di cellule neuronali umane da cellule ES o iPSC, sfruttando l'espressione forzata di un singolo fattore di trascrizione, la Neurogenina2 (*Ngn2*). Per far questo è stato utilizzato un vettore lentivirale che ha permesso di integrare in un *genomic safe harbor* (GSH) il transgene *Ngn2*, la cui espressione può essere indotta dalla tetraciclina Tet-ON 3G³⁶.

Grazie al differenziamento di queste cellule staminali è possibile quindi costruire sia modelli *in vitro* di colture cellulari bidimensionali (2D), che colture tridimensionali (3D).

Le colture 2D sono ottenute seminando le cellule direttamente su una superficie piana rigida, solitamente rivestita con substrati che imitano la composizione della matrice extracellulare (ECM) al fine di promuovere l'adesione e supportare la proliferazione cellulare. Per quanto concerne lo studio del cervello, possono essere utilizzate, oltre che i neuroni, colture di astrociti e oligodendrociti umani³⁹. Questo approccio fornisce un sistema altamente riproducibile, conveniente e facilmente interpretabile. Un esempio concreto e attuale dell'utilizzo di questo modello *in vitro* è uno studio condotto sulla differenza nella neurovirulenza tra alcune varianti di SARS-CoV-2 su modelli *in vivo* e *in vitro*⁴⁰. In questo caso, per il modello *in vitro*, sono state differenziate delle iPSC in neuroni dello strato corticale eccitatorio mediante la sovraespressione della *Ngn2* indotta dalla doxiciclina, mentre per il modello *in vivo* sono stati utilizzati dei criceti dorati siriani. I risultati ottenuti dalle indagini parallele hanno permesso di confermare le informazioni tratte sulla neuroinvasività e la neurovirulenza di diverse varianti di SARS-CoV-2 sia in modelli animali che in modelli derivati da hiPSC.

Le colture 2D, tuttavia, non sono realmente rappresentative di un ambiente cellulare *in vivo*, in cui diversi tipi di cellule coesistono e interagiscono tra loro. Negli ultimi anni, il rapido progresso della tecnologia delle cellule staminali ha fornito uno strumento per sviluppare colture tridimensionali (3D) che riproducono più fedelmente le complesse interazioni cellula-cellula e cellula-ambiente, garantendo dei risultati più realistici⁴¹. Gli organoidi sono sistemi tridimensionali generati da cellule staminali pluripotenti che si differenziano nei diversi tipi di cellule di interesse del tessuto, imitando più fedelmente gli eventi che si verificano durante l'organogenesi *in vivo*.

3.Scopo della tesi

Dall'analisi dell'intera sequenza di un genoma virale, non è ancora possibile estrapolare tutte le informazioni necessarie a determinare il potenziale di patogenicità di un organismo. In assenza di sufficienti dati epidemiologici sull'uomo, l'impiego di un modello *in vitro* capace di caratterizzare fenotipicamente il virus emergente potrebbe rappresentare un sistema estremamente utile per fornire in modo rapido e predittivo dati relativi al tropismo e alla virulenza dell'agente infettante. Lo scopo di questo studio è stato quello di sviluppare un modello umano di infezione *in vitro* per lo studio del neurotropismo di alcuni flavivirus, come West Nile virus (WNV) e Usutu virus (USUV) e capace di fornire rapidamente dati predittivi sulla virulenza e sulla patogenicità.

L'aumento delle conoscenze sulla biologia delle cellule staminali, che ha caratterizzato gli ultimi decenni, ha permesso di fronteggiare l'inaccessibilità del sistema nervoso centrale (SNC) umano mediante lo sviluppo di sistemi neuronali bi- e tridimensionali in grado di riprodurre *in vitro* cellule umane neuronali e della glia.

In questo studio, in particolare, è stato generato un modello *in vitro* di neuroni derivati dal differenziamento di cellule staminali embrionali umane al fine di indagare e confrontare a livello fenotipico diversi lignaggi di WNV e USUV, entrambi flavivirus neurotropi emergenti in Europa, i cui genotipi sono ben caratterizzati. WNV e USUV sono due virus geneticamente, antigenicamente ed epidemiologicamente correlati, entrambi circolanti in Italia e di considerevole rilevanza epidemiologica e clinica, considerata l'epidemia che si è verificata in Veneto durante l'estate 2022 e ancora in corso. Entrambi i flavivirus rientrano nel "Piano di sorveglianza e risposta alle Arbovirosi" del Ministero della Salute.

Lo studio fa inoltre parte del progetto Horizon2020 VEO finalizzato alla generazione e distribuzione di informazioni fruibili per la segnalazione precoce delle malattie infettive emergenti.

4. Materiali e metodi

4.1 Colture e linee cellulari

4.1.1 Linea cellulare Vero E6

La linea cellulare Vero clone E6 rappresenta una popolazione di cellule epiteliali renali originariamente isolate dal *Cercopithecus aethiops* (African Green Monkey) adatta per supportare la crescita degli Arbovirus. Le cellule Vero E6 sono state coltivate in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) arricchito con il 10% v/v di siero fetale bovino (FBS, Gibco) filtrato con Stericup Quick Release-HV Sterile Vacuum Filtration System (Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germania) e 1% v/v di penicillina-streptomina (P/S 10000 U/mL, Gibco). Le cellule sono state seminate in fiasche Falcon™ da 75 cm², mantenute a 37 °C con il 5% di CO₂ e subcoltivate al raggiungimento di una confluenza dell'80-90%, utilizzando 2 mL di 0,05% tripsina-EDTA 1X (Gibco) per 5 minuti a 37°C.

4.1.2 Linea cellulare H9

4.1.2.1 Caratteristiche della linea cellulare

La linea cellulare H9 (WA09, WiCell) è stata ottenuta dal Dr. James Thomson (Università del Wisconsin) mediante l'isolamento della *inner cell mass* (ICM) di un embrione fecondato *in vitro* e coltivato fino allo stadio di blastocisti⁴². Queste sono cellule staminali embrionali umane (hESC) e come tali, hanno la potenzialità di differenziarsi nei derivati di tutti e tre i foglietti embrionali. Le cellule presentano un elevato rapporto tra nucleo e citoplasma, con nucleoli prominenti, un cariotipo 46, XX normale; esprimono marcatori di superficie cellulare specifici delle cellule indifferenziate e delle cellule di carcinoma embrionale umano (EC) e presentano alti livelli di attività della telomerasi. Nello specifico, la linea cellulare H9 impiegata in questo studio era stata progettata per esprimere il transgene Neurogenin2 (*Ngn2*) indotto dalla tetraciclina Tet-ON 3G ed integrato nel locus SHS (Safe harbor sites) AAVS1. La neurogenina2 è un fattore di trascrizione che svolge un ruolo importante nella neurogenesi, la cui induzione nelle cellule trattate con doxiciclina provoca la sottoregolazione dei fattori di pluripotenza e l'inizio del programma trascrizionale neuronale che porta ad una rapida conversione in neuroni (circa 14 giorni)⁴³.

4.1.2.2 Mantenimento delle cellule

Le cellule H9, gentilmente fornite dal Prof. Wade Harper (Harvard Medical School), sono state seminate in piastre multiwell-6 Falcon™, i cui i pozzetti sono stati rivestiti precedentemente da un sottile strato di Geltrex® (Life Technologies, Carlsbad, California, Stati Uniti) e mantenute in terreno privo di siero composto da mTeSR1™ Basal Medium (STEMCELL Technologies,

Vancouver, Canada) arricchito con mTeSR™1 5X Supplement (STEMCELL Technologies) e 1% v/v di P/S a 37 °C con il 5% di CO₂. Quotidianamente il mezzo di coltura è stato sostituito con terreno fresco.

Il Geltrex® è un estratto di membrana basale che agisce come substrato e supporto fisico per le cellule in coltura e contribuisce a creare matrici extracellulari più simili a quelle *in vivo*. Esso viene conservato a -80°C e al bisogno viene scongelato O/N a 4°C o per 5 ore in ghiaccio, viene poi seminato alla concentrazione di 10µL/mL in terreno DMEM/F-12 (Gibco) freddo, e lasciato asciugare per almeno un'ora a temperatura ambiente prima del suo utilizzo.

4.1.2.3 Subcultura

Quando le cellule H9 in coltura hanno raggiunto l'80-90% di confluenza nel pozzetto, sono state dissociate in piccoli aggregati cellulari (*clumps*), utilizzando una soluzione PBS/ 0,1% EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Stati Uniti) o in singole cellule mediante l'enzima Accutase® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific), di solito con una diluizione rispettivamente 1:4/1:6 o 1:10/1:12. La subcultura cellulare ottenuta utilizzando la soluzione di PBS/EDTA è un metodo non enzimatico e delicato che dissocia solo parzialmente le cellule, portando alla generazione di *clumps*. Il passaggio delle cellule in PBS/EDTA riduce al minimo la morte cellulare, l'insorgenza di cariotipi anormali e favorisce una rapida adesione al pozzetto così come la ripresa del ciclo cellulare al momento del riposizionamento. Inoltre, il passaggio in EDTA è una procedura rapida che non richiede la neutralizzazione enzimatica e la centrifugazione, riducendo le possibilità di contaminazione. Dopo aver lavato brevemente le cellule con Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; Gibco), la soluzione PBS/EDTA 0,5 mM è stata aggiunta alle cellule e lasciata agire per 10 minuti a temperatura ambiente⁴⁴. Al termine dell'incubazione, la soluzione è stata accuratamente aspirata dai pozzetti ed è stato immediatamente aggiunto DMEM/F-12. Le cellule sono state quindi dissociate dal pozzetto mediante l'utilizzo di un cell-scraper e la quantità desiderata di cellule è stata seminata in nuovi pozzetti rivestiti con Geltrex® di una piastra multiwell-6 contenente 2mL di terreno mTeSR completo.

In alternativa, per conoscere il numero preciso delle singole cellule, è stata eseguita la dissociazione enzimatica in Accutase®. L'enzima Accutase® (1 mL in un pozzetto di piastra 6-multiwell) è stato aggiunto alle cellule, previo lavaggio in DPBS, e lasciato agire in incubatore a 37°C per 10 minuti. Successivamente, l'enzima è stato diluito con un volume di DPBS 5 volte superiore a quello della soluzione di dissociazione (5 mL per il 6-well). Le cellule dissociate sono state quindi raccolte e centrifugate a 1100 RPM per 5 minuti a temperatura ambiente. Il pellet è stato poi risospeso in terreno completo per la conta cellulare e successivamente il

numero desiderato di cellule è stato prelevato, risospeso in mTeSR completo integrato con Rock inhibitor (StemMACS™ Y27632, RI, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) alla concentrazione di 10 µM e trasferito nei pozzetti desiderati

4.2 Differenziamento delle cellule staminali H9 in neuroni

Le H9 sono differenziate in neuroni, al fine di ottenere un modello *in vitro* su cui testare il neurotropismo di alcuni flavivirus. Il protocollo di differenziamento⁴⁵ (Figura 4.1) si suddivide nei seguenti steps:

Day 0: Le cellule staminali pluripotenti AAVS1-TRE3G-NGN2 in coltura vengono trattate con Accutase® e seminate in piastre 6-well rivestite con Geltrex®, alla concentrazione di 2x10⁵ cells/well in terreno **ND1 Medium** (tabella 4.1) arricchito con RI 10 µM.

ND1 Medium (per 20 mL):

Reagenti	Concentrazione finale	Volume
DMEM/F12 (Gibco)		19,5 mL
N2 (100x) (Gibco)	1x	200 µL
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF, GFH1 Cell Guidance Sistem)	10 ng/mL	20 µL
Neurotrophin-3 (NT-3, GFH99 Cell Guidance Sistem)	10 ng/mL	20 µL
NEAA (100X) (Gibco)	1x	200 µL
Human Laminin (Sigma-Aldrich)	0.2 µg/mL	4 µL
Doxycycline (Sigma-Aldrich)	2 µg/mL	20 µL
P/S	1x	200 µL

Tabella 4.1 Reagenti per la composizione del terreno ND1 Medium

Day 1: Il terreno cellulare in ogni 6-well viene sostituito con ND1 Medium fresco.

Day 2: Il terreno ND1 Medium viene sostituito con terreno ND2 Medium (tabella 4.2) fresco.

ND2 Medium (per 50 mL):

Reagenti	Concentrazione finale	Volume
Neurobasal medium (Gibco)		48 mL
B-27® Supplement (50x) (Gibco)	1x	1 mL
Glutamax (100X) (Gibco)	1x	500 µL
BDNF	10 ng/mL	50 µL
NT-3	10 ng/mL	50 µL
Doxycycline	2 µg/mL	50 µL
P/S	1x	500 µL

Tabella 4.2 Reagenti per la composizione del terreno ND2

Day 4: Il 50% del terreno viene rimpiazzato con terreno ND2 Medium fresco

Day 7: Le cellule vengono dissociate con Accutase® e seminate alla concentrazione di $2-4 \times 10^5$ cells/well in nuove piastre da 6-well rivestite di Geltrex® in terreno ND2 Medium arricchito con RI $10 \mu\text{M}$.

Day 8 - Day 14: Il terreno ND2 Medium viene rimpiazzato al 50% con terreno ND2 fresco a giorni alterni. Il terreno viene sostituito solo per il 50% in quanto i neuroni non possono stare a contatto con l'aria.

Day 14 e successivi: Le cellule al quattordicesimo giorno raggiungono lo stato differenziato di neuroni. Per mantenere i neuroni in coltura per più di 14 giorni, sono richiesti successivi cambi di terreno al 50% (ND2 Medium), a giorni alterni.

