



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI ISTOLOGIA, MICROBIOLOGIA E  
BIOTECNOLOGIE MEDICHE**

**DOTTORATO DI RICERCA IN VIROLOGIA  
E BIOTECNOLOGIE MICROBICHE  
XX CICLO**

**VALUTAZIONE DELL'EFFETTO  
IMMUNOMODULATORIO  
DELLA GLICOPROTEINA vOX2  
DELL'HERPESVIRUS UMANO DI TIPO 8  
SU MONOCITI-MACROFAGI**

**Coordinatore: Ch.mo Prof. Giorgio Palù**

**Supervisore: Ch.mo Prof. Giorgio Palù**

**Dottorando: Dott. Matteo Curtarello**

31 gennaio 2008



# INDICE

<b>1. RIASSUNTO</b>	pag. 1
<b>2. ABSTRACT</b>	pag. 3
<b>3. INTRODUZIONE</b>	pag. 5
<b>3.1 L'HERPES VIRUS UMANO DI TIPO 8 (HHV-8)</b>	pag. 5
<b>3.1.1 CARATTERISTICHE GENERALI</b>	pag. 5
<b>3.1.2 PATOLOGIE ASSOCIATE</b>	pag. 7
<b>3.1.3 STRUTTURA DEL VIRIONE</b>	pag. 8
<b>3.1.4 ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA</b>	pag. 10
<b>3.1.5 CICLO REPLICATIVO DI HHV-8</b>	pag. 12
<b>3.2 IL SARCOMA DI KAPOSÌ</b>	pag. 18
<b>3.2.1 PATOGENESI DEL SARCOMA DI KAPOSÌ</b>	pag. 19
<b>3.2.2 PROTEINE ONCOGENICHE CODIFICATE DA HHV-8</b>	pag. 21
<b>3.2.3 TERAPIA DEL KS</b>	pag. 25
<b>3.3 MECCANISMI DI IMMUNOEVASIONE DI HHV-8</b>	pag. 26
<b>3.3.1 LA GLICOPROTEINA UMANA OX2</b>	pag. 28
<b>3.3.2 L'OMOLOGO VIRALE vOX2 (orf K14) DI HHV-8</b>	pag. 32
<b>4. SCOPO DELLA TESI</b>	pag. 37
<b>5. MATERIALI E METODI</b>	pag. 39
<b>MATERIALI</b>	pag. 39
<b>5.1 LINEE CELLULARI</b>	pag. 39
<b>5.2 COLTURE PRIMARIE DI MONOCITI-MACROFAGI</b>	pag. 39
<b>5.3 PLASMIDI</b>	pag. 40
<b>5.4 OLIGONUCLEOTIDI</b>	pag. 42
<b>METODI</b>	pag. 43
<b>5.5 CLONAGGIO DELLA ORF K14 ED ORF K14-HA3' NEL VETTORE             pRRLsin.PPT.CMV.eGFP</b>	pag. 43
<b>5.6 GENERAZIONE DEL VETTORE pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP</b>	pag. 46
<b>5.7 PREPARAZIONE DEL DNA PLASMIDICO</b>	pag. 46
<b>5.8 TECNICHE DI TRASFEZIONE</b>	pag. 46
<b>5.9 TRASDUZIONE CON VIRIONI RICOMBINANTI</b>	pag. 48
<b>5.10 STIMOLAZIONE CON IFN<math>\gamma</math></b>	pag. 48
<b>5.11 ANALISI CITOFLUORIMETRICA (FACS)</b>	pag. 49
<b>5.12 ELETTROFORESI SU GEL DI PROTEINE E WESTERN BLOTTING</b>	pag. 50
<b>5.13 IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA</b>	pag. 51
<b>5.14 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE</b>	pag. 52
<b>5.15 REAL-TIME RT-PCR ed RT-PCR</b>	pag. 53

<b>5.16</b> ELISA ( <i>Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay</i> )	pag. 55
<b>5.17</b> ESPERIMENTO DI COCOLTURA	pag. 56
<b>5.18</b> SAGGIO DI FAGOCITOSI	pag. 56
<b>5.19</b> IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE	pag. 57
<b>5.20</b> <i>MICROARRAY</i> DI DNA	pag. 58
<b>6. RISULTATI</b>	pag. 61
<b>6.1</b> VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA DI TRASFERIMENTO GENICO NELLE CELLULE MONOCITO-MACROFAGICHE	pag. 61
<b>6.2</b> ESPRESSIONE DELLA GLICOPROTEINA vOX2 DI HHV-8 NELLE LINEE CELLULARI MONOCITO-MACROFAGICHE	pag. 64
<b>6.3</b> ESPRESSIONE DELLA GLICOPROTEINA vOX2 DI HHV-8 NELLE COLTURE PRIMARIE DI MACROFAGI (MØ)	pag. 66
<b>6.4</b> MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLE CITOCHINE INFIAMMATORIE (TNF $\alpha$ ed IL-1 $\beta$ ) NELLE LINEE CELLULARI MONOCITO-MACROFAGICHE E NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2	pag. 70
<b>6.5</b> VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL CD200R NELLE LINEE CELLULARI MONOCITO-MACROFAGICHE E NEI MACROFAGI PRIMARI	pag. 74
<b>6.6</b> DOSAGGIO DEL TNF $\alpha$ SECRETO DAI MACROFAGI PRIMARI MESSI A CONTATTO CON CELLULE THP1 ESPRIMENTI LA vOX2	pag. 75
<b>6.7</b> MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA CITOCHINA INIBITORIA IL-10 NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2	pag. 78
<b>6.8</b> MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL CD200R NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2	pag. 79
<b>6.9</b> VALUTAZIONE DELLA FAGOCITOSI NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2	pag. 80
<b>6.10</b> MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE DEL COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITA' HLA NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2	pag. 82
<b>6.11</b> VALUTAZIONE DEL PROFILO D'ESPRESSIONE GENICA NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2	pag. 84
<b>7. DISCUSSIONE</b>	pag. 89
<b>8. ABBREVIAZIONI</b>	pag.95
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b>	pag. 97



# 1. RIASSUNTO

L'herpesvirus umano di tipo 8 (HHV-8) è l'agente eziologico del Sarcoma di Kaposi (KS), una malattia angioproliferativa mediata da citochine infiammatorie. Nel genoma del virus sono presenti numerosi omologhi di geni cellulari codificanti proteine che sono critiche nella patogenesi del KS in quanto intervengono nella regolazione del ciclo cellulare, nell'inibizione dell'apoptosi e nell'evasione della risposta immunitaria, fra cui la glicoproteina vOX2. L'omologo cellulare OX2 appartiene alla superfamiglia delle immunoglobuline, è espresso da diversi tipi di cellule *in vivo* e trasferisce un segnale inibitorio nelle cellule mieloidi attraverso l'interazione con un loro specifico recettore, il CD200R; così facendo, l'OX2 inibisce le risposte infiammatorie ed immunitarie e previene lo sviluppo di malattie autoimmuni. Anche la vOX2 di HHV-8 ha funzioni immunomodulatrici: alcuni studi dimostrano che essa esercita un'attività anti-infiammatoria ed immunosoppressiva nei basofili e nei neutrofili mentre, per quanto riguarda i monociti-macrofagi, i dati presenti in letteratura sono contrastanti.

In questo lavoro di tesi, si è voluto chiarire l'effetto esercitato dalla vOX2 sui monociti-macrofagi al fine di definire il ruolo funzionale della glicoproteina nella patogenesi del KS. La rilevanza dei monociti-macrofagi è correlata al fatto che queste cellule rappresentano un bersaglio naturale d'infezione da parte di HHV-8 *in vivo*, sono presenti nelle lesioni del KS ed esprimono il recettore CD200R, che viene riconosciuto dalla vOX2 con un'affinità identica a quella dell'omologo umano. Per il nostro studio si è deciso di esprimere la glicoproteina erpetica sia in linee cellulari monocito-macrofagiche (U937 e THP1) che in colture primarie di macrofagi derivati da sangue periferico (MØ primari). Innanzitutto, mettendo a confronto fra loro diverse metodiche (fisiche, chimiche e virali), si è dimostrato che il sistema più efficiente di trasferimento genico nelle cellule bersaglio è quello basato sull'impiego di un vettore virale; quindi, l'orf K14 di HHV-8 codificante la vOX2 è stata clonata in un vettore lentivirale basato su HIV-1 da utilizzare per la trasduzione di tali cellule. Una volta verificata l'espressione della vOX2 nelle cellule trasdotte, è stato valutato l'effetto della glicoproteina sul livello trascrizionale e sulla secrezione di due citochine infiammatorie critiche nella genesi del KS, il TNF $\alpha$  ed l'IL-1 $\beta$ . Mentre nelle U937 la vOX2 induce un aumento di entrambe le citochine, sia in condizioni basali che in condizioni di attivazione indotta mediante trattamento con IFN $\gamma$ , per quanto riguarda le THP1 ed i MØ primari quest'effetto stimolatorio risulta evidente solamente in condizioni basali. Al contrario, nelle cellule attivate con IFN $\gamma$ , la glicoproteina erpetica inibisce l'espressione dei geni del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$ . Alla

luce dei risultati contraddittori ottenuti nei diversi tipi cellulari utilizzati nello studio, è stata valutata l'espressione del CD200R nelle U937, nelle THP1 e nei MØ primari. Dal momento che il CD200R è un bersaglio d'azione della vOX2 *in vivo*, si è deciso di proseguire le indagini unicamente nelle cellule positive per l'espressione del recettore, ossia i MØ primari. Allo scopo di confermare i dati sulla modulazione delle citochine infiammatorie da parte della vOX2, sono state allestite delle coculture di cellule THP1 CD200R<sup>-</sup> esprimenti la glicoproteina con MØ primari CD200R<sup>+</sup>. I risultati mostrano che la glicoproteina erpetica stimola la secrezione del TNF $\alpha$  nei MØ primari in condizioni basali mentre la inibisce nelle medesime cellule attivate con IFN $\gamma$ , esattamente come succede nelle monoculture di MØ primari esprimenti la vOX2. A questo punto, è stato valutato l'effetto della vOX2 sul livello trascrizionale dell'IL-10, una citochina inibitoria delle risposte infiammatorie; il suo profilo d'espressione, come atteso, è speculare a quello del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$ . Del resto, tutto questo concorda con il fatto che il gene del recettore inibitorio CD200R risulta represso in condizioni basali ed indotto nelle cellule attivate con IFN $\gamma$ . Oltre ad influenzare la produzione di citochine, la vOX2 modula l'attività fagocitica dei MØ primari, in particolare la promuove in condizioni basali mentre la inibisce nelle cellule attivate con IFN $\gamma$ . Da questo si evince che l'effetto immunomodulatorio della vOX2 è strettamente dipendente dallo stato d'attivazione cellulare. D'altra parte, questo stesso dualismo emerge anche analizzando l'impatto della vOX2 sul profilo globale d'espressione genica nei MØ primari. Invece, per quanto riguarda la capacità dei MØ primari di presentare l'antigene alle cellule T, essa risulta essere compromessa dalla vOX2 indipendentemente dallo stato in cui si trovano le cellule; infatti, sia in condizioni basali che in condizioni di attivazione, la glicoproteina erpetica interferisce con l'espressione degli HLA sulla superficie cellulare.

In conclusione, la vOX2 può rientrare fra i meccanismi di immunoevasione adottati dal virus in virtù della sua capacità di esercitare un effetto anti-infiammatorio ed immunosoppressivo nei monociti-macrofagi attivati. D'altra parte, essa può anche esercitare un effetto attivatorio sulle cellule in condizioni basali contribuendo così al microambiente infiammatorio in cui si sviluppa il KS; questo presuppone l'esistenza di almeno un altro recettore che sia in grado di competere con il recettore inibitorio CD200R per il legame alla glicoproteina. Una funzione immunomodulatrice della vOX2, correlata allo stato di attivazione cellulare, contribuirebbe a spiegare i dati contraddittori presenti in letteratura.

## 2. ABSTRACT

Kaposi's Sarcoma (KS) is an inflammatory cytokines-mediated angioproliferative disease triggered by human herpesvirus 8 (HHV-8) infection. This virus is unique because of its extensive molecular piracy of host critical cell regulatory and immune modulatory genes encoding proteins that could contribute to viral immune evasion and tumorigenesis. Among them we can find the vOX2 glycoprotein. Cellular homologous OX2 is a member of the immunoglobulin superfamily. This glycoprotein is expressed by several cell types *in vivo* and it down-modulates inflammatory response through the interaction with a specific receptor of the myeloid cells, the CD200R. By this mechanism, cellular OX2 prevents autoimmune disease, displaying immune modulatory functions.

This latter feature is also present in the HHV-8 vOX2. Indeed, several reports suggest that the vOX2 has an anti-inflammatory and immunosuppressive activity in basophil and neutrophil cells, but its effect on monocytes-macrophages is still controversial.

The aim of our work is to clarify the vOX2 activity in monocytes-macrophages in order to define its functional role in KS pathogenesis. The relevance of monocytes-macrophages relies on the fact that this cell type is infected by HHV-8 *in vivo*, it is present in KS lesions and it expresses CD200R that functions as a receptor for vOX2 exactly like it does for cellular OX2.

We decided to express the viral glycoprotein into two different monocytic-macrophagic cell lines (U937 and THP1) and/or into PBMC-derived macrophages (primary MØ) for our study. Compared to chemical and physical methods, the viral transduction has resulted the most efficient system to transfer transgenes into the target cells; based on this finding, the HHV-8 orf K14 encoding vOX2 has been cloned into HIV-1 based lentiviral vector that has been used to transduce the cells.

After verifying the vOX2 expression in the transduced target cells, we evaluated the glycoprotein effect on the transcription level and secretion of two inflammatory cytokines involved in the KS development, TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . Our data show that the vOX2 up-regulates both TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in U937 and THP1 cell lines and in primary MØ kept in basal conditions. In addition, the TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  up-regulation was observed in the IFN $\gamma$ -activated U937 cell line. By contrast, in the IFN $\gamma$ -activated THP1 cell line and primary MØ the viral glycoprotein inhibits TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  gene expression.

Taking into account these controversial data in the different cell types, in order to carry on our research in a model more representative of the physiological condition,

we checked the expression of vOX2 receptor on U937 and THP1 cell line and on primary MØ. Since the primary MØ resulted to be the only cell type expressing CD200R, we decided to evaluate the vOX2 activity employing this cellular system. However, being the level of viral protein expression in primary MØ low compared to the one obtained in the cell lines, we performed coculture between THP1 CD200R<sup>-</sup> cell line expressing vOX2 and primary MØ CD200R<sup>+</sup> in order to confirm the results on inflammatory-cytokines modulation by vOX2. Our data show that the vOX2 promotes TNF $\alpha$  secretion in the primary MØ in basal conditions; on the contrary, in the IFN $\gamma$ -activated cells the viral glycoprotein induces a significant reduction of cytokine production as we observed in monoculture of primary MØ expressing vOX2.

Starting from these data, we next evaluated the vOX2 effect on the transcription level of IL-10, an inhibitory cytokine of the TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ -mediated inflammatory responses. Our data show that IL-10 expression profile is the opposite with respect to TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , as we expected.

Moreover, these results are in agreement with the CD200R mRNA down-modulation that we observed in basal conditions and with its up-regulation in the IFN $\gamma$ -activated cells.

In addition, we were able to show that vOX2 promotes the phagocytosis of the primary MØ in basal conditions while it inhibits this activity in the IFN $\gamma$ -activated cells.

Our results suggest that the immune modulatory activity of vOX2 is tightly dependent on the activation state of the cells.

This conclusion is also supported by the analysis of vOX2 effect on the global gene expression profile in the primary MØ.

Finally, we observed that the antigen presentation to T cells by primary MØ is compromised by vOX2 expression regardless of the activation state of the cells. This effect seems to be related to the down-modulation of HLA expression on cell surface.

Overall, our results lead to the conclusion that vOX2 may be involved in viral immune evasion because of its anti-inflammatory and immunosuppressive effect in the activated monocytes-macrophages. At the same time, in basal conditions, vOX2 can also stimulate monocytes-macrophages contributing to the inflammatory state that is important for the KS development. This finding would imply the presence of at least one unknown receptor that would compete with the “inhibitory receptor” CD200R for the binding to vOX2. An immune modulatory activity of vOX2, linked to cell activation state, could explain the contradictory results reported in literature.

### 3. INTRODUZIONE

#### 3.1 L'HERPES VIRUS UMANO DI TIPO 8 (HHV-8)

##### 3.1.1 CARATTERISTICHE GENERALI

L'Herpesvirus umano di tipo 8 (HHV-8) è il più recente virus umano della famiglia *Herpesviridae* ad essere stato identificato (1994), appartiene alla sottofamiglia dei *Gammaherpesvirinae*, al genere *Rhadinovirus* (Tabella 1), ed è strettamente correlato ad alcuni virus dei primati, fra cui l'herpesvirus saimiri (HVS) ed il rhesus rhadinovirus (RRV) delle scimmie.

<b>Alphaherpesvirinae:</b> presentano un ampio spettro d'ospite ed un ciclo replicativo breve, si replicano in diversi tipi di linee cellulari <i>in vitro</i> , con una rapida diffusione dell'infezione ed un'efficiente lisi delle cellule infettate. Nell'ospite naturale, inoltre, sono in grado di instaurare un'infezione latente nei gangli sensoriali.	
<i>Simplexvirus</i>	Virus dell'Herpes simplex di tipo 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2)
<i>Varicellavirus</i>	Virus della varicella-zoster (VZV)

<b>Betaherpesvirinae:</b> presentano uno spettro d'ospite ristretto (specie-specifici) ed un ciclo replicativo prolungato, <i>in vitro</i> si replicano quasi esclusivamente in colture di fibroblasti, con una lenta diffusione dell'infezione, ed <i>in vivo</i> il virus viene mantenuto in forma latente nelle ghiandole secernenti, nelle cellule linforeticolari e nei reni.	
<i>Cytomegalovirus</i>	Citomegalovirus umano (HCMV)
<i>Roseolovirus</i>	Herpesvirus umano di tipo 6 (HHV-6a e HHV-6b) Herpesvirus umano di tipo 7 (HHV-7)

<b>Gammaherpesvirinae:</b> presentano uno spettro d'ospite molto ristretto con un tropismo spiccato verso cellule della linea linfoblastoide sia <i>in vitro</i> che <i>in vivo</i> . Infatti si replicano ed instaurano latenza quasi esclusivamente nei linfociti B e T. Inoltre sono frequentemente associati a immortalizzazione cellulare.	
<i>Lymphocryptovirus</i>	Virus di Epstein Barr (EBV)
<i>Rhadinovirus</i>	Herpesvirus umano di tipo 8 (HHV-8)

Tabella 1 Famiglia *Herpesviridae*: classificazione degli herpesvirus umani.

HHV-8 fu identificato per la prima volta nelle lesioni del sarcoma di Kaposi (KS) utilizzando la tecnica *representational differential analysis* (RDA) che consente di amplificare mediante PCR sequenze di acidi nucleici presenti in un determinato campione (biopsia da KS) rispetto ad un campione di riferimento (biopsia da tessuto normale) [Chang Y. et al., 1994]. Successivamente il genoma virale fu clonato e sequenziato [Russo J.J et al., 1995] ed al nuovo virus fu dato originariamente il nome di *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus* (KSHV).

A differenza degli altri virus erpetici, HHV-8 non è un agente patogeno comune nella popolazione generale. Nel Nord Europa e Nord America l'infezione viene trasmessa principalmente per via sessuale mentre nei Paesi del Mediterraneo, specialmente in Africa, il virus si trasmette preferenzialmente per via non sessuale come dimostrato dall'alta incidenza di bambini sieropositivi. In ogni caso, gioca un ruolo critico il fatto che il virus sia presente in grandi quantità nella saliva degli individui infetti.

*In vivo*, l'infezione è strettamente ristretta all'uomo; il genoma e i trascritti virali di HHV-8 sono stati rilevati nei linfociti B (che rappresentano il principale *reservoir* del virus), nei linfociti T, nei monociti-macrofagi, nelle cellule dendritiche, nelle cellule endoteliali e nelle cellule epiteliali. Il virus infetta una grande varietà di cellule umane e non umane *in vitro*, come cellule B, monociti-macrofagi, cellule endoteliali, fibroblasti, cheratinociti, cellule epiteliali umane e ancora cellule di rene di scimmia, fibroblasti di rene di criceto (linea cellulare BHK), cellule di ovaio di criceto (linea cellulare CHO) e colture primarie di fibroblasti embrionali di topo [Bechtel J.T. et al., 2003; Krishnan H.H. et al., 2005].

Come tutti i virus erpetici, HHV-8 presenta due modalità di replicazione: litica e latente. Nel ciclo litico, il genoma virale viene copiato da una DNA polimerasi codificata dal virus e impacchettato in virioni infettanti che vengono rilasciati dalla cellula ospite principalmente attraverso la morte per lisi della cellula stessa. Nella latenza, invece, il genoma virale persiste nel nucleo cellulare, la sua replicazione avviene in concomitanza con quella del genoma cellulare ad opera degli enzimi dell'ospite e si ha l'espressione di un limitato numero di geni senza produzione di progenie virale. La trascrizione dei geni virali è mediata dall'RNA polimerasi II della cellula ospite [Ganem D., 2007].

In molte linee cellulari in coltura, dopo l'ingresso nella cellula ospite ed una fase iniziale d'espressione genica generalizzata, il virus entra rapidamente in latenza ed il genoma virale viene frequentemente perso durante i passaggi successivi delle cellule infettate. Questo si verifica anche nelle colture primarie di cellule tumorali di KS infettate da HHV-8 isolate da paziente. La difficoltà a coltivare efficientemente il virus in sistemi cellulari *in vitro* ha creato e tuttora continua a creare numerosi ostacoli per lo studio del suo ciclo replicativo [Renne R. et al., 1998].

Una caratteristica peculiare di HHV-8, che lo distingue da tutti gli altri virus erpetici che infettano l'uomo, è la cosiddetta "pirateria molecolare" di geni cellulari ossia l'aver acquisito nel corso dell'evoluzione numerosi geni delle cellule ospiti utili per la sua sopravvivenza e replicazione, nonché per la disseminazione dell'infezione e la patogenesi virale [Jenner R.G. et al., 2002; Moore P.S. et al., 2003; Nicholas J., 2003].

### **3.1.2 PATOLOGIE ASSOCIATE**

HHV-8 è un virus oncogenico. Oltre al KS, che verrà ampiamente descritto nel capitolo successivo, HHV-8 è stato associato a due disordini linfoproliferativi a cellule B, il linfoma ad effusione primaria (PEL) e la malattia multicentrica di Castleman (MCD) [Boshoff C. et al., 2001; Hengge U.R. et al. Part 2, 2002].

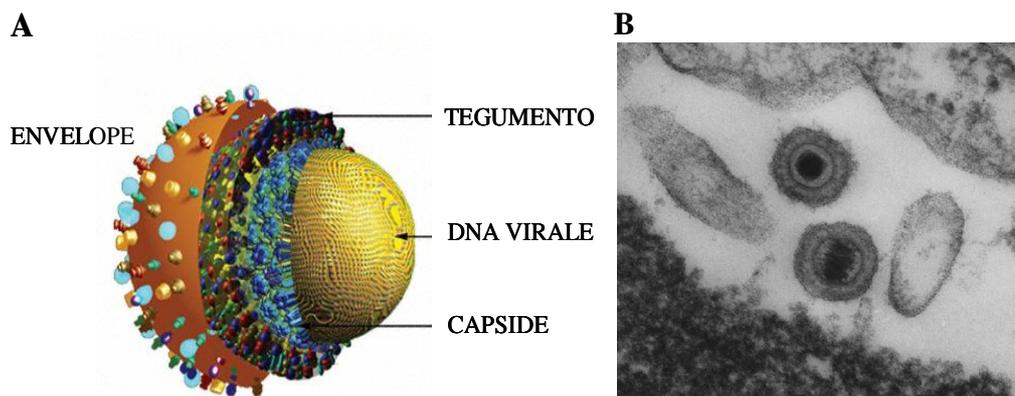
Il PEL è una rara forma di linfoma non-Hodgkin che si riscontra in pazienti immunocompromessi, tipicamente nei malati di AIDS, in cui i linfociti B proliferanti sono infettati da HHV-8 e, nella maggior parte dei casi (80%), anche dal virus di Epstein Barr (EBV) [Nador R.G. et al., 1996]. Generalmente, la neoplasia localizza nelle cavità sierose del corpo (pleura, pericardio e peritoneo) senza infiltrazione di organi solidi. Il PEL è una classica neoplasia monoclonale; le cellule tumorali presentano una morfologia eterogenea e mancano di marcatori di superficie caratteristici dei linfociti, tuttavia mostrano alcuni riarrangiamenti a carico dei geni delle immunoglobuline che ne dimostrano la derivazione da precursori di cellule B e l'origine clonale [Ensoli B. et al., 2000]. Dai PEL sono state stabilizzate numerose linee cellulari (ad esempio BC-3, BCBL-1) che ospitano il virus in forma latente e che tuttora rappresentano il sistema principale per poter produrre e studiare HHV-8 [Arvanitakis L. et al., 1996]. Le cellule dei PEL contengono numerose copie di genomi virali (50-150/cellula) contrariamente a quanto si osserva nelle cellule del KS. In condizioni basali, solo una piccola percentuale di queste cellule va incontro spontaneamente ad infezione litica con rilascio di progenie virale infettante. La stimolazione con agenti chimici, come gli esteri del forbolo (TPA) o il butirrato di sodio, determina un incremento di questa percentuale (30%) con conseguente aumento della quantità di virus rilasciato nel terreno di coltura.

La malattia di Castleman (CD) è un raro disordine linfoproliferativo di origine policlonale dei linfociti B, caratterizzato da una crescita anormale benigna, che può presentarsi ovunque nei tessuti linfatici del corpo sia in soggetti positivi che negativi per il virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1). Sono presenti due varianti istopatologiche di tale malattia di cui la più rara ed aggressiva è quella plasmacellulare o multicentrica (MCD) associata all'infezione delle cellule B da

parte di HHV-8. La patogenesi del CD è correlata ad una sovraespressione di interleuchina 6 (IL-6) che agisce da fattore di crescita per i linfociti B; infatti, anticorpi monoclonali neutralizzanti diretti contro il recettore bersaglio di questa citochina sono risultati efficaci nel trattamento della malattia [Nishimoto N. *et al.*, 2000]. HHV-8 codifica un omologo della IL-6 cellulare (vIL-6) e l'espressione di questo gene virale potrebbe spiegare la maggiore aggressività della variante MCD rispetto alla CD [Schulz T.F. *et al.*, 2001].

### 3.1.3 STRUTTURA DEL VIRIONE

Il virione di HHV-8 appare strutturalmente simile a quello di altri herpesvirus noti e ben caratterizzati, tipo il virus dell'Herpes Simplex di tipo 1 (HSV-1), come dimostrato dalla microscopia elettronica (Figura 1 B). Partendo dall'interno troviamo un nucleocapside elettron-opaco contenente il DNA genomico in forma di toroide, un capsido formato da 162 capsomeri arrangiati in una simmetria icosaedrica con T=16, un tegumento di materiale amorfo ed, infine, un envelope costituito da un doppio strato di lipidi di origine cellulare e da diverse glicoproteine virali che protrudono dalla sua superficie (Figura 1 A) [Said W. *et al.*, 1996].



**Figura 1** (A) Rappresentazione schematica della particella virale di HHV-8. (B) Immagine al microscopio elettronico di virioni di HHV-8 [Said W. *et al.*, 1996].

Studi sui virioni purificati dai sovranatanti delle linee cellulari derivate da PEL hanno portato all'identificazione di almeno 24 proteine virioniche che comprendono 5 proteine capsidiche, 6 proteine del tegumento, 8 glicoproteine dell'envelope, ed altre 5 proteine la cui precisa localizzazione nel virione non è stata ancora chiarita [Zhu F.X. *et al.*, 2005].

Il capsid è formato da 12 pentoni (i capsomeri ai vertici dell'icosaedro) e da 150 esoni (gli altri capsomeri), costituiti rispettivamente da 5 o 6 copie della proteina capsidica principale MCP (*major capsid protein*, orf 25); i capsomeri sono saldati fra di loro da strutture eterotrimeriche formate da due proteine capsidiche minori, TRI-1 (orf 62) e TRI-2 (orf 26), combinate nel rapporto di 1:2. Nonostante l'arrangiamento strutturale del capsid di HHV-8 sia perfettamente analogo a quello di HSV-1, esiste una scarsa omologia di sequenza delle proteine MCP e TRI con le rispettive controparti di HSV-1 [Trus B.L. et al., 2001].

Per quanto riguarda il tegumento si conosce ancora poco sulla precisa funzione delle proteine virali che lo costituiscono, tuttavia si può ipotizzare che queste esercitino importanti funzioni regolatrici e abbiano così un ruolo critico nel ciclo replicativo virale essendo rilasciate immediatamente dopo l'ingresso del virus nella cellula. Fra queste, la proteina codificata dalla orf45, che è espressa molto precocemente nell'infezione virale litica, è in grado di bloccare la risposta immunitaria innata interagendo con la proteina cellulare IRF7 (*Interferon Regulator Factor 7*) e reprimendo così la trascrizione dei geni dell'interferone  $\alpha$  e  $\beta$  (IFN $\alpha$  e  $\beta$ ) [Zhu F.X. et al., 2002]. Inoltre, studi recenti hanno dimostrato che questa proteina gioca un ruolo critico sia nell'infezione *ex novo* che nel rilascio della progenie virale dalla cellula infettata [Zhu F.X. et al., 2006].

L'envelope comprende le glicoproteine gB (orf8), gH (orf22), gL (orf47), gM (orf39) e gN (orf53), che sono 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 cellulare attraverso il 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; inoltre, essa possiede il motivo aminoacidico Arg-Gly-Asp (RGD) nel suo dominio extracellulare mediante il quale è in grado di interagire specificatamente con l'integrina  $\alpha 3 \beta 1$  che, come vedremo, viene 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.

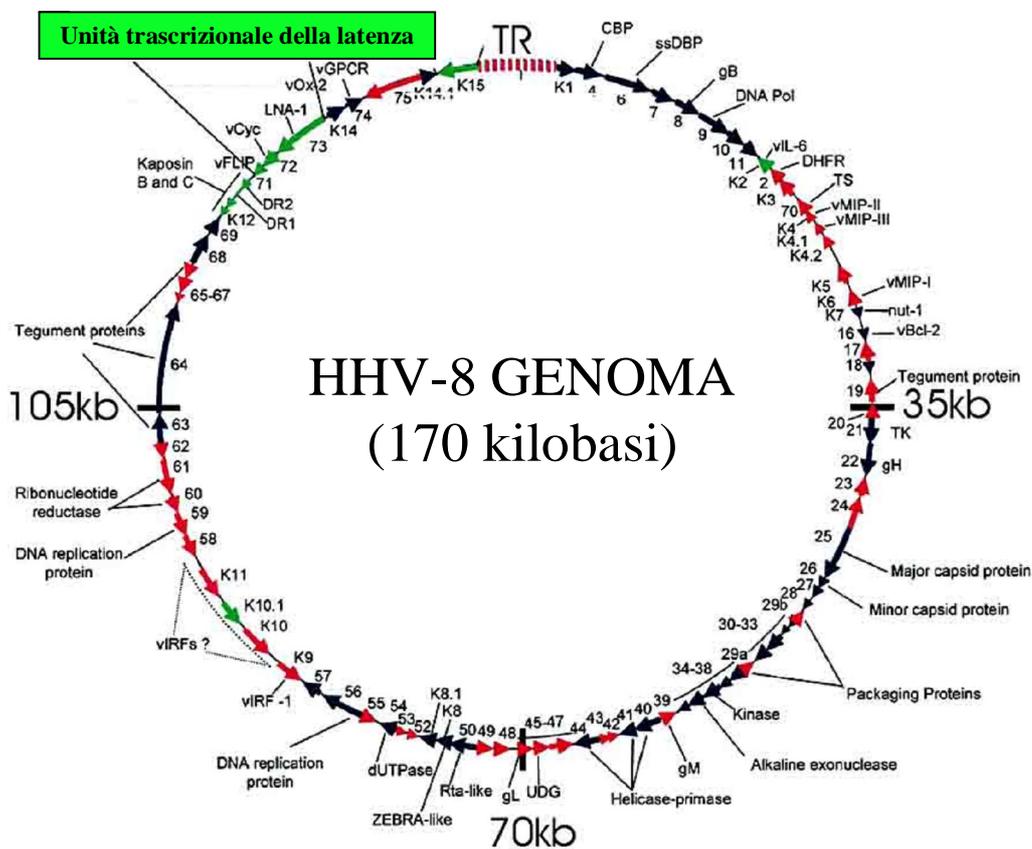
Le glicoproteine gB, gH e gL sono essenziali per la penetrazione del virus nella cellula ed, inoltre, quando vengono espresse in cellule suscettibili all'infezione da parte di HHV-8 inducono la formazione di policariociti [Pertel P.E., 2002].

Nel virione di HHV-8 sono state trovate anche alcune proteine cellulari, fra cui la  $\beta$ -actina e la catena pesante di tipo A della miosina di classe II, suggerendo un coinvolgimento del citoscheletro nel trasporto intracellulare dei capsidi virali, nell'assemblaggio e nella fuoriuscita dei virioni maturi [Zhu F.X et al., 2005].

Inoltre, 11 mRNA virali sono incorporati nella particella, presumibilmente a livello del tegumento. Per lo più si tratta di trascritti prodotti in grande quantità durante il ciclo di replicazione litica e, quindi, inglobati in modo casuale durante la fase di assemblaggio della progenie virale. Tuttavia, uno degli mRNA presenti (quello codificante la proteasi virale) non viene normalmente prodotto in quantità elevate suggerendo la possibilità che esistano anche dei meccanismi specifici per il reclutamento dei trascritti virali nella particella matura [Bechtel J. et al., 2005].

### 3.1.4 ORGANIZZAZIONE DEL GENOMA

Il genoma di HHV-8 è una molecola di DNA lineare a doppio filamento di circa 165-170 kb, che circolarizza immediatamente dopo il rilascio dal capsid e si localizza nel nucleo della cellula infettata (Figura 2) [Renne R. et al., 1996].



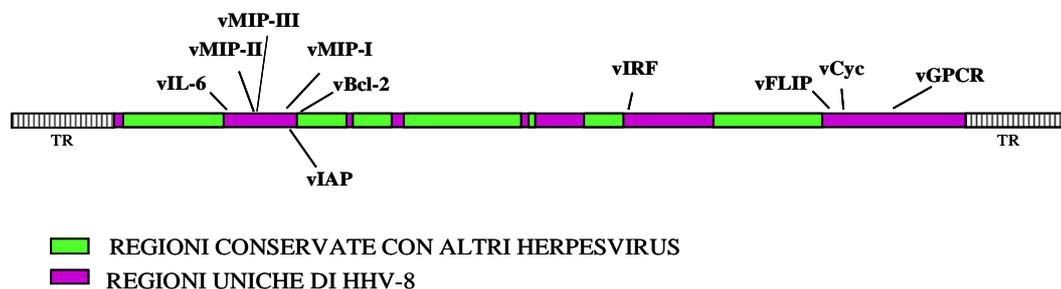
**Figura 2** Genoma di HHV-8 mostrato in forma di episoma circolare, come si trova nel nucleo della cellula infettata.

Al suo interno possiamo distinguere una regione centrale unica (LUR) di 145 kb a basso contenuto di GC (53%), in cui mappano tutti i geni virali noti (~ 87) [Russo J.J. et al., 1996], fiancheggiata da una serie di ripetizioni terminali dirette (TR), complessivamente lunghe 20-25 kb, caratterizzate da un alto contenuto in GC (85%) e del tutto prive di sequenze codificanti [Lagunoff M. et al., 1997]. Nelle TR sono presenti i segnali di *packaging* pac1 e pac2 necessari per l'incorporazione di singole molecole di DNA genomico all'interno dei capsidi neoformati al momento dell'assemblaggio della progenie virale. Nel genoma sono state identificate due sequenze che funzionano da origini di replicazione litica (*ori*) e che vengono 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).

Il confronto della sequenza genomica della LUR di HHV-8 con quella di altri herpesvirus linfotropici, in particolare di HVS, ha evidenziato sette blocchi principali di geni altamente conservati, codificanti proteine e enzimi critici per la replicazione virale e componenti strutturali del virione; molti di questi trascritti sono conservati in tutta la famiglia degli *Herpesviridae* (Figura 3).

HHV-8 contiene anche numerose sequenze codificanti che non sono conservate negli altri herpesvirus, ad eccezione di HVS, e che sono intersperse fra le sequenze conservate. Fra queste troviamo almeno 15 geni unici che non hanno nessun omologo in HVS e che vengono designati con la lettera K (K1-K15). La maggior parte di questi geni presenta un'elevata omologia con geni cellulari codificanti proteine coinvolte in diverse vie di segnalazione intracellulari, nel controllo della proliferazione cellulare, nell'inibizione dell'apoptosi e nell'evasione del sistema immunitario dell'ospite (omologhi virali di recettori accoppiati a proteine G (vGPCR), della ciclina D (vCyc), di FLIP (vFLIP), di Bcl-2 (vBcl-2), degli inibitori delle proteine dell'apoptosi (vIAP), dell'IL-6 (vIL-6), delle chemochine CC (vMIP-I, vMPI-II e vMIP-III), degli *Interferon Regulatory Factors* (vIRFs)).

Tutti questi geni rientrano nella caratteristica "pirateria molecolare" che contraddistingue HHV-8 (Figura 3).



**Figura 3** Localizzazione nel genoma di HHV-8 degli omologhi virali dei geni cellulari. Viene indicato il nome della proteina corrispondente preceduto dalla lettera v che sta per virale.

Dal genoma di HHV-8 vengono anche trascritti degli RNA non codificanti. Nel corso dell'infezione latente, sono trascritte 12 piccole molecole di RNA (micro-RNA) che si pensa 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, così da favorire il persistere e il propagarsi dell'infezione [Cai X. *et al.*, 2005]. Invece, nel corso della replicazione litica, viene trascritto un RNA poliadenilato non codificante di 1.1 kB che localizza nel nucleo (*polyadenylated nuclear RNA* (PAN)) 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].

