



UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche Fisiche e Naturali

Corso di Dottorato in Virologia Fondamentale e Clinica

SSD: MED/07

“Subtractive differential expression of human inflammation and apoptosis pathways in latently, productively and not infected competent cells with HHV-8”.

Candidato:
Maddalena Galati

Relatore:
Prof. Luca Ceccherini-Nelli

Co-Relatore:
Dr.ssa Barbara Matteoli

Anno Accademico 2013-2014

INDICE:	PAGINA
RIASSUNTO	4
ABSTRACT	5
INTRODUZIONE:	
1. Human Herpesvirus 8	
1.1.1. Classificazione	6
1.1.2. Struttura	10
1.1.3. Genoma virale e variabilità	12
1.1.4. Ciclo replicativo	19
1.2 Le patologie HHV8 correlate, clinica e istologia	
1.2.1. Il Linfoma ad Effusione Primaria	23
1.2.2. La Malattia Multicentrica Di Castleman	24
1.2.3. Il Sarcoma di Kaposi	26
1.3 Ruolo dell'HHV8 nella patogenesi del Sarcoma di Kaposi	
1.3.1. Proteine oncogeniche e sviluppo del Sarcoma	29
1.3.2. Evasione della risposta immune	33
1.3.3. Tropismo cellulare	34
1.3.5 Terapie	35
SCOPO DELLA TESI	37
MATERIALI E METODI	
3.1 Colture cellulari BCBI1 e BC3 e riattivazione della replicazione virale	38
3.2 Tipizzazione genetica	39
3.3 Quantificazione della carica virale	43

3.4 Infezione delle linee cellulari umane HEK293 e PBMC	46
3.5 Gene expression profiling: i Microarray	49
3.6 Estrazione dell'RNA	51
3.7 Retrotrascrizione e Marcatura	52
3.8 Ibridazione e rivelazione Silverquant	53
3.9 Acquisizione e analisi dei dati	54
3.10 Validazione dei risultati mediante real-time PCR	56
3.11 Test in vitro su campioni biologici umani	58
RISULTATI	
4.1 Tipizzazione Virale: Clustering Analysis	59
4.2 Risultati analisi molecolari e IFA	61
4.3 Gene expression profiling e analisi statistica dei dati	62
4.5 Validazione dei risultati mediante real-time PCR	64
4.6 Risultati delle analisi in vitro	64
DISCUSSIONE	65
BIBLIOGRAFIA	68
ALLEGATO: LAVORO DI RICERCA SVOLTO ALL'ESTERO	79
ATTIVITÀ EXTRACURRICULARI E INTERDISCIPLINARI	92
RINGRAZIAMENTI	93

RIASSUNTO

L'herpes virus umano 8 (HHV-8) è un herpes virus di tipo gamma associato al Sarcoma di Kaposi, una malattia linfoproliferativa osservata nei soggetti immunocompromessi. Il genoma di HHV-8 esprime geni virali unici e omologhi di geni regolatori umani responsabili dell'angiogenesi, dell'inibizione dell'apoptosi, dell'evasione dei *check point* nel ciclo cellulare, dell'immunoescape, della proliferazione dei linfociti B, in cui il virus attua il ciclo lisogeno. Nel nostro laboratorio abbiamo testato in vitro il tropismo cellulare dei ceppi A1 e C3 di HHV8, ottenuti dalla riattivazione del virus nelle linee cellulari BCBL1 e BC3 o da campioni clinici mediante trattamento con TPA. Il virus purificato è stato impiegato per infettare le linee cellulari HEK203 e PBMC; abbiamo successivamente analizzato il pattern di espressione dei geni cellulari coinvolti nel processo infiammatorio mediante estrazione dell'RNA genomico (RNeasy Mini Kit, Qiagen), RT-PCR con random primers e ibridazione su DualChip® Microarray, Eppendorf (contenenti una serie di sonde rappresentative di 297 geni umani coinvolti nel processo infiammatorio). Undici geni sono risultati comunemente modulati: C5, CCL1, IL15, IL3, IL7, IRF2, NFATC1, STAT1, TGFBI, TLR4 e TNFSF11, implicati nell'eziologia virale e perciò ri-analizzati in maniera quantitativa con un set di specifici primers Real Time PCR (Roche, Light Cycler 2.0). I risultati ottenuti si collocano in un range quantitativo compreso tra 3,80 e 6,25 Log₁₀ Cp/mL. In conclusione, la modulazione di questi geni porta alle cellule infettate un vantaggio metabolico richiesto per la tumori genesi: il loro silenziamento potrebbe inibire l'infezione litica di HHV-8 e le sue conseguenze cliniche.

ABSTRACT

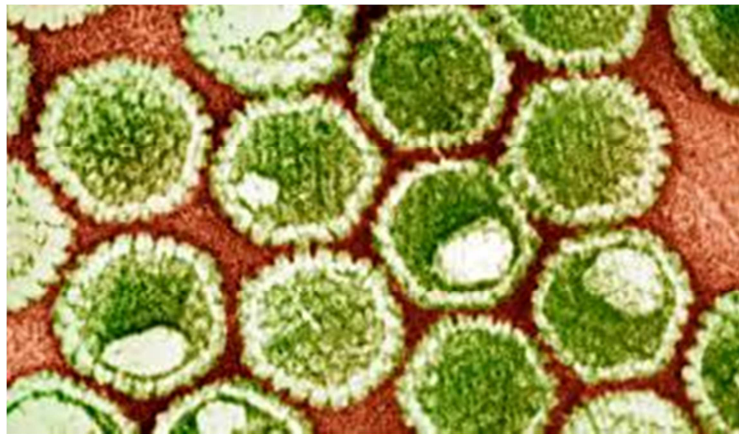
Human herpes virus 8 (HHV-8) is a gamma-herpes virus associated with Kaposi's sarcoma, a lymphoproliferative disease observed in immunocompromised individuals. Viral genes and viral homologues of human regulatory genes are responsible for human angiogenesis, inhibition of apoptosis, cell cycle check points evasion, immunoescape, proliferation of B lymphocytes (in which the virus implements the lysogenic cycle). We have tested in vitro cellular tropism of HHV-8 strains A1 and C3, obtained by the reactivation of the virus in cell lines BC3 and BCBL1 or in clinical samples, by treatment with TPA. The purified virus was used to infect HEK203 and PBMCs cell lines: we analyzed the pattern of expression of cellular genes involved in the inflammatory process by extracting genomic RNA (RNeasy Mini Kit, Qiagen), performing RT-PCR with random primers and Microarray hybridization of DualChip[®], Eppendorf (containing a series of probes representing 297 human genes involved in the inflammatory process), with automatic hybridizer Thermoblock. The results show that 11 genes commonly modulated: C5, CCL1, IL15, IL3, IL7, IRF2, NFATC1, STAT1, TGFBI, TLR4 and TNFSF11, all involved in viral etiology. Quantitative analysis of these genes (Real Time PCR, Roche Light Cycler 2.0) show results placed in a range between 3.80 and 6.25 log₁₀ Cp/ml. Infected cells gene's modulation can give HHV-8 infected cells a metabolic advantage required for tumorigenesis; gene silencing by siRNA could inhibit HHV-8 lytic infection and its clinical consequences.

INTRODUZIONE

1. Human Herpesvirus 8

1.1.1. Classificazione

Gli Herpesvirus sono diffusi al livello globale e infettano almeno 130 specie animali differenti, dai pesci ai mammiferi. Dall'uomo sono stati isolati 9 Herpesvirus: Herpes simplex 1 (HSV-1), Herpes simplex 2 (HSV-2), human citomegalovirus (HCMV), varicella zoster virus (VZV), Epstein-Barr Virus (EBV), Human Herpesvirus 6A, 6B, 7 e 8 (HHV-6A, HHV-6B, HHV-7, HHV-8). L'appartenenza alla famiglia Herpesviridae viene determinata in base a caratteristiche chimico-fisiche peculiari del virione. Quest'ultimo contiene un *core* di DNA lineare a doppio filamento che varia in dimensioni da circa 125 kbp a 240 kbp e in composizione nucleotidica dal 32 al 75% di (G + C), a seconda della specie virali [Honest, 1984], circondato da un *capside icosaedrico* del diametro di 100-110 nm e costituito da 162 unità ripetitive definite capsomeri, percorsi da una cavità longitudinale cilindrica. Il capside è a sua volta circondato da un *tegumento* di materiale amorfo (o zona granulare), composto da proteine globulari, e più esternamente è presente un *envelope* proveniente dalle membrane (nucleare e citoplasmatica) della cellula ospite e ricco di spicole (peplomeri), ovvero proiezioni glicoproteiche codificate dal virus, importanti nella fase di attacco del ciclo replicativo virale.

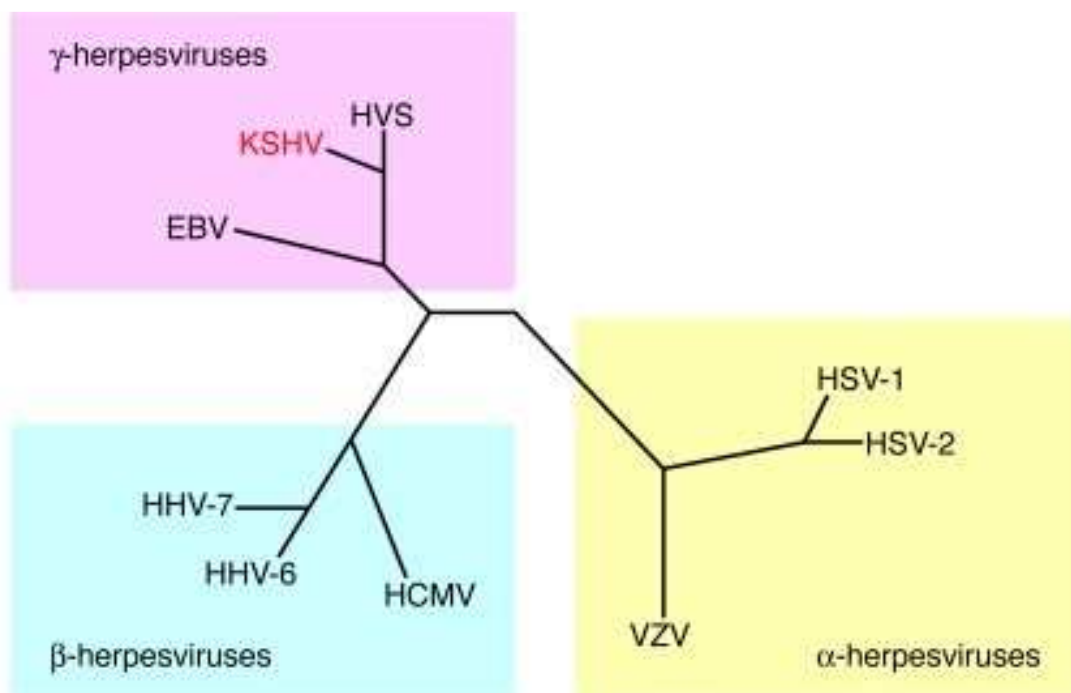


[Virioni dell'Herpesvirus umano 8HHV-8, www.sgm.ac.uk.]

Le caratteristiche biologiche comuni nella famiglia riguardano: l'organizzazione strutturale e funzionale del genoma, che non è covalentemente chiuso o legato covalentemente a proteine come negli altri virus che infettano l'uomo [Moss, 2001, Shenk, 2001] e presenta nucleotidi disappaiati alle estremità [Tamashiro e Spector, 1986]; la sintesi del DNA virale e l'assemblaggio del nucleocapside della progenie che avviene nel nucleo: genomi più grandi sono alloggiati in capsidi più grandi, ma la relazione non è proporzionale [Trus et al, 1999; Bhella et al., 2000]; la formazione dell'envelope durante

l'ingresso tramite le membrane cellulari secondo meccanismi di envelopment e de-envelopment ancora oggi non ben chiariti; la sintesi di enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici (timidina chinasi, timidilato sintetasi, deossiuridinatrifosfatasi o dUTPasi, ribonucleotide reductasi) e delle proteine (proteine chinasi US3, UL13 e serina proteasi UL26p); la capacità di dare luogo ad infezioni litiche, con distruzione delle cellule infettate durante il rilascio della progenie fagica, o latenti, in cui il genoma virale è presente nel nucleo delle cellule dell'ospite in forma circolarizzata *episomale*, ed esprime una percentuale minore di geni che gli permettono di persistere in questo stato, dal quale può riattivarsi e manifestarsi nelle sue forme sintomatiche.

Le differenze riguardanti: organizzazione genomica e grado di omologia, tropismo tissutale e altre proprietà biologiche (velocità di replicazione, citopatologia e sede d'infezione, azione oncogena) hanno permesso di individuare negli Herpesviridae delle sottofamiglie, classificate come Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae, Gammaherpesvirinae.

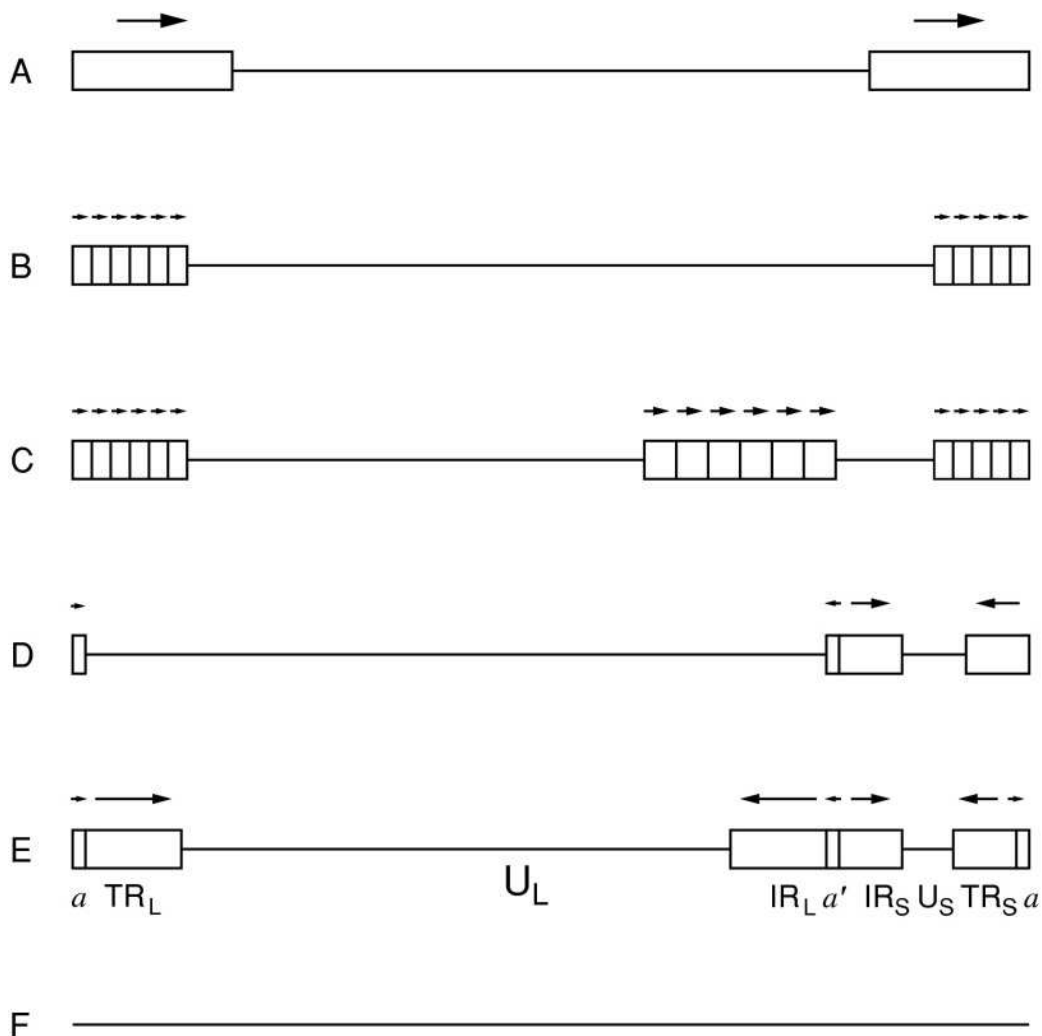


[Sottofamiglie virus herpetici, www.jci.org.]

Gli Alpha-herpesvirus (Herpes Simplex di tipo I e II o HSVI e II e Varicella Zoster o VZV) sono caratterizzati da un ciclo replicativo breve, un marcato effetto citopatico e un tropismo tissutale ampio. La sede preferenziale di latenza sono le cellule dei gangli nervosi. I Beta-herpesvirus (Citomegalovirus o CMV e Virus Herpetici Umani VI e VII o HHV-6 e 7) attuano invece un ciclo replicativo lungo e hanno un tropismo cellulare molto più ristretto, così come la capacità di indurre sincizi. La sede di

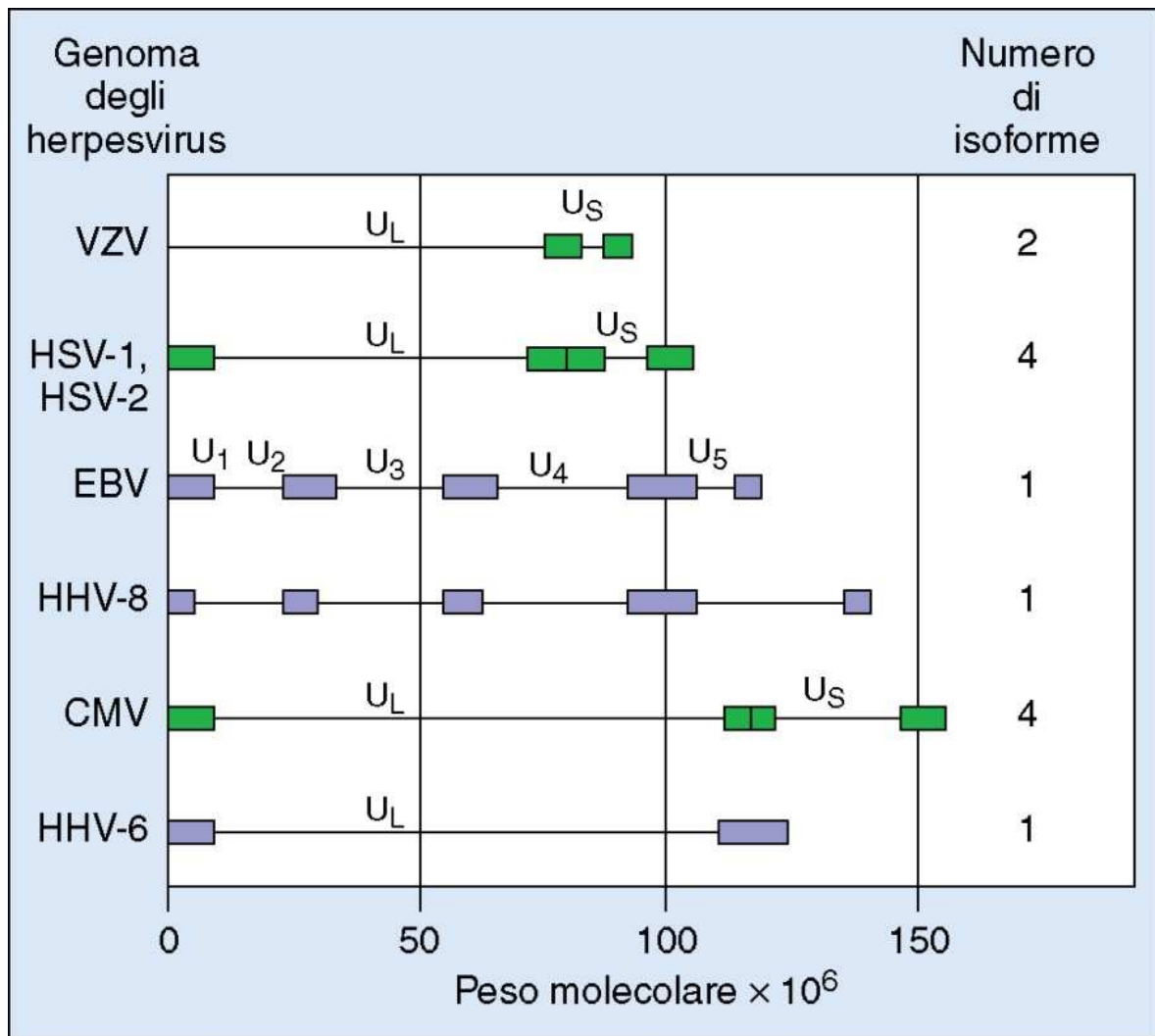
latenza è nelle ghiandole salivari, nei tubuli renali, nelle linfoghiandole (cellule epiteliali e monociti). I Gamma-herpesvirus (Epstein-Barr o EBV e Virus Herpetico Umano 8 o HHV-8) hanno un tropismo tissutale limitato alle cellule linfoidi (Linfociti B e T), nei quali spesso latentizzano. In vitro danno luogo ad infezioni quasi esclusivamente all'interno di cellule linfoblastoidi e a volte in cellule epiteloidi e in fibroblasti.

Il genoma degli herpesvirus consiste in una singola molecola di DNA a doppio filamento, formato da due sequenze geniche, una lunga (UL) e una corta (US) che variano tra le 120 kbp e le 250 kbp, affiancate da sequenze terminali ripetute di unità di 100 bp (TR) che possono far aumentare notevolmente le dimensioni del genoma. Le diverse posizioni di queste sequenze hanno portato ad una ripartizione che prevede sei classi, nominate dalla A alla F.



[Roizman and Pellett , 2001. Le TR sono mostrati come linee orizzontali e rettangoli, rispettivamente. Gli orientamenti di ripetizioni sono mostrate dalle frecce.]

In particolare nella classe E, la possibilità di inversione delle sequenze terminali, nell'una e nell'altra elica, danno origine a quattro popolazioni di DNA isomeriche che differiscono per l'orientamento di UL e US, e che sono presenti nelle popolazioni virali in uguali quantità.

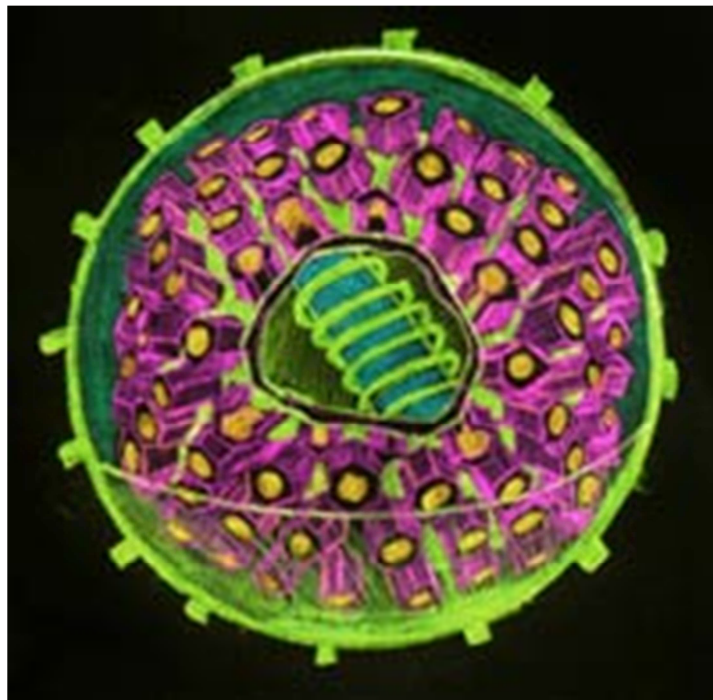


[Numero di isoforme nei virus erpetici, universita.elsevier.it.]

La presenza di ripetizioni è probabilmente collegata alle modalità di replicazione del DNA, piuttosto che a qualsiasi vantaggio ottenuto dalla duplicazione genica: una spiegazione troppo semplicistica in un contesto evolutivo particolare, dal momento che più sottili processi di sostituzione nucleotidica possono facilmente alterare i livelli trascrizionali; inoltre, le regioni ripetute non codificano proteine o enzimi. Questo fenomeno è probabilmente una conseguenza della ricombinazione nel tempo tra ripetizioni del DNA concatemerico virale neosintetizzato. Gli isomeri sono funzionalmente equivalenti, e l'inversione del segmento sembra essere correlato alla biologia del virus [Jenkins e Roizman, 1986; Pellet, 2001].

1.1.2. Struttura del virione

Il virus HHV-8 (Famiglia Herpesviridae, Sottofamiglia Gammaherpesvirus, Genere Rhadinovirus) è l'agente eziologico del Sarcoma di Kaposi e altre malattie correlate, ed è l'unico virus del suo Genere in grado di infettare l'uomo. Il virione ha dimensioni comprese tra i 110 e i 150 nanometri e morfologicamente si presenta di forma sferica. Come tutti gli Herpesvirus è caratterizzato da un involucro lipidico dal quale protrudono diverse glicoproteine virali e da un core denso che contiene il genoma a doppio filamento di DNA ripiegato in forma di toroide.

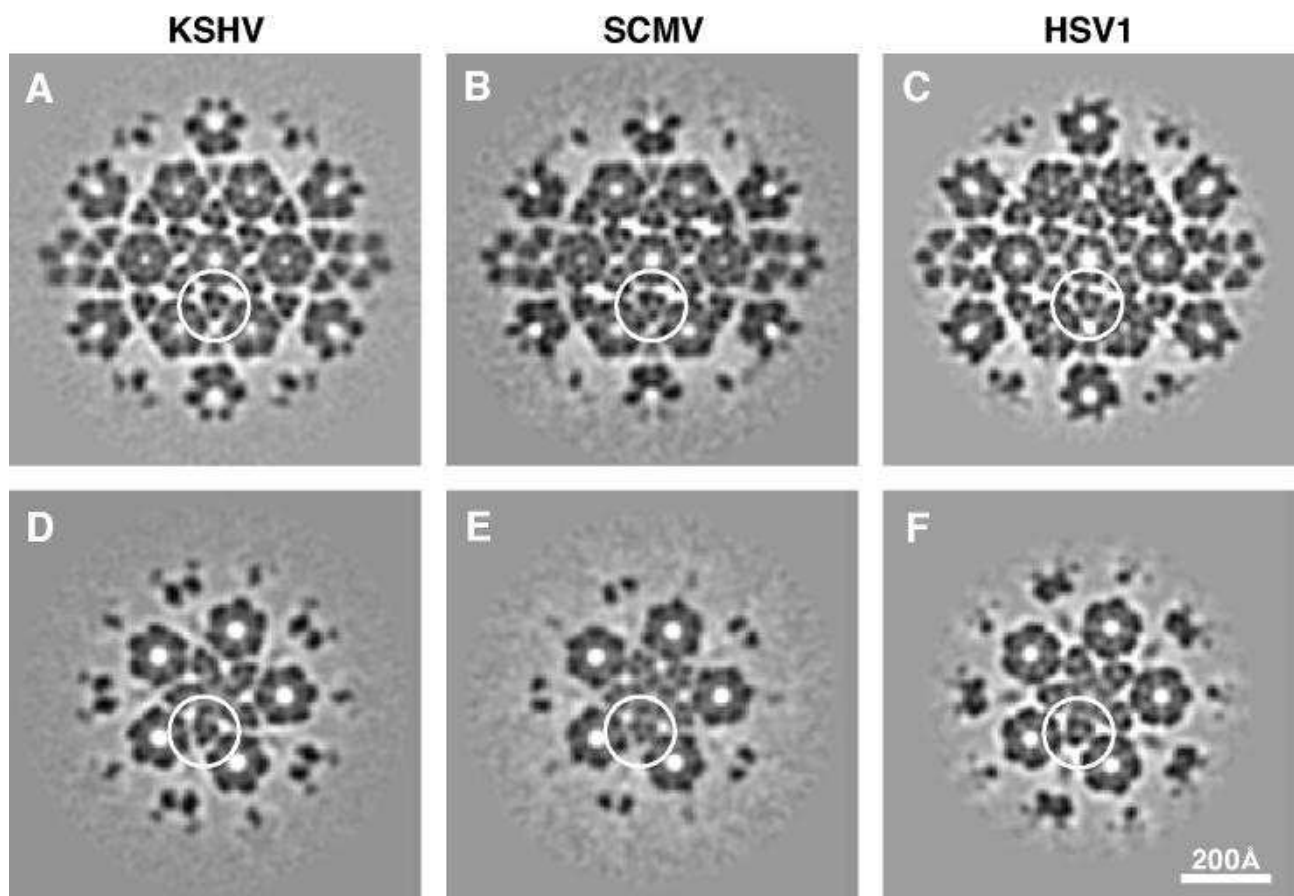


[Struttura del virione dell'HHV-8, www.liveinternet.ru.]

Il capsidico di KSHV è una struttura icosaedrica composta da sei proteine: pORF25 (major capsid protein, MCP), pORF62 (triplex 1), pORF26 (triplex 2), pORF17 (proteasi), pORF17.5 (proteina scaffold) e pORF65 (smallest capsid protein, SCPs) [P. E.M. et al, 2008]. È costituito da 12 pentoni (i capsomeri ai vertici dell'icosaedro) e da 150 esoni (altri capsomeri) contenenti rispettivamente 5 o 6 copie della proteina capsidica principale (MCP). I capsomeri sono saldati tra loro attraverso 320 strutture eterotrimeriche formate dalle proteine capsidiche minori, TR-1 (orf 62) e TR-2 (orf 26) combinate nel rapporto 1:2 [Said et al., 1996; Trus et al., 2001; Lo P et al., 2003]. La proteasi e la proteina scaffold occupano lo spazio interno della struttura del capsidico e sono fondamentali per il suo assemblaggio. Nonostante la limitata similarità di sequenza tra proteine capsidiche corrispondenti, KSHV ha lo stesso Numero di triangolazione ($T = 16$) e la stessa architettura dell'herpes simplex virus (HSV) e del citomegalovirus (CMV). Le proteine meno conservate sono quelle minori basiche del capsidico: mentre le

SCPs di HSV e CMV si legano solo agli esoni, una differente mappatura suggerisce che la proteina omologa in KSHV (ORF65) si lega sia agli esoni sia ai pentoni [Trus et al., 2001, Lo P et al., 2003]. Questa bassa omologia di sequenza delle SCPs può essere correlata al loro ruolo funzionali specifico per i diversi virus. È stato recentemente dimostrato che l'SCP UL48.5 è essenziale per l'infezione da HCMV in vivo e la sua omologa, VP26, è indispensabile per HSV-1.

La localizzazione delle SCPs ORF65 alle regioni ultraperiferiche del capside di HHV-8 [Lo P. et al., 2003] suggerisce u suo possibile nel mediare le interazioni tra le proteine del capside e quelle del tegumento e del citoscheletro durante l'infezione.

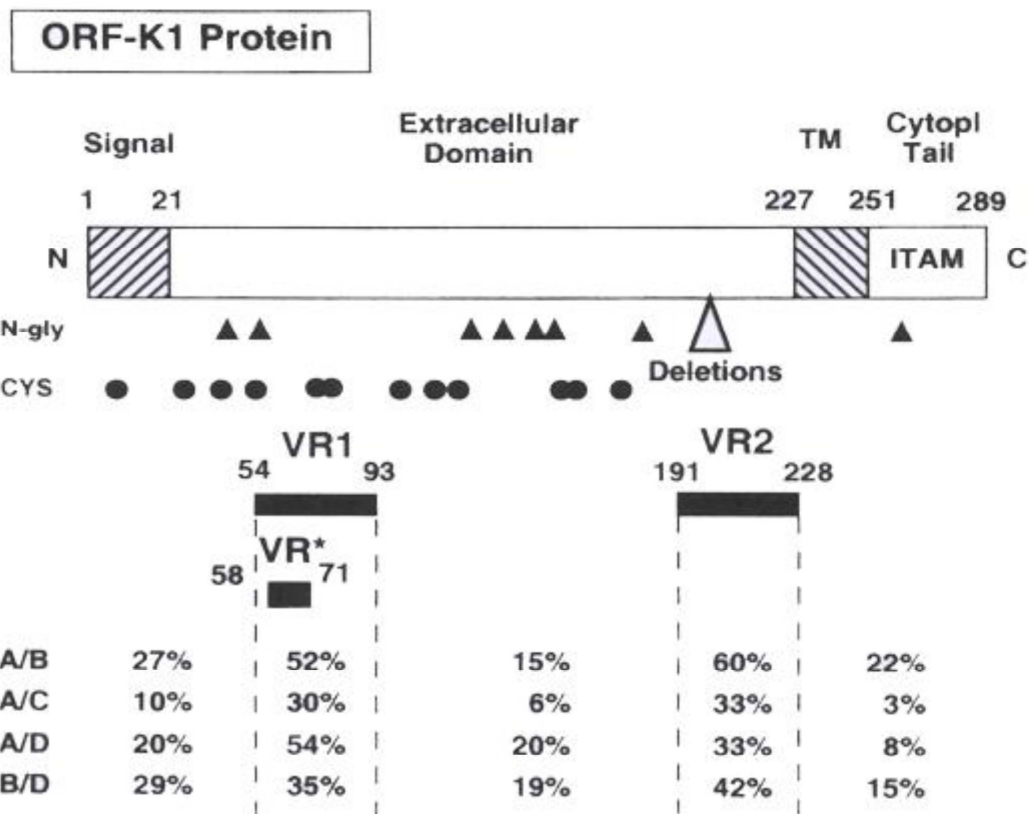


[Trus et al., 2001. Sezioni (5 Å) dei capsidi di KSHV, SCMV e HSV-1. I cerchi indicano gli eterotrimeri.]

Si conosce poco sulle proteine che costituiscono il tegumento, si pensa che esercitino importanti funzioni nella regolazione della replicazione virale [Trus et al., 2001]. L'envelope comprende le glicoproteine gB (orf8), gH (orf 22), gL (orf 47), gM (orf 39) e gN (orf 53), conservate in tutti gli Herpesviridae, e i prodotti dei geni orf K8.1, orf 68 e orf 28' specifici dell'HHV-8. Le glicoproteine dell'envelope rivestono un importante ruolo nell'adesione e nella penetrazione nella cellula ospite [Said et al., 1996].