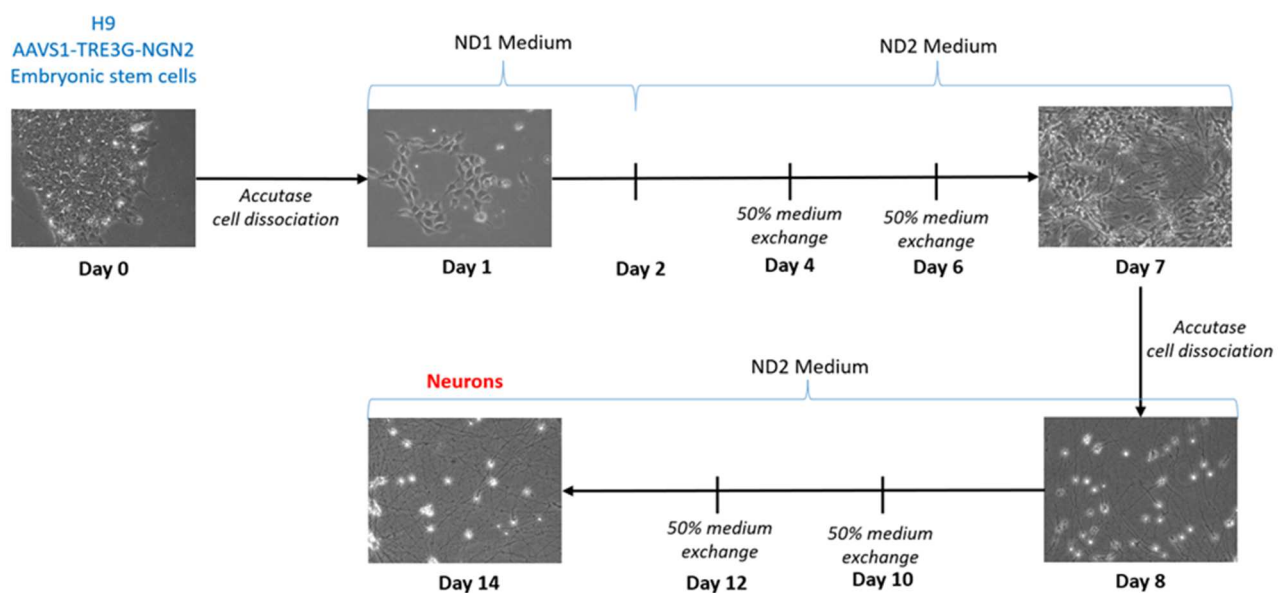


Figura 4.1 Protocollo di differenziamento delle H9 AAVS1-TRE3G-NGN2 in neuroni. Le cellule H9 vengono dissociate mediante trattamento con Accutase® e seminate in piastre rivestite con Geltrex, in terreno ND1 medium. Dal giorno 3 fino al giorno 7 il terreno di coltura viene rimpiazzato a giorni alterni con terreno ND2 fresco. Al giorno 7 le cellule vengono nuovamente separate in Accutase®, e seminate in maniera definitiva in nuovi pozzetti rivestiti con Geltrex. I giorni successivi il 50% del mezzo di coltura (ND2 medium) viene cambiato a giorni alterni fino al raggiungimento dello stato differenziato. (giorno 14).

4.3 Virus

I neuroni sono stati infettati con USUTU virus e due lignaggi di West Nile virus, tre flavivirus neurotropi prodotti e amplificati nella linea permissiva di cellule Vero E6.

4.3.1 West Nile Virus

4.3.1.1 West Nile Virus lignaggio 1

West Nile Virus lignaggio 1 (WNV 1) ceppo ITA/09 (GenBank GU011992) è stato il primo virus del Nilo occidentale umano isolato in Italia nel 2009 ed è stato espanso su cellule Vero E6 e titolato tramite saggio in placche raggiungendo una concentrazione di 2×10^7 PFU/mL.

4.3.1.2 West Nile Virus lignaggio 2

West Nile Virus lignaggio 2 (WNV 2) AUT/08 (GenBank KF179640) è stato isolato da un astore (*Accipiter gentilis*, uccello rapace della famiglia degli Accipitridi) in Austria nel 2008 ed è stato gentilmente fornito dal Prof. N. Nowotny (Università di Vienna). Il titolo ottenuto dalla produzione virale è $5,4 \times 10^6$ PFU/mL.

4.3.2 Usutu Virus

L'Usutu virus (USUV) utilizzato nello studio appartiene al ceppo Europe1 (GenBank AY453411) ed è stato isolato da un merlo (*Turdus Merula*) (isolato 939/01) a Vienna nel 2001. Il virus è stato fornito dal Prof. N. Nowotny ed è stato espanso su cellule Vero E6, ottenendo un titolo virale di 5×10^7 TCID₅₀/mL.

Per la gestione e gli esperimenti di infezione con questi virus è stato utilizzato un livello di biosicurezza di tipo 3 (BSL-3).

La produzione e la titolazione virale sono stati descritti nell'allegato 8.1.

4.4 Infezione dei neuroni

I neuroni sono stati infettati con una molteplicità di infezione (MOI) di 0.1, ovvero 1 particella virale ogni 10 cellule da infettare. Per ottenere la MOI corretta, ogni virus è stato diluito in terreno privo di siero (DMEM ,1% P/S). I neuroni derivati dalle cellule H9, seminati in piastre da 6-well e da 24-well, sono state trasferite nel laboratorio BSL-3, dove è avvenuta l'inoculazione dei virus. Per facilitare l'ingresso delle particelle virali all'interno delle cellule ospiti, metà del terreno di coltura è stato rimosso dai singoli pozzetti di cellule e successivamente è stata aggiunta la quantità di virus richiesta. Dopo l'inoculazione del virus, le cellule sono state incubate a 37°C, con il 5% di CO₂ per 90 minuti al fine di consentire la penetrazione del virus. Al termine dell'incubazione, vista l'impossibilità di aspirare completamente il mezzo virale per evitare di esporre i neuroni all'aria, in ogni pozzetto è stato tolto e successivamente aggiunto metà volume di terreno ND2 per sei volte consecutive, al fine di lavare le cellule (circa 2 lavaggi per pozzetto) e rimuovere le particelle virali residue. Successivamente, sono stati raccolti 500 µL di surnatante da ogni pozzetto, impiegati come tempo zero (T0) nell'analisi della cinetica virale effettuata mediante saggio TCID₅₀, e RT-qPCR. È stato quindi aggiunto nuovamente il terreno rimosso e le cellule sono state incubate a 37°C, con il 5% di CO₂. I surnatanti delle cellule infettate, così come i lisati cellulari, sono stati poi raccolti nuovamente a 24 e 48h post-infezione. Ad entrambi i time-point è stato raccolto anche il pellet cellulare per le analisi dell'espressione dei geni della risposta immunitaria innata con RT-PCR e per lo studio di trascrittomico in RNA-Seq. Le infezioni condotte nelle multiwell-24 sono state invece utilizzate per eseguire il test di immunofluorescenza indiretta (IIF) a 48hpi.

4.5 Immunofluorescenza indiretta (IIF)

Al fine di eseguire il test di immunofluorescenza e visualizzare le cellule infettate al microscopio ottico confocale Nikon Eclipse Ti (Nikon, Tokyo, Giappone), le cellule neuronali sono state seminate su vetrini copri-oggetto posti all'interno di piastre 24-well su cui è stato posteriormente seminato e lasciato polimerizzare il Geltrex. Le cellule infettate con USUV, WNV1 e WNV2 a MOI 0.1 48hpi sono state lavate tre volte con PBS 1X e fissate in paraformaldeide al 4% (PFA, Merck Millipore) in PBS per 15 minuti a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi con PBS/0,05% Tween 20 (Merk, Millipore), le cellule sono state incubate con PBS/0,1% Triton X-100 (Merk Millipore) per 15 minuti a temperatura ambiente per consentire la permeabilizzazione della membrana cellulare. Successivamente, sono stati eseguiti tre lavaggi con PBS/0,05% Tween 20 e quindi le cellule sono state bloccate con albumina di siero bovino al 4% (BSA, Merk Millipore) in PBS a 4 °C overnight. Il giorno seguente, dopo un lavaggio in PBS, è stato aggiunto l'anticorpo primario diluito in BSA/PBS al 4% e le cellule sono state incubate insieme all'anticorpo overnight a 4 °C. Per l'identificazione dei flavivirus nelle cellule infettate è stato utilizzato un anticorpo primario monoclonale pan-flavivirus specifico per un epitopo della proteina E dell'envelope (clone 4G2, mouse, Merck Millipore) alla diluizione di 1: 500, mentre per l'individuazione della β -Tubulina III come marcatore neuronale, è stato utilizzato un anticorpo monoclonale di coniglio anti-TUJ1 (Clone Poly18020, Sino Biological Inc., Pechino, Cina), alla diluizione 1:5000. Dopo l'incubazione notturna a 4°C, le cellule sono state lavate tre volte con PBS/0,05% Tween 20 e l'anticorpo secondario, diluito in PBS, è stato aggiunto e incubato a 37°C per un'ora (protetto dalla luce). Gli anticorpi secondari utilizzati sono l'IgG [H+L] anti-mouse Alexa Fluor-488 Plus (Invitrogen) di capra alla diluizione 1:1000 e l'IgG [H+L] anti-rabbit Alexa Fluor-546 (Thermo Fisher Scientific) di capra alla diluizione 1:500. I pozzetti sono stati quindi lavati tre volte con PBS/0,05% Tween 20 e i nuclei cellulari sono stati colorati con l'intercalante DRAQ5™ Fluorescent probe (Thermo Scientific) previa incubazione per 10 minuti a temperatura ambiente seguita da due lavaggi finali con PBS. Infine, i vetrini copri-oggetto con le cellule trattate sono stati montati su vetrini porta-oggetti per microscopia utilizzando il reagente Fluor Save (Merk, Millipore), analizzati al microscopio confocale e acquisiti utilizzando il software Nis-Element. Le immagini sono state poi elaborate con il software Fiji-ImageJ.

4.6 Analisi della replicazione virale

4.6.1 Estrazione dell'RNA e RT-qPCR per l'analisi della cinetica virale

I surnatanti dei neuroni infettati con USUV e WNV (lignaggio 1 e 2) sono stati raccolti a 24 e 48h post-infezione (hpi). L'RNA virale è stato amplificato mediante One-Step RT-qPCR utilizzando QuantStudio™ 3 Real-Time PCR (Thermo Fisher Scientific) e un set di primer e sonde TaqMan specifiche per USUV⁴⁶, WNV lignaggio 1⁴⁷ e WNV lignaggio 2⁴⁸.

4.6.1.1 Estrazione RNA dai surnatanti delle cellule infettate

L'RNA virale è stato estratto dai surnatanti mediante kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen) seguendo il protocollo del produttore. In breve, all'interno del laboratorio BSL-3, 140 µL di surnatante sono stati aggiunti ad un tampone di lisi contenente guanidina tiocianato, a cui viene aggiunto un RNA Carrier fornito dal kit, in grado di ridurre la degradazione dell'RNA virale e aumentare al contempo la purificazione dell'RNA, in condizioni altamente denaturanti per inattivare le ribonucleasi. Successivamente, all'esterno della BLS-3, è stato aggiunto etanolo 96-100% e i lisati sono stati caricati sulle colonnine di estrazione fornite dal kit: l'RNA si lega specificatamente alla membrana in silice, separandosi dai contaminanti che, diversamente, scorrono attraverso questa. Gli inibitori della reazione di PCR, come i cationi bivalenti e le proteine, sono stati completamente rimossi tramite due fasi di lavaggio con appositi buffer forniti dal kit. Infine, l'RNA puro è stato eluito in 60 µL di Buffer AVE.