I geni degli herpesvirus sono solitamente raggruppati in due categorie mutuamente esclusive in relazione alle due differenti modalità d'infezione, latente e litica; poi, sulla base della loro cinetica di trascrizione, 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). Per quanto riguarda HHV-8, i geni virali sono stati suddivisi in tre classi, in relazione alla loro cinetica d'espressione in linee cellulari derivate da PEL. I geni di classe I sono quelli tipicamente associati alla latenza, sono espressi costitutivamente nei PEL e non subiscono modificazioni in seguito all'induzione del ciclo litico mediante trattamento delle cellule con TPA. Fra questi ci sono i geni codificanti le proteine LANA (Antigene Nucleare Associato alla Latenza), vCyc e vFLIP che sono raggruppati insieme all'estremità del genoma virale subito a monte della TR. Anche i geni di classe II vengono trascritti in condizioni basali ma il trattamento con TPA ne incrementa notevolmente l'espressione. Essi comprendono il gene vIL-6, il gene codificante la Kaposina, una proteina oncogenica di HHV-8 che gioca un ruolo critico nello sviluppo del KS, ed il trascritto PAN. Infine, i geni di classe III vengono trascritti solamente dopo induzione del ciclo litico con TPA e comprendono tutti i geni necessari per la produzione della progenie virale [Sarid R. *et al.*, 1998].

### **3.1.5 CICLO REPLICATIVO DI HHV-8**

Analogamente agli altri virus erpetici, anche per HHV-8 l'evento iniziale del suo ciclo replicativo consiste nell'attacco del virione alla superficie della cellula, mediato dall'interazione della glicoproteina K8.1 e di gB con il glicosamminoglicano eparan-solfato che è legato covalentemente ai domini extracellulari di numerose proteine di membrana. Tale interazione non è essenziale per l'ingresso del virus, è reversibile ed

incrementa l'efficienza di penetrazione probabilmente concentrando il virus sulla superficie cellulare così da facilitarne l'interazione con i recettori specifici (Figura 4) [Spear P.G. et al., 2003].

Ad oggi sono state identificate almeno tre differenti proteine cellulari che potrebbero funzionare da recettori per HHV-8. Come abbiamo già detto, il virus interagisce con l'integrina  $\alpha 3\beta 1$  attraverso il motivo RGD presente in gB. Questa integrina è espressa su diversi tipi cellulari suscettibili all'infezione da HHV-8, incluse cellule B, cellule endoteliali, fibroblasti e cellule epiteliali. Sia anticorpi diretti contro l' $\alpha 3\beta 1$  che forme solubili dell'integrina stessa interferiscono con l'interazione virus-cellula, tuttavia essi provocano una riduzione (50-70%) ma non un'annullamento totale dell'infettività [Akula S.M. et al., 2002]. Proprio per questo motivo, l' $\alpha 3\beta 1$  non può essere l'unica proteina dell'ospite coinvolta nell'ingresso di HHV-8.

Recentemente, è stato dimostrato che il trasportatore di scambio Cisteina/Glutamato (xCT), che media l'ingresso della cisteina extracellulare accoppiato alla fuoriuscita del glutammato, può funzionare da recettore per HHV-8; infatti, la sua espressione in cellule normalmente non suscettibili le rende permissive all'infezione ed anticorpi diretti contro xCT bloccano completamente l'ingresso del virus nella cellula. Tipicamente, questa proteina forma un eterodimero con il CD98 sulla superficie cellulare e questo complesso si associa con l'integrina  $\alpha 3\beta 1$ ; è possibile che le integrine, peraltro espresse ubiquitariamente in molti tessuti, non costituiscano un vero e proprio recettore per HHV-8 ma piuttosto siano parte di un complesso multiproteico che viene riconosciuto dal virus e che ne media l'ingresso nella cellula bersaglio [Kaleeba J.A. et al., 2006].

Infine, HHV-8 utilizza la proteina CD209 o DC-SIGN (*Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin*), appartenente alla famiglia delle lectine di tipo C, come recettore specifico per l'ingresso nelle cellule dendritiche e nei monociti-macrofagi; infatti, il legame del virus a questi tipi cellulari e l'infezione vengono bloccati da anticorpi diretti contro questa lectina o da forme solubili della stessa [Rappocciolo G. et al., 2006]. DC-SIGN riconosce alcuni motivi glucidici specifici presenti nelle glicoproteine dell'envelope. L'infezione delle cellule dendritiche si accompagna ad una riduzione dell'espressione di DC-SIGN, alla compromissione dell'attività endocitica ed all'inibizione della presentazione degli antigeni alle cellule T CD8+ con una conseguente disfunzione delle risposte immunitarie che favorirebbe il persistere dell'infezione [Cirone M. et al., 2007].

Quindi, proteine cellulari di membrana completamente non correlate fra di loro vengono riconosciute da HHV-8; da tutto questo si evince che il virus utilizza molteplici recettori per infettare le cellule bersaglio e che questi variano a seconda del tipo cellulare (Figura 4).

La penetrazione del virus, almeno in alcuni tipi cellulari, incluse cellule B, fibroblasti e cellule epiteliali, avviene per endocitosi della particella virale seguita dalla fusione dell'envelope con la membrana dell'endosoma in risposta ad un'abbassamento del pH all'interno della vescicola (meccanismo pH dipendente) con conseguente rilascio del capsido nel citoplasma [Akula S.M. et al., 2003; Inoue N. et al., 2006]. Alla luce di quanto è noto sui meccanismi di penetrazione degli altri herpesvirus non si può tuttavia escludere che HHV-8 possa entrare nella cellula anche attraverso la fusione diretta dell'envelope virale con la membrana plasmatica (meccanismo pH indipendente). Il macchinario fusogenico basale utilizzato da HHV-8 include le glicoproteine gB, gH e gL [Pertel P.E., 2002]. Una volta liberato nel citoplasma, il capsido, probabilmente in maniera analoga a quanto accade in HSV-1, viene trasportato attraverso il sistema dei microtubuli fino alla membrana nucleare, quindi il DNA virale viene rilasciato nel nucleo dove circolarizza a formare un'episoma per azione di enzimi dell'ospite. Attraverso l'interazione con le proteine istoniche cellulari, l'episoma si organizza in strutture simil-cromatina diventando un substrato idoneo per l'attacco dell'RNA polimerasi II della cellula (Figura 4).

A questo punto, dopo una prima fase d'espressione genica generalizzata, il virus normalmente entra in latenza mantenendo l'espressione di un limitato numero di geni virali (LANA, vCyc, vFLIP e Kaposina); solo una piccola percentuale di cellule infettate *de novo* (1-3%) intraprende spontaneamente il ciclo litico esattamente come si osserva nelle colture cellulari derivate dai tumori PEL [Ganem D., 2007]. Per le sue proprietà funzionali la proteina LANA, il cui ruolo fondamentale è quello di legare stabilmente l'episoma alla cromatina cellulare, potrebbe reclutare alcuni repressori trascrizionali sul DNA virale inibendo l'espressione dei geni litici e favorendo così il mantenimento della latenza. Il programma d'espressione genica nella latenza, tuttavia, non sembra essere costante; infatti, il gene virale codificante l'omologo del fattore di trascrizione IRF3 (vIRF3 o LANA2, orf K10.6/K10.5) è espresso nelle cellule PEL ma non nelle cellule infettate latentemente presenti nelle lesioni del KS [Rivas C. et al., 2001]. vIRF3 insieme agli altri omologhi virali degli IRF (almeno tre, tutti espressi come geni litici) contribuisce all'evasione della risposta immunitaria innata all'infezione interferendo con l'espressione dell'IFN  $\alpha$  e  $\beta$  o con la loro attività antivirale [Gao S.J. et al., 1997; Fuld S. et al., 2006; Joo C.H. et al., 2007; Offermann M.K., 2007].

L'induzione della replicazione litica è controllata dalla proteina virale RTA (*replication and transcription activator*, orf 50) che possiede un dominio N-terminale di dimerizzazione e di legame al DNA e un dominio C-terminale di attivazione della trascrizione [Deng H. et al., 2007]. RTA interagisce con diversi fattori di trascrizione cellulari, fra cui STAT3 ed RBP-J, attivandoli e promuovendo così l'espressione dei geni virali litici [Gwack Y. et al., 2002; Liang Y. et al., 2002].

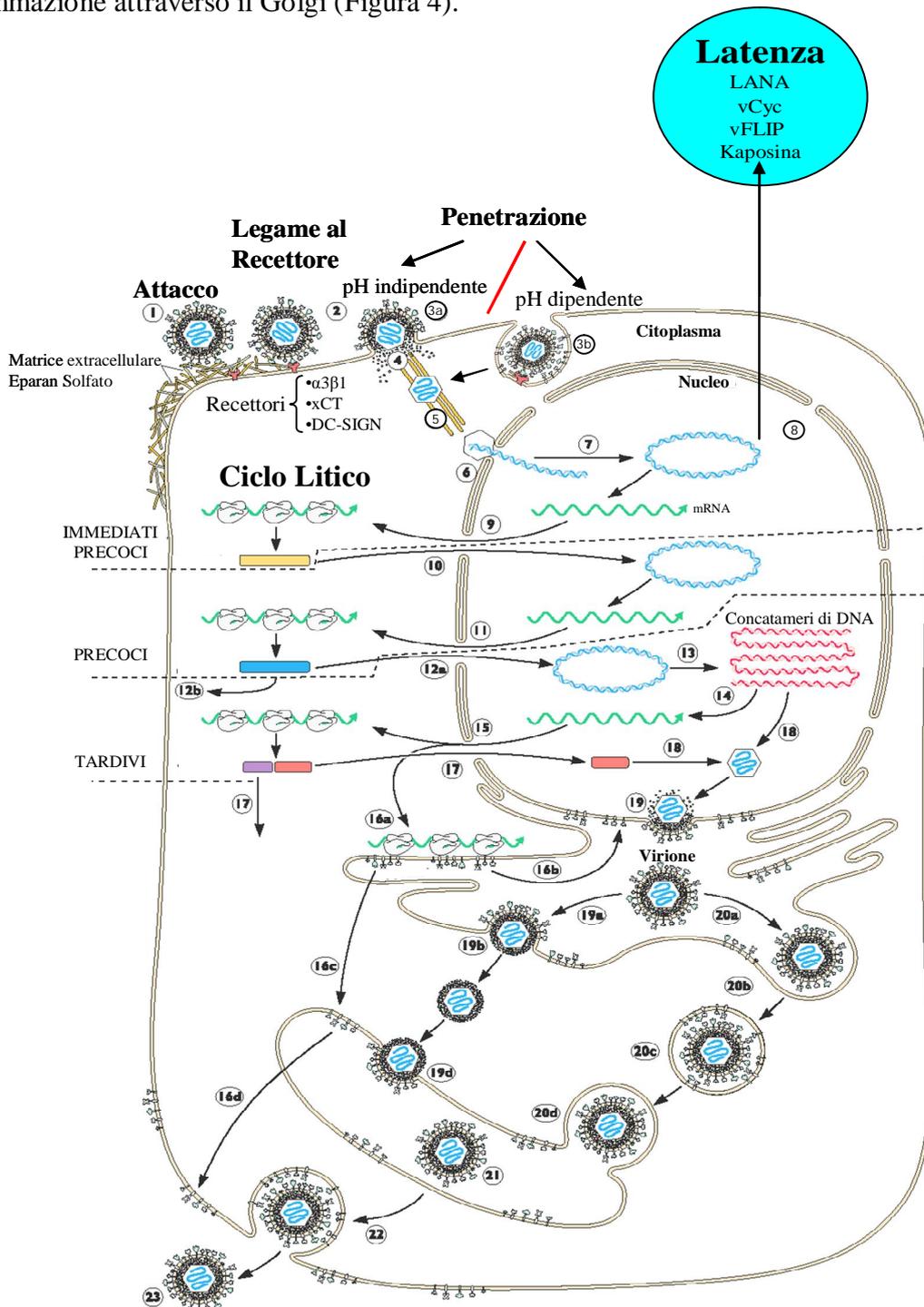
Si innesca, quindi, una cascata di eventi che porta alla trascrizione dei geni virali immediati-precoci e precoci, alla replicazione del genoma virale ed, infine, alla trascrizione dei geni tardivi che avviene utilizzando anche il DNA neoformato come stampo. Numerosi agenti chimici, come gli esteri del forbolo o gli inibitori dell'istone deacetilasi, funzionano da induttori del ciclo litico *in vitro* mentre non si sa ancora quali stimoli attivino questa modalità di replicazione nell'ospite *in vivo*. La maggior parte dei geni precoci codifica enzimi (timidina-kinasi, ribonucleotide-reduktasi, DNA-polimerasi ed elicasi) o proteine accessorie (proteina che lega il DNA a singolo filamento (ssDNA), fattore di processività della polimerasi) coinvolti direttamente nella replicazione del genoma virale. Altre funzioni precoci sono implicate nell'evasione della risposta immunitaria adattativa specifica (MIR1 (orf K3) e MIR2 (orf K5) (*modulators of immune recognition*)), nell'inibizione della sintesi delle proteine cellulari (SOX (*shutoff exonuclease*, orf 37)) o nella modulazione della trasduzione del segnale (orf K1, orf K15 ed orf74). Inoltre, fra i prodotti precoci ci sono almeno due proteine con funzioni regolatrici; MTA (*mRNA transcript accumulation*, orf 57), che promuove il trasporto dal nucleo al citoplasma degli mRNA virali e può potenziare l'attivazione trascrizionale mediata da RTA, e RAP (*replication associated protein*, orf K8), che media il blocco del ciclo cellulare in G1 favorendo così la sintesi del DNA virale a scapito di quella del DNA cellulare [Murphy M.P. et al., 2001; Ganem D., 2007].

Analogamente agli altri herpesvirus, la replicazione del genoma virale inizia con modalità theta origine-dipendente per proseguire con un meccanismo a “cerchio rotante” origine-indipendente, che porta alla formazione di lunghi concatameri testa-coda che vengono tagliati in monomeri lineari durante l'impacchettamento del DNA virale nel capsido.

Gli eventi a valle della replicazione del genoma virale non sono stati chiariti con precisione; infatti, sul controllo dell'espressione dei geni tardivi di HHV-8 si conosce ancora poco. I trascritti tardivi sono decisamente più abbondanti degli altri grazie anche alla disponibilità di più molecole di DNA stampo a cui l'RNA polimerasi può legarsi; infatti, la trascrizione della maggior parte di questi geni è fortemente compromessa da inibitori della sintesi del DNA virale (ganciclovir, foscarnet, etc). Le proteine tardive sono prevalentemente proteine strutturali del capsido, del tegumento e dell'envelope; gli alti livelli di trascrizione correlano con la necessità di grandi quantità di proteine strutturali per la formazione della progenie virale.

Restano ancora molte incertezze sulle ultime fasi del ciclo replicativo litico. Si presume che l'impacchettamento del genoma virale nei capsidi neoassemblati avvenga nel nucleo e che, quindi, la particella acquisisca il tegumento ed, infine, l'envelope contenente le glicoproteine virali per gemmazione attraverso la membrana nucleare interna. Le particelle virali neoformate verrebbero poi trasportate mediante

transcitosi in vescicole attraverso il reticolo endoplasmatico e le cisterne del Golgi, dove viene completata la maturazione delle glicoproteine virali, e, dopo fusione delle vescicole con la membrana plasmatica, i virioni maturi sarebbero rilasciati per esocitosi all'esterno della cellula, portando infine alla morte della cellula stessa. Alternativamente, la particella virale potrebbe perdere l'envelope durante la fusione con la membrana nucleare esterna (deinviluppo) ed acquisire quello definitivo per gemmazione attraverso il Golgi (Figura 4).



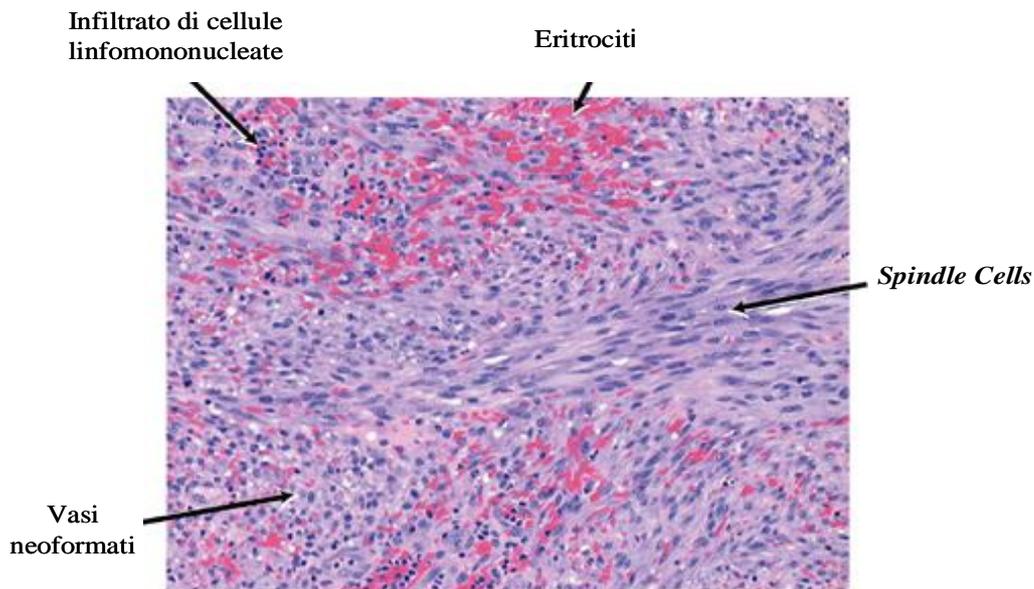
**Figura 4** Ciclo replicativo di HHV-8 (Latenza o Ciclo Litico).

Come per altri herpesvirus, gB risulta essere essenziale non solo per il legame alla cellula bersaglio e la penetrazione ma anche nella fase di assemblaggio e fuoriuscita della progenie virale; la delezione di gB, infatti, inibisce il rilascio di nuovi virioni dalle cellule infettate [*Krishnan H.H. et al., 2005*].

## 3.2 IL SARCOMA DI KAPOSI

Il sarcoma di Kaposi (KS) è stato descritto per la prima volta nel 1872 dal dermatologo Moritz Kaposi come un sarcoma multipigmentato idiopatico della pelle. Più specificatamente si tratta di un tumore di origine mesenchimale che inizia con la comparsa simultanea di lesioni multiple della cute e, nelle forme più aggressive, dei visceri. Sono state identificate quattro differenti forme cliniche ed epidemiologiche di KS; una forma sporadica con decorso indolente (*classic KS*), una forma aggressiva endemica che è diffusa nell'Africa sub-equatoriale (*African KS*), una forma di media entità che colpisce i pazienti sottoposti a trapianto d'organo e trattati con terapie immunosoppressive (*PT-KS*) ed, infine, la forma più aggressiva di KS, caratterizzata da interessamento viscerale e linfonodale ed elevata morbilità, che è associata all'infezione da HIV-1 e quindi all'AIDS (*AIDS-KS*) [Monini P. et al., 1999; Hengge U.R. et al. Part 1, 2002]. Ad oggi, il KS rappresenta una delle più frequenti patologie opportunistiche associate all'AIDS.

Nonostante il diverso decorso clinico, tutte le forme di KS sono caratterizzate dal punto di vista istopatologico da intensa neoangiogenesi, edema, formazione di vasi aberranti con stravasamento di eritrociti, infiltrazione di cellule linfomononucleate, principalmente linfociti T CD8+ e monociti-macrofagi, e dalla proliferazione di caratteristiche cellule a morfologia fusiforme, definite *spindle cells* (SC), che sono considerate le cellule tumorali della lesione (Figura 5) [Ensoli B. et al., 1998; Ensoli B. et al., 2001; Viejo-Borbolla A. et al., 2003].



**Figura 5** Caratteristica immagine istologica di lesione del Sarcoma di Kaposi (KS) dopo colorazione della biopsia tessutale con ematossilina-eosina.

Si ritiene che le SC derivino da un progenitore cellulare multipotente che può differenziare dando origine sia a cellule endoteliali che a cellule emopoietiche; infatti, anche se la maggior parte delle SC esprime marcatori di superficie specifici delle cellule endoteliali dei vasi linfatici (FVIII-RA, VE-caderina, CD34, CD31), alcune cellule presentano recettori tipici dei macrofagi e delle cellule dendritiche (CD14, CD68, CD45, CD1a) [Ensolì B. *et al.*, 1998; Gessain A. *et al.*, 2005]. Quindi, il KS non presenta le caratteristiche istologiche di un classico tumore monoclonale che si genera dalla proliferazione incontrollata di un singolo tipo cellulare.

Tutte le forme di KS sono associate all'infezione da HHV-8. Nelle SC, che costituiscono la componente cellulare principale della lesione, il virus persiste in forma latente ed i geni virali espressi sono pochi; questa ridotta produzione di proteine antigeniche consente al virus di evadere la risposta immunitaria e favorisce il persistere dell'infezione. Invece, nella piccola percentuale di cellule infiltranti (5%), prevalentemente monociti e linfociti T CD8+, si ha un'infezione litica produttiva con rilascio di progenie virale [Blasig Z. *et al.*, 1997]. Inoltre, il virus replica attivamente nelle cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), ossia nei linfociti B, T e nei monociti circolanti, dei pazienti con il KS e dei soggetti ad alto rischio di sviluppo del KS [Decker L.L *et al.*, 1996].

Precocemente, nelle lesioni del KS, solo il 10% delle SC risulta infettato da HHV-8, suggerendo l'importanza di meccanismi di stimolazione paracrina per la progressione della malattia. Negli stadi avanzati del sarcoma, invece, il genoma di HHV-8 è riscontrabile nel 90% delle SC indicando che il virus deve favorire la proliferazione e la sopravvivenza delle cellule infettate [Boshoff C. *et al.*, 2001; Jenner R.G. *et al.*, 2002]. Da tutto ciò risulta evidente che il sarcoma origina come un'iperplasia policlonale, caratterizzata da una popolazione cellulare eterogenea, che tuttavia può progredire fino a diventare un vero e proprio tumore monoclonale.

### **3.2.1 PATOGENESI DEL SARCOMA DI KAPOSÌ**

Il KS si sviluppa in conseguenza di un'alterata regolazione del sistema immunitario che porta alla comparsa di un infiltrato cellulare infiammatorio costituito da linfociti T CD8+, monociti-macrofagi e cellule dendritiche. Queste cellule attivate producono citochine infiammatorie di tipo Th1 (IC), principalmente il fattore di necrosi tumorale alfa (TNF $\alpha$ ), l'interleuchina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), l'interferone gamma (IFN $\gamma$ ), l'IL-6 e l'interleuchina 12 (IL-12) [Ensolì B. *et al.*, 2001; Hayward G.S. *et al.*, 2003]. La genesi di questi foci d'infiammazione è una condizione necessaria per lo sviluppo del sarcoma; infatti, nei tessuti dei pazienti si ha dapprima un aumento significativo

delle IC e solo in un secondo momento si può rilevare la presenza del genoma di HHV-8 [Monini P. et al., 1999].

Le IC mediano il reclutamento delle cellule circolanti, incluse cellule infettate da HHV-8, nei tessuti attraverso l'induzione di molecole di adesione (*intercellular cell adhesion molecule* (ICAM), *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)) sugli endoteli vasali e di chemochine (*Rantes*, *monocyte chemotactic protein 1* (MCP-1), *interleukin 8* (IL-8), *macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$*  (MIP-1 $\alpha$ )), attivano le cellule endoteliali e macrofagiche ad acquisire il peculiare fenotipo delle SC ed, inoltre, stimolano la produzione di fattori angiogenici e fattori di crescita (*vascular endothelial growth factor* (VEGF), *basic fibroblast growth factor* (bFGF)) che favoriscono l'angiogenesi, l'edema, la proliferazione delle SC e la crescita della lesione [Fiorelli V. et al., 1995; Samaniego F. et al., 1998]. Questa cascata di eventi può essere innescata oppure favorita dall'infezione con HHV-8. Le IC, inoltre, possono riattivare il virus presente nelle cellule circolanti, favorendo così la disseminazione dell'infezione e il reclutamento di altre cellule infettate nei tessuti; si stabilisce quindi un circuito positivo di amplificazione della cascata di eventi sopra descritta che favorisce l'espandersi della lesione e lo sviluppo di nuove lesioni in altri distretti dell'organismo. Almeno negli stadi iniziali il KS non è un vero e proprio sarcoma piuttosto insorge come un'iperplasia vascolare reattiva provocata dall'infiammazione che può anche regredire spontaneamente. La mancanza di alterazioni cromosomiche, l'origine multifocale in assenza di metastasi e gli sporadici casi di regressione del tumore confermano il ruolo delle IC nello sviluppo del sarcoma e la presenza di lesioni multiple è riconducibile al fatto che HHV-8 infetta cellule circolanti, linfociti e monociti.

L'immunoattivazione accompagnata o seguita da una più o meno marcata immunodepressione, come accade nell'AIDS conclamato, e l'infezione da HHV-8 rappresentano i due principali fattori di rischio per lo sviluppo del KS.

La maggiore aggressività e la più rapida progressione dell'*AIDS-KS* rispetto alle altre forme di KS sono strettamente correlate ad un massiccio aumento delle IC a livello sistemico che si accompagna all'infezione da HIV-1 prima dell'insorgenza dell'immunodepressione caratteristica dell'AIDS. Inoltre, la proteina transattivatrice Tat di HIV-1, che viene secreta dai linfociti T CD4+ e dai macrofagi infettati, può contribuire allo sviluppo del KS in quanto, oltre a stimolare essa stessa la produzione di IC, mima gli effetti di proteine della matrice extracellulare, come la fibronectina e la vitronectina, che giocano un ruolo chiave nella proliferazione e sopravvivenza delle cellule endoteliali e nell'angiogenesi [Ensoli B. et al., 1998; Barillari G. et al., 2002]. Quindi, Tat agisce come cofattore per la progressione del KS promuovendo la crescita delle SC. Infine, l'immunodepressione contribuisce ulteriormente a

complicare il quadro generale perchè, essendo compromessi i meccanismi di difesa dell'ospite, viene favorita la disseminazione dell'infezione da HHV-8.

La progressione della lesione a tumore monoclonale richiede un'alterazione dell'espressione di alcuni geni cellulari che controllano la proliferazione, il differenziamento e l'apoptosi. Negli stadi avanzati del KS si osserva un aumento dei livelli della proteina anti-apoptotica Bcl-2, che favorisce la continua proliferazione cellulare promossa dai fattori di crescita ed angiogenici presenti nella lesione portando ad instabilità genetica e alla conversione del KS in un vero e proprio sarcoma. Inoltre, l'induzione di alcuni oncogeni (c-myc, c-int, ras) e l'accumulo di mutazioni a carico di geni oncosoppressori (p53) con conseguente perdita di funzione delle proteine corrispondenti sembrano avere un ruolo importante nell'evoluzione della patologia. A questo punto, il KS si mostra spesso resistente all'azione dei farmaci antitumorali convenzionali.

Anche l'espressione a lungo termine dei geni di HHV-8 associati alla latenza (LANA, vCyc, vFLIP, Kaposina) potrebbe essere critica nella progressione del KS in virtù della loro capacità di promuovere la proliferazione delle SC sia in modo diretto che bloccando fenomeni apoptotici [Direkze S. et al., 2004].

### **3.2.2 PROTEINE ONCOGENICHE CODIFICATE DA HHV-8**

Numerose proteine codificate da HHV-8 hanno proprietà trasformanti e pertanto possono giocare un ruolo critico nella patogenesi del KS. In particolare, è stata dimostrata l'importanza delle proteine virali associate alla latenza che, fra l'altro, sono espresse nella maggior parte delle SC tumorali.

LANA (*latency-associated nuclear antigen, orf73*) è una proteina multifunzionale che presenta una regione centrale ricca di aminoacidi altamente acidi, un dominio C-terminale più basico, contenente una cerniera di leucine, che è preposto alla dimerizzazione ed al legame del genoma virale, ed un dominio N-terminale che interagisce con la cromatina cellulare e media il reclutamento di repressori trascrizionali [Garber A.C. et al., 2001; Garber A.C. et al., 2002]. LANA è fortemente immunogenica; anticorpi diretti contro la proteina sono un utile marker sierologico d'infezione da HHV-8. La funzione principale di questa proteina è quella di fare da ponte fra il genoma virale e quello cellulare, assicurando il mantenimento del genoma virale in forma di episoma nel nucleo della cellula infettata e garantendone la replicazione e la corretta segregazione durante la mitosi [Ballestas M.E. et al., 1999]. Tuttavia, LANA interagisce anche con diverse proteine coinvolte nel controllo della proliferazione cellulare e nell'apoptosi. Fra queste ci sono i due più importanti soppressori tumorali, p53 e pRb, che vengono sequestrati dal legame

con la proteina virale ed inattivati con conseguente alterazione del controllo del ciclo cellulare; in questo modo, viene favorita la proliferazione e la sopravvivenza delle SC presenti nella lesione [Friborg Jr J. et al., 1999; Radkov S.A. et al., 2000]. Inoltre, LANA media la rilocalizzazione della GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ), che è implicata nella regolazione dei livelli di  $\beta$ -catenina, dal citoplasma al nucleo; il conseguente accumulo citosolico di  $\beta$ -catenina porta all'induzione di molteplici geni coinvolti nella proliferazione cellulare (c-myc, c-jun, ciclina D) [Fujimuro M. et al., 2003]. Infine, LANA può anche controllare ampiamente il profilo d'espressione genica dell'ospite attraverso l'interazione con diversi componenti cellulari della trascrizione e così facendo altera l'omeostasi cellulare [Renne R. et al., 2001; Kaul R. et al., 2007].

vCyc (*viral cyclin, orf72*) è un omologo virale della ciclina D cellulare e viene espresso a partire da un trascritto bicistronico insieme alla proteina vFLIP oppure tricistronico comprendente anche LANA [Chang Y. et al., 1996; Grundhoff A. et al., 2001]. vCyc lega ed attiva cdk6 (*cyclin dependent kinase 6*) promuovendo la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare e, quindi, la proliferazione. A differenza della proteina cellulare, vCyc non è però sensibile all'azione degli inibitori delle cdk e viene così ad esercitare una stimolazione continua e sregolata nelle cellule in cui è espressa [Swanton C. et al., 1997]. Inoltre, vCyc agisce come una ciclina pleiotropica mediando la fosforilazione di un maggior numero di proteine bersaglio rispetto a quelle che sono fisiologicamente sotto il controllo dell'omologo cellulare [Li M. et al., 1997].

vFLIP (*viral FLICE inhibitory protein, orf71*) è una piccola proteina composta da due domini effettori di morte (DED, *Death Effector Domain*), motivi strutturali comunemente presenti nelle caspasi. Inizialmente, si pensava che vFLIP bloccasse l'apoptosi innescata per via recettoriale in quanto, analogamente all'omologo umano, può prevenire l'attivazione della caspasi 8 iniziatrice competendo con essa per il legame al DISC (*Death-inducing signalling complex*) [Belanger C. et al., 2001]. Tuttavia, sembra più probabile che vFLIP favorisca la sopravvivenza delle SC grazie alla sua capacità di incrementare i livelli nucleari del fattore di trascrizione NF $\kappa$ B (*Nuclear factor-kappa B*) che, a sua volta, promuove l'espressione di differenti geni con attività antiapoptotica [Sun Q. et al., 2003]; d'altra parte, in questo modo, vFLIP può anche interferire con l'apoptosi innescata per via mitocondriale. L'NF $\kappa$ B è anche uno dei principali regolatori della risposta infiammatoria, pertanto vFLIP, attraverso tale fattore di trascrizione, potrebbe contribuire ad incrementare i livelli di secrezione delle citochine infiammatorie che, come abbiamo già detto, giocano un ruolo fondamentale nello sviluppo del KS [Matta H. et al., 2007].

L'RNA messaggero (mRNA) della kaposina, infine, codifica almeno tre proteine (A, B e C) attraverso l'utilizzo di differenti siti di inizio della traduzione [Sadler R. et al.,

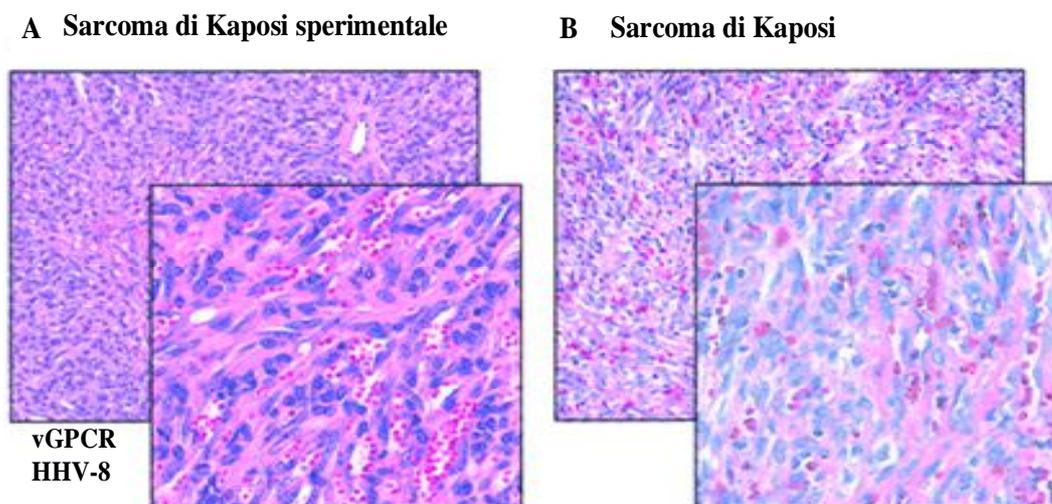
1999]. Delle tre, ad oggi, l'unica ben caratterizzata è la Kaposina B. Questa proteina agisce da adattatore legando e attivando una MAP Kinasi (*Mitogen-activated protein kinase*) della cascata di segnalazione di p38 che è coinvolta nell'innescamento di risposte proinfiammatorie [McCormick C. et al., 2005]. Più specificatamente, questa kinasi incrementa la stabilità di alcuni mRNA cellulari che presentano un alto contenuto in AU nella regione 3' non tradotta (ARE, *AU-rich elements*) e così determina un aumento nei livelli delle proteine corrispondenti. Gli ARE sono presenti nei trascritti di numerose citochine infiammatorie (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ed IL-6) e di fattori angiogenici (VEGF) che sono critici per lo sviluppo del KS, ma si trovano anche in alcuni importanti oncogeni (c-myc) che vengono così ad essere sovraespressi nella cellula infettata [Wang H.W. et al., 2005].

Tutte queste proteine contribuiscono alla progressione del KS, tuttavia, nessuna di loro, presa singolarmente o in combinazione con le altre, sembra essere sufficiente ad innescare la cascata di eventi che porta alla genesi del sarcoma; infatti, pur essendo in grado di indurre trasformazione cellulare *in vitro*, da sole non danno origine a lesioni istologicamente analoghe a quelle del KS in modelli murini *in vivo*.

D'altra parte, anche i geni virali espressi durante l'infezione litica contribuiscono alla patogenesi del KS. Da un lato, essi garantiscono una periodica reinfezione delle cellule endoteliali che è assolutamente necessaria per la persistenza del virus *in vivo*. Dall'altro lato, alcuni geni litici codificano proteine che inducono la produzione di citochine infiammatorie, fattori angiogenici e fattori di crescita, promuovendo così lo sviluppo del KS con un meccanismo paracrino.

Numerosi studi hanno dimostrato che una proteina associata alla replicazione litica potrebbe rappresentare il principale determinante della sarcomogenesi [Bais C. et al., 1998; Montaner S. et al., 2003]. Si tratterebbe di un recettore a sette domini transmembrana accoppiato alla proteina G, vGPCR (*viral G-protein coupled receptor, orf 74*), che è omologo al recettore umano dell'IL-8 ma che, a differenza di questo, è costitutivamente attivo nelle cellule in cui è espresso [Arvanitakis L. et al., 1997]. La sostituzione di un singolo aminoacido (aspartato o glutammato) con uno neutro (valina) nella seconda ansa intracellulare della proteina è responsabile della sua attivazione costitutiva [Burger M. et al., 1999]. Nella lesione del KS, la proteina è espressa nella piccola percentuale di cellule in cui si ha un'infezione produttiva da parte di HHV-8. Attraverso l'interazione con molteplici proteine G, il recettore virale attiva numerose vie di segnalazione portando all'induzione di geni che promuovono la proliferazione e la sopravvivenza cellulare ed interferiscono con la cascata apoptotica che potrebbe essere innescata in risposta all'infezione virale [Couty J.P. et al., 2001; Montaner S. et al., 2001; Couty J.P. et al., 2004]. Inoltre, la vGPCR induce l'espressione di alcune citochine infiammatorie (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 ed IL-12), di molecole di adesione, di fattori di crescita e di fattori angiogenici

(VEGF, bFGF) che giocano un ruolo chiave negli stadi iniziali di sviluppo del sarcoma [Bais C. et al., 1998; Sodhi A. et al., 2000; Schwarz M. et al., 2001; Polson A.G. et al., 2002]. Tutti questi mediatori solubili fanno parte dei circuiti di stimolazione paracrina che intervengono massivamente nel promuovere la neoangiogenesi, l'infiammazione e la proliferazione delle SC [Kirshner J.R. et al., 1999; Montaner S. et al., 2004]. L'attività di segnalazione della vGPCR può essere modulata da alcune chemochine sia positivamente (IL-8 e GRO $\alpha$ ) che negativamente (SDF-1 $\alpha$  e IP-10) ed è stato dimostrato che questa regolazione giocherebbe un ruolo critico nella sarcomogenesi [Holst P.J. et al., 2001]. Resta da chiarire come questo recettore possa essere il principale fattore di innesco del sarcoma dal momento che la sua espressione e, quindi, la sua attività di segnalazione sono strettamente regolate nel tempo dalla morte cellulare conseguente all'infezione virale. Sotto particolari condizioni, come ad esempio nell'infiammazione o nella coinfezione da HIV-1, viene favorita la sopravvivenza cellulare così che la vGPCR ha a disposizione il tempo necessario per sovvertire i controlli cellulari e dare inizio al KS [Sodhi A. et al., 2004]. Inoltre, l'espressione della vGPCR è strettamente controllata da un fattore di trascrizione cellulare, RBP-J, che potrebbe essere attivato da numerosi stimoli endogeni; in tal modo, il recettore virale può essere espresso anche al di fuori di un'infezione litica produttiva da HHV-8 [Liang Y. et al., 2004]. D'altra parte, il potenziale trasformante della proteina erpetica è dimostrato dalla sua capacità di dare luogo a lesioni angioproliferative istologicamente simili al KS in topi transgenici per la vGPCR, fenomeno che non è stato osservato con nessun'altra proteina codificata da HHV-8 (Figura 6) [Yang T.Y. et al., 2000; Montaner S. et al., 2003].



**Figura 6** Colorazione ematossilina-eosina di un tumore sperimentale indotto dalla vGPCR di HHV-8 in un modello murino (A) e di una biopsia da paziente con AIDS-KS (B). Entrambe le lesioni hanno una predilezione spiccata per la cute [Montaner S. et al., 2003].

### 3.2.3 TERAPIA DEL KS

Essendo il KS un vero e proprio tumore negli stadi avanzati, gli approcci terapeutici disponibili includono la crioterapia, la radioterapia e la chemioterapia.