2005]. Nel genoma sono state identificate inoltre due sequenze che funzionano da origini di replicazione litica (ori), essendo riconosciute dalla DNA polimerasi virale: una mappa fra le orf K4.2 e K5 (ori di sinistra) e l'altra fra le orf K12 e 71 (ori di destra). Questa organizzazione del genoma è caratteristica della classe B precedentemente citata, e caratterizza più Gammaherpesvirinae nel genere Rhadinovirus, come HHV-8 stesso e HSV [Russo et al., 1996].

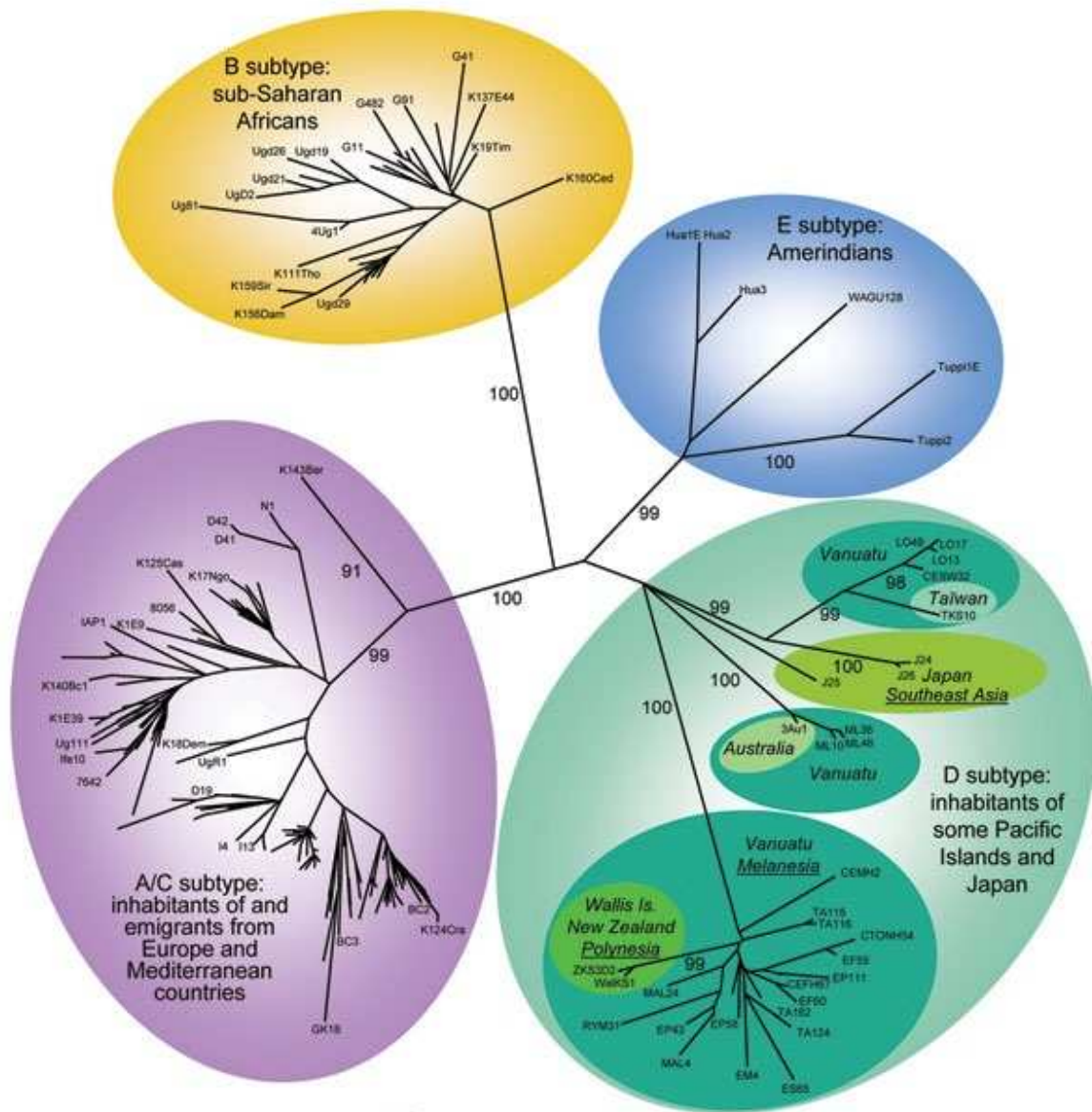
La variabilità genomica che caratterizza la glicoproteina del capsido K1 (ORF-K1) ha permesso di individuare diversi sottotipi di HHV-8 [Nicholas et al., 1998], ciascuno dei quali mostra una tipica distribuzione geografica. ORF-K1 mappa sul lato sinistro del genoma e presenta fino al 30% di divergenza [Zong et al., 1999].



[ORF-K1, Fields et al, 2007.]

I cluster individuati grazie a questa regione ipervariabile rappresentano dei sottogruppi evolutivi ben distinti: A, B, C, e D, E correlati ai flussi migratori in età moderna dall'Africa Orientale verso l'Asia meridionale e l'Oceania e prima, l'Europa e l'Asia Occidentale dopo, e sottoposti a processi di evoluzione e selezione naturale [Nicholas et al., 1998; Poole LJ et al., 2002]. Ulteriori divergenze emerse nell'analisi filogenetica dei sottogruppi, in concomitanza a piccole delezioni, hanno permesso

l'ulteriore descrizione di 13 varianti virali denominate da A1 ad A5, da C1 a C5 e da D1 a D2 [Zong J.C. et al., 1999].

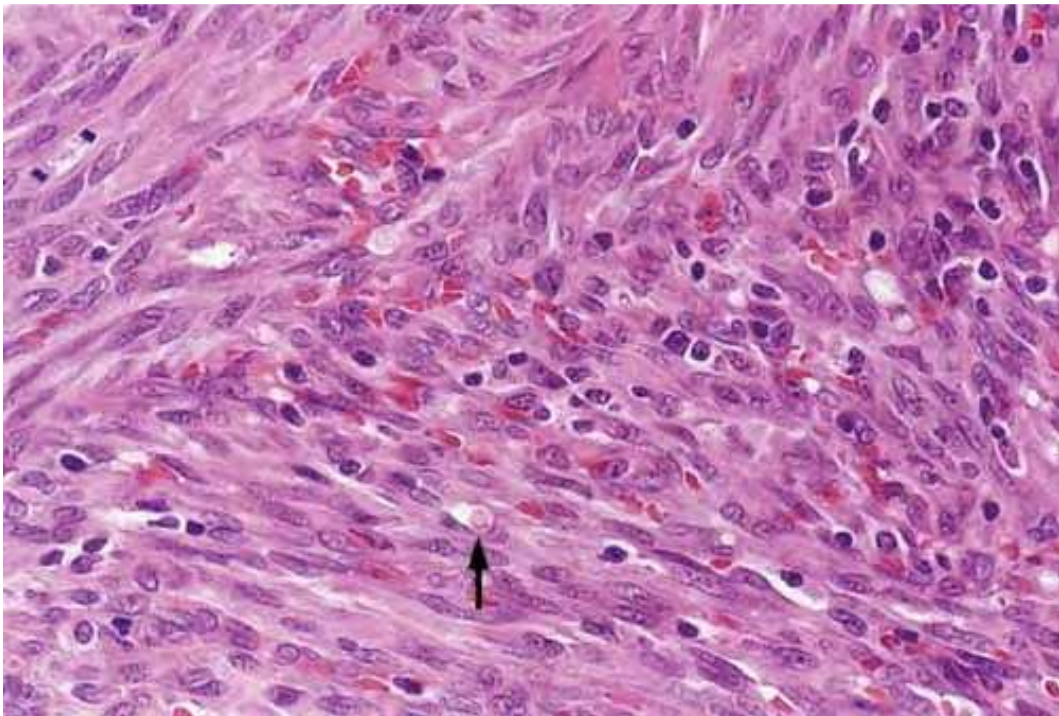


[Suddivisione in cluster dell'HHV-8, wwwnc.cdc.gov]

Numerosi esperimenti di clonaggio di stipiti virali hanno dimostrato che tali isolati sono stabili nell'ospite [Zong J.C. et al., 1999]. Tuttavia, sono state riscontrati molti genomi chimerici, soprattutto per quanto riguarda la presenza di diversi alleli P ed M alleli del gene ORF-K15, che codifica per una proteina integrale di membrana. Un punto non ancora chiarissimo è invece se i differenti genotipi siano correlati ad un particolare decorso delle patologie associate all'infezione virale; tuttavia, recenti studi hanno fornito le prime evidenze di un'associazione tra l'infezione con il sottotipo A dell'HHV-8 ed una forma più aggressiva delle patologie correlate [Mancuso et al., 2008]. La variabilità genomica

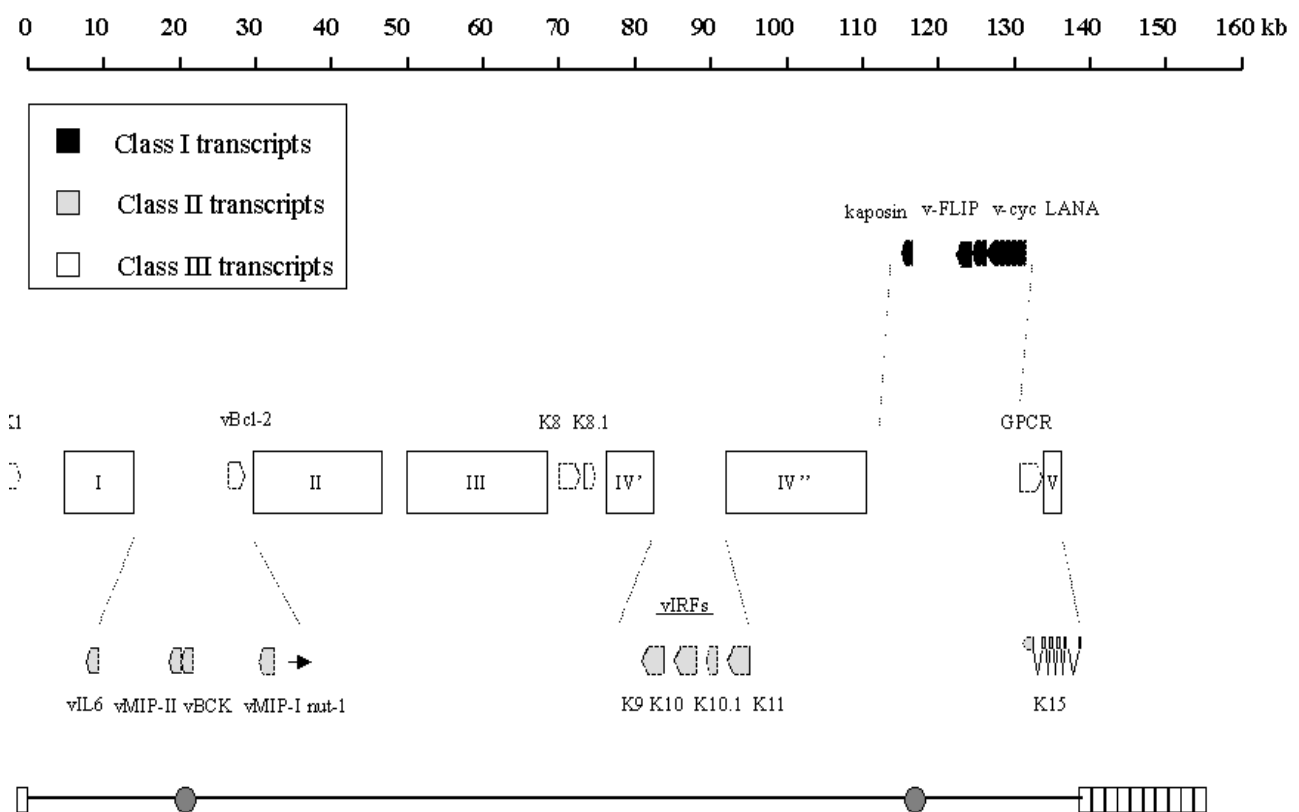
“confinata” a diverse aree geografiche suggerisce che KSHV è un virus umano di derivazione antica, che viene trasmesso in primo luogo in modo familiare, con tasso di ricombinazione conseguentemente molto basso.

Nel genoma sono presenti geni sovrapposti, open reading frame (ORF) antisenso e vengono espressi caratteristici RNA non codificanti, coinvolti nel controllo della latenza. Dei 95 geni codificanti sequenziati [Moore et al., 1996] 25 codificano per proteine uniche virali e 15 in particolare non hanno omologi in HSV, e vengono designati con la lettera K (K1-K15). L’envelope comprende le glicoproteine gB (ORF8), gH (ORF22), gL(ORF47), gM (ORF39) e gN (ORF53), che sono molto conservate nella famiglia degli Herpesviridae, ed i prodotti della ORFK8.1, ORF68 ed ORF28. La proteina codificata dalla ORFK8.1 favorisce l’adesione del virus alla superficie della cellula ospite attraverso un legame all’eparan-solfato, ed *in vivo* stimola la produzione di anticorpi neutralizzanti [Wang F.Z. et al., 2001]. Anche gB contiene un sito di riconoscimento per l’eparan-solfato e possiede il motivo aminoacidico Arg-Gly-Asp (RGD) nel suo dominio extracellulare mediante il quale risulta interagire specificatamente con l’integrina $\alpha 3\beta 1$ utilizzata dal virus come recettore per la penetrazione nella cellula ospite [Wang F.Z. et al., 2003]. Come per gli altri herpesvirus, gH e gL formano un eterodimero (gH/gL); gL è richiesta per il “*folding*” ed il trasporto intracellulare di gH. Le glicoproteine gB, gH e gL sono essenziali per la penetrazione del virus nella cellula ed, inoltre, quando vengono espresse in cellule suscettibili all’infezione da parte di HHV-8 inducono la formazione di policariociti [Pertel P.E., 2002].



[policariociti infetti, colorazione con ematossilina/eosina; www.dermaamin.com.]

I geni degli herpesvirus vengono solitamente raggruppati in due categorie mutuamente esclusive in relazione alle due differenti modalità d'infezione, latente e litica. I geni litici vengono ulteriormente classificati come immediati-precoci (codificanti proteine regolatrici), precoci (codificanti gli enzimi necessari alla replicazione del genoma virale) e tardivi (codificanti le proteine strutturali del virione maturo). **I geni dell'HHV-8 sono stati invece suddivisi in tre classi in base alla loro cinetica di espressione all'interno della cellula infettata.** I geni di classe I sono associati alla fase di latenza e comprendono ad esempio quelli codificanti per le proteine LANA (Latent Associated Nuclear Antigen), v-Cyc e v-Flip. I geni di classe II vengono espressi già in fase latente, ma l'induzione della fase litica ne incrementa esponenzialmente i livelli di espressione; ne sono esempi: il gene v-IL6, il gene codificante la kaposina (molecola chiave nella patogenesi del KS), ed il gene codificante per il trascritto PAN. I geni di classe III vengono trascritti solo in seguito all'induzione del ciclo litico e codificano per proteine coinvolte nella produzione della progenie virale [Schulz, 1998].



[Sarid et al., 1998]

La maggior parte dei geni espressi durante l'infezione litica sono omologhi di geni cellulari, e sono coinvolti in diverse vie di segnalazione, nella proliferazione cellulare, nell'apoptosi e nell'evasione del

sistema immunitario dell'ospite [Moore et al., 1996]. Tra i geni che meglio rappresentano la caratteristica "pirateria molecolare" di HHV-8 troviamo:

- **Citochine:** HHV-8 esprime un omologo dell'interleuchina6 (k2/v-IL6), che nell'uomo è un fattore di crescita delle cellule B e un regolatore negativo dell'apoptosi con effetto inibitorio su TNF- α ed IL-1. Il gene omologo virale K2 è in grado di stimolare la proliferazione cellulare tramite l'ausilio del proprio corecettore gp130 indipendentemente dalla presenza del recettore dell'IL6 (gp80). La proteina codificata dall'ORF 74 (vGPCR) invece, è una proteina transmembrana omologa al recettore umano dell'interleuchina 8 (IL-8). Le cellule che esprimono vGPCR secernono elevate quantità di fattori di crescita e citochine sia autocrine che paracrine (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, granulociti, macrofagi, VEGF, bFGF, e MCP-1) con possibilità quindi di indurre la neoangiogenesi mediante un meccanismo paracrino [Bais C., 1998]. Altri geni virali svolgono funzioni simili, interagendo in particolare con il fattore di trascrizione CBP/p300 per alterare l'espressione genica e upregolando c-myc, promuovendo la progressione del ciclo cellulare.

- **Fattori responsivi alle citochine:** una proteina dell'envelope virale (ORF45), espressa precocemente nell'infezione virale litica, è in grado di bloccare la risposta immunitaria innata interagendo con la proteina cellulare Interferon Regulator Factor 7 (IRF7) e reprimendo la trascrizione dei geni dell'interferone α e β (IFN α e β) [Zhu F.X. et al., 2002]. È stato recentemente dimostrato che questa proteina virale gioca un ruolo chiave sia nell'infezione ex novo, sia nel rilascio della progenie virale dalle cellule infettate [Zhu F.X. et al., 2006].

- **Chemochine:** sono state caratterizzate due chemochine virali, v-MIP-I e v-MIP-II, (ORF K6 e ORF K4) con omologia al MIP-alpha. Entrambe mostrano un'azione angiogenica in vitro; v-MIP-II in particolare è un antagonista delle chemochine cellulari e può inibire HIV-1 [Fields et al., 2007].

- **Recettori cellulari:** omologhi del recettore del complemento 2 (CR2 / CD21), delle molecole di adesione (NCAM) e di un antigene di superficie delle cellule T con putative proprietà immunosoppressive (OX-2)

- **Fattori di regolazione della crescita:** un omologo della ciclina D (ORF72). La v-CYC omologa impedisce il l'arresto del ciclo in fase G1 e stimola la proliferazione cellulare. Un' altra proteina virale omologa ai GPCRs (g-protein coupled receptors) stimola le vie di trasduzione del segnale legate alla proliferazione cellulare, il rilascio del fattore angiogenico VEGF (fattore di crescita endoteliale-vascolare), e ha azione oncogenica in vitro.

- **Inibitori dell'apoptosi**: un omologo di Bcl-2 (v-Bcl-2) può inibire l'apoptosi; un'altra proteina virale (v-FLIP) omologa della proteina umana codificata dall'ORF71 può invece impedire la morte cellulare Fas-mediata.

- **Fattori coinvolti nella sintesi del DNA e nella replicazione**: come altri virus erpetici, HHV-8 contiene geni virali omologhi alla ribonucleotide reduttasi (RR), alla diidrofolato reduttasi (DHFR), alla timidina chinasi (TK) e alla timidilato sintasi (TS).

- **Proteine del citoscheletro**: il ritrovamento recente di sequenze codificanti proteine virali omologhe alla β -actina umana e alla catena pesante di tipo A della miosina di classe II hanno suggeriscono un coinvolgimento del citoscheletro nel trasporto intracellulare dei capsidi virali, nell'assemblaggio e nella fuoriuscita dei virioni maturi [Zhu F.X. et al., 2005].

Le proteine codificate dai geni omologhi cellulari sembrerebbero coinvolte nei processi di trasformazione virale, essendo in grado di interferire con il metabolismo cellulare [Moore P.S. et al., 1996]. Tali geni sono stati probabilmente acquisiti dal virus nel corso della sua evoluzione attraverso fenomeni di "pirateria molecolare". Questa caratteristica peculiare dell'HHV-8 lo distingue dagli tutti altri virus erpetici che infettano l'uomo: tale meccanismo ha infatti permesso al virus di incorporare nel proprio genoma numerosi geni cellulari utili per la sua sopravvivenza, per la sua replicazione e alla base della patogenesi virale [Fakhari F.D. et al., 2002; Coscoy L., 2007; Fujimuro et al., 2007].

Durante l'infezione latente invece, 3 geni sono espressi dall'episoma virale: orf72 (v-ciclina D), ORF73 (antigene nucleare associato alla latenza, o LANA-1), e K13 (vFLIP). LANA-1 sembra funzionare in modo analogo a EBNA-1, espresso da EBV durante la latenza. LANA-1 permette la propagazione dell'episoma virale nelle cellule infettate durante la mitosi, assicurando la trascrizione mediante la sovrapposizione del DNA di HHV-8 all'istone H1 della cromatina dell'ospite [Ballestas ME et al, 1999]. Inoltre, tutti e 3 i geni giocano un ruolo fondamentale nella tumorigenesi attraverso il controllo del ciclo cellulare e la regolazione dell'apoptosi. LANA-1 in particolare reprime l'attività trascrizionale di p53, impedendo la sua capacità di innescare l'apoptosi. [Friborg J. Et al, 1999]. In maniera analoga, vFLIP impedisce l'attivazione del pathway del recettore di morte Fas e conseguentemente l'apoptosi nelle cellule infettate da HHV-8 [Irmmler M. et al, 1997]: le cellule vengono protette dall'azione citotossica dei linfociti [Djerbi M. et al, 1999]. Infine, l'espressione della ciclina virale D previene l'arresto del ciclo cellulare e della proliferazione, agendo da regolatore negativo delle chinasi ciclina-dipendente e di pRb.

Nel corso dell'infezione latente, sono trascritti 12 micro-RNA: è stato ipotizzato, ma non ancora confermato, che questi RNA abbiano la funzione di modulare l'espressione genica dell'ospite,

presumibilmente legandosi agli mRNA cellulari ed interferendo con la loro traduzione o promuovendone la degradazione, in maniera tale da favorire il persistere e il propagarsi dell'infezione [Cai X. et al., 2005]. Nel corso della replicazione litica viene trascritto un RNA poliadenilato non codificante della grandezza di 1.1 kB denominato PAN, che localizza nel nucleo e che rappresenta il più abbondante RNA virale presente nelle cellule infettate produttivamente. PAN probabilmente partecipa alla costituzione dei complessi ribonucleoproteici e modula i processi di splicing dell'RNA [Zhong W. et al., 1997; Conrad N.K. et al., 2005].

1.1.4. Ciclo replicativo

L'infezione virale inizia con il legame del capsido alla superficie delle cellule ospiti; questo fenomeno, definito adsorbimento, richiede un'interazione tra specifiche strutture di superficie del virione (antirecettori o spicole) e recettori della membrana citoplasmatica della cellula. All'adsorbimento segue poi la penetrazione del virus, che può avvenire per traslocazione del virione attraverso la membrana cellulare, per endocitosi all'interno di vacuoli citoplasmatici o, per fusione dell'involucro pericapsidico del virus con la membrana citoplasmatica cellulare. Una volta che il virus, o una sua parte, sia penetrato all'interno della cellula, l'acido nucleico virale viene liberato da quanto rimane del rivestimento proteico (decapsidazione) e inizia a essere espresso al fine di formare nuova progenie virale. I recettori per i virus possono essere i più disparati, e definiscono lo spettro d'ospite (cioè il tipo di cellule che può essere infettato). Esistono recettori specifici, e quindi il virus può infettare uno o pochi tipi cellulari, mentre esistono recettori pressoché ubiquitari, in questo caso il virus che ne fa uso ha uno spettro d'ospite molto ampio. Il contatto tra HHV-8 e le cellule ospiti è mediato dall'interazione delle **glicoproteine virali K8.1 e gB** con il glicosamminoglicano eparansolfato, che è legato covalentemente ai domini extracellulari di numerose proteine di membrana. Tale interazione non è strettamente indispensabile per l'ingresso del virus: numerosi studi ne sottolineano la reversibilità e nello stesso tempo evidenziano una maggiore efficienza di penetrazione dovuta probabilmente ad una maggiore concentrazione del virus sulla superficie cellulare, così da facilitarne l'interazione con i recettori specifici [Spear P.G. et al., 2003]. Ad oggi, gli antirecettori della membrana cellulare che sembrano mediare in maniera diretta l'ingresso dell'HHV-8 sono tre: l'integrina $\alpha 3\beta 1$, il trasportatore di scambio Cisteina/Glutamato (xCT) e la proteina CD209. Questi recettori, presenti su tipi cellulari differenti, definiscono lo spettro d'ospite caratteristico dell'HHV-8:

- Il motivo RGD della proteina virale gB interagisce con l'integrina $\alpha 3\beta 1$; questa proteina della membrana cellulare è presente sui linfociti B, sulle cellule endoteliali, su quelle epiteliali e sui

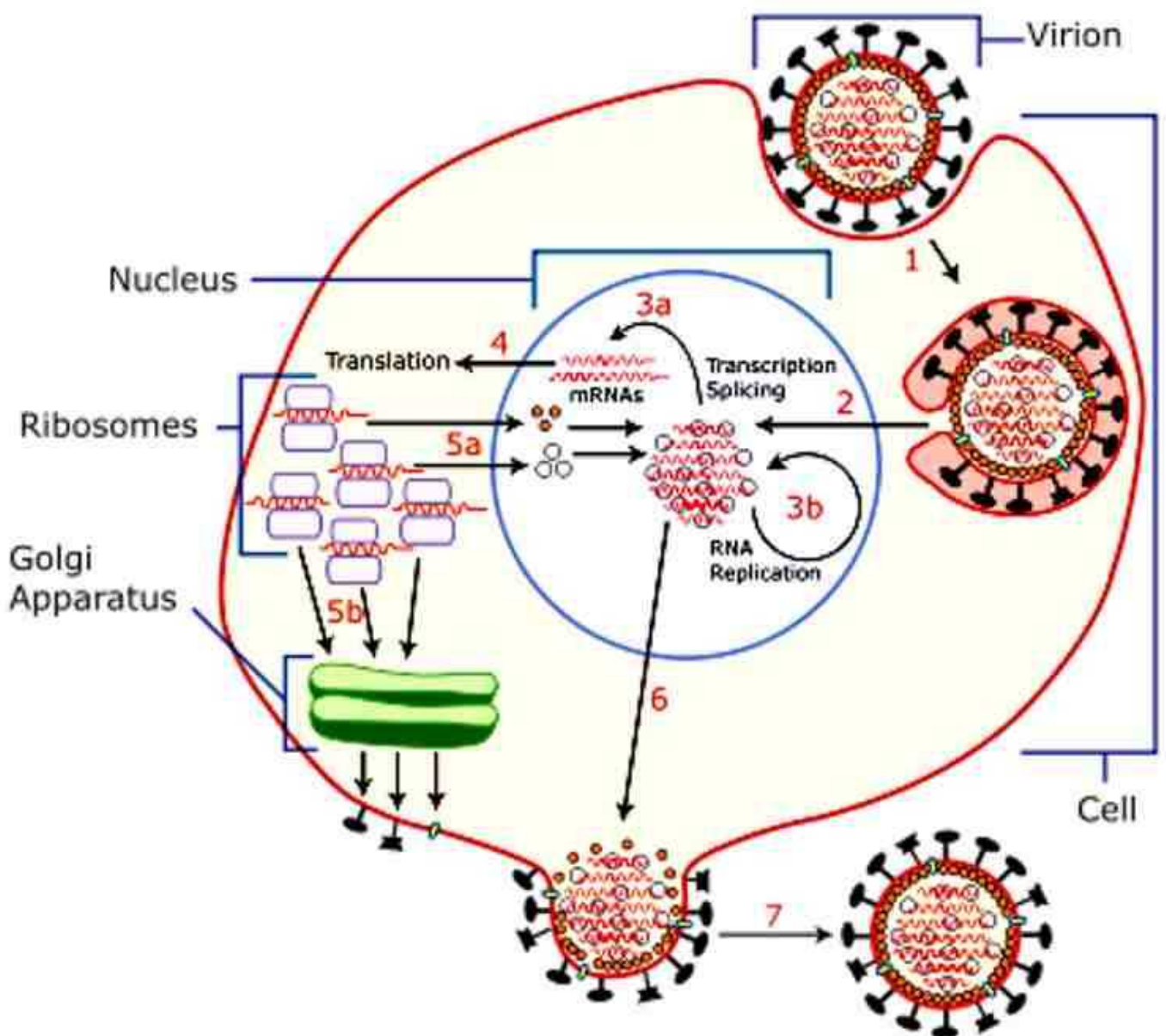
fibroblasti. Anticorpi diretti contro la proteina o forme solubili della stessa interferiscono con l'ingresso del virus nelle cellule suscettibili per l'instaurarsi di legami competitivi. L'infettività non viene ad essere però completamente annullata, perciò è palese la presenza di ulteriori recettori specifici [Akula S.M. et al., 2002].

- Il trasportatore di scambio Cisteina/Glutamato (xCT) fisiologicamente media l'ingresso della cisteina extracellulare in concomitanza della fuoriuscita del glutammato (trasporto accoppiato); questo recettore viene sfruttato da HHV-8, com'è evidenziato dall'espressione indotta che rende permissive all'infezione cellule solitamente non suscettibili. Il trasportatore forma un complesso con la proteina CD98 e con l'integrina $\alpha 3\beta 1$, che perciò potrebbe essere non un vero e proprio recettore per HHV-8, bensì parte di un complesso che media la penetrazione del virus [Kaleeba J.A. et al., 2006].
- La sovracitata proteina CD209 o DC-SIGN (Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin), che appartiene alla famiglia delle lectine di tipo C, è espressa sulla membrana delle cellule dendritiche e nei monociti-macrofagi; l'infettività di HHV-8 è completamente bloccata da anticorpi diretti contro CD209 o da forme solubili competitive della stessa. È dimostrato che questo antirecettore cellulare viene riconosciuto dalle spicole glicoproteiche dell'envelope virale [Rappocciolo G. et al., 2006]. È stato ipotizzato che la compromissione delle cellule dendritiche favorisca la persistenza del genoma virale, causando disfunzioni del sistema immunitario e delle risposte di difesa agli agenti infettivi, come la mancata presentazione degli antigeni ai linfociti T citotossici e l'inibizione dell'attività endocitica [Cirone M. et al., 2007].

La penetrazione del virus nei linfociti B e nelle cellule epiteliali prevede l'**endocitosi** delle particelle virali e il loro rilascio mediante fusione tra la membrana dell'endosoma e l'envelope virale a seguito di cambiamenti del **pH** delle vescicole. Le proteine virali **gB**, **gH** e **gL** sono responsabili di tale processo [Pertel P.E., 2002]. Non è da escludersi però che HHV-8 possa anche impiegare un meccanismo di fusione diretta con la membrana cellulare, al pari degli altri herpesvirus. Successivamente il capsido, libero nel citoplasma, viene trasportato attraverso una rete di microtubuli sino alla membrana nucleare: il DNA virale quindi viene rilasciato nel nucleo della cellula ospite sotto forma di episoma [Akula et al., 2003; Inoue N. et al., 2006]. Il genoma virale è in grado di interagire con le proteine istoniche del DNA cellulare, e crea un contatto stabile che lo rende substrato ottimale della RNA polimerasi II e capace quindi di sfruttare il macchinario replicativo della cellula. Solitamente, dopo il rilascio in forma di episoma, HHV-8 entra in latenza, esprimendo un numero esiguo di geni (LANA, vCyc, vFLIP e Kaposina), importanti proprio per il mantenimento di questo stato. La percentuale di cellule che esibisce un'infezione litica spontanea è invece molto bassa (3%). La proteina virale LANA gioca un ruolo

fondamentale nell'instaurarsi dello stato di latenza, poiché è scientificamente dimostrato che recluta dei repressori trascrizionali dei geni espressi nel ciclo litico [Schultz, 1998; Ganem D., 2007]. È stato dimostrato inoltre che la proteina LANA si lega simultaneamente alle TR del DNA virale e cromosomi mitotici della cellula ospite, mediando la segregazione degli episomi alle cellule figlie. La regione N-terminale della LANA lega gli istoni H2A e H2B cellulari, mentre la regione C-terminale lega le TR virali: entrambe le regioni N- e C-terminali di LANA sono quindi essenziali per la persistenza del genoma virale in forma di episoma [Vázquez Ede L. et al, 2013]. L'espressione dei geni litici è invece promossa dalla proteina virale RTA (Replication and transcription activator, ORF50), che lega il DNA virale stesso tramite il dominio N-terminale e, con il dominio C-terminale, interagisce con i fattori di trascrizione cellulari come STAT3 e RBP-J [Deng H. et al, 2007]. L'over-espressione di RTA mediante un promotore eterologo è sufficiente per indurre il ciclo litico e la replicazione di HHV-8, che risulta nella produzione di progenie virale matura e infettante. Allo stesso tempo la deplezione di parte del locus ORF50 impedisce la sintesi del DNA virale e la produzione di progenie infettante nonostante l'induzione chimica con TPA [Xu Y. Et al, 2005]. Recenti studi hanno dimostrato che la proteina RTA attivare l'espressione dell'ORF59 e la conseguente codificazione dei fattore essenziale per la replicazione del DNA virale. Questo meccanismo è mediato proprio dall'interazione tra RTA e il fattore di trascrizione RBP-J [Liu Y. Et al, 2008] nonché tra RTA e altri elementi regolativi cis-agenti presenti nei promotori virali. Analisi dei siti situati immediatamente a monte di ORF70 (timidilato sintasi), ORF19 (proteina tegumento), e ORF47 (glicoproteina L) hanno evidenziato l'esistenza di promotori RTA-sensibili, che sono stati convalidati mediante mRNA isolati da cellule infettate da HHV-8 e sottoposti riattivazione litica. In particolare, ORF19 viene espressa in concomitanza dei geni *late*, indicando che RTA regola tutte le tre fasi del programma litico [Persson LM., Wilson AC., 2010]. La trascrizione dei geni segue modalità comuni agli altri herpesvirus: vengono trascritti i geni immediati precoci, i geni precoci e i geni tardivi in una successione ben ordinata di eventi, che porta alla trascrizione del genoma di HHV-8 e alla formazione e rilascio della progenie virale. I geni precoci codificano per enzimi deputati in maniera diretta alla replicazione del genoma virale (timidina-kinasi, DNA-polimerasi ed elicasi) e per proteine peculiari come MTA (mRNA transcript accumulation, orf 57), che promuovono il trasporto degli mRNA virali dal nucleo al citoplasma e mediano il blocco del ciclo cellulare in fase G1, favorendo in questo modo la sintesi del DNA virale a scapito di quello cellulare. Altri geni come i modulators of immune recognition MIR1 (orfK3) e MIR2 (orf K5), SOX (orf37) e orf1, orfK15 e orf74 sono coinvolti nell'inibizione della sintesi delle proteine cellulari o nella modulazione della trasduzione del segnale: questi trascritti precoci mediano i meccanismi di evasione dalla risposta immunitaria specifica dell'ospite [Ganem D., 2007]. Poco si sa riguardo ai meccanismi di espressione dei geni tardivi, i cui prodotti sono essenzialmente proteine strutturali del capsido, del

tegumento e dell'envelope. Il genoma virale neofornato probabilmente viene introdotto nel capsido in un processo che avviene nel nucleo della cellula ospite, e successivamente il virus acquisisce il tegumento e l'envelope per gemmazione dalla membrana nucleare interna e le glicoproteine virali maturano infine nel trasporto attraverso il reticolo endoplasmatico e l'apparato di Golgi [Dourmishev et al., 2003]. Le proteine implicate nell'adsorbimento del virus alle cellule ospiti (K8.1 e gB) sono in quest'ultima fase indispensabili per la fuoriuscita della progenie virale. L'inibizione della loro espressione ostacola il normale rilascio dei virioni mediante gemmazione.