4.6.1.2 One-step RT-qPCR

L'RNA estratto è stato retrotrascritto ed amplificato mediante tecnica One-Step Real-time PCR quantitativa (RT-qPCR) in cui le fasi di trascrizione inversa e di amplificazione sono entrambe condotte nello stesso pozzetto di reazione. La miscela di reazione è stata preparata in un volume finale di 25µL, come riassunto nella seguente tabella (tabella 4.3):

Reagenti	Volume (µL)
Buffer 2x	12,50
Rnase-free water	3,50
25X RT Enzyme (Thermo Fisher)	1,00
TaqMan probes and primers mix	3,00
Campione di RNA	5,00
Totale	25,00

Tabella 4.3 Mix di reazione per la One-step RT-qPCR

I profili di incubazione della reazione di RT e PCR sono descritti in tabella 4.4

Cycle step		Temperatura	Tempo	Cicli
Hold Stage	Step 1	50°C	30 min	1
	Step 2	95°C	10 min	1
PCR stage	Step 1	95°C	15 sec	40
	Step 2	60°C	1 min	

Tabella 4.4 Temperatura di reazione della qPCR Real time e profilo di incubazione

4.6.2 Titolazione virale: saggio TCID₅₀

Al fine di quantificare le particelle virali infettive prodotte e liberate nel surnatante delle cellule infettate con USUV, WNV1 e WNV2, 24h e 48h post-infezione, è stato utilizzato il saggio TCID₅₀ (50% Tissue Culture Infective Dose), che permette di stimare la quantità di virus presente nel campione in grado di provocare un effetto citopatico nel 50% delle cellule infettate. Per far questo, 20.000 cellule Vero E6 sono state seminate in singoli pozzetti di piastre multiwell-96 in un volume finale di 100 µL di DMEM (10% FBS, 1% di P/S). Il giorno successivo le cellule sono state lavate due volte con DMEM (1% P/S) per rimuovere eventuali tracce di siero che potrebbero influenzare la resa del saggio, in quanto l'FBS inibisce la replicazione virale. I surnatanti dei neuroni infettati con USUV, WNV1 e WNV2 a MOI 0,1 e il surnatante dei controlli negativi (Mock), raccolti a 24 hpi e 48 hpi, sono stati diluiti serialmente in rapporto 1:10 in terreno DMEM (1% P/S) privo di siero. Le cellule Vero E6 sono state quindi infettate con le singole diluizioni (da 10⁻¹ a 10⁻¹²) in un volume di 100 µL per pozzetto. Per ogni diluizione virale, sono stati infettati 5 pozzetti come repliche tecniche (figura 3.2). Dopo un'incubazione di 90 minuti a 37 °C e 5% di CO₂, è stato aggiunto in ciascun pozzetto un volume (100 µL) di DMEM 6% FBS e 1% P/S, per bloccare l'infezione e mantenere le cellule in coltura. I giorni successivi è stato osservato al microscopio ottico l'effetto citopatico (CPE) di ciascuna diluizione di virus, nei singoli pozzetti e, dopo circa 4/5 giorni post-infezione, il terreno di coltura è stato rimosso, i pozzetti sono stati lavati con DPBS e la soluzione di fissazione/colorazione con cristalvioletto (Merck Millipore Burlington, Massachusetts, Stati Uniti) è stata aggiunta a ciascun pozzetto e incubato a temperatura ambiente per 30 minuti. La piastra è stata poi lavata due volte con acqua per immersione in un grande becher, quindi essiccata all'aria a temperatura ambiente. Il TCID₅₀ è stato valutato in base alla presenza o assenza del colore viola intenso (presenza/assenza di CPE) in ciascun pozzetto. Il titolo virale è stato calcolato poi secondo la formula Spearman-Kärber:

$$T = 10^{1+d(S-0,5)+1} \text{ TCID}_{50}/\text{mL}$$

Dove *d* rappresenta Log₁₀ della diluizione e *S* è la somma dei pozzetti che presentano CPE per ogni fattore di diluizione specifico.

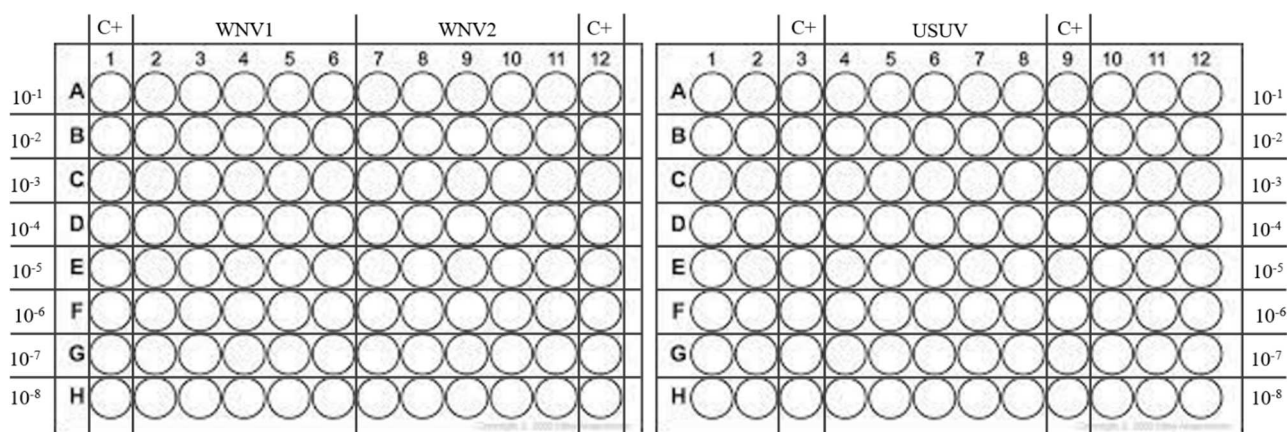


Figura 4.2 Esempio di uno schema di infezione di due piastre multiwell-96 di Vero E6 utilizzate per il saggio TCID₅₀ (le diluizioni possono variare a seconda del titolo atteso).

4.7 Analisi dell'espressione genica della risposta immunitaria innata

Le variazioni nell'espressione di alcuni geni coinvolti nella risposta immunitaria e infiammatoria indotta dall'infezione virale sono state valutate mediante l'analisi dell'mRNA estratto dai neuroni infettati con USUV, WNV1 e WNV2 raccolti a 24 e 48 hpi. 500 ng dell'RNA estratto sono stati retrotrascritti in cDNA e successivamente amplificati tramite Real-Time PCR (QuantStudio™ 3 Real-Time PCR), utilizzando il sistema HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix 5x (Solis BioDyne, Tartu, Estonia) associato a primer specifici per le diverse citochine analizzate (tabella 4.9).

4.7.1 Estrazione dell'RNA dai pellet delle cellule infettate

L'RNA cellulare è stato estratto utilizzando l'RNeasy® Mini Kit (Qiagen). All'interno della struttura BSL-3, i neuroni infettati sono stati lisati con una soluzione composta da Buffer RLT (contenente guanidina tiocianato) e β-Mercaptoetanololo (β -ME, 10ul/mL) e poi omogeneizzati. Una volta esportati dalla BLS-3, i lisati sono stati trattati con etanolo al 70%, per fornire condizioni di legame ideali. Il lisato è stato quindi caricato sulle colonnine con membrana in silice fornite dal kit, e tutti i contaminanti sono stati eliminati in modo efficiente. Per eliminare il DNA residuo, ciascun campione è stato incubato per 10 minuti a temperatura ambiente con una soluzione composta da Buffer RDD (70 µL) e DNase I stock solution (10 µL). L'RNA è stato poi eluito in 30 µL di acqua DEPC e quantificato allo spettrofotometro NanoDrop™ One (Thermo Fischer Scientific).

4.7.2 Reazione di retrotrascrizione

Al fine di analizzare l'espressione genica della risposta immunitaria innata in PCR Real-Time, l'RNA è stato retrotrascritto in cDNA. 500 ng di RNA di ciascun campione sono stati retrotrascritti utilizzando la trascrittasi inversa MuLV, una DNA polimerasi (RNA-dipendente) ricombinante, combinata con i reagenti mostrati in tabella 4.5 in un volume finale di 60 µL. Tutti i reagenti utilizzati per la retrotrascrizione sono forniti da Applied Biosystem (Thermo Fisher Scientific).

Reagenti	Volume (µL)
Buffer 10x (senza MgCl ₂)	6
MgCl ₂	11
dNTPs	1
Random esameri	2
RNase inhibitor	1
Trascrittasi inversa Mulv	1,25
DEPC	37,75

Tabella 4.5 Mix di reazione di trascrizione inversa

La miscela di reazione è stata quindi poi incubata secondo la tabella 4.6.

Step	Temperatura	Tempo
Step 1	25°C	10 min
Step 2	48°C	60 min
Step 3	95°C	5 sec
Step 4	4°C	∞

Tabella 4.6 Profilo di incubazione per la retrotrascrizione

4.7.3 PCR Real-Time

L'RNA estratto e retrotrascritto è stato amplificato mediante Real-time PCR quantitativa con il sistema HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix 5x. La miscela di reazione è stata preparata in un volume finale di 20 µL, come riassunto nella seguente tabella (tabella 4.7):

Reagenti	Volume (µL)
HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix 5x	4
Forward primer (10µM)	0,4
Reverse primer (10µM)	0,4
DNA template	5

Tabella 4.7 Mix di reazione della PCR Real-Time con HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix 5x

Con l'aggiunta di acqua è stato raggiunto un volume finale di 20 μ L. La miscela di reazione è stata sottoposta a dei cicli di amplificazione come riportato dalla seguente tabella (tabella 4.8):

Cycle step	Temperatura	Tempo	Cicli
Attivazione della polimerasi	95°C	12 min	1
Denaturazione	95°C	15 sec	40
Annealing	60°C	30 sec	
Estensione	72°C	30 sec	

Tabella 4.8 Temperatura di reazione della qPCR Real time e profilo di incubazione

I primer utilizzati sono tutti exon-exon-spanning, ovvero disegnati a cavallo tra 2 esoni (la prima parte del primer alla fine di un esone e l'ultima parte all'inizio dell'esone successivo) o all'interno di due esoni intervallati da una sequenza intronica molto lunga (tabella 4.9). L'analisi si è focalizzata sull'espressione di alcuni geni chiave della risposta innata antivirale: RIG-I, TLR-3, IRF-7, VIPERIN e MX-1.

Gene	Primer Forward	Primer Reverse	Lunghezza (bp)
GAPDH ⁴⁹	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	322
RIG-I ⁵⁰	ACCAGAGCACTTGTGGACGCT	TGCCGGGAGGGTCATTCCTGT	126
TLR-3 ⁵¹	GAAAGGCTAGCAGTCATCCA	CATCGGGTACCTGAGTCAAC	170
IRF-7 ⁵²	TACCATCTACCTGGGCTTCG	AGGGTTCCAGCTTCACCA	83
VIPERIN ⁵³	CTTTGTGCTGCCCCTTGAG	TCCATACCAGCTTCCTTAAGCAA	63
MX-1 ⁵⁴	GGCTGTTTACCAGACTCCGACA	CACAAAGCCTGGCAGCTCTCTA	143

Tabella 4.9 Sequenze dei primer impiegati per l'analisi della risposta immunitaria innata.

4.8 Analisi statistica

L'analisi statistica è stata condotta utilizzando il *test non parametrico Mann-Whitney* e la significatività statistica è stata definita come $\alpha < 0,05$.

5. Risultati

5.1 Differenziamento della linea cellulare H9 in Neuroni

Al fine di studiare il neurotropismo e la neuro-patogenicità di alcuni flavivirus come WNV e USUV, è stato creato un modello *in vitro* derivato da cellule staminali embrionali (ESC) della linea cellulare H9 (H9 AAVS1-TRE3G-NGN2). L'impiego delle cellule staminali embrionali offre la possibilità di allestire colture cellulari *in vitro*, che possono essere poi differenziate in molteplici tipologie cellulari. Questi modelli permettono quindi di studiare i virus che possono infettare specifici tipi cellulari umani, a volte inaccessibili, come le cellule neuronali. Grazie al protocollo di differenziamento descritto in precedenza (capitolo 4.2), in 14 giorni è stato possibile ottenere i neuroni corticali (figura 5.2, day 14) a partire da cellule staminali embrionali (figura 5.1). In figura 5.2 sono riportate le immagini delle cellule in differenziamento acquisite in campo chiaro utilizzando una fotocamera di un microscopio digitale Leica DFC7000.

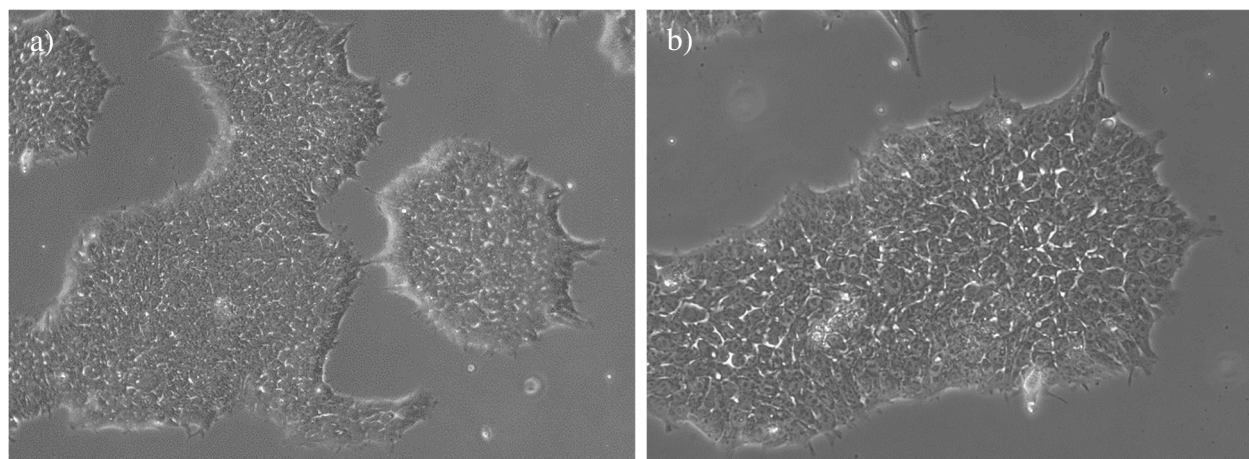


Figura 5.1 Cellule H9 AAVS1-TRE3G-NGN2 in coltura a) ingrandimento 10x; b) ingrandimento 20x. Cellule H9 dissociate in Accutase[®], seminate su un substrato di Geltrex e mantenute in terreno privo di siero composto da mTeSR1[™] Basal Medium arricchito con mTeSR[™]1 5X Supplement e 1% v/v di P/S a 37 °C con il 5% di CO₂.

Grazie alla doxiciclina, presente nei terreni di coltura, viene stimolato il gene della *Ngn2*, provocando l'inizio del differenziamento e, con esso, l'origine delle modificazioni morfologiche. Già a partire dal primo giorno possiamo infatti osservare un allungamento del soma cellulare (figura 5.2, day 1), con formazione dei primi neuriti (assoni e dendriti) il secondo giorno (figura 5.2, day 2). La replicazione cellulare continua fino circa il settimo giorno, nel quale le cellule vengono staccate in Accutase[®] e subcoltivate in nuove piastre 6-well rivestite di Geltrex. Dall'ottavo giorno (figura 5.2, day 8) in poi, grazie all'allungamento di assoni e dendriti, questi si uniscono tra di loro, formando una fitta rete. Dal giorno 14 in poi, le cellule possono essere definite come neuroni differenziati.