Nelle forme più lievi di KS si interviene con una terapia locale mirata alle singole lesioni cutanee; buoni risultati si ottengono con un derivato dell'acido retinoico (alitretinoina) che blocca la proliferazione cellulare ed induce l'apoptosi. Nelle forme più aggressive di KS in cui si ha l'interessamento anche degli organi interni, come nell'*AIDS-KS*, si ricorre ad una massiccia chemioterapia sistemica; i farmaci d'elezione sono due antracicline liposomiche (doxorubicina e daunorubicina) ed un texano (paclitaxel) [Di Lorenzo G. et al., 2007]. In questo modo, si riesce a prevenire la progressione delle lesioni ed a ridurre la severità dei sintomi. In ogni caso, però, non si ha mai una remissione completa della malattia: infatti, il KS è ancora oggi un tumore non curabile.

L'introduzione della terapia HAART (*Highly active antiretroviral therapy*) diretta contro HIV-1 ha apportato grandi miglioramenti in quanto ha stabilizzato o addirittura fatto regredire l'*AIDS-KS*. La HAART contribuisce a bloccare la crescita del sarcoma riducendo l'invasività ed il rischio di sviluppare nuove lesioni a distanza, presumibilmente per il suo effetto sulla replicazione di HIV-1 e sulla produzione ed il rilascio di Tat. Inoltre, la HAART può esercitare di per sé un'attività antiangiogenica che contrasta direttamente lo sviluppo e la progressione del KS [Di Lorenzo G. et al., 2007].

Al contrario, farmaci diretti contro HHV-8 fra cui gli inibitori nucleosidici della DNA polimerasi erpetica, tipo l'acyclovir o il gancyclovir, non hanno alcun effetto sulla regressione della malattia.

Come abbiamo già detto, la formazione di uno stato angiogenico-infiammatorio è cruciale per la genesi del KS così come lo sono i circuiti di segnalazione attivati dalle proteine di HHV-8, in particolare dalla vGPCR, che contribuiscono ad alimentarlo. La ricerca di molecole in grado di inibire l'angiogenesi (Talidomide) o di interferire con le vie di trasduzione del segnale (Imatinib) ha portato allo sviluppo di strategie terapeutiche alternative mirate ad evitare la tossicità dei chemioterapici tradizionali [Di Lorenzo G. et al., 2007]. La comprensione degli eventi molecolari che guidano la genesi e lo sviluppo del KS fornisce numerosi bersagli per la messa a punto di nuovi farmaci che possano agire anche ad uno stadio molto precoce della malattia.

### 3.3 MECCANISMI DI IMMUNOEVASIONE DI HHV-8

L'instaurarsi di un'infezione persistente, assolutamente necessaria per la patogenesi sia del KS che del PEL e dell'MCD, viene favorito dalla capacità di HHV-8 di contrastare in modo efficiente il sistema immunitario dell'ospite.

Innanzitutto, la latenza rappresenta una strategia passiva di immunoevasione; infatti, solamente pochi geni virali vengono espressi nelle cellule infettate latentemente, riducendo così il numero di antigeni che possono essere presentati al sistema immunitario ed evocare una risposta specifica contro HHV-8 [Rezaee S.A. et al., 2006]. Tuttavia, l'infezione litica con produzione e rilascio di nuovi virioni è necessaria per la disseminazione del virus nell'ospite, pertanto HHV-8 deve anche evadere attivamente le difese immunitarie dell'ospite (Figura 7). A tale scopo, numerose proteine virali interferiscono direttamente sia con l'immunità innata che con l'instaurarsi dell'immunità adattativa specifica [Coscoy L., 2007].

Nell'ambito delle risposte immunitarie innate, HHV-8:

- inibisce l'attivazione del sistema del complemento, preposto alla lisi diretta delle cellule infettate e delle particelle virali o a promuoverne la fagocitosi e l'eliminazione da parte dei macrofagi, grazie alla proteina **KCP** (*KSHV complement-control protein*, orf 4) [Spiller O.B. et al., 2003];
- inibisce l'espressione dei geni dell'IFN $\alpha$  e  $\beta$  e/o interferisce con il loro meccanismo d'azione antivirale, grazie alla proteina del tegumento codificata dall'**orf45** ed ai numerosi omologhi virali degli IRF (**IRF1** (orf K9), **IRF2** (orf K11.1/K11), **IRF3** (orf K10.6/K10.5) ed **IRF4** (orf K10.1/K10)), precedentemente descritti nel capitolo 1.

L'apoptosi delle cellule infettate rappresenta un meccanismo di difesa innato che serve a limitare la replicazione virale e la disseminazione dell'infezione ma è anche il sistema effettore delle risposte immunitarie adattative [Rezaee S.A. et al., 2006]. HHV-8 codifica tre proteine che interferiscono direttamente con il processo apoptotico. Oltre a **vFLIP**, descritto nel capitolo 2, le proteine **vIAP** (orf K7) e **vBcl-2** (orf 16) favoriscono la sopravvivenza delle cellule infettate da HHV-8 grazie alla loro capacità di bloccare l'apoptosi, l'una inibendo direttamente le caspasi e l'altra modulando negativamente l'attività ed il rilascio di molecole proapoptiche; in questo modo, viene favorito il completamento del ciclo replicativo virale con rilascio di nuova progenie e disseminazione dell'infezione [Dourmichev L.A. et al., 2003].

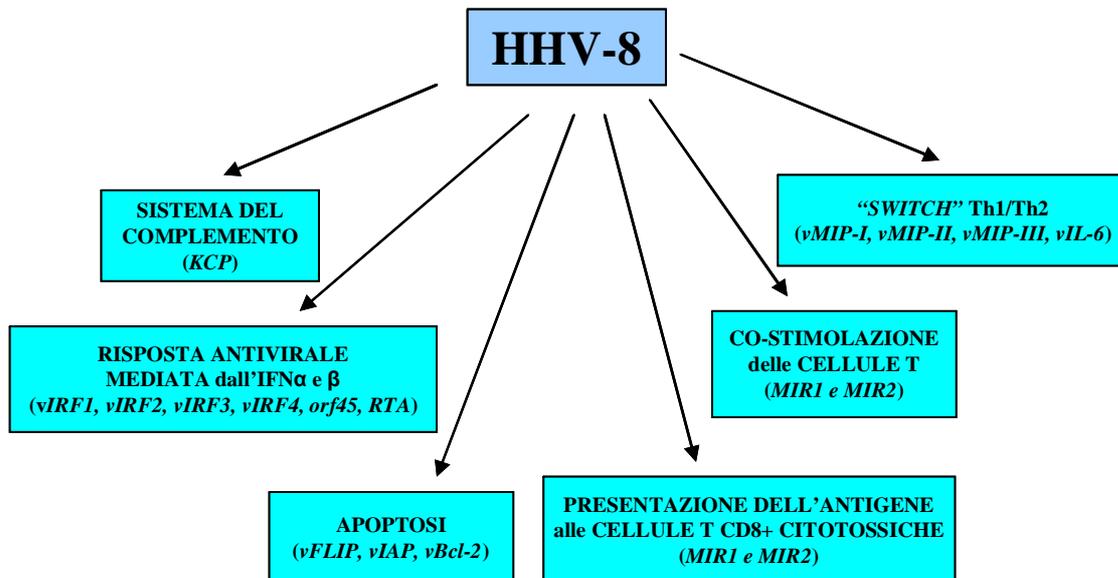
Nell'ambito dell'immunità adattativa, la presentazione degli antigeni virali da parte delle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (HLA-A, B, C) sulla superficie delle cellule infettate ed il successivo riconoscimento da parte dei

linfociti T CD8+ citotossici è fondamentale per lo sviluppo di un'efficiente risposta immunitaria specifica. HHV-8 codifica due proteine, **MIR1** e **MIR2**, già citate nel capitolo 1, che interferiscono con l'espressione degli HLA di classe I sulla superficie delle cellule infettate, promuovendone l'internalizzazione per endocitosi e la degradazione nei lisosomi, e che, quindi, inibiscono la presentazione degli antigeni virali al sistema immunitario dell'ospite [Coscoy L. et al., 2000]. Inoltre, MIR1 e MIR2 riducono l'espressione anche di altre proteine di superficie, come il CD86 (B7-2) e la molecola d'adesione ICAM-1, che funzionano da segnali di co-stimolazione per le cellule T; la ridotta espressione di queste proteine sulle cellule professionali preposte a presentare l'antigene (APC), cellule dendritiche, macrofagi e cellule B infettate da HHV-8, interferisce ulteriormente con la genesi delle risposte immunitarie adattative specifiche [Coscoy L. et al., 2001].

Le chemochine **vMIP-I** (orf K6), **vMIP-II** (orf K4) e **vMIP-III** (orf K4.1) codificate da HHV-8 attivano recettori prevalentemente distribuiti sulle cellule Th2 CD4+ indirizzando così le difese immunitarie dell'ospite verso una risposta di tipo umorale anticorpale a scapito di quella cellulo-mediata citotossica in cui giocano un ruolo chiave le cellule T CD8+ e le cellule Th1 CD4+ e che è deputata al controllo ed all'eliminazione dell'infezione virale [Stine J.T., et al., 2000; Holst P.J. et al., 2003]. Inoltre, si è visto che vMIP-II può anche funzionare da antagonista di molteplici chemochine endogene, tipo RANTES o MIP-1 $\alpha$ , su diverse cellule del sistema immunitario (T CD8+, Th1 CD4+, B, macrofagi, NK) compromettendo quindi le risposte infiammatorie ed immunitarie di tipo Th1. In generale, attraverso la loro attività immunomodulatrice, le chemochine virali creano un microambiente favorevole per la sopravvivenza delle cellule infettate e promuovono così la disseminazione dell'infezione contribuendo indirettamente alla patogenesi virale [Jensen K.K. et al., 2004].

Infine, altre proteine di HHV-8 possono esercitare funzioni immunomodulatrici ed interferire con il sistema immunitario dell'ospite. Fra queste:

- la proteina **RTA**, già descritta nel capitolo 1, che promuove la degradazione dell'IRF7 ed agisce in sinergia con il prodotto dell'orf 45 inibendo l'espressione dei geni dell'IFN $\alpha$  e  $\beta$  [Yu Y. et al., 2005];
- la proteina **vIL-6** (orf K2), che promuove la proliferazione delle cellule B ed il loro differenziamento a plasmacellule, inibisce l'apoptosi indotta da una varietà di stimoli differenti ed agisce in sinergia con le chemochine virali favorendo le risposte anticorpali di tipo Th2 ed inibendo quelle citotossiche di tipo Th1 [Dourmishchev L.A. et al., 2003; Coscoy L. et al., 2007];
- la glicoproteina **vOX2** (orf K14), omologa alla glicoproteina cellulare OX2 [Rezaee S.A. et al., 2006; Coscoy L. et al., 2007].



**Figura 7** Rappresentazione schematica delle strategie attive di immunoevasione di HHV-8.

### 3.3.1 LA GLICOPROTEINA UMANA OX2

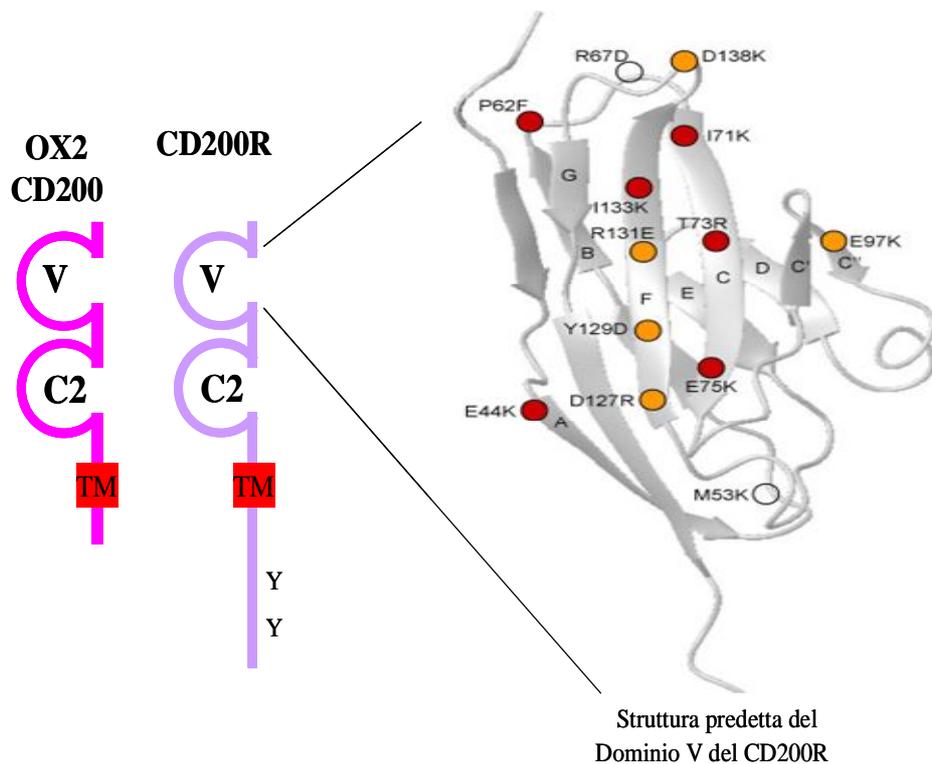
L'OX2, anche conosciuta come CD200, è una glicoproteina di membrana appartenente alla superfamiglia delle immunoglobuline (IgSF) e viene espressa su molteplici tipi di cellule, inclusi timociti immaturi, cellule T attivate, cellule B, monociti-macrofagi, neuroni, cellule endoteliali, cellule del glomerulo renale, cellule follicolari delle tonsille e cellule del sinciziotrofoblasto [Wright G.J. et al., 2001]. Il suo gene mappa sul locus cromosomico 3q12-13 e codifica una proteina di 294 aminoacidi che presenta due domini immunoglobulinici nella porzione extracellulare, uno variabile (V) ed uno costante (C2), una sequenza idrofobica transmembrana ed una piccola coda citoplasmatica di soli 19 residui incapace di trasdurre un segnale (Figura 8) [Clark M.J. et al., 1985]. Ciascun dominio immunoglobulinico ha una struttura tridimensionale predetta a barile  $\beta$ , costituito da due foglietti  $\beta$  affacciati formati da nove filamenti  $\beta$  antiparalleli (A, B, C, C', C'', D, E, F e G) [Prota A.E. et al., 2003]. Il profilo d'espressione dell'OX2 risulta molto conservato fra specie diverse, essendo praticamente identico nel topo, nel ratto e nell'uomo.

L'OX2 è in grado di interagire con il recettore CD200R che viene espresso esclusivamente sulla superficie delle cellule mieloidi (monociti-macrofagi, cellule dendritiche, neutrofilo, basofili-mastociti ed eosinofili), che sono le cellule effettrici delle risposte infiammatorie ed immunitarie, e su alcune cellule T (Th2 CD4+) [Wright G.J. et al., 2000; Wright G.J. et al., 2003]. Il livello d'espressione del recettore è molto variabile fra le diverse cellule della linea mieloide, mostrandosi

decisamente più elevato nei basofili, che sono implicati nelle risposte infiammatorie di tipo allergico attraverso la secrezione di istamina, e molto basso nei neutrofilo, che invece giocano un ruolo critico nelle risposte immunitarie innate attraverso la fagocitosi e l'uccisione di microorganismi patogeni [Shiratori I. et al., 2005]. Il CD200R è una glicoproteina di 348 aminoacidi appartenente all'IgSF ed è intimamente correlata all'OX2 dal punto di vista strutturale; anch'essa presenta due domini immunoglobulinici nella porzione extracellulare (V e C2) ma in più possiede un dominio citoplasmatico di 67 aminoacidi contenente tre residui di tirosina fosforilabili (Y286, Y289 e T297), uno dei quali (Y297) si trova all'interno di un motivo conservato NPxY che è potenzialmente implicato in interazioni proteina-proteina e nella trasduzione del segnale (Figura 8) [Vieites J.M. et al., 2003]. Il gene codificante il CD200R mappa sul cromosoma 3 in prossimità del gene del CD200, suggerendo che entrambi si siano evoluti a partire da un gene ancestrale attraverso fenomeni di duplicazione genica [Wright G.J. et al., 2003]. L'interazione fra le due proteine è molto debole ed è caratterizzata da una rapida cinetica di dissociazione ( $K_D = 0.5 \mu M$ ). Studi di mutagenesi hanno dimostrato che il legame CD200-CD200R coinvolge i domini immunoglobulinici V delle due glicoproteine ed, in particolare, le mutazioni del recettore che ne compromettono la capacità di legare l'OX2 mappano nei filamenti C ed F del foglietto  $\beta$  GFCC'; questo tipo di interazione proteina-proteina è molto comune nell'ambito dell'IgSF [Preston S. et al., 1997; Hatherley D. et al., 2004]. Geni codificanti proteine di membrana con domini immunoglobulinici sono particolarmente numerosi nei genomi di tutti i mammiferi. I membri della IgSF codificati dal genoma umano sono moltissimi, frequentemente mediano interazioni cellula-cellula e la maggior parte gioca un ruolo critico nella regolazione delle risposte immunitarie sia innate che adattative; circa un terzo delle proteine di membrana delle cellule del sistema immunitario contiene domini immunoglobulinici, in numero variabile da uno a diciassette, e circa la metà di queste possiede solo due di questi domini ed è strutturalmente simile all'OX2 [Barclay A.N., 2003].

Attraverso il legame al CD200R, l'OX2 trasduce un segnale inibitorio nelle cellule mieloidi, soprattutto nei monociti-macrofagi e nei basofili-mastociti [Hoek R.M. et al., 2000; Zhang S. et al., 2004]. Le prime conoscenze sulla funzione di questa interazione derivano da modelli murini che sono stati ingegnerizzati per non esprimere il gene dell'OX2; in questi topi si osserva un massiccio aumento nel numero e nello stato d'attivazione dei macrofagi in diversi tessuti ed un notevole incremento della suscettibilità verso patologie autoimmuni a livello del sistema nervoso centrale e delle articolazioni [Hoek R.M. et al., 2000]. Questo fenotipo immunoattivatorio può essere facilmente contrastato dalla somministrazione di una forma solubile dell'OX2 [Gorczynski R.M. et al., 2001].

L'ampio spettro d'espressione dell'OX2 *in vivo* ed i cambiamenti nei suoi livelli di produzione suggeriscono che essa svolga un ruolo fondamentale nel controllare localmente l'attivazione delle cellule mieloidi in diversi distretti dell'organismo, specialmente nei tessuti infiammati; in tal modo l'OX2 previene il danno tessutale e lo sviluppo di malattie autoimmuni provocate da un'eccessiva stimolazione e da una prolungata attivazione delle cellule mieloidi stesse [Barclay A.N. *et al.*, 2002; Jenmalm M.C. *et al.*, 2006].



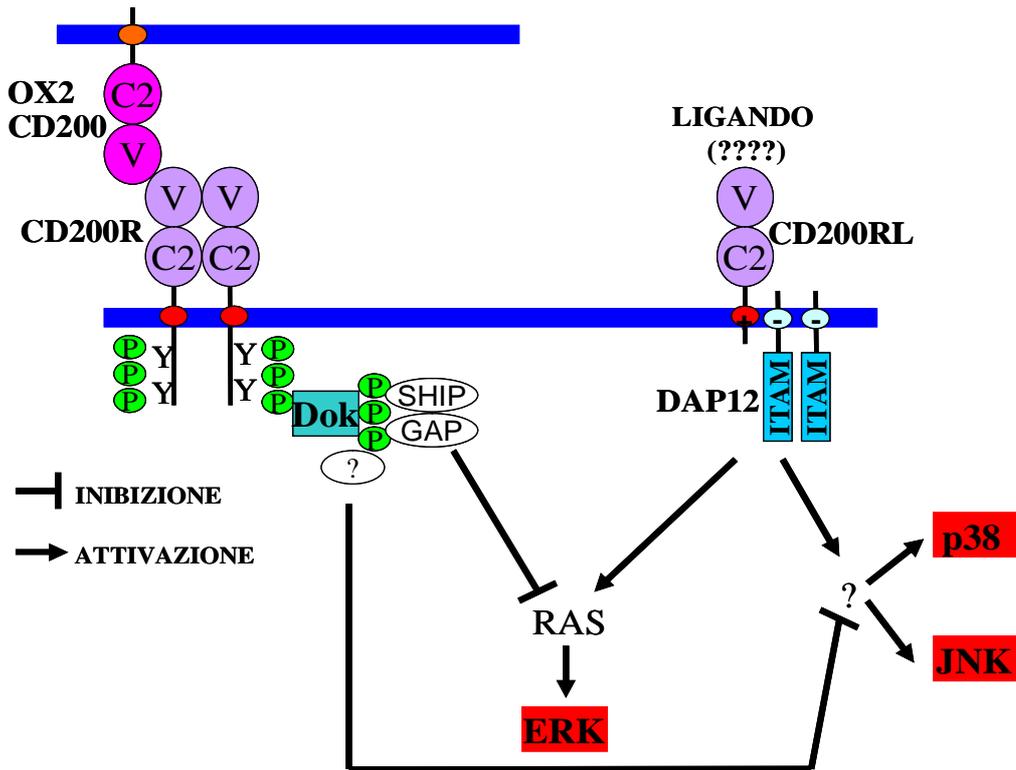
**Figura 8** Rappresentazione schematica dell'OX2 (CD200) e del recettore CD200R con evidenziati i due domini immunoglobulinici (V e C2), la regione transmembrana (TM) e la coda citoplasmatica. Nel CD200R, quest'ultima è più grande e contiene delle tirosine (Y) fosforilabili. Nel dominio V, a destra, sono indicati con dei cerchietti rossi i residui sul CD200R critici per il legame all'OX2 (E44, P62, I71, T73, E75 ed I133).

Le cellule mieloidi esprimono diversi recettori inibitori sulla loro superficie, incluso il CD200R, come meccanismo di controllo per prevenire danni provocati da risposte immunitarie inappropriate dirette contro il "self". La maggior parte dei recettori inibitori espressi sulle cellule mieloidi contiene una sequenza ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) nella porzione citoplasmatica. L'oligomerizzazione di tali recettori indotta dal legame del ligando induce la fosforilazione delle tirosine dell'ITIM, ad opera della famiglia delle kinasi Src, con conseguente reclutamento della tirosin-fosfatasi SHP1 e dell'inositol-fosfatasi SHIP che sopprimono l'attivazione cellulare promuovendo reazioni di defosforilazione a cascata. Al

contrario, nella porzione citoplasmatica del CD200R non è presente un motivo ITIM; l'interazione dell'OX2 con il CD200R induce la dimerizzazione del recettore e la fosforilazione delle tirosine citoplasmatiche che vengono così riconosciute dalle proteine adattatrici Dok1 e Dok2 che possono associarsi e venire anch'esse attivate attraverso fosforilazione [Zhang S. et al., 2004]. Attraverso studi di mutagenesi condotti sulla forma murina del recettore, si è dimostrato che la Y289 non è indispensabile per l'attivazione del CD200R e degli adattatori Dok1 e Dok2 e, quindi, per la conseguente inibizione cellulare mentre le altre due tirosine, Y286 ed Y297, agiscono in maniera sinergica promuovendo la fosforilazione l'una dell'altra [Zhang S. et al., 2006]. Dok1 e Dok2 fosforilate reclutano ed attivano gli effettori SHIP e Ras-GAP che, inibendo Ras, bloccano la cascata della MAP kinasi ERK che porta alla produzione ed al rilascio di citochine. E' probabile che siano coinvolti anche altri effettori nella cascata inibitoria innescata dall'OX2 in quanto vengono bloccate anche le MAP kinasi p38 e JNK che non dipendono da Ras (Figura 9) [Zhang S. et al., 2004]. Interferendo con le vie di segnalazione di queste MAP kinasi, l'OX2 reprime l'espressione di varie citochine e di molecole infiammatorie e riduce la degranolazione dei basofili-mastociti ed il rilascio di istamina sopprimendo così l'attivazione delle cellule mieloidi [Cherwinski H.M. et al., 2005; Jenmalm M.C. et al., 2006].

L'effetto immunomodulatorio risultante dall'interazione dell'OX2 con il CD200R rappresenta un bersaglio interessante per la messa a punto di nuovi approcci terapeutici dal momento che la sua manipolazione può indurre tolleranza immunologica da un lato ed autoimmunità dall'altro. Effetti positivi sono stati ottenuti in modelli murini di artrite e di rigetto al trapianto grazie all'impiego di forme ricombinanti dell'OX2 [Gorczyński R.M. et al., 1999; Gorczyński R.M., 2005]. Nel genoma umano ed in quello murino sono stati recentemente identificati rispettivamente uno e quattro omologhi del CD200R che mancano del dominio citoplasmatico e quindi sono apparentemente incapaci di trasdurre un segnale (CD200RL) [Wright G.J. et al., 2003]. Tuttavia, alcuni residui carichi positivamente nella regione transmembrana di questi omologhi recettoriali possono interagire con residui carichi negativamente presenti nella porzione transmembrana dell'omodimero DAP12. Questa proteina di membrana possiede un motivo ITAM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif*) nella sua porzione intracellulare che può essere fosforilato e, quindi, può reclutare ed attivare delle tirosin-kinasi. L'accoppiamento fra il CD200RL e la proteina DAP12 risulta così nella trasduzione di un segnale attivatorio all'interno della cellula bersaglio (Figura 9). Attraverso l'utilizzo di una forma ricombinante della glicoproteina, si è dimostrato che l'OX2 non interagisce con i recettori CD200RL [Hatherley D. et al., 2005]. In conclusione, a differenza del CD200R inibitorio originariamente caratterizzato nel topo e nell'uomo, questi

omologhi CD200RL funzionano da recettori attivatori; purtroppo quali siano i ligandi di queste proteine *in vivo* e quale sia il significato funzionale e biologico di questi recettori restano ancora da chiarire. E' possibile che questi CD200RL si siano evoluti per riconoscere alcune componenti virali o batteriche ed attivare, attraverso DAP12, le cellule effettrici del sistema immunitario, analogamente a quanto è stato descritto per il recettore attivatorio Ly49 espresso sulle cellule NK che riconosce la proteina m157 del CMV murino [Smith H.R. *et al.*, 2002; French A.R. *et al.*, 2006].

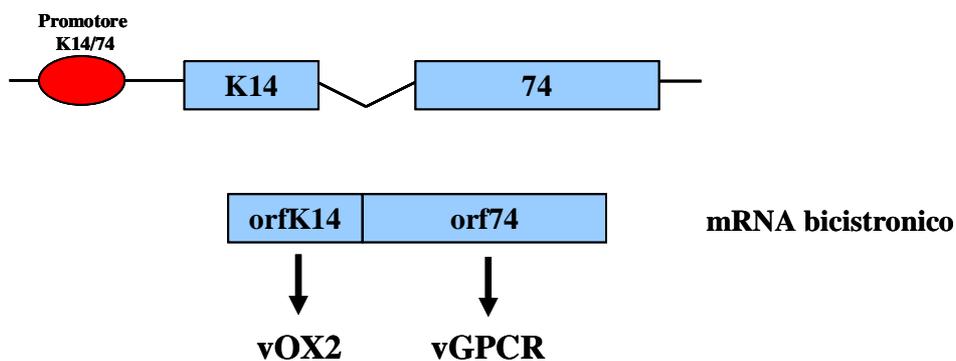


**Figura 9** Rappresentazione della cascata di segnalazione innescata dall'interazione dell'OX2 con il recettore di membrana CD200R che porta all'inibizione delle MAP kinasi ERK, p38 e JNK (coinvolte nell'induzione dei geni di numerose citochine). L'attivazione del CD200RL, attraverso l'adattatore DAP12, controbilancia la cascata inibitoria innescata dal CD200R.

### 3.3.2 L'OMOLOGO VIRALE vOX2 (orf K14) di HHV-8

Geni omologhi al gene codificante la glicoproteina OX2 sono stati identificati in numerosi virus patogeni sia per l'uomo che per l'animale, nei betaherpesvirus (HHV-6a, HHV-6b ed HHV-7), nei gammaherpesvirus (HHV-8 ed RRV) ed anche in diversi yata- e leporipoxvirus (Myxoma virus, Shope fibroma virus ed "Lumpy skin disease" virus), ad indicare che il gene umano è stato acquisito indipendentemente numerose volte nel corso dell'evoluzione. Presumibilmente, l'OX2 fornisce un forte

vantaggio selettivo per questi virus svolgendo un ruolo critico nel loro ciclo vitale e favorendone la sopravvivenza di fronte alle difese immunitarie dell'ospite [Barclay A.N. *et al.*, 2002]. L'omologo dell'OX2 di HHV-8, detto vOX2 (orf K14), è una glicoproteina di membrana che localizza sulla superficie delle cellule infettate [Chung Y.H. *et al.*, 2002]; essa viene espressa precocemente nella fase litica del ciclo replicativo virale a partire da un mRNA bicistronico di circa 2.7 kb codificante anche la glicoproteina vGPCR (orf 74) che, come abbiamo già detto, viene considerata il principale determinante della genesi del KS (Figura 10) [Talbot S.J. *et al.*, 1999; Montaner S. *et al.*, 2003].



**Figura 10** Rappresentazione schematica del locus genico K14/74 e dell'mRNA bicistronico (orf k14 ed orf 74) codificante le glicoproteine vOX2 e vGPCR.

Nel promotore K14/74 sono stati identificati due siti di legame per il fattore di trascrizione cellulare RBP-J che viene intercettato ed attivato dal transattivatore litico RTA, promuovendo così l'espressione della vOX2 e della vGPCR nelle cellule infettate da HHV-8. Fisiologicamente, il fattore RBP-J è un bersaglio a valle della via di segnalazione di *Notch* che può essere attivata da numerosi stimoli endogeni e che esercita un ruolo critico nel controllo della proliferazione e della sopravvivenza cellulare. La forte dipendenza da questo fattore cellulare per la loro trascrizione suggerisce che le due proteine virali potrebbero essere espresse anche senza l'induzione dell'RTA e, quindi, al di fuori di un vero e proprio ciclo di replicazione litica [Liang Y. *et al.*, 2004]. In questo modo, come abbiamo già sottolineato, l'attività di segnalazione della vGPCR non sarebbe condizionata nel tempo dalla morte cellulare provocata dall'infezione litica e potrebbe così favorire la genesi e la progressione del KS.

La vOX2 di HHV-8 presenta un'omologia del 40% con l'OX2 umana a livello di sequenza aminoacidica primaria ed anch'essa non trasduce di per sé alcun segnale nella cellula in cui viene espressa. Inoltre, è stato dimostrato che la glicoproteina erpetica interagisce con il recettore inibitorio CD200R con una cinetica praticamente

identica a quella dell'omologo umano OX2 ( $K_D \sim 0.5 \mu M$ ) [Foster-Cuevas M. et al., 2004]. Il bersaglio d'azione della vOX2, analogamente a quanto dimostrato per l'OX2 umana, è rappresentato dalle cellule della linea mieloide. Nell'ambito delle risposte immunitarie mediate dai basofili e dai neutrofili la glicoproteina erpetica esercita un chiaro effetto inibitorio [Shiratori I. et al., 2005; Rezaee S.A. et al., 2005]. In particolare, nei basofili attivati la vOX2 inibisce il rilascio di istamina dai granuli citoplasmatici sopprimendo così la risposta infiammatoria allergica mentre nei neutrofili blocca la produzione delle specie reattive dell'ossigeno compromettendo l'attività di fagocitosi e di uccisione dei microorganismi patogeni. Quindi, la vOX2, analogamente al suo omologo umano OX2, inibisce le risposte infiammatorie ed immunitarie dell'ospite favorendo in tal modo la persistenza e la disseminazione dell'infezione virale [Rezaee S.A. et al., 2006].

Tuttavia, l'effetto della vOX2 nei monociti-macrofagi, che giocano un ruolo cruciale nelle risposte immunitarie sia innate che adattative all'infezione virale rispetto ai basofili ed ai neutrofili, non è stato ancora chiarito con precisione; infatti, ci sono dati contraddittori in letteratura in merito all'azione esercitata dalla glicoproteina erpetica su questo tipo di cellule. I monociti-macrofagi sono presenti nelle lesioni del KS e contribuiscono fortemente al microambiente infiammatorio in cui si sviluppa il KS stesso, da un lato sono sede d'infezione litica da parte di HHV-8 e dall'altro sono suscettibili all'azione della vOX2 che viene espressa sulla superficie delle cellule infettate liticamente dal virus [Chung Y.H. et al., 2002].

In un lavoro del 2002, si dimostra che la vOX2 di HHV-8 stimola i monociti-macrofagi a secernere numerose citochine proinfiammatorie. Infatti, si osserva che una forma solubile della vOX2, costituita dall'intera porzione extracellulare della glicoproteina, promuove la produzione del TNF $\alpha$ , dell'IL-1 $\beta$  e dell'IL-6 in monociti-macrofagi primari isolati dal sangue periferico e che, in particolare, quest'effetto stimolatorio risulta molto più marcato nelle cellule pretrattate con l'IFN $\gamma$ , la più potente citochina attivatrice dei macrofagi. Anche cellule B (linea cellulare BJAB) esprimenti la vOX2 sulla loro superficie stimolano cellule monocito-macrofagiche (linea cellulare U937) a produrre citochine infiammatorie. Pertanto, contrariamente all'omologo umano OX2, la glicoproteina erpetica vOX2 sembra trasdurre un segnale attivatorio nei monociti-macrofagi [Chung Y.H. et al., 2002]. In virtù di questa sua capacità di stimolare la produzione di citochine infiammatorie, le sarebbe stato attribuito un ruolo diretto nella sarcomogenesi.

In un secondo studio del 2004, invece, l'attenzione viene focalizzata sull'interazione della vOX2 con il recettore inibitorio CD200R. Nonostante vi sia una similarità solo del 40% fra la vOX2 e l'OX2, come abbiamo già detto, le due proteine legano il CD200R con la medesima affinità e ciò comporta un effetto analogo sulle cellule bersaglio. In questo lavoro, si dimostra che la vOX2 di HHV-8 mima la funzione

dell'OX2 umana trasferendo segnali inibitori nelle cellule monocito-macrofagiche. Infatti, si osserva che cellule di ovaio di criceto (linea cellulare CHO) esprimenti la vOX2 sulla loro superficie sono in grado di interagire con monociti-macrofagi primari attivati mediante trattamento con IFN $\gamma$  ed LPS (lipopolisaccaride) e di inibire il rilascio di citochine infiammatorie, come il TNF $\alpha$  [Foster-Cuevas M. et al., 2004]. Questi dati, pur essendo chiaramente in contrasto con il lavoro precedente secondo cui la glicoproteina vOX2 avrebbe proprietà immunoattivatorie, concordano con quanto è noto sulla funzionalità dell'OX2 umana. Per le sue funzioni inibitorie sui macrofagi attivati, la vOX2 dovrebbe interferire con le difese immunitarie favorendo così la persistenza del virus nell'ospite.

Anche un altro gammaherpesvirus, RRV, responsabile di un'iperplasia a cellule B nella scimmia molto simile all'MCD associata all'infezione da HHV-8, codifica un omologo dell'OX2 (RRV vOX2, orf R15) che presenta un 30% ed un 28% di identità a livello aminoacidico rispettivamente con l'OX2 umana e la vOX2 di HHV-8. La capacità di HHV-8 ed RRV di dare patologie simili nei loro ospiti naturali fa presupporre che gli omologhi dell'OX2 codificati dai due virus esercitino lo stesso effetto sulle loro cellule bersaglio. A differenza della vOX2, l'omologo codificato da RRV viene trascritto tardivamente nel ciclo replicativo litico e si presenta anche in una forma solubile, che viene secreta dalla cellula infettata, oltre che nella canonica forma transmembrana [Pratt C.L. et al., 2005]. RRV vOX2 si comporta da omologo funzionale dell'OX2 umano, in quanto riduce i livelli d'espressione e di secrezione del TNF $\alpha$  in cellule monocito-macrofagiche [Langlais C.L. et al., 2006].



## 4. SCOPO DELLA TESI

Una caratteristica peculiare di HHV-8 è la “pirateria molecolare” di molteplici geni cellulari codificanti proteine implicate nella regolazione della proliferazione e nella modulazione delle risposte immunitarie che contribuiscono alla sarcomogenesi e all’evasione delle difese dell’ospite; fra queste c’è la glicoproteina vOX2 (orf K14). L’OX2 umana viene espressa da diversi tipi di cellule *in vivo* e blocca localmente le risposte infiammatorie mediate dai monociti-macrofagi interagendo con un loro specifico recettore inibitorio, il CD200R. Per quanto riguarda la vOX2, i dati in letteratura relativi all’effetto esercitato dalla glicoproteina sulle cellule monocito-macrofagico sono invece contrastanti.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di chiarire l’effetto della vOX2 su queste cellule al fine di definire il ruolo funzionale della proteina nella patogenesi del KS. I monociti-macrofagi sono un bersaglio naturale d’infezione da parte di HHV-8, sono presenti nelle lesioni del KS *in vivo* ed esprimono il recettore CD200R. Da un lato, contribuiscono attivamente al microambiente infiammatorio in cui si sviluppa il KS. Dall’altro, giocano un ruolo importante nell’immunità sia innata che adattativa verso le infezioni virali, pertanto l’effetto esercitato dalla vOX2 su queste cellule potrebbe essere utile per la persistenza del virus nell’ospite.



## 5. MATERIALI e METODI

### MATERIALI

#### 5.1 LINEE CELLULARI

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

293T: cellule embrionali renali umane, a morfologia stellata, che esprimono costitutivamente l'antigene T del Virus Vacuolante della Scimmia (SV40) e garantiscono un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici contenenti l'origine di replicazione di tale virus, gentilmente fornite dal Dott. D. Baltimore (Rockefeller University, New York). Queste linea cellulare cresce adesa ed è stata coltivata in terreno di crescita DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco BRL) con l'aggiunta degli antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml) e del 10% (v/v) di FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Gibco BRL) inattivato a 56° per 30 minuti.

U937: cellule umane di tipo monocito-macrofagico derivanti da un linfoma istiocitario, ottenute dall'*American Type Culture Collection* (ATCC CRL-2367).

THP1: cellule umane di tipo monocito-macrofagico derivanti da una leucemia monocitica acuta, ottenute dall'*American Type Culture Collection* (ATCC TIB-202). Queste linee cellulari crescono in sospensione in terreno RPMI 1640 (Gibco BRL) con l'aggiunta degli antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml) e del 10% (v/v) di FBS inattivato a 56° per 30 minuti.

Le colture cellulari sono state mantenute in incubatore (Hereaus) alla temperatura costante di 37°C in ambiente umidificato al 5% (v/v) di CO<sub>2</sub> e sottoposte a periodici controlli di *routine* per escludere eventuali contaminazioni.