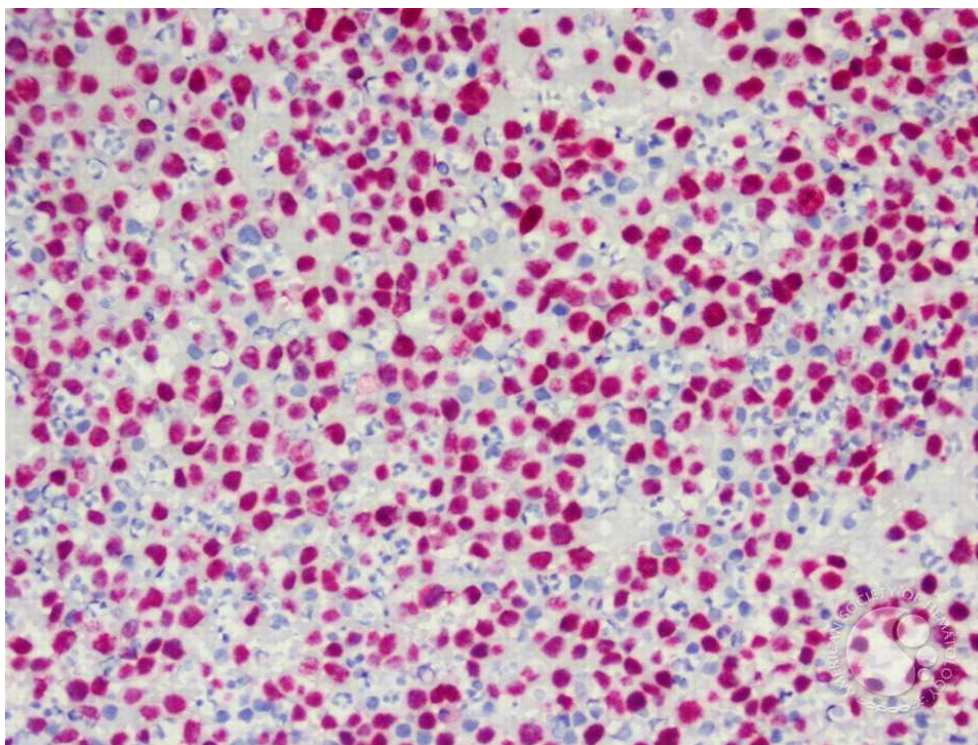


[www.portalsaofrancisco.com].

1.2. Le patologie HHV-8 correlate, clinica e istologia.

1.2.1. Il Linfoma ad Effusione Primaria

Il Pel (Primary effusion lymphoma) è un raro linfoma che può originare nelle cavità corporee come la pleura, il peritoneo o il pericardio, in assenza di una vera e propria massa tumorale. Questi linfomi sono caratteristici solo dei soggetti immunodepressi e le cellule tumorali sono infettate in forma latente dal virus HHV-8, che codifica per proteine omologhe a diverse oncoproteine note, tra cui la ciclina D1. In rari casi, i pazienti non sono soggetti immunocompromessi, bensì individui anziani provenienti da regioni dove HHV-8 è endemico, come ad esempio il bacino del mediterraneo [Said J. Et al, 2008].



[immunoistochimica per HHV-8 positiva in cellule compatibili con una diagnosi di linfoma effusione primaria;

[imagebank.hematology.org.](http://imagebank.hematology.org/)]

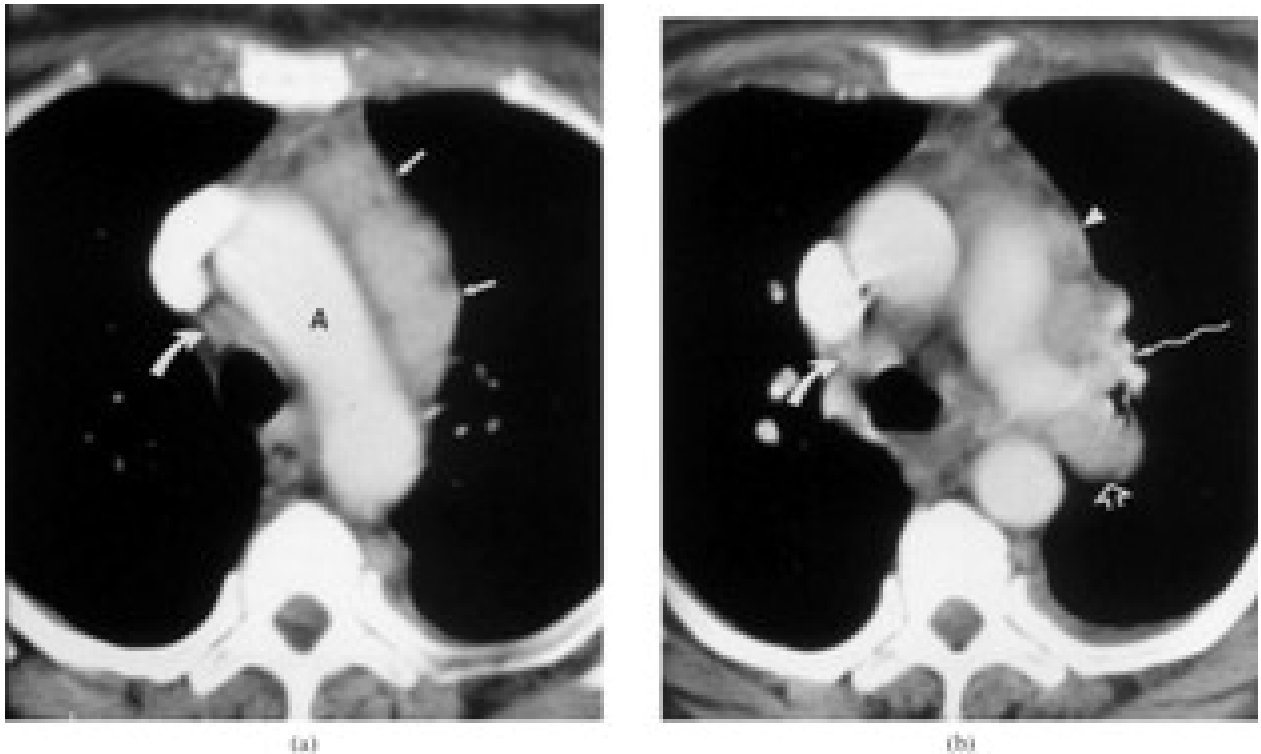
In altri casi, le cellule tumorali contengono anche il genoma del virus di Epstein-Barr (EBV) [Cesarman E. et al, 1995]. Nella maggior parte dei casi, in associazione ai versamenti linfomatosi peritoneali, pleurici e pericardici, manifestazione più evidente e grave della patologia, non sono presenti masse linfomatose extranodali. I sintomi del PEL correlano con la cavità del corpo interessata e dipendono dalla massa del versamento maligno. La malattia pleurica o pericardica si associa a dispnea, mentre la malattia peritoneale causa la distensione dell'addome. Questo tumore presenta diverse morfologie e immunofenotipi: analisi citologiche rilevare la presenza di grandi cellule neoplastiche clonali (con aspetto immunoblastico, anaplastico o plasmablastico), con grossi nucleoli, nuclei rotondi o irregolari e citoplasma occasionalmente vacuolizzato [KYM Y. et al, 2014].

La diagnosi differenziale si pone con il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL), il linfoma di Burkitt. In tutti i casi di Pel viene rilevato l'antigene nucleare LANA-1, che conferma la presenza dell'HHV-8 nei campioni tissutali. Le proteine virali che hanno un ruolo trasformante scientificamente dimostrato nel PEL, oltre a LANA-1 stesso, includono: v-ciclina, vFLIP (K13), LANA-2 (vIRF-3), VIL-6, K1, kaposina, e K5. Queste proteine hanno capacità di indurre la proliferazione delle cellule ospiti, mostrano attività promitotica, anti-apoptotico, pro-infiammatoria, e angiogenica. Stimoli sconosciuti possono indurre HHV-8 ad effettuare lo switch dallo stato latente allo stato litico, con conseguente produzione di virioni maturi e infettivi, che vengono rilasciati nella saliva. È dimostrato infatti che il 25% delle cellule derivate da lesioni del PEL esprimere HHV-8 i geni di fase litica di HHV-8, che potrebbe essere alla base dell'infezione de novo di cellule sane.

1.2.2. La Malattia Multicentrica Di Castleman.

L'iperplasia Linfonodale Angiofollicolare o Morbo di Castleman (Castleman's Disease, CD) è stata descritta per la prima volta nel 1954 da Beniamino Castleman. È una patologia rara della quale ancora si discute sulla etiopatogenesi e sulla istomorfologia. Lo scopritore ha considerato questa anomalia come una iperplasia dei linfonodi, causata da un processo infiammatorio cronico. La letteratura riporta tre teorie etiopatogenetiche: teoria infettivo-flogistica, amartomatosa e neoplastica. La casistica più numerosa è stata pubblicata negli ultimi 60 anni da Castleman stesso, Koller e Hochhozer, che hanno descritto due distinti tipi istologici: vascolare-ialino e a plasmacellule. Questa malattia ha assunto una rilevanza medico-scientifica sempre maggiore negli ultimi anni, a causa della sua associazione con l'HIV e HHV-8 (sarcoma di Kaposi) e il suo potenziale di progredire in Linfoma a cellule B, che costituisce il 40% circa dei linfomi in soggetti adulti e sono caratterizzati dalla proliferazione incontrollata dei linfociti B a livello degli organi linfatici (linfonodi, midollo osseo, milza, fegato) e/o delle sedi extralinfonodali.

La CD si presenta con uguale frequenza in entrambe i sessi, manifestandosi nella seconda-quarta decade d'età; eccezionale è la comparsa nell'infanzia. I quadri clinici possono essere vari e istologicamente differenti. La forma più frequente è definita "monostazionale", poiché coinvolge un solo linfonodo o piccoli gruppi di un'unica stazione linfonodale, che nel 70% dei casi si rivela essere intratoracica (ilo polmonare, mediastino, timo).



[Iperplasia di linfonodi in Castleman's disease, www.malattiaclinica.com.]

Un terzo di questi tumori presenta mutazioni puntiformi del promotore di BCL6 e in un'ulteriore frazione si evidenziano riarrangiamenti veri e propri del gene. Sia la mutazione puntiforme che quella cromosomica causano aumentati livelli di espressione della proteina BCL6, che è un importantissimo regolatore trascrizionale dei linfociti B [Ota Y. Et al, 2014]. Il gene bcl-6 codifica una fosfoproteina nucleare di 95 kD contenente sei sequenze zinc-finger C-terminali, che ha funzioni di repressore trascrizionale. La proteina bcl-6 nella linea B è espressa durante la reazione centrollicolare ed è fondamentale per lo sviluppo e la funzionalità del centro germinativo. Il gene bcl-6 può essere alterato da traslocazioni che comportano la sostituzione del promotore con sequenze eterologhe che derivano dal cromosoma partner della traslocazione (osservate in circa il 30% dei linfomi B a grandi cellule e 10% dei LF). Altre modificazioni del gene, considerate però "fisiologiche" e caratteristiche della transizione della cellula B nel centro germinativo, sono rappresentate da mutazioni somatiche puntiformi, concentrate nella regione non codificante in 5'. Queste modificazioni sembrano essere simili per frequenza, distribuzione e natura a quelle che occorrono nel processo ipermutazionale delle Immunoglobuline: non è ancora stato perciò chiarito il vero significato patogenetico e prognostico della presenza di queste mutazioni [Barua A. et al, 2014]. L'espressione nucleare del prodotto bcl-6 invece è considerata un valido marcatore rappresentativo di una popolazione linfoide B neoplastica e indica la natura centrollicolare della patologia [Soumerai JD. et al, 2014].

1.2.1 Il Sarcoma di Kaposi

Il Sarcoma di Kaposi è una neoplasia multifocale di origine vascolare, che si manifesta clinicamente con macule, papule e noduli di colorito rosso violaceo a componente emorragica, localizzati alla cute, alle mucose e ai visceri [Hengge UR et al., 2002]. Deve il suo nome al dermatologo ungherese che per primo descrisse compiutamente questa forma di tumore, Moritz Kaposi (1837-1902), professore di dermatologia dell'università di Vienna.



[www.dijitalimaj.com.]

A causa della sua manifestazione prevalente tra gli individui di sesso maschile di età avanzata e della distribuzione geografica tra gli abitanti del bacino del Mediterraneo (Italia, Grecia) e i paesi dell'Africa equatoriale, venne in principio considerato una malattia rara [Laor Y. et al., 1979]. Successivamente vennero descritti nuovi casi di KS in pazienti sottoposti a trapianto d'organo [Penn I., 1988] e in soggetti infetti da virus HIV: l'incidenza del KS era circa trecento volte più alta nei pazienti immunocompromessi rispetto alla popolazione sana. Nuovi studi epidemiologici hanno evidenziato che il KS avesse un agente eziologico infettivo e sessualmente trasmissibile [Beral V. et al., 1990]. La recente identificazione di sequenze di DNA dell'HHV-8 nelle cellule fuse ed endoteliali isolate dalle lesioni cutanee caratteristiche del morbo di Kaposi ha indicato definitivamente un ruolo primario di questo virus nella patogenesi della neoplasia [Beral V. et al., 1990; Chang et al., 1994]. È stato

ipotizzato che nella reazione immunologica, che si sviluppa nei confronti del virus HHV-8 acquisito per infezione esogena *de novo* o già presente nell'organismo, e ri-attivato da vari stimoli (endocrini, immunologici, microbiologici, farmacologici), si genererebbero mediatori chimici in grado di stimolare una proliferazione delle cellule endoteliali (iperplasia policlonale infiammatoria); queste cellule produrrebbero a loro volta una serie di citochine infiammatorie causa della loro stessa crescita e selezione di cloni cellulari con caratteristiche neoplastiche [Judde J.G. et al., 2000]. L'insieme di questi eventi culminerebbe nello sviluppo della tipica lesione del morbo di Kaposi. Diversamente da altri tipi di neoplasie, che di norma vengono suddivisi in sottogruppi basati sulle caratteristiche delle cellule cancerose, il sarcoma di Kaposi viene generalmente suddiviso sulla base di criteri clinico-epidemiologici. In base a detti criteri si distinguono quindi quattro tipologie principali:

- sarcoma di Kaposi classico: colpisce soggetti adulti di sesso maschile (con un rapporto tra maschi-femmine di 3:1) di età compresa tra i 50 e gli 80 anni circa. Le popolazioni interessate sono quelle che abitano nelle regioni del Mediterraneo, nell'Europa orientale (Ebrei aschenaziti) e in quella settentrionale (in particolare Norvegia e Svezia). La notevole incidenza di questa forma in determinate zone geografiche e in particolari etnie suggerisce una associazione tra fattori genetici predisponenti e particolari condizioni ambientali [Stallone G. et al., 2000];

- sarcoma di Kaposi epidemico: è riscontrato tipicamente nei soggetti che hanno già contratto l'infezione da HIV e che, conseguentemente, hanno un sistema immunitario indebolito. I soggetti sieropositivi o affetti da AIDS con concomitante infezione da HHV-8 hanno probabilità molto più elevate di sviluppare la neoplasia rispetto alla popolazione generale sana [Seybold U. et al., 2008];

- sarcoma di Kaposi endemico: si manifesta tra le popolazioni dell'Africa equatoriale, territorio in cui il virus HHV-8 è particolarmente diffuso; contrariamente alla forma classica, interessa soggetti di età inferiore ai 40 anni Il rapporto maschi-femmine è 10:1, ma bisogna sottolineare che nelle donne il decorso è più grave [Minhas V., Wood C., 2014];

- sarcoma di Kaposi iatrogeno: i soggetti sottoposti a trattamenti farmacologici immunosoppressivi perché sia evitato il rigetto degli organi solidi trapiantati sono a forte rischio di contrarre l'infezione da HHV-8 e sviluppare conseguentemente la neoplasia. Si è osservato che l'incidenza del sarcoma di Kaposi iatrogeno è maggiore nei soggetti di sesso maschile sottoposti a terapia con ciclosporina A, rispetto a quelli trattati con farmaci immunosoppressivi differenti [Hodak E et al, 1999].

Nonostante alcune differenze cliniche ed epidemiologiche, tutte le forme del sarcoma di Kaposi presentano caratteristiche istopatologiche molto simili, tra le quali infiammazione, neo-angiogenesi, edema, infiltrazione di cellule linfomononucleate e proliferazione di caratteristiche cellule a morfologia

fusiforme, definite spindle cells (SC), che sono considerate come cellule tumorali sarcoma del Kaposi in stadio avanzato (nodulare). Studi di microscopia elettronica e immunoistochimica hanno recentemente confermato che le cellule fusiformi hanno origine dalla linea cellulare endoteliale. La maggior parte delle SC esprime infatti marcatori di superficie caratteristici delle cellule endoteliali dei vasi linfatici (FVIII-RA, VE-caderina, CD34, CD3); altre esprimono invece recettori tipici dei macrofagi e delle cellule dendritiche (CD14, CD68, CD45, CD1a) [Gessain A. et al., 2005]. Si evince pertanto che il KS non presenta le caratteristiche istologiche di un classico tumore monoclonale che si genera dalla proliferazione incontrollata di un singolo tipo cellulare. Solo recentemente, studi effettuati mediante tecniche di ibridazione e di immunoistochimica hanno dimostrato che l'HHV-8 è presente nelle cellule fusiformi in tutte le fasi della malattia (patch, placca, nodulo): va però sottolineato che, mentre i geni legati alla latenza sono espressi in quasi tutte le spindle cells, solo una piccola frazione esprime marker di replicazione litici. Ciò supporterebbe il modello in base al quale questo tumore inizia come una malattia policlonale (una vera e propria iperplasia policlonale) seguita da una specifica selezione mono/oligoclonale che progredirebbe fino a diventare un vero e proprio tumore originato, per l'appunto, da un singolo clone infetto [Gessain A., Duprez R., 2005].



[Lesioni delle mucose nel Sarcoma di Kaposi; www.hiv.va.gov.].

1.3 Ruolo dell'HHV8 nella patogenesi del Sarcoma di Kaposi

1.3.1. Proteine oncogeniche e sviluppo del Sarcoma

La cancerogenesi è un processo multifattoriale e multifasico complesso, in cui fattori di natura genetica ed epigenetica contribuiscono con un'importanza non sempre ben compresa e definita nella trasformazione delle cellule e nell'acquisizione di un fenotipo neoplastico [Isaac Berenblum, 1977]. Nell'ambito delle ricerche di Genetica e Diagnostica Molecolare moderne, viene studiato il ruolo nella cancerogenesi di mutazioni a carico di oncogeni ed oncosoppressori e delle alterazioni dei meccanismi che presiedono al ciclo cellulare e all'apoptosi in diversi tipi di neoplasie. Tra i virus responsabili di neoplasie nell'uomo, particolare interesse è sempre stato rivolto ai retrovirus umani e ai virus erpetici nel processo di trasformazione delle cellule emopoietiche. Anche nelle neoplasie associate a virus oncogeni il processo di trasformazione neoplastica è un fenomeno multistep, in cui alterazioni di numerose vie metaboliche e anomalie molecolari legate alla presenza del virus interagiscono con elementi propri dell'ospite. La cancerogenesi è infatti sempre primariamente associata all'integrazione del genoma virale nel genoma cellulare (causa di mutagenesi inserzionale) o alla **persistenza funzionale** in esso: le cellule non permissive non replicano il virus infettante e subiscono la trasformazione neoplastica in quanto si verificano eventi molecolari atti a determinare il fenotipo tumorale.

La proteina **LANA (orf73)** è espressa durante l'infezione latente (vedi **1.1.4. Ciclo replicativo**), e la sua presenza è rilevata soprattutto nelle Spindle Cells nel KS, ma anche in quelle del linfoma ad effusione e della malattia multicentrica di Castleman. Essendo questa proteina particolarmente immunogenica, anticorpi anti-LANA sono i principali marker sierologici d'infezione da HHV-8. La sua lunghezza è di 1162 aa, e presenta una regione centrale ricca di aminoacidi altamente acidi (in particolare la glutammina), mentre i domini C- ed N-terminale basici sono caratterizzati da un motivo a cerniera di leucine, preposto alla dimerizzazione [Garber A.C. et al., 2002]. Nelle cellule latentemente infette da HHV-8 viene rilevata la presenza di più copie extracromosomiche del genoma virale, chiuse in forma circolare grazie a legami covalenti o episomi. La principale funzione finora caratterizzata di LANA è quella di mediare la persistenza del DNA virale in forma episomiale, legandosi alle sequenze ripetute terminali (TR) del DNA virale stesso tramite il dominio C-terminale e al DNA cromosomico della cellula ospite tramite il dominio N-terminale, garantendo così la replicazione dell'episoma virale in concomitanza ad ogni divisione cellulare e favorendo la segregazione del DNA dopo la mitosi in entrambe i cloni cellulari [Ballestas ME., Kaye KM., 2011]. Per realizzare queste funzioni, LANA si associa con diverse proteine della cellula ospite, tra cui proteine istoniche (H2A e H2B) e proteine enzimatiche coinvolte nella replicazione del DNA. È interessante notare che un cospicuo numero di proteine associate al LANA localizzano sulle regioni pericentromeriche o dell'eterocromatina e mediano

i contatti con il DNA genomico. Queste proteine includono MeCP2, Sin3A, HP1 α , ORC2, ORC6 e SUV39H1 [Verma S.C. et al., 2006]. Oltre a mantenere l'episoma virale stabile, LANA ha effetti regolatori trascrizionali che influiscono sulla crescita e proliferazione cellulare. È noto da tempo che LANA sequestra p53 e pRb, promuovendo la crescita ed espansione delle SC, e stimola l'accumulo citosolico di β -catenina che porta all'induzione dei geni coinvolti nella proliferazione cellulare (c-myc, c-jun, ciclina D) [Radkov S.A. et al., 2000; Fujimuro M. et al., 2003]. LANA modifica l'espressione genica delle cellule attraverso interazioni con fattori di trascrizione [An J. et al., 2004; Cai Q. et al., 2006], mediando silenziamento epigenetico [Shamay M. et al., 2006], e modulando i livelli di microRNA cellulari (miRNA) [Campbell M. et al., 2014]. Nuove interazioni, convalidate mediante *Protein array screening* e saggi di immunoprecipitazione, sono state scoperte con la Tat interattiva proteina 60 (TIP60), con la proteina fosfatasi 2A (PP2A), e con le proteine A implicate nella replicazione cellulare (RPA). L'interazione con TIP60 (che è un modulatore della struttura della cromatina) potrebbe giocare un ruolo chiave nell'attivazione della risposta enzimatica ai danni del DNA. L'interazione con la PP2A fosfatasi suggerisce un ulteriore meccanismo di alterazione (LANA-mediate) dello stato di fosforilazione delle proteine nucleari delle cellule KSHV-infette, e infine interazioni con proteine che legano i telomeri fanno speculare che LANA possa avere un impatto anche sulla lunghezza dei telomeri cellulari [Shamay M. et al., 2012].

La ciclina virale **vCyc (orf72)**, che è un omologo della ciclina cellulare D, induce lo stress replicativo nelle cellule endoteliali, che ha come conseguenza la senescenza e l'attivazione della risposta al danno del DNA. L'associazione di cicline cellulari con le chinasi ciclina-dipendenti (CDK) porta alla formazione di un oloenzima attivo che può fosforilare molte molecole bersaglio coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare. La vCyc è un omologo virale della ciclina D cellulare, in grado di stimolare cdk6 che a sua volta fosforila la proteina retinoblastoma e l'istone H1 [Chang et al., 1996]. È stato dimostrato che su questo oloenzima non interferiscono i normali inibitori delle CDK quali p16Ink4a, p21Cip1 e p27Kip1 e la sua azione stimola la progressione del ciclo cellulare da G1 a S nei fibroblasti quiescenti [Swanton et al., 1997], bypassando anche i checkpoint di fase G1 [Mann et al., 1999]. La vCyc può attivare inoltre la trascrizione della ciclina umana A in cellule quiescenti [Duro et al., 1999]: ciò dimostra un'azione pleiotropica che culmina nella fosforilazione di un maggior numero di proteine bersaglio rispetto a quelle che sono fisiologicamente sotto il controllo dell'omologo cellulare e di conseguenza viene indotta la proliferazione cellulare [Koopla S. et al., 2007].

Le cellule che esprimono **v-FLIP** sono protette dall'apoptosi indotta dal recettore CD95 [Thome et al., 1997]. Questa proteina inibisce l'attivazione della caspasi e quindi impedisce alle cellule di andare incontro all'apoptosi mediata da Fas; sembra inoltre che vFLIP favorisca la sopravvivenza delle cellule

fusiformi tumorali grazie alla capacità di promuovere indirettamente l'espressione di differenti geni con attività antiapoptotica, facendo aumentare la concentrazione del fattore di trascrizione NFκB (Nuclear factor-kappa B) [Sun Q. et al., 2003].

Le tre proteine descritte fanno parte dei geni di classe I.

Tra quelli di classe II è stata dimostrata azione trasformante e oncogena per vIL-6 (ORFK2), vMIP-I, vMIP-II and vBcl (ORFs K4, K6 e K4.1), T1.1/ nut-1 RNA (ORFK7), vBcl-2 (ORF16), ORF50 and ORFK8, ORFK8.1, vIRF-1 (ORFK9) and vIRF-2 (unassigned ORF), LAMP (ORFK15) e T0.7 (ORFK12) [Moore P.E. et al, 1996; Zhong W. Et al, 1996]. L'importanza di alcune di queste proteine, è stata discussa nel paragrafo 1.1.3. Genoma Virale e variabilità.

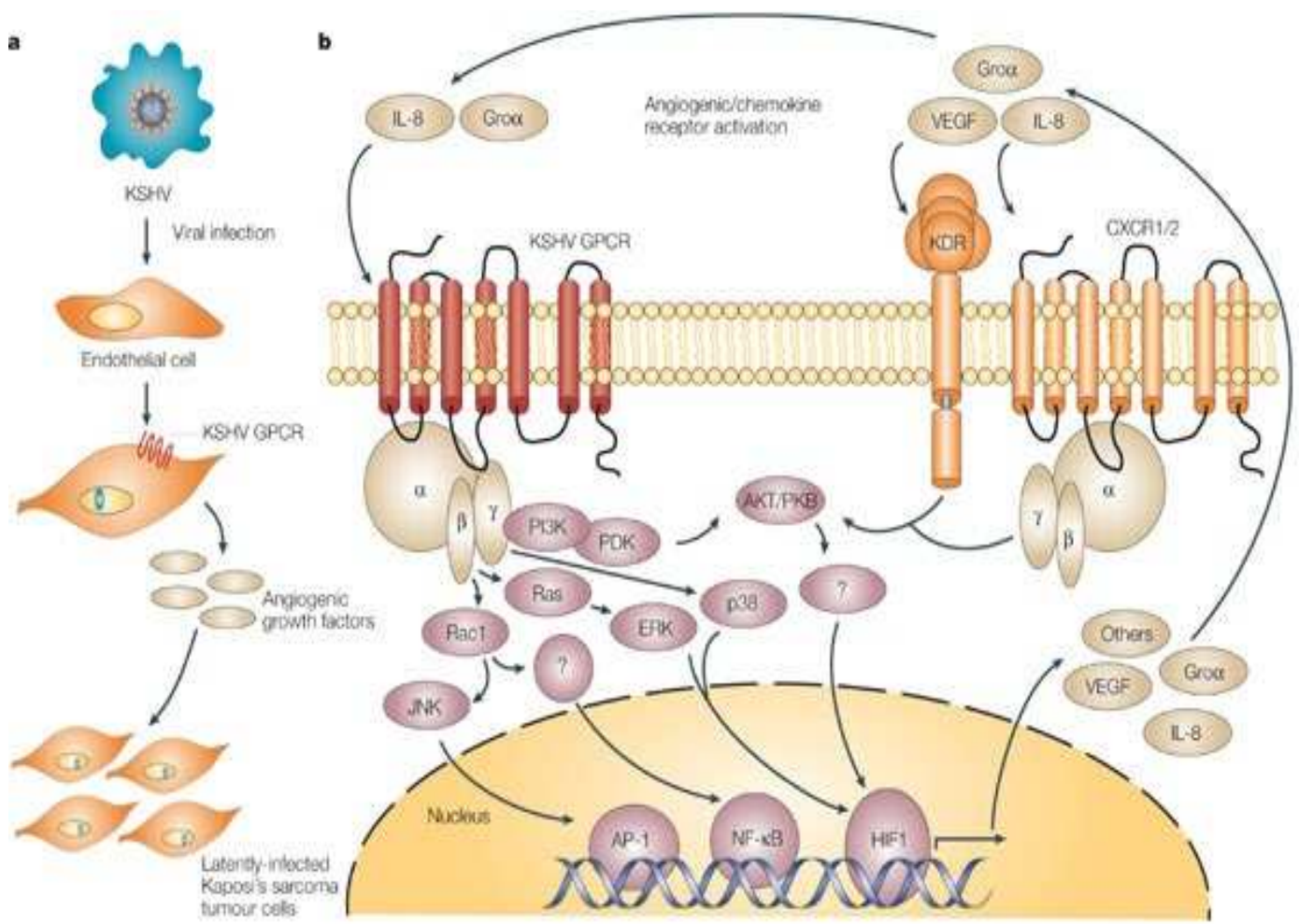
Il gene **T0.7 (ORFK12)** codifica per una piccola proteina denominata Kaposina, il cui RNA è espresso in abbondanza nelle cellule BCBL-1 indotte con TPA (che stimola chimicamente la riattivazione virale) ed è rilevabile nella maggior parte dei tumori KS, nelle diverse varianti epidemiologiche [Staskus et al., 1997]. L'iniezione sottocutanea della Kaposina in topi nudi prodotta sarcomi altamente vascolari e indifferenziati [Muralidhar et al., 1998]. Questa proteina inoltre lega una MAP Kinasi (Mitogen-activated protein kinase) della cascata di segnalazione di p38, coinvolta nell'instaurarsi di risposte proinfiammatorie [McCormick C. et al., 2005]. Inoltre, incrementa la stabilità di alcuni mRNA cellulari che presentano un alto contenuto in AU nella regione 3' non tradotta (ARE, AU-rich elements), determinando un aumento delle citochine infiammatorie TNFα, IL-1β ed IL-6 e di fattori angiogenici (VEGF) e oncogeni come c-myc, che sono critici per lo sviluppo del KS [Wang H.W. et al., 2005].

I geni trasformanti di Classe III sono infine ORFK1 e ORF74 (GPCR/v-IL8R).

Come è stato precedentemente discusso, **ORFK1** presenta un elevato grado di variabilità, ed è una regione sottoposta a pressione selettiva. L'ipotesi relativa alle sue proprietà trasformanti è stata formulata per analogia con le proteine di altri herpesvirus, analoghe rispetto alla posizione genomica: la proteina trasformante saimiri (STP) di HVS e la proteina latente di membrana 1 (LMP-1) di EBV. Evidenze sperimentali derivano, nel modello murino, dalla trasfezione della proteina che induce trasformazione [Lee H. et al, 1998].

KSHV-GPCR invece attiva due proteine chinasi cellulari, JNK/SAPK e p38MAPK, che stimolano a loro volta l'attivazione di numerose citochine infiammatorie (TNFα, IL-1β, IL-6 ed IL-12); sono note per indurre l'angiogenesi e stimolare la produzione di VEGF nelle cellule fusiformi del KS [Bais et al, 1998; Polson A.G. et al., 2002]. GPCR è espressa soltanto in una sottopopolazione di cellule fusiformi caratteristiche del KS, interessate da replicazione litica [Kirshner et al., 1999].

Ciascuna di queste proteine, agendo singolarmente o in maniera sinergica, contribuisce alla progressione della malattia ed è in grado di esercitare un potere trasformante *in vitro*, ma non è sufficiente *in vivo* a riprodurre le lesioni caratteristiche del KS nel modello murino. Sebbene il mantenimento del genoma virale sotto forma di episoma, la produzione di citochine infiammatorie e la de-regolazione del ciclo cellulare promosse dall'espressione dei geni virali siano indispensabili per la progressione del KS, i fattori primariamente scatenanti sono ancora sotto indagine.



[Cascata di eventi indotta dall'infezione da KSHV; www.nature.com.]