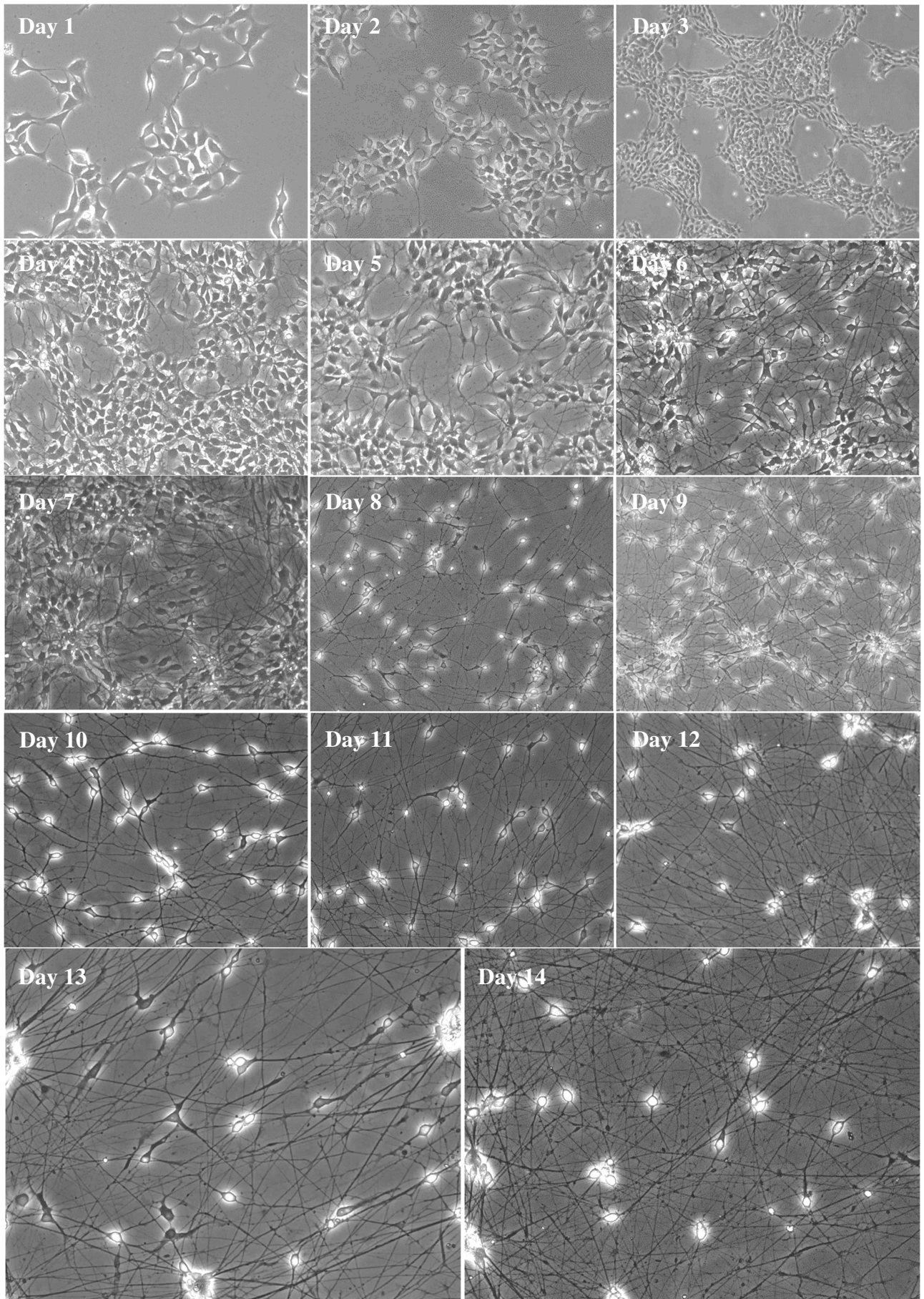


Figura 5.2 Processo di differenziamento da cellule staminali H9 AAVS1-TRE3G-NGN2 (day 1) a neuroni (day 14), ingrandimento 20x.

5.2 Identificazione della proteina virale E nelle cellule neuronali infettate mediante immunofluorescenza indiretta

Per stimare la percentuale di cellule infettate e localizzare il virus all'interno delle cellule, è stata eseguita un'immunofluorescenza indiretta della proteina E dell'envelope virale e della β -tubulina III, un marcatore microtubulare che si esprime quasi esclusivamente nei neuroni. Le cellule staminali embrionali sono state fatte differenziare sulla superficie di vetrini circolari per microscopia, su cui è stato seminato precedentemente il Geltrex, posti all'interno di pozzetti multiwell-24. I neuroni sono stati infettati parallelamente con WNV lignaggio 1 (WNV1), WNV lignaggio 2 (WNV2) e USUV alla MOI 0.1. 48h post-infezione, le cellule sono state fissate, marcate con gli anticorpi e, successivamente, i singoli vetrini sono stati montati su vetrini porta-oggetto e le immagini sono state acquisite al microscopio confocale.

In particolare, sono stati utilizzati un anticorpo pan-flavivirus specifico per un epitopo della proteina E dell'envelope espresso sia in USUV che in entrambi i lignaggi utilizzati di WNV e un anticorpo primario monoclonale specifico per la proteina TUJ1 (β -tubulina III).

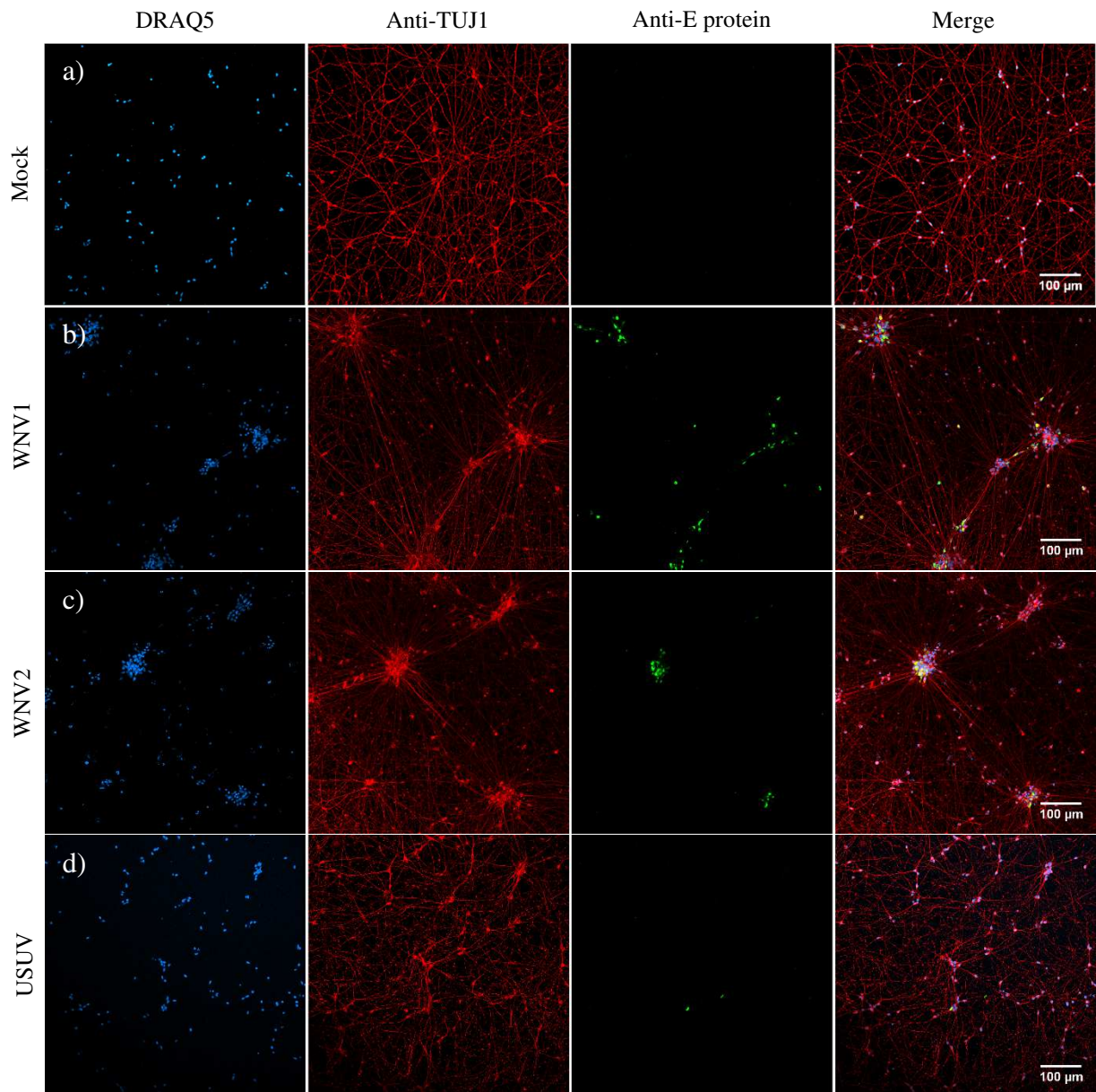


Figura 5.3 Immunofluorescenza indiretta di neuroni infettati con WNV1, WNV2 e USUV alla MOI 0.1, 48hpi, ingrandimento 20x. a) Mock; b) WNV lignaggio 1; c) WNV lignaggio 2; d) USUV. La presenza effettiva di cellule neuronali è assicurata dalla positività in tutti i pozzetti all'anticorpo anti-TUJ1 (rosso), mentre la presenza del virus è stata rilevata mediante gli anticorpi Anti-E protein (verde). I nuclei sono stati colorati con DRAQ5 (ciano).

Le immagini acquisite al microscopio confocale mostrano che, mediamente, a 48h dall'infezione, la percentuale di cellule infettate varia tra le diverse specie virali: i neuroni positivi a WNV lignaggio 1 come quelli infettati con WNV2, ammontano a circa il 10-13%, mentre la percentuale di cellule positive all' USUV è circa del 2%. Questi risultati riflettono i dati relativi alle cinetiche virali ottenute in Real-time PCR e mediante saggio TCID50 sui surnatanti cellulari.

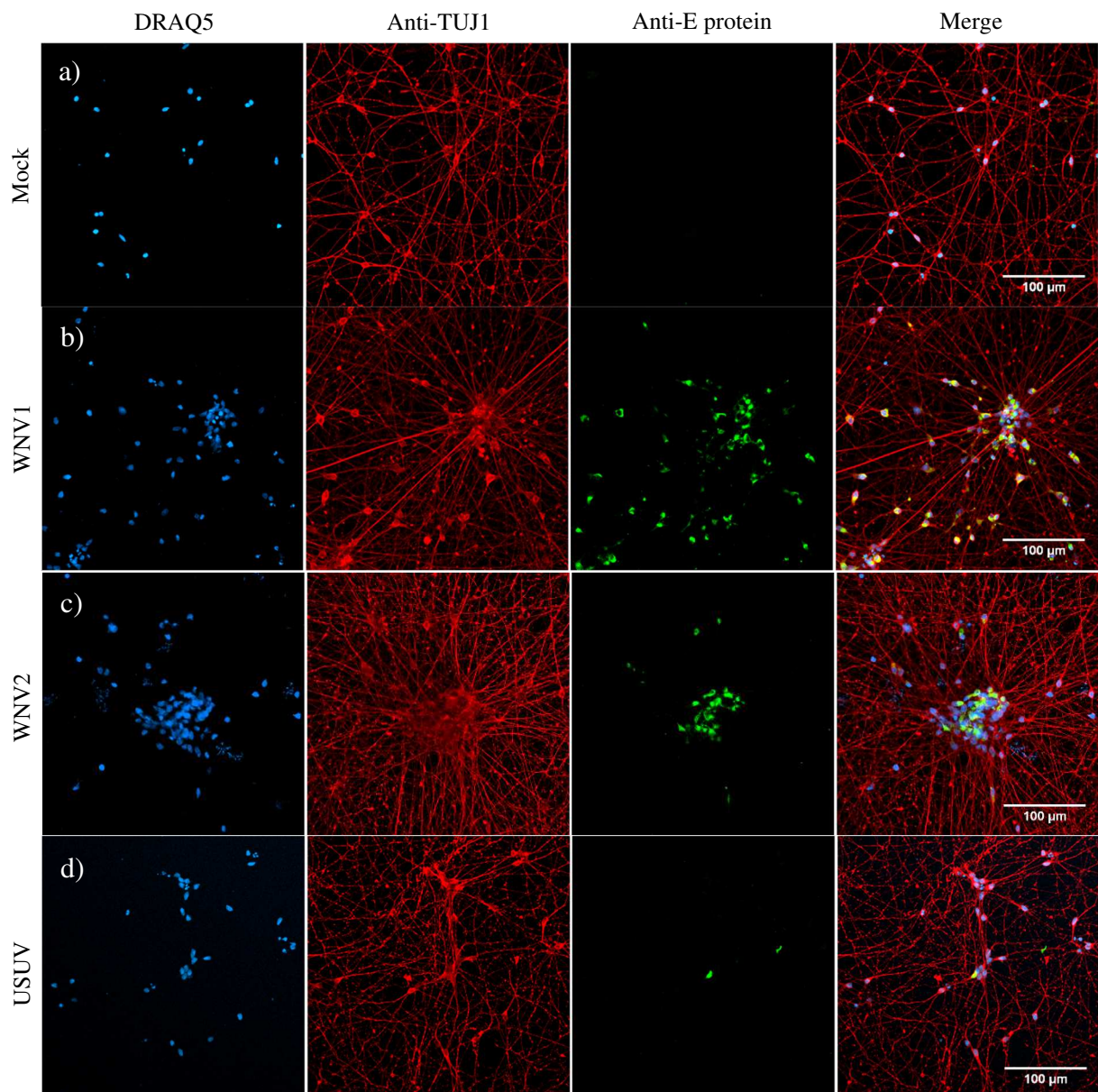


Figura 5.4 Immunofluorescenza indiretta di neuroni infettati con WNV1, WNV2 e USUV alla MOI 0.1, 48hpi, zoom di ingrandimenti 20x a) Mock; b) WNV lignaggio 1; c) WNV lignaggio 2; d) USUV.