#### 5.2 COLTURE PRIMARIE DI MONOCITI-MACROFAGI

In questo lavoro di tesi sono state allestite colture primarie di monociti-macrofagi partendo da dei *buffy coat* di donatori sani gentilmente forniti dal centro immunotrasfusionale dell'Azienda Ospedaliera di Padova. Il sangue è stato diluito in PBS (*Phosphate Buffer Saline*: 3.2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.3 mM KCl,

135 mM NaCl pH 7.4) in rapporto 1:2 (v/v) e quindi stratificato sopra un isovolume di Ficoll. Dopo centrifugazione a temperatura ambiente a 1700 rpm per 40 minuti, le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), separate dalle altre componenti ematiche grazie al gradiente di densità generato dal Ficoll, sono state recuperate e sottoposte a diversi lavaggi in PBS. I PBMC purificati sono stati seminati alla densità di  $10 \times 10^7$  cellule in piastre da 35 mm di diametro (Corning) nel terreno di crescita RPMI 1640, addizionato degli antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomina (100 µg/ml), del 20% (v/v) di FBS e del 10% di HS (*Human Serum*) (Cambrex), entrambi inattivati a 56° per 30 minuti. Dopo 24 ore, le cellule in sospensione (linfociti B e T) sono state aspirate via ed il monostrato di cellule adese (monociti-macrofagi) è stato lavato con PBS prima di aggiungere terreno di crescita fresco [Zeng L. et al., 2006]. Le colture primarie sono state mantenute in incubatore (Hereaus) alla temperatura costante di 37 °C in ambiente umidificato al 5% (v/v) di CO<sub>2</sub> e sottoposte a periodici cambiamenti di terreno fino al momento in cui sono state utilizzate.

### 5.3 PLASMIDI

Sono di seguito descritti i plasmidi impiegati in questo lavoro sperimentale:

pRRLsin.PPT.CMV.eGFP: contenente il vettore lentivirale basato su HIV-1, di terza generazione, Tat-indipendente e *Self-Inactivating* (SIN) [Zufferey R. et al., 1998; Dull T. et al., 1998]. Le componenti del vettore sono:

- LTR in 5' chimerica, costituita da sequenze *enhancer/promoter* derivate dal promotore del Virus del Sarcoma di Rous (RSV) e dalla regione R-U5 derivata da HIV-1, che risulta essere Tat-indipendente;
- Il segnale di incapsidamento  $\psi$  di HIV-1;
- Una regione del gene gag (i primi 653 nucleotidi), la cui presenza aumenta l'efficienza di trasferimento genico [Parolin C. et al., 1996];
- La sequenza RRE (*Rev Response Element*) che garantisce il trasporto nucleocitoplasma dell'RNA virale grazie all'interazione con la proteina regolatrice Rev [Parolin C. et al., 1994];
- La sequenza cPPT (*central Poly-Purine Tract*) del genoma di HIV-1 la cui presenza si è dimostrata rendere maggiormente efficiente l'espressione genica in cellule arrestate nella crescita [Follenzi A. et al., 2000];
- Il promotore IE (*Immediate Early*) dell'HCMV che guida l'espressione del transgene;
- Il gene reporter eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*);

- La sequenza WPRE (*Woodchuck Hepatitis C Virus Post-transcriptional Regulatory Element*) che conferisce stabilità al trascritto virale;
- LTR in 3' deleta nella regione U3. In seguito alla fase di retrotrascrizione, il vettore presenta la delezione della regione U3 anche nell'LTR in 5' che risulta così priva della regione enhancer/promoter e quindi è inattiva.

pMDLg/p RRE: contenente i geni gag e pol di HIV-1 posti sotto il controllo trascrizionale del promotore IE dell'HCMV. Gag codifica le proteine capsidiche mentre pol codifica la proteasi, la trascrittasi inversa e l'integrasi. Sono presenti inoltre la sequenza RRE e la sequenza di poliadenilazione del gene della  $\beta$ -globina umana.

pVSV-g: contenente il gene vsv-g, posto sotto il controllo trascrizionale del promotore IE dell'HCMV e codificante la glicoproteina G del pericapside del Virus della Stomatite Vescicolare, in grado di conferire un ampio spettro d'infezione. Sono presenti inoltre l'introne e la sequenza di poliadenilazione del gene della  $\beta$ -globina umana.

pREV: contenente il gene rev di HIV-1 posto sotto il controllo trascrizionale del promotore dell'RSV. Rev lega la regione RRE presente nel vettore lentivirale e media l'esporto dei trascritti non processati dal nucleo al citoplasma. E' presente inoltre la sequenza di poliadenilazione del gene della  $\beta$ -globina umana.

pRRL.sin.PPT.CMV.eGFP, pMDLg/p RRE, pVSV-g e pREV sono stati gentilmente forniti dal Prof. L. Naldini (Osp. San Raffaele, Milano). In tutti e quattro i plasmidi sono presenti il gene per la resistenza all'ampicillina e l'origine di replicazione batterica. Per la loro amplificazione in cellule procariotiche è stato utilizzato il ceppo XL1Blue di *Escherichia coli* [supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac<sup>-</sup> F' (proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZ $\Delta$ M15 tn10(tet<sup>r</sup>)], sempre fornito dal Prof. L. Naldini.

pcDNA3.1+ (Invitrogen): plasmide d'espressione eucariotico caratterizzato dalla presenza del promotore IE dell'HCMV a monte del sito di policlonaggio mentre a valle sono presenti i segnali di poliadenilazione e di terminazione della trascrizione del gene dell'ormone della crescita bovino (BGH). Sono presenti l'origine di replicazione batterica (ColE1) ed il gene per la resistenza all'ampicillina (bla) per il mantenimento e la selezione del plasmide in cellule procariotiche. L'origine di replicazione di SV40 consente la replicazione del plasmide nelle cellule eucariotiche mentre il gene per la resistenza alla neomicina ne permette la selezione.

peGFP: contenente il gene eGFP clonato nel sito di policlonaggio del pcDNA3.1+.

pORFK14: contenente l'orf K14 di HHV-8 (codificante la glicoproteina vOX2) clonata nel sito di policlonaggio del pcDNA3.1+.

pORFK14HA3': contenente l'orf K14 di HHV-8 fusa con un epitopo (HA) all'estremità 3' (orf K14-HA3') clonata nel sito di policlonaggio del pcDNA3.1+. L'HA consente di valutare l'espressione della orf K14 a livello di proteina dal momento che non è disponibile in commercio un anticorpo specifico per la glicoproteina.

pcDNA3.1+, peGFP, pORFK14 e pORFK14HA3' erano disponibili nel nostro laboratorio. Per l'amplificazione di questi plasmidi in cellule procariotiche è stato utilizzato il ceppo DH5 $\alpha$  di *Escherichia coli* [F'/endA1 hsdR17 ( $r_k^- m_k^+$ ) glnV44 thi-1 recA1 gyrA (NaI<sup>r</sup>) relA1  $\Delta$  (lacIZYA-argF)U169 deoR ( $\phi$ 80dlac $\Delta$ (lacZ)M15)] (Biolabs).

I batteri sono stati coltivati in forma liquida in terreno Luria-Bertani (LB) [1% (p/v) di Bacto-triptone, 0.5% (p/v) di estratto di lievito, 1% (p/v) di NaCl] in agitazione a 37°C. Quando necessario, il terreno è stato solidificato mediante aggiunta di 1.5% (p/v) di agar. Se richiesto, è stata aggiunta ampicillina alla concentrazione finale di 100  $\mu$ g/ml.

## 5.4 OLIGONUCLEOTIDI

In questo lavoro di tesi è stata utilizzata una serie di *primer* e di sonde fluorogeniche specifiche per real-time RT-PCR le cui sequenze sono riportate in tabella 2.

<i>Primer</i>	Sequenza nucleotidica 5'-3'
K14II°ATG FW	GATAATGGATCCGCCACCATGTCTAGCCTCTTCATTC
BGH REV	TAGAAGGCACAGTCGAGG
TNFa FW	CCCAGGGACCTCTCTCTAATC
TNFa REV	ATGGGCTACAGGCTTGTCCT
Sonda TNFa	6FAM-TGGCCCCAGGCAGTCAGATCATC-TAMRA
IL1b FW	ACAGATGAAGTGCTCCTTCCA
IL1b REV	GTCGGAGATTCGTAGCTGGAT
Sonda IL1b	6FAM-CTCTGCCCTCTGGATGGCGG-TAMRA

IL10 FW	ACGGCGCTGTCATCGATT
IL10 REV	TTGGAGCTTATTAAGGCATTCTTC
Sonda IL10	<i>6FAM</i> -CTTCCCTGTGAAAACAAGAGCAAGGCC- <i>TAMRA</i>
GAPDH FW	GAAGGTGAAGGTCGGAGT
GAPDH REV	GAAGATGGTGATGGGATTTC
Sonda GAPDH	<i>6FAM</i> -CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC- <i>TAMRA</i>
CD200R FW	TGCTTTGTTGCCCTCCTATC
CD200R REV	CCACGGTACGAATCTGAAGG
$\beta$ -actina FW	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA
$\beta$ -actina REV	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG

**Tabella 2** Oligonucleotidi (Invitrogen). Nel *primer* K14II°ATG FW è sottolineata la sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione BamHI, ed è indicato in azzurro l'ATG d'inizio della traduzione. Le sonde fluorogeniche presentano *6FAM* (6-carbossifluoresceina) al 5' e *TAMRA* (tetrametilrodamina) al 3'.

## METODI

### 5.5 CLONAGGIO DELLA ORF K14 ED ORF K14-HA3' NEL VETTORE pRRLsin.PPT.CMV.eGFP

Le orf K14 ed orf K14-HA3' di HHV-8 da clonare nel vettore lentivirale sono state ottenute mediante PCR utilizzando come stampo rispettivamente i plasmidi pORFK14 e pORFK14HA3' (Figura 11). La miscela di reazione conteneva 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M dATP, 100  $\mu$ M dCTP, 100  $\mu$ M dGTP, 100  $\mu$ M dTTP, 2.5 U di AmpliTaq Gold polimerasi (Applied Biosystems), 0.5  $\mu$ M del *primer* K14II°ATG FW e 0.5  $\mu$ M del *primer* BGH RV (Invitrogen), e 6 ng/ $\mu$ l del DNA plasmidico stampo (Figura 11).

L'analisi della sequenza nucleotidica della orf K14 ha evidenziato la presenza di due distinti ATG in *frame* dei quali è il secondo (II°ATG) quello che funziona da codone d'inizio della traduzione [Chung Y.H. et al., 2002]. Il *primer* K14II°ATG FW è stato disegnato in modo da appaiarsi allo stampo a partire dal II°ATG dell'orf K14 e da contenere il sito di restrizione BamHI. Il *primer* BGH RV si appaia immediatamente a valle del sito di policlonaggio del pcDNA3.1+; tale sito contiene al suo interno la sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione XhoI.

Ciascuna reazione di PCR è stata effettuata in un termociclatore (*Master Cycler Personal*; Eppendorf) utilizzando il seguente profilo termico: un ciclo a 95°C per 10

minuti, per attivare la polimerasi, 35 cicli costituiti da 1 minuto a 95°C (fase di denaturazione), 45 secondi a 49°C (fase di appaiamento), 1 minuto a 72°C (fase di elongazione), ed infine un ciclo a 72°C per 7 minuti.

Gli amplificati ottenuti dalle reazioni di PCR sono stati analizzati in gel d'agarosio all'1% (p/v) nel tampone di corsa TBE (TRIS BORATO EDTA; 90 mM Tris base, 90 mM acido borico, 2 mM EDTA pH 8) per verificare che fossero del peso molecolare atteso, utilizzando come marcatore di peso molecolare il Marker VIII (Roche), frammenti 1114/900/692/501/489/404/320/242/190/147/124/110/62 pb.

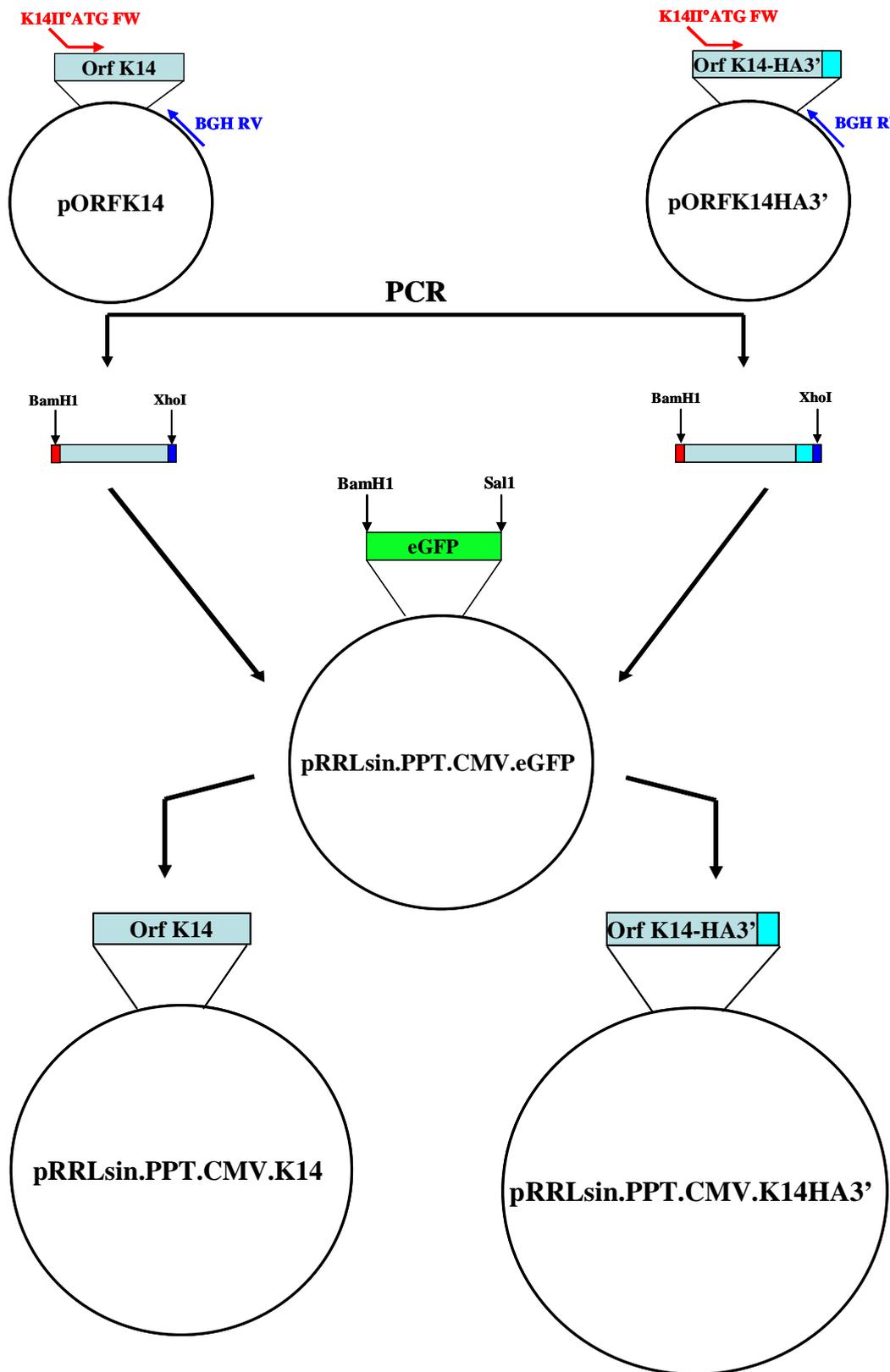
Quindi, sono stati purificati da gel d'agarosio mediante l'impiego di colonne che sfruttano il legame specifico degli acidi nucleici a particelle di silice-gel in presenza di un agente caotropico (*QIAquick Gel Extraction Kit*; Qiagen); la separazione del DNA da sali ed enzimi avviene mediante una serie di eluizioni progressive.

Il DNA è stato poi digerito con gli enzimi di restrizione BamHI e XhoI (Biolabs) per 2 ore a 37°C in un tampone contenente 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 1 mM ditiotreitolo pH 7.9, BSA (*Bovine Serum Albumin*) 100 µg/ml (Biolabs) e, dopo incubazione per 20 minuti a 65°C (per inattivare gli enzimi), è stato nuovamente purificato da gel d'agarosio (Figura 11).

In parallelo, il vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.eGFP è stato digerito con gli enzimi di restrizione BamHI e Sall (Biolabs), nelle stesse condizioni utilizzate per gli inserti prodotti per PCR, al fine di rimuovere il gene reporter eGFP e, quindi, è stato purificato da gel d'agarosio (Figura 11). Il vettore è stato poi defosforilato enzimaticamente dalla fosfatasi alcalina di intestino di vitellino (*CIAP*; Roche), utilizzando 1 Unità (U) di enzima ogni 100 pmoli di DNA, per 30 minuti a 37°C per due volte. La reazione di defosforilazione è stata bloccata aggiungendo 0.5 mM EDTA pH 8 finale e 0.5% (p/v) di SDS finale. La *CIAP* è stata inattivata mediante digestione con proteinasi K 100 µg/ml finale per 30 minuti a 56°C.

Ciascun inserto con estremità BamHI-XhoI è stato clonato nel vettore con estremità BamHI-Sall, sfruttando la compatibilità fra i siti di restrizione Sall ed XhoI (Figura 11). La reazione di ligazione è stata catalizzata dalla DNA ligasi del batteriofago T4 (Biolabs) in un tampone contenente 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 10 mM ditiotreitolo pH 7.5 (Biolabs) per circa 16 ore a 16°C. Si sono ottenuti così i vettori lentivirali pRRLsin.PPT.CMV.K14 e pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3'.

I plasmidi sono stati controllati su gel d'agarosio dopo digestione con opportuni enzimi di restrizione. Inoltre, per verificare che non fossero state introdotte mutazioni casuali dalla DNA polimerasi in PCR e che l'inserimento fosse avvenuto correttamente, sono state eseguite delle PCR di sequenza.



**Figura 11** Clonaggio dell'orf K14 e dell'orf K14-HA3' nel vettore lentivirale.

Rappresentazione schematica del clonaggio dell'orf K14 e dell'orf K14-HA3' (l'HA è indicato in turchese) nel vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.eGFP, con produzione dei vettori pRRLsin.PPT.CMV.K14 e pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3'.

## 5.6 GENERAZIONE DEL VETTORE pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP

Il vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.eGFP è stato digerito con gli enzimi di restrizione BamHI e Sall (Biolabs) al fine di rimuovere il gene reporter eGFP, quindi le estremità coesive generate, fra loro incompatibili, sono state convertite in estremità piatte mediante l'utilizzo della subunità Klenow della DNA polimerasi di *E. coli* (Biolabs) che polimerizza dNTPs sui tratti a singolo filamento rendendo così possibile la rilegazione del vettore. A tale scopo, il DNA è stato incubato con l'enzima aggiungendo ciascun dNTPs 33 μM per 40 minuti a 37°C e, dopo 20 minuti a 75°C (per inattivare l'enzima), è stato purificato da gel d'agarosio. La reazione di ligazione, quindi, ha generato il vettore pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP che è stato utilizzato come controllo negativo in tutti gli esperimenti.

## 5.7 PREPARAZIONE DEL DNA PLASMIDICO

Il DNA plasmidico è stato estratto da cellule batteriche di *E. coli*, ceppo XL1Blue oppure DH5α, rese artificialmente competenti mediante la tecnica del cloruro di calcio e trasformate mediante shock termico con i singoli plasmidi descritti precedentemente (Paragrafo 5.3).

Per ottenere preparazioni plasmidiche ad elevato grado di purezza ed in grande scala (*Maxi Prep*), il DNA plasmidico è stato estratto utilizzando il *Plasmid MAXI Kit* (Qiagen) basato sull'utilizzo di colonne a scambio anionico. Attraverso questo procedimento il DNA plasmidico si lega alla resina della colonna utilizzando tamponi a bassa concentrazione salina, mentre viene purificato da RNA, proteine e impurità ad alto peso molecolare. Il DNA plasmidico viene quindi eluito dalla colonna per mezzo di tamponi ad elevata concentrazione salina. Il plasmide, in seguito, viene concentrato e pulito dai sali mediante precipitazione con isopropanolo e lavaggio con etanolo al 70% (v/v). La concentrazione del DNA ottenuto è stata quantificata mediante lettura della densità ottica allo spettrofotometro.

## 5.8 TECNICHE DI TRASFEZIONE

Elettroporazione: metodo fisico di trasfezione che comporta una permeabilizzazione reversibile delle membrane cellulari grazie all'applicazione di un breve impulso elettrico ad alto voltaggio alle cellule. A tale scopo, le cellule U937 o THP1 ( $5 \times 10^6$ ) sono state incubate con la miscela di trasfezione costituita da 10 μg di pcDNA3.1 + o

peGFP e terreno di coltura RPMI 1640 addizionato del 20% (v/v) di FBS in un volume finale di 500 µl per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo il trasferimento in una cuvetta da 0.2 cm di spessore (Eppendorf), le cellule sono state sottoposte ad un impulso elettrico di voltaggio pari a 0.24 V, regolando l'elettroporatore (*Gene Pulser Transfection Apparatus*; BioRad) ad una capacitanza di 960 µF. Le cellule sono state quindi risospese in 5 ml di terreno RPMI 1640 completo e trasferite in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> (Falcon). Dopo 24 ore, sono stati aggiunti 3ml di terreno di crescita alla coltura cellulare.

Lipofezione: metodo chimico di trasfezione basato sull'incorporazione del DNA in liposomi capaci di fondersi con le membrane cellulari. A tale scopo, 10 µg di pcDNA3.1+ o peGFP sono stati risospesi in 500 µl di RPMI 1640. In parallelo, 20 µl di Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen) sono stati risospesi in 500 µl di RPMI 1640 ed incubati per circa 5 minuti a temperatura ambiente, quindi le due soluzioni sono state mescolate insieme. Dopo 20 minuti di incubazione, la miscela di reazione è stata applicata alle cellule U937 o THP1 (5x10<sup>6</sup>) risospese in 5 ml di terreno RPMI 1640 in fiasche da 25 cm<sup>2</sup> (Falcon). Dopo 5-6 ore di incubazione, le cellule sono state centrifugate 10 minuti a 1200 rpm a temperatura ambiente e risospese in RPMI 1640 completo.

Precipitazione con Calcio-Fosfato: metodo chimico di trasfezione basato sulla precipitazione del DNA sulla superficie cellulare favorita da sali di fosfato di calcio. Per la produzione dei virioni ricombinanti si è proceduto alla cotrasfezione delle cellule 293T con il vettore lentivirale ed i tre costrutti di packaging. A tale scopo, 24 ore prima della trasfezione, le cellule 293T (2x10<sup>6</sup>) sono state seminate in piastre da 100 mm di diametro (Falcon) in terreno DMEM addizionato del 10% (v/v) di FBS senza aggiunta di antibiotici. 10 µg di vettore lentivirale [pRRLsin.PPT.CMV.eGFP oppure pRRLsin.PPT.CMV.K14 oppure pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' oppure pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP], 7 µg di pMDLg/p RRE, 3.5 µg di pVSV-g e 2 µg di pREV sono stati diluiti in 450 µl di TE 1/10 (1 mM Tris-HCl pH 8, 0.1 mM EDTA pH 8), quindi sono stati aggiunti 50 µl di CaCl<sub>2</sub> 2.5 M. La miscela contenente il DNA è stata trasferita in una provetta contenente 500 µl di HPB 2X pH 7.1 (280 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7.1, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) e, dopo 20 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la soluzione con i precipitati di DNA e fosfato di calcio è stata trasferita goccia a goccia sulle cellule. Dopo 7 ore dalla trasfezione, il terreno di coltura è stato aspirato, sono stati effettuati due lavaggi con DMEM e sono stati aggiunti 10 ml di DMEM completo.

Dopo 48 ore dalla cotrasfezione, il sovrinatante cellulare contenente i virioni ricombinanti è stato sottoposto a centrifugazione a 1200 rpm a 4°C per 10 minuti allo

scopo di sedimentare i residui cellulari presenti, quindi è stato filtrato con filtri da 0.45 µm (Millipore) e conservato a -80°C.

## 5.9 TRASDUZIONE CON VIRIONI RICOMBINANTI

Le cellule U937 e THP1 sono state trasdotte con i virioni ricombinanti contenenti il vettore pRRLsin.PPT.CMV.eGFP secondo i seguenti protocolli:

- $4 \times 10^5$  cellule sono state incubate con 500 µl di virioni in presenza di Polibrene (Sigma) alla concentrazione di 8 µg/µl per 24 ore, quindi sono state centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti e risospese in RPMI 1640 completo (**singola trasduzione**);
- Le cellule, risospese nei virioni in presenza del Polibrene, sono state centrifugate per 2 ore a 2500 rpm a 25°C, quindi sono state risospese in RPMI 1640 completo (**spin inoculation**);
- Alternativamente al primo protocollo, le cellule sono state sottoposte ad una seconda trasduzione identica alla prima, quindi, dopo 24 ore sono state centrifugate e risospese in RPMI 1640 completo (**doppia trasduzione**).

Le cellule 293T, dopo 24 ore dalla semina in piastre da 35 mm di diametro (Falcon) ( $3 \times 10^5$ ), sono state incubate con 500 µl di virioni ricombinanti contenenti il vettore pRRLsin.PPT.CMV.eGFP e/o con loro diluizioni scalari in presenza del Polibrene per 24 ore, quindi è stato aggiunto 1 ml di terreno DMEM completo.

Per gli studi sull'orf K14 di HHV-8, le cellule U937 e THP1 sono state sottoposte ad una doppia trasduzione con gli opportuni virioni ricombinanti [pRRLsin.PPT.CMV.K14 oppure pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' oppure pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP], quindi  $1 \times 10^6$  cellule sono state seminate in piastre da 35 mm di diametro (Falcon) in presenza di TPA 50 ng/ml che ne induce l'adesione alla fiasca ed il differenziamento a macrofagi e, dopo 24 ore, sono state lavate con PBS ed è stato aggiunto terreno RPMI 1640 completo. Invece, le colture primarie di macrofagi (Paragrafo 5.2) ( $\sim 1 \times 10^6$  cellule) sono state doppiamente trasdotte dopo 11 giorni dalla semina con 1 ml dei virioni ricombinanti ogni volta [Zeng L. et al., 2006], quindi sono state lavate ed è stato aggiunto il terreno di coltura.

## 5.10 STIMOLAZIONE CON IFN $\gamma$

Allo scopo di indurre un fenotipo attivato nelle linee cellulari monocito-macrofagiche doppiamente trasdotte ed indotte con TPA e nelle colture primarie

doppiamente trasdotte (Paragrafo 5.9), le cellule sono state stimolate mediante trattamento con IFN $\gamma$  300 ng/ml (Invitrogen).

## 5.11 ANALISI CITOFLUORIMETRICA (FACS)

Le cellule U937 e THP1 trasfettate con il peGFP (Paragrafo 5.8) oppure trasdotte con i virioni ricombinanti contenenti il vettore pRRLsin.PPT.CMV.eGFP (Paragrafo 5.9) e le cellule 293T trasdotte con gli stessi virioni (Paragrafo 5.9) sono state raccolte dopo 72 ore, centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti a 4°C, quindi sono state sottoposte a due lavaggi in PBS freddo, risospese in 500  $\mu$ l di PBS ed analizzate al citofluorimetro (FACSCALIBUR; Beckton & Dickinson). La proteina eGFP non richiede la presenza di nessun altro substrato o cofattore poiché assorbe ad una lunghezza d'onda di 395 nm nel visibile ed ha il suo picco massimo d'emissione alla lunghezza d'onda di 508 nm nel canale dell'FL-1 (verde).

Le linee cellulari monocito-macrofagiche e le colture primarie doppiamente trasdotte con i virioni ricombinanti contenenti il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' (Paragrafo 5.9) sono state raccolte a 72 ore dall'ultima trasduzione e dopo due lavaggi in PBS freddo, sono state fissate in paraformaldeide al 2% (p/v) in PBS per 10 minuti a 4°C. Dopo due lavaggi in PBS freddo, le cellule sono state permeabilizzate con una soluzione di PBS, 0.5% (p/v) di BSA (Sigma) e 0.5% (p/v) di saponina (Calbiochem) per 10 minuti a 4°C, quindi sono state nuovamente lavate con PBS freddo due volte ed incubate per un'ora a 4°C con l'anticorpo monoclonale anti-HA (Covance) diluito 1:100 in PBS, 0.5% (p/v) di BSA (Sigma). A questo punto sono stati effettuati due lavaggi in PBS freddo, quindi le cellule sono state incubate per un'ora a 4°C con un anticorpo secondario diretto verso le immunoglobuline di topo coniugato con isotiocianato di fluoresceina (FITC) (Santa Cruz) diluito 1:100 in PBS e 0.5% (p/v) di BSA (Sigma). Dopo due lavaggi in PBS freddo, le cellule sono state risospese in 500  $\mu$ l di PBS ed analizzate al citofluorimetro. Il FITC assorbe ad una lunghezza d'onda di 488 nel visibile ed ha il suo picco massimo d'emissione alla lunghezza d'onda di 530 nel canale dell'FL-1 (verde).

Allo scopo di verificare il livello di purezza della preparazione dei macrofagi primari, un'aliquota di cellule fissate e permeabilizzate è stata incubata con un anticorpo monoclonale anti-CD14 (Acris Antibodies) diluito 1:100 in PBS e 0.5% (p/v) di BSA (Sigma) per un'ora a 4°C, quindi processata come è già stato descritto ed analizzata al citofluorimetro.

I dati ottenuti dallo strumento sono stati elaborati mediante il programma WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu/>) ed espressi in forma di *Histogram Plot*. Il marker (M1) definisce la percentuale di cellule positive rispetto al controllo (cellule trasfettate con

pcDNA3.1+ o trasdotte con i virioni ricombinanti contenenti il vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP).

Dalla percentuale di cellule 293T positive per il gene reporter eGFP si può risalire al titolo della sospensione virale corrispondente applicando la seguente formula:

$$\text{UNITA' TRASDUCENTI/ML} = (\% \text{ cell. positive} \times n^\circ \text{ cell. infettate} \times \text{fattore di diluizione}) / \text{volume infezione (ml)}$$

Allo scopo di utilizzare circa la medesima quantità di virioni ricombinanti in tutti gli esperimenti di trasduzione delle U937 e THP1 e delle colture primarie di macrofagi, si è scelto di conservare solo le preparazioni virali aventi un titolo intorno a  $3-4 \times 10^9$  unità trasducenti/ml.

## 5.12 ELETTROFORESI SU GEL DI PROTEINE E WESTERN BLOTTING

Le U937 e THP1 doppiamente trasdotte con i virioni ricombinanti contenenti il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' ed indotte con TPA (Paragrafo 5.9) sono state raccolte dopo 72 ore dall'ultima trasduzione, lavate due volte con PBS freddo e lisate mediante risospensione in RIPA [0.15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1% (v/v) di Nonidet P-40 (Sigma), 0.5% (p/v) di sodio desossicolato (BioRad), 0.1% (p/v) di SDS (BioRad)], addizionato di una miscela di inibitori delle proteasi (*Protease inhibitor cocktail tablets*; Roche), per 20 minuti a 4°C. In seguito a centrifugazione a 14000 rpm a 4°C per 20 minuti, il sovranatante (**frazione proteica totale**) è stato diluito 1:2 con il tampone di caricamento LB (*Laemmli Buffer*) 2X [0.125 M Tris-HCl pH 6.8, 2% (p/v) di SDS (BioRad), 11% (p/v) di glicerolo (Sigma), 0.01% (p/v) di blu di bromofenolo (Sigma), 20% (v/v) di β-mercaptoetanololo (Sigma)] mentre il sedimento (**frazione proteica di membrana**) è stato risospeso nello stesso tampone e fatto bollire per 20 minuti.

I campioni sono stati incubati a 100°C per 5 minuti, quindi sono stati caricati in gel di poliacrilammide utilizzando il marcatore di peso molecolare Rainbow (Amersham), proteine 220/97/66/45/30/20.1/14.3 kDa. La migrazione elettroforetica è stata condotta in apparato mini-Protean II (Biorad) contenente il tampone di corsa [25 mM Tris base (Biorad), 192 mM glicina (Biorad), 3 mM SDS (Biorad)] ad un voltaggio costante di 70 V per il gel d'impacchettamento [5% (p/v) della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v) (Biorad), 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% (p/v) di SDS (Biorad), 1% (p/v) di ammonio persolfato (APS) (Biorad), 1% (v/v) di TEMED (Biorad)] e di 90 V per il gel di corsa [8% (p/v) della soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (p/v) (Biorad), 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 1% (p/v) di SDS (Biorad), 1% (p/v) di ammonio persolfato (APS) (Biorad), 0.6% (v/v) di TEMED (Biorad)].

Al termine della corsa, le proteine separate sul gel di poliacrilammide sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (*Hybond-C Extra*; Amersham) mediante una cella mini-Protean II (Biorad) contenente il tampone di trasferimento [25 mM Tris base (Biorad), 192 mM glicina (Biorad), 0.03% (p/v) di SDS (Biorad), 20% (v/v) di metanolo] ad un amperaggio costante di 350 mA per un'ora a 4°C.

Quindi, la membrana è stata incubata in una soluzione bloccante costituita da TBS (10 mM Tris-HCl pH 8, 150 mM NaCl) addizionato dello 0.2% (v/v) di Tween 20 (Sigma) (TBST) e del 5% (p/v) di latte scremato in polvere per un'ora a temperatura ambiente in agitazione in modo da saturare eventuali siti di legame aspecifici.

In seguito, la membrana è stata incubata *overnight* a 4°C in agitazione con l'anticorpo monoclonale anti-HA (Covance) diluito 1:1000 nella soluzione di bloccaggio, poi sono stati eseguiti tre lavaggi da 2 minuti e tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con TBST. A questo punto, è stata eseguita un'incubazione di un'ora a temperatura ambiente in agitazione con un anticorpo secondario diretto verso le immunoglobuline di topo coniugato alla perossidasi (*Horse-Radish Peroxidase*; Chemicon) diluito 1:5000 nella soluzione di bloccaggio. Dopo tre lavaggi da 2 minuti e tre lavaggi da 10 minuti ciascuno con TBST, sono stati eseguiti altri tre lavaggi da 5 minuti ciascuno con TBS, quindi la membrana è stata incubata per 5 minuti con una soluzione contenente il substrato per la reazione fotoluminescente della perossidasi (*ECL Plus Western Blotting Detection System*; Amersham) con cui sono state impressionate le lastre fotografiche (*Biomax Light Film*; Kodak) sovrapponendole alla membrana. Le lastre sono state esposte alla membrana per un tempo variabile tra 2 minuti e 20 minuti e successivamente sviluppate.

### **5.13 IMMUNOFLUORESCENZA INDIRETTA**

In tal caso, i macrofagi primari doppiamente trasdotti con i virioni ricombinanti contenenti il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' (Paragrafo 5.9) sono stati originariamente seminati su vetrini pretrattati con poli D-lisina (Sigma) 1 mg/ml per due ore a temperatura ambiente. In questo modo viene favorito l'attacco delle cellule alla superficie del vetrino. 72 ore dopo l'ultima trasduzione, le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 2% (p/v) in PBS per 20 minuti a temperatura ambiente, quindi sono state permeabilizzate in PBS addizionato dello 0.1% (v/v) di Triton X-100 (Sigma) per 30 minuti a temperatura ambiente. A questo punto, è stata eseguita un'incubazione con una soluzione bloccante di PBS addizionato dell'1% (p/v) di BSA (Sigma) per 30 minuti a temperatura ambiente. Quindi, i vetrini sono stati incubati con l'anticorpo monoclonale anti-HA (Covance) diluito 1:100 nella soluzione di bloccaggio per un'ora e mezza a temperatura ambiente, lavati 2-3 volte

con PBS ed incubati con l'appropriato anticorpo secondario coniugato con FITC diluito 1:100 nella soluzione bloccante per un'ora a temperatura ambiente. Dopo 2-3 lavaggi in PBS, i vetrini sono stati incubati con 0.2 mg/ml di ioduro di propidio (PI) (Sigma) in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente. PI è un intercalante fluorescente del DNA che assorbe ad una lunghezza d'onda di 488 nm nel visibile ed ha il suo picco massimo d'emissione alla lunghezza d'onda di 625 nm (rosso). Dopo 2-3 lavaggi in PBS e 2-3 lavaggi in acqua per rimuovere i cristalli del PBS, i vetrini sono stati montati ed analizzati al microscopio confocale a scansione laser (Leica).

## 5.14 ESTRAZIONE DELL'RNA TOTALE

Dopo 72 ore dalla doppia trasduzione con i virioni ricombinanti contenenti il vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.K14 o pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP (Paragrafo 5.9), l'RNA totale è stato estratto dalle linee cellulari monocito-macrofagiche e dalle colture primarie non stimolate o stimolate con IFN $\gamma$  (Paragrafo 5.10) mediante l'utilizzo di colonne ad alta affinità costituite da un gel di silice (*RNeasy Mini Kit*; Qiagen). Queste colonne consentono di purificare gli RNA di lunghezza superiore a 200 basi direttamente da un lisato cellulare. La procedura sperimentale ha previsto la lisi delle cellule in presenza di un tampone altamente denaturante contenente guanidina isotiocianato, che inattiva le RNAsi cellulari, e  $\beta$ -mercaptoetanololo (Sigma), in grado di ridurre i ponti disolfuro. Dopo l'aggiunta di etanolo al 70% (v/v), il lisato cellulare è stato trasferito in colonna quindi è stato centrifugato a 13000 rpm per 15 secondi. L'eluato è stato eliminato e la colonna è stata sottoposta a lavaggi con opportuni tamponi, necessari per rendere il legame dell'RNA alla colonna più restrittivo. Infine, l'RNA è stato eluito in 30  $\mu$ l di acqua addizionata con dietilpirocarbonato (DEPC), un inibitore delle RNAsi cellulari. L'RNA totale estratto è stato incubato a 37°C per 45 minuti con 30 U di DNAsi RNAsi *free* (Roche) in presenza di MgCl<sub>2</sub> 7 mM in modo da digerire l'eventuale DNA genomico cellulare rimasto nell'eluato, quindi è stata effettuata un'incubazione a 94°C per 10 minuti per inattivare la DNasi seguita da 2 minuti in ghiaccio. L'RNA totale, dopo essere stato quantificato mediante lettura della densità ottica allo spettrofotometro (NanoDrop ND-1000) e valutato qualitativamente per essere certi che non fosse stato degradato nella fase di estrazione (*RNA 6000 Nano LabChip® Kit e 2100 Bioanalyzer*; Agilent), è stato conservato a -80°C.