1.3.3. Evasione della risposta immune

L'instaurarsi di un'infezione persistente è alla base del Sarcoma di Kaposi, della Malattia Multicentrica di Castelman e del Linfoma ad Effusione Primaria. I virus che causano infezioni croniche devono sfuggire ai meccanismi difensivi primari dell'immunità innata nonché alle risposte immunitarie adattative dell'ospite, in modo tale da far perdurare l'infezione nel tempo. Il primo meccanismo "indiretto" o "passivo" di immunoevasione attuato da HHV-8 è la latenza del genoma, poiché in questa fase l'espressione delle proteine virali è repressa/esigua, in modo tale da limitare il riconoscimento degli antigeni estranei da parte dei Linfociti B e la loro presentazione ai Linfociti T citotossici mediante l'MHC di classe I [Moore P.S., Chang Y., 2003]. Lo switch alla fase litica, che comporta la disseminazione del virus nell'ospite, è invece accompagnato da una strategia di immunoevasione "attiva". Molti virus impiegano un ampio repertorio di proteine durante la replicazione per bypassare il controllo dell'ospite, ma HHV-8 possiede delle caratteristiche uniche dovute alla sua evoluzione e ad eventi di pirateria molecolare che gli permettono inoltre di sfruttare al meglio il macchinario replicativo cellulare. Molti dei geni virali omologhi dei geni cellulari discussi precedentemente codificano proteine che inibiscono direttamente l'immunità innata e l'immunità adattativa dell'ospite. Altre proteine virali già descritte hanno come bersaglio la proteina retinoblastoma e il soppressore tumorale p53 o esercitano i più disparati effetti inibitori sul sistema immunitario (KCP, KIS, vIL-6, ORF45 PROTEIN e vIRF1). L'attività di LANA-1 come repressore trascrizionale che interferisce con l'attività di p53 è stata già citata. In maniera analoga, anche la proteina vIRF1, oltre alle sue proprietà note di inibizione dell'IFN, ha dimostrato capacità di legare e inattivare p53 [Nakamura H. et al, 2001]. Questo effetto può essere in parte mediata dal sequestro di p300, che è un p53trascrizione ed un coattivatore acetilatore p53. vIRF1 blocca efficacemente l'apoptosi indotta dagli agenti che danneggiano il DNA e mostra attività trasformante in vitro e in vivo nel modello murino. Le tre proteine isoforme codificate dal gene ORF4 e denominate collettivamente KCP presentano regioni conservate omologhe al regolatore del complemento umano, il decay accelerating factor (DAF), ed una regione transmembrana peculiare; è stato dimostrato che queste proteine inibiscono la deposizione di C3b sulla superficie delle cellule durante l'attivazione del complemento e ne ostacolano quindi il corretto funzionamento. KSHV ORF4 è il più complesso esempio di splicing alternativo che codifica per proteine virale descritto finora. La sua attività protegge HHV-8 dalla clearance mediata dal complemento e riducendo il reclutamento di cellule infiammatorie antivirali [Spiller O.B. et al, 2003]. L'attività di *immune escape* mediata dalle proteine codificate da HHV-8, che agiscono singolarmente o in maniera sinergica a vari livelli a seconda delle fasi del ciclo virale e del progredire dell'infezione, dimostra che l'evasione della risposta immune è intimamente correlata all'oncogenesi virale.

1.3.2. Tropismo cellulare

Gli individui co-infettati da HHV-8 e dal virus HIV hanno un rischio notevolmente maggiore di sviluppare il sarcoma di Kaposi. HHV-8 è necessario, ma non sufficiente, per l'oncogenesi, se non accostato ad altri fattori di rischio quali l'immunosoppressione, uno stato di infiammazione persistente e l'esposizione a fattori ambientali [Mutalima N. et al, 2010; Lungu E. et al, 2013; Pelsler C. et al, 2009]. La trasmissione del virus avviene principalmente per via sessuale o per scambio di fluidi corporei. Studi sieroepidemiologici e la recente definizione di una forma particolarmente rapida e aggressiva di KS infantile di recente definizione [Kasolo F.C. et al, 2007], hanno evidenziato che il genotipo K1A5 è quello prevalente nel sangue e nei campioni bioptici di KS e di neonati sia HIV-positivi, sia HIV-negativi in Zambia, Uganda e altre regioni altamente endemica [Kasolo F.C. et al, 2007; Wakeham K. Et al, 2013]. Si ritiene che il virus possa essere trasmesso da madre a figlio verticalmente attraverso l'applicazione di saliva infetta sulla cute, per lenire ad esempio il fastidio dovuto alle punture di artropodi ematofagi [Minhas V., 2014; Shebl F.M, 2013]. La saliva sembra essere il fluido corporeo maggiormente a rischio per la trasmissione dell'infezione, e anche uno studio condotto a Pisa su 30 pazienti affetti da KS classico (tutti residenti nell'area di Sassari) lo ha confermato: nei campioni di saliva sono state riscontrate le maggiori cariche virali maggiori, rispetto a campioni di diverso tipo quali sangue, in soggetti infetti con HHV-8. La tipizzazione virale ha evidenziato che la maggior parte dei pazienti aveva contratto il ceppo virale A (30%) e i rimanenti erano stati infettati dai ceppi C2 e C3 [Matteoli B. et al, 2008]. Inoltre, studi epidemiologici recenti hanno evidenziato una maggiore progressione del KS classico in pazienti infetti con il sottotipo A [Mancuso R. et al., 2008]. Queste evidenze sperimentali portano ad ipotizzare che il virus HHV-8, e in particolar modo il ceppo A, abbia un più elevato tropismo verso le cellule epiteliali, ad esempio quelle che rivestono il cavo orale, e che ciò possa riflettersi in una diversa interazione tra virus e cellule suscettibili, sia al livello di dinamiche d'infezione, sia al livello di effetti trasformanti e patogenetici.

1.3.2. Terapie

La crescita incontrollata delle cellule endoteliali (che ricoprono i vasi sanguigni o linfatici) genera la comparsa di macchie rosso-violacee a livello della pelle, chiamate in gergo tecnico lesioni, che possono mutare fino a trasformarsi in veri e propri noduli. Talvolta le lesioni non hanno una sintomatologia grave, e causano prurito soprattutto alle gambe, alla regione dell'inguine e attorno agli occhi. Se il tumore si sviluppa a livello degli organi interni le conseguenze invece possono essere anche molto gravi e i sintomi variano a seconda dell'organo interessato: sanguinamento se il tumore è nel tratto digestivo, difficoltà respiratorie se colpisce i polmoni etc. Le tecniche principalmente utilizzate per poter effettuare diagnosi di KS sono radiografia o TC toracica, endoscopia gastrointestinale, biopsia e ovviamente ricerca di antigeni immunogeni (LANA1) o del genoma virale mediante real time PCR. Definire lo stadio di un tumore, la sua localizzazione e quanto sia efficiente la risposta del sistema immunitario del soggetto colpito è indispensabile per poter scegliere anche in maniera mirata il successivo trattamento.

La cura delle manifestazioni più lievi, ad esempio lesioni localizzate e molto esposte sul viso e gli arti, viene realizzata mediante criochirurgia con azoto liquido o chemioterapia locale (iniezioni di chemioterapico intralesione). Anche radioterapia e chirurgia vengono impiegate per trattare aree interessate da un basso numero di lesioni. [Riva G. et al, 2012].

Farmaci antivirali come il cidofovir, il foscarnet, il ganciclovir o il valgancyclovir si sono dimostrati efficaci contro HHV-8, e possono offrire un trattamento prezioso per ridurre la viremia e possibilmente contribuire a controllare le malattie correlate come il Sarcoma che presentano alti livelli di replicazione del virus [Kedes DH, Ganem D, 1997; Casper C. et al, 2008].

La chemioterapia sistemica viene impiegata nelle forme di Kaposi Aids-correlate. Questa prevede l'utilizzo di farmaci appartenenti al gruppo delle antracicline, come la doxorubicina e la daunorubicina [Di Lorenzo G. et al, 2007; Riva G. et al, 2012]. Purtroppo, nonostante spesso le condizioni dei pazienti trattati con chemioterapici migliorino, non si giunge ad una completa remissione della malattia.

L'introduzione della HAART (Highly active antiretroviral therapy), diretta contro HIV, ha apportato notevoli miglioramenti nel trattamento del Sarcoma di Kaposi [Wolf T. et al, 2005]. Attualmente esistono cinque classi di farmaci antiretrovirali, combinabili in protocolli HAART, ovvero: RTI (NRTI e NNRTI), che inibiscono la retroscrittura del genoma virale ad RNA in DNA; PI; inibitori della fusione della membrana virale con quella cellulare; inibitori del legame al corecettore virale; inibitori dell'integrasi virale. Alcuni esempi di questi farmaci sono: ciclofosfamide, adriamicina, vincristina, prednisone e rituximab. Delle cinque categorie di farmaci sovraccitate solo le prime tre sono approvate per uso clinico, ma l'approvazione delle ultime due è imminente [Ortega L. et al, 2014]. La terapia

HAART talvolta è accostata al trapianto di cellule staminali autologhe, che sembra averne migliorato in taluni casi l'efficacia [Wieters I. et al, 2014]. Recentemente è stata introdotta la terapia basata sull'utilizzo di anticorpi monoclonali anti CD-20 [Wyen C. et al, 2012; Wieters I. et al, 2014]. Questa proteina di 35 kDa è espressa sulla membrana plasmatica dei linfociti B, ed è importante per la regolazione del ciclo cellulare e il differenziamento; l'overespressione della proteina è stata riscontrata nel 95% dei casi di tutti i tumori non-Hodcking a cellule B, tra i quali i linfomi correlati all'infezione da HHV-8. Anticorpi monoclonali anti CD-20 possono essere generati immunizzando dei conigli con linfociti umani presentanti CD20 e ingegnerizzati combinando le regioni variabili della catena pesante e leggera (murine) con la regione costante IgG1 (umana); la produzione su larga scala prevede l'impiego di ibridomi o altri sistemi, ma l'efficienza è bassa e i costi notevoli. I farmaci presenti in commercio come soluzioni sono il Genentech – RITUXAN (San Francisco) , il MabThera (Basel) e un prodotto Roche [Wyen C. et al, 2012]

La sperimentazione attualmente verte sulle terapie biologiche basate sull'interferone, sull'impiego di farmaci che bloccano la formazione di nuovi vasi sanguigni, di farmaci immunoterapici come l'interleuchina 2, e su nuove combinazioni di farmaci antiretrovirali. Solo recentemente, essendo più chiari i passaggi molecolari dell'oncogenesi, è stato preso in considerazione lo studio e il possibile sviluppo di terapie di *targeting molecolare* indirizzate contro l'apparato del proteasoma, contro l'NF-kB, contro le citochine virali e contro gli antigeni di superficie di HHV-8, che potrebbero fornire, negli anni immediatamente a venire, prove fondamentali per il loro uso clinico [Okada S. et al, 2014]. Recentemente la proteina vGPCR, nota per le sue implicazioni evidenti ma ancora non del tutto chiarite nell'oncogenesi, è stata usata come bersaglio molecolare terapeutico per bloccare la progressione del tumore. Le prime evidenze sperimentali sembrerebbero indicare una regressione del sarcoma nei soggetti trattati [Montaner S. et al, 2006]. In quest'ottica, per scoprire nuovi possibili target farmacologici, è di fondamentale importanza approfondire lo studio dei meccanismi molecolari alla base dell'oncogenesi e delle interazioni tra HHV-8 e le cellule suscettibili all'infezione.

SCOPO DELLA TESI

Le finalità del lavoro di tesi sono state:

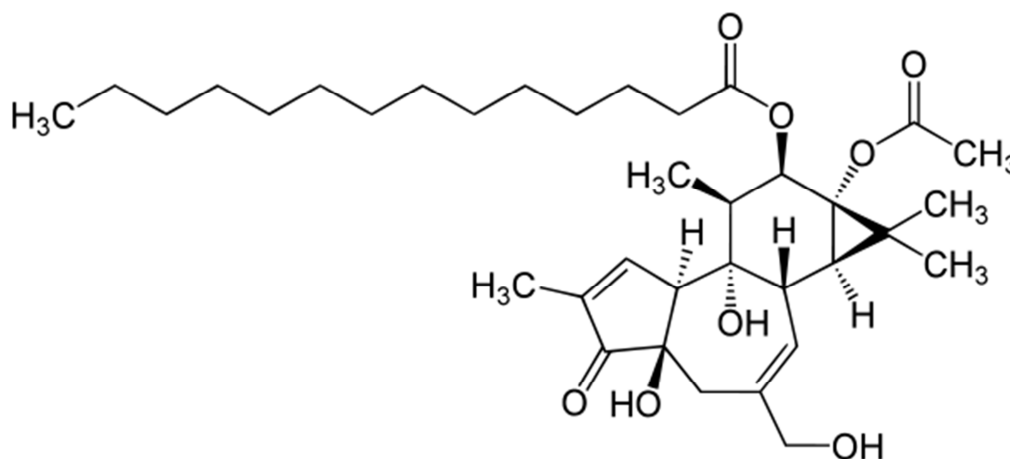
- I. Analisi del tropismo cellulare dei ceppi A1 e C3 di HHV-8, ottenuti dalla riattivazione del virus nelle linee cellulari BCBL1 e BC3 .
- II. *Gene expression profiling* dei geni cellulari coinvolti nel processo infiammatorio, mediante la tecnologia DNA Microarray.
- III. Validazione dei risultati mediante real-time PCR.
- IV. Analisi in vitro di isolati clinici.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Colture cellulari BCBL1 e BC3 e riattivazione della replicazione virale

Le tipiche condizioni di coltura sono ottenute mantenendo le cellule in contenitori di plastica o “flask” sterili, immerse in appropriati mezzi di coltura o “terreni” liquidi che contengono disciolte le quantità sufficienti delle sostanze necessarie alla crescita cellulare, in incubatori che sono in grado di mantenere controllata la temperatura, la pressione parziale dell'anidride carbonica e l'umidità. Le condizioni sperimentali usate in questo studio prevedevano in particolar modo l'impiego di RPMI 1640, addizionato al 10% di Siero Fetale Bovino (FBS, Sigma aldrich, inattivato a 56° per 30 minuti) come terreno di propagazione per linee cellulari “**Body Cavity Based Lymphoma**” (BCBL1) e “**Body Cavity Lymphoma**” (BC3), **latentemente infette rispettivamente con il sottotipo A1 e C3 di HHV-8** [Yimin Y. et al., 1999]. Le cellule crescono come sospensione di singole unità. Le caratteristiche di crescita hanno evidenziato che le BCBL1 e le BC3, inoculate inizialmente alla concentrazione di $1 \cdot 10^6$ cellule/ml, possono essere divise (“splittate”) 1:10 ogni tre-quattro giorni.

L'espressione del genoma virale di HHV-8 e la sua replicazione è stata indotta nelle **BCBL1** e **BC3** mediante trattamento con **forbolo estere 12-O-tetradecanoilforbolo-13-acetato (TPA)**, per una concentrazione finale di 50 ng/ml, seguendo dei protocolli standard [Renne R et al., 1996; Barouk Simonet E. et al., 2002].



[TPA, en.wikipedia.org-2000.]

Il surnatante delle colture (in cui il virus viene rilasciato grazie alla stimolazione chimica) è stato prelevato dopo 48 ore di trattamento con TPA, privato della componente cellulare e concentrato mediante: centrifugazione, ultrafiltrazione (0.2 μ m) e ultracentrifugazione a 20.000 giri per 1 ora a 4°C

[Renne et al., 1996]. Il DNA virale è stato estratto e quantificato mediante REAL-TIME PCR (Light Cycler, Roche) e i ceppi virali sono stati in concomitanza tipizzati, per la verifica dei sottotipi infettanti A1 e C3.

Il **DNA virale** è stato estratto utilizzando il kit commerciale “QIAamp DNA Mini kit” (QIAGEN, Chatsworth, CA), progettato per purificare il DNA totale (genomico, mitocondriale e virale) da diversi tipi di campioni (sangue intero, plasma, siero, fluidi corporei, linfociti, colture cellulari e tessuti), quindi adatto al nostro scopo. Attraverso **analisi spettrofotometrica** (Eppendorf) è stata valutata la presenza di contaminanti proteici e calcolata la concentrazione dell'acido nucleico, e la sua qualità è stata valutata mediante **corsa elettroforetica** su gel di agarosio (Euroclone).

Il DNA è stato successivamente **tipizzato** (mediante Sequenziamento di Sanger a terminazione di catena) e **quantificato** (mediante Real Time PCR).

3.2 Tipizzazione Genetica.

Il metodo di sequenziamento del DNA con dideossinucleoterminalori o *metodo di Sanger* consiste di 3 fasi:

1. **PCR (REAZIONE A CATENA POLIMERASI).**
2. **RIVELAZIONE DEL PRODOTTO DI AMPLIFICAZIONE** e interpretazione dei profili ottenuti.
3. **SEQUENZIAMENTO E DATA ANALYSIS.**

1. In questa fase di preparazione del campione il filamento di DNA che si vuole sequenziare viene copiato artificialmente, in modo da ottenere diverse copie identiche dello stesso. Sono due le tecniche che permettono questo processo di duplicazione: il DNA ricombinante e la PCR, dall'Inglese *Polymerase Chain Reaction*. La **Nested PCR** impiegata in questo caso è una variante della PCR tradizionale, basata su due reazioni di amplificazione consecutive: la seconda amplificazione è effettuata mediante una coppia di primers più interni rispetto ai primers della prima reazione [J. M. Walker and R. Rapley, *Molecular Biology and Biotechnology*, 2009]. La seconda coppia produce così un amplificato (di dimensioni inferiori) d'alto valore diagnostico, ma solo se il risultato della prima amplificazione è specifico. La scelta del template dipende dallo scopo che si vuole perseguire: gli *introni* e le *non-coding region* sono, rispetto alle regioni codificanti, più soggette nel tempo a subire mutazioni; i geni indispensabili per la sopravvivenza dell'organismo e che determinano peculiari funzioni sono invece poco soggetti a subire mutazioni spontanee. Sono necessari primers altamente conservati, specifici per le

sequenze di un'intera popolazione (specie virale). Se l'utilizzo della PCR è mirato all'identificazione di diversi ceppi, deve esserci un significativo livello di variazioni di sequenza tra le specie oggetto di studio per poterle confrontare. Dai dati disponibili in bibliografia, la scelta della regione da amplificare è ricaduta sulla regione virale VR2 interna all'ORFK1 [Zong W et al., 1999], amplificata in due cicli consecutivi mediante i seguenti primers e cicli di amplificazione:

Primers step I:

LGH2089 (forward) 5'-GTTCTGCCAGGCATAGTC-3'

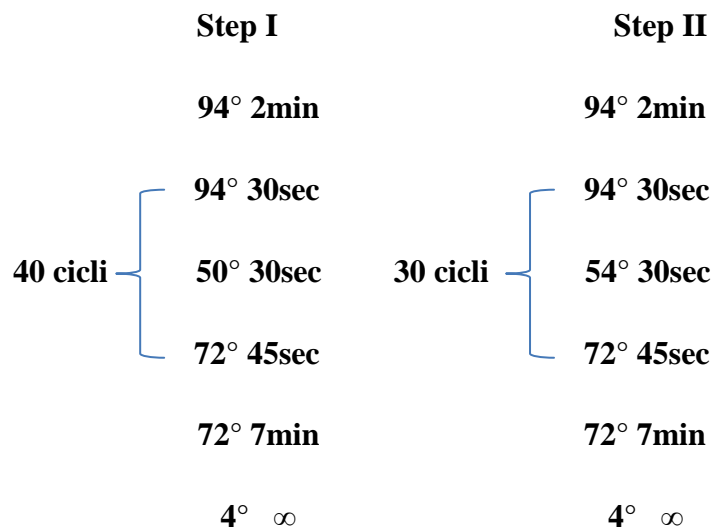
LGH2505 (reverse) 5'-CAACCTGTCTTACAAACC-3'

Primers step II:

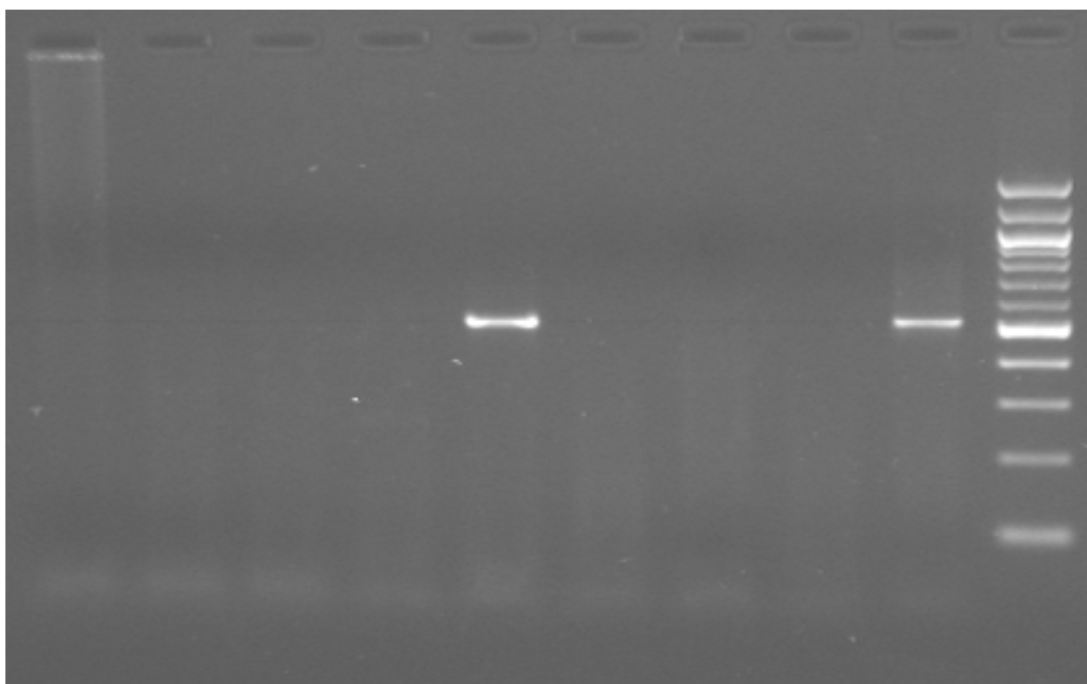
PB3 (forward) 5'-GGCATCTACCAAACGGACG-3'

LC4 (reverse) 5'-GATTATCTTACCTGAATGTCAGTACCA-3'

PROFILI DI AMPLIFICAZIONE ORFK1 VR2



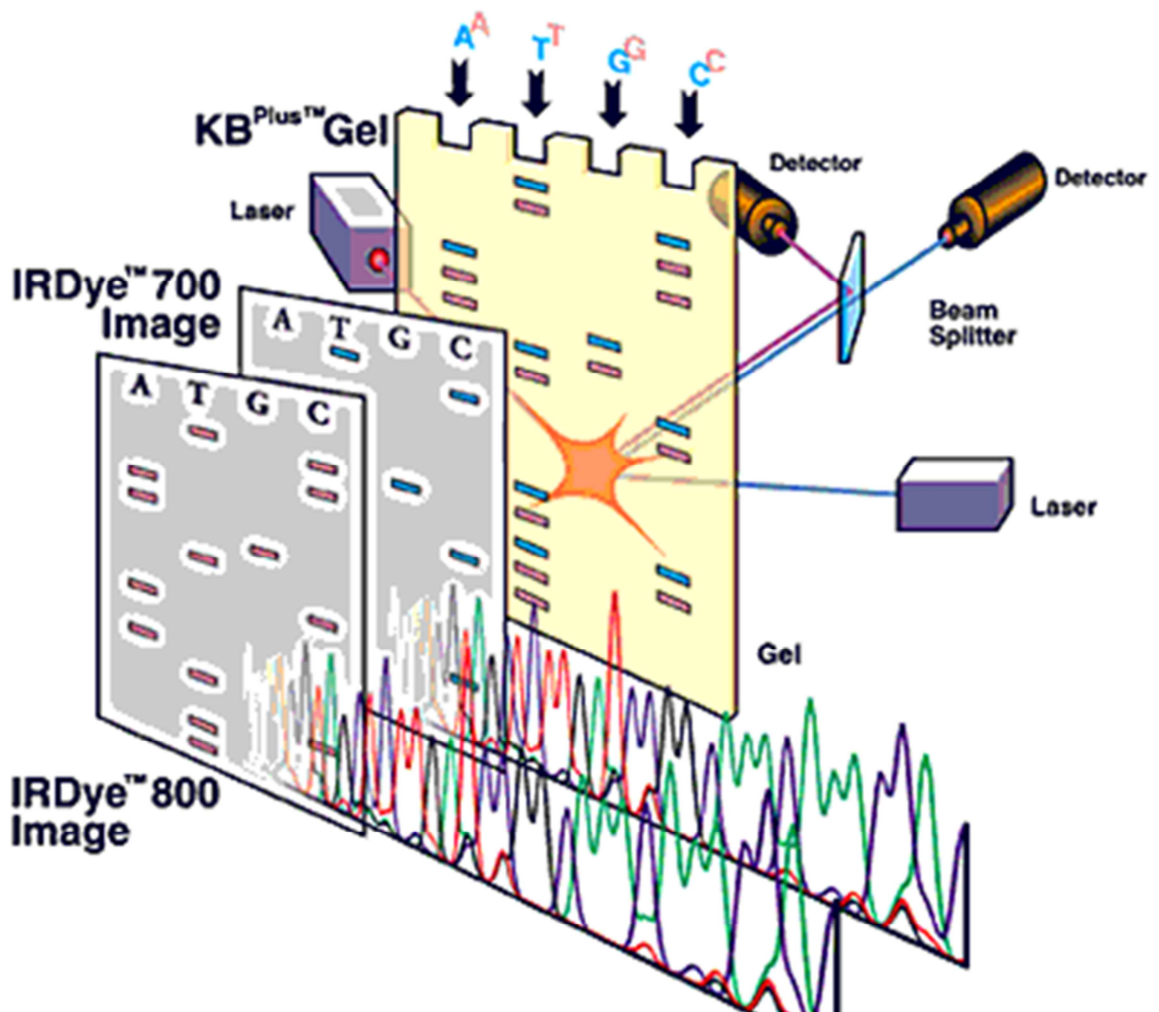
2. L'elettroforesi in gel è il metodo standard utilizzato per separare, identificare e successivamente purificare frammenti di DNA. Il gel può essere costituito da poliacrilamide o da agarosio. I gel di poliacrilamide sono usati per separare frammenti di **DNA < 500 bp** e hanno un'elevata risoluzione, ma sono più complicati da preparare e più difficili da maneggiare rispetto ai gel di agarosio. I gel di **agarosio** (un polimero di carboidrati estratto dalle alghe) sono di semplice preparazione e sono tipicamente usati per separare frammenti di dimensioni variabili **da poche centinaia di basi a 20 kb**. La porosità della matrice del gel dipende dalla concentrazione di agarosio [J.W.Dale et al., Dai Geni ai Genomi, 2013]. La lunghezza del prodotto di amplificazione atteso della ORFK1 VR2 è di 520 bp. Perciò 10 µL del prodotto di amplificazione del secondo round della PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su un gel al 2% di agarosio (EuroClone) trattato con Etidio Bromuro (Roche) al 0,002%, per 30 minuti a 90mV. Successivamente è stata effettuata la lettura ai raggi ultravioletti mediante l'analizzatore di immagine Syngene.



Elettroforesi su gel di agarosio al 2% in TBE buffer 0,5X di 10 µL del secondo round della Nested PCR per VR2 colorati con 1 µL di blu di bromofenolo. (marker di peso molecolare 100 bp, Invitrogen).

Gli amplificati all'altezza attesa di 520 bp sono stati considerati positivi e purificati mediante il Wizard SV Gel PCR Clean-UP System (Promega).

3. Durante la reazione di sequenziamento, il campione biologico viene sottoposto a quattro processi: denaturazione, primer annealing, copia del filamento, terminazione. Nel sequenziamento automatico si può allestire una singola reazione inserendo quattro ddNTPs marcati mediante l'incorporazione di un composto fluorescente, diverso per ogni base, e l'elettroforesi avviene lungo un capillare, all'interno dei quali è collocata la matrice polimerica (al contrario di quanto avviene nel sequenziamento manuale, in quello automatico le quattro miscele di frammenti di terminazione della catena, una per ogni analogo ddNTP marcato, vengono sottoposte ad elettroforesi su gel di poliacrilamide o gel di agarosio in differenti corsie). Durante la corsa elettroforetica, i frammenti vengono letti in ordine di lunghezza crescente da un fascio laser che eccita i marcatori fluorescenti. L'intensità della luce emessa viene misurata e tale informazione (ovvero quel tipo di ddNTP corrisponde al colore specifico di fluorescenza) viene inviata ad un computer ed elaborata da un computer in forma di elettroferogramma [J.W.Dale et al., Dai Geni ai Genomi, 2013].



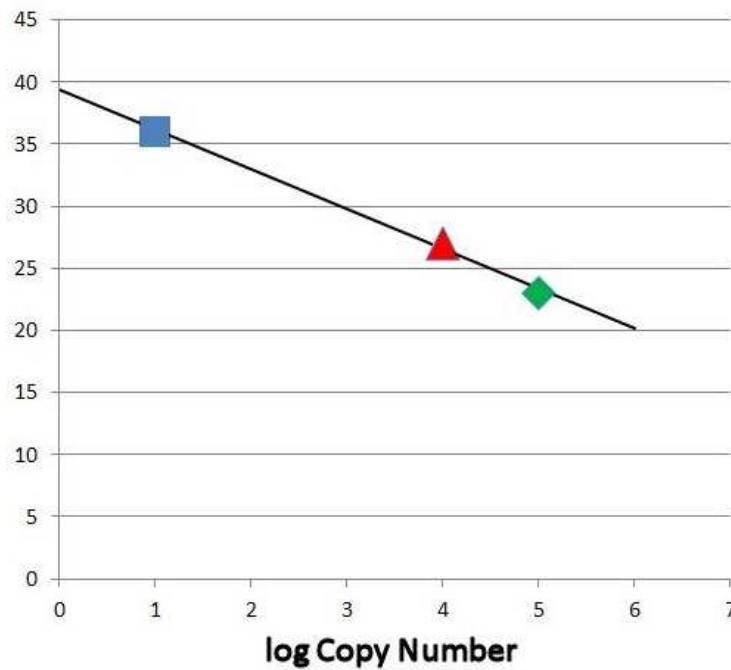
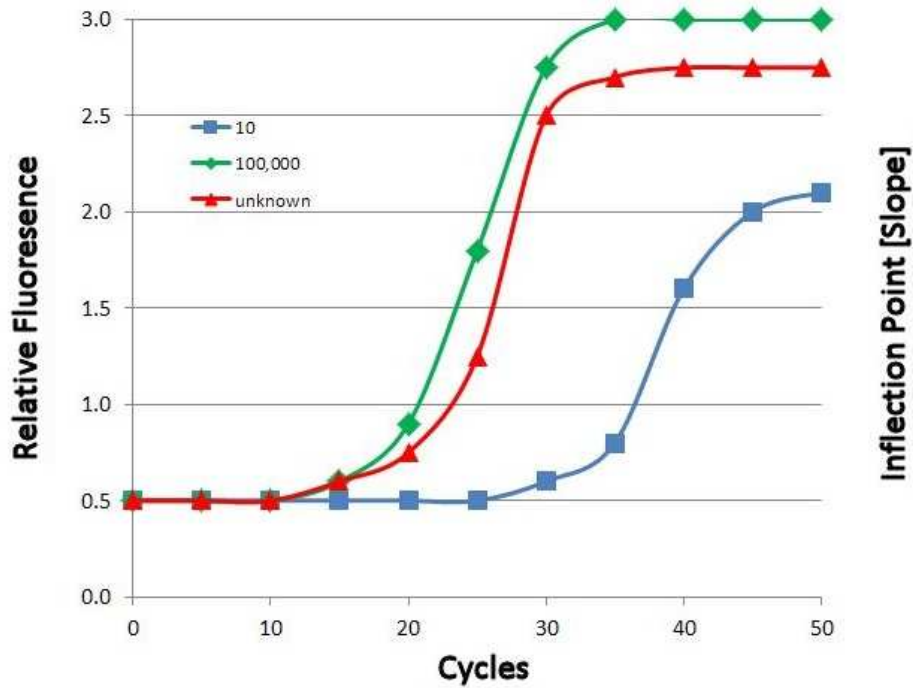
[www.the-scientist.com.]

I prodotti dell'amplificazione del II round della Nested PCR, precedentemente purificati, sono stati sottoposti a reazione di sequenziamento con il metodo di Sanger a terminazione di catena (BigDye Terminator vs.1.1, Abbott), impiegando stavolta uno solo dei due primers utilizzati nel II ciclo. Le sequenze ottenute mediante l'elettroforesi capillare con il Genetic Analyzer 3100 ABI PRISM (Applied Biosystems) sono state analizzate con il software ChromasLite ed allineate utilizzando il software MEGA vs3.0, con i riferimenti presenti in Genbank: AF130288 e AF133038 per il sottotipo A1; U75698 per il sottotipo A2; AF130287 e AF278829 per il sottotipo A3; AF130285 e AF133039 per il sottotipo A4; AF130289 per il sottotipo A5; AF130292, AF130293, AF133040, AF130306, AF130262 e AF130263 per il sottotipo B; AF130267 AF130273 per il sottotipo C1; AF130304 per il sottotipo C2; AF130298 per il sottotipo C3; AF133044 per il sottotipo D2; AY329026, AY329024, AY329025, AY329027, AY329028 per il sottotipo E. Utilizzando il metodo neighbour joining (ovvero attraverso un algoritmo fenetico che riassume le differenze in indici di distanza/similarità) è stato costruito l'albero filogenetico ed i ceppi infettanti principali sono stati tipizzati [Zong W. et al., 1999].

3.3 Quantificazione della carica virale

Nella PCR classica non vi è una relazione sicura tra la quantità di stampo aggiunto alla reazione e la quantità finale del prodotto, analizzata dopo un numero fisso di cicli. Tuttavia, esiste una relazione più affidabile tra la quantità di stampo e il numero di cicli di amplificazione necessari per produrre un prodotto rivelabile: la PCR *real time* si basa su tale principio ed è una tecnica utilizzata per monitorare l'avanzamento di una reazione di PCR in tempo reale e quantificare con precisione il prodotto finale [J.W.Dale et al., Dai Geni ai Genomi, 2013]. Ciò è reso possibile dall'impiego di molecole reporter fluorescenti che si legano al DNA a doppio filamento (come il colorante SYBR® verde), che si accumulano di pari passo al prodotto PCR con ogni ciclo di amplificazione, o grazie a sonde specifiche per il prodotto (Molecular Beacons o TaqMan® Probes).

Lo stampo è inizialmente a singolo filamento (il DNA viene denaturato nel primo passaggio) e quindi non vi sarà alcun segnale; con il procedere della reazione e la sintesi di un prodotto a doppio filamento, la fluorescenza diverrà misurabile dall'apposito strumento e aumenterà dopo un certo numero di cicli: estrapolando a zero la curva risultante si potrà determinare con precisione il numero di cicli necessari per la formazione di una quantità misurabile di prodotto. Il numero che esprime tale valore è il Ct, correlato alla quantità iniziale di stampo in maniera inversamente proporzionale: maggiori quantità di stampo corrispondono a Ct più bassi.