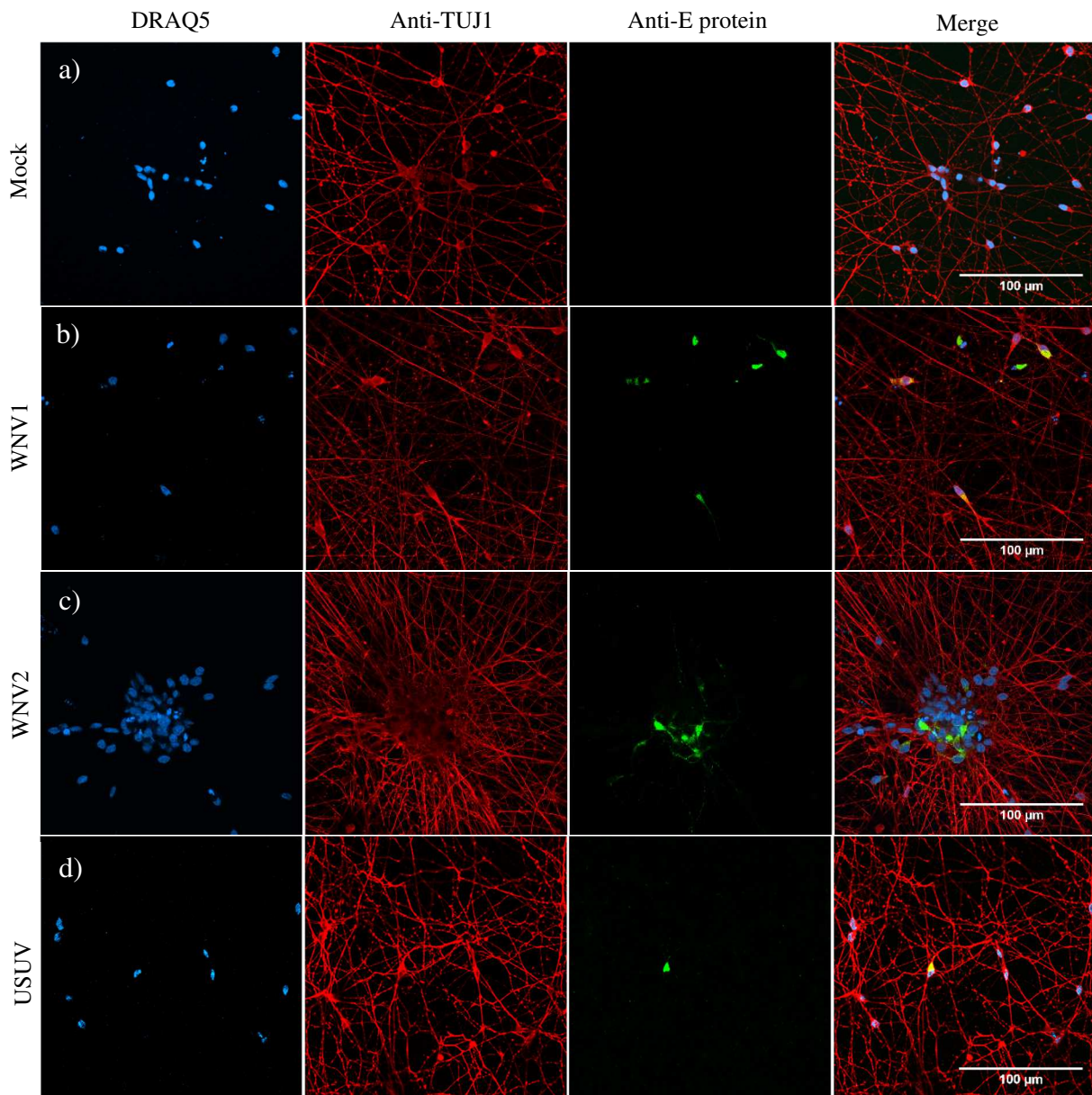


Figura 5.5 Immunofluorescenza indiretta di neuroni infettati con WNV1, WNV2 e USUV alla MOI 0.1, 48hpi, ingrandimento 60x a) Mock; b) WNV lignaggio 1; c) WNV lignaggio 2; d) USUV.

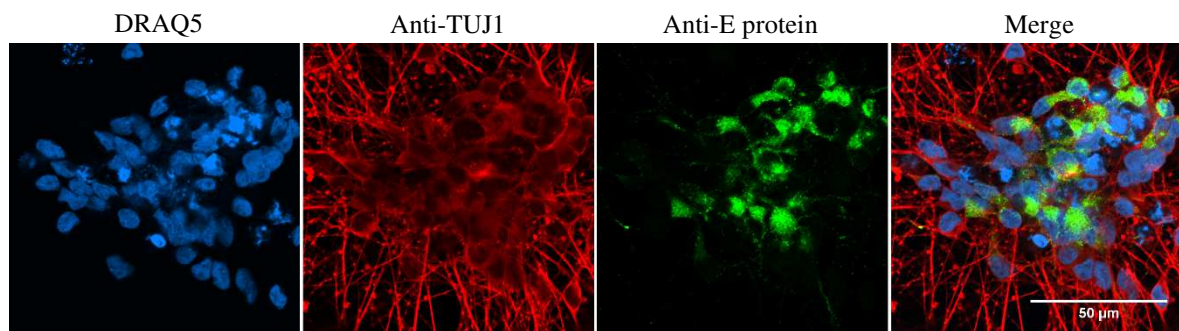


Figura 5.6 Immunofluorescenza indiretta di neuroni infettati con WNV1, WNV2 e USUV alla MOI 0.1, 48hpi, zoom di un ingrandimento 60x.

5.3 Cinetica di replicazione di WNV1, WNV2 e USUV nei neuroni

La cinetica di replicazione virale di USUV, WNV1 e WNV2 nei neuroni è stata analizzata in quattro esperimenti di infezione effettuati alla MOI 0,1 fino alle 48h post-infezione. La concentrazione di RNA virale nei surnatanti dei neuroni infettati, raccolti dopo 1,5h di inoculazione virale (T0), dopo 24h e dopo 48h post-infezione, è stata misurata mediante qRT-PCR e il risultato è stato poi confermato con il saggio TCID₅₀ di titolazione delle particelle virali infettive.

5.3.1 Cinetica virale di WNV1, WNV2 e USUV nel surnatante cellulare

La cinetica di replicazione dei singoli virus è stata valutata nei surnatanti dei neuroni infettati mediante qRT-PCR, in cui si stima la variazione della quantità di RNA virale nelle 48h, e con il saggio TCID₅₀ in cellule Vero E6 con cui il titolo delle particelle infettive di ciascun virus è stato espresso come $\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{mL})$.

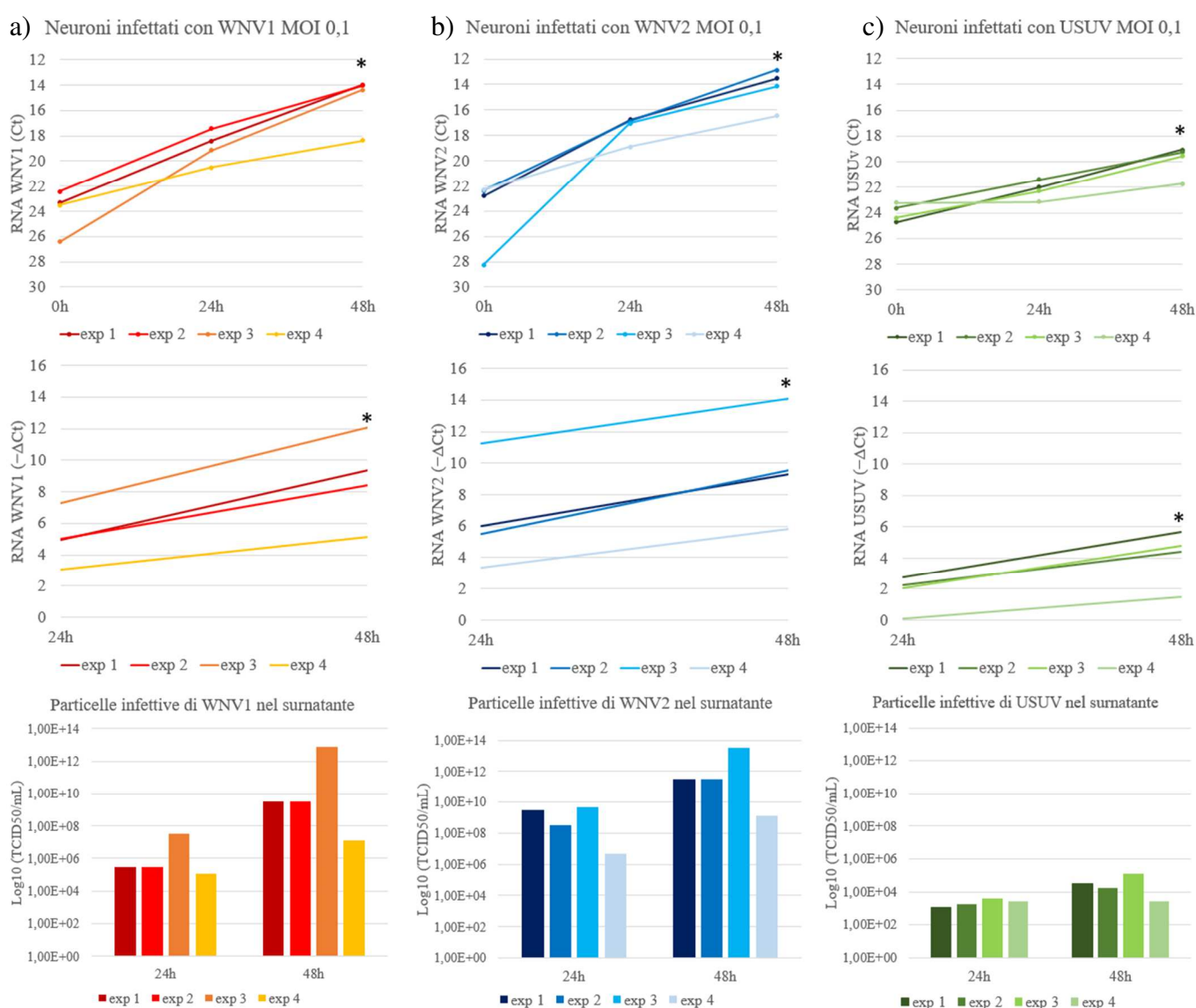


Figura 5.7 Cinetica di replicazione di WNV1, WNV2 e USUV in neuroni infettati a MOI 0.1. I neuroni derivati dalle cellule H9 sono stati infettati con WNV1 (A), WNV2 (B) e USUV (C) a MOI 0.1 in quattro esperimenti differenti. La concentrazione di RNA virale è stata misurata mediante qRT-PCR e riportato sia come valore del ciclo di soglia Ct (pannello superiore), sia come $-\Delta Ct$ (pannello intermedio). Il titolo infettivo invece è stato titolato su cellule Vero E6 mediante saggio TCID₅₀, ed espresso come Log_{10} della dose infettiva del 50% della coltura tissutale (pannello inferiore). *:p-value < 0,05.

I risultati dei quattro esperimenti mostrano in maniera congruente come i due ceppi di WNV si replichino velocemente raggiungendo titoli molto alti mentre USUV si replica più lentamente, sebbene già a 24h raggiunga un titolo discreto (circa 10^3 TCID₅₀/mL). I dati, quindi, concordano con quanto ottenuto dalle immagini acquisite in immunofluorescenza. Si può osservare, inoltre, come i ΔCt dalle 24 alle 48 hpi, relativi all'RNA di tutti e tre i virus, risultino significativamente diversi; pertanto, vi è un'effettiva crescita dei virus a livello neuronale.