## 5.15 REAL-TIME RT-PCR ed RT-PCR

La retrotrascrizione dell'RNA estratto è stata effettuata utilizzando la trascrittasi inversa (RT) del Virus della Leucemia Murina di Moloney (MULV) in grado di retrotrascrivere l'RNA in DNA in presenza di ioni magnesio. Sono stati utilizzati dei *random primer* (esameri in sequenza casuale) come innesco per la retrotrascrizione. La reazione ha previsto l'impiego di 1.5 µg di RNA totale estratto, di un tampone di reazione (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl), di MgCl<sub>2</sub> 5.5 mM, di una miscela contenente i quattro dNTPs 2 mM, di *random primer* 2.5 µM, di 20 U di RNAsin e di 125 U della RT di MULV (Applied Biosystems). Il volume totale della reazione è stato portato a 50 µl aggiungendo acqua DEPC. La reazione di retrotrascrizione è stata effettuata nel termociclatore (*Master Cycler Personal*; Eppendorf) utilizzando il seguente programma: 25°C per 10 minuti (fase di appaiamento), 42°C per 50 minuti (fase di allungamento) e 95°C per 5 minuti (fase di inattivazione).

Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione è stato sottoposto a PCR qualitativa o quantitativa in Real-Time.

Le reazioni di Real-Time per valutare il livello trascrizionale dei geni del TNF $\alpha$ , dell'IL-1 $\beta$  e dell'IL-10 sono state eseguite secondo il principio "*Taq-man*" utilizzando specifiche coppie di *primer* e sonde fluorogeniche (Tabella 2). A tale scopo 5 µl di cDNA sono stati mescolati con 12.5 µl di una Mastermix Universale per "*Taq-Man*" 2X (Applied Biosystems), con ciascun *primer* specifico FW e REV 0.3 µM (Invitrogen) e con la sonda fluorogenica specifica 0.2 µM (Invitrogen), quindi il volume è stato portato a 25 µl mediante aggiunta di acqua. Le reazioni di amplificazione sono state effettuate nell'apposito termociclatore (*ABI PRISM 7700*; Applied Biosystems) secondo il seguente profilo termico: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti (per attivare la polimerasi), seguiti da 45 cicli costituiti da 15 secondi a 95°C (fase di denaturazione) ed 1 minuto a 60°C (fase di appaiamento). A causa della possibile variabilità associata alla fase di estrazione dell'RNA dalle cellule, è stata eseguita una reazione "*Taq-Man*" per il gene *housekeeping* della gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi (GAPDH) che è espresso in modo costitutivo nell'ambito di uno stesso tipo cellulare. Le sequenze dei *primer* FW e REV e della sonda fluorogenica per il GAPDH sono quelle fornite dall'Applied Biosystems (Tabella 2). La quantificazione relativa degli RNA messaggeri (mRNAs) di ciascun gene esaminato nei campioni, normalizzata rispetto al gene del GAPDH, è espressa come *fold change* calcolato relativamente al controllo con la seguente formula:

$$\frac{2^{-(\text{Ct gene considerato} - \text{Ct GAPDH}) \text{ A} - \text{Ct gene considerato B}}}{2^{-(\text{Ct gene considerato} - \text{Ct GAPDH}) \text{ B} - \text{Ct gene considerato B}}}$$

Ct (ciclo soglia)

A (campione trasdotto con pRRLsin.PPT.CMV.K14)

B (controllo trasdotto con pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP)

Per verificare l'espressione del recettore CD200R, è stata eseguita una PCR diretta utilizzando una coppia di *primer* specifici (Tabella 2). In questo caso come gene *housekeeping* è stato amplificato il gene della β-actina utilizzando i *primer* corrispondenti (Tabella 2). Per ogni campione è stata preparata una miscela contenente 5 µl di cDNA, 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 µM dATP, 100 µM dCTP, 100 µM dGTP, 100 µM dTTP, 2.5 U di AmpliTaq Gold polimerasi (Applied Biosystems), 0.5 µM di ciascun *primer* specifico FW e REV ed acqua DEPC fino ad un volume di 50 µl. La reazione di amplificazione è stata effettuata nell'apposito termociclatore (*Master Cycler Personal*; Eppendorf) utilizzando il seguente profilo termico: un ciclo a 95°C per 10 minuti, per attivare la polimerasi, 40 cicli costituiti da 1 minuto a 95°C (fase di denaturazione), 45 secondi a 60°C (fase di appaiamento), 1 minuto a 72°C (fase di elongazione), ed infine un ciclo a 72°C per 7 minuti. I frammenti ottenuti sono stati analizzati in gel d'agarosio al 2% (p/v) nel tampone di corsa TBE per verificare che fossero delle dimensioni attese, utilizzando il marcatore di peso molecolare Marker VIII (Roche).

In parallelo, il livello d'espressione del gene del CD200R è stato valutato quantitativamente mettendo a punto una PCR in Real-Time basata sul sistema rilevatore SYBR<sup>®</sup> Green I dye, un'intercalante fluorescente del DNA a doppio filamento. A tale scopo 5 µl di cDNA di ogni campione sono stati mescolati con 12,5 µl di una Power SYBR<sup>®</sup> Green PCR MasterMix 2X (Applied Biosystems) e con ciascun *primer* specifico FW e REV 0.5 µM (Invitrogen) ed il volume è stato portato a 25 µl mediante aggiunta di acqua. Le reazioni di amplificazione sono state effettuate nell'apposito termociclatore (*ABI PRISM 7700*; Applied Biosystems) secondo il seguente profilo termico: 50°C per 2 minuti, 95°C per 10 minuti (per attivare la polimerasi), seguiti da 40 cicli costituiti da 15 secondi a 95°C (fase di denaturazione) ed 1 minuto a 60°C (fase di appaiamento).

La specificità dell'amplificazione è stata valutata mediante analisi delle curve di *melting* al termine della corsa di Real-Time PCR. La curva di *melting* è stata ottenuta svolgendo un singolo ciclo: 95°C per 2 minuti, 60°C per 20 secondi, 95 °C per 2

minuti, facendo aumentare lentamente la temperatura da 60°C a 95°C e raccogliendo continuamente i dati di fluorescenza.

La quantificazione relativa dell'mRNA del CD200R nei campioni, normalizzata rispetto al gene della  $\beta$ -actina, è espressa come *fold change* calcolato relativamente al controllo con la seguente formula:

$$\frac{2^{-(\text{Ct gene considerato} - \text{Ct } \beta\text{-actina}) \text{ A} - \text{Ct gene considerato B}}}{2^{-(\text{Ct gene considerato} - \text{Ct } \beta\text{-actina}) \text{ B} - \text{Ct gene considerato B}}}$$

Ct (ciclo soglia)

A (campione trasdotto con pRRLsin.PPT.CMV.K14)

B (controllo trasdotto con pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP)

## 5.16 ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

I sovranatanti delle U937, delle THP1 e dei macrofagi primari doppiamente trasdotti con i virioni ricombinanti pRRLsin.PPT.CMV.K14 o pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP (Paragrafo 5.9), non stimolati o stimolati con IFN $\gamma$  (Paragrafo 5.10) sono stati raccolti dopo 72 ore dall'ultima trasduzione, centrifugati a 1200 rpm per 10 minuti a 4°C, filtrati con filtri da 0.22  $\mu$ m (Millipore) e sottoposti ad ELISA per il dosaggio del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$ . A tale scopo sono state utilizzate delle piastre contenenti 96 pozzetti (*MaxiSorp*; NUNC) e delle coppie di anticorpi (un anticorpo monoclonale di cattura (**coating antibody**) ed un anticorpo policlonale di rilevazione coniugato alla biotina (**detection antibody**)) specifiche per ciascuna citochina (*Human TNF $\alpha$  Cytoset<sup>TM</sup>* e *Human IL-1 $\beta$  Cytoset<sup>TM</sup>*; Biosource). Dopo un'incubazione *overnight* a 4°C con 100  $\mu$ l per pozzetto dell'anticorpo di cattura diluito in PBS secondo le indicazioni del produttore, le piastre sono state lavate con una soluzione di lavaggio contenente 120 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 650 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O, 1 mM EDTA e 0.002% (v/v) di Tween 20 (Sigma), quindi sono state incubate con 300  $\mu$ l per pozzetto di una soluzione bloccante costituita da PBS addizionato dello 0.5% (p/v) di BSA (Sigma) e dello 0.1% (v/v) di Tween 20 (Sigma) per un'ora a temperatura ambiente in agitazione. A questo punto la soluzione di bloccaggio è stata rimossa e sono stati dispensati per pozzetto 100  $\mu$ l di ciascun sovranatante raccolto o di diluizioni scalari di fattore due dello standard specifico a concentrazione nota. Sia i campioni che gli standard sono stati caricati in doppio. Immediatamente sono stati aggiunti 50  $\mu$ l per pozzetto dell'anticorpo di rilevazione diluito nella soluzione di bloccaggio secondo le indicazioni del produttore e la piastra è stata incubata per circa 2 ore a temperatura ambiente in agitazione. Dopo 5 lavaggi nella corrispondente soluzione, sono stati

dispensati 100 µl per pozzetto di streptavidina coniugata alla perossidasi diluita nella soluzione di bloccaggio secondo le indicazioni del produttore e la piastra è stata incubata per 30 minuti a temperatura ambiente in agitazione. Quindi sono stati effettuati 5 lavaggi, sono stati aggiunti 100 µl per pozzetto del substrato cromogeno TMB (Biosource) e la piastra è stata rimessa in agitazione. Prima di 30 minuti la reazione di colorazione è stata bloccata aggiungendo una soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.8 N. A questo punto è stata misurata allo spettrofotometro l'assorbanza dei campioni alla lunghezza d'onda di 450 nm. La concentrazione assoluta di ogni citochina è stata calcolata sulla base dei valori d'assorbanza misurati per le diluizioni scalari a concentrazione nota dello standard corrispondente.

## **5.17 ESPERIMENTO DI COCOLTURA**

Le cellule THP1, doppiamente trasdotte con i virioni ricombinanti esprimenti l'orf K14 di HHV-8 (pRRLsin.PPT.CMV.K14) ed indotte con il TPA (Paragrafo 5.9), dopo 72 ore dall'ultima trasduzione sono state lavate due volte con PBS quindi sono state incubate per due ore a 37°C con Brefeldina A (Sigma) 10 µg/ml in terreno RPMI 1640 completo. Questo trattamento serve ad inibire i processi di secrezione cellulare. In parallelo, i macrofagi primari ad 11 giorni dalla semina, che all'occorrenza erano stati attivati mediante stimolazione con IFN $\gamma$  (Paragrafo 5.10) 24 ore prima, sono stati raccolti. Quindi, le cellule THP1 sono state lavate due volte con PBS e sono state incubate con circa un ugual numero di macrofagi primari nel loro terreno di coltura a 37°C in ambiente umidificato al 5% (v/v) di CO<sub>2</sub>. I sovranatanti delle coculture sono stati raccolti dopo 30 minuti, 3 ore, 5 ore, 8 ore, 21 ore e sono stati processati per essere sottoposti ad ELISA per il dosaggio del TNF $\alpha$  (Paragrafo 5.15). Come controllo sono state utilizzate cellule THP1 trasdotte con virioni ricombinanti contenenti il vettore pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP.

## **5.18 SAGGIO DI FAGOCITOSI**

La capacità dei macrofagi di internalizzare batteri (fagocitosi), è stata valutata sia con un metodo indiretto che con un metodo diretto, sia in condizioni basali che di attivazione mediante stimolazione con IFN $\gamma$  (Paragrafo 5.10).

Metodo indiretto: basato sulla titolazione del sovranatante cellulare dopo incubazione dei macrofagi primari doppiamente trasdotti (Paragrafo 5.9) con una sospensione

batterica. A tale scopo, i batteri DH5 $\alpha$  sono stati coltivati *overnight* in terreno LB a 37°C, quindi sono stati centrifugati a 5000 rpm per 15 minuti e risospesi nel terreno completo dei macrofagi in un volume tale da avere circa 8x10<sup>7</sup> CFU/ml di batteri. I macrofagi, a 72 ore dall'ultima trasduzione, sono stati incubati per 30 minuti a 37°C con 1 ml della sospensione batterica, quindi sono stati prelevati 100  $\mu$ l del sovrantante che, insieme a opportune diluizioni seriali, sono stati seminati su piastre di terreno LB agar e coltivati *overnight* a 37°C. Il numero di colonie ottenute rappresenta il titolo dei batteri extracellulari ed è inversamente proporzionale all'attività fagocitica cellulare.

Metodo diretto: basato sull'analisi citofluorimetrica della fluorescenza emessa da macrofagi primari doppiamente trasdotti (Paragrafo 5.9) dopo incubazione con batteri marcati con 6 carbossi-fluoresceina diacetato (CFDA). La CFDA assorbe ad una lunghezza d'onda di 492 nm nel visibile ed ha il suo picco massimo d'emissione alla lunghezza d'onda di 519 nm nel canale dell'FL-1 (verde). A tale scopo, i batteri DH5 $\alpha$  sono stati coltivati *overnight* in terreno LB a 37°C in agitazione, quindi sono stati lavati due volte con PBS e risospesi in PBS in modo che la densità ottica della sospensione batterica (OD) misurata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 600 nm fosse uguale a 0.5. I batteri sono stati marcati con la CFDA 100  $\mu$ M (Sigma) per un'ora a 37°C in agitazione, poi sono stati lavati due volte con PBS e risospesi in PBS. I macrofagi sono stati lavati con terreno RPMI 1640 e sono stati incubati con i batteri diluiti in rapporto 1:2 (v/v) in terreno RPMI 1640 per 30 minuti a 37°C in ambiente umidificato al 5% (v/v) di CO<sub>2</sub>. Infine, dopo due lavaggi in PBS per rimuovere i batteri che non erano stati fagocitati, i macrofagi sono stati raccolti ed analizzati al FACS (Paragrafo 5.11). Come controllo sono stati utilizzati dei macrofagi primari incubati con batteri non marcati.

## 5.19 IMMUNOFENOTIPIZZAZIONE

Allo scopo di valutare l'espressione di alcuni marcatori cellulari di superficie (HLA) implicati nelle risposte immunitarie adattative specifiche, è stata eseguita un'analisi citofluorimetrica utilizzando degli anticorpi gentilmente forniti dal Prof. T. Mertens (Università di Ulm, Germania).

Circa 1x10<sup>5</sup> macrofagi primari doppiamente trasdotti (Paragrafo 5.9), non stimolati o stimolati con IFN $\gamma$  (Paragrafo 5.10), sono stati raccolti a 72 ore dall'ultima trasduzione e, dopo due lavaggi in PBS, sono stati incubati per un'ora a 4°C con uno dei seguenti anticorpi monoclonali:

- anti-*human* HLA-A, B, C (HLA di classe I), diluito 1:50 in PBS;

- anti-*human* HLA-DP, DQ, DR (HLA di classe II), diluito 1:50 in PBS.

Le cellule sono state lavate due volte con PBS, quindi sono state incubate per un'ora a 4°C con l'anticorpo secondario diretto verso le immunoglobuline di topo coniugato con FITC (Santa Cruz) diluito 1:100 in PBS. Infine sono state lavate due volte con PBS, risospese in PBS ed analizzate al FACS nel canale dell'FL-1 (verde).

Per l'elaborazione dei dati e la rappresentazione dei risultati si è proceduto come già descritto nel Paragrafo 5.11.

## 5.20 MICROARRAY DI DNA

Per valutare il profilo d'espressione genica dei macrofagi primari doppiamente trasdotti con i virioni ricombinanti esprimenti l'orf K14 di HHV-8 rispetto al controllo (pRRLsin.PPT.CMV.K14 contro pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP) (Paragrafo 5.9), non stimolati o stimolati con IFN $\gamma$  (Paragrafo 5.10), sono stati eseguiti dei microarray di DNA utilizzando opportuni vetrini contenenti 21.329 oligonucleotidi depositati (*Set oligo uomo*; Cribi). Innanzitutto, partendo da circa 1  $\mu$ g di RNA totale estratto dalle cellule a 72 ore dall'ultima trasduzione (Paragrafo 5.14), sono stati amplificati gli mRNAs attraverso una prima fase di retrotrascrizione nei corrispondenti cDNAs a doppio filamento ed una seconda fase di trascrizione *in vitro* utilizzando il *SuperScript<sup>TM</sup> Indirect RNA Amplification System* (Invitrogen) secondo le indicazioni del produttore. Quindi, dopo essere stato quantificato e valutato qualitativamente (Paragrafo 5.14), l'RNA amplificato (aRNA) (5  $\mu$ g) è stato marcato con i coloranti fluorescenti Cy3 o Cy5 (*CyDye Post-Labeling Reactive Dye Pack*; Amersham) risospesi in DMSO per 2 ore a temperatura ambiente secondo il seguente schema che ha previsto l'inversione dei fluorofori (Replica tecnica):

controllo ΔeGFP	Cy3	
campione K14	Cy5	
controllo ΔeGFP	Cy5	} Inversione dei fluorofori ( <i>dye swap</i> ) Replica tecnica
campione K14	Cy3	

Cy3 emette alla lunghezza d'onda di 532 nm (verde) mentre Cy5 alla lunghezza d'onda di 635 nm (rosso). Dopo aver valutato allo spettrofotometro (NanoDrop ND-1000) l'efficienza di incorporazione dei fluorofori (pmoli/ $\mu$ l di aRNA marcato), ciascun campione è stato messo a precipitare con un'uguale quantità del suo corrispondente controllo a -20°C *overnight* aggiungendo 0.8 volumi di sodio acetato

0.3 M e 2.5 volumi di etanolo assoluto. Quindi, dopo centrifugazione a 15000 rpm per 10 minuti a 4°C e due successivi lavaggi in etanolo al 70% (v/v), gli aRNA marcati sono stati risospesi nel tampone di ibridazione [30 µl di SSC 20X (3 M NaCl, 0.3 M sodio citrato pH 7.2), 30µl di formamide, 1.2 µl di SDS 10% (p/v), 1.2 µl di BSA 1% (p/v), 57.6 µl di acqua DEPC] e sono stati ibridati sul vetrino utilizzando l'ibridatore automatico (*HS400Pro*; Tecan). Le immagini sono state ottenute tramite lo scanner GenePix 4000B ed i dati numerici sono stati generati con il software GenePix Pro 6.0 e successivamente analizzati con il software Acuity 4.0 (Axon Instruments). I risultati sono espressi come  $\log_2$  (campione/controllo).



## 6. RISULTATI

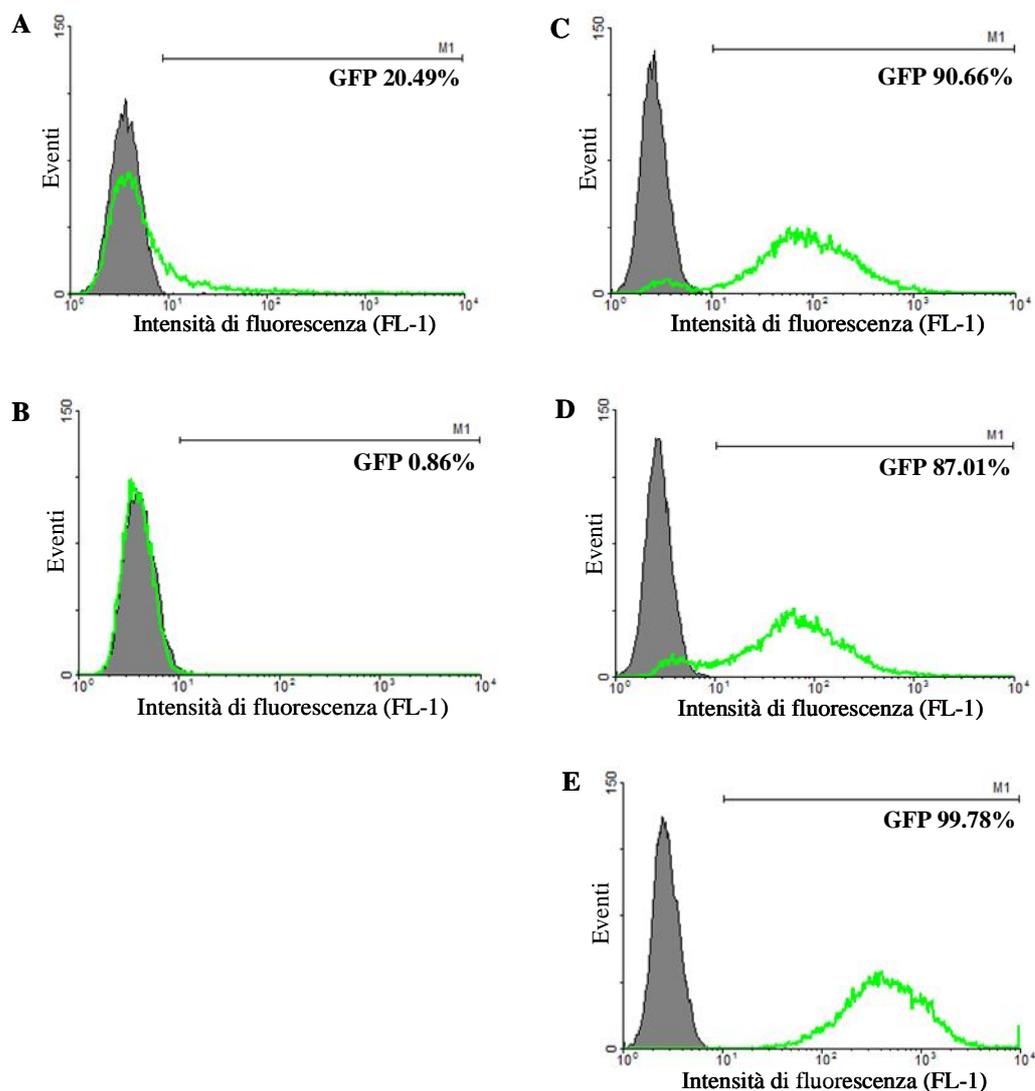
### 6.1 VALUTAZIONE DELL'EFFICIENZA DI TRASFERIMENTO GENICO NELLE CELLULE MONOCITO-MACROFAGICHE

Inizialmente è stata valutata l'efficienza di trasferimento genico nelle cellule monocito-macrofagiche utilizzando come modello le linee cellulari U937 e THP1. A tale scopo sono stati messi a confronto un metodo fisico (elettroporazione), un metodo chimico (lipofezione) ed un metodo biologico (trasduzione con un vettore virale); quest'ultimo sfrutta la capacità intrinseca dei virus di veicolare materiale genetico all'interno della cellula durante il ciclo replicativo.

Nei primi due casi, si è proceduto a trasfettare le cellule U937 e THP1 con un plasmide contenente il gene *reporter* eGFP (peGFP). Dopo 72 ore è stata effettuata l'analisi citofluorimetrica misurando l'intensità di fluorescenza nel canale dell'FL-1 (verde) in cui la proteina eGFP ha il suo picco d'emissione (508 nm) (Figura 12 A e B; Figura 13 A e B). Come controllo negativo sono state utilizzate cellule trasfettate con il plasmide pcDNA3.1+.

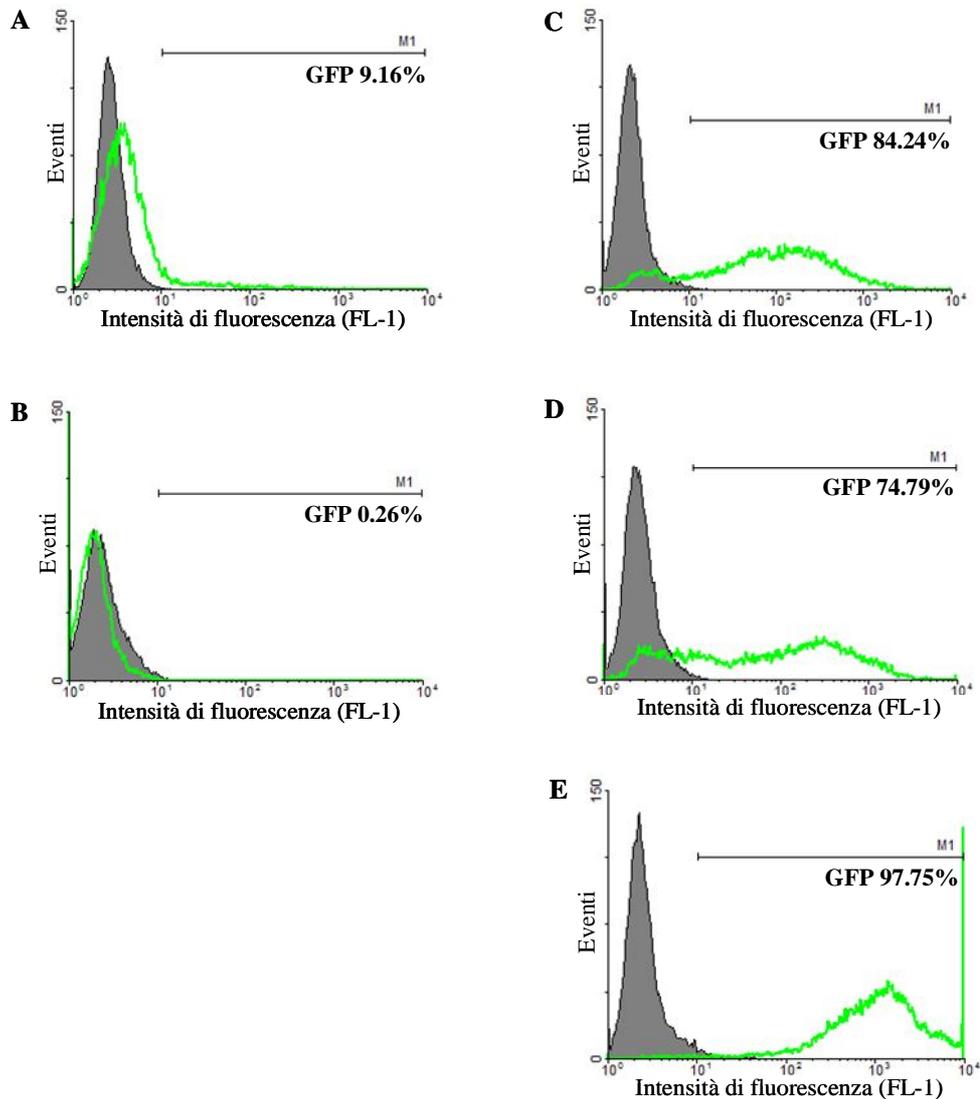
Per quanto riguarda il metodo biologico, è stato utilizzato un vettore lentivirale di terza generazione basato su HIV-1; le cellule U937 e THP1 sono state trasdotte con i virioni ricombinanti prodotti dalla cotrasfezione di cellule 293T con i costrutti di *packaging* (pMDLg/p RRE, pVSV-g e pREV), che forniscono in *trans* le proteine strutturali e gli enzimi coinvolti nella formazione della particella infettiva, e con il vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.eGFP, da cui viene trascritto l'RNA genomico che viene poi incapsidato nei virioni [Zufferey R. *et al.*, 1998]. Nella cellula trasdotta, l'RNA genomico virale viene retrotrascritto in una molecola di DNA a doppio filamento che si integra nel genoma della cellula stessa (DNA provirale). L'LTR in 5' presenta una delezione nella sequenza U3 e pertanto non è in grado di funzionare da promotore/*enhancer* trascrizionale; l'unico promotore funzionante è il promotore interno IE di HCMV che controlla l'espressione del gene *reporter* eGFP. Anche in questo caso, dopo 72 ore dalla trasduzione, che è stata effettuata seguendo differenti protocolli (singola trasduzione, *spin inoculation*, doppia trasduzione), si è proceduto a misurare al citofluorimetro l'intensità di fluorescenza nel canale dell'FL-1 (Figura 12 C, D ed E; Figura 13 C, D ed E).

In tal caso, come controllo negativo sono state utilizzate cellule trasdotte con i virioni ricombinanti prodotti usando il vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP, derivato dal pRRLsin.PPT.CMV.eGFP per escissione del gene *reporter* eGFP (Paragrafo 5.6).



**Figura 12** Valutazione dell'efficienza di trasferimento genico nelle cellule U937.

Analisi citofluorimetrica di cellule U937 A) trasfettate mediante elettroporazione, B) trasfettate mediante lipofezione, C) sottoposte a singola trasduzione, D) sottoposte a *spin inoculation* ed E) sottoposte a doppia trasduzione. Ciascun *Histogram plot* mostra l'emissione di fluorescenza della popolazione cellulare di controllo (area grigia) e della popolazione trasfettata con il peGFP o trasdotta con i virioni ricombinanti prodotti utilizzando il vettore pRRLsin.PPT.CMV.eGFP (linea verde). Il marker M1 ( $10^1$ - $10^4$ ) definisce la percentuale di cellule positive esprimenti la proteina eGFP nella popolazione totale.



**Figura 13 Valutazione dell'efficienza di trasferimento genico nelle cellule THP1.**

Analisi citofluorimetrica di cellule THP1 A) trasfettate mediante elettroporazione, B) trasfettate mediante lipofezione, C) sottoposte a singola trasduzione, D) sottoposte a *spin inoculation* ed E) sottoposte a doppia trasduzione. Ciascun *Histogram plot* mostra l'emissione di fluorescenza della popolazione cellulare di controllo (area grigia) e della popolazione trasfettata con il peGFP o trasdotta con i virioni ricombinanti prodotti utilizzando il vettore pRRLsin.PPT.CMV.eGFP (linea verde). Il marker M1 ( $10^1$ - $10^4$ ) definisce la percentuale di cellule positive esprimenti la proteina eGFP nella popolazione totale.

I risultati mostrano che l'efficienza di trasferimento genico nelle cellule monocito-macrofagiche è nettamente superiore utilizzando il metodo biologico rispetto a quello fisico o chimico. In particolare, con questo metodo, il 90.66% delle cellule U937 e l'84.24% delle cellule THP1 sono risultate positive per l'espressione della proteina eGFP (singola trasduzione). Inoltre, dall'osservazione delle cellule al microscopio ottico, si osserva che la trasduzione con il vettore lentivirale non determina un effetto di citotossicità rilevante mentre le cellule elettroporate appaiono visibilmente sofferenti (dato non mostrato). Infine, confrontando fra di loro i diversi approcci di trasduzione impiegati, si è potuto constatare che con la doppia trasduzione non solo si ha un incremento della percentuale di cellule positive per l'espressione della proteina eGFP ma si ottiene anche uno spostamento dell'ordine di un logaritmo in base 10 del picco di fluorescenza (da  $\sim 10^2$  a  $\sim 10^3$ ) e questa maggiore intensità di segnale è verosimilmente ascrivibile ad una migliore espressione del gene *reporter*. Pertanto, la doppia trasduzione con il vettore lentivirale si è dimostrata essere il sistema di trasferimento genico migliore per far esprimere la glicoproteina vOX2 di HHV-8 in cellule monocito-macrofagiche al fine di poterne così valutare l'effetto esercitato su questo tipo di cellule.

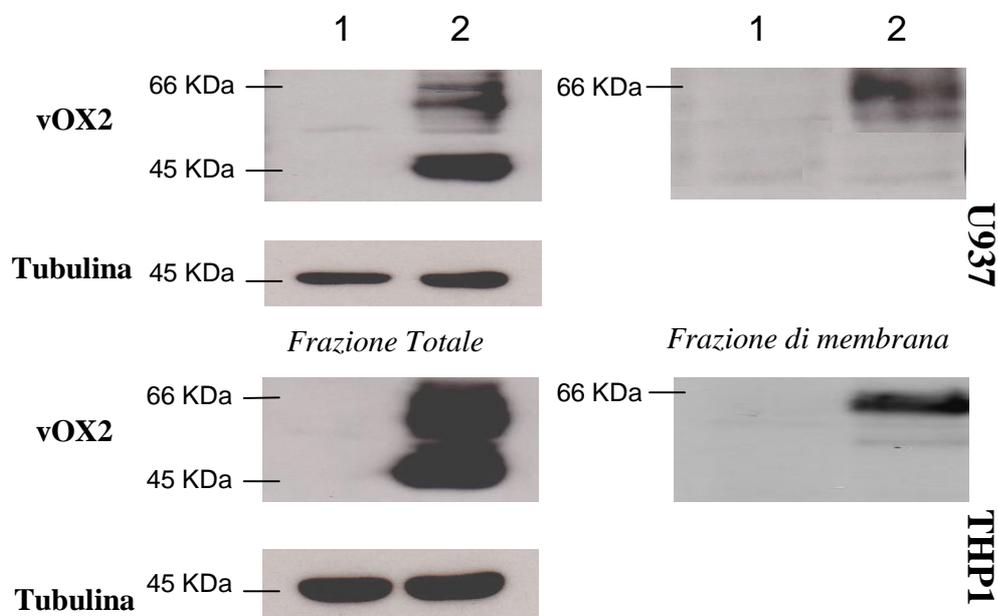
## **6.2 ESPRESSIONE DELLA GLICOPROTEINA vOX2 DI HHV-8 NELLE LINEE CELLULARI MONOCITO-MACROFAGICHE**

Una volta dimostrato che il metodo di trasferimento genico migliore è quello che prevede una doppia trasduzione delle cellule bersaglio, la sequenza dell'orf K14 di HHV-8, codificante la glicoproteina vOX2, è stata clonata nel vettore lentivirale al posto del gene *reporter* eGFP, generando il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14 (Paragrafo 5.5). Per poter valutare l'espressione a livello di proteina, è stato clonato anche un costrutto chimerico contenente l'epitopo HA in posizione 3' rispetto alla sequenza codificante la vOX2, generando il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3'. Le sequenze dell'orf K14 e dell'orf K14HA3' sono state ottenute mediante amplificazione in PCR utilizzando come stampo rispettivamente i plasmidi porfK14 e porfK14HA3' già disponibili in laboratorio. Ciascun vettore ricombinante prodotto è stato controllato mediante reazione di sequenziamento per verificare che non fossero state introdotte mutazioni nella sequenza dell'orf K14 durante il processo di amplificazione in PCR.

A questo punto, le cellule monocito-macrofagiche U937 e THP1 sono state sottoposte a duplice trasduzione con i virioni ricombinanti ottenuti utilizzando il vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' oppure il vettore di controllo

pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP e, quindi, sono state indotte a differenziare a macrofagi mediante trattamento con TPA (50 ng/ml), acquisendo così la tipica morfologia macrofagica; esse, infatti, aderiscono alla fiasca ed esprimono antigeni caratteristici del differenziamento sotto lo stimolo del TPA. Dopo 72 ore dalla seconda trasduzione, l'espressione della glicoproteina erpetica è stata verificata sia mediante Western Blot che attraverso un'analisi citofluorimetrica.

Nel primo caso, le cellule sono state lisate in tamponi appropriati al fine di recuperare la frazione proteica totale e quella insolubile di membrana, quindi l'espressione della vOX2 è stata verificata utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro l'epitopo HA (anti-HA). Entrambe le linee cellulari monocito-macrofagiche esprimono la glicoproteina erpetica; nella frazione totale si può osservare una banda corrispondente alla forma non glicosilata della proteina (~45 kDa) insieme ad altre bande che presumibilmente rappresentano differenti stadi di glicosilazione. Come atteso, nella frazione di membrana è presente principalmente la forma matura di vOX2 (~65 kDa) (Figura 14) [Chung Y.H. *et al.*, 2002].

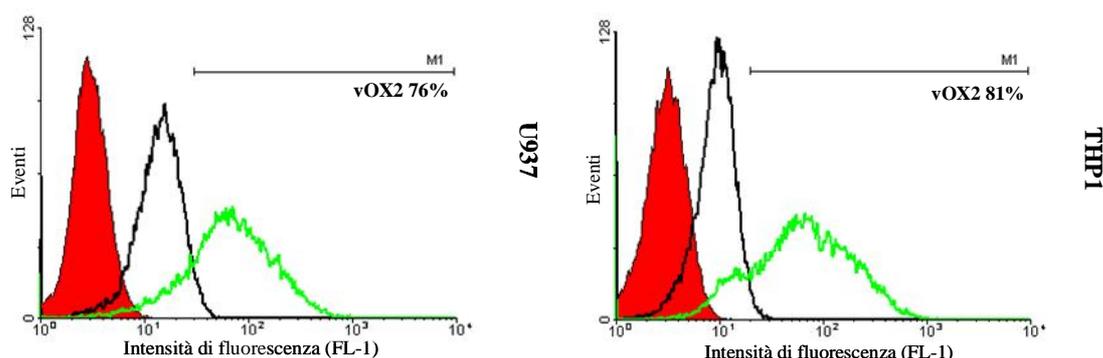


**Figura 14** Valutazione dell'espressione della glicoproteina vOX2 nelle cellule U937 e THP1.

Western Blot sui lisati delle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' utilizzando un anticorpo monoclonale anti-HA ed un'opportuno anticorpo secondario coniugato con la perossidasi, sviluppato attraverso una reazione fotoluminescente (ECL) (*corsia 2*). Lisati di cellule trasdotte con il vettore pRRLsinPPT.CMV.ΔeGFP sono stati utilizzati come controllo negativo (*corsia 1*). In parallelo, è stata valutata la tubulina nella frazione totale come controllo della quantità di proteina caricata.

L'analisi citofluorimetrica ha permesso di valutare il livello d'espressione della vOX2 quantificando in percentuale il numero di cellule positive per la glicoproteina erpetica nella popolazione totale. In questo caso, prima della marcatura con l'anticorpo anti-HA, le cellule sono state fissate e permeabilizzate in quanto l'epitopo è localizzato al C-terminale della glicoproteina che si trova a livello citoplasmatico. Quindi, l'espressione della vOX2 è stata valutata misurando al citofluorimetro l'intensità di fluorescenza nel canale dell'FL-1 in cui il fluoroforo FITC, coniugato all'anticorpo secondario, ha il suo picco d'emissione (530 nm).

Come mostrato in Figura 15, una buona percentuale di cellule risulta essere positiva per la vOX2, rispettivamente un 76% nelle U937 ed un 81% nelle THP1; inoltre, in entrambe le linee cellulari, l'intensità di fluorescenza è decisamente elevata con il picco localizzato in prossimità di  $10^2$ .



**Figura 15 Valutazione dell'espressione della glicoproteina vOX2 nelle cellule U937 e THP1.**

Analisi citofluorimetrica delle cellule trasdotte con il vettore pRRlsin.PPT.CMV.K14HA3' utilizzando un anticorpo monoclonale anti-HA ed un'opportuno anticorpo secondario coniugato con FITC. In ciascun *Histogram plot* la fluorescenza aspecifica è determinata dall'anticorpo secondario (area rossa) mentre il marker M1 definisce la percentuale di cellule esprimenti la vOX2 (linea verde) rispetto al controllo trasdotto con il vettore pRRlsin.PPT.CMV.ΔeGFP (linea nera).