[www.mun.ca/biology.]

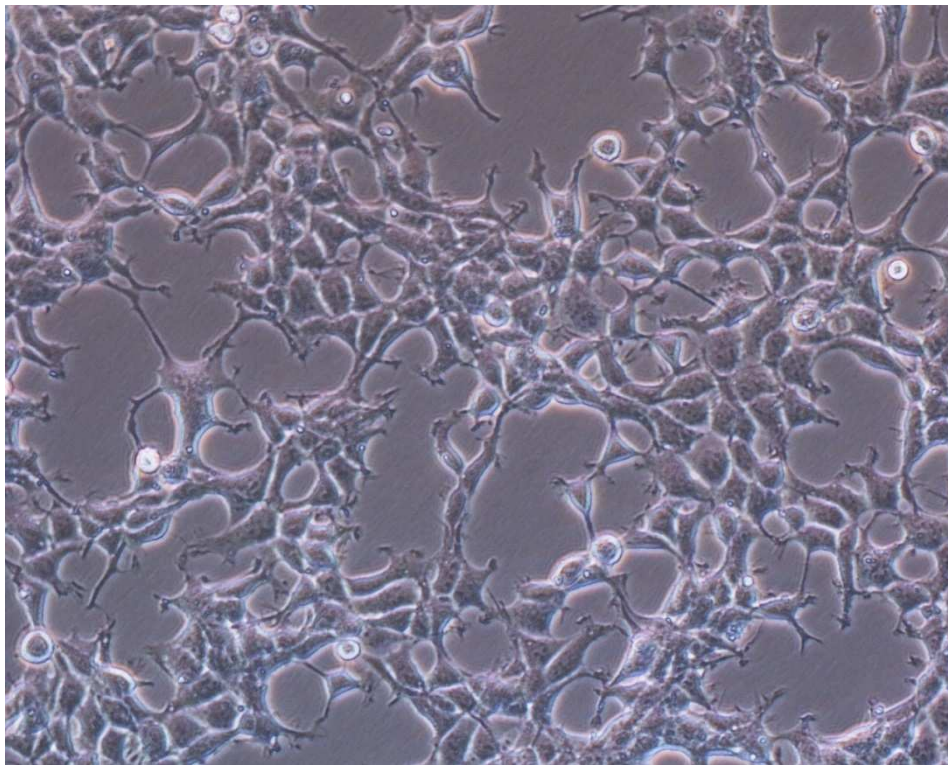
Innanzitutto sono stati **titolati i primers** (sempre mediante *real time PCR*) utilizzando diverse concentrazioni: 300 nM per il primer *sense* e 900 nM per il primer *anti-sense*. La miscela di reazione è stata preparata in base al volume iniziale dei campioni utilizzato (5µl) e ai primers impiegati,

aggiungendo Taqman Universal PCR Master Mix (Roche) 2X, sonda 0,1 µl e H₂O per un volume finale di 25 µl. La reazione si svolge con un ciclo iniziale di due minuti a 50°C che permette l'attivazione dell'enzima UNG (AmpErase Uracil-N-Glicosilasi) della Master Mix (che elimina ogni eventuale molecola di DNA contaminante), un secondo ciclo di 10 minuti a 90 °C per inattivare l'UNG e attivare l'AmpliTaq Gold Polimerase (Applied Biosystems), e successivamente 50 cicli costituiti da una fase di denaturazione di 15 secondi a 90°C e una fase di appaiamento ed estensione di un minuto a 60°C, con la concomitante misurazione della fluorescenza emessa. Nell'impostazione delle reazioni di PCR per esperimenti con curva standard sono stati inoltre **indispensabili**: i **campioni** da analizzare (con quantità di target incognita), degli **standard** (campioni dalla quantità nota), una serie di **diluizioni standard** (un set di diluizioni utilizzate per la costruzione della curva standard), **replicati** (repliche identiche contenenti componenti e volumi identici) e **controlli negativi** (campioni contenenti acqua o buffer invece del template, che non devono amplificarsi). La retta standard avrà un coefficiente angolare pari a tre (i cicli di differenza per ogni log di diluizione sono esattamente 3); l'analisi della curva di amplificazione e della retta di taratura degli standard permette di individuare il **Ct**. Le sonde usate nella real time sono di tipo TaqMan (metodologia FRET, trasferimento di energia per risonanza): presentano all'estremità 5' un fluoroforo reporter e all'estremità 3' una molecola quencher. Il fluoroforo reporter ad alta energia emette fluorescenza, mentre il fluoroforo quencher a bassa energia assorbe i fotoni emessi dal reporter e "annulla" il segnale fluorescente, se si trova in prossimità del reporter. Se la PCR avviene in maniera specifica ed efficiente, i due fluorofori vengono allontanati e si ha emissione e conseguente rilevamento della fluorescenza, per la corretta quantificazione dei campioni. Se si comparano campioni diversi, la quantità di DNA di partenza deve essere la stessa. Il sistema migliore per **normalizzare** i campioni è di effettuare una PCR parallela, utilizzando un altro gene che è noto essere espresso in maniera costitutiva: quello scelto nel nostro caso è il gene umano della **β-globina**.

3.4 Infezione delle linee cellulari umane HEK293 e PBMC

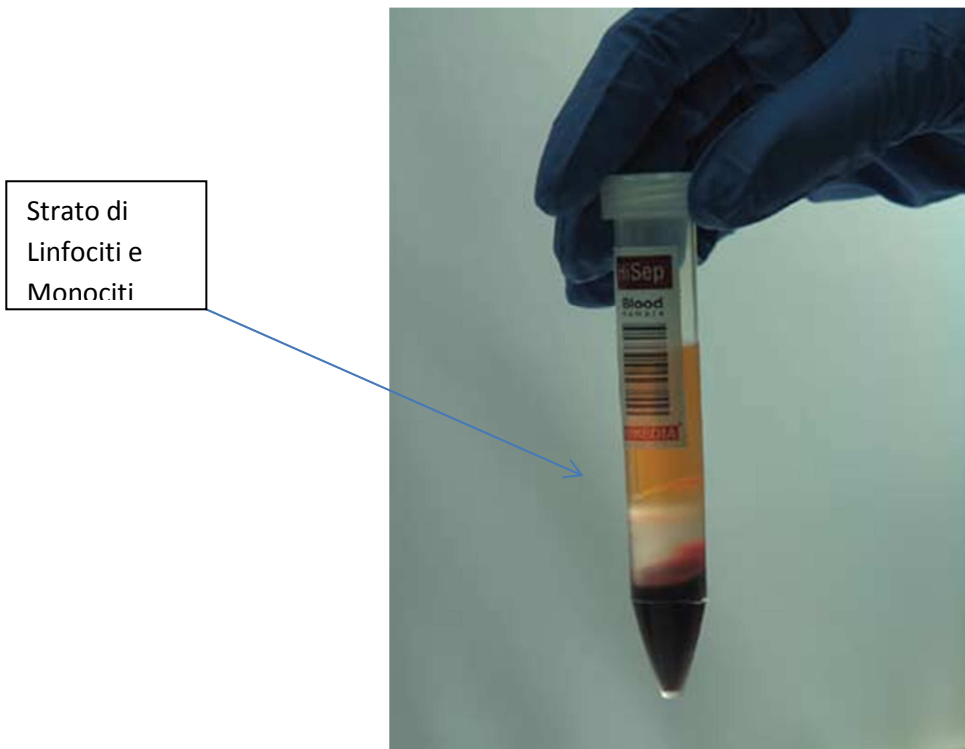
In questa fase del lavoro di tesi sono state impiegate le seguenti colture cellulari, permissive di un ciclo virale litico se infettate con HHV-8 [Bechtel et al., 2003]:

HEK293: queste cellule sono state generate dalla trasformazione di culture umane embrionali di cellule renali con Adenovirus di tipo 5 [Graham et al, 1977]. Le HEK 293 hanno un cariotipo molto complesso, possiedono due o più copie di ciascun cromosoma. Sono descritte come cellule **hypotriploid (ipotriploidi)**, dal momento che contengono meno di tre volte il numero di cromosomi di una normale cellula umana **diploide**. Anomalie cromosomiche riscontrate nelle HEK293 comprendono la presenza di tre copie del cromosoma X e di quattro copie dei cromosomi 17 e 22. La presenza di più cromosomi X e la mancanza di qualsiasi traccia di sequenza del cromosoma Y suggeriscono che il feto originale grazie al quale era stata allestita la coltura di cellule embrionali fosse di sesso femminile. Le cellule sono state gentilmente fornite dall'Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Bruno Ubertini. Queste linea cellulare, che cresce adesa, è stata coltivata (inoculo iniziale di 10×10^7 cellule) in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (Gibco BRL) addizionato ad antibiotici quali penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml) e con il 10% (v/v) di FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco BRL), inattivato a 56° per 30 minuti.



[gdbiotec.com.]

PBMC: le colture primarie di PBMC (peripheral blood mononuclear cell) sono state allestite partendo dal **buffy coat** ottenuto dal sangue processato di donatori sani: i campioni sono stati gentilmente forniti dall'Azienda Ospedaliera Universitaria Pisana. Il sangue è stato diluito 1:2 in PBS (Phosphate Buffer Saline: 3.2 mM Na₂HPO₄, 0.5 mM KH₂PO₄, 1.3 mM KCl, 135 mM NaCl pH 7.4) e stratificato sopra un isovolume di Ficoll. Mediante centrifugazione a 1500 rpm per 30 minuti a temperatura ambiente, i PBMC sono stati separati dalle altre componenti ematiche grazie al gradiente di densità generato dal Ficoll.



[old.himedia.cz]

Recuperato accuratamente l'anello centrale contenente i PBMC, questi ultimi sono stati sottoposti a diversi lavaggi in PBS **sterile** (1500 RPM, 10' a 4°C ; dopo ogni centrifuga è stato eliminato il sovrantante e risospeso il pellet in PBS fresco). I PBMC purificati e sottoposti a conta (50 µl + 450 µl di TURK per la lettura nella camera di Burkers) sono stati seminati alla densità di 10×10^7 cellule in piastre sterili con terreno di crescita RPMI 1640, addizionato di supplementi quali: 2mM L-Glutammina (Roche), penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 µg/ml), 10% FBS (Sigma, inattivato a 56° per 30 minuti) e PHA (fitoemoagglutinina, Roche), una mucoproteina estratta dal *Phaseolus vulgaris*, utile a stimolarne la crescita [Zeng L. et al., 2006]. Le colture primarie sono state mantenute in incubatore alla temperatura costante di 37 °C in ambiente umidificato al 5% (v/v) di CO₂ e sottoposte a periodici cambiamenti di terreno fino al momento in cui sono state utilizzate. In particolare dopo tre giorni di coltura è stata aggiunta al mezzo anche l'interleuchina 2 (IL-2, Roche) alla concentrazione di 20 U/ml.

Il virus, purificato dal surnatante delle BC3 e BCBL1 mediante ultracentrifugazione, risospeso in terreno MEM (Gibco) in maniera tale da avere la stessa concentrazione per entrambe i due ceppi derivati dalle due diverse linee, è stato addizionato al terreno delle HEK293 e dei PBMC, confluenti al 70%, e sostituito dopo 12 ore da terreno fresco al 2% di FBS: la minore concentrazione del siero fetale bovino rispetto al consueto 10% addizionato alle colture primarie garantisce una maggiore efficienza di infezione. Dopo un periodo di 24, 48, 72 e 96 ore le cellule sono state processate per la quantificazione della carica virale adsorbita e rilasciata e per l'analisi dell'espressione antigenica.

A tutti i tempi di cui sopra, il surnatante è stato separato dal monostrato cellulare adeso, che è stato sottoposto a trattamento con tripsina e tre lavaggi in PBS. Il DNA virale è stato estratto sia dal surnatante sia dalle cellule con il kit commerciale "QIAamp DNA Mini kit" (QIAGEN, Chatsworth, CA) ed è stata effettuata una real time PCR per quantificare la carica virale adsorbita nelle cellule e la carica virale rilasciata nel surnatante a seguito dell'infezione litica.

Per analizzare l'espressione antigenica, delle repliche sono state infettate con la medesima procedura e, sempre a 24, 48, 72 e 96 ore le cellule sono state tripsinizzate, lavate con PBS e fissate con acetone ed etanolo 1:1 per 15 minuti a -20°C. È stata successivamente effettuata una **immunofluorescenza di tipo indiretto**: le cellule sono state trattate con il siero di un paziente risultato positivo per anticorpi anti K8 e successivamente con un anticorpo anti IG umane (Diasorin). Dopo aver preparato il substrato formato dal complesso antigene-anticorpo marcato, attraverso il microscopio a fluorescenza (Nikon) è stato possibile osservare la sua localizzazione. Il funzionamento del microscopio a fluorescenza è molto intuitivo in quanto, in una prima fase, emette un fascio di luce infrarossa (<750nm) che colpisce il preparato. La caratteristica del marcatore fluorescente è che assorbe la luce e, grazie a reazioni di ossidoriduzione, la restituisce con un livello energetico superiore. Secondo l'equazione d'onda della luce all'aumentare dell'energia diminuisce la lunghezza d'onda per cui dai 750nm dell'infrarosso il complesso riemette luce con lunghezza d'onda pari a circa 700nm (luce rossa) o 530nm (luce verde).

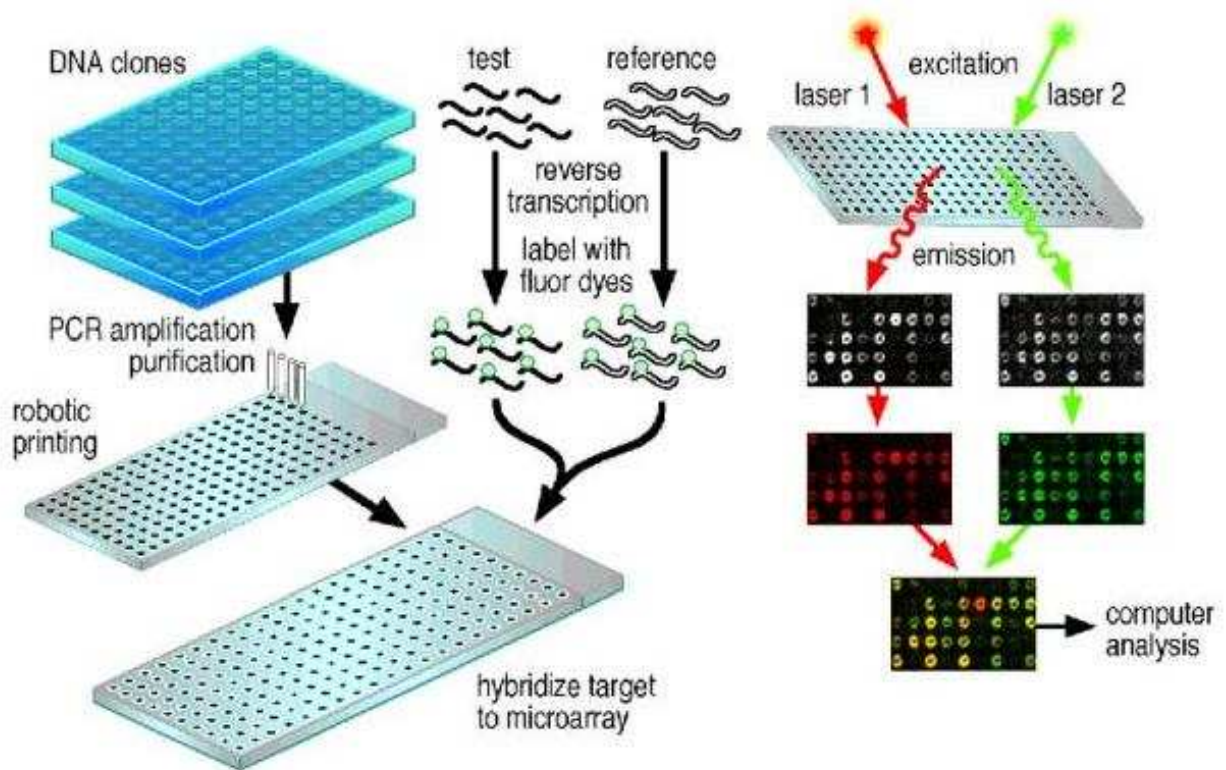
3.5 Gene expression profiling: i Microarray

È nozione acquisita che migliaia di geni e i prodotti da essi codificati (RNA e proteine) sono alla base dell'infettività virale e della **risposta cellulare dell'ospite**. La biologia molecolare tradizionale, basata sul criterio "un esperimento, un gene", è insufficiente ad affrontare lo studio di questi complessi meccanismi. La tecnologia dei Microarray, sviluppatasi negli ultimi anni, permette di esaminare in parallelo, in maniera veloce ed economica, l'intero genoma di un organismo o la totalità dei suoi prodotti su una singola lastrina di vetro o di silicio (chip), contenente specifiche sonde di DNA. Le sue applicazioni spaziano dall'identificazione dei profili di espressione dei geni trascritti in un dato momento da una cellula o da un tessuto, all'individuazione di alterazioni e mutazioni di geni in un campione biologico: SNP, genotipizzazione, sequenziamento, marcatori prognostici o diagnostici di uno stato patologico. Questa tecnologia è stata sviluppata nell'ultimo decennio del XX secolo: la sintesi fotolitografica su supporto solido di sonde oligonucleotidiche per costruire microarray è stata pubblicata all'inizio del decennio. Nel 1995 il gruppo di Patrick O. Brown della Stanford University ha realizzato microarray utilizzando sonde di DNA complementare (cDNA). I microarray ad alta densità sono stati introdotti subito dopo. Strutturalmente, i microarray consiste in un supporto solido recante una successione ordinata di migliaia di microscopici spot di DNA, contenenti ognuno poche picomoli di una specifica sequenza (sonda). Ciascuno di questi punti della matrice ha dimensioni inferiori a 200 micron e costituisce l'unità minima del microarray, detta feature. I microarray si classificano per il numero di features, che indica la loro complessità, e per il tipo di sonde di cui sono composti: array di cDNA o di oligonucleotidi. La tecnologia basata sulla fotolitografia e sulla chimica in base solida (Affymetrix) e la tecnologia basata su stampa a getto di inchiostro, senza contatto fisico col supporto (Agilent Technologies), permettono di sintetizzare in situ gli oligonucleotidi. Attualmente in commercio sono presenti anche microarray creati con diverse tecnologie, contenenti sonde ancorate a microsferi o matrici di gel tridimensionali (Illumina, Applied Microarrays, Applied Biosystem). Le sonde degli array spottati sono invece frammenti di DNA a singolo o doppio filamento pre-sintetizzati (in genere ottenuti per PCR) e successivamente depositati sul supporto e legati ad esso mediante UV-crosslinking (Biosense).

L'approccio per l'analisi dei profili di espressione genica si basa sulla proprietà dell'RNA o del DNA di ibridare alle proprie sequenze complementari. Al livello operativo, l'RNA estratto da un tessuto o da una linea cellulare è utilizzato per generare il "target" marcato, che viene poi ibridizzato con i probe immobilizzati sul chip. In particolare viene effettuata l'ibridizzazione contemporanea di due cDNA marcati, generati da due diversi campioni di RNA (confronto tra campione e controllo). L'utilizzo di diverse molecole fluorescenti (Cy3 e Cy5) permette di marcare i due cDNA con colori diversi; in questo modo è possibile miscelarli e ibridizzarli sullo stesso vetrino, per operare un "legame competitivo" dei

target ai probe. Può essere in alternativa effettuata una marcatura con biotina. A questa avanzata tecnologia costruttiva deve essere affiancata una tecnologia bioinformatica altrettanto avanzata per l'acquisizione e l'analisi dei dati.

Al fine di studiare i processi sottostanti all'infezione virale e alla risposta cellulare delle HEK293 e dei PBMCs, per questo lavoro di tesi sono stati impiegati dei DualChip® Microarray (Eppendorf), contenenti una serie di sonde rappresentative di 297 geni umani coinvolti nel processo infiammatorio.



[bme240.eng.uci.edu.]

3.6 Estrazione dell'RNA

La preparazione dei campioni da testare mediante microarray inizia con l'isolamento dell'**RNA totale** dalle cellule in esame. L'estrazione deve essere completa e significativa, per poter rappresentare tutti i geni espressi nel campione al momento dell'acquisizione: particolarmente importante è perciò il controllo del grado di **purezza** e integrità dell'RNA, tale che impurità o contaminazioni da parte di proteine, lipidi o carboidrati non aumenti in maniera statisticamente significativa il **rumore di fondo** attraverso ibridizzazioni aspecifiche nei microarray.

L'RNA totale è stato estratto in ambedue le linee cellulari HEK293 e PBMC, infettate alternativamente con i ceppi A e C di HHV-8 e dalle stesse linee di controllo non infettate, impiegando l'RNeasy Mini Kit (Quiagen). Gli estratti sono stati trattati con DNasi (Roche), successivamente inattivata a 94C per 10' e l'RNA totale è stato valutato quantitativamente e qualitativamente mediante lettura allo spettrofotometro (Eppendorf) e corsa elettroforetica su gel di agarosio (Euroclone).

Per ciascuna linea cellulare sono state effettuate tre repliche, con scopo di controllo innanzitutto e al fine di effettuare anche una quantificazione dei geni eventualmente sovra o sottoespressi.

3.7 Retrotrascrizione e Marcatura

Per ciascuno dei campioni da analizzare, l'RNA messaggero contenuto nella preparazione di RNA totale deve essere convertito in DNA complementare (cDNA), rappresentativo dell'espressione genica cellulare; la conversione in cDNA è stata effettuata mediante l'enzima trascrittasi inversa **SuperScript™ II Reverse Transcriptase** (Invitrogen) e una corta sequenza innesco (primer sequence) costituita da oligo(dT), una breve sequenza di deossi-timina, che si accoppierà con la coda poliadenilata degli RNA messaggeri e funzionerà da innesco per la trascrittasi inversa che così convertirà in cDNA soltanto i messaggeri poliadenilati. La marcatura fluorescente dei campioni di cDNA avviene in concomitanza alla retrotrascrizione per incorporazione enzimatica di un nucleotide precursore marcato con un fluorocromo, nel nostro specifico caso la biotina. La miscela di reazione è stata così preparata in due fasi, successivamente miscelate:

T. ambiente	}	Internal Standard mix-Silverquant 2,0 µl
		Oligo (dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0,5µg/µl)
+ 1' a 70°C		X µl RNA Totale (il volume dipende dalla concentrazione)
		RNase-free water per un V_f = 10,0 µl.
In ghiaccio	}	5X First Strand Buffer 4,0 µl
		DTT (0,1 M) 2,0 µl,
+ 90' a 42 °C		Biotina-dNTP mix 2,0 µl (10x)
+ 15' a 70 °C		RNaseOut TM (40 U/µl) 1,0 µl per un V_f = 9 µl.

Alla miscela di reazione complessiva è stata aggiunta RNase H (2U/µl) e incubata 90' a 37 °C e infine 3' a 95°C: questa ribonucleasi taglia l'RNA in un eteroduplex DNA/RNA per produrre "single stranded DNA" (ssDNA). Il cDNA così prodotto deve essere conservato a -20° C fino al suo impiego. Lo specifico protocollo può essere consultato all'indirizzo:

https://www.dkfz.de/gpcf/fileadmin/downloads/Equipment/Eppendorf_DualChip_extManual.pdf.

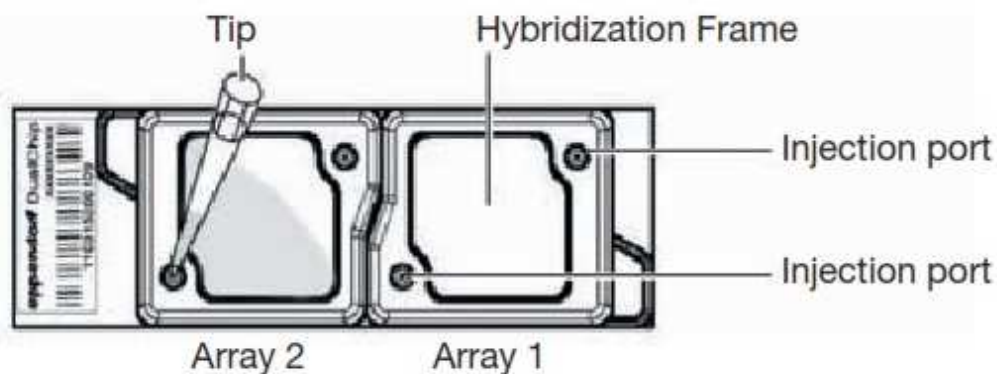
3.8 Ibridazione e rivelazione Silverquant

L'ibridazione è il processo tramite cui due filamenti complementari di acidi nucleici (il campione e la sonda) si accoppiano per formare una molecola a doppio filamento. I campioni marcati vengono denaturati a temperatura elevata in apposite soluzioni e successivamente posti a contatto con il microarray in una camera da ibridazione di piccolo volume, in maniera tale da mantenere alta la concentrazione delle sequenze bersaglio e favorire la cinetica e la velocità di ibridazione. La cinetica di reazione dipende dalla concentrazione delle sequenze bersaglio, dalla forza ionica della soluzione, dalla temperatura e dal tempo di incubazione: tutti parametri che vanno studiati in dettaglio e monitorati. La metodica Silverquant prevede l'impiego di un anticorpo anti-biotina marcato con particelle d'oro. La miscela di reazione è stata preparata con:

}	cDNA biotilato 20.0 μ l
	Biotin-HybControl (Red vial) 10.0 μ l
	RNase-free water (White vial) 10.0 μ l
	Silverquant hybridization additive 10.0 μ l
	HybriBuffer A (Blue vial) 10.0 μ l
	HybriBuffer B* (Orange vial) 40.0 μ l per un $V_f = 100 \mu$l.

* La miscela deve essere incubata 5' a 60 °C se compare un precipitato bianco.

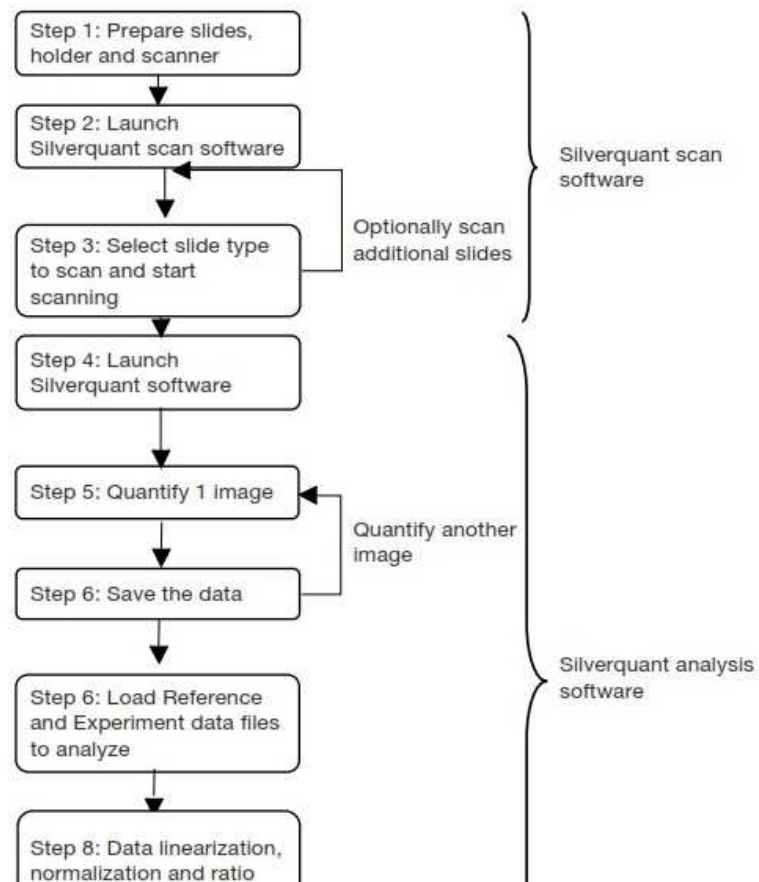
L'ibridazione è stata effettuata mediante una incubazione overnight a 60°C utilizzando l'ibridatore automatico Thermoblock (Eppendorf) ad una frequenza di 1400 giri / min. Successivamente i Dualchip sono stati lavati (per eliminare il cDNA non ibridato) stabilizzati e analizzati.



[Rappresentazione schematica del sistema di iniezione per l'ibridazione, Eppendorf].

3.9 Acquisizione e analisi dei dati

Terminato il lavaggio, i microarray devono essere asciugati e si passa alla fase di acquisizione dei dati: bisogna ottenere un'immagine accurata della superficie ibridata del microarray, utilizzando uno scanner laser. Il fascio del laser scansiona la superficie del microarray, eccitando i fluorocromi incorporati nelle sequenze bersaglio ibridate alle differenti *feature*; l'emissione fluorescente prodotta, di lunghezza d'onda caratteristica, viene raccolta e misurata da un microscopio confocale. I dati vengono trasformati in immagini digitali, che vengono esaminate con software appositi che estraggono i dati in un formato numerico utilizzabile per le successive analisi. L'analisi del DualChip è stata effettuata mediante lo scanner Silverquant (Eppendorf): questo è stato sviluppato per consentire l'acquisizione facile e veloce dei dati da qualunque DualChip elaborato con colorimetria. La metodica Silverquant impiega il programma di lettura Silverquant Image Viewer (Eppendorf) e permette di visualizzare e quantificare un'immagine, quindi di analizzare e salvare i risultati attraverso un apposito software. Installato il sistema, il flusso di lavoro si compone di nove precisi step:



[Silverquant: Generating and Analyzing Dual Chip Images]

I software impiegati per visualizzare i dati dei microarray e analizzarli sono strumenti adatti a “scavare” nei dati, rendendo evidenti i cambiamenti di espressione genica più significativi statisticamente. Essi hanno la possibilità di integrare dei dati, di filtrarli secondo diversi parametri, di riconoscere particolari configurazioni e di applicare dei modelli interpretativi. Le caratteristiche operative del Silverquant Analysis Software (Eppendorf) sono di:

- ✓ analizzare l'immagine e localizzare le feature, allineandole con la griglia teorica che ne descrive la posizione sulla superficie del microarray;
- ✓ misurare il rumore di fondo locale nelle vicinanze di ciascuna feature, ovvero esaminare i valori di assorbenza del background e sottrarli da quelli letti a livello di ciascuno spot;
- ✓ assegnare alle singole feature le annotazioni relative alla sonda che le formano (identificazione e sequenza della sonda, simbolo del relativo gene, numero di accesso GenBank);
- ✓ esportare i dati ottenuti sotto forma di tabella numerica e sotto forma di immagine, perché possano essere ulteriormente analizzati;
- ✓ effettuare una completa analisi statistica a livello della singola feature, esaminando molti differenti parametri (coefficiente di variazione ottenuto analizzando la distribuzione statistica dei pixel, la forma e dell'uniformità del segnale, la presenza di pixel saturati, e il rapporto tra segnale e rumore di fondo).
- ✓ Effettuare una normalizzare basata sui geni Housekeeping (HKG).

<http://www.medesa.cz/Data/files/pdf/katalogy/Eppendorf/05-Microarray%20systems.pdf>



[SilverQuant Microarray Detection and Scanning System.]

3.10 Validazione dei risultati mediante real-time PCR

Per escludere l'ipotesi di artefatti nei geni sovra o sotto-espressi nei Microarray è utile performare una PCR quantitativa dei campioni in esame. È stata perciò effettuata una real-time-PCR, prestando particolare attenzione ai geni che mostravano un più alto livello di espressione differenziale tra campioni infettati con i ceppi A e C di HHV-8 rispetto ai controlli, e che ricerche bioinformatiche o sulla letteratura scientifica hanno dimostrato essere strettamente correlati alle alterazioni cliniche e biochimiche causate dall'infezione e dalla risposta cellulare.

1 µg di RNA totale precedentemente estratto (**paragrafo 3.7**) è stato utilizzato per la **retrotrascrizione** del messaggero (mRNA). È stata preparata una miscela contenente Oligo(dT)20 (50µm), 10mM dNTP mix (Invitrogen) e l'RNA del campione per un Vf di 10 µl: la miscela è stata incubata a 65°C per 5' per favorire l'annealing dell'oligo(dT) all'mRNA. Sono stati poi addizionati: 10x RT Tampone, 25 mM MgCl₂, 0,1 M DTT, SuperScript III RT (200 U/µl), RNaseOUT (40 U/µl) (Invitrogen Life technologies). È stata anche preparata in parallelo una reazione in assenza della trascrittasi inversa per verificare l'assenza di DNA genomico (controllo no-RT). La reazione è stata incubata a 50°C per 50' e poi a 80°C per 5' al fine di inattivare la trascrittasi inversa e quindi è stato aggiunto 1µl di RNasi H e incubato a 37°C per 20' per rimuovere l'RNA stampo dagli ibridi RNA:cDNA.

La **real-time-PCR** è stata eseguita utilizzando il sistema Light Cycler (Roche). La reazione è stata eseguita in un volume finale di 25µl, contenente 800 nM di primers specifici, 12,5 ml iQ SYBR Green (Sigma-Aldrich) e 2µl del cDNA ottenuto mediante la trascrizione inversa. Il protocollo prevedeva le seguenti fasi: denaturazione (95°C per 2'), 35 cicli di amplificazione in due fasi (95°C per 15'' e 60°C per 30''), Allungamento (72°C 5').

I primers per la reazione sono stati selezionati dalla letteratura scientifica o creati mediante apposito software Primer Design (Primer3) <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>:

TLR4 F: 5'-ATGAAATGAGTTGCAGCAGA3-3'

R: 5'-AGCCATCGTTGTCTCCCTAA3-3' [Hoppstädter J. Et al, 2010.].

C5 F: 5'TATCCCATCAAGGTGCAGGT 3'

R: 5'ACTCCAGCACCGTCACTCCA3' (Primer3).

IL15 F: 5'-GGATTTACCGTGGCTTTGAGTAATGAG-3'

R: 5'-GAATCAATTGCAATCAAGAAGTG-3' [Meazza R. et al, 1998.].

STAT1 F: 5'-TGCTCCTTTGGTTGAATCCC-3'

R: 5'-GGAATTTTGAGTCAAGCTGCTG-3' [JING-YI YUAN et al, 2010].