5.3.2 Confronto delle cinetiche di replicazione virale tra i due lignaggi di WNV

La differenza di replicazione intra-virale tra i due lignaggi di WNV nel modello neuronale è stata analizzata successivamente nel dettaglio:

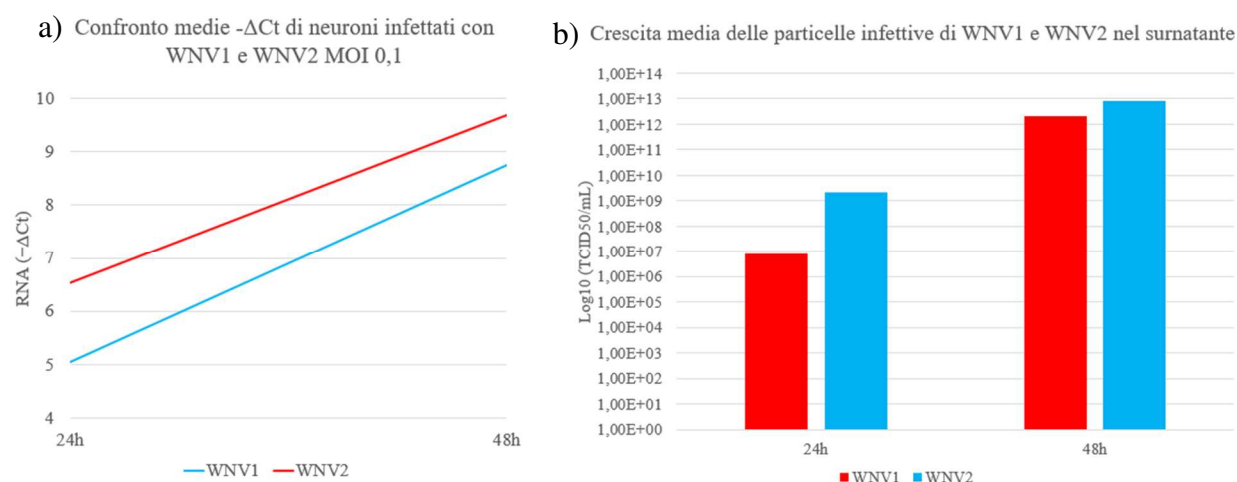


Figura 5.8 Confronto tra la cinetica di replicazione virale di WNV1 e quella di WNV2 nei neuroni.

a) Confronto tra $-\Delta Ct$ medio dell'RNA virale rilevato nei surnatanti dei neuroni infettati con WNV1 e con WNV2; b) Confronto tra le particelle infettive medie, raccolte nel surnatante dei neuroni infettati con WNV1 e con WNV2. *:p-value < 0,05.

Il confronto tra i due ceppi è stato eseguito sulle medie dei ΔCt e non sui Ct assoluti (le sonde per la rilevazione in qRT-PCR dei due virus erano caratterizzate da una sensibilità e una specificità differente) e sui titoli in TCID₅₀ medi. Dai grafici si può osservare una crescita maggiore, nel tempo, del WNV2 rispetto al lignaggio 1 sia in RT-PCR che in saggio TCID₅₀.

5.3.2.1 Analisi statistica del confronto delle cinetiche virali tra i due ceppi di WNV

Per valutare se la differenza della crescita tra i due lignaggi di WNV fosse realmente significativa, sono stati svolti dei test statistici. In primo luogo, è stato svolto un *test di Shapiro-Wilk* per valutare la normalità dei dati. I risultati ottenuti in Ct e in TCID₅₀ per entrambi i virus nei diversi time-point risultano avere una distribuzione normale, tuttavia, vista la scarsità di dati, è stato svolto il *test non parametrico di Mann-Whitney* (alternativa non parametrica al t-test). Nella tabella 5.1 possiamo osservare i diversi p-value ottenuti:

	Cinetiche virale surnatanti (Ct)			Particelle infettive (TCID ₅₀ /mL)		
	24h	48h	Δ (48h-24h)	24h	48h	Δ (48h-24h)
WNV1 vs WNV2	0.4857	0.6857	0.4857	0.05907	0.4651	0.4678

Tabella 5.1 p-value WNV lignaggio 1 vs WNV lignaggio 2. Sono riportati nella tabella tutti i p-value ricavati dal test di Mann-Whitney relativi al confronto WNV1 vs WNV2 alle 24 ore e alle 48 ore, dei risultati ottenuti con RT-qPCR, e mediante saggio TCID₅₀. È stato inoltre calcolato il p-value della differenza tra le 48 e le 24 ore, ovvero della crescita tra questi due time-point. È stato considerato un livello di significatività con $p < 0,05$.

Osservando i valori del p-value si può dedurre che la differenza nella cinetica di replicazione di WNV1 vs WNV2 non sia significativa.

5.3.3 Confronto delle cinetiche di replicazione virale tra i due lignaggi di WNV e USUV

È stato successivamente effettuato il confronto tra le cinetiche di replicazione dei due lignaggi di WNV vs USUV.

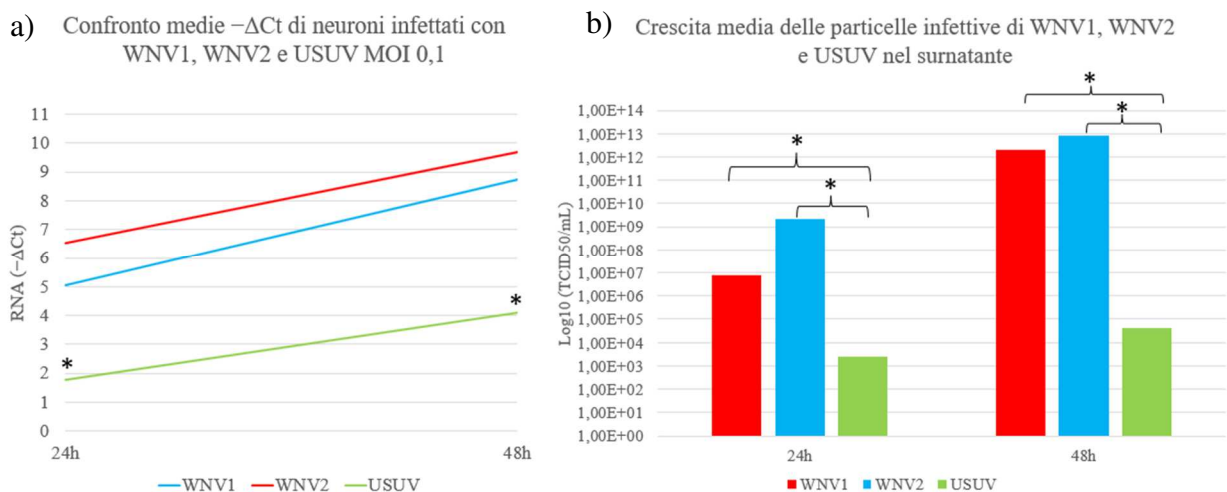


Figura 5.9 Confronto della cinetica di replicazione di WNV e USUV. a) confronto $-\Delta Ct$ tra RNA virale nei surnatanti di neuroni infettati da WNV1 e WNV2; b) Confronto tra particelle infettive di neuroni infettati da WNV1 e WNV2. L'asterisco indica la significatività (p -value $< 0,05$).

5.3.3.1 Analisi statistica del confronto delle cinetiche virali tra i due lignaggi di WNV e USUV

Per valutare se la differenza della crescita tra i due lignaggi di WNV e USUV fosse realmente significativa, sono stati svolti dei test statistici. I risultati ottenuti in Ct e in TCID₅₀ per entrambi i virus nei diversi time-point risultavano avere una distribuzione normale, tuttavia, vista la scarsità di dati, è stato svolto il *test non parametrico di Mann-Whitney*. Nella tabella 5.2 possiamo l'esito dei test effettuati:

	Cinetiche virale surnatanti (Ct)			Particelle infettive (TCID ₅₀ /mL)		
	24h	48h	Δ (48h-24h)	24h	48h	Δ (48h-24h)
WNV1 vs USUV	0.02857	0.03326	0.1465	0.0294	0.0294	0.0294
WNV2 vs USUV	0.02857	0.02857	0.2000	0.02857	0.0294	0.02857

Tabella 5.2 p-value WNV lignaggio 1 vs USUV e WNV2 vs USUV. Sono stati riportati nella tabella tutti i p-value ricavati dal test di Mann-Whitney di WNV1 vs USUV e WNV2 vs USUV alle 24 e alle 48 ore, delle cinetiche virali ricavate con RT-qPCR, e delle particelle infettive ricavate mediante saggio TCID₅₀. È stato inoltre calcolato il p-value della differenza tra le 48 e le 24 ore, ovvero della crescita tra questi due time-point. È stato considerato un livello di significatività < 0,05.

Dai p-value ottenuti si può osservare come la differenza, sia nella crescita osservata in RT-qPCR, che nel numero di particelle infettive ottenute mediante saggio TCID₅₀ tra i due lignaggi di WNV e USUV, sia significativa. La differenza tra i due ceppi di WNV e l'USUV in termini di ΔCt (48h-24h) non è risultata significativa in quanto il p-value > 0.05; mentre il test svolto sul Δ(48h – 24h) delle particelle infettive calcolate in TCID₅₀ risulta significativo.

In seguito (figura 5.10), sono riportati due istogrammi che rappresentano il confronto della crescita di ciascun virus dalle 24h alle 48h espressa in ΔCt (figura 5.10 a) e ΔTCID₅₀ (figura 5.10 b), ottenuti mediante RT-qPCR e TCID₅₀, rispettivamente.

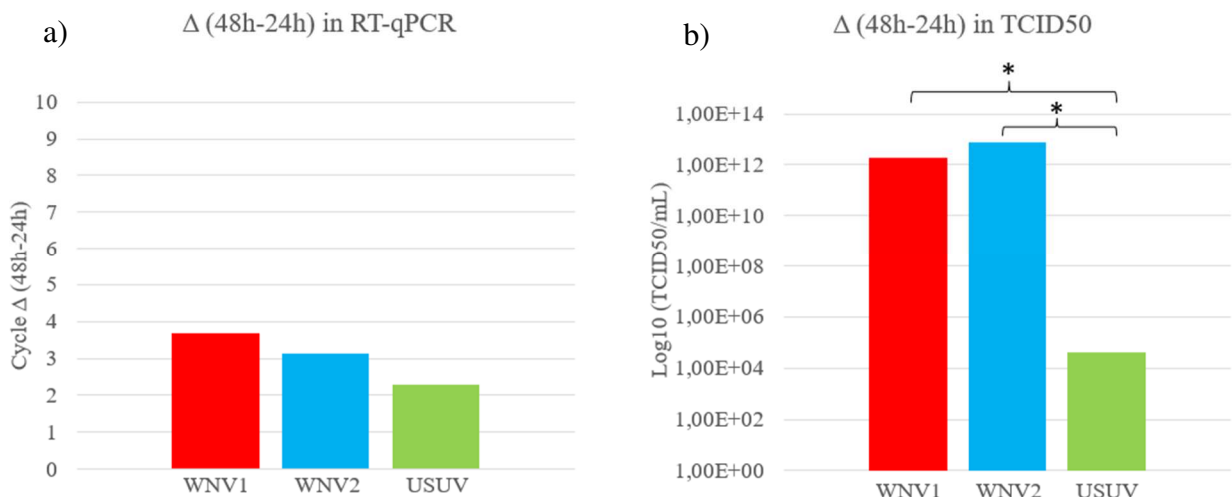


Figura 5.10 Confronto della crescita virale dalle 24h alle 48h post-infezione (Δ (48h-24h)) nel surnatante dei neuroni infettati. a) confronto in -ΔCt (48h-24h) dell'RNA virale nei surnatanti di neuroni infettati con WNV1, WNV2 e USUV; b) Confronto in ΔTCID₅₀ (48h-24h) delle particelle infettive presenti nel surnatante dei neuroni infettati con WNV1, WNV2 e USUV. L'asterisco indica la significatività (p-value < 0,05).

5.4 Effetti dell'infezione dei flavivirus sull'espressione dei geni della risposta innata antivirale

Il riconoscimento del virus da parte dell'ospite e lo sviluppo di un'efficace risposta immunitaria innata rappresentano le prime linee di sopravvivenza e di difesa contro l'infezione virale. A fronte di questo, è stata analizzata la modulazione dell'espressione genica nelle 24 e le 48 h dall'infezione di diversi geni coinvolti nell'immunità innata, nei neuroni infettati con USUV, WNV1 e WNV2 a MOI 0.1. L'RNA totale è stato estratto dai neuroni dopo 24h e dopo 48h post-infezione e retrotrascritto in cDNA. Mediante qRT-PCR sono stati analizzati il livello di mRNA di diversi geni della risposta immunitaria, inclusi: RIG-I, TLR3, IRF-7, VIPERIN e MX-1. I risultati sono stati normalizzati al GAPDH umano e analizzati utilizzando il metodo $\Delta\Delta Ct$.

Sample		GAPDH	RIG-1/DDX58				TLR-3			IRF-7		
				inf/mock	48h/24h		inf/mock	48h/24h		inf/mock	48h/24h	
		<i>Ct</i>	<i>Ct</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	<i>Ct</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	<i>Ct</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
24h	Mock	20,18	30,47			41,00			31,08			
	USUV	17,73	28,56	0,69		41,00	0,18		28,85	0,86		
	WNV1	17,83	28,31	0,87		38,64	1,00		28,44	1,22		
	WNV2	16,76	27,63	0,67		37,34	1,18		27,75	0,94		
48h	Mock	21,22	32,04			38,35			32,27			
	USUV	23,47	33,73	1,48	1,48	41,00	0,76	1,00	33,90	1,55	1,61	
	WNV1	17,78	28,63	0,98	0,77	37,72	0,14	1,90	28,63	1,15	0,85	
	WNV2	20,56	31,49	0,93	0,96	37,00	1,63	1,27	31,11	1,42	1,35	

Sample		GAPDH	Viperin/RSAD2				MX-1		
				inf/mock	48h/24h		inf/mock	48h/24h	
		<i>Ct</i>	<i>Ct</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	<i>Ct</i>	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	
24h	Mock	20,18	36,91			34,75			
	USUV	17,73	34,31	1,12		33,80	0,35		
	WNV1	17,83	32,91	3,13		34,30	0,27		
	WNV2	16,76	32,00	2,82		32,44	0,46		
48h	Mock	21,22	35,21			34,51			
	USUV	23,47	37,16	1,23	7,38	41,00	0,05	0,36	
	WNV1	17,78	32,83	0,48	1,02	31,74	0,63	5,72	
	WNV2	20,56	33,18	2,59	6,14	34,02	0,89	4,65	

Tabella 5.3 Valori di Ct, ΔCt , $\Delta\Delta Ct$ e Fold expression (inf vs mock e 48h vs 24h) di alcuni geni della risposta immunitaria innata. I valori di fold expression inf vs mock dei diversi geni sono stati calcolati come $2^{-\Delta\Delta Ct}$, dove i Ct sono i cicli ottenuti dall'analisi in qPCR per ogni gene, il ΔCt è la differenza tra i Ct ottenuti del gene testato e i Ct di espressione del GAPDH (gene housekeeping); il $\Delta\Delta Ct$ è la differenza tra il ΔCt calcolato nel campione infetto e il ΔCt calcolato nel mock. I valori di fold expression 48h vs 24h, invece, sono stati calcolati utilizzando come $\Delta\Delta Ct$ la differenza tra il ΔCt delle 48h e il ΔCt delle 24h per ogni singolo gene. I valori di fold expression <1 rappresentano un'espressione inferiore rispetto al controllo, mentre valori >1 rappresentano un'espressione maggiore.