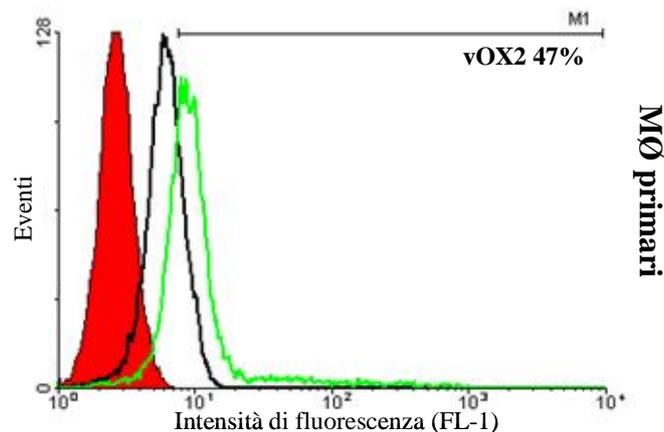
### **6.3 ESPRESSIONE DELLA GLICOPROTEINA vOX2 DI HHV-8 NELLE COLTURE PRIMARIE DI MACROFAGI (MØ)**

Oltre ad utilizzare linee cellulari (U937 e THP1) indotte a differenziare ad un fenotipo macrofagico mediante trattamento con TPA come modello per il nostro studio, sono state trasdotte anche colture primarie di macrofagi derivati dal sangue periferico di donatori sani (MØ). Dai dati in letteratura si evidenzia che l'efficienza di trasferimento genico nei macrofagi primari può essere influenzata dal differenziamento cellulare e/o da altri fattori associati al mantenimento delle cellule

*in vitro* [Zeng L. *et al.*, 2006]. Pertanto, le colture primarie sono state inizialmente trasdotte a due differenti tempi dopo l'isolamento dal sangue periferico (7 ed 11 giorni) e quindi sono state analizzate al citofluorimetro a 72 ore dalla trasduzione per valutare l'espressione del gene *reporter* eGFP; il miglior risultato si è ottenuto con i macrofagi di 11 giorni, in accordo con i dati presenti in letteratura.

Alla luce di questo, trascorsi 11 giorni dall'isolamento, le cellule primarie sono state sottoposte ad una duplice trasduzione con i virioni prodotti utilizzando il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3'. Al fine di verificare l'espressione della vOX2 e quantificare la percentuale di cellule positive per la glicoproteina erpetica nella popolazione totale, a 72 ore dalla seconda trasduzione è stata eseguita un'analisi citofluorimetrica analogamente a quanto è stato fatto con le linee cellulari monocito-macrofagiche.

Circa il 47% dei macrofagi primari è risultato positivo per la vOX2 anche se in questo caso l'intensità di fluorescenza è decisamente più bassa rispetto a quella osservata nelle linee cellulari con il picco localizzato in prossimità di  $10^1$  (Figura 16).

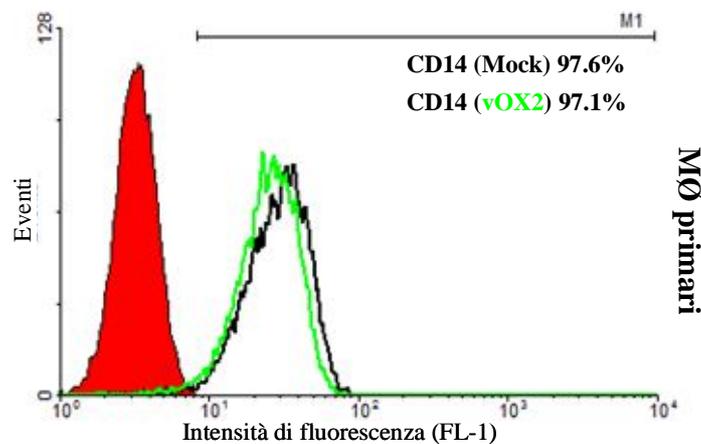


**Figura 16** Valutazione dell'espressione della glicoproteina vOX2 nei macrofagi primari (MØ).

Analisi citofluorimetrica delle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' utilizzando un anticorpo monoclonale anti-HA ed un'opportuno anticorpo secondario coniugato con FITC. Nell'*Histogram plot* la fluorescenza aspecifica è determinata dall'anticorpo secondario (area rossa) mentre il marker M1 definisce la percentuale di cellule esprimenti la vOX2 (linea verde) rispetto al controllo trasdotto con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP (linea nera).

L'allestimento delle colture primarie di macrofagi dal sangue periferico mediante adesione comporta sempre un rischio di contaminazione da parte di altre cellule presenti nel circolo ematico. Pertanto, in parallelo, è stata valutata anche la purezza della preparazione dei macrofagi primari utilizzando un anticorpo monoclonale diretto contro il CD14, un marcatore identificativo di questo tipo cellulare, ed

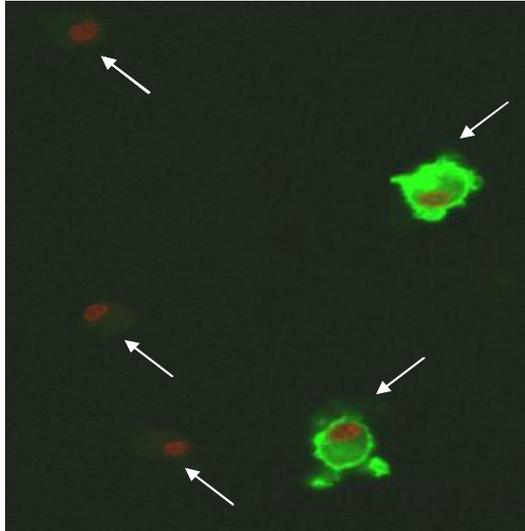
analizzando le cellule al citofluorimetro. Come mostrato in figura 17, la coltura primaria allestita mostra un ottimo livello di purezza dal momento che quasi la totalità delle cellule (97%) risulta essere positiva per il CD14 la cui espressione, fra l'altro, non viene modificata dalla presenza della glicoproteina erpetica.



**Figura 17** Valutazione dell'espressione del marcatore CD14 nei macrofagi primari (MØ).

Analisi citofluorimetrica delle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' (vOX2) oppure con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP (*Mock*) utilizzando un anticorpo monoclonale anti-CD14 ed un'opportuno anticorpo secondario coniugato con FITC. Nell'*Histogram plot*, il marker M1 definisce la percentuale di cellule positive per il CD14 (linee verde e nera) rispetto al segnale aspecifico dato dall'anticorpo secondario (area rossa).

Come ulteriore prova d'espressione ed al fine di valutare la distribuzione e la localizzazione della glicoproteina erpetica nei macrofagi primari doppiamente trasdotti è stato eseguito un saggio di immunofluorescenza indiretta (IFI) a 72 ore dall'ultima trasduzione utilizzando un anticorpo coniugato con il fluoroforo FITC per la rilevazione. Anche in questo caso le cellule sono state fissate e permeabilizzate prima della marcatura con l'anticorpo anti-HA. La vOX2, come atteso, localizza abbondantemente su tutta la superficie cellulare con la tendenza a concentrarsi in particolari zone dove la fluorescenza verde risulta decisamente più intensa [Chung Y.H. *et al.*, 2002]. La colorazione con PI, un intercalante fluorescente del DNA, consente di visualizzare i nuclei che appaiono rossi al microscopio confocale. Dall'esame di più campi del vetrino si evince che mediamente due cellule su cinque ( $2/5 = 40\%$ ) sono verdi, quindi positive per la vOX2, in piena concordanza con i risultati dell'analisi citofluorimetrica (Figura 18).



**Figura 18** Valutazione dell'espressione della glicoproteina vOX2 nei macrofagi primari.

Immunofluorescenza indiretta su cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' utilizzando un anticorpo monoclonale anti-HA ed un'opportuno anticorpo secondario coniugato con FITC (freccie bianche rivolte verso il basso). La colorazione con PI mostra i nuclei e quindi le cellule presenti nel campo fotografato (freccie bianche).

## **6.4 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLE CITOCINE INFIAMMATORIE (TNF $\alpha$ ed IL-1 $\beta$ ) NELLE LINEE CELLULARI MONOCITO-MACROFAGICHE E NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2**

Una volta verificata l'espressione della vOX2 nelle cellule bersaglio trasdotte (U937, THP1 e macrofagi primari), è stato valutato innanzitutto l'effetto della glicoproteina erpetica sul livello trascrizionale e sulla secrezione di due citochine infiammatorie, il TNF $\alpha$  e l'IL-1 $\beta$ , che giocano un ruolo critico negli stadi precoci di sviluppo del KS [Ensoli B. et al., 2001]. D'altra parte queste molecole sono anche implicate nelle risposte immunitarie innate mirate a contrastare il propagarsi dell'infezione.

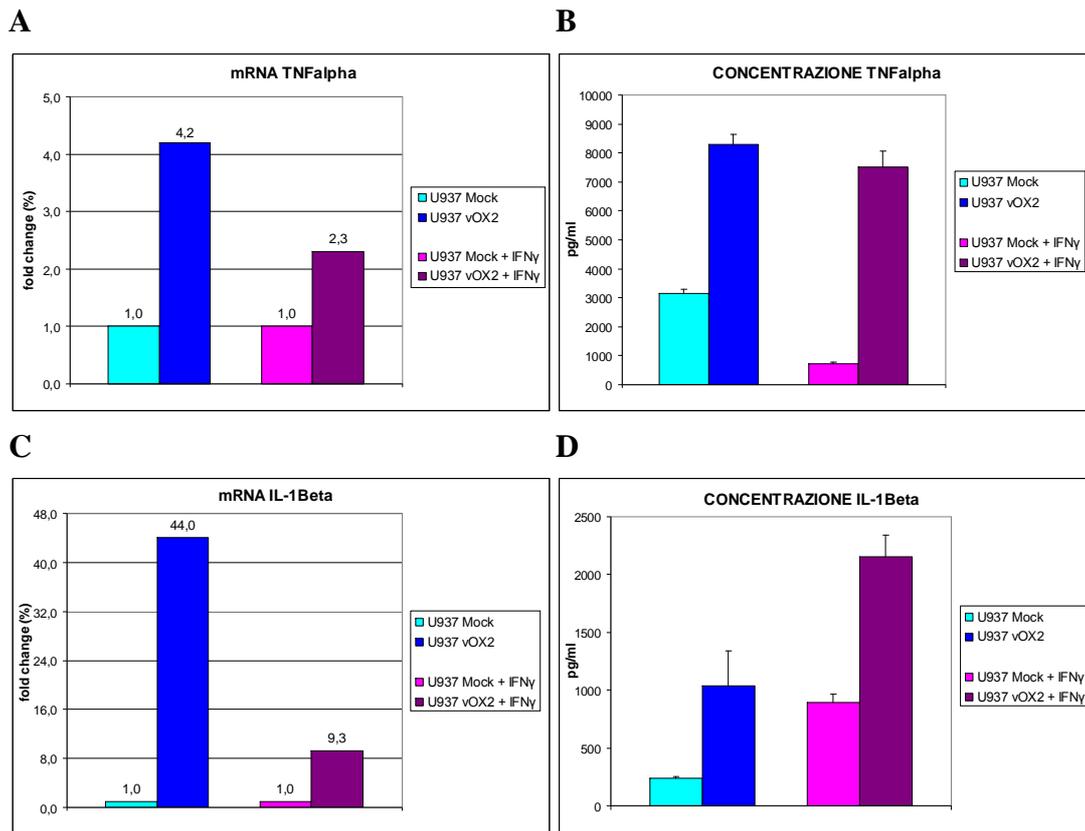
A tale scopo, sono stati eseguiti esperimenti di *real-time* RT-PCR per quantificare gli mRNA del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  mediante l'impiego di *primer* e sonde fluorogeniche specifiche per ciascun gene partendo dall'RNA totale estratto dalle cellule a 72 ore dalla doppia trasduzione con i virioni ricombinanti ottenuti utilizzando il vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2). In parallelo, i sovranatanti cellulari sono stati sottoposti ad ELISA per determinare la concentrazione delle due citochine. Per quanto riguarda le linee cellulari, in seguito alla doppia trasduzione, esse sono state indotte a differenziare a macrofagi mediante trattamento con TPA.

Cellule trasdotte con i virioni ricombinanti ottenuti utilizzando il vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP (*Mock*) sono state impiegate come controllo.

Tenendo presente che *in vivo*, nel contesto della lesione del sarcoma, i monocito-macrofagi possono essere attivati dal caratteristico microambiente infiammatorio in cui si sviluppa il KS, si è deciso di valutare l'effetto della vOX2 sull'espressione delle due citochine infiammatorie non solo in condizioni basali ma anche in condizioni di attivazione cellulare mediante stimolazione con IFN $\gamma$  (300 ng/ml), la più potente citochina attivatrice delle cellule monocito-macrofagiche.

Nelle cellule U937, la vOX2 induce un aumento significativo di entrambe le citochine prese in esame, sia a livello di mRNA che a livello di proteina, e quest'incremento viene osservato sia in condizioni basali che in condizioni di attivazione cellulare. In particolare, si osserva un aumento dei livelli di trascrizione dei geni del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  rispettivamente di 3.2 e 43.0 volte nelle cellule esprimenti la glicoproteina erpetica rispetto al controllo. Invece, nelle medesime cellule attivate con IFN $\gamma$ , la vOX2 incrementa di 1.3 volte l'mRNA del TNF $\alpha$  e di 8.3 volte quello dell'IL-1 $\beta$  (Figura 19 A e C). Inoltre, i dati sulla modulazione dell'espressione genica delle due citochine da parte della vOX2 concordano con la quantificazione della concentrazione del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  nei sovranatanti cellulari (Figura 19 B e D).

Alla luce di questo, la vOX2 sembrerebbe esercitare un effetto stimolatorio sulle cellule monocito-macrofagiche e perciò, promuovendo le reazioni infiammatorie, potrebbe contribuire direttamente alla patogenesi del KS [Chung Y.H. *et al.*, 2002].



**Figura 19** Valutazione dell'effetto della vOX2 sull'espressione genica e sulla secrezione del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  nelle cellule U937.

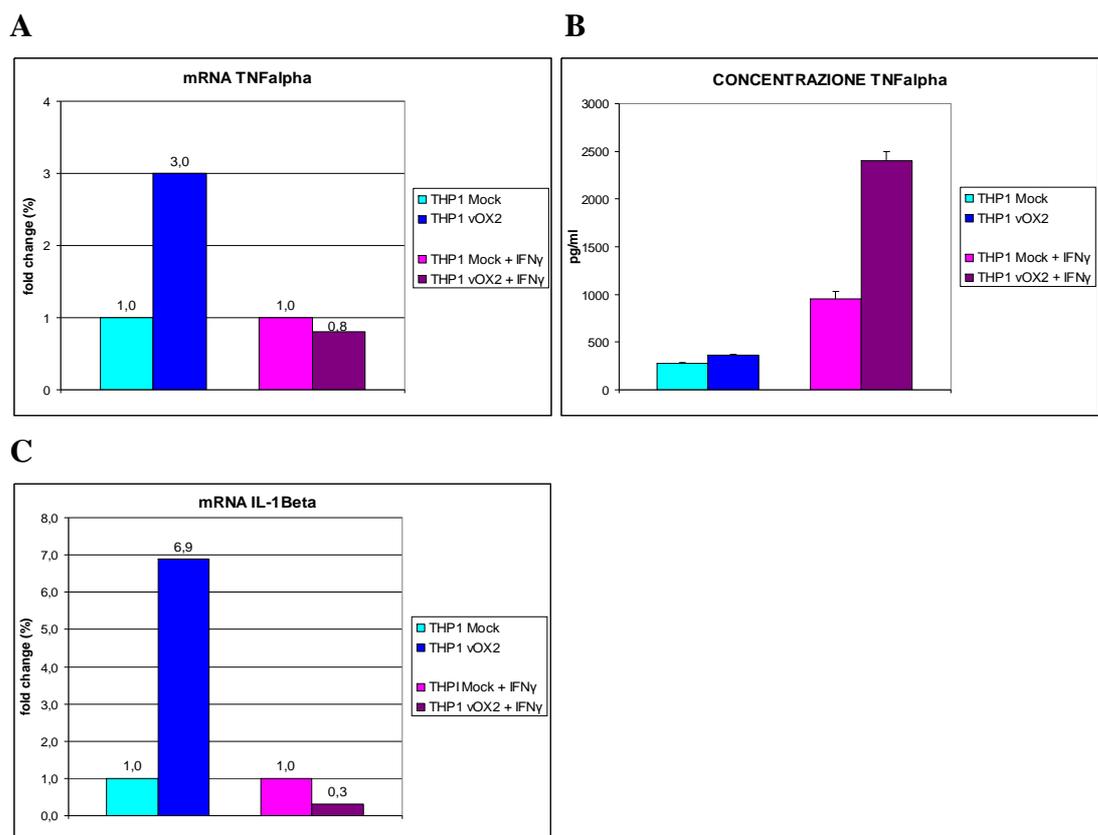
**Pannelli A e C:** *Real-time* RT-PCR per quantificare l'mRNA del TNF $\alpha$  (A) e/o dell'IL-1 $\beta$  (C) nelle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2). I risultati sono espressi come *fold change* (%), calcolato relativamente al controllo trasdotto con il vettore pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP (*Mock*) dopo normalizzazione rispetto al GAPDH (gene *housekeeping*), sono riportati sopra ciascuna barra dell'istogramma e rappresentano la media di tre differenti esperimenti.

**Pannelli B e D:** ELISA per quantificare il TNF $\alpha$  (B) e/o l'IL-1 $\beta$  (D) nei sovranatanti cellulari. I risultati sono espressi in pg/ml, rappresentano la media di tre differenti esperimenti e le barre d'errore corrispondono alle deviazioni standard.

Invece, nelle cellule THP1, che dal punto di vista fenotipico sono molto più simili ai macrofagi primari, la vOX2 sembra indurre un incremento degli mRNA delle due citochine in condizioni basali mentre i geni corrispondenti risultano essere repressi in condizioni di attivazione cellulare. In particolare, si osserva un incremento di 2.0 e 5.9 volte dell'mRNA del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  nelle cellule esprimenti la glicoproteina erpetica rispetto al controllo. Al contrario, nelle medesime cellule attivate con IFN $\gamma$ ,

l'espressione dei geni del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  viene ridotta rispettivamente di 0.2 e 0.7 volte per effetto della vOX2. (Figura 20 A e C).

Tuttavia, i risultati relativi alla modulazione della trascrizione del gene del TNF $\alpha$  nelle cellule esprimenti la glicoproteina erpetica non sembrano concordare con la quantificazione della citochina secreta (Figura 20 B); inoltre, contrariamente alle U937, l'IL-1 $\beta$  non risulta rilevabile nei sovranatanti di queste cellule.



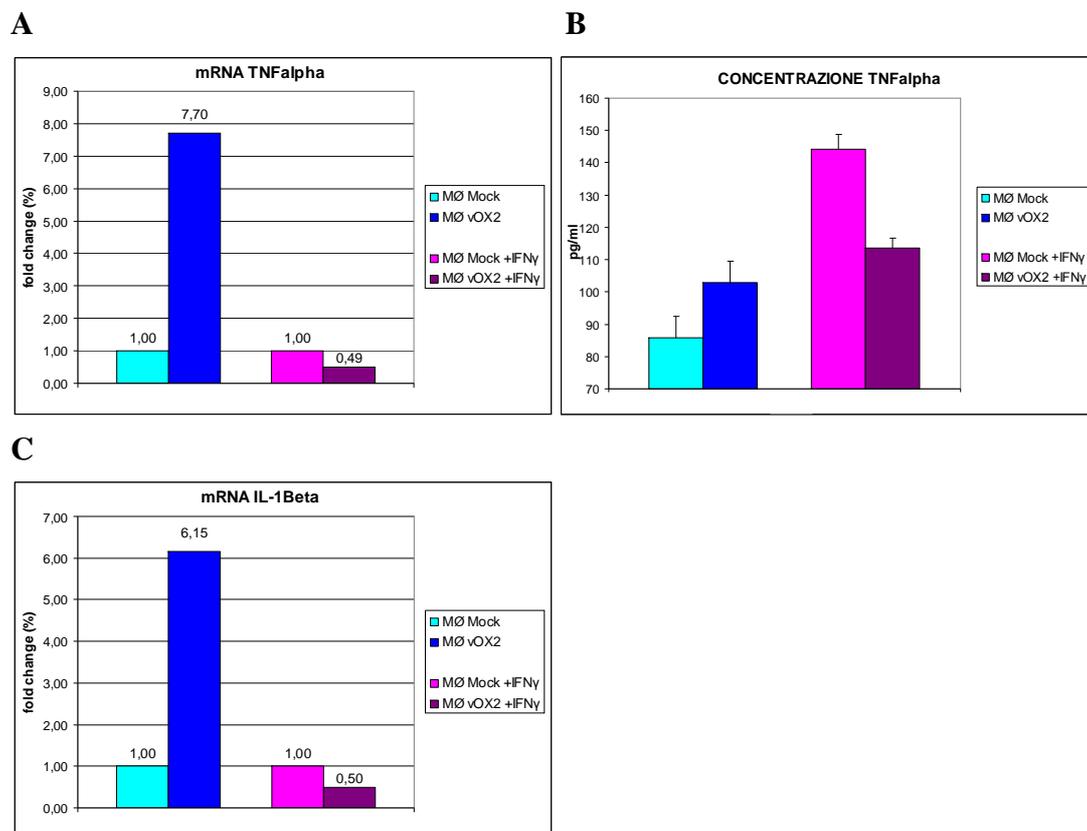
**Figura 19** Valutazione dell'effetto della vOX2 sull'espressione genica e sulla secrezione del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  nelle cellule THP1.

**Pannelli A e C:** *Real-time* RT-PCR per quantificare l'mRNA del TNF $\alpha$  (A) e/o dell'IL-1 $\beta$  (C) nelle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2). I risultati sono espressi come *fold change* (%), calcolato relativamente al controllo trasdotto con il vettore pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP (*Mock*) dopo normalizzazione rispetto al GAPDH (gene *housekeeping*), sono riportati sopra ciascuna barra dell'istogramma e rappresentano la media di tre differenti esperimenti.

**Pannello B:** ELISA per quantificare il TNF $\alpha$  (B) nei sovranatanti cellulari. I risultati sono espressi in pg/ml, rappresentano la media di tre differenti esperimenti e le barre d'errore corrispondono alle deviazioni standard.

Infine, nel caso dei macrofagi primari (M $\phi$ ), l'effetto della vOX2 sull'espressione genica delle due citochine infiammatorie è analogo a quello osservato nelle THP1. Gli mRNA del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  risultano aumentati rispettivamente di 6.70 e 5.15

volte nelle cellule esprimenti la vOX2 in condizioni basali; al contrario, nelle cellule attivate con IFN $\gamma$ , l'espressione genica si riduce di 0.51 e 0.50 volte rispetto al controllo (Figura 21 A e C). Anche in questo caso, analogamente alle THP1, l'IL-1 $\beta$  non viene rilevata nei sovrinatanti cellulari mentre, per quanto riguarda il TNF $\alpha$ , si osserva un incremento significativo della citochina nei sovrinatanti dei macrofagi esprimenti la vOX2 in condizioni basali, in accordo con l'aumento del suo mRNA. Al contrario, la secrezione del TNF $\alpha$  da parte dei macrofagi attivati dall'IFN $\gamma$  viene ridotta in presenza della glicoproteina erpetica, in accordo con la diminuzione della trascrizione del gene (Figura 21 B).



**Figura 19** Valutazione dell'effetto della vOX2 sull'espressione genica e sulla secrezione del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  nei macrofagi primari (MØ).

**Pannelli A e C:** *Real-time* RT-PCR per quantificare l'mRNA del TNF $\alpha$  (A) e/o dell'IL-1 $\beta$  (C) nelle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2). I risultati sono espressi come *fold change* (%), calcolato relativamente al controllo trasdotto con il vettore pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ GFP (*Mock*) dopo normalizzazione rispetto al GAPDH (gene *housekeeping*), sono riportati sopra ciascuna barra dell'istogramma e rappresentano la media di tre differenti esperimenti.

**Pannello B:** ELISA per quantificare il TNF $\alpha$  (B) nei sovrinatanti cellulari. I risultati sono espressi in pg/ml, rappresentano la media di tre differenti esperimenti e le barre d'errore corrispondono alle deviazioni standard.

Complessivamente, l'effetto della vOX2 sull'espressione delle due citochine infiammatorie prese in esame risulta molto variabile nelle diverse cellule monocito-macrofagiche utilizzate per lo studio (U937, THP1 e macrofagi primari (MØ)).

## **6.5 VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL CD200R NELLE LINEE CELLULARI MONOCITO-MACROFAGICHE E NEI MACROFAGI PRIMARI**

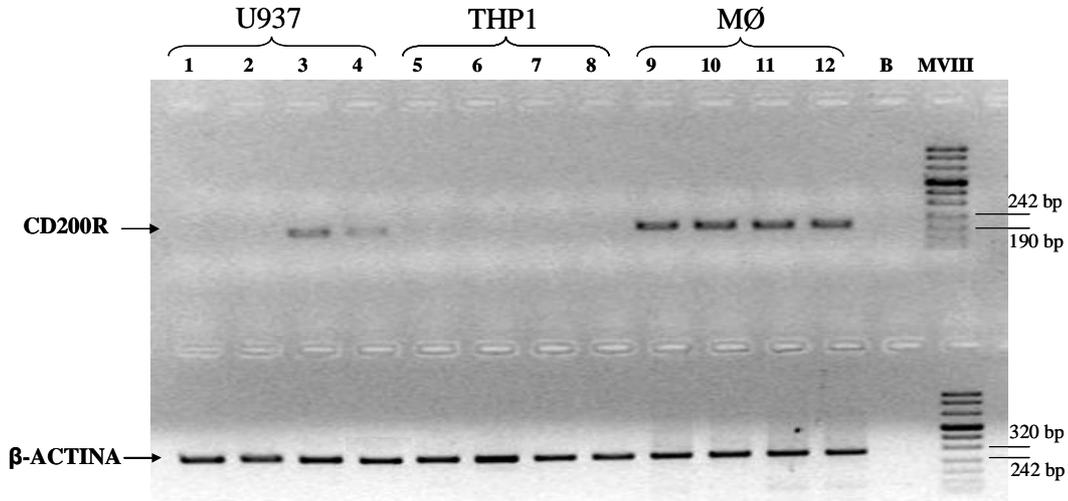
Essendo il CD200R l'unico recettore ad oggi conosciuto della vOX2 di HHV-8 [Foster-Cuevas M. et al., 2004] ed essendo espresso esclusivamente dalle cellule mieloidi *in vivo* [Wright G.J. et al., 2003], abbiamo voluto verificare la sua espressione sia nelle linee monocito-macrofagiche (U937 e THP1) che nelle colture primarie di macrofagi (MØ).

A tale scopo, l'RNA totale è stato estratto dalle cellule a 72 ore dalla doppia trasduzione con il vettore lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2) oppure con il vettore di controllo pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP (*Mock*), quindi, è stato sottoposto ad RT-PCR utilizzando una coppia di *primer* specifici per il CD200R al fine di valutare la presenza dell'mRNA del recettore nelle cellule monocito-macrofagiche utilizzate nello studio; in parallelo, è stato valutato l'mRNA della β-actina che, essendo espresso in modo costitutivo nelle cellule, è servito come controllo dell'avvenuta estrazione dell'RNA e retrotrascrizione. Anche in questo caso, la valutazione è stata condotta sia in condizioni basali che in condizioni di attivazione cellulare.

La corsa elettroforetica dei prodotti delle reazioni di RT-PCR ha evidenziato che solo i macrofagi primari sono positivi per l'espressione del recettore sia in condizioni basali che in condizioni di attivazione cellulare. Per quanto riguarda le linee cellulari monocito-macrofagiche, il recettore non viene per niente espresso nelle cellule THP1 mentre nelle U937 l'mRNA del CD200R risulta rilevabile solo in condizioni di attivazione cellulare mediante stimolazione con IFN $\gamma$  e sembra essere meno espresso in presenza della vOX2 (Figura 22).

Ipotizzando che il recettore inibitorio CD200R giochi un ruolo importante *in vivo* dal momento che viene espresso dai monociti-macrofagi e può essere intercettato dalla vOX2 di HHV-8 nel contesto delle lesioni del KS, si può concludere che le linee cellulari monocito-macrofagiche non costituiscono un modello valido per la valutazione dell'attività della glicoproteina erpetica dal momento che, normalmente, non esprimono il recettore.

Pertanto, si è deciso di proseguire le indagini focalizzando l'attenzione sulle colture primarie di macrofagi.



**Figura 22** Valutazione dell'espressione del CD200R nelle cellule U937 e THP1 e nei macrofagi primari (MØ).

Corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2% dei prodotti di PCR dei retrotrascritti ottenuti dall'RNA estratto dalle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2), in condizioni basali (corsie 2, 6 e 10) o di attivazione cellulare mediante stimolazione con IFN $\gamma$  (300 ng/ml) (corsie 4, 8 e 12), oppure con il vettore di controllo pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP (*Mock*), in condizioni basali (corsie 1, 5 e 9) o di attivazione cellulare (corsie 3, 7 e 11), utilizzando una coppia di *primer* specifici per il CD200R ed i *primer* per la  $\beta$ -ACTINA. Le cellule U937 e THP1 trasdotte sono state indotte a differenziare a macrofagi mediante trattamento con TPA (50 ng/ml).

B, bianco di reazione (controllo negativo); MVIII, marker di peso molecolare (Roche).

## 6.6 DOSAGGIO DEL TNF $\alpha$ SECRETO DAI MACROFAGI PRIMARI MESSI A CONTATTO CON CELLULE THP1 ESPRIMENTI LA vOX2

Come abbiamo già visto nel Paragrafo 6.4, la vOX2 promuove in modo significativo la secrezione del TNF $\alpha$  da parte dei macrofagi primari in condizioni basali, mentre esercita un effetto opposto nelle medesime cellule attivate con IFN $\gamma$ . Allo scopo di confermare l'effetto della glicoproteina erpetica sulla modulazione della secrezione del TNF $\alpha$ , si è pensato di allestire delle coculture di cellule THP1 esprimenti la vOX2 e macrofagi primari. In questo modo, tenendo conto che il livello d'espressione della glicoproteina erpetica è decisamente più elevato nelle linee cellulari trasdotte rispetto alle colture primarie (Paragrafi 6.2 e 6.3), è possibile vedere se l'effetto esercitato dalla vOX2 sui macrofagi primari risulta più rilevante quando il livello d'espressione della glicoproteina è maggiore.

Le cellule THP1 esprimono ad ottimi livelli la glicoproteina erpetica in seguito ad una doppia trasduzione con i virioni ricombinanti prodotti utilizzando il vettore

lentivirale pRRLsin.PPT.CMV.K14HA3' (vOX2) ed al trattamento con il TPA (Paragrafo 6.2); inoltre, esse non esprimono il recettore CD200R (Paragrafo 6.5). Pertanto, in queste cellule non si corre il rischio che la vOX2 espressa sulla superficie cellulare venga sequestrata dal legame con il CD200R.

Dall'altro lato, i macrofagi primari invece esprimono il recettore CD200R (Paragrafo 6.5) e, quindi, costituiscono un bersaglio d'azione della vOX2.

Esattamente come è stato fatto per le monoculture di macrofagi primari, anche negli esperimenti di cocoltura sono state utilizzate sia cellule in condizioni basali che cellule attivate mediante stimolazione con IFN $\gamma$ .

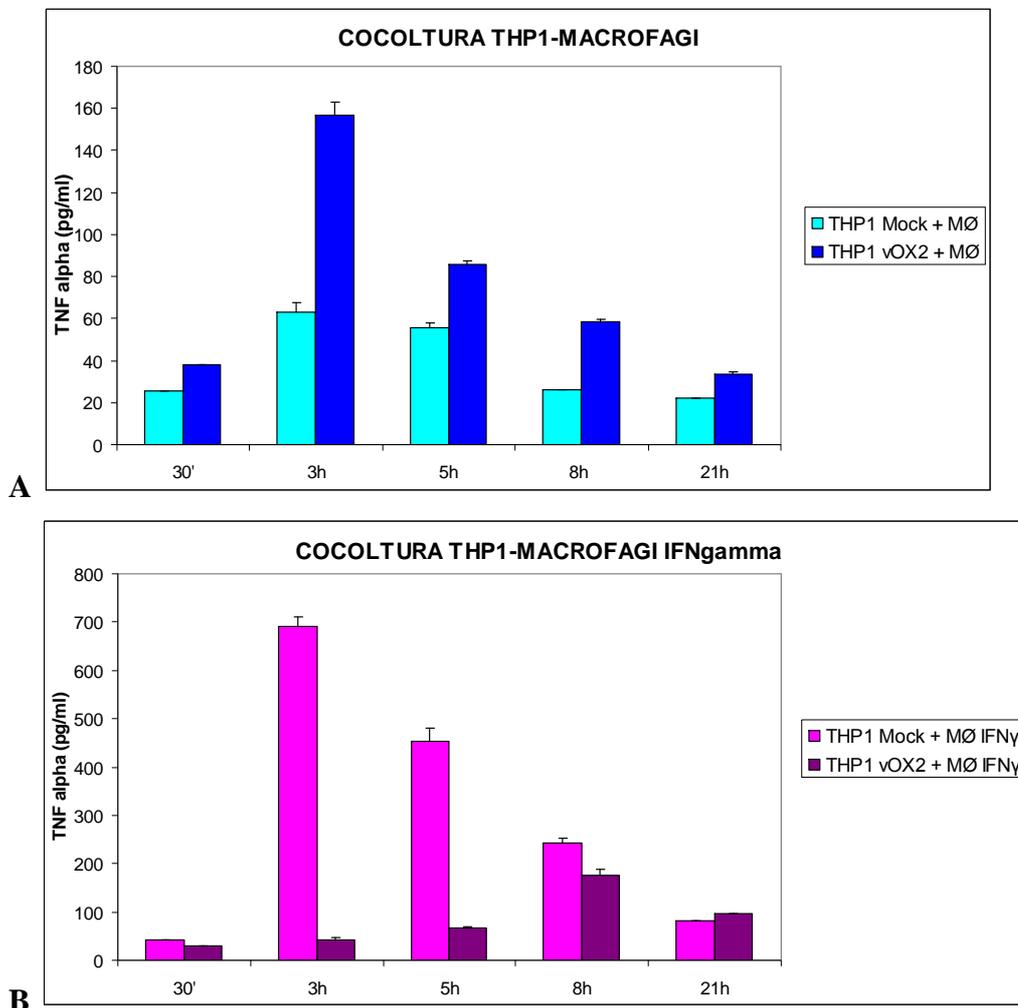
Dopo trattamento con brefeldina A (10  $\mu$ g/ml), che inibisce i processi di secrezione cellulare, le cellule THP1 esprimenti la vOX2 sono state messe a contatto con i macrofagi primari di 11 giorni, quindi i sovranatanti cellulari sono stati raccolti rispettivamente dopo 30 minuti, 3 ore, 5 ore, 8 ore e 21 ore e sono stati sottoposti ad ELISA per quantificare il TNF $\alpha$ . Secondo questo disegno sperimentale, la citochina rilevata sarebbe prodotta unicamente dai macrofagi primari dal momento che i processi di esocitosi risultano bloccati nelle cellule THP1.

Come controllo sono state allestite coculture di cellule THP1 trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP (*Mock*) e macrofagi primari.

I risultati ottenuti concordano con quanto osservato nelle monoculture di macrofagi primari esprimenti la glicoproteina erpetica. La vOX2 di HHV-8 stimola il rilascio del TNF $\alpha$  da parte dei macrofagi quiescenti; infatti, già dopo 3 ore dal contatto fra i due differenti tipi cellulari, l'effetto stimolatorio risulta evidente ed è molto più marcato rispetto a quello rilevato nelle monoculture. Tuttavia, nei tempi di raccolta successivi, pur mantenendosi costante l'effetto di stimolazione esercitato dalla vOX2, si osserva che la concentrazione del TNF $\alpha$  diminuisce sia nei campioni che nei corrispondenti controlli. Probabilmente questo è correlato alla tossicità della brefeldina A in quanto l'inibizione dei processi di secrezione può compromettere la funzionalità cellulare portando alla morte, con conseguente rilascio di proteasi ed altri enzimi digestivi che potrebbero degradare la citochina secreta, e riducendo nel contempo il numero di cellule esprimenti la vOX2 (Figura 23 A).

Al contrario, la glicoproteina erpetica inibisce fortemente la secrezione del TNF $\alpha$  da parte dei macrofagi attivati, come risulta evidente sempre alle 3 ore dall'inizio della cocoltura (Figura 23 B).

Alla luce dei dati finora raccolti, sembra che l'effetto della vOX2 sull'espressione di citochine pro-infiammatorie nei macrofagi primari sia strettamente correlato allo stato d'attivazione cellulare, ovvero stimolatorio in condizioni basali e fortemente inibitorio in condizioni di attivazione cellulare.



**Figura 23** Valutazione dell'effetto della vOX2 espressa dalle cellule THP1 sulla secrezione del TNF $\alpha$  da parte dei macrofagi primari (MØ).

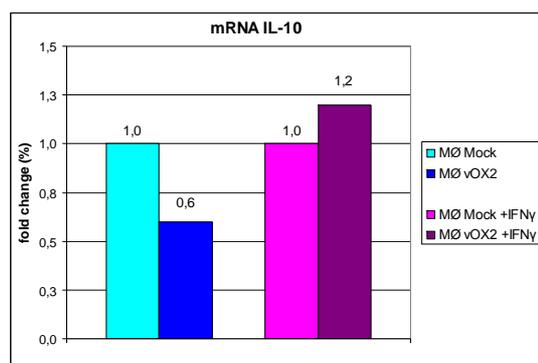
ELISA per quantificare il TNF $\alpha$  presente nel sovranatante delle coculture di cellule THP1 esprimenti la vOX2 e macrofagi primari in condizioni basali (Pannello A) e/o di attivazione cellulare mediante stimolazione con IFN $\gamma$  (300 ng/ml) (Pannello B), a 30 minuti, 3 ore, 5 ore, 8 ore e 21 ore dal contatto iniziale fra i due differenti tipi cellulari. Come controllo sono state utilizzate cellule THP1 trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP (*Mock*). I risultati sono espressi in pg/ml, rappresentano la media di due differenti esperimenti e le barre d'errore corrispondono alle deviazioni standard.

## 6.7 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLA CITOCHINA INIBITORIA IL-10 NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2

L'Interleuchina 10 (IL-10) è una citochina regolatrice delle risposte infiammatorie ed immunitarie, in particolare nei monociti-macrofagi essa inibisce la secrezione di citochine pro-infiammatorie. Pertanto, visto che l'effetto della vOX2 sull'espressione del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$ , come abbiamo già sottolineato, sembra essere strettamente dipendente dall'attivazione cellulare, si è voluto analizzare mediante esperimenti di *real-time* RT-PCR quantitativa il profilo d'espressione di questa citochina inibitoria nei macrofagi primari.

L'mRNA dell'IL-10 è stato quantificato negli stessi RNA totali già analizzati per quantificare gli mRNA del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  (Paragrafo 6.4) impiegando una coppia di *primer* ed una sonda specifici per il gene della citochina.