IL7 F: 5' TGCTGCTCGCAAGTTGAGGCAATT3'

R: 5' CCAGGGCAGCTGGTTTTCTTCCTTT3' (Primer3).

TGF- β F: 5'- CACGTGGAGCTGTACCAGAA-3'

R: 5'-GAACCCGTTGATGTCCACCTT -3' [Mika T. et al, 2011.].

Per normalizzare l'espressione dei geni è stata impiegata la β -actina come gene housekeeping:

ACTB F: 5' GGAATTCGAGCAAGAGATGG 3'

R: 5' GAGTGATCTCCTTCTGCATC 3'. [EL-Moataz N. et al, 2013].

3.11 Test in vitro su campioni biologici umani

Per analizzare l'incidenza sierologico-epidemiologica e molecolare dell'infezione da HHV-8, sono stati analizzati diversi campioni biologici, pervenuti all'UO di virologia dell'Azienda Ospedaliero-universitaria Pisana. Particolare attenzione è stata rivolta alle analisi di sangue, siero, saliva, liquor e il liquido ascitico di un paziente affetto da sindrome di Beckwith-Wiedemann, dovuta all'alterazione dell'imprinting di alcuni geni che risiedono sul braccio corto del cromosoma 11 [Knudson A. et al, 1991; Ko J.M., 2013]. Il paziente era stato sottoposto nell'agosto 2008, a trapianto ortoptico di fegato, alla successiva asportazione chirurgica di due metastasi polmonari e in terapia con everolimus, che presentava una sindrome infiammatoria acuta con febbre $>40^{\circ}$, alterazione degli indici di flogosi, pancitopenia, splenomegalia e versamento pleurico bilaterale ed ascitico per la **presenza del genoma di HHV-8**. Dai campioni di siero e saliva è stato isolato il virus, che è stato successivamente caratterizzato.

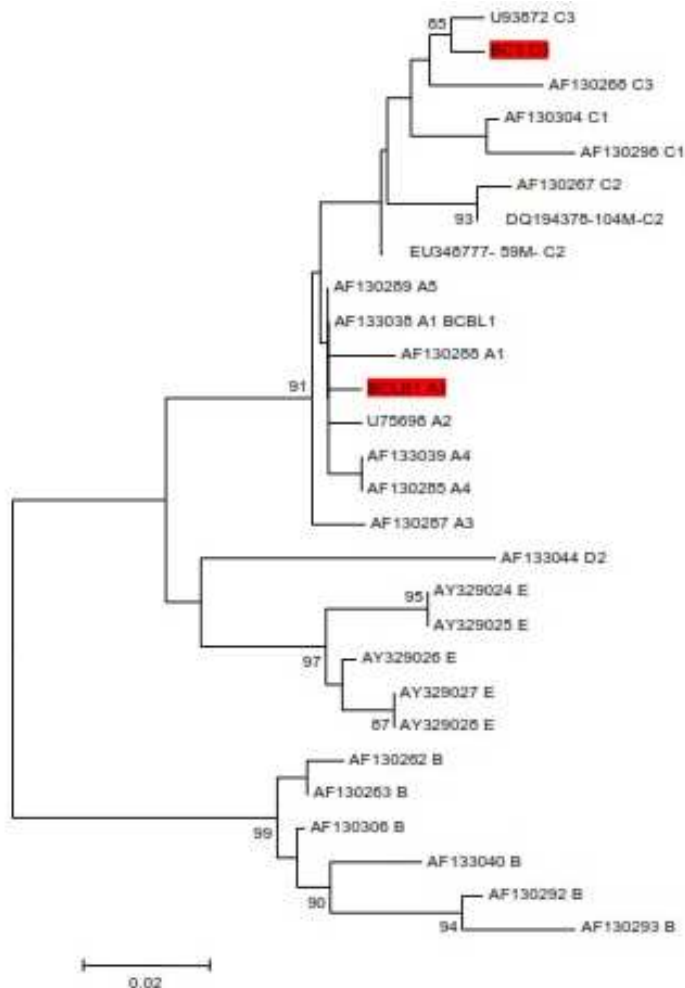
Il DNA virale è stato estratto utilizzando il kit commerciale "QIAamp DNA Mini kit" (QIAgen, Chatsworth, CA), che permette di purificare il DNA totale (genomico, mitocondriale e virale) da sangue intero, plasma, siero, fluidi corporei, linfociti, colture cellulari e tessuti. La concentrazione dell'acido nucleico è stata calcolata attraverso analisi spettrofotometrica (Eppendorf), e la sua qualità è stata valutata mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (Euroclone).

L'analisi del ceppo infettante è stata effettuata con il metodo di sequenziamento del DNA con dideossinucleoterminali o metodo di Sanger (precedentemente descritto nel capitolo **3.2 Tipizzazione Genetica**).

RISULTATI

4.1 Tipizzazione Virale: Clustering Analysis

L'analisi filogenetica della sequenza nucleotidica della regione VR2 ha confermato che linee cellulari BC3 e BCBL1 sono realmente infette rispettivamente con i sottotipi virali C3 e A1 di HHV-8.



Il metodo impiegato, ovvero il NJ, produce alberi non radicati (un albero è detto additivo se le distanze fra i taxa sono uguali alla somma delle lunghezze dei rami che li connettono). Due taxa si dicono vicini o neighbors se sono connessi attraverso un solo nodo interno. Il metodo NJ inizia con un set di nodi terminali non connessi che rappresentano le sequenze da analizzare. Sulla base delle distanze genetiche note, due nodi vicini *i* e *J* vengono scelti e connessi da un nuovo nodo interno *n* (con la conseguente cancellazione dei nodi *i* e *J* stessi). Le sequenze da analizzare diminuiscono nel processo, che viene reiterato fino a che tutti i nodi terminali non vengono connessi in un singolo albero. La maggior parte degli alberi filogenetici produce alberi senza radice: vengono rilevate le differenze tra i taxa ma non

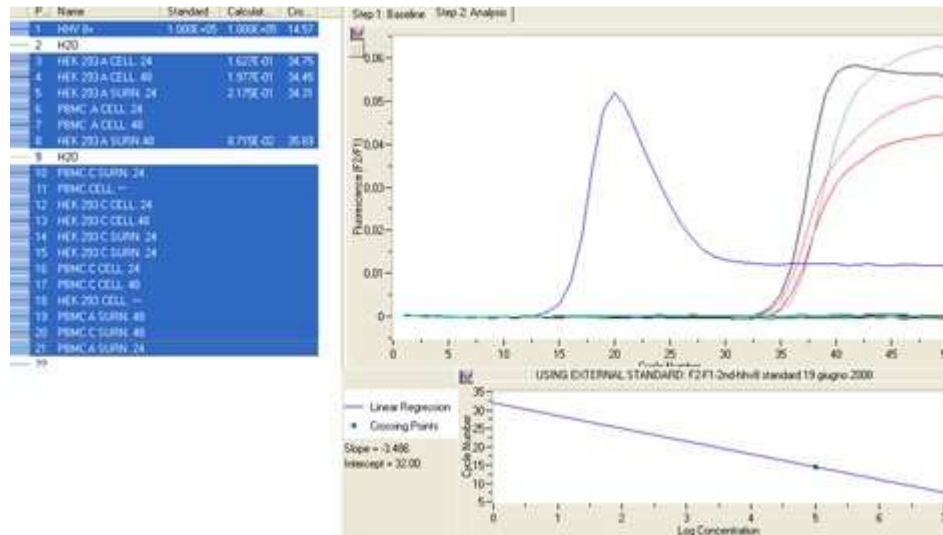
vengono orientati i cambiamenti residui relativamente al tempo. Esistono due metodi per orientare gli alberi:

Metodo dell'outgroup: vengono analizzate delle sequenze esterne al gruppo di studio e la radice viene posta sul ramo che le congiunge a quelle di nostro interesse principale.

Metodo dell'orologio molecolare: Fissato un momento di divergenza da un antenato, si assume che tutte le linee si siano evolute con la stessa velocità, e la radice viene posta nel punto equidistante da tutte le foglie. Questo secondo metodo è risultato il più idoneo per l'analisi dei **ceppi infettanti A1 e C3**.

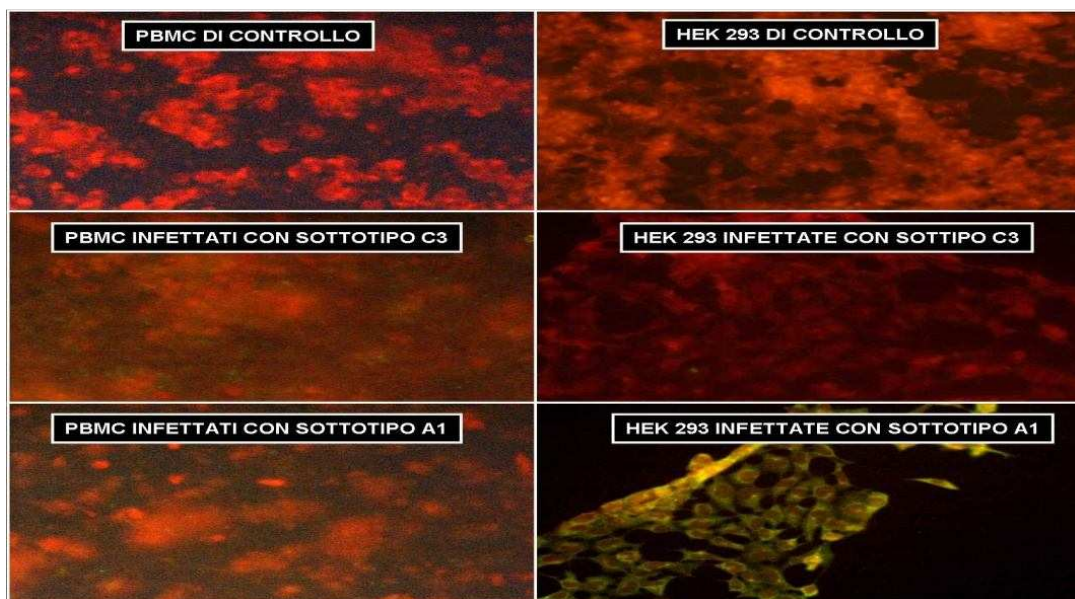
4.2 Risultati analisi molecolari e IFA

La quantificazione effettuata a 24 e 48 ore dall'infezione della linea cellulare epiteliale e dei PBMC mediante real-time PCR (Lightcycler, Roche) ha rilevato una carica maggiore di 10^3 solo nelle cellule e nel surnatante (esaminati separatamente) delle colture di **HEK293**, infettate con il ceppo virale A1. Trascorse 72 e 96 ore il valore di 10^3 è stato raggiunto anche nelle HEK293 infettate con il ceppo virale C3 e nei PBMC, infettati con ambedue i ceppi.



[Cinetica di amplificazione delle colture HEK293 e PBMC infettate con i sottotipi A1 e C3 a 24 e 48 ore]

L'espressione degli antigeni virali è assolutamente maggiore a tutti i tempi sopra descritti nelle HEK293 infettate con il ceppo A1 di HHV-8.



[Immunofluorescenza indiretta. Gli antigeni virali sono maggiormente espressi nella linea HEK293.]

4.3 Gene expression profiling e analisi statistica dei dati

Mediante l'impiego dei DualChip® Microarray (Eppendorf) ,contenenti una serie di sonde rappresentative di 297 geni umani coinvolti nel processo infiammatorio raggruppati in 65 differenti pathways cellulari, è stato esaminato il profilo di espressione della linea cellulare HEK293 e dei PBMC, infettati con i sottotipi A1 e C3 di HHV-8.

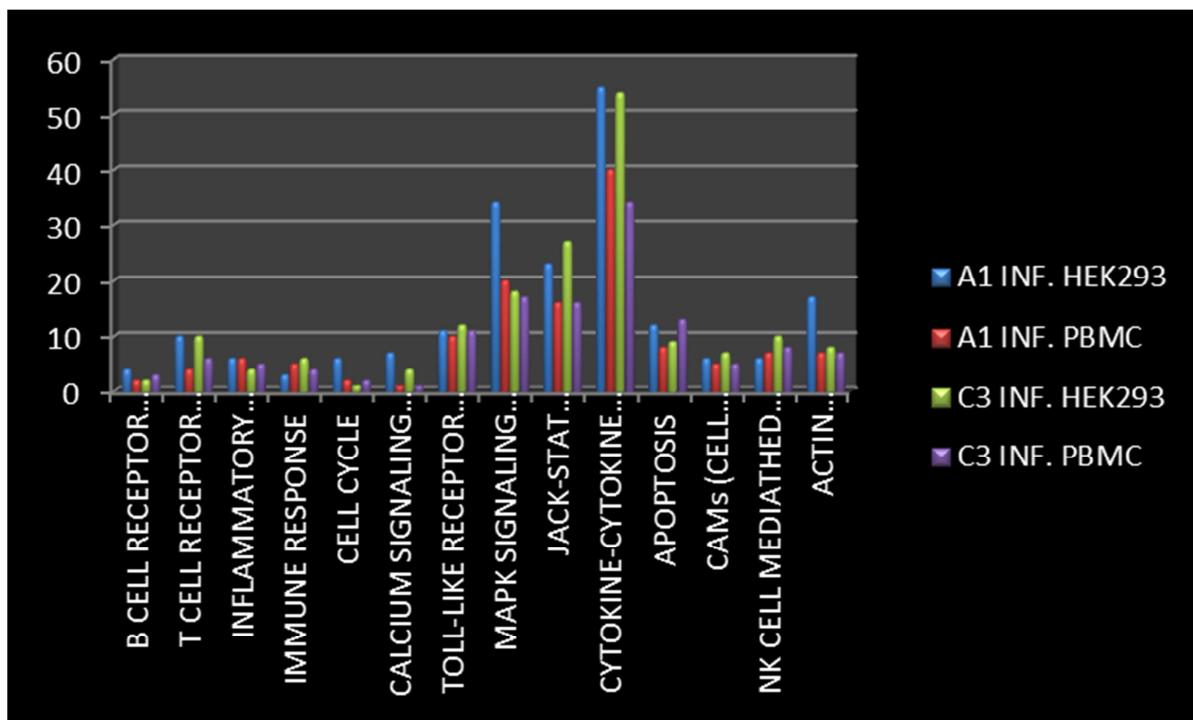
All'analisi statistica effettuata mediante metodica Silverquant (Silverquant Image Viewer e Silverquant Analysis Software, Eppendorf) sono risultati modulati un totale di 360 geni coinvolti nel processo infiammatorio, raggruppabili in 14 differenti pathways. La tabella e il grafico che seguono riassumono i geni modulati nelle due linee cellulari, infettate con entrambe i ceppi di HHV-8:

- 169 geni modulati nella linea cellulare HEK293 infettata con il ceppo A1;
- 104 geni modulati nella linea cellulare PBMC infettata con il ceppo A1;
- 131 geni modulati nella linea cellulare HEK293 infettata con il ceppo C3;
- 93 geni modulati nella linea cellulare PBMC infettata con il ceppo C3.

I pathway coinvolti nella risposta cellulare all'infezione sono: B cell receptor signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, Inflammatory response, Immune response, Cell cycle, Calcium signaling pathway, Toll-like receptor signaling pathway, MAPK signaling pathway, Jack-Stat signaling pathway, Cytokine-Cytokine receptor signaling pathway, Apoptosis, CAMs (Cell Adhesion Molecules), NK cell mediated cytotoxicity, Cytoskeleton regulation.

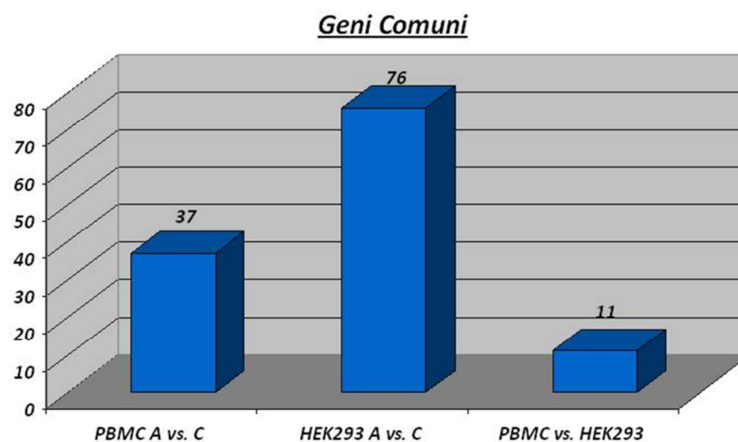
PATHWAY	TOT. GENI MODULATI	A1 INF. HEK293	A1 INF. PBMC	C3 INF. HEK293	C3 INF. PBMC
B CELL RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	6	4	2	2	3
T CELL RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	20	10	4	10	6
INFLAMMATORY RESPONSE	12	6	6	4	5
IMMUNE RESPONSE	11	3	5	6	4
CELL CYCLE	8	6	2	1	2
CALCIUM SIGNALING PATHWAY	8	7	1	4	1
TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	22	11	10	12	11
MAPK SIGNALING PATHWAY	53	34	20	18	17
JACK-STAT SIGNALING PATHWAY	42	23	16	27	16
CYTOKINE-CYTOKINE RECEPTOR SIGNALING PATHWAY	94	55	40	54	34
APOPTOSIS	24	12	8	9	13
CAMs (CELL ADHESION MOLECULES)	19	6	5	7	5
NK CELL MEDIATED CYTOTOXICITY	19	6	7	10	8
ACTIN CYTOSKELETON REGULATION	22	17	7	8	7

[Tabella dei geni modulati nelle HEK293 e nei PBMCs, rispettivamente infetti con i ceppi A1 e C3 di HHV-8.]



[Confronto tra i geni modulati nelle HEK293 e nei PBMCs, rispettivamente infette con i ceppi A1 e C3.]

I risultati ottenuti dall'impiego dei microarray indicano chiaramente che linea HEK293, infettata con i sottotipi A1 e C3, aveva un più alto numero di geni modulati rispetto alla linea linfoide. Analizzando il totale dei geni modulati nelle HEK293 e nei PBMC, infettati con entrambe i ceppi A1 e C3, 11 geni sono risultati comunemente modulati in maniera statisticamente significativa: **C5**, **CCL1**, **IL15**, **IL3**, **IL7**, **IRF2**, **NFATC1**, **STAT1**, **TGFBI**, **TLR4** e **TNFSF11**, che sono implicati nell'interazione virus-cellula e potrebbero essere coinvolti in meccanismi chiave dell'eziologia virale.



[Geni comunemente modulati nella linea HEK293 e ei PBMCs infettati con i ceppi A1 e C3 di HHV-8]

4.5 Validazione dei risultati mediante real-time PCR

La linea **HEK293** infettata con il sottotipo **A1** di HHV-8 ha dimostrato di avere un numero maggiore di geni modulati, rispetto alle stesse infettate con il sottotipo **C3** e rispetto ai PBMC infettati con ambedue i ceppi A1 e C3.

I risultati ottenuti mediante PCR quantitativa (LightCycler, Roche) di alcuni dei geni risultati comunemente modulati nelle due linee si collocano in un range quantitativo compreso **tra 3,80 e 6,25 Log₁₀ Cp/ml** per le HEK293 infettate con il ceppo A1 a 48 ore post inoculo del virus ed estrazione dell'mRNA:

- TLR4: 6,25 Log₁₀ Cp/ml;
- C5: 3,80 Log₁₀ Cp/ml;
- IL15: 5,4 Log₁₀ Cp/ml;
- STAT1: 5,56 Log₁₀ Cp/ml;
- IL7: 6,02 Log₁₀ Cp/ml;
- TGF1 β : 4,31 Log₁₀ Cp/ml.

Questi risultati avvalorano l'ipotesi che non vi siano artefatti nei geni precedentemente esaminati mediante metodica dei Microarray (Eppendorf).

4.6 Risultati delle analisi in vitro

La ricerca di HHV8 su sangue, saliva e sui campioni di aspirato midollare (estrazione genomica con kit QIAGEN-QIA amp DNA blood minikit , quantificazione con kit RocheTibMolBiol. LightMix kit HHV8 su apparecchiatura Roche LightCycler versione 2.0 che prevede l'amplificazione della regione 142bp del ORF73 del virus) ha rilevato una carica virale di 10³ copie/ml.

Il virus HHV-8 isolato dai campioni di siero e saliva e caratterizzato (mediante sequenziamento di Sanger, BigDye Terminator vs.1.1, Abbott, e mediante analisi filogenetica della regione VR2) è un ceppo A1, a conferma del maggior tropismo del virus per le cellule epitelioidi.

DISCUSSIONE

L'agente eziologico del sarcoma di Kaposi, KSHV o HHV-8, è stato associato a diverse neoplasie, tra le quali la Malattia Multicentrica di Castleman, il Linfoma ad effusione primaria e il KS endemico infantile, una forma particolarmente rapida e aggressiva, di recente definizione [Kasolo F.C. et al, 2007]. Mediante studi sieroepidemiologici a livello mondiale e attraverso l'analisi di sequenza dell'ORFK1 del virus, isolato in reperti biotipici di lesioni KS e in colture cellulari derivate da Pel, è stato possibile classificare il genoma virale in 5 ceppi maggiori: A, B, C, D ed E [Russo J.J. et al, 1996]. Il KS classico (Mediterraneo), la sua variante HIV / AIDS associata, e le forme endemica (africana) e iatrogena sono state oggetto di studi approfonditi. Tuttavia, poco si sa del KS endemico infantile (che riguarda particolarmente le regioni dell'Africa sub-sahariana). Nei soggetti adulti è stata confermata la correlazione tra i 5 differenti genotipi e il decorso più o meno severo delle patologie associate all'infezione virale; studi recenti hanno fornito le prime evidenze di un'associazione tra l'infezione con il sottotipo A dell'HHV-8 ed una forma più aggressiva delle patologie correlate [Mancuso et al., 2008]. È possibile che i cinque genotipi siano correlati anche alle differenze nella distribuzione regionale e al basso tasso di ricombinazione, e anche alle dinamiche dell'infezione infantile. È stato dimostrato che il genotipo K1A5 è quello prevalente nel sangue e nei campioni biotipici di KS e di neonati sia HIV-positivi, sia HIV-negativi in Zambia, una regione altamente endemica [Kasolo F.C. et al, 2007; Wakeham K. Et al, 2013]. Anche l'andamento degli anticorpi anti-LANA (antigene nucleare associato alla latenza, altamente immunogeno; questa proteina sopprime p53 ed ha attività trasformante) sembra correlare con l'andamento clinico della malattia e l'andamento della carica virale nella saliva è inversamente proporzionale a quella nel sangue e nel siero. È probabile il titolo anticorpale aumenti nel corso dell'infezione da KSHV, e che questo aumento sia correlato a livelli elevati di stimolazione antigenica. L'infezione in età precoce, seguita da riattivazione del virus latente, può in quest'ottica causare l'esposizione prolungata ad antigeni virali in popolazioni endemiche. Inoltre, fornirebbe il tempo per l'espansione delle cellule B, atte a produrre anticorpi neutralizzanti nella risposta umorale che si verifica negli individui infetto [Kumar P. et al, 2013; Shebl F.M. et al, 2013]. Gli alti livelli di sieroprevalenza del KSHV e l'alta incidenza del sarcoma di Kaposi già in età infantile registrati nelle aree endemiche, indicano l'esistenza di una modalità di trasmissione orizzontale intrafamiliare del virus, oltre che la nota trasmissione sessuale [Lungu E. et al, 2013; Rohner E. et al, 2014]. Le dinamiche della trasmissione dell'HHV-8 da madre a figlio non sono ancora state chiarite, ma numerose evidenze indicano che la fonte di contagio è la saliva dei soggetti sieropositivi. Si ritiene che il virus possa essere trasmesso da madre a figlio attraverso l'applicazione di saliva infetta sulla cute, per lenire ad esempio il fastidio dovuto alle punture di artropodi ematofagi [Minhas V., 2014; Shebl F.M, 2013]. La saliva sembra essere il fluido corporeo maggiormente a rischio per la trasmissione dell'infezione, e proprio in

campioni di saliva sono state riscontrate le maggiori cariche virali, rispetto a campioni di diversa provenienza, in soggetti infetti con il ceppo A [Mancuso R. et al, 2008; Matteoli B. et al, 2008]. Queste evidenze sperimentali portano ad ipotizzare che HHV-8, e in particolar modo il ceppo A, abbia un più elevato tropismo verso le cellule epiteliali, ad esempio quelle che rivestono il cavo orale. I dati ottenuti in questo lavoro di tesi, sembrerebbero supportare tali ipotesi, sia per quanto riguarda le analisi in vitro, sia per quanto riguarda lo studio effettuato sui campioni clinici forniti dall'Azienda Ospedaliera Pisana. Nelle cellule HEK293, infettate con il sottotipo A, è stata rilevata una carica virale maggiore rispetto alle stesse infettate con il sottotipo C e rispetto ai PBMC. Anche l'espressione degli antigeni virali sulla superficie cellulare conferma questo dato. Il virus HHV-8 isolato dai campioni di siero e saliva e caratterizzato appartiene al ceppo A1, a conferma del suo maggiore tropismo per le cellule epitelioidei. I risultati ottenuti mediante la tecnica dei microarray, da ampliare, potrebbero invece fornire i mezzi per comprendere meglio la patogenesi virale e per individuare nuovi target farmacologici. La maggior parte dei geni espressi da HHV-8 durante l'infezione litica sono omologhi di geni cellulari e sono coinvolti in diverse vie di segnalazione, nella proliferazione cellulare, nell'apoptosi e nell'evasione del sistema immunitario dell'ospite [Moore et al. Science, 1996]. Molte proteine codificate da HHV-8 durante la fase di latenza (LANA, v-FLIP e v-cyc) ed espresse nelle Spindle Cells, caratteristiche delle lesioni del KS, mostrano invece proprietà trasformanti [Ballestas ME. Et al, 2011]. Ciascuna di questi geni e i loro relativi prodotti, agendo singolarmente o in maniera sinergica, contribuisce alla progressione della malattia ed è in grado di esercitare un potere trasformante in vitro, ma non è sufficiente in vivo a riprodurre le lesioni caratteristiche del KS nel modello murino. Sebbene il mantenimento del genoma virale sotto forma di episoma, la produzione di citochine infiammatorie e la de-regolazione del ciclo cellulare promosse dall'espressione dei geni virali siano indispensabili per la progressione del KS, i fattori primariamente scatenanti sono ancora sotto indagine. I risultati dello studio dell'espressione genica mediante DualChip contenenti una serie di sonde rappresentative dei geni coinvolti nell'infiammazione, hanno evidenziato una modulazione dell'espressione genica correlata al ceppo infettante e alla linea cellulare ospite. I dati evidenziano infatti che la linea HEK293 infettata con il ceppo A di HHV-8 mostra un numero di geni modulati maggiore rispetto alla stessa infettata con il ceppo C e rispetto ai PBMC infettati con ambedue i ceppi alternativamente. Anche questo conferma il maggiore tropismo di HHV-8 per citotipo epiteliale [Mancuso R. et al., 2008]. I geni modulati sono coinvolti nel pathway delle MAPK, del ciclo cellulare e nella regolazione dell'actina citoscheletrica: sono perciò correlati alla replicazione virale e al processo di maturazione e rilascio dei virioni, che sfruttano il citoscheletro per il loro trasporto attraverso la cellula [Zhu F.X. et al., 2005]. Tra i geni differenzialmente modulati nelle due linee troviamo IL-6, JAK1, STAT1/3, STAT5, IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, VEGF, bFGF, MCP-1, molti dei quali sono coinvolti nell'oncogenesi, come è stato

precedentemente discusso. I geni trovati comunemente modulati e quantificati per essere confermati sono: C5, CCL1, IL15, IL3, IL7, IRF2, NFATC1, STAT1, TGFBI, TLR4 e TNFSF11. Anch'essi sono implicati nei meccanismi di immunoescape e di trasformazione cellulare e le loro modalità d'azione e peso nella patogenesi virale sono state descritte. Questa modulazione differenziale tra i diversi ceppi e le diverse linee cellulari impiegate potrebbe rivelarsi interessante per comprendere meglio i meccanismi dell'infezione, la correlazione con la distribuzione globale e la sieropidemiologia di HHV-8, e il diverso decorso delle patologie correlate, per trovare nuove possibilità di terapia o nuovi target molecolari per lo sviluppo di farmaci e vaccini.

BIBLIOGRAFIA

- An J., Sun Y., Rettig M.B.: **Transcriptional coactivation of c-Jun by the KSHV-encoded LANA.** Blood 103:222–228, 2004.
- AuCoin D.P., Colletti K.S., Cei S.A., Papoušková I., Tarrant M., Pari G.S.: **Amplification of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 lytic origin of DNA replication is dependent upon a cis-acting AT-rich region and an ORF50 response element and the trans-acting factors ORF50 (K-Rta) and K8 (K-bZIP).** Virology. 2004 Jan 20;318(2):542-55.
- AuCoin D.P., Colletti K.S., Xu Y., Cei S.A., Pari G.S.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) contains two functional lytic origins of DNA replication.** J. Virol. 2002 Aug;76(15):7890-6.
- Bais C., B. Santomaso, O. Coso, L. Arvanitakis, E. GerasRaaka., J.S. Gutkind, A.S. Asch, E. Cesarman, M.C. Gershengorn and E.A. Mesri: **G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator.** 1998; Nature 391: 86-89.
- Ballestas M.E., Chatis P.A., Kaye K.M.: **Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency- associated nuclear antigen.** Science 1999; 284:641-4.
- Ballestas M.E., Kaye K.M.: **The latency-associated nuclear antigen, a multifunctional protein central to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency.** Future Microbiol. 2011 Dec;6(12):1399-413.
- Barouk-Simonet E., Andrieux J., Copin M.C., Grardel-Duflos N., Huyghe P., Patte J.H., Preudhomme C., Quesnel B., Laï J.L.: **TPA stimulation culture for improved detection of t(11;14)(q13;q32) in mantle cell lymphoma.** Ann Genet. 2002 Jul-Sep;45(3):165-8.
- Barua A., Vachlas K., Milton R., Thorpe J. : **Castleman's disease- a diagnostic dilemma.** J Cardiothorac Surg. 2014 Nov 28;9(1):170.
- Berenblum I.: **Cancer research in historical perspective: an autobiographical essay.** Cancer Res. 1977 Jan;37(1):1-7.
- Bihl F., Mosam A., Henry L.N., Chisholm J.V., Dollard S., Gumbi P., Cassol E., Page T., Mueller N., Kiepiela P., Martin J.N., Coovadia H.M., Scadden D.T., Brander C.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-specific immune reconstitution and antiviral effect of combined HAART/chemotherapy in HIV clade C-infected individuals with Kaposi's sarcoma.** AIDS. 2007 Jun 19;21(10):1245-52.

- Bourboullia D., Aldam D., Lagos D., Allen E., Williams I., Cornforth D., Copas A., Boshoff C.: **Short- and long-term effects of highly active antiretroviral therapy on Kaposi sarcoma-associated herpesvirus immune responses and viraemia.** *AIDS*. 2004 Feb 20;18(3):485-93.
- Brinkmann M.M., Glenn M., Rainbow L., Kieser A., Henke-Gendo C., Schulz T.F.: **Activation of mitogen-activated protein kinase and NF-kappaB pathways by a Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus K15 membrane protein.** *J. Virol.* 2003 Sep; 77(17): 9346-58.
- Cai Q., Banerjee S., Cervini A., Lu J, Hislop A.D., Dzens R., Robertson E.S.: **IRF-4-mediated CIITA transcription is blocked by KSHV encoded LANA to inhibit MHC II presentation.** *PLoSPathog.* 2013 Oct;9(10):e1003751.
- Cai Q., et al.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent protein LANA interacts with HIF-1 alpha to upregulate RTA expression during hypoxia: latency control under low oxygen conditions.** *J. Virol.* 80:7965–7975, 2006.
- Campbell Mel, Kung Hsing-Jien and Izumiya Yoshihiro: **Long Non-Coding RNA and Epigenetic Gene Regulation of KSHV.** *Viruses* 2014, 6(11), 4165-4177.
- Carbone A., De Paoli P., Gloghini A., Vaccher E.: **KSHV-associated multicentric Castleman disease: A tangle of different entities requiring multitarget treatment strategies.** *Int. J. Cancer.* 2014 Apr 27. doi: 10.1002/ijc.28923.
- Casper C., Krantz E.M., Corey L., et al.: **Valganciclovir for suppression of human herpesvirus-8 replication: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial.** *J. Infect. Dis.* 2008;198(1):23-30.
- Cassar O., Afonso P.V., Bassot S., Plancoulaine S., Duprez R., Capuano C., Abel M., Martin P.M., Gessain A.: **Novel human herpesvirus 8 subtype D strains in Vanuatu, Melanesia.** *Emerg Infect Dis.* 2007 Nov;13(11):1745-8. doi: 10.3201/eid1311.070636.
- Cesarman E, Nador RG, Bai F, Bohenzky RA, Russo JJ, Moore PS, Chang Y, Knowles DM.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma.** *J. Virol.* 1996 Nov;70(11):8218-23.
- Cesarman E., Chang Y., Moore P.S., Said J.W. and Knowles D.M.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences are present in AIDS-related body cavity-based lymphoma.** *New England Journal of Medicine.* 1995, 332: 1186–1191.
- Cesarman E., Chang Y., Moore P.S., Said J.W., Knowles D.M.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas.** *N Engl J Med.* 1995 May 4; 332(18):1186-91.