In figura 5.11 sono riportati i risultati ottenuti rappresentati mediante istogrammi:

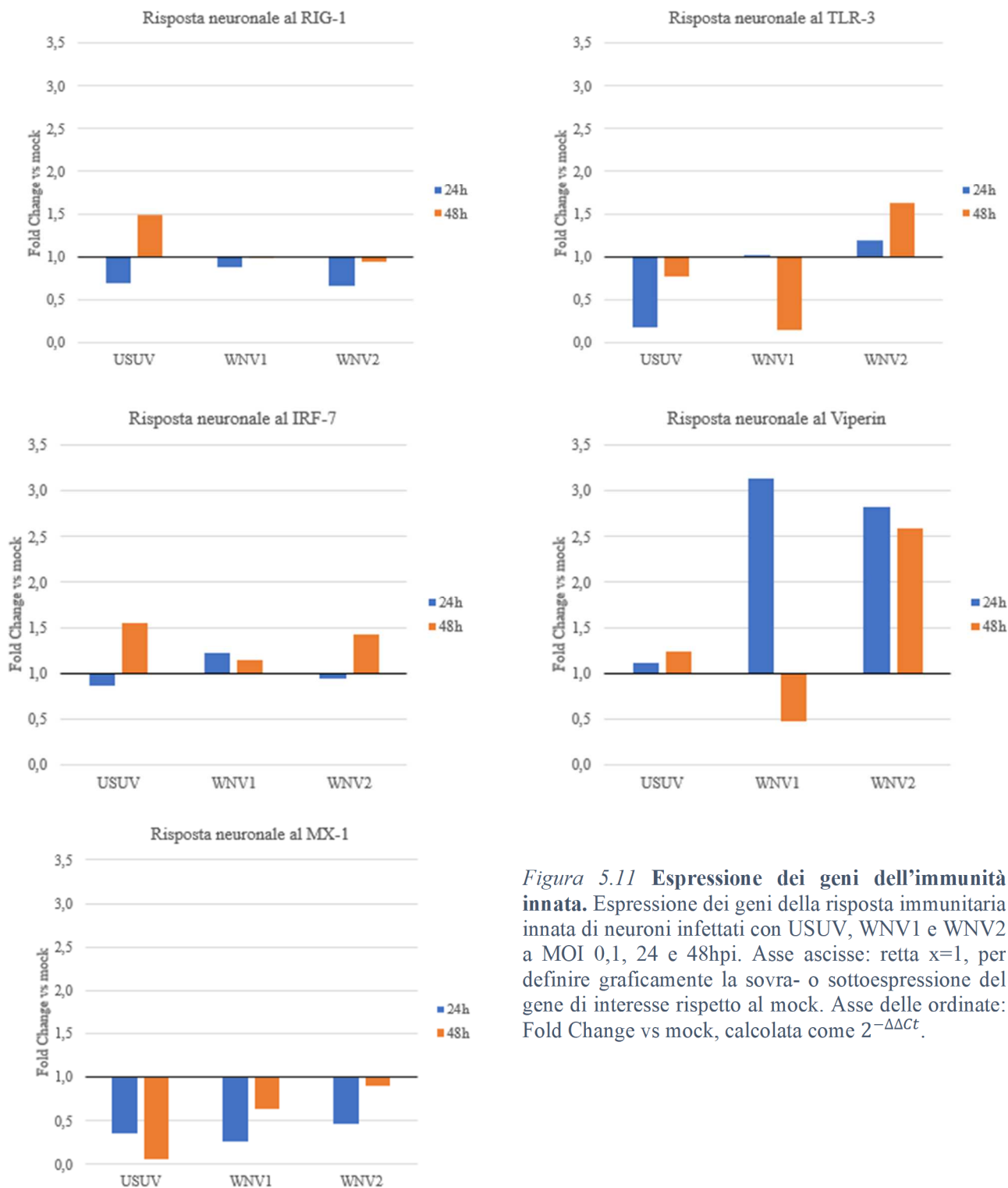


Figura 5.11 **Espressione dei geni dell'immunità innata.** Espressione dei geni della risposta immunitaria innata di neuroni infettati con USUV, WNV1 e WNV2 a MOI 0,1, 24 e 48hpi. Asse ascisse: retta $x=1$, per definire graficamente la sovra- o sottoespressione del gene di interesse rispetto al mock. Asse delle ordinate: Fold Change vs mock, calcolata come $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Dai grafici ottenuti si può dedurre che l'infezione dei tre virus non modifica l'espressione dei geni RIG-I, TLR-3, IRF-7, mentre l'infezione da WNV sembra indurre l'espressione di Viperin e l'infezione da USUV inibire l'espressione di MX-1. Questi risultati sono preliminari e di carattere esplorativo, poiché eseguiti su un singolo esperimento.

6. Discussione e conclusione

Questo studio si è posto l'obiettivo di sviluppare un modello *in vitro* di infezione basato sul differenziamento di cellule staminali embrionali umane in neuroni (o neuron-like cell), al fine di confrontare a livello fenotipico West Nile virus (WNV) e Usutu virus (USUV), due flavivirus neurotropi filogeneticamente correlati e con meccanismi di trasmissione analoghi¹⁴.

In passato, molti studi hanno sfruttato il potenziale differenziativo delle cellule staminali (iPSC e ESC) e dei fibroblasti per generare modelli neuronali *in vitro*³⁶. Spesso, tuttavia, i protocolli di differenziamento presentano molte limitazioni legate alle procedure variabili e di lunga durata, e alla ridotta riproducibilità subordinata alla variabilità fenotipica delle diverse linee cellulari di derivazione utilizzate³⁶. Il protocollo di differenziamento applicato in questo studio⁴⁵, ha permesso di ottenere, in soli 14 giorni, cellule neuronali, a partire da cellule staminali embrionali H9 nel cui genoma è stato integrato, a livello del locus AAVS1, il transgene *Neurogenin2*, la cui espressione può essere indotta dalla tetraciclina Tet-ON 3G.

La natura delle cellule ottenute dal differenziamento è stata dimostrata dall'espressione endogena della β -tubulina III, un marcatore tipico neuronale identificato mediante saggio di immunofluorescenza indiretta. La β -tubulina di classe III (altrimenti nota come β -tubulina III) è infatti un elemento dei microtubuli della famiglia delle tubuline, codificato dal gene TUBB3, che si trova quasi esclusivamente nei neuroni e nelle cellule del testicolo.

Al fine di stabilire se il modello sviluppato *in vitro* fosse affidabile e generasse dati riproducibili, le caratteristiche fenotipiche e il neurotropismo di USUV e WNV lignaggio 1 e 2 sono state analizzate mediante l'esecuzione di quattro esperimenti di infezione, ciascuno su linee neuronali distinte, ovvero ottenute da quattro differenziamenti distinti. Le infezioni delle cellule neuronali sono state effettuate in BLS-3 ad una MOI di 0,1.

Ancora oggi, a causa delle ridotte segnalazioni che ogni anno giungono agli enti di sanità pubblica, non conosciamo la reale infettività e patogenicità di USUV nell'uomo. Tuttavia, considerata l'elevata prevalenza sierologica di anticorpi USUV nelle zone endemiche, spesso anche maggiore rispetto a WNV^{32,33}, sembrerebbe che, a fronte di un numero minore di casi di malattia conclamata, USUV sia meno virulento per l'uomo rispetto a WNV. La ridotta neuropatogenicità di USUV nell'uomo potrebbe essere giustificata dal suo minore neurotropismo rispetto a WNV. Questa conclusione rispecchierebbe i risultati di immunofluorescenza ottenuti in questo studio: la percentuale di neuroni infettati con USUV (circa il 2%) risulta inferiore rispetto a quelle infettate con entrambi i lignaggi di WNV (circa il 10%).

Inoltre, i risultati di immunofluorescenza concordano con le cinetiche virali analizzate nel surnatante alle 24 e alle 48 hpi dei neuroni infettati con USUV e i due lignaggi di WNV, ottenuti mediante la ricerca del genoma virale in RT-qPCR. Il *test non parametrico di Mann-Whitney* è stato svolto al fine di valutare se la differenza osservata tra la cinetica di replicazione di USUV e WNV fosse significativa. Dal confronto di USUV con entrambi i lignaggi di WNV sono stati ricavati dei *p-value* < 0.05, sia per le 24 h che per le 48 h post-infezione. Diversamente, la differenza di crescita tra le 24 e le 48 ore dei due virus, non è significativa, supportando l'ipotesi che la penetrazione di USUV a livello neuronale sia inferiore a quella di WNV, ma che il trend di crescita tra i due virus sia analogo.

Utilizzando il *test non parametrico di Mann-Whitney*, sono state confrontate anche le cinetiche di replicazione dei due lignaggi di WNV, allo scopo di valutare, se presente, una differenza tra i due virus. In questo caso, sono stati ottenuti *p-value* molto alti, sia dal confronto dei titoli virali ottenuti alle 24 h e alle 48 h post-infezione, che dal confronto della crescita dei due virus tra i due punti temporali, escludendo differenze nella capacità replicativa dei due lignaggi di WNV.

Tutti i dati delle cinetiche virali ottenuti mediante RT-qPCR sono stati poi confrontati con i risultati ottenuti dai saggi di TCID₅₀, in cui le cellule permissive Vero E6 sono state infettate con le particelle virali presenti nel surnatante, raccolto ai diversi time-points, dei neuroni infettati. Con questo saggio, è stato valutato il numero di particelle infettive presenti nei diversi time-point espresso come $\text{Log}_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{mL})$, che hanno confermato i risultati ottenuti dalle Real-time PCR. Anche l'analisi statistica dei dati ottenuti confermano i risultati precedenti.

Per ottenere ulteriori informazioni sulla difformità fenotipica di USUV rispetto a WNV, è stato raccolto il pellet cellulare dei neuroni infettati a 24 h e 48 h post-infezione, ed è stata svolta un'analisi preliminare dell'espressione di alcuni geni chiave della risposta immunitaria innata. Dal pellet cellulare è stato estratto e retro-trascritto l'RNA, per testare un pannello di alcuni geni rappresentativi delle cascate del segnale della risposta dell'interferone. Per tutti i geni analizzati sono state utilizzate coppie di primer exon-exon-spanning. Il pannello testato in qPCR con un sistema EVAgreen includeva i seguenti geni: RIG-I, TLR3, IRF-7, VIPERIN e MX-1. I risultati ottenuti sono poi stati normalizzati al GAPDH umano e analizzati utilizzando il metodo del $\Delta\Delta\text{Ct}$. In particolare, abbiamo notato che l'espressione di RIG-I e TLR3, due Pattern recognition receptor (PRR) responsabili dell'innescamento della risposta immunitaria innata che porta alla produzione di interferone di tipo I, il primo citosolico e il secondo presente sulla membrana endosomiale, non viene sovraregolata in risposta all'infezione virale. Anche per quanto riguarda l'espressione di IRF-7, un fattore di trascrizione dell'interferone attivato sia dalla cascata del segnale di RIG-I che da quella di TLR3, e MX-1, un interferon stimulated gene (ISG) stimolato dall'INF di tipo I, non

osserviamo una sovraregolazione nella loro trascrizione. Si può invece osservare un aumento nell'espressione della Viperina di circa 3 volte nelle cellule infettate con WNV 1 (a 24h) e 2 (a 24h e 48h) rispetto al controllo negativo (mock). Tuttavia, questa analisi preliminare, condotta in singolo, ha generato risultati caratterizzati da un'alta variabilità e alti livelli di incertezza, probabilmente causata dalla bassa espressione genica cellulare.

Al fine di valutare con maggiore accuratezza e in modo globale l'espressione dei geni coinvolti nella risposta immunitaria innata è in corso il sequenziamento dell'RNA (RNA-Seq) sui campioni degli esperimenti svolti. L'analisi dei dati ottenuti mediante RNA-seq fornirà informazioni sulla sequenza e sulla quantità di ogni RNA espresso, noto come "trascrittoma", sia cellulare che virale. L'RNA-Seq, infatti, è una tecnica di Next generation Sequencing (NGS), in grado di definire non solo qualitativamente la sequenza degli RNA presenti in un campione, ma anche quantitativamente, permettendo una valutazione molto accurata dell'espressione genica cellulare.