Come mostrato in Figura 24, si osserva una riduzione di 0.4 volte della trascrizione del gene della citochina inibitoria nelle cellule esprimenti la vOX2 rispetto al controllo in condizioni basali, dove risultano essere indotti i geni delle citochine infiammatorie, mentre nei macrofagi attivati la glicoproteina erpetica induce un aumento di 0.2 volte dell'mRNA dell'IL-10.



**Figura 24** Valutazione dell'effetto della vOX2 sull'espressione genica dell'IL-10 nei macrofagi primari (MØ).

*Real-time* RT-PCR per quantificare l'mRNA dell'IL-10 nelle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2). I risultati sono espressi come *fold change* (%), calcolato relativamente al controllo trasdotto con il vettore pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP (*Mock*) dopo normalizzazione rispetto al GAPDH (gene *housekeeping*), sono riportati sopra ciascuna barra dell'istogramma e rappresentano la media di tre differenti esperimenti.

Quindi, in perfetta concordanza con i risultati precedenti, l'effetto della glicoproteina erpetica sulla modulazione dell'espressione dell'IL-10 è sempre dipendente dallo stato in cui si trovano le cellule ed è completamente speculare a quello osservato per le citochine infiammatorie.

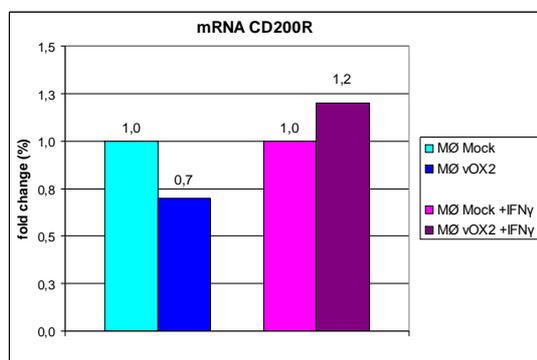
## **6.8 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DEL CD200R NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2**

Il recettore CD200R trasferisce un segnale inibitorio nelle cellule mieloidi, inclusi i monociti-macrofagi, in quanto blocca la cascata delle MAP kinasi ERK, p38 e JNK che porta alla produzione ed al rilascio di citochine ed inibisce così le risposte infiammatorie mediate da questi tipi cellulari [Jenmalm M.C. et al., 2006]. Fisiologicamente, esso viene attivato dalla glicoproteina umana OX2. Tuttavia, la vOX2 di HHV-8 è in grado di interagire con il recettore con un'affinità praticamente indistinguibile da quella della sua controparte cellulare [Foster-Cuevas M. et al., 2004]. Tenendo conto di questo, si è voluto valutare mediante esperimenti di *real-time* RT-PCR il livello d'espressione del CD200R nei macrofagi primari esprimenti la vOX2 rispetto al controllo (*Mock*), sia in condizioni basali che in condizioni di attivazione cellulare, partendo sempre dall'RNA totale estratto dalle cellule.

A differenza del sistema utilizzato per la quantificazione degli mRNA delle citochine (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  ed IL-10) che è basato sull'impiego di sonde fluorogeniche specifiche (*Taq-man*), per quanto riguarda il CD200R è stato utilizzato un intercalante fluorescente del DNA a doppio filamento (*SYBR green*) per monitorare l'espressione del recettore e la specificità della reazione di amplificazione è stata verificata mediante analisi delle curve di *melting* (Paragrafo 5.15).

In condizioni basali, il gene del CD200R risulta represso nelle cellule esprimenti la vOX2 di 0.3 volte mentre viene indotto nelle medesime cellule attivate con IFN $\gamma$  di 0.2 volte rispetto al controllo (Figura 25).

I risultati ottenuti concordano con i dati relativi alla modulazione dell'espressione delle citochine infiammatorie (TNF $\alpha$  ed IL-1 $\beta$ ) e della citochina inibitoria (IL-10), dal momento che la vOX2 esercita un effetto stimolatorio sui macrofagi in condizioni basali mentre inibisce le cellule attivate, presumibilmente attraverso l'interazione con il CD200R, che risulta essere maggiormente espresso in questa condizione.



**Figura 25** Valutazione dell'espressione del CD200R nei macrofagi primari (MØ) esprimenti la vOX2.

*Real-time* RT-PCR per quantificare l'mRNA del CD200R nelle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2). I risultati sono espressi come *fold change* (%), calcolato relativamente al controllo trasdotto con il vettore pRRLsin.PPT.CMV. $\Delta$ eGFP (*Mock*) dopo normalizzazione rispetto alla  $\beta$ -ACTINA (gene *housekeeping*), sono riportati sopra ciascuna barra dell'istogramma e rappresentano la media di tre differenti esperimenti.

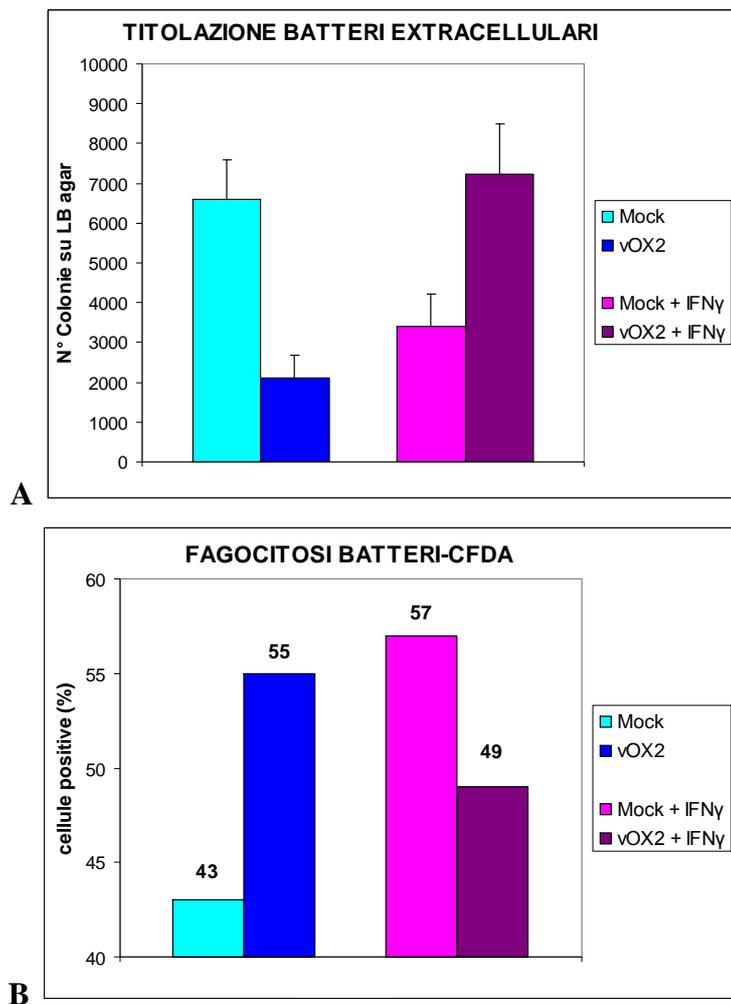
## 6.9 VALUTAZIONE DELLA FAGOCITOSI NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2

I monociti-macrofagi giocano un ruolo critico nell'infiammazione e nelle risposte immunitarie innate. In particolare, essi secernono numerose citochine ad attività pro-infiammatoria (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IFN $\alpha$  e  $\beta$ ) che, pur essendo implicate nei meccanismi di difesa dell'ospite contro le infezioni, come abbiamo già sottolineato sono anche fondamentali nella patogenesi del KS. Tuttavia, la funzione principale di queste cellule è la fagocitosi, ossia la capacità di inglobare nel citoplasma particelle estranee, compresi i microorganismi, e di distruggerle. Pertanto, una volta valutato l'effetto della vOX2 sull'espressione di alcune citochine infiammatorie tipicamente prodotte dai monociti-macrofagi, si è voluto verificare se la glicoproteina erpetica interferisse con questa loro caratteristica funzione.

Analogamente agli esperimenti precedenti, l'attività fagocitica dei macrofagi primari è stata saggiata a 72 ore dalla doppia trasduzione delle cellule bersaglio con gli opportuni virioni ricombinanti.

La fagocitosi è stata valutata innanzitutto in modo indiretto, andando a titolare il sovrantante della coltura dei macrofagi primari esprimenti la vOX2 e dei macrofagi di controllo (*Mock*) dopo 30 minuti di incubazione delle cellule con una quantità nota di batteri. In parallelo, le stesse cellule sono state messe in contatto con i batteri marcati con la sonda fluorescente CFDA per 30 minuti, quindi la fagocitosi è stata

monitorata in modo diretto rilevando al citofluorimetro la fluorescenza emessa dalle cellule nel canale dell'FL-1 in cui la CFDA ha il suo picco di emissione (519 nm). Nei macrofagi primari, in condizioni basali, la vOX2 promuove la fagocitosi, come dimostrato dalla riduzione significativa della quantità di batteri presenti nel sovrinatante cellulare e dall'incremento del numero di cellule che risultano positive all'analisi citofluorimetrica nei campioni esprimenti la glicoproteina erpetica rispetto ai controlli. Al contrario, la vOX2 esercita un effetto inibitorio sulla fagocitosi nei macrofagi attivati mediante stimolazione con IFN $\gamma$  (Figura 26).



**Figura 26 Valutazione dell'effetto della vOX2 sulla fagocitosi dei macrofagi primari (MØ)**

**Pannello A:** Titolazione del sovrinatante cellulare dopo 30 minuti di incubazione delle cellule con una quantità nota di batteri. I risultati sono espressi come numero di colonie cresciute su piastre di LB agar, rappresentano la media di tre differenti esperimenti e le barre d'errore corrispondono alle deviazioni standard.

**Pannello B:** Analisi citofluorimetrica della fluorescenza emessa dalle cellule dopo 30 minuti di incubazione con batteri marcati con 6-carbossi fluoresceina diacetato (CFDA). I risultati sono espressi come percentuale di cellule positive (%), sono riportati sopra ciascuna barra dell'istogramma e rappresentano la media di tre differenti esperimenti.

Essendo la fagocitosi un'attività del monocita-macrofago strettamente correlata all'infiammazione, i risultati ottenuti concordano pienamente con i dati relativi alla modulazione delle citochine infiammatorie da parte della vOX2. Infatti, anche in questo caso, l'effetto della glicoproteina erpetica nelle cellule in condizioni basali è chiaramente opposto a quello osservato nelle cellule attivate con IFN $\gamma$ , confermando ulteriormente la sua dipendenza dallo stato d'attivazione cellulare.

## **6.10 MODULAZIONE DELL'ESPRESSIONE DELLE PROTEINE DEL COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITA' HLA NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2**

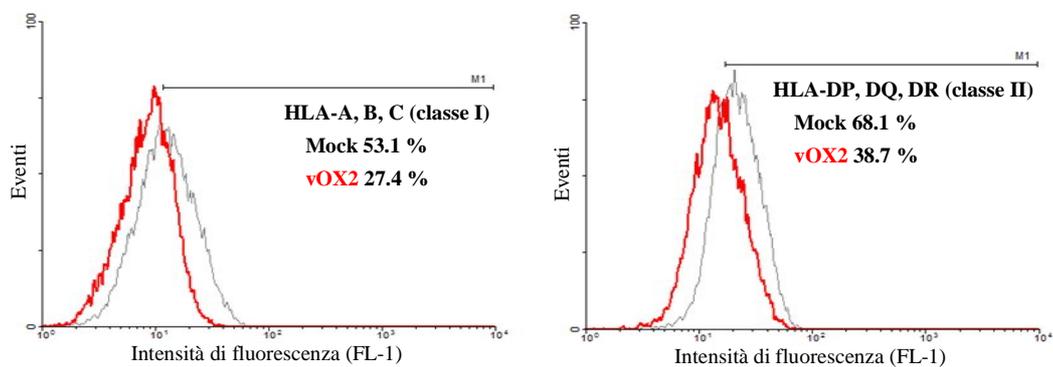
I monociti-macrofagi oltre che nell'infiammazione e nell'immunità innata intervengono anche nelle risposte immunitarie adattative specifiche dirette contro i patogeni attraverso la presentazione degli antigeni extracellulari captati per fagocitosi alle cellule T CD4+ (HLA-DP, DQ, DR, classe II). Inoltre, essendo bersaglio d'infezione da parte di HHV-8, essi presentano direttamente gli antigeni virali prodotti all'interno della cellula ai linfociti T CD8+ citotossici (HLA-A, B, C, classe I). Visto il ruolo critico che essi hanno nell'innescare dell'immunità adattativa, si è voluto verificare se la vOX2 modulasse l'espressione degli HLA I e II sulla superficie dei macrofagi primari interferendo così con la presentazione antigenica.

A tale scopo, a 72 ore dalla doppia trasduzione con gli opportuni virioni ricombinanti le cellule sono state incubate con anticorpi primari specifici per i due marcatori e con un anticorpo secondario coniugato al fluoroforo FITC, quindi sono state analizzate al citofluorimetro misurando l'intensità di fluorescenza nel canale dell'FL-1.

In presenza della vOX2, si riduce di circa un 30% il livello d'espressione di entrambi gli HLA sulla superficie dei macrofagi primari in condizioni basali (Figura 27).

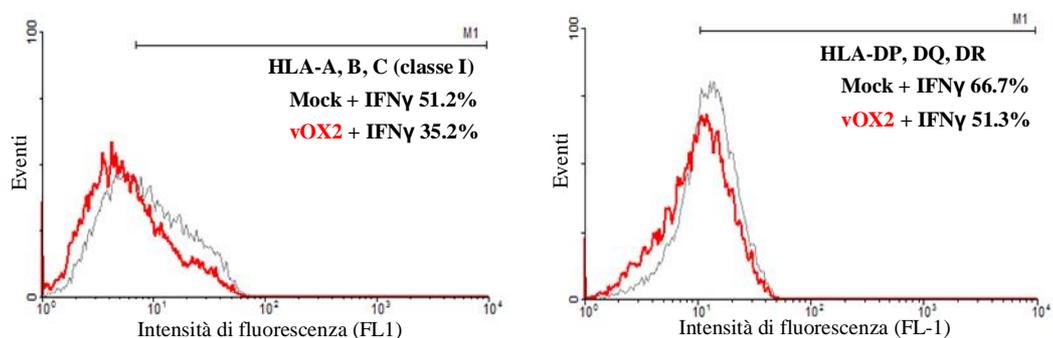
Lo stesso effetto, seppur meno marcato, viene osservato anche nei macrofagi primari attivati con IFN $\gamma$  ed esprimenti la vOX2, nei quali il livello d'espressione di entrambi gli HLA si riduce di circa un 16% rispetto al controllo (Figura 28).

Quindi, la capacità dei macrofagi primari di presentare gli antigeni alle cellule T risulta essere compromessa dalla vOX2 sia in condizioni basali che in condizioni di attivazione cellulare, ossia indipendentemente dallo stato in cui si trovano le cellule. In questo modo, la glicoproteina erpetica può contribuire anche ai meccanismi di evasione dell'immunità adattativa specifica.



**Figura 27** Valutazione dell'effetto della vOX2 sull'espressione dei marcatori HLA-A, B, C (classe I) ed HLA-DP, DQ, DR (classe II) sulla superficie dei macrofagi primari (MØ).

Analisi citofluorimetrica delle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2) o con il vettore pRRL.sin.PPT.CMV.ΔeGFP (*Mock*) utilizzando anticorpi monoclonali anti-HLA ed un'opportuno anticorpo secondario coniugato con FITC. In ciascun *Histogram plot*, il marker M1 definisce la percentuale di cellule esprimenti la vOX2 positive per il marcatore (linea rossa) rispetto al controllo (*Mock*, linea grigia).



**Figura 28** Valutazione dell'effetto della vOX2 sull'espressione dei marcatori HLA-A, B, C (classe I) ed HLA-DP, DQ, DR (classe II) sulla superficie dei macrofagi primari (MØ) attivati con IFN $\gamma$ .

Analisi citofluorimetrica delle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2) o con il vettore pRRL.sin.PPT.CMV.ΔeGFP (*Mock*) utilizzando anticorpi monoclonali anti-HLA ed un'opportuno anticorpo secondario coniugato con FITC. In ciascun *Histogram plot*, il marker M1 definisce la percentuale di cellule esprimenti la vOX2 positive per il marcatore (linea rossa) rispetto al controllo (*Mock*, linea grigia).

## 6.11 VALUTAZIONE DEL PROFILO D'ESPRESSIONE GENICA NEI MACROFAGI PRIMARI ESPRIMENTI LA vOX2

Alla luce dei molteplici effetti della vOX2 di HHV-8 su diverse attività dei monociti-macrofagi (produzione di citochine, fagocitosi, presentazione antigenica), si è voluto valutare quale impatto avesse la glicoproteina erpetica sul loro profilo globale d'espressione genica mediante la tecnologia dei *microarray* ed, a tale scopo, è stato utilizzato l'RNA totale già impiegato negli esperimenti di *real-time* RT-PCR.

Dopo essere stato amplificato e marcato, l'mRNA estratto dai macrofagi primari esperimenti la vOX2 è stato co-ibridato con quello estratto dalle cellule di controllo (*Mock*) sul vetrino contenente gli oligonucleotidi depositati. Di norma il campione da analizzare è coniugato con il colorante fluorescente Cy5 (rosso) ed il controllo con il Cy3 (verde). Per l'analisi è stato utilizzato il logaritmo in base 2 del rapporto tra le intensità di segnale nei due canali (rosso/verde). Parallelamente, è stata eseguita la replica tecnica dell'esperimento invertendo i fluorofori usati per marcare gli RNA; in questo caso, è stato calcolato il reciproco del rapporto in modo da poter effettuare il confronto con gli *array* marcati in modo convenzionale.

I dati grezzi ottenuti sono stati elaborati statisticamente con il software Acuity 4.0 dopo essere stati normalizzati con il metodo *lowess*.

Sono di seguito presentati i risultati preliminari degli esperimenti di *microarray*. La Tabella 3 riporta una selezione di geni particolarmente interessanti la cui espressione risulta essere modulata in presenza della vOX2 di HHV-8 di almeno un fattore 2 in positivo (>1) oppure in negativo (<-1). In presenza della glicoproteina erpetica viene promossa la trascrizione di una serie di geni codificanti proteine coinvolte nelle reazioni infiammatorie e nelle risposte immunitarie innate, nelle vie di trasduzione del segnale e nella regolazione del ciclo cellulare e dello smistamento intracellulare delle proteine. In particolare, fra i geni indotti troviamo quelli codificanti:

- citochine, come l'*Interferon* (4.79), l'*Interleukin 1 $\beta$*  (2.63), l'*Interleukin 7* (2.75) ed il *Tumor necrosis factor  $\alpha$*  (1.25), e chemochine, come la *Small inducible cytokine A4* (1.57), che sono coinvolte nei processi infiammatori;
- recettori di citochine e proteine ad essi associate, come il *Tumor necrosis factor receptor superfamily* (1.09) ed il *Tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein* (4.85) che fanno parte della via di segnalazione intracellulare del TNF $\alpha$ ;
- membri della famiglia dei recettori *Toll*, come il *Toll-like receptor 1* (1.27) ed il *Toll-like receptor 9* (4.52) che giocano un ruolo critico nelle risposte immunitarie innate ai patogeni;

- diverse proteine della cascata delle MAP kinasi p38 ed ERK che controllano la produzione di molte citochine infiammatorie, fra cui la *Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5* (9.04);
- e proteine che promuovono la proliferazione cellulare, fra cui l'*Activator of S phase Kinase* (2.11) e la *CDC28 protein kinase 2* (2.03).

Solamente pochissimi geni risultano essere repressi nei macrofagi primari esprimenti la vOX2 in condizioni basali (Tabella 3).

Al contrario, nelle cellule stimulate con IFN $\gamma$  e, quindi, attivate, si è osservato che un numero più elevato di geni viene modulato per effetto della glicoproteina erpetica rispetto alle cellule non stimulate e che la maggior parte di questi risulta essere repressa mentre pochissimi geni vengono indotti. In particolare, in condizioni di attivazione cellulare, la vOX2 provoca una significativa riduzione dell'espressione di molteplici geni coinvolti nell'infiammazione e nell'immunità innata, inclusi geni che codificano citochine (*Interferon* (-1.10), *Interleukin 1 $\beta$*  (-2.83), *Interleukin 7* (-3.21), *Interleukin 12A* (-2.58) e *Tumor necrosis factor  $\alpha$*  (-1.26)), chemochine (*Small inducible cytokine A4* (-1.25), *Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys)* (-1.73) oppure *B (Cys-X-Cys)* (-1.43) e *RANTES* (-1.03)), recettori di citochine e chemochine (*Interleukin 1 receptor* (-2.64), *CCR1* (-2.09), *Tumor necrosis factor receptor superfamily* (-1.79) e *Tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein* (-1.77)), e membri della famiglia dei recettori Toll (*Toll-like receptor 1* (-2.85) e *Toll-like receptor 9* (-3.56)). Invece, risultano indotti geni implicati nell'inibizione delle risposte infiammatorie (*Transforming growth factor* (12.4)), nell'inibizione delle vie di segnalazione delle citochine infiammatorie (*STAT induced STAT inhibitor-4* (3.34) e nell'inibizione del ciclo cellulare (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D* (1.61) e *Cyclin B1* (4.62)) (Tabella 3).

Come si può vedere nella Tabella 3, i geni che risultano indotti per effetto della glicoproteina erpetica nei macrofagi primari in condizioni basali sono repressi in condizioni di attivazione cellulare e viceversa.

In conclusione, anche i risultati degli array suggeriscono che l'effetto della vOX2 sia strettamente dipendente dallo stato di attivazione cellulare, in accordo con i dati relativi alla modulazione dell'espressione delle citochine e dell'attività fagocitica; quindi, la vOX2 eserciterebbe un effetto stimolatorio sui macrofagi in condizioni basali mentre nelle cellule attivate medierebbe preferenzialmente un segnale di tipo inibitorio. D'altra parte, la modulazione dell'espressione dei geni del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  riscontrata negli *array* (induzione in condizioni basali e repressione in condizioni di attivazione cellulare) concorda perfettamente con quanto osservato negli esperimenti di *real-time* RT-PCR (Paragrafo 6.4).

<b>Geni modulati dalla vOX2 di HHV-8</b>		<b>IFN<math>\gamma</math></b>
<b>CITOCHINE E CHEMOCHINE</b>		
<i>Colony stimulating factor 1 (macrophage)</i>	0,49	-1,17
<i>Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i>	0,38	-1,47
<i>Colony stimulating factor 2 receptor</i>	0,33	-1,98
<i>Colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)</i>	0,47	-1,26
<i>Interferon</i>	4,79	-1,10
<i>Interferon-induced</i>	0,72	-2,18
<i>Interleukin 1<math>\beta</math></i>	2,63	-2,83
<i>Interleukin 12A (natural killer cell stimulatory factor 1)</i>	0,48	-2,58
<i>Interleukin 13</i>	0,04	-1,53
<i>Interleukin 15</i>	1,12	-1,29
<i>Interleukin 16 (lymphocyte chemoattractant factor)</i>	0,56	-1,25
<i>Interleukin 17</i>	0,34	-2,69
<i>Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)</i>	0,75	-2,00
<i>Interleukin 19</i>	0,48	-1,18
<i>Interleukin 21</i>	0,72	-1,04
<i>Interleukin 5 (colony-stimulating factor)</i>	0,51	-1,16
<i>Interleukin 7</i>	2,75	-3,21
<i>Monokine induced by gamma interferon</i>	1,38	-1,51
<i>Small inducible cytokine A2 (monocyte chemotactic protein 1)</i>	0,37	-1,03
<i>Small inducible cytokine A3</i>	0,61	-1,28
<i>Small inducible cytokine A4</i>	1,57	-1,25
<i>Small inducible cytokine A5 (RANTES)</i>	0,74	-1,03
<i>Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys)</i>	0,55	-1,73
<i>Small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys)</i>	0,49	-1,43
<i>Small inducible cytokine subfamily D (Cys-X3-Cys)</i>	0,64	-2,11
<i>Transforming growth factor (TGF)</i>	-3,83	12,4
<i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i>	1,25	-1,26
<i>Tumor necrosis factor (ligand) superfamily</i>	2,41	-1,56
<b>RECETTORI DI CITOCHINE E CHEMOCHINE</b>		
<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 1 (CXCR1)</i>	0,47	-1,05
<i>Chemokine (C-C motif) receptor 1 (CCR1)</i>	-0,09	-2,09
<i>Chemokine (C-C motif) receptor 8 (CCR8)</i>	0,37	-1,07
<i>Chemokine (C-X3-C) receptor 1</i>	-0,16	-2,38
<i>Class II cytokine receptor</i>	0,47	-2,42
<i>Interferon gamma receptor 1 (IFNGR1)</i>	0,49	-1,76
<i>Interleukin 1 receptor</i>	0,26	-2,64
<i>Interleukin 1 receptor antagonist</i>	0,45	-1,16
<i>Interleukin 10 receptor</i>	0,86	-1,16
<i>Interleukin 6 receptor</i>	0,47	-2,04
<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily</i>	1,09	-1,79
<i>Tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein</i>	4,85	-1,77
<b>RISPOSTA IMMUNITARIA INNATA</b>		
<i>CD84 antigen (leukocyte antigen)</i>	0,15	-1,41
<i>CD86 antigen (CD28 and CTLA4 ligand)</i>	4,17	-1,19
<i>Immunoglobulin superfamily</i>	9,12	-2,22
<i>Leukocyte immunoglobulin-like receptor</i>	0,67	-1,52
<i>Toll-like receptor 1 (TLR1)</i>	1,27	-2,85
<i>Toll-like receptor 9 (TLR9)</i>	4,52	-3,56

<b>TRASDUZIONE DEL SEGNALE</b>		
<i>CD38 antigen</i>	1,58	-1,13
<i>G protein-coupled receptor Family</i>	1,50	-1,87
<i>Interferon regulatory factor 5 (IRF5)</i>	1,47	-1,20
<i>Interferon regulatory factor 7 (IRF7)</i>	0,41	-1,25
<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 1</i>	0,53	-1,52
<i>Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)</i>	0,54	-1,12
<i>Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)</i>	0,89	-1,20
<i>Leukocyte tyrosine kinase</i>	0,53	-1,34
<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>	1,12	-1,51
<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>	1,36	-2,85
<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>	1,45	-1,01
<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 5</i>	9,04	-1,20
<i>P300/CBP-associated factor</i>	1,93	-2,21
<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>	4,93	-2,22
<i>Protein kinase C</i>	1,79	-3,54
<i>Regulator of G-protein signalling 1</i>	2,27	-4,36
<i>Rho GTPase activating protein 5</i>	5,14	-1,82
<i>Serine/threonine kinase Family</i>	0,71	-1,73
<i>STAT induced STAT inhibitor-4</i>	-1,03	3,34
<i>TNF receptor-associated factor 1 (TRAF1)</i>	0,70	-2,25
<i>TNF receptor-associated factor 3 (TRAF3)</i>	1,09	-2,02
<i>TRAF and TNF receptor-associated protein</i>	0,45	-1,44
<b>CONTROLLO CICLO CELLULARE</b>		
<i>Activator of S phase kinase</i>	2,11	-2,50
<i>CDC28 protein kinase 2</i>	2,03	-2,67
<i>Cyclin B1</i>	-2,40	4,62
<i>Cyclin D2</i>	0,94	-3,25
<i>Cyclin D3</i>	0,78	-2,10
<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19 inhibits CDK4)</i>	-4,38	1,61
<i>G1 to S phase transition 1</i>	0,60	-1,34
<i>Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide D</i>	3,49	-2,93
<i>Replication factor C (activator 1) 4 (37kD)</i>	8,83	-1,30
<b>PROTEINE IMPLICATE NELLO SMISTAMENTO INTRACELLULARE</b>		
<i>Golgi phosphoprotein 2</i>	9,94	-3,12
<i>RAB5 interacting protein 3</i>	5,67	-3,35
<i>Rab9 effector p40</i>	1,70	-2,84

**Tabella 3** Valutazione dell'effetto della vOX2 sul profilo globale d'espressione genica dei macrofagi primari.

Identificazione attraverso *microarray* dei geni cellulari indotti (rosso) o repressi (verde) nelle cellule trasdotte con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.K14 (vOX2) rispetto al controllo trasdotto con il vettore pRRLsin.PPT.CMV.ΔeGFP (*Mock*), in condizioni basali o di attivazione mediante stimolazione con IFN $\gamma$  (300 ng/ml). I risultati sono espressi come log<sub>2</sub> (vOX2/*Mock*).



## 7. DISCUSSIONE

Nel genoma di HHV-8 sono presenti numerosi omologhi di geni cellulari. Alcuni di questi codificano proteine che intervengono nella regolazione del ciclo cellulare promuovendo la proliferazione e/o inibendo la morte per apoptosi; altri, invece, sono implicati nell'evasione delle difese immunitarie sia innate che adattative dell'ospite. Insieme, essi contribuiscono alla patogenesi del sarcoma di Kaposi (KS) sia in modo diretto che indirettamente favorendo la persistenza del virus nelle lesioni del sarcoma [Boshoff C. *et al.*, 2001; Moore P.S *et al.*, 2003].

Diversi studi in letteratura hanno attribuito alla vGPCR del virus il ruolo di protagonista principale della sarcomogenesi alla luce della sua capacità di indurre l'espressione non solo di geni coinvolti nella proliferazione cellulare e nel blocco dell'apoptosi ma anche di numerose citochine infiammatorie, di fattori di crescita e di fattori angiogenici critici per lo sviluppo del KS [Sodhi A. *et al.*, 2004]. La vGPCR viene espressa nelle cellule infettate liticamente dal virus a partire da un mRNA bicistronico insieme alla glicoproteina di membrana vOX2 di cui, invece, non è stato ancora chiarito con precisione il ruolo nella patogenesi virale.

Il suo omologo umano, OX2, trasferisce un segnale inibitorio nelle cellule mieloidi attraverso l'interazione con il recettore CD200R e così facendo ne modula lo stato di attivazione prevenendo lesioni tissutali e fenomeni autoimmuni [Cherwinski H.M. *et al.*, 2005; Jenmalm M.C. *et al.*, 2006].

Anche la vOX2 ha funzioni immunomodulatrici; alcuni studi dimostrano che essa esercita un'attività anti-infiammatoria ed immunosoppressiva nei basofili-mastociti e nei neutrofili [Rezaee S.A. *et al.*, 2005; Shiratori I. *et al.*, 2005] mentre, per quanto riguarda i monociti-macrofagi, i dati presenti in letteratura sono contrastanti.

In questa tesi di dottorato si è voluto indagare l'effetto esercitato dalla vOX2 sulle cellule monocito-macrofagiche al fine di chiarire in che modo essa contribuisca alla patogenesi del KS. A tale scopo si è deciso di esprimere la glicoproteina erpetica in linee cellulari monocito-macrofagiche (U937 e THP1) ed in colture primarie di macrofagi derivati da sangue periferico (MØ). Infatti, oltre ad essere un bersaglio d'azione della vOX2 nel contesto della lesione del sarcoma, i monociti-macrofagi sono anche infettati liticamente da HHV-8 *in vivo* e, quindi, esprimono la glicoproteina [Blasig C. *et al.*, 1997].

Il trasferimento genico in questi tipi cellulari si è rivelato essere particolarmente problematico. Infatti, metodi convenzionali di trasfezione, tipo l'elettroporazione o la lipofezione, si sono dimostrati scarsamente efficienti, come evidenziato dalle basse percentuali di cellule positive per l'espressione della proteina eGFP (< 20%). Inoltre,

l'elettroporazione si accompagna ad una massiccia citotossicità. Invece, ottimi risultati si sono ottenuti utilizzando un approccio di trasduzione con un vettore lentivirale di ultima generazione basato su HIV-1 [Zufferey R. *et al.*, 1998]; in particolare, la doppia trasduzione con tale vettore si è dimostrata essere il più efficiente metodo di trasferimento genico in cellule monocito-macrofagiche dal momento che praticamente tutte le cellule (97-100%) sono risultate positive per l'espressione della eGFP.

Alla luce di questo, nel nostro modello sperimentale, le cellule bersaglio (U937, THP1 e MØ primari) sono state doppiamente trasdotte con il vettore lentivirale codificante la vOX2 di HHV-8; quindi, le linee cellulari sono state indotte a differenziare a macrofagi mediante stimolazione con TPA in modo tale da poterle mettere a confronto con le colture primarie. La glicoproteina erpetica viene espressa in tutte le cellule trasdotte; tuttavia il livello d'espressione e la percentuale di cellule positive per la vOX2 sono decisamente più bassi nelle colture primarie rispetto alle linee cellulari. Questa differenza potrebbe essere dovuta all'attivazione trascrizionale indotta dal TPA nelle linee cellulari trasdotte che promuoverebbe l'espressione della glicoproteina erpetica.

I monociti-macrofagi giocano un ruolo critico nell'infiammazione e nell'immunità innata attraverso la secrezione di citochine infiammatorie e l'attività fagocitica. In questo studio si è valutato innanzitutto l'effetto della vOX2 sull'espressione genica e sulla secrezione del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$ , le due più importanti citochine infiammatorie prodotte dai monociti-macrofagi; i risultati ottenuti nelle diverse cellule bersaglio utilizzate per lo studio si sono mostrati molto discordanti fra di loro.

Mentre nelle cellule U937 la vOX2 promuove la trascrizione dei geni delle due citochine sia in condizioni basali che in condizioni di attivazione cellulare indotta mediante stimolazione con IFN $\gamma$ , per quanto riguarda le cellule THP1 ed i MØ primari quest'effetto stimolatorio viene rilevato esclusivamente nelle cellule non attivate. Al contrario, nelle cellule attivate con IFN $\gamma$ , la glicoproteina erpetica inibisce l'espressione dei geni del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$ .

L'effetto di modulazione della trascrizione genica è stato confermato andando a quantificare, qualora fosse possibile, la citochina rilasciata nel sovrantante delle cellule esprimenti la glicoproteina erpetica. Una perfetta concordanza fra i dati sull'espressione genica e quelli sulla secrezione è stata osservata sia nelle cellule U937 che nei MØ primari.

La capacità della vOX2 di promuovere la secrezione del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  nelle cellule U937 non attivate e/o attivate con IFN $\gamma$  era già stata evidenziata in uno studio precedente [Chung Y.H. *et al.*, 2002]. Quest'attività immunostimolatoria della vOX2 potrebbe essere correlata al fatto che il gene del recettore inibitorio CD200R non viene per niente espresso in questa linea cellulare in condizioni basali mentre appare

represso nelle cellule attivate con IFN $\gamma$  ed esprimenti la glicoproteina erpetica rispetto a quelle di controllo. Si può ipotizzare, quindi, che la vOX2 interagisca con un qualche recettore attivatorio espresso sulla superficie delle U937 stimolando così la secrezione delle citochine infiammatorie.

Tuttavia, il CD200R gioca un ruolo molto importante ai fini della caratterizzazione funzionale della vOX2 in quanto costituisce un potenziale bersaglio d'azione della glicoproteina erpetica nel contesto delle lesioni del KS; infatti, il recettore viene espresso dalle cellule mieloidi *in vivo* [Wright G.J. *et al.*, 2003] e viene legato dalla vOX2 con un'affinità praticamente identica a quella del suo ligando naturale, l'OX2 umano [Foster-Cuevas M. *et al.*, 2004].

Fra le diverse cellule monocito-macrofagiche utilizzate in questo studio, solo le colture di macrofagi primari sono risultate positive per l'espressione del CD200R sia in condizioni basali che in condizioni di attivazione cellulare; pertanto, esse si sono rivelate il modello ideale su cui focalizzare la nostra attenzione.

La capacità della vOX2 di promuovere la secrezione del TNF $\alpha$  nei macrofagi primari in condizioni basali e, viceversa, di inibirla nelle medesime cellule attivate con IFN $\gamma$ , già dimostrata nelle monoculture di M $\emptyset$  primari trasdotti, è stata nuovamente confermata nelle coculture di cellule THP1 esprimenti la glicoproteina erpetica con M $\emptyset$  primari non stimolati oppure stimolati con IFN $\gamma$ . In questo caso, come mostrano i risultati qui riportati (Paragrafo 6.6), l'effetto esercitato dalla vOX2 sul rilascio della citochina da parte dei M $\emptyset$  primari, sia esso positivo o negativo, è decisamente più marcato, presumibilmente in relazione al maggiore livello d'espressione della glicoproteina erpetica nella linea cellulare rispetto alla coltura primaria.

Proseguendo con lo studio dell'effetto della vOX2 sui M $\emptyset$  primari non attivati e/o attivati con IFN $\gamma$ , è stato interessante notare come il profilo d'espressione del gene dell'IL-10, citochina inibitoria delle risposte infiammatorie mediate dal TNF $\alpha$  e dall'IL-1 $\beta$ , mostri un andamento completamente speculare, e pertanto in perfetta armonia, a quello dei geni delle due citochine infiammatorie.

Tutto questo concorda con la diminuita espressione del gene del CD200R nei M $\emptyset$  primari esprimenti la glicoproteina erpetica in condizioni basali; infatti, in queste cellule, per effetto della vOX2, le citochine infiammatorie risultano aumentate mentre quella inibitoria risulta diminuita. Viceversa, un aumento dell'mRNA del recettore inibitorio viene osservato nelle cellule attivate con IFN $\gamma$  in accordo con la soppressione del loro fenotipo infiammatorio.

Oltre ad interferire con l'espressione ed il rilascio di citochine, la vOX2 modula anche l'attività fagocitica dei macrofagi primari. I risultati qui riportati (Paragrafo 6.9) mostrano che la glicoproteina erpetica promuove la fagocitosi nelle cellule in condizioni basali mentre la inibisce nelle medesime cellule attivate con IFN $\gamma$ , in perfetto accordo con i dati relativi alla modulazione delle citochine infiammatorie.

Nel complesso, analizzando gli effetti della vOX2 sulla produzione di citochine e sull'attività fagocitica nei MØ primari, si evince che la funzione immunomodulatoria esercitata dalla glicoproteina erpetica sui monociti-macrofagi risulta strettamente dipendente dallo stato di attivazione cellulare. Infatti, la vOX2 sembrerebbe mediare un segnale di tipo attivatorio nelle cellule macrofagiche in condizioni basali mentre eserciterebbe un effetto inibitorio sulle cellule attivate.

Del resto questo stesso dualismo è stato messo in evidenza anche dall'analisi dei risultati preliminari dei *microarray*, che fra l'altro hanno confermato l'effetto della vOX2 sulla modulazione dell'espressione dei geni del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$ . Infatti, in merito alla regolazione dell'espressione genica cellulare da parte della glicoproteina erpetica, si osserva che molti geni codificanti proteine implicate nell'infiammazione e nell'immunità innata, ma anche nella trasduzione del segnale e nella proliferazione cellulare sono indotti in condizioni basali. Al contrario, gli stessi geni, insieme ad altri strettamente correlati, risultano essere repressi nelle cellule attivate.