- Chang Y., P.S. Moore, S.J. Talbot, C.H. Boshoff, T. Zarkowska, D. Godden-Kent, H. Paterson, R.A. Weiss and S. Mittnacht: **Cyclin encoded by KS herpesvirus. 1996;** Nature 382: 410.
- Choi J.K., Lee B.S., Shim S.N., Li M., Jung J.U.: **Identification of the novel K15 gene at the rightmost end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome.** J. Virol. 2000 Jan;74(1):436-46.
- Conrad N.K.: **Posttranscriptional gene regulation in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** AdvApplMicrobiol. 2009;68:241-61.
- Crane G.M., Xian R.R., Burns K.H., Borowitz M.J., Duffield A.S., Taube J.M.: **Primary effusion lymphoma presenting as a cutaneous intravascular lymphoma.** J CutanPathol. 2014 Oct 30. doi: 10.1111/cup.12405.
- Dale J. W., von Schantz M., Plant N.: **Dai geniaigenomi.** Molecular Biology and Biotechnology.
- Di Lorenzo G., Konstantinopoulos P.A., Pantanowitz L., Di Trolino R., De Placido S. and Dezube B.J.: **Management of AIDS-related Kaposi's sarcoma.** Lancet Oncol. 2007. 8: 167-176.
- Djerbi M., Screpanti V., Catrina A.I., Bogen B., Biberfeld P., Grandien A., Dalens H., Rigal D., Djerbi R., Hadj Salah H., Belaid S., Achour H., Djerbi A., Mestiri S.: **The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors.** J Exp Med 1999; 190:1025-32.
- Domsic J.F., Chen H.S., Lu F., Marmorstein R., Lieberman P.M.: **Molecular basis for oligomeric-DNA binding and episome maintenance by KSHV LANA.** PLoSPathog. 2013;9(10):e1003672.
- Dupuy S., Lambert M., Zucman D., Choukem S.P., Tognarelli S., Pages C., Lebbé C., Caillat-Zucman S.: **Human Herpesvirus 8 (HHV8) sequentially shapes the NK cell repertoire during the course of asymptomatic infection and Kaposi sarcoma.** PLoSPathog. 2012 Jan;8(1):e1002486.
- EL-Moataz N., Aboul-enin N., Aboul-Ezz E., Elhussary W. : **Stimulation of Angiogenic and Neurogenic Differentiation of a Population of Human Dental Pulp Stem Cells .** Journal of Applied Sciences Research, 9(6): 3530-3535, 2013.
- Friberg J. Jr., Kong W., Hottiger M.O., Nabel G.J. : **p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death.** Nature 1999; 402:889-94.
- Gasparetto T.D., Marchiori E., Lourenço S., Zanetti G., Vianna A.D., Santos A.A., Nobre L.F.: **Pulmonary involvement in Kaposi sarcoma: correlation between imaging and pathology.** Orphanet J. Rare Dis. 2009 Jul 14;4:18.

- Gbabe O.F., Okwundu C.I., Dedicoat M., Freeman E.E.: **Treatment of severe or progressive Kaposi's sarcoma in HIV-infected adults.** Cochrane Database Syst. Rev. 2014 Aug. 13;8: CD003256.
- Gessain A., Duprez R.: **Spindle cells and their role in Kaposi's sarcoma.** Int J Biochem Cell Biol. 2005 Dec;37(12):2457-65.
- Gottwein E, Mukherjee N, Sachse C, et al.: **A viral microRNA functions as an orthologue of cellular miR-155.** Nature. 2007; 450(7172):1096–1099.
- Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R.: **Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5.** J. Gen. Virol. July 1977; 36 (1): 59–74.
- Hayward G.S.: **KSHV strains: the origins and global spread of the virus.** Semin Cancer Biol. 1999 Jun;9(3):187-99.
- Hengge U.R., Ruzicka T., Tyring S.K., Stuschke M., Roggendorf M., Schwartz R.A., Seeber S.: **Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma.** Lancet Infect Dis. 2002 Jun;2(6):344-52. Review.
- Hengge U.R., Ruzicka T., Tyring S.K., Stuschke M., Roggendorf M., Schwartz R.A., Seeber S.: **Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy.** Lancet Infect Dis. 2002 May;2(5):281-92. Review.
- Hodak E., Hammel I., Feinmesser M., Zelinger A., Maron L., Sulkes J., David M.: **Differential expression of p53 and Ki-67 proteins in classic and iatrogenic Kaposi's sarcoma.** Am J Dermatopathol. 1999 Apr;21(2):138-45.
- Hoppstädter J., Diesel B., Zarbock R., Breinig T., Monz D., Koch M., Meyerhans A., Gortner L., Lehr C.M., Huwer H., Kiemer A.K.: **Differential cell reaction upon Toll-like receptor 4 and 9 activation in human alveolar and lung interstitial macrophages.** Respir Res. 2010 Sep 15;11:124.
- Irmeler M., Thome M., Hahne M., Schneider P., Hofmann K., Steiner V., Bodmer J.L., Schroter M., Burns K., Mattmann C., Rimoldi D., French L.E., Tschopp J.: **Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP.** Nature 1997; 388:190-5.
- Jing-Yi Yuan, Li-Ying Liu, Pei Wang, Zong-Fang Li, Lei Ni, Aiyang Wang, Sheng-Xiang Xiao, Tu-Sheng Song, and Chen Huang: **Small-interfering RNA-mediated silencing of the MAPK p42 gene induces dual effects in HeLa cells.** OncolLett. Jul 2010; 1(4): 649–655.

- Jothikumar N., Cromeans T.L., Hill V.R., Lu X., Sobsey M.D., Erdman D.D.: **Quantitative real-time PCR assays for detection of human adenoviruses and identification of serotypes 40 and 41.** Appl Environ Microbiol. 2005 Jun;71(6):3131-6.
- Kasolo F.C., Spinks J., Bima H., Bates M., Gompels U.A.: **Diverse genotypes of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus (KSHV) identified in infant blood infections in African childhood-KS and HIV/AIDS endemic region.** J. Med. Virol. 2007 Oct;79(10):1555-61.
- Kedes D.H., Ganem D.: **Sensitivity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus replication to antiviral drugs. Implications for potential therapy.** J. Clin. Invest. 1997 May 1;99(9):2082-6.
- Kim Y., Park C.J., Roh J., Huh J.: **Current concepts in primary effusion lymphoma and other effusion-based lymphomas.** Korean J Pathol. 2014 Apr;48(2):81-90.
- Kirshner J.R., K. Staskus, A. Haase, M. Lagunoff and D. Ganem: **Expression of the open reading frame 74 (G-protein-coupled receptor) gene of Kaposi's sarcoma (KS)-associated herpesvirus: implications for KS pathogenesis.** 1999; J. Virol. 73 (7): 6006-6014.
- Knudson A., VandeWoude G.F., Friend S.H., Cavenee W.K., Brodeur G.M.: **Developmental genetics and childhood cancer. AACR special conference in cancer research.** Cancer Res. 1991 Oct 1;51(19):5435-9.
- Ko J.M.: **Genetic syndromes associated with overgrowth in childhood.** Ann. PediatrEndocrinolMetab. 2013 Sep;18(3):101-5.
- Koopal S., Furuhejm J.H., Järviluoma A., Jäämaa S., Pyakurel P., Pussinen C., Wirzenius M., Biberfeld P., Alitalo K., Laiho M., Ojala P.M.: **Viral oncogene-induced DNA damage response is activated in Kaposi sarcoma tumorigenesis.** PLoSPathog. 2007 Sep 7;3(9):1348-60.
- Kumar P., Kuwa N.Y., Minhas V., Marimo C., Shea D.M., Kankasa C., Wood C.: **Higher levels of neutralizing antibodies against KSHV in KS patients compared to asymptomatic individuals from Zambia.** PLoSOne. 2013 Aug 14;8(8):e71254.
- La Ferla L., Pinzone M.R., Nunnari G., Martellotta F., Lleshi A., Tirelli U., De Paoli P., Berretta M., Cacopardo B.: **Kaposi' s sarcoma in HIV-positive patients: the state of art in the HAART-era.** EurRevMedPharmacol Sci. 2013 Sep;17(17):2354-65.
- Laor Y., Schwartz R.A.: **Epidemiologic aspects of american Kaposi's sarcoma.** J SurgOncol. 1979 Dec;12(4):299-303.

- Lee H., J. Guo, M. Li, J.K. Choi, M. DeMaria, M. Rosenzweig and J.U. Jung: **Identification of an immunoreceptor tyrosine-based activation motif of K1 transforming protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** 1998; Mol. Cell. Biol. 18 (9): 5219-5228.
- Lee H., R. Veazey, K. Williams, M. Li, J. Guo, F. Neipel, B. Fleckenstein, A. Lackner, R.C.: **Desrosiers and J.U. Jung. Deregulation of cell growth by the K1 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** 1998; Nat. Med. 4 (4):435-440.
- Liu Y., Cao Y., Liang D., Gao Y, Xia T., Robertson E.S., Lan K.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus RTA activates the processivity factor ORF59 through interaction with RBP-Jkappa and a cis-acting RTA responsive element.** Virology. 2008 Oct 25; 380(2):264-75.
- Lo P., Yu X., Atanasov I., Chandran B., Zhou ZH.: **Three-dimensional localization of pORF65 in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus capsid.** J. Virol. 2003 Apr;77(7):4291-7.
- Lu J., Jha H.C., Verma S.C., Sun Z., Banerjee S., Dzen R., Robertson E.S.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA contributes to viral latent replication by activating phosphorylation of survivin.** J. Virol. 2014 Apr;88(8):4204-17.
- Lungu E., Massaro T.J., Ndelwa E., Ainea N., Chibaya S., Malunguza N.J.:**Mathematical modeling of the HIV/Kaposi's sarcoma coinfection dynamics in areas of high HIV prevalence.** Comput Math MethodsMed. 2013;2013:753424.
- Mancuso R., Biffi R., Valli M., Bellinvia M., Turlaki A., Ferrucci S., Brambilla L., Delbue S., Ferrante P., Tinelli C., Clerici M.: **HHV8 a subtype is associated with rapidly evolving classic Kaposi's sarcoma.** J. Med, Virol. 2008 Dec;80(12):2153-60. doi: 10.1002/jmv.21322.
- Mann D.J., E.S. Child, C. Swanton, H. Laman and N. Jones.: **Modulation of p27Kip1 levels by the cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** 1999; EMBO J. 18 (3): 654-663.
- Matteoli B., Parenti S., Broccolo F., Vatteroni M.L., Pistello M., Ceccherini-Nelli L.: **Correlazione tra genotipo e carica virale diHHV8.** Comunicazione orale al 37° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia. Roma. 12-15/10/2008.
- McCormick C. and Ganem D.: **The kaposinB protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNA.** 2005; Science 307: 739-741.
- Meazza R., Basso S., Gaggero A., Detotero D., Trentin L., Pereno R., Azzarone B., Ferrini S.: **Interleukin (IL)-15 induces survival and proliferation of the growth factor-dependent**

acute myeloid leukemia M-07e through the IL-2 receptor beta/gamma. *Int J Cancer.* 1998 Oct 5;78(2):189-95.

- Meir Shamy, JianyongLiu, RenfengLi, Gangling Liao, Li Shen, Melanie Greenway, ShaohuiHu, JianZhu, ZhiXie, Richard F. Ambinder, Jiang Qian, HengZhu, and S. Diane Hayward.: **A Protein Array Screen for Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus LANA Interactors Links LANA to TIP60, PP2A Activity, and Telomere Shortening.** *J. Virol.* May 2012; 86(9): 5179–5191.
- Minhas V., Wood C.: **Epidemiology and Transmission of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus.** *Viruses* 2014 Nov 4; 6(11):4178-4194.
- Moore P.S., Chang Y.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirusimmuno evasion and tumorigenesis: two sides of the same coin?** *Annu. Rev. Microbiol.* 2003;57:609-39.
- Moore P.S., Gao S.J., Dominguez G., Cesarman E., Lungu O., Knowles D.M., Garber R., Pellett P.E., McGeoch D.J. and Chang Y.: **Primary characterization of a herpesvirus agent associated with Kaposi's sarcoma.** 1996; *J. Virol.* 70 (1): 549-558.
- Muralidhar S., A.M. Pumfery, M. Hassani, M.R. Sadaie, N. Azumi, M. Kishishita, J.N. Brady, J. Doniger, P. Medveczky and L.J. Rosenthal: **Identification of Kaposin (Open Reading Frame K12) as a human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) transforming gene.** 1998; *J. Virol.* 72 (6): 4980-4988.
- Mutalima N., Molyneux E.M., Johnston W.T., Jaffe H.W., Kamiza S., Borgstein E., Mkandawire N., Liomba G.N., Batumba M., Carpenter L.M., Newton R.: **Impact of infection with human immunodeficiency virus-1 (HIV) on the risk of cancer among children in Malawi - preliminary findings.** *Infect Agent Cancer.* 2010 Feb 12;5:5.
- Nakamura H., Li M., Zarycki J., Jung J.U.: **Inhibition of p53 tumor suppressor by viral interferon regulatory factor.** *J. Virol.* 2001; 75:7572–7582.
- Nelwan E.J., Pramono L.A., Lubis A.M., Djoerban Z.: **Kaposi sarcoma of the eye in an HIV patient well-responded to HAART.** *Acta Med. Indones.* 2014 Jul;46(3):253-5.
- Okada S., Goto H., Yotsumoto M.: **Current status of treatment for primary effusion lymphoma.** *Intractable Rare Dis Res.* 2014 Aug;3(3):65-74.
- Okada S., Goto H., Yotsumoto M.: **Current status of treatment for primary effusion lymphoma.** *Intractable Rare Dis. Res.* 2014 Aug; 3(3):65-74.

- Ortega L., Cooper C.J., Otoukesh S., Mojtahedzadeh M., Didia C.S., Torabi A., Nahleh Z.: **Multicentric Castleman's Disease and Kaposi's Sarcoma in a HIV-Positive Patient on Highly Active Antiretroviral Therapy.** *Rare Tumors.* 2014 Aug 6;6(3):5480.
- Ortega L., Cooper C.J., Otoukesh S., Mojtahedzadeh M., Didia C.S., Torabi A., Nahleh Z.: **Multicentric Castleman's Disease and Kaposi's Sarcoma in a HIV-Positive Patient on Highly Active Antiretroviral Therapy.** *Rare Tumors.* 2014 Aug 6;6(3):5480.
- Ota Y., Hishima T., Mochizuki M., Kodama Y., Moritani S., Oyaizu N., Mine S., Ajisawa A., Tanuma J., Uehira T., Hagiwara S., Yajima K., Koizumi Y., Shirasaka T., Kojima Y., Nagai H., Yokomaku Y., Shiozawa Y., Koibuchi T., Iwamoto A., Oka S., Hasegawa H., Okada S., Katano H.: **Classification of AIDS-related lymphoma cases between 1987 and 2012 in Japan based on the WHO classification of lymphomas, fourth edition.** *Cancer Med.* 2014 Feb; 3(1):143-53.
- Pelsler C., Dazzi C., Graubard B.I., Lauria C., Vitale F., Goedert J.J.: **Risk of classic Kaposi sarcoma with residential exposure to volcanic and related soils in Sicily.** *Ann. Epidemiol.* 2009 Aug;19(8):597-601.
- Perkins EM., Anacker D., Davis A., Sankar V., Ambinder RF., Desai P.: **Small capsid protein pORF65 is essential for assembly of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus capsids.** *J. Virol.* 2008 Jul;82(14):7201-11.
- Persson L.M., Wilson A.C.: **Wide-scale use of Notch signaling factor CSL/RBP-Jkappa in RTA-mediated activation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic genes.** *J. Virol.* 2010 Feb;84(3):1334-47.
- Polson A.G., Wang D., DeRisi J. and Ganem D.: **Modulation of host gene expression by the constitutively active G protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** 2002; *Cancer Res.* 62: 4525-4530.
- Poole L.J., Zong J.C., Ciuffo D.M., Alcendor D.J., Cannon J.S., Ambinder R., Orenstein J.M., Reitz M.S., Hayward G.S.: **Comparison of genetic variability at multiple loci across the genomes of the major subtypes of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus reveals evidence for recombination and for two distinct types of open reading frame K15 alleles at the right-hand end.** *J. Virol.* 1999 Aug;73(8):6646-60.
- Pramod P., Naranatt, Harinivas H., Krishnan, Stan R., Svojanovsky, Clark Bloomer, Sachin Mathur, and Bala Chandran: **Host Gene Induction and Transcriptional Reprogramming in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus (KSHV/HHV-8)-Infected Endothelial, Fibroblast, and B Cells: Insights into Modulation Events Early during Infection.** *Cancer Res* January 1, 2004 64:72-84;

- Renne R., Zhong W., Herndier B., McGrath M., Abbey N., Kedes D., Ganem D.: **Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture.** *Nat Med.* 1996 Mar;2(3):342-6.
- Riva Giovanni, Luppi Mario, Barozzi Patrizia, Forghieri Fabio, and Potenza Leonardo: **How I treat HHV8/KSHV-related diseases in post transplant patients.** November 15, 2012; *Blood:* 120 (20).
- Rohner E., Wyss N., Trelle S., Mbulaiteye S.M., Egger M., Novak U., Zwahlen M., Bohlius J.: **HHV-8 seroprevalence: a global view.** *Syst Rev.* 2014 Feb 12;3:11. doi: 10.1186/2046-4053-3-11.
- Rossetto C., Yamboliev I., Pari G.S.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 K-bZIP modulates latency-associated nuclear protein-mediated suppression of lytic origin-dependent DNA synthesis.** *J. Virol.* 2009 Sep;83(17):8492-501.
- Russo J.J., Bohenzky R.A., Chien M.C., Chen J., Yan M., Maddalena D., Parry J.P., Peruzzi. D., Edelman I.S., Chang Y., Moore P.S.: Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *ProcNatlAcadSci USA.*1996 Dec 10;93(25):14862-7.
- Samols M.A, HU J., Skalsky R.L., Renne R.: **Cloning and identification of a microRNA cluster within the latency-associated region of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** *J. Virol.* 2005; 79(14): 9301–9305.
- Santos M., Vilasboas V., Mendes L., Talhari C., Talhari S.: **Lymphangiectatic Kaposi's sarcoma in a patient with AIDS.** *An Bras Dermatol.* 2013 Mar-Apr;88(2):276-8.
- Shamay M., Krithivas A., Zhang J., Hayward S.D.: **Recruitment of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:14554 –14559, 2006.
- Sharp T.V., Wang H.W., Koumi A., Hollyman D., Endo Y., Ye H., Du M.Q., Boshoff C.: **K15 protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is latently expressed and binds to HAX-1, a protein with antiapoptotic function.** *J. Virol.* 2002 Jan;76(2):802-16.
- Shebl F.M., Emmanuel B., Bunts L., Biryahwaho B., Kiruthu C., Huang M.L., Pfeiffer R.M., Casper C., Mbulaiteye S.M.: **Population-based assessment of kaposi sarcoma-associated herpesvirus DNA in plasma among Ugandans.** *J. Med. Virol.* 2013 Sep;85(9):1602-10.
- Singh V.V., Dutta D., Ansari M.A., Dutta S., Chandran B.: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the ATM and H2AX DNA damage response early during de novo infection of primary endothelial cells, which play roles in latency establishment.** *J. Virol.* 2014 Mar;88(5):2821-34.

- Soumerai J.D., Sohani A.R., Abramson J.S.: **Diagnosis and management of Castlemandisease.** Cancer Control. 2014 Oct; 21(4):266-78.
- Spiller O.B., Robinson M., O'Donnell E., Milligan S., Morgan B.P., et al.: **Complement regulation by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF4 protein.** J. Virol. 2003; 77:592–599.
- Staskus K.A., W. Zhong, K. Gebhard, B. Herndier, H. Wang, R. Renne, J. Beneke, J. Pudney, D.J. Anderson, D. Ganem and A.T. Haase: **Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells.**1997; J. Virol. 71 (1): 715-719.
- Sun Q., Matta H. and Chaudhary P.M.: **The human herpesvirus 8-encoded viral FLICE-inhibitory protein protects against growth factor withdrawal-induced apoptosis via NF-kappa B activation.** 2003; Blood 101: 1956-1961.
- Sun R., Lin S.F., Gradoville L., Yuan Y, Zhu F., Miller G.: **A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** ProcNatlAcadSci U S A. 1998 Sep 1; 95(18):10866-71.
- Sun R., Lin S.F., Gradoville L., Yuan Y., Zhu F., Miller G.: **A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** ProcNatlAcadSci USA. 1998 Sep 1;95(18):10866-71.
- Sun R., Lin S.F., Gradoville L., Yuan Y., Zhu F., Miller G.: **A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus.** ProcNatlAcadSci USA. 1998 Sep 1;95(18):10866-71.
- Swerdlow S.H., Quintanilla-Martinez L., Willemze R., Kinney M.C.: **Cutaneous B-cell lymphoproliferative disorders: report of the 2011 Society for Hematopathology/European Association for Haematopathology workshop.** Am J ClinPathol. 2013 Apr;139(4):515-35.
- Swerdlow S.H.: **Hematopathology: LC14-1 DIAGNOSIS OF MALIGNANT LYMPHOMAS IN 2014.** Pathology. 2014 Oct;46 Suppl 2:S20-1.
- Terao Mika, Murota Hiroyuki, Kimura Akihiro, Kato Arisa, Ishikawa Akiko, Igawa Ken, Miyoshi Eiji, and Katayama Ichiro: **11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase-1 is a Novel Regulator of Skin Homeostasis and a Candidate Target for Promoting Tissue Repair.** PLoS One. 2011; 6(9): e25039.
- Thome M., P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meinl, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J.L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P.H. Krammer, M.E. Peter and J. Tschopp: **Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPS) prevent apoptosis induced by death receptors.** 1997; Nature 386: 517-521.

- Vázquez Ede L., Carey V.J., Kaye K.M.: **Identification of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA regions important for episome segregation, replication, and persistence.** J. Virol. 2013 Nov;87(22):12270-83.
- Verma S.C., Choudhuri T., Kaul R., Robertson E.S.: **Latency-associated nuclear antigen (LANA) of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus interacts with origin recognition complexes at the LANA binding sequence within the terminal repeats.** J. Virol. 2006; 80(5):2243–2256.
- Wakeham K., Webb E.L., Sebina I., Nalwoga A., Muhangi L., Miley W., Johnston W.T., Ndibazza J., Whitby D., Newton R., Elliott A.M.: Risk factors for seropositivity to Kaposi sarcoma-associated herpesvirus among children in Uganda. J. Acquir Immune Defic Syndr. 2013 Jun 1;63(2):228-33.
- Wang H.W. and Boshoff C.: **Linking Kaposi virus to cancer associated cytokines.** 2005; Trends Mol. Med. 11: 309-312.
- Wieters I., Atta J., Kann G., Owasil J., Goepel S., Haberl A., Stephan C., Wolf T.: **Autologous stem cell transplantation in HIV-related lymphoma in the rituximab era - a feasibility study in a monocentric cohort.** J. Int. AIDS. Soc. 2014 Nov 2;17(4 Suppl 3):19648.
- Wolf T., Brodt H.R., Fichtlscherer S., Mantzsch K., Hoelzer D., Helm E.B., et al.: **Changing incidence and prognostic factors of survival in AIDS-related non-Hodgkin lymphoma in the era of highly active antiretroviral therapy.** Leuk Lymph. 2005; 46(2):20715.
- Wyen C., Jensen B., Hentrich M., Siehl J., Sabranski M., Esser S., et al.: **Treatment of AIDS-related lymphomas: rituximab is beneficial even in severely immunosuppressed patients.** AIDS. 2012; 26(4): 45764.
- Xu Y., AuCoin D.P., Huete A.R., Cei S.A., Hanson L.J., Pari G.S.: **A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 ORF50 deletion mutant is defective for reactivation of latent virus and DNA replication.** J. Virol. 2005 Mar;79(6):3479-87.
- Zhong W., H. Wang, B. Herndier and D. Ganem: **Restricted expression of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genes in Kaposi sarcoma.** 1996; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6641-6646.
- Zong J., Ciufu D.M., Viscidi R., Alagiozoglou L., Tying S., Rady P., Orenstein J., Boto W., Kalumbuja H., Romano N., Melbye M., Kang G.H., Boshoff C., Hayward G.S.: **Genotypic analysis at multiple loci across Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) DNA molecules: clustering patterns, novel variants and chimerism.** J. Clin Virol. 2002 Jan; 23(3):119-48.

ALLEGATO: ATTIVITÀ DI RICERCA SVOLTA ALL'ESTERO

Contributo al lavoro scientifico:

Methylation warfare; interaction of *Streptococcus pneumoniae* bacteriophages with their host.

Leonardo Furi¹, Ana Manso¹, Maddalena Galati², Megan De Ste Croix¹, Richard Hiagh¹, Kristine Engelsen Fjelland³, Gregor Duncan Gilfillan³, Martha Clockie⁴, Marco R Oggioni^{1,*}

Affiliations

1 Department of Genetics, University of Leicester, Leicester, UK

2 Virology Unit, Pisa University Hospital, Pisa, Italy

3 Department of Medical Genetics, Oslo University Hospital, Oslo, Norway

4 Department of Infection, Immunity and Inflammation, University of Leicester, Leicester, UK

* E-mail: mro5@le.ac.uk

INTRODUZIONE.

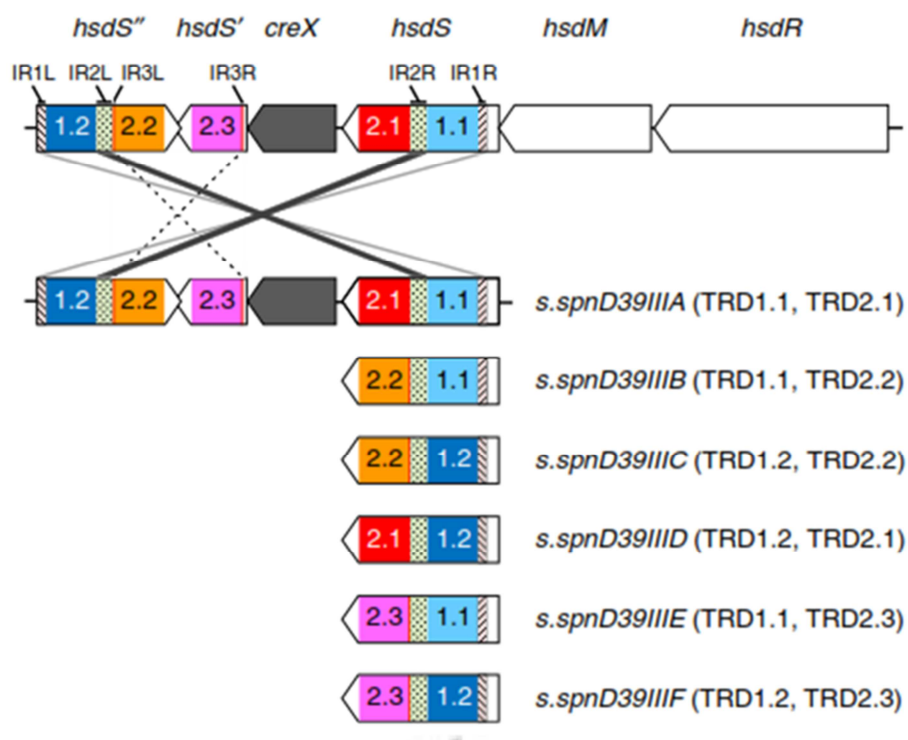
Lo *Streptococcus Pneumoniae*, appartenente al genere *Streptococcus*, è un batterio Gram positivo ed è l'agente eziologico della polmonite [Andam C.P., 2014]. Questo batterio si dimostra essere alfa-emolitico in condizioni di aerobiosi, beta-emolitico in condizioni di anaerobiosi. È molto esigente da coltivare; al pari degli altri streptococchi manca di catalasi, quindi abbisogna degli enzimi che degradano le specie ossidanti dell'ossigeno per poter sopravvivere in terreni agar sangue.



[Crescita batterica di *S. pneumoniae* su piastra agar sangue; microbiologyinpictures.com]

Pur essendo un colonizzatore fisiologico delle vie aeree umane, lo *S. Pneumoniae* è in grado di passare da una forma innocua per l'uomo ad una forma altamente virulenta, causando numerosi decessi soprattutto nei soggetti immunocompromessi e nei bambini [Marks L. et al, 2012].

Recenti studi hanno evidenziato che il sistema di restrizione e modificazione in *S. Pneumoniae* (indicato dalla sigla **SpnD39III**) è soggetto a riarrangiamenti casuali che si traducono nella formazione di sei diversi profili genomici che potrebbero avere un impatto importante sulla variazione di virulenza. I profili alternativi mostrano un diverso pattern di metilazione del genoma batterico stesso [Ana Sousa Manso et al, 2014].



[Schematic map of the SpnD39III locus and of the six alternative hsdS genes; Ana Sousa Manso, 2014.]

I sistemi di restrizione **RM** (restriction and methylation system) hanno solitamente il compito di proteggere i batteri dal materiale genetico esogeno introdotto nella cellula, degradandolo; si ipotizza che questo meccanismo si sia evoluto principalmente in risposta all'attacco da parte dei batteriofagi di *S.pneumoniae*, ma che costituisca anche un significativo fattore di adattamento alle condizioni ambientali e un importante fattore di virulenza [Ana Sousa Manso, 2014]. Le caratteristiche genetiche delle varianti di *S. pneumoniae* ed i meccanismi patogenetici messi in atto dal batterio per resistere alle difese dell'ospite ed ai trattamenti antibiotici sono in tal senso un chiaro esempio di regolazione epigenetica.

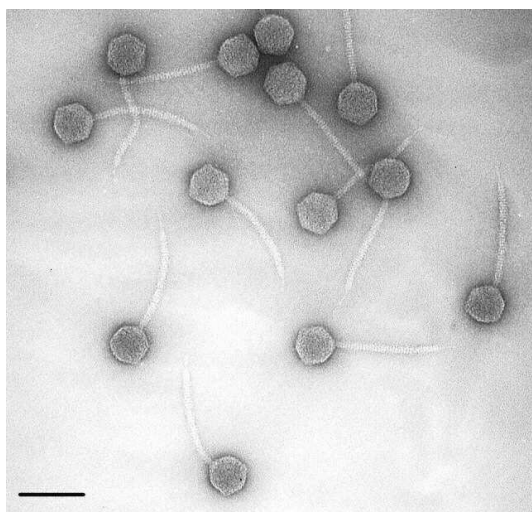
PREMESSA AL LAVORO SCIENTIFICO.

In questo lavoro sono stati impiegati i seguenti ceppi batterici:

- Ceppo 2 virulento o Avery's strain **D39** [Avery 1944 ; Lanie J. et al, 2007];
- Ceppo **DP1400** derivato dal ceppo non capsulato di *S. pneumoniae* Rx1 [Pearce et al, 2002];
- Mutanti **spnDP1004III ko mutant o FP470**, **spnIIDP1004A locked mutant (FP424)** e **spnIIDP1400B locked mutant (FP422)** [Department of Genetics, University of Leicester, UK], “bloccati” nella conformazione evidenziata rispetto al sistema di metilazione e restrizione spnIII.

Sono stati impiegati inoltre i mutanti Ko, A-metilato B-metilato del batteriofago **SpSL1**, isolati rispettivamente nei ceppi FP470, FP424 ed FP422 come ospite [Department of Genetics, University of Leicester, UK].

SpSL1 Presenta un capsido isometrico del diametro di 50 nm e una caratteristica coda non contrattile di 160 nm che termina in una singola fibra: queste caratteristiche permettono di classificarlo come appartenente alla famiglia Siphoviridae. Il suo genoma è lungo 33.756 bp e mostra un contenuto in GC pari al 38,6%. All'estremità del genoma è presente un tratto a filamento singolo coesivo di 11bp (5'-CGGTGTCAATC-3') necessario per la replicazione del fago. SpSL1 lisogeno si trova integrato in due tratti specifici del genoma di *S. pneumoniae*, csRNA3 e csRNA2 (5'-CTTTTTCATAATAATCTCCCT-3') che fanno parte di quattro sequenze codificanti per small RNA a funzione ancora ignota e denominati per l'appunto csRNA2, 3, 4 e 5 [vedi tesi **Methylation warfare; interaction of Streptococcus pneumoniae bacteriophages with their host**, Leonardo Furi, 2014].



[Electron micrographs of Siphoviridae; textbookofbacteriology.net.]

SCOPO.

Il ciclo replicativo di un batteriofago può essere distinto in fasi sequenziali: la collisione fago con un batterio suscettibile; l'adsorbimento mediante specifici recettori; l'introduzione dell'acido nucleico all'interno del batterio; un periodo di eclissi, durante il quale scatta la sintesi delle proteine fagiche e la replicazione dell'acido nucleico; un periodo "post-eclipse", durante il quale i virioni giungono a maturazione; il rilascio dei virioni neoformati e infine la diffusione [Ellis and Delbrück, 1939]. Molte tecniche possono essere impiegate per capire come i virus possano infettare le cellule e replicarsi [Hyman P., Abedon S.T., 2009]; scopo di questo lavoro è stato lo studio delle varie fasi del ciclo replicativo di SPSL1, in particolare modo della fase di eclissi, del rilascio dei virioni e dell'efficienza di replicazione mediante esperimenti di:

ADSORPTION RATE,

ONE STEP GROWTH CURVE,

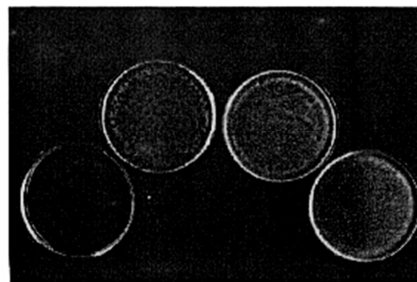
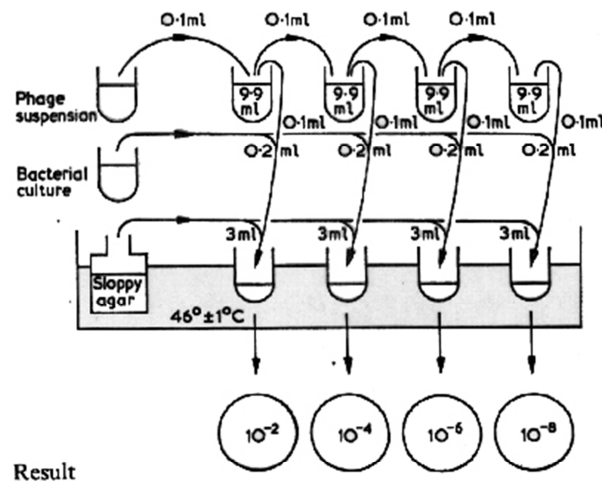
BURST SIZE.