In conclusione, il modello *in vitro* di infezione neuronale sviluppato in questo studio si è dimostrato un ottimo sistema per lo studio e il confronto a livello fenotipico di specie virali anche filogeneticamente correlate. Grazie alla tecnologia delle cellule staminali sarà possibile sviluppare ulteriori modelli bidimensionali, per lo studio di altri tipi cellulari target dei flavivirus, come ad esempio gli astrociti, cellule non neuronali del SNC che costituiscono il target principale del WNV *in vivo*; ma anche definire nuovi modelli tridimensionali, che permettono di riprodurre più fedelmente le complesse interazioni cellula-cellula e cellula-ambiente presenti *in vivo*. Gli organoidi, ad esempio, sono modelli 3D di colture cellulari, che possono originare sempre da cellule staminali che vengono poi differenziate nei tipi cellulari in esame. Questo tipo di tecnologia viene oggi ampiamente utilizzata per lo studio di cellule neuronali, permettendo di costruire modelli *in vitro* di diversi tipi cellulari, riproducendo più fedelmente la situazione *in vivo*.

7. Bibliografia

1. Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N. & Cropp, C. B. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.* **72**, 73–83 (1998).
2. Gaunt, M. W. *et al.* Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.* **82**, 1867–1876 (2001).
3. Rizzoli, A. *et al.* Understanding West Nile virus ecology in Europe: *Culex pipiens* host feeding preference in a hotspot of virus emergence. *Parasit. Vectors* **8**, 213 (2015).
4. Murray, C. L., Jones, C. T. & Rice, C. M. Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 699–708 (2008).
5. Suthar, M. S., Diamond, M. S. & Gale, M. West Nile virus infection and immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**, 115–128 (2013).
6. Colpitts, T. M., Conway, M. J., Montgomery, R. R. & Fikrig, E. West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 635–648 (2012).
7. Daniels, B. P. *et al.* Viral pathogen-associated molecular patterns regulate blood-brain barrier integrity via competing innate cytokine signals. *mBio* **5**, e01476-01414 (2014).
8. Donadieu, E. *et al.* Differential Virulence and Pathogenesis of West Nile Viruses. *Viruses* **5**, 2856–2880 (2013).
9. Yoneyama, M. *et al.* The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* **5**, 730–737 (2004).
10. Wu, B. & Hur, S. How RIG-I like receptors activate MAVS. *Curr. Opin. Virol.* **12**, 91–98 (2015).
11. Sato, M. *et al.* Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* **13**, 539–548 (2000).
12. Sprooten, J., Agostinis, P. & Garg, A. D. Type I interferons and dendritic cells in cancer immunotherapy. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **348**, 217–262 (2019).

13. Blasius, A. L. & Beutler, B. Intracellular toll-like receptors. *Immunity* **32**, 305–315 (2010).
14. Zannoli, S. & Sambri, V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms* **7**, 184 (2019).
15. Komar, N. *et al.* Serologic evidence for West Nile virus infection in birds in the New York City vicinity during an outbreak in 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 621–625 (2001).
16. Colpitts, T. M., Conway, M. J., Montgomery, R. R. & Fikrig, E. West Nile Virus: biology, transmission, and human infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **25**, 635–648 (2012).
17. Pealer, L. N. *et al.* Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N. Engl. J. Med.* **349**, 1236–1245 (2003).
18. Fonseca, K. *et al.* West Nile virus infection and conjunctival exposure. *Emerg. Infect. Dis.* **11**, 1648–1649 (2005).
19. Carson, P. J. *et al.* Neuroinvasive disease and West Nile virus infection, North Dakota, USA, 1999-2008. *Emerg. Infect. Dis.* **18**, 684–686 (2012).
20. Fall, G. *et al.* Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **11**, e0006078 (2017).
21. Delbue, S. *et al.* Review of West Nile virus epidemiology in Italy and report of a case of West Nile virus encephalitis. *J. Neurovirol.* **20**, 437–441 (2014).
22. Barzon, L. *et al.* Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of West Nile virus lineage 1 and lineage 2 from human cases of infection, Italy, August 2013. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **18**, 20591 (2013).
23. Vazquez, A. *et al.* Putative new lineage of west nile virus, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **16**, 549–552 (2010).
24. Barzon, L. *et al.* Early start of seasonal transmission and co-circulation of West Nile virus lineage 2 and a newly introduced lineage 1 strain, northern Italy, June 2022. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **27**, (2022).

25. Salute, M. della. Piano nazionale di prevenzione, sorveglianza e risposta alle Arbovirosi (PNA) 2020-2025.
https://www.salute.gov.it/portale/documentazione/p6_2_2_1.jsp?id=2947&lingua=italiano.
26. Sorveglianza integrata del West Nile e Usutu virus 2 Bollettino N. 14 del 21 settembre 2022 RISULTATI NAZIONALI.
27. Cadar, D. *et al.* Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, western Europe, 2016. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **22**, 30452 (2017).
28. Roesch, F., Fajardo, A., Moratorio, G. & Vignuzzi, M. Usutu Virus: An Arbovirus on the Rise. *Viruses* **11**, E640 (2019).
29. Vilibic-Cavlek, T. *et al.* Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathog. Basel Switz.* **9**, E699 (2020).
30. Clé, M. *et al.* Usutu virus: A new threat? *Epidemiol. Infect.* **147**, e232 (2019).
31. Ministero della Salute. Piano di sorveglianza e risposta ai virus West Nile e Usutu - 2018.
32. Gaibani, P. *et al.* Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from northern Italy. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* **12**, 431–433 (2012).
33. Faggioni, G. *et al.* Prevalence of Usutu and West Nile virus antibodies in human sera, Modena, Italy, 2012. *J. Med. Virol.* **90**, 1666–1668 (2018).
34. le Feber, J. In Vitro Models of Brain Disorders. *Adv. Neurobiol.* **22**, 19–49 (2019).
35. Goshi, N., Morgan, R. K., Lein, P. J. & Seker, E. A primary neural cell culture model to study neuron, astrocyte, and microglia interactions in neuroinflammation. *J. Neuroinflammation* **17**, 155 (2020).
36. Zhang, Y. *et al.* Rapid single-step induction of functional neurons from human pluripotent stem cells. *Neuron* **78**, 785–798 (2013).
37. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).

38. Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861–872 (2007).
39. D’Souza, G. X. *et al.* The application of in vitro-derived human neurons in neurodegenerative disease modeling. *J. Neurosci. Res.* **99**, 124–140 (2021).
40. Bauer, L. *et al.* In vitro and in vivo differences in neurovirulence between D614G, Delta And Omicron BA.1 SARS-CoV-2 variants. *Acta Neuropathol. Commun.* **10**, 124 (2022).
41. Kelava, I. & Lancaster, M. A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev. Biol.* **420**, 199–209 (2016).
42. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).
43. Pawlowski, M. *et al.* Inducible and Deterministic Forward Programming of Human Pluripotent Stem Cells into Neurons, Skeletal Myocytes, and Oligodendrocytes. *Stem Cell Rep.* **8**, 803–812 (2017).
44. Beers, J. *et al.* Passaging and colony expansion of human pluripotent stem cells by enzyme-free dissociation in chemically defined culture conditions. *Nat. Protoc.* **7**, 2029–2040 (2012).
45. Zhang, J. & Jw, H. Neural differentiation of AAVS1-TRE3G-NGN2 pluripotent stem cells. (2021).
46. Cavrini, F. *et al.* A rapid and specific real-time RT-PCR assay to identify Usutu virus in human plasma, serum, and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **50**, 221–223 (2011).
47. Lanciotti, R. S. *et al.* Rapid Detection of West Nile Virus from Human Clinical Specimens, Field-Collected Mosquitoes, and Avian Samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR Assay. *J. Clin. Microbiol.* **38**, 4066–4071 (2000).
48. Linke, S., Ellerbrok, H., Niedrig, M., Nitsche, A. & Pauli, G. Detection of West Nile virus lineages 1 and 2 by real-time PCR. *J. Virol. Methods* **146**, 355–358 (2007).

49. Gordon, F. E. *et al.* Increased Expression of Angiogenic Genes in the Brains of Mouse Meg3-Null Embryos. *Endocrinology* **151**, 2443–2452 (2010).
50. Webster Marketon, J. I., Corry, J. & Teng, M. N. The respiratory syncytial virus (RSV) nonstructural proteins mediate RSV suppression of glucocorticoid receptor transactivation. *Virology* **449**, 62–69 (2014).
51. Abrahams, V. M. *et al.* Bacterial modulation of human fetal membrane Toll-like receptor expression. *Am. J. Reprod. Immunol. N. Y. N 1989* **69**, 33–40 (2013).
52. Prescott, J. B., Hall, P. R., Bondu-Hawkins, V. S., Ye, C. & Hjelle, B. Early innate immune responses to Sin Nombre hantavirus occur independently of IFN regulatory factor 3, characterized pattern recognition receptors, and viral entry. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 1796–1802 (2007).
53. Dill, M. T. *et al.* Interferon-induced gene expression is a stronger predictor of treatment response than IL28B genotype in patients with hepatitis C. *Gastroenterology* **140**, 1021–1031 (2011).
54. Schmitt, M. *et al.* Anti-Tumoral Effect of Chemerin on Ovarian Cancer Cell Lines Mediated by Activation of Interferon Alpha Response. *Cancers* **14**, 4108 (2022).

8. ALLEGATI

8.1 Produzione e titolazione virale

8.1.1 Produzione virale

Per produrre uno stock virale concentrato di WNV e USUV, sono state infettate 5 fiasche T75 di cellule permissive Vero E6 ad una confluenza dell'80%. Le cellule sono state lavate due volte con DMEM P/S senza FBS, al fine di eliminare l'FBS, utilizzato nel mezzo di coltura, che potrebbe impedire al virus di entrare nelle cellule. L'infezione è stata effettuata con 7 mL del surnatante del terzo passaggio del virus isolato su Vero E6 e diluito 1:7. Successivamente, le cellule sono state incubate a 37°C in CO₂ al 5% per 90 minuti. Al termine dell'incubazione, sono stati aggiunti 8 mL di DMEM con antibiotici integrati e FBS al 6%. Dopo 4-5 giorni, in presenza di un effetto citopatico (CPE) su circa il 90% del monostrato cellulare, il virus è stato raccolto e purificato. Le cellule infette sono state staccate meccanicamente mediante cell-scraper, raccolte in provette sterili tipo Falcon da 50 mL e sottoposte ad un ciclo di shock termico; successivamente sono state poste in congelatore a -80°C fino a completo congelamento per poi essere scongelate in bagnetto a 37°C, quindi centrifugate a 3000 rpm per 10 minuti per rimuovere i detriti cellulari. Il surnatante contenente virus concentrato è stato suddiviso in singole aliquote da 1 ml in provette di congelamento sterili e conservato a -80 ° C.

8.1.2 Titolazione virale

Il titolo virale di WNV è stato espresso come unità formanti placca per ml (PFU/mL). Delle cellule Vero E6 permissive sono state seminate in 6-well e dopo 24 ore sono state infettate con diluizioni seriali 1:10 di stock virale e incubate per 1 ora e 30 minuti a 37°C in 5% CO₂. Successivamente il surnatante è stato rimosso ed è stato aggiunto MEM 2X contenente il 4% di FBS e il 2% di agarosio a ciascun pozzetto e incubato a 37°C. Dopo 72 ore, a ciascun pozzetto è stato aggiunto MEM 2X contenente il 4% di FBS e il 2% di agarosio con lo 0,003% di colorante rosso neutro (Merck Millipore), seguito da un'incubazione a 37°C per 24 ore per poi procedere al conteggio delle placche.

Per quanto riguarda USUV, invece, è stato utilizzato il saggio TCID₅₀ descritto nel capitolo 4.6.2.

RINGRAZIAMENTI

Al termine di questo percorso di studi, mi sento in dovere di ringraziare tutte quelle persone che mi sono sempre state accanto e che hanno creduto in me.

Ringrazio prima di tutto la Prof.ssa Barzon e con lei la Dr.ssa Silvia Riccetti, la Dr.ssa Emanuela dal Molin e il Dr. Alessandro Sinigaglia per avermi accolto, guidato e supportato nella fase più importante del mio percorso accademico.

Ringrazio poi la mia famiglia: mia mamma Lucia e mio papà Gianni, ai loro insegnamenti senza i quali oggi non sarei ciò che sono, ma anche mia sorella Alice, che mi ha fatto conoscere questo corso di studi e che mi ha sempre sostenuto, rimanendo al mio fianco per qualsiasi cosa.

Un ringraziamento di cuore va alla mia ragazza Benedetta, che è sempre riuscita a risollevarmi il mio morale nei momenti più difficili, stando al mio fianco e credendo sempre in me. Grazie per tutto il tempo che mi hai dedicato e perché ci sei sempre stata.

Con lei, vorrei ringraziare anche tutti i miei amici più stretti; grazie per essere stati miei complici, ognuno a suo modo, nel bene e nel male. Sono così tanti i ricordi che mi passano per la testa che è impossibile trovare le parole giuste per onorarli.

Un ringraziamento va anche a Don Luca e a tutti gli animatori della parrocchia di Campagnola, con cui ho condiviso in questi anni momenti indimenticabili.

Tra i tanti ringraziamenti non possono di certo mancare quelli ai miei compagni di corso, che mi hanno sopportato in questi tre anni. Purtroppo, a causa della pandemia, abbiamo avuto poco tempo a disposizione, ma siamo riusciti comunque a legare abbastanza da avere dei ricordi indimenticabili.

Un ultimo ringraziamento va anche a mia nonna e tutti i miei parenti più stretti, che mi hanno sostenuto spronandomi sempre a fare di più.

Dedico a tutti voi questo mio grande traguardo, perché senza di voi questo non sarebbe stato possibile.

Andrea