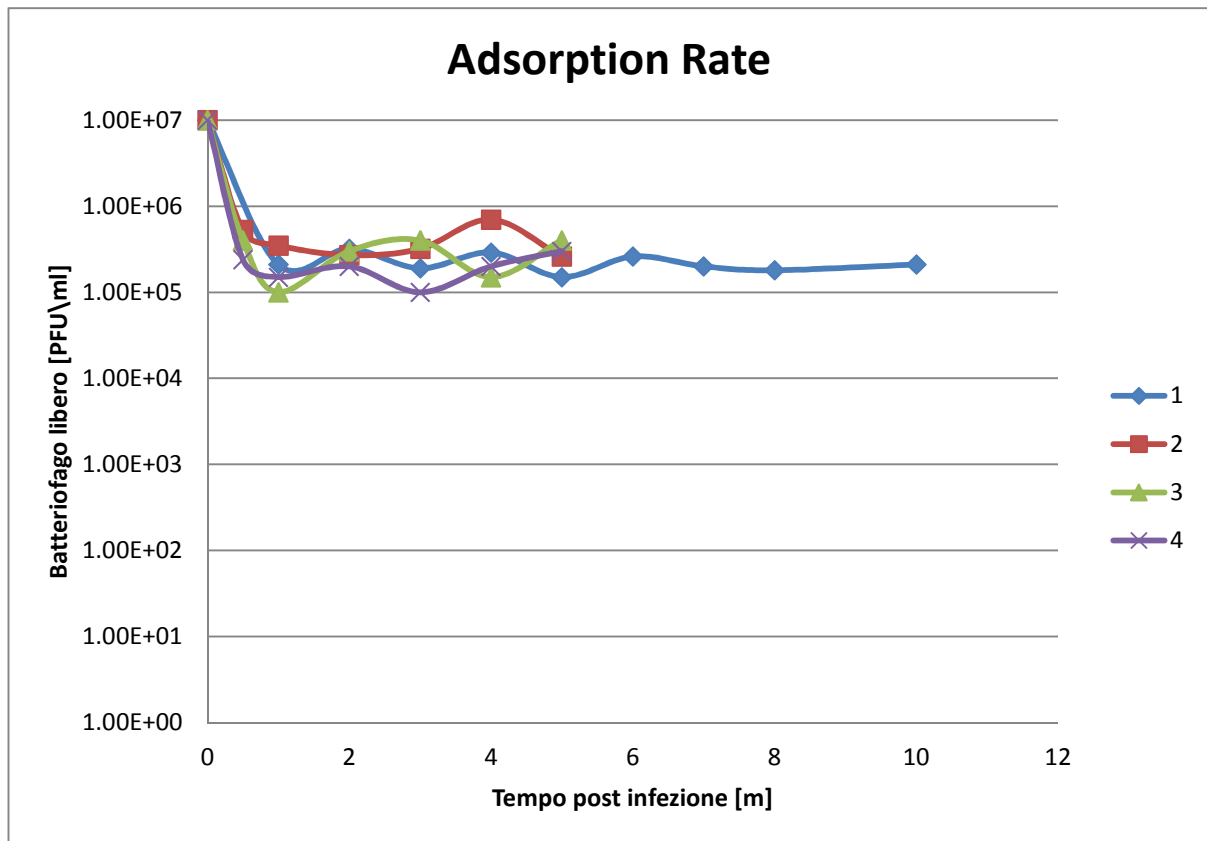
È stato valutato inoltre l'effetto **dell'attività enzimatica di SpnIII sugli acidi nucleici** di cellule infettate con SpSL1.

ADSORPTION RATE.

È stato valutato il tasso di adsorbimento del batteriofago SpSL1 Ko nel ceppo batterico suscettibile FP470 (spnDP1004III ko mutant), coltivato in 5 ml di CAT-Galattosio (Bacto Casitone 10 g/l, Bacto Tryptone 10 g/l, Yeast Extract 0.5 g/l, NaCl 5 g/l, K₂HPO₄ 1.5 mM, and 0.2% D-Galactose) a 32°C sino al raggiungimento di una OD₅₉₀ pari a 0.1 [Pearce et al, 2002], che corrisponde ad una concentrazione di 10⁸ CFU/ml. La MOI (rapporto tra il numero di agenti infettanti e il target di infezione) impiegata per infettare FP470 era di 0.1 [Shao Y., Wang I.N., 2008].

La presenza di fagi in soluzione può essere facilmente e rapidamente messa in evidenza con il metodo delle placche: il campione da testare viene mescolato con alcuni ml di soft agar e la miscela viene poi distribuita su una piastra di agar nutriente, sul quale si stanno già moltiplicando i batteri adatti (suscettibili); alternativamente, il campione e i batteri vengono mescolati contemporaneamente al soft agar, distribuito poi su una piastra di agar addizionato di catalasi (Sigma, Germany). Questo test è anche noto come Double-Layer Agar (D-LA) assay [Gallet R. et al, 2009; Santos S.B. et al.,2009]. Se i fagi sono assenti dalla soluzione, i batteri formeranno una patina omogenea; la presenza dei fagi è invece dimostrata da aree lisate di batteri uccisi, che appaiono come aloni circolari trasparenti, dette placche di lisi. La loro conta, dopo una incubazione overnight a 37°C , 5% CO₂, permette di determinare la concentrazione in termini di PFU/ml.





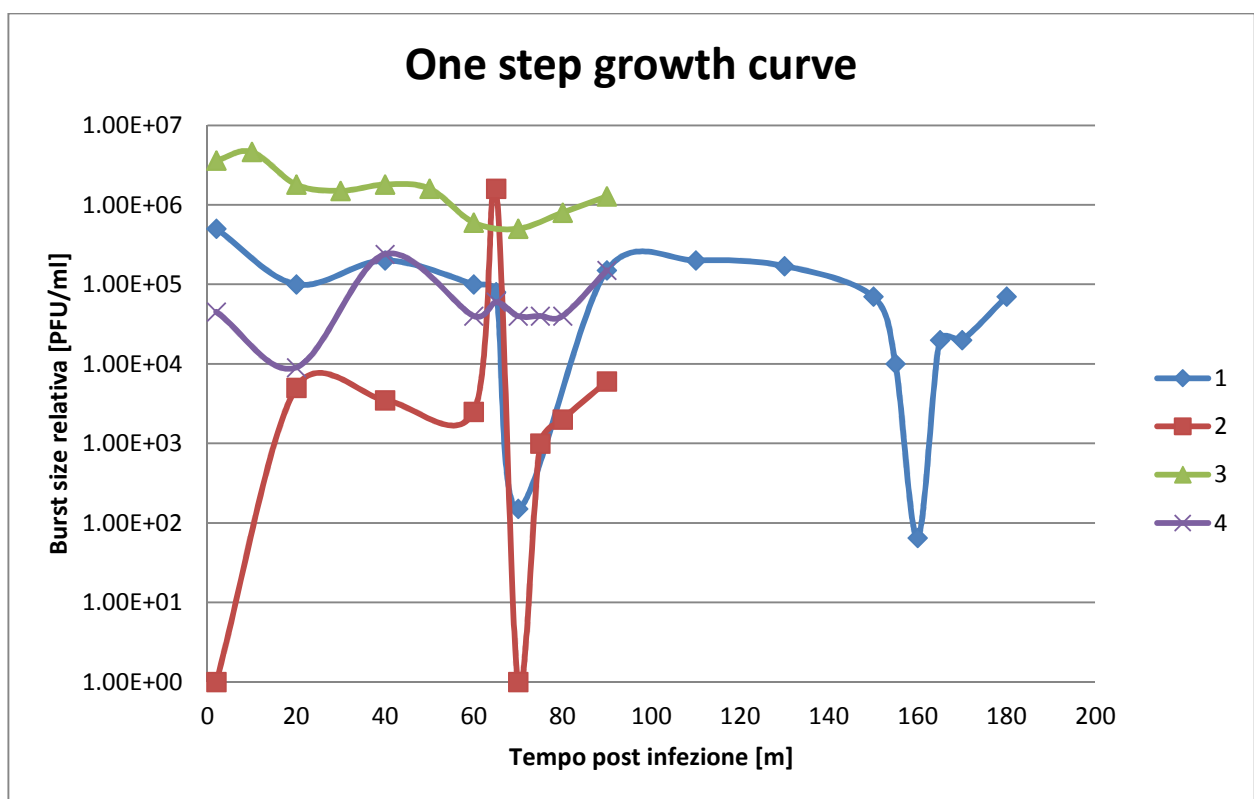
[Grafico 1: adsorption curves di SpSL1 Ko in FP470; sono state effettuate quattro repliche; il surnatante è stato raccolto ogni minuto a partire dall'inoculo del batteriofago e testato per la presenza e concentrazione delle particelle fagiche libere mediante Plaque Assay]

L'adsorbimento è risultato essere molto veloce: il numero di fagi liberi diminuisce del 98% in meno di 60'' secondi a partire dal contatto con cellule pneumococco (Fig. S1c). Il tasso di assorbimento è costante durante il primo minuto di incubazione e pari a 3.9×10^8 ml/min.

ONE STEP GROWTH CURVE.

Una curva di crescita sperimentale *one step* viene costruita mediante l'infezione di un batterio suscettibile con una concentrazione molto elevata di particelle fagiche (MOI): ciò assicura che tutti i batteri siano rapidamente infettati. La miscela fago / cella viene poi diluita o i batteri infettati vengono pellettizzati e il surnatante sostituito con del mezzo di coltura fresco, affinché le cellule siano sincronizzate [Ye J., 2002]. Per monitorare l'infezione nel tempo, campioni della miscela fago / cellule incubata a 37°C vengono prelevati ad intervalli regolari e quantificati in termini di PFU/ml utilizzando il saggio di placca [Gallet R. et al, 2009].

Il ceppo batterico FP470 è stato coltivato in 5 ml di CAT-Galattosio a 32°C sino al raggiungimento di una OD590 pari a 0.1 e infettato con una sospensione di SPsL1 Ko, inizialmente concentrato 10⁹ PFU/ml, ad una MOI di 10. I batteri così inoculati sono stati lasciati a contatto con il virus per 2'; successivamente sono stati centrifugati ed il surnatante eliminato, contenente il fago non adsorbito, è stato sostituito con nuovo CAT-GAL. A vari tempi, avendo cura di non far subire variazioni di temperatura alle cellule infettate, mantenute in incubatore a 32°C, dei campioni sono stati prelevati e testati per la presenza del fago mediante D-LA assay [Ellis E.L., Delbrück M., 1939; Hyman P., Abedon ST., 2009]. Sono state effettuate diverse repliche dell'esperimento.



[Grafico 2: One Step Growth Curve di SPsL1 Ko in FP470; le quattro repliche sono evidenziate da colori differenti. Il surnatante, raccolto a diversi tempi dall'inoculo del batteriofago, dopo aver effettuato centrifuga e cambio del mezzo di coltura, è stato testato per la presenza e concentrazione di SpS11 rilasciato, sempre mediante Plaque Assay]

I risultati ottenuti effettuando delle repliche appaiono contrastanti: ciò potrebbe dipendere dall'adesione variabile del fago al materiale plastico dei tubi di crescita, o dalla presenza di altri fattori non identificati ma rilevanti nelle condizioni sperimentali, che hanno influenzato le misurazioni in modo evidente.

BURST SIZE E ISOLAMENTO DEI FAGI LISOGENI.

La **Burst size** rappresenta il numero di particelle fagiche prodotte per cellula infettata. In breve, il ceppo FP470 è stato coltivato in 5 ml di CAT-GAL a 32°C sino al raggiungimento di una OD₅₉₀ pari a 0.1 e successivamente diluito 1:10 (10⁷ CFU/ml) e inoculato con 400 µl di soluzione fagica di SpSL1 Ko concentrato 10⁹ PFU/ml (MOI = 10). Campioni di 1 ml della miscela sono stati presi a intervalli stabiliti e immediatamente sottoposti a centrifugazione a 14.000 g per 3' per rimuovere i batteri. Il titolo dei fagi nei diversi campioni è stato determinato mediante la tecnica D-LA [Gallet R. et al, 2009; Santos S.B. et al.,2009]. La Burst Size del fago è stata calcolata come $B = Pt / P_0$, dove Pt è il titolo fago al raggiungimento del plateau e P₀ è il titolo infettivo iniziale. L'efficienza di replicazione è risultata molto bassa, essendo la Burst Size riscontrata pari a un numero al di sotto dell'unità (0,7) diversa da quella attesa (≥ 10).

Allo stesso tempo i batteri infettati sono stati contati dopo semina e crescita su piastre agar sangue; Tra i sopravvissuti (3*10⁶ CFU/ml) all'infezione e alla lisi causata dai batteriofagi sono state isolate 10 colonie, nelle quali la presenza del fago lisogeno nel sito di inserzione csRNA3 è stata valutata mediante PCR classica.

La miscela di reazione è stata preparata con 16,4 µl H₂O, 2,5 µl **Buffer** (10X), 0,5 µl **dNTPs** (10mM), 1 µl primer forward **LF_90** (5µM), 1 µl primer reverse **LF_88** (5µM), 0,1 µl **Taq**, 2,5 µl **tar** (10X), 1 µl **gDNA** (estratto dalle colonie) per un volume finale di 25 µl per campione. Come controllo gli stessi campioni sono stati amplificati utilizzando il primer LF_94 in sostituzione all'LF_88.

Tar è un colorante giallo paglierino, che si addiziona inizialmente alla mix in sostituzione del loading Buffer che, aggiunto agli amplificati, evidenzia il fronte di corsa nell'elettroforesi su gel di agarosio;

Le sequenze dei primers impiegati sono:

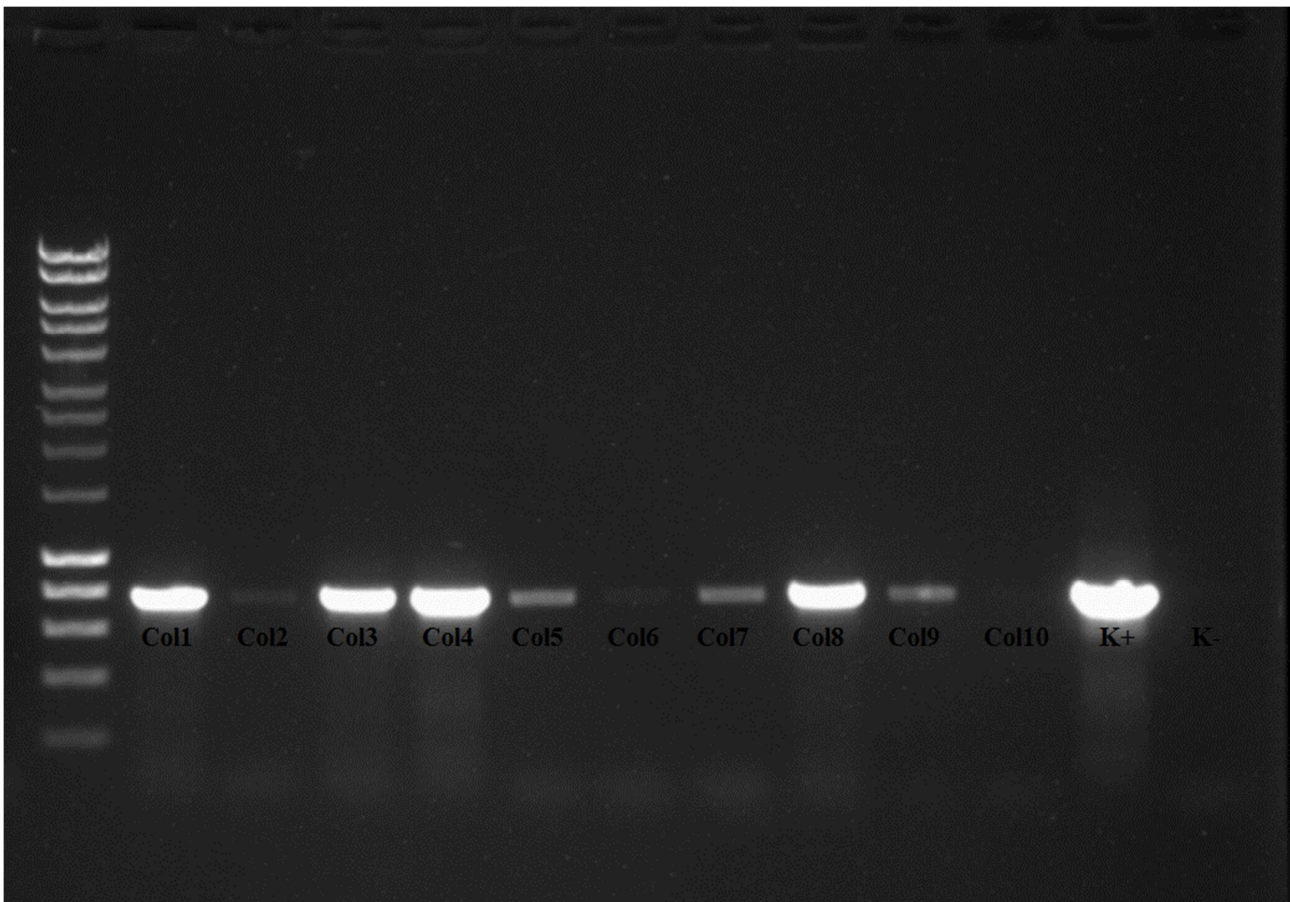
LF_90: 5'-AGTAGGTCCTGGTCGTGAACAA-3' ;

LF_88: 5'-ACGGGCTATACTGCATCTTAGAGA-3'.

Il primer LF_90 è specifico per una sequenza del genoma batterico a monte del sito di inserzione e se usato in combinazione con LF_88, specifico per il genoma di SpSL1, permette l'amplificazione di una sequenza di 775 paia di basi solo se in presenza di fago integrato.

Le condizioni di amplificazione utilizzate sono le seguenti:

	T (°C)	tempo	cicli
Denaturazione	95	5'	1
Denaturazione	95	30"	
Annealing	60	30"	35
Estensione	72	1'	
Estensione	72	10'	1

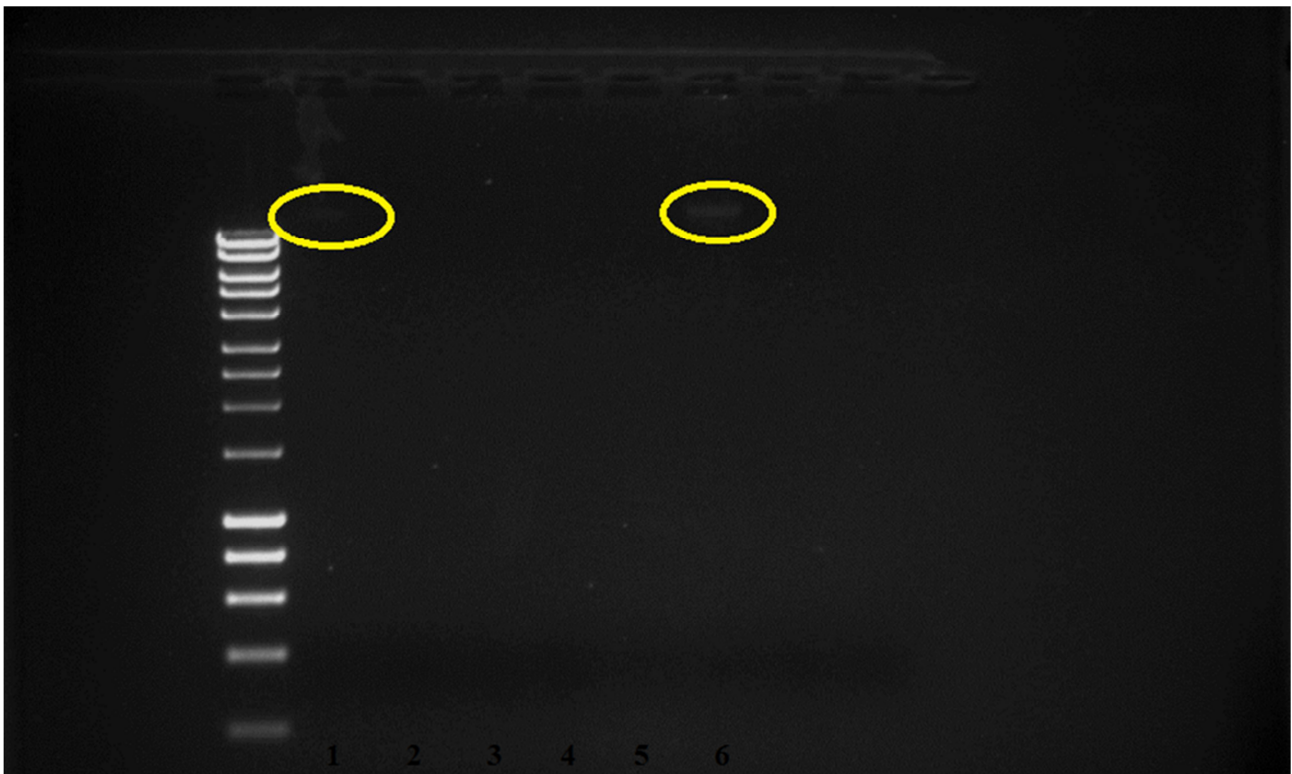


[Figura1: elettroforesi su gel di agarosio (1%). Pozzetto 1: Marker (HyperLadder 1kb, Bioline). Pozzetti 2-11: prodotti della PCR per l'identificazione di fago integrato nel sito csRNA3 (775 bp). Pozzetto 12: ceppo lisogeno MRO597, isolato in precedenza, controllo positivo. Pozzetto 13: controllo negativo].

Sette colonie su dieci sono risultate essere positive per la presenza del fago nel sito di inserzione csRNA3: queste rappresentano il 20% della popolazione batterica totale infettata, in cui il fago ha attuato il **ciclo lisogeno**.

INFEZIONE DI FP422 e FP424 CON SpSL1 A-met e SpSL1 B-met.

Per valutare gli effetti dell'attività del sistema di restrizione SpnD39III sul DNA batterico, i ceppi FP422 e FP424, cresciuti in 5ml di CAT-AGAR a 32°C sino ad una OD₅₉₀ pari a 0.1, sono stati infettati in maniera alternata con le varianti A-met e B-met di SpSL1. Dopo 60' dall'inoculo del virus, il DNA è stato estratto dalle cellule infettate e dai controlli non infettati e valutato mediante elettroforesi sul gel di agarosio 1%. Il DNA viene degradato dall'attività enzimatica di SpSL1, ma i frammenti non creano durante la corsa uno smear come ad esempio quello identificativo e caratteristico delle cellule apoptotiche [Fuwa H. et al, 2014]



[Figura2: elettroforesi sul gel di agarosio 1%. Pozzetto 1: Marker (HyperLadder 1kb, Bioline). Pozzetti 2-6: campioni di DNA estratto dai ceppi batteri FP422 e FP422 infettati con le varianti A-met e B-met di SpSL1.]

Legenda:

- 1: FP422 non infette;
- 2: FP422 infettate con A-met SpSL1;
- 3: FP424 infettate con con A-met SpSL1;
- 4: FP422 infettate con B-met SpSL1;

5: FP424 infettate con con B-met SpSL1;

6: FP424 non infette.

I risultati mostrano chiaramente la presenza del DNA genomico intatto nei campioni prelevati dalle cellule non infette e l'**assenza** della relativa banda o di **frammenti visibili** nelle cellule infettate con SpSL1.

REFERENCES:

- Andam C.P., Hanage W.P.: **Mechanisms of genome evolution of Streptococcus.** Infect. Genet. Evol. 2014 Nov 13. pii: S1567-1348(14)00410-9.
- Avery O.T., Macleod C.M., McCarty M.: **Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types: induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III.** J. Exp. Med. 1944 Feb 1;79(2):137-58.
- Ellis E.L., Delbrück M.: **The Growth of Bacteriophage.** J. Gen. Physiol. 1939 Jan 20;22(3):365-84.
- Fuwa H., Sato M., Sasaki M.: **Programmed cell death induced by (-)-8,9-dehydroneoptolide in human promyelocytic leukemia HL-60 cells under energy stress conditions.** Mar. Drugs. 2014 Nov 20;12(11):5576-89.
- Gallet R., Kannoly S., Wang I.N. : **Effects of bacteriophage traits on plaque formation.** BMC Microbiol. 2011 Aug 9;11:181.
- Gallet R., Shao Y., Wang I.N.: **High adsorption rate is detrimental to bacteriophage fitness in a biofilm-like environment.**BMC Evol. Biol. 2009 Oct 5;9:241.
- Hyman P., Abedon S.T.: **Practical methods for determining phage growth parameters.** Methods Mol Biol. 2009;501:175-202.
- Lanie J.A., Ng W.L., Kazmierczak K.M., Andrzejewski T.M., Davidsen T.M., Wayne K.J., Tettelin H., Glass J.I., Winkler M.E.: **Genome sequence of Avery's virulent serotype 2 strain D39 of Streptococcus pneumoniae and comparison with that of unencapsulated laboratory strain R6.** J. Bacteriol. 2007 Jan;189(1):38-51.
- Liu W., Lin Y.R., Lu M.W., Sung P.J., Wang W.H., Lin C.S.: **Genome sequences characterizing five mutations in RNA polymerase and major capsid of phages ϕ A318 and ϕ As51 of Vibrio alginolyticus with different burst efficiencies.** BMC Genomics. 2014 Jun 21;15:505
- Manso A.S., Chai M.H., Atack J.M., Furi L., De Ste Croix M., Haigh R., Trappetti C., Ogunniyi A.D., Shewell L.K., Boitano M., Clark T.A., Korlach J., Blades M., Mirkes E., Gorban A.N., Paton J.C., Jennings M.P., Oggioni M.R.: **A random six-phase switch regulates pneumococcal virulence via global epigenetic changes.** Nat. Commun. 2014 Sep 30;5:5055.
- Marks L.R., Reddinger R.M., Hakansson A.P.: **High levels of genetic recombination during nasopharyngeal carriage and biofilm formation in Streptococcus pneumoniae.** MBio. 2012 Sep. 25;3(5). pii: e00200-12.

- Pearce B.J., Iannelli F., Pozzi G.: **Construction of new unencapsulated (rough) strains of *Streptococcus pneumoniae*.** *Res Microbiol.* 2002 May;153(4):243-7.
- Santos S.B., Carvalho C.M., Sillankorva S., Nicolau A., Ferreira E.C., Azeredo J. **The use of antibiotics to improve phage detection and enumeration by the double-layer agar technique.** *BMC Microbiol.* 2009 Jul. 23;9:148.
- Shao Y., Wang I.N.: **Bacteriophage adsorption rate and optimal lysis time.** *Genetics.* 2008 Sep;180(1):471-82.
- Ye J., Flint A.P., Campbell K.H., Luck M.R.:**Synchronization of porcine oocyte meiosis using cycloheximide and its application to the study of regulation by cumulus cells.** *Reprod Fertil Dev.* 2002;14(7-8):433-42.

ATTIVITÀ EXTRA-CURRICULARI E INTERDISCIPLINARI

Con lo scopo di accrescere gli esiti formativi specifici del dottorato di ricerca, ho partecipato ad attività scientifiche e culturali addizionali.

SEMINARI SEGUITI:

- 9-10/12/2014 Forum SIVIM “IMMUNITÀ INNATA ED INFEZIONI VIRALI” (con relativo attestato di partecipazione). February 2, 2012: “Nef, retrovirus infectivity and susceptibility to antibody neutralization: functional roles beyond HIV”.
- March/April 2012: Short Course: “Molecular heterogeneity of major hepatitis viruses and their impact in virus host-interplay, pathogenesis and response to therapy”. Coordinatore: Prof. Ferruccio Bonino, Md-PhD Full Professor of Gastroenterology, Liver and Digestive Disease Division, Department of Internal Medicine, University of Pisa:
- 28/03/2012: Bio-molecular heterogeneity of hepatitis B virus infection (Dr. Maurizia R. Brunetto, MD Director of the Hepatology Unit and Liver Physiopathology Laboratory, University Hospital of Pisa); 03/12/2014 University of Leicester. Jay Hinton. Understanding the choreography of Salmonella transcription with RNA-seq.
- 29/03/2012: miRNA and virus persistence: possible role in HBV and HCV infections (Prof. Ferruccio Bonino);
- 04/04/2012: Optimization of in vitro models of viral replication and gene expression (Dr. Daniela Cavallone, PhD Liver Physiopathology Laboratory, Liver Unit, University of Pisa);
- 05/04/2012: Bio-physical models for the study of the dynamics of viral infection in vivo (Dr. Piero Colombatto, MD Hepatology Unit and Liver Physiopathology Laboratory, University Hospital of Pisa).
- 10/11/2014 University of Leicester. Victor A. Albert. Architectural evolution and gene space dynamics of a minute plant genome.

ULTERORE ATTIVITÀ DI RICERCA.

- Impiego del sistema Clart-Pneumovir, basato su microarray, nella diagnosi di infezioni virali in pazienti con patologie del tratto respiratorio.
- Raccolta di campioni di sangue con lo scopo di indagare i meccanismi molecolari cruciali per lo sviluppo del glioblastoma, il più diffuso fra i tumori cerebrali.

RINGRAZIAMENTI

I miei più sentiti ringraziamenti vanno al Professore Luca Ceccherini, che mi ha dato la possibilità di crescere come biologa e come persona, stimolandomi e incoraggiandomi anche a lasciare il “nido” di casa, inteso come il dipartimento cui sono profondamente affezionata, per vivere all'estero un'esperienza interessante e altamente formativa. È stato sempre un mentore e un riferimento importantissimo. Grazie anche alla Dottoressa Barbara Matteoli, che è stata presente in tutto il mio percorso formativo, sin dalla Laurea Specialistica. Il pensiero corre veloce a tutte le altre persone che mi hanno circondata e sostenuta in questi anni, che sono trascorsi fin troppo velocemente. Ricordo ancora Antonio sull'uscio del vecchio laboratorio in Via San Zeno, incuriosito dalla mia nuova presenza: mi ha insegnato tanto, e mi ha dimostrato quanto valga lavorare in maniera appassionata ed essere convinti delle proprie potenzialità. È stato un grande amico, e gli voglio un bene dell'anima. Il pensiero si sposta su Gioacchino, con il quale ho lavorato, riso, pianto, mi sono confidata a cuore aperto; sul personale tecnico dell'AOUP, perché ognuno mi ha regalato qualcosa, ovvero esperienza, supporto, comprensione, un sorriso, un abbraccio, chiacchiere, risate, ascolto in momenti faticosi o tristi: perciò grazie a Susi, Paola, Lucia, Francesca R., Francesca M., Silvia, Massimo, Marco, Lucia, Angela, Alfredo, Patrizia e Massimo B, e grazie anche alla Dottoressa Vatteroni, al Dottor Maggi e al Dottor Pistello per i loro consigli. Partendo per l'Inghilterra ho trovato poi un'accoglienza fuori dal comune. Ringrazio quindi il Professor Oggioni, che è un uomo eccezionale e non c'è bisogno di aggiungere altro, e ringrazio Leonardo e Ana: sono stati degli ottimi colleghi e insegnanti al tempo stesso, due persone preparatissime e competenti ma buone e umili, con le quali mi sono sentita subito serena e a mio agio. Grazie anche a Megan e Richard, sempre vigile e pronto ad aiutare e condividere il suo sapere, e grazie a Giuseppe e Valeria, che le hanno tentate proprio tutte per farmi svagare (anche se sono stata refrattaria) in un periodo difficile e pieno di impegni. Ultimi nell'elenco, ma non nel cuore, i miei cari, che mi hanno sempre sostenuta. Grazie mamma Rosa e papà Angelo: il vostro affetto è impareggiabile. Non ci sono parole per descrivere l'amore dei genitori, che è la cosa più grande che esista e il punto fermo della mia vita. Il vostro esempio è sempre stato determinante; mi avete donato tutto, avete sempre creduto in me: spero di poter ripagare le vostre aspettative. Quando vi osservo ricordo me, ragazzina, nel momento di lasciare casa per andare a studiare lontano, in cerca della mia strada, e rivivo i vostri incoraggiamenti, ricordo i consigli, le telefonate infinite, le parole d'amore e la gioia nel riabbracciarmi quando, purtroppo di rado, torno nella mia terra. Speriamo che in questo “diluvio di tempi duri” io possa realizzarmi e rendervi orgogliosi di me, anche se mi dimostrate già ogni giorno di esserlo:

“Chi ti vuol bene veramente,

non solo tre cose di te capisce,

ma tutto di te intende e tutto accetta,

anche quando sbagli e aspetta

paziente che tu lo riconosca”.

Grazie ai miei nonni dolcissimi Angela, Giuseppe e Maddalena che mi hanno cresciuta con amore e ancora si preoccupano per me, e al nonno Giuseppe che mi manca tantissimo e da bambina mi viziava affettuosamente; grazie a tutti gli zii, allo zio Peppino che non è più tra noi perché ero la luce dei suoi occhi e grazie oggi in particolar modo allo zio Gianfranco e alla zia Carmela, con i quali mi sono sempre potuta confidare e che mi hanno donato gli splendidi cuginetti Andrea e Francesco, che sono degli ometti ormai. Grazie a Marilena e a Francesca, le mie cugine che sono state due figure molto importanti e d'esempio, due sorelle maggiori. Grazie al caro zio Franco e ai suoi premurosi regalini che dopo una giornata di studio rinfrancano lo spirito e rimettono in forze. Ringrazio i miei amici Manuela, Federica, Lara, Vincenza, Rosanna, Katia, Barbara, Roberta, Biagio, Alberto e Aldo: non c'è bisogno di sottolineare quanto bene vi voglio per quante ne abbiamo passate insieme, quanto mi avete sempre capita, aiutata con dolcezza o fermezza se ce n'era il bisogno, e quanto ami trascorrere il tempo con voi, seppure ultimamente gli impegni e gli spostamenti me lo abbiano permesso pochissimo. Infine grazie Emanuel. I nostri occhi si sono incontrati per caso alcuni anni fa e in quello stesso momento ho capito che facevi parte della mia vita prima ancora di conoscerti: “probabilmente non esiste nessuna intimità che possa competere con due sguardi che si incontrano con fermezza e decisione e semplicemente rifiutano di lasciare la presa”. Mi sostieni sempre, hai un cuore grande e generoso, anche se a volte come dici tu stesso hai “la testa per aria” e mi arrabbio con te; sei il mio amore e il mio amico, la mia spalla anche se a volte non te ne accorgi. Mi spingi a cercare soddisfazioni e gioia di vivere nelle piccole cose quotidiane, nei momenti tranquilli della nostra vita e maggiormente quando mi vedi triste o preoccupata: sei tu la mia serenità.