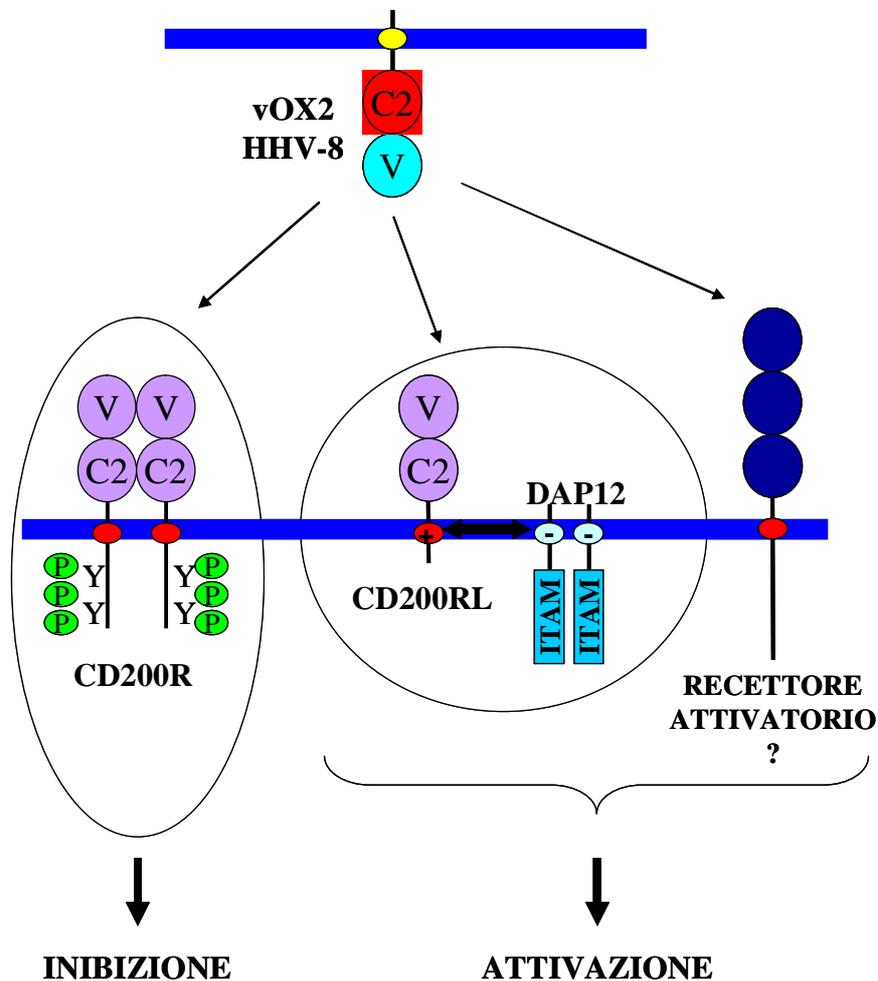
Presumibilmente, l'effetto inibitorio sulla produzione di citochine e sull'attività fagocitica nonché sull'espressione genica in generale, osservato in condizioni di attivazione cellulare, è dipendente dall'interazione della vOX2 con il recettore CD200R, in perfetto accordo con i dati presenti in letteratura (Figura 29) [Foster-Cuevas M. et al., 2004].

La vOX2 interferisce anche con la capacità dei monociti-macrofagi di presentare eventuali antigeni intracellulari ed extracellulari alle cellule T, ostacolando in questo modo lo sviluppo delle risposte immunitarie adattative specifiche. Infatti, la glicoproteina erpetica riduce l'espressione delle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (HLA di classe I e II), preposte alla presentazione antigenica, sulla superficie cellulare dei MØ primari. Verosimilmente, tale effetto si esplica a livello di proteina dal momento che i geni degli HLA non sembrano essere modulati dalla glicoproteina erpetica, come mostrato nei risultati dei *microarray* (Paragrafo 6.11). Questa ridotta espressione degli HLA per effetto della vOX2 è rilevabile sia in condizioni basali che in condizioni di attivazione cellulare; quindi, a differenza di quanto osservato per le citochine infiammatorie e per la fagocitosi, in questo caso l'attività della glicoproteina erpetica risulta essere la stessa indipendentemente dallo stato in cui si trovano le cellule.

Questo suggerisce che i meccanismi molecolari che mediano gli effetti della vOX2 nelle cellule monocito-macrofagiche possano essere molteplici.

In conclusione, la vOX2 di HHV-8 sembra appartenere a quel gruppo di proteine virali che sono implicate nei meccanismi di evasione delle risposte immunitarie per la sua capacità di esercitare un effetto anti-infiammatorio ed immunosoppressivo nei monociti-macrofagi attivati [Rezaee S.A. et al., 2006]. Tuttavia, alla luce dei risultati di questa tesi, si può affermare che questa classificazione non è pienamente corretta

dal momento che la glicoproteina erpetica può promuovere, in condizioni normali, sia l'infiammazione che le risposte immunitarie innate che vedono coinvolti i monociti-macrofagi, principalmente stimolando la produzione di citochine pro-infiammatorie da parte di queste cellule e promuovendone l'attività fagocitica. Pertanto, si può ipotizzare l'esistenza di almeno un altro recettore in grado di interagire con la vOX2 che competerebbe con il recettore inibitorio CD200R, già caratterizzato, trasferendo un segnale attivatorio nelle cellule bersaglio. Fra i recettori candidati ci sarebbe l'isoforma potenzialmente attivatoria del CD200R, il CD200RL, che, attraverso l'interazione con l'adattatore DAP12, potrebbe controbilanciare la cascata di segnali innescata dal recettore inibitorio (Figura 29) [Wright G.J. et al., 2003]. In alternativa, la vOX2 potrebbe interagire con uno dei tanti recettori attivatori della superfamiglia delle immunoglobuline che sono espressi sulla superficie dei monociti-macrofagi (Figura 29) [Dietrich J. et al., 2000].



**Figura 29** Modello rappresentativo dei potenziali recettori bersaglio della glicoproteina vOX2 di HHV-8 presenti sulla superficie dei monociti-macrofagi.

D'altra parte, questa nostra ipotesi aiuterebbe a spiegare i dati contrastanti presenti in letteratura in quanto attribuisce alla vOX2 la capacità sia di esercitare una funzione pro-infiammatoria che di mediare un effetto inibitorio sui monociti-macrofagi in relazione all'attivazione cellulare.

Nel contesto della lesione del KS, la vOX2 potrebbe inizialmente stimolare i monociti-macrofagi a produrre citochine infiammatorie [Chung Y.H. et al., 2002]. In questo modo, la glicoproteina erpetica eserciterebbe un ruolo diretto nella genesi del sarcoma in quanto contribuirebbe a creare quel microambiente infiammatorio che rappresenta il *primum movens* per l'innescamento del KS, favorendo così la proliferazione delle cellule endoteliali nelle lesioni del sarcoma ed il loro differenziamento a *spindle cells*. D'altra parte, le citochine stesse mediano il reclutamento nel sito d'infezione di linfociti e monociti circolanti che sono bersaglio d'infezione litica da parte di HHV-8 promuovendo in questo modo la disseminazione del virus nell'ospite [Monini P. et al., 1999]. Di contro, l'attivazione dei macrofagi per effetto dello stato infiammatorio caratteristico del KS può favorire l'eliminazione delle cellule liticamente infettate da HHV-8. Di conseguenza, la capacità della vOX2 di indurre un segnale inibitorio nei macrofagi attivati, riducendo la secrezione di citochine infiammatorie e compromettendo l'attività fagocitica, può rientrare fra i meccanismi di immunoevasione adottati dal virus [Foster-Cuevas M. et al., 2004]. In tal caso, la glicoproteina erpetica contribuirebbe indirettamente alla sarcomogenesi in quanto favorirebbe la produzione di nuova progenie virale e quindi la disseminazione e la persistenza del virus nell'ospite. Inoltre, ostacolando l'eliminazione delle cellule infettate grazie alla sua azione inibitoria sui monociti-macrofagi, la vOX2 può promuovere i circuiti di stimolazione paracrina attivati dalla vGPCR che sono essenziali per lo sviluppo del KS [Montaner S. et al., 2003].

Allo scopo di confermare questa capacità della vOX2 di avere una funzione pro-infiammatoria e/o anti-infiammatoria in relazione allo stato d'attivazione cellulare, la prospettiva futura sarà quella di verificare innanzitutto l'effetto della glicoproteina erpetica sulla modulazione di altre citochine, incluse quelle che giocano un ruolo importante nello sviluppo del KS (ad esempio IL-12, IL-6, IFN $\gamma$ ), nei M $\emptyset$  primari non stimolati oppure stimolati con IFN $\gamma$ .

Dopodiché, sarebbe interessante identificare il recettore e/o i recettori potenzialmente responsabili della trasduzione di un segnale attivatorio nelle cellule monocito-macrofagiche da parte della vOX2.

## 8. ABBREVIAZIONI

AIDS	Sindrome da Immunodeficienza Acquisita
APS	ammonio persolfato
BGH	<i>Bovine Growth Hormone</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
cDNA	DNA complementare
CFDA	Carbossi-fluoresceina diacetato
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
cPPT	<i>central Poly-Purine Tract</i>
C <sub>T</sub>	<i>Threshold Cycle</i>
DEPC	dietilpirocarbonato
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
dNTPs	desossiribonucleotidi
eGFP	<i>enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EDTA	acido etilendiamminotetracetico
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FITC	Isotiocianato di fluoresceina
FW	<i>Forward</i>
GAPDH	Gliceraldeide 3-fosfato deidrogenasi
hCMV	Citomegalovirus Umano
HPB	<i>Hepes Phosphate Buffer</i>
HHV-8	Herpesvirus Umano di tipo 8
HIV-1	Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HRP	<i>Horse-Radish Peroxidase</i>
KS	Sarcoma di Kaposi
IC	citochine infiammatorie
IE	<i>Immediate-Early</i>
IFN $\gamma$	Interferone gamma
IL-1 $\beta$	Interleuchina 1 beta
IL-6	Interleuchina 6
IL-10	Interleuchina 10
IL-12	Interleuchina 12
LB	<i>Laemli Buffer</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>

MCD	Malattia Multicentrica di Castleman
mRNA	RNA messaggero
MULV	Virus della Leucemia Murina di Moloney
OD	Densità Ottica
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
pb	paia di basi
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PEL	Linfoma ad effusione primaria
p/v	peso su volume
R	sequenza ripetuta
rpm	rivoluzioni per minuto
RRE	<i>Rev Responsive Element</i>
RSV	Virus del Sarcoma di Rous
RV	<i>Reverse</i>
SC	<i>Spindle cells</i>
SDS	sodio dodicil solfato
SIN	<i>Self-Inactivating</i>
STAT4	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 4</i>
SV40	Virus Vacuolante della Scimmia
TBE	Tris Borato EDTA
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>
TPA	tetradecanoilforbolo acetato
TNF $\alpha$	fattore di necrosi tumorale alfa
U3	sequenza unica in 3'
U5	sequenza unica in 5'
VSV	Virus della Stomatite Vescicolare
v/v	volume su volume
WPRE	<i>Woodchuck Hepatitis C Virus Post-transcriptional Regulatory Element</i>

## 9. BIBLIOGRAFIA

Akula S.M., Naranatt P.P., Walia N.S., Wang F.Z., Fegley B. and Chandran B., 2003. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) infection of human fibroblast cells occurs through endocytosis. *J. Virol.* 77: 7978-7990.

Akula S.M., Pramod N.P., Wang F.Z. and Chandran B., 2002. Integrin alpha3beta1 (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV-HHV8) entry into the target cells. *Cell* 108: 407-419.

Arvanitakis L., Geras-Raaka E., Varma A., Gershengorn M.C., and Cesarman E., 1997. Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation. *Nature* 385: 347-350.

Arvanitakis L., Mesri E.A., Nador R.G., Said J.W., Asch A.S., Knowles D.M. and Cesarman E., 1996. Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harbouring Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV8) in the absence of Epstein-Barr virus. *Blood* 88: 2648-2654.

Bais C., Santomaso B., Coso O., Arvanitakis L., Raaka E.G., Gutkind J.S., Asch A.S., Cesarman E., Gershengorn M.C. and Mesri E.A., 1998. G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature* 391: 86-89.

Ballestas M.E., Chatis P.A. and Kaye K.M., 1999. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science* 284: 641-644.

Barclay A.N., 2003. Membrane proteins with immunoglobulin-like domains – a master superfamily of interaction molecules. *Semin. Immunol.* 15: 215-223.

Barclay A.N., Wright G.J., Brooke G., and Brown M.H., 2002. CD200 and membrane protein interactions in the control of myeloid cells. *Trends Immunol.* 23: 285-290.

Barillari G. and Ensoli B., 2002. Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Clin. Microbiol. Rev.*, 15: 310-326.

Bechtel J., Grundhoff A. and Ganem D., 2005. RNAs in the virion of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 79: 10138-10146.

Bechtel J.T., Liang Y., Hvidding J. and Ganem D., 2003. Host range of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J. Virol.* 77: 6474-6481.

Belanger C., Gravel A., Tomoiu A., Janelle M.E., Gosselin J., Tremblay M.J. and Flamand L., 2001. Human herpesvirus 8 viral FLICE-inhibitory protein inhibits Fas-mediated apoptosis through binding and prevention of procaspase-8 maturation. *J. Hum. Virol.* 4: 62-73.

Blasig C., Zietz C., Haar B., Neipel F., Esser S., Brockmeyer N.H., Tschachler E., Colombini S., Ensoli B. and Sturzl M., 1997. Monocytes in Kaposi's sarcoma lesions are productively infected by human herpesvirus 8. *J. Virol.* 71: 7963-7968.

Bshoff C. and Chang Y., 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: a new DNA tumor virus. *Annu. Rev. Med.* 52: 453-470.

Burger M., Burger J.A., Hoch R.C., Oades Z., Takamori H. and Schraufstatter I.U., 1999. Point Mutation Causing Constitutive Signaling of CXCR2 Leads to Transforming Activity Similar to Kaposi's Sarcoma Herpesvirus-G Protein-Coupled Receptor. *J. Immunol.* 15: 2017-2022.

Cai X., Lu S., Zhang Z., Gonzalez C.M., Damania B. and Cullen B.R., 2005. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 5570-5575.

Chang Y., Cesarman E., Pessin M.S., Lee F., Culpepper J., Knowles D.M. and Moore P.S., 1994. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science* 266: 1865-1869.

Chang Y., Moore P.S., Talbot S.J., Bshoff C.H., Zarkowska T., Godden-Kent, Paterson H., Weiss R.A. and Mittnacht S., 1996. Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature* 382: 410-411.

Cherwinski H.M., Murphy C.A., Joyce B.L., Bigler M.E., Song Y.S., Zurawski S.M., Moshrefi M.M., Gorman D.M., Miller K.L., Zhang S., Sedgwick J.D. and Phillips J.H., 2005. The CD200 receptor is a novel and potent regulator of murine and humane mast cell function. *J. Immunol.* 174: 1348-1356.

Chung Y.H., Means R.E., Choi J., Lee B.S. and Jung J.U., 2002. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus OX2 glycoprotein activates myeloid-lineage cells to induce inflammatory cytokine production. *J. Virol.* 76: 4688-4698.

Cirone M., Lucania G., Bergamo P., Trivedi P., Frati L. and Faggioni A., 2007. Human herpesvirus 8 (HHV-8) inhibits monocyte differentiation into dendritic cells and impairs their immunostimulatory activity. *Immunol. Lett.* 113: 40-46.

Clark M.J., Gagnon J., Williams A.F. and Barclay A.N., 1985. MRC OX-2 antigen: a lymphoid/neuronal membrane glycoprotein with a structure like a single immunoglobulin light chain. *EMBO J.* 4: 113-118.

Conrad N.K. and Steitz J.A., 2005. A Kaposi's sarcoma virus RNA element that increases the nuclear abundance of intronless transcripts. *EMBO J.*, 18: 1831-1841.

Coscoy L. and Ganem D., 2000. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 8051-8056.

Coscoy L. and Ganem D., 2001. A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation. *J. Clin. Invest.* 107: 1599-1606.

Coscoy L., 2007. Immune evasion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 391-401.

Couty J.P., Geras-Raaka E., Weksler B.B. and Gershengorn M.C., 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor signals through multiple pathways in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276: 33805-33811.

Couty J.P. and Gershengorn M.C., 2004. Insights into the viral G protein-coupled receptor encoded by human herpesvirus type 8 (HHV-8). *Biol. Cell.*, 96: 349-354.

Decker L.L., Shankar P., Khan G., Freeman R.B., Dezube B.J., Lieberman J. and Thorley-Lawson D.A., 1996. The Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV) is present as an intact latent genome in KS tissue but replicates in the peripheral blood mononuclear cells of KS patients. *J. Exp. Med.* 184: 283-288.

Deng H., Liang Y. and Sun R., 2007. Regulation of KSHV lytic gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 312: 157-183.

Di Lorenzo G., Konstantinopoulos P.A., Pantanowitz L., Di Trolio R., De Placido S. and Dezube B.J., 2007. Management of AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Lancet Oncol.* 8: 167-176.

Dietrich J., Nakajima H. and Colonna M., 2000. Human inhibitory and activating Ig-like receptors which modulates the function of myeloid cells. *Microbes Infect.* 2: 323-329.

Direkze S. and Laman H., 2004. Regulation of growth signalling and cell cycle by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genes *Int. J. Exp. Path.* 85: 305–319.

Dourmishev L.A., Dourmishev A.L., Palmeri D., Schwartz R.A. and Lukac D.M., 2003. Molecular Genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 175-212.

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

Ensoli B. and Sturzl M., 1998. Kaposi's sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9: 63–83.

Ensoli B., Sgadari C., Barillari G., Sirianni M.C., Sturzl M. and Monini P., 2001. Biology of Kaposi's sarcoma. *Eur. J. Cancer* 37: 1251-1269.

Ensoli B., Sturzl M. and Monini P., 2000. Cytokine-mediated growth promotion of Kaposi's sarcoma and primary effusion lymphoma. *Semin. Cancer Biol.* 10: 367-381.

Fiorelli V., Gendelman R., Samaniego F., Markham P.D. and Ensoli B., 1995. Cytokines from activated T cells induce normal endothelial cells to acquire the phenotypic and functional features of AIDS-Kaposi's sarcoma spindle cells. *J. Clin. Invest.* 95: 1723-1734.

Follenzi A., Ailles L.E., Bakovic S., Geuna M. and Naldini L., 2000. Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat. Genet.* 25: 217-222.

Foster-Cuevas M., Wright G.J., Puklavec M.J., Brown M.H. and Barclay A.N., 2004. Human herpesvirus 8 K14 protein mimics CD200 in down-regulating macrophage activation through CD200 receptor. *J. Virol.* 78: 7667-7676.

French A.R., Sjolín H., Kim S., Koka R., Yang L., Young D.A., Cerboni C., Tomasello E., Ma A., Vivier E., Karre K. and Yokoyama W.M., 2006. DAP12 signaling directly augments proliferative cytokine stimulation of NK cells during viral infections. *J. Immunol.*, 15: 4981-4990.

Friberg J. Jr, Kong W., Hottiger M.O. and Nabel G.J., 1999. p53 inhibition by the LANA protein of KSHV protects against cell death. *Nature* 402: 889-894.

Fuld S., Cunningham C., Klucher K., Davison A.J. and Blackbourn D.J., 2006. Inhibition of interferon signalling by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus full-length viral interferon regulatory factor 2 protein. *J. Virol.*, 80: 3092-3097.

Fujimuro M., Wu F.Y., ApRhys C., Kajumbula H., Young D.B., Hayward G.S. and Hayward S.D., 2003. A novel viral mechanism for dysregulation of beta-catenin in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latency. *Nat. Med.* 9: 300-306.

Ganem D., 2007. Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus. "*Fields Virology*" 5<sup>th</sup> ed. (Knipe D.M., Howley P.M., Griffin D.E., Lamb R.A., Martin M.A., Roizman B. and Straus S.E.). Lippincott Williams and Wilkins.

Gao S.J., Boshoff C., Jayachandra S., Weiss R.A., Chang Y. and Moore P.S., 1997. KSHV ORF K9 (vIRF) is an oncogene that inhibits the interferon signaling pathway. *Oncogene* 15: 1979-1985.

Garber A.C., Hu J. and Renne R., 2002. Latency-associated nuclear antigen (LANA) cooperatively binds to two sites within the terminal repeats, and both sites contribute to the ability of LANA to suppress transcription and to facilitate DNA replication. *J. Biol. Chem.* 277: 27401-27411.

Garber A.C., Shu M.A., Hu J. and Renne R., 2001. DNA binding and modulation of gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 75: 7882-7892.

Gessain A. and Duprez R., 2005. Spindle cells and their role in Kaposi's sarcoma. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37: 2457-2465.

Gorczyński R.M., 2005. CD200 and its receptor as targets for immunoregulation. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 6: 483-488.

Gorczyński R.M., Catral M.S., Chen Z., Hu J., Lei J., Min W.P., Yu G. and Ni J., 1999. An immunoadhesin incorporating the molecule OX-2 is a potent immunosuppressant that prolongs allo- and xenograft survival. *J. Immunol.* 163: 1654-1660.

Gorczyński R.M., Chen Z., Yu K. and Hu J., 2001. CD200 immunoadhesion suppresses collagen-induced arthritis in mice. *Clin. Immunol.* 101: 328-334.

Grundhoff A. and Ganem D., 2001. Mechanisms governing expression of the v-FLIP gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 75: 1857-1863.

Gwack Y., Hwang S., Lim C., Won Y.S., Lee C.H. and Choe J., 2002. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50 stimulates the transcriptional activity of STAT3. *J. Biol. Chem.* 277: 6438-6442.

Hatherley D. and Barclay A.N., 2004. The CD200 and CD200 receptor cell surface proteins interact through their N-terminal immunoglobulin-like domains. *Eur. J. Immunol.* 34: 1688-1694.

Hatherley D., Cherwinski H.M., Moshref M. and Barclay A.N., 2005. Recombinant CD200 protein does not bind activating proteins closely related to CD200 receptor. *J. Immunol.* 175: 2469-2474.

Hayward G.S., 2003. Initiation of angiogenic Kaposi's sarcoma lesions. *Cancer cell* 3: 1-3.

Hengge U.R., Ruzicka T., Tyring S.K., Stuschke M., Roggendorf M., Schwartz R.A. and Seeber S., 2002. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestation, and therapy. *Lancet Infect. Dis.* 2: 281-292.

Hengge U.R., Ruzicka T., Tyring S.K., Stuschke M., Roggendorf M., Schwartz R.A. and Seeber S., 2002. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease, and pleural effusion lymphoma. *Lancet Infect. Dis.* 2: 344-352.

Hoek R.M., Ruuls S.R., Murphy C.A., Wright G.J., Goddard R., Zurawski S.M., Blom B., Homola M.E., Streit W.J., Brown M.H., Barclay A.N. and Sedgwick J.D., 2000. Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290: 1768-1771.

Holst P.J., Luttichau H.R., Schwartz T.W. and Rosenkilde M.M., 2003. Virally encoded chemokines and chemokine receptors in the role of viral infections. *Contrib. Microbiol.*, 10: 232-252.

Holst P.J., Rosenkilde M.M., Manfra D., Chen S.C., Wiekowski M.T., Holst B., Cifire F., Lipp M., Schwartz T.W. and Lira S.A., 2001. Tumorigenesis induced by the HHV8-encoded chemokine receptor requires ligand modulation of high constitutive activity. *J. Clin. Invest.* 108: 1789-1796.

Inoue N., Winter J., Lal R.B., Offermann M.K. and Koyano S., 2003. Characterization of entry mechanisms of human herpesvirus 8 by using an RTA-dependent reporter cell line. *J. Virol.* 77: 8147-8152.

Jenmalm M.C., Cherwinski H., Bowman E.P., Phillips J.H. and Sedgwick J.D., 2006. Regulation of myeloid cell function through the CD200 receptor. *J. Immunol.* 176: 191-199.

Jenner R.G. and Boshoff C., 2002. The molecular pathology of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Biochim. Biophys. Acta* 1602: 1-22.

Jensen K.K. and Lira S., 2004. Chemokines and Kaposi's sarcoma. *Semin. Cancer Biol.* 14: 187-194.

Joo C.H., Shin Y.C., Gack M., Wu L., Levy D. and Jung J.U., 2007. Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3. *J. Virol.*, 81: 8282-8292.

Kaleeba J.A. and Berger E.A., 2006. Kaposi's Sarcoma Associated Herpesvirus Fusion-Entry Receptor: Cystine Transporter xCT. *Science* 311: 1921-1924.

Kaul R., Verma S.C. and Robertson E.S., 2007. Protein complexes associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded LANA. *Virology*, 364: 317-329.

Kirshner J.R., Staskus K., Haase A., Lagunhoff M. and Ganem D., 1999. Expression of the open reading frame 74 (G-protein-coupled receptor) gene of Kaposi's sarcoma (KS)-associated herpesvirus: implications for KS pathogenesis. *J. Virol.* 73: 6006-6014.

Krishnan H.H., Sharma-Walia N., Zeng L., Gao S.J. and Chandran B., 2005. Envelope glycoprotein gB of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is essential for egress from infected cells. *J. Virol.* 79: 10952-10967.

Lagunoff M. and Ganem D., 1997. The structure and coding organization of the genomic termini of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Virology* 236: 147-154.

Langlais C.L., Jones J.M., Estep R.D. and Wong S.W., 2006. Rhesus rhadinovirus R15 encodes a functional homologue of human CD200. *J. Virol.* 80: 3098-3103.

Li M., Lee H., Yoon D.W., Albrecht J.C., Fleckenstein B., Neipel F. and Jung J.U., 1997. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J. Virol.* 71: 1984-1991.

Liang Y. and Ganem D., 2004. RBP-J (CSL) is essential for activation of the K14/vGPCR promoter of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by the lytic switch protein RTA. *J. Virol.* 78: 6818-6826.

Liang Y., Chang J., Lynch S.J., Lukac D.M. and Ganem D., 2002. The lytic switch protein of KSHV activates gene expression via functional interaction with RBP-Jkappa (CSL), the target of the Notch signalling pathway. *Genes Dev.* 16: 1977-1989.

Matta H., Surabhi R.M., Zhao J., Punj V., Sun Q., Schamus S., Mazzacurati L. and Chaudhary P.M., 2007. Induction of spindle cell morphology in human vascular endothelial cells by human herpesvirus 8-encoded viral FLICE inhibitory protein K13. *Oncogene*, 26: 1656-1660.

McCormick C. and Ganem D., 2005. The kaposin B protein of KSHV activates the p38/MK2 pathway and stabilizes cytokine mRNA. *Science* 307: 739-741.

Monini P., Carlini F., Franco M. and Ensoli B., 1999. Retrovirus ed herpesvirus nella patogenesi del sarcoma di Kaposi. *GIMMOC* 3: 136-150.

Monini P., Colombini S., Sturzl M., Goletti D., Cafaro A., Sgadari C., Buttò S., Franco M., Leone P., Fais S., Leone P., Melucci-Vigo G., Chiozzini C., Carlini F., Ascherl G., Cornali E., Zietz C., Ramazzotti E., Ensoli F., Andreoni M., Pezzotti P., Rezza G., Yarchoan R., Gallo R.C. and Ensoli B., 1999. Reactivation and persistence of human herpesvirus-8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma. *Blood* 93: 4044-4058.

Montaner S., Sodhi A., Molinolo A., Bugge T.H., Sawai E.T., He Y., Li Y., Ray P.E. and Gutkind J.S., 2003. Endothelial infection with KSHV genes in vivo reveals that vGPCR initiates Kaposi's sarcomagenesis and can promote the tumorigenic potential of viral latent genes. *Cancer Cell* 3: 23-36.

Montaner S., Sodhi A., Pece S., Mesri E.A. and Gutkind J.S., 2001. The kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor promotes endothelial cell survival through the activation of Akt/protein kinase B. *Cancer Res.* 61: 2641-2648.

Montaner S., Sodhi A., Servitja J.M., Ramsdell A.K., Barac A., Sawai E.T. and Gutkind J.S., 2004. The small GTPase Rac1 links the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus vGPCR to cytokine secretion and paracrine neoplasia. *Blood*, 104: 2903-2911.

Moore P.S. And Chang Y., 2003. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immunoevasion and tumorigenesis: two sides of the same coin?. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 609-639.

Murphy M.P., Ha N.K., Xiang C., Chen Y., Gillim L., Yarchoan R., Meltzer P., Bittner M., Trent J. and Zeichner S., 2001. Transcription program of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). *J. Virol.* 75: 4843-4853.

Nador R.G., Cesarman E., Chadburn A., Dawson D.B., Ansari M.Q., Sald J. and Knowles D.M., 1996. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Blood* 88: 645-656.

Nicholas J., 2003. Human herpesvirus-8-encoded signalling ligands and receptors. *J. Biomed. Sci.* 10: 475-489.

Nishimoto N., Kishimoto T. and Yoshizaki K., 2000. Anti-interleukin 6 receptor antibody treatment in rheumatic disease. *Ann. Rheum. Dis.*, 59: i21-27.

Offermann M.K., 2007. Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded interferon regulator factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 312: 185-209.

Parolin C., Dorfman T., Palù G., Gottlinger H. and Sodroski J., 1994. Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J. Virol.* 68: 3888-3895.

Parolin C., Taddeo B., Palù G. and Sodroski J., 1996. Use of cis- and trans- acting viral regulatory sequences to improbe expression of human immunodeficiency virus vectors in human lymphocytes. *Virology* 222: 415-422.

Pertel P.E., 2002. Human herpesvirus 8 Glycoprotein B (gB), gH and gL can mediate cell fusion. *J. Virol.* 76: 4390-4400.

Polson A.G., Wang D., DeRisi J. and Ganem D., 2002. Modulation of host gene expression by the constitutively active G protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Cancer Res.* 62: 4525-4530.

Pratt C.L., Estep R.D. and Wong S.W., 2005. Splicing of rhesus rhadinovirus R15 and ORF74 bicistronic transcripts during lytic infection and analysis of effects on production of vCD200 and vGPCR. *J. Virol.* 79: 3878-3882.

Preston S., Wright G.J., Starr K., Barclay A.N. and Brown M.H., 1997. The leucocyte/neuron cell surface antigen OX2 binds to a ligand on macrophages. *Eur. J. Immunol.* 27: 1911-1918.

Prota A.E., Campbell J.A., Schelling P., Forrest J.C., Watson M.J., Peters T.R., Aurrand-Lions M., Imhof B.A., Dermody T.S. and Stehle T., 2003. Crystal structure of human junctional adhesion molecule 1: implications for reovirus binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 5366-5371.

Radkov S.A., Kellam P. and Boshoff C., 2000. The latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat. Med.* 6: 1121-1127.

Rappocciolo G., Jenkins F.J., Hensler H.R., Piazza P., Jais M., Borowski L., Watkins S.C., Rinaldo C.R. Jr., 2006. DC-SIGN is a receptor for human herpesvirus 8 on dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.* 176: 1741-1749.

Renne R., Barry C., Dittmer D., Compitello N., Brown P.O. and Ganem D., 2001. Modulation of cellular and viral gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus. *J. Virol.* 75: 458-468.

Renne R., Blackbourn D., Whitby D., Levy J. and Ganem D., 1998. Limited transmission of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J. Virol.*, 72: 5182-5188.

Renne R., Lagunoff M., Zhong W. and Ganem D., 1996. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J. Virol.* 70: 8151-8154.

Rezaee S.A., Cunningham C., Davison A.J. and Blackbourn D.J., 2006. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview. *J. Gen. Virol.* 87: 1781-1804.

Rezaee S.A., Gracie J.A., McInnes I.B. and Blackbourn D.J., 2005. Inhibition of neutrophil function by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vOX2 protein. *AIDS* 19: 1907-1910.

Rivas C., Thlick A.E., Parravicini C., Moore P.S. and Chang Y., 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell specific latent viral protein that inhibits p53. *J. Virol.* 75: 429-438.

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. and Moore P.S., 1996. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14862–14867.

Sadler R., Wu L., Forghani B., Renne R., Zhong W., Herndier B. and Ganem D., 1999. A complex translational program generates multiple novel proteins from the latently expressed kaposin (K12) locus of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 73: 5722-5730.

Said W., Chien K., Takeuchi S., Tasaka T., Asou H., Cho S.K., De Vos S., Cesarman E., Knowles D.M. and Koeffler H.P., 1996. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV or HHV8) in primary effusion lymphoma; ultrastructural demonstration of herpesvirus in lymphoma cells. *Blood* 87: 4937-4943.

Samaniego F., Markham P.D., Gendelman R., Watanabe Y., Kao V., Kowalski K., Sonnabend J.A., Pintus A., Gallo R.C. and Ensoli B., 1998. Vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor present in Kaposi's sarcoma are induced by inflammatory cytokines and synergize to induce vascular permeability and KS lesion development. *Am. J. Pathol.* 152: 1433-1443.

Sarid R., Flore O., Bohenzky R.A., Chang Y. and Moore P.S., 1998. Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). *J. Virol.* 72: 1005-1012.

Schulz T.F., 2001. KSHV/HHV8-associated lymphoproliferations in the AIDS setting. *Eur. J. Cancer*, 37: 1217-1226.

Schwarz M. and Murphy P.M., 2001. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor constitutively activates NF- $\kappa$ B and induces proinflammatory cytokine and chemokine production via a C-terminal signaling determinant. *J. Immunol.* 167: 505-513.

Shiratori I., Yamaguchi M., Suzukawa M., Yamamoto K., Lanier L.L., Saito T. and Arase H., 2005. Down-regulation of basophil function by human CD200 and human herpesvirus-8 CD200. *J. Immunol.* 175: 4441-4449.

Smith H.R., Heusel J.W., Mehta I.K., Kim S., Dorner B.G., Naidenko O.V., Iizuka K., Furukawa H., Beckman D.L. and Pingel J.T., 2002. Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer activation receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 8826-8831.

Sodhi A., Montaner S. and Gutkind J.S., 2004. Does dysregulated expression of a deregulated viral GPCR trigger Kaposi's sarcomagenesis? *FASEB J.* 18: 422-427.

Sodhi A., Montaner S., Patel V., Zohar M., Bais C., Mesri E.A. and Gutkind J.S., 2000. The kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor up-regulates vascular endothelial growth factor expression and secretion through mitogen-activated protein kinase and p38 pathways acting on hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Cancer Res.* 60: 4873-4880.

Spear P.G., and Longnecker R., 2003. Herpesvirus entry: an update. *J. Virol.* 77: 10179-10185.

Spiller O.B., Blackbourn D.J., Mark L., Proctor D.G. and Blom A.M., 2003. Functional activity of the complement regulator encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Biol. Chem.* 278: 9283-9289.

Stine J.T., Wood C., Hill M., Epp A., Raport C.J., Schweickart V.L., Endo Y., Sasaki T., Simmons G., Boshoff C., Clapham P., Chang Y., Moore P., Gray P.W. and Chantry D., 2000. KSHV-encoded CC chemokine vMIP-III is a CCR4 agonist, stimulates angiogenesis, and selectively chemoattracts TH2 cells. *Blood* 95: 1151-1157.

Sun Q., Matta H. and Chaudhary P.M., 2003. The human herpesvirus 8-encoded viral FLICE-inhibitory protein protects against growth factor withdrawal-induced apoptosis via NF-kappa B activation. *Blood* 101: 1956-1961.

Swanton C., Mann D.J., Fleckenstein B., Neipel F., Peters G. and Jones N., 1997. Herpes viral Cyclin/cdk6 complexes evade inhibition by cdk inhibitor proteins. *Nature* 390: 184-187.

Talbot S.J., Weiss R.A., Kellam P. and Boshoff C., 1999. Transcriptional analysis of human herpesvirus-8 open reading frames 71, 72, 73, K14 and 74 in primary effusion lymphoma cell line. *Virology* 257: 84-94.

Trus B.L., Heymann J.B., Nealon K., Cheng N., Newcomb W.W., Brown J.C., Kedes D.H. and Steven A.C., 2001. Capsid structure of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, a gammaherpesvirus, compared to those of an alphaherpesvirus, herpes simplex virus type 1, and a betaherpesvirus, cytomegalovirus. *J. Virol.* 75: 2879-2890.

Vieites J.M., De la Torre R., Ortega M.A., Montero T., Peco J.M., Sanchez-Pozo A., Gil A. and Suarez A., 2003. Characterization of human cd200 glycoprotein receptor gene located on chromosome 3q12-13. *Gene* 311: 99-104.

Wang F.Z., Akula S.M., Pramod N.P., Zeng L. and Chandran B., 2001. Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein K8.1A interaction with the target cells involves heparan sulphate. *J. Virol.* 75: 7517-7527.

Wang F.Z., Akula S.M., Sharma-Walia N., Zeng L. and Chandran B., 2003. Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein B mediates cell adhesion via its RGD sequence. *J. Virol.* 77: 3131-3147.

Wang H.W. and Boshoff C., 2005. Linking Kaposi virus to cancer associated cytokines. *Trends Mol. Med.* 11: 309-312.

Wright G.J., Cherwinski H., Foster-Cuevas M., Brooke G., Puklavec M.J., Bigler M., Song Y., Jenmalm M., Gorman D., McClanahan T., Liu M.R., Brown M.H., Sedgwick J.D., Philips J.H. and Barclay A.N., 2003. Characterization of the CD200 receptor family in mice and humans and their interactions with CD200. *J. Immunol.* 171: 3034-3046.

Wright G.J., Jones M., Puklavec M.J., Brown M.H. and Barclay A.N., 2001. The unusual distribution of the neuronal/lymphoid cell surface CD200 (OX2) glycoprotein is conserved in humans. *Immunology* 102: 173-179.

Wright G.J., Puklavec M.J., Willis A.C., Hoek R.M., Sedgwick J.D., Brown M.H. and Barclay A.N., 2000. Lymphoid/neuronal cell surface OX2 glycoprotein recognizes a novel receptor on macrophages implicated in the control of their function. *Immunity* 13: 3034-3046.

Yang T.Y., Chen S.C., Leach M.W., Manfra D., Homey B., Wiekowski M., Sullivan L., Jenh C.H., Narula S.K., Chensue S.W. and Lira S.A., 2000. Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by human herpesvirus 8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi's sarcoma. *J. Exp. Med.* 191: 445-454.

Yu Y., Wang S.E. and Hayward G.S., 2005. The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteasome-mediated degradation. *Immunity* 22: 59-70.

Zeng L., Planelles V., Sui Z., Gartner S., Maggirwar S.B., Dewhurst S., Ye L., Nerurkar V.R., Yanagihara R. and Lu Y., 2006. HIV-1 based defective lentiviral vectors efficiently transduce human monocytes-derived macrophages and suppress replication of wild-type HIV-1. *J. Gen. Med.* 8: 18-28.

Zhang S. and Philips J.H. 2006. Identification of tyrosine residues crucial for CD200R-mediated inhibition of mast cell activation. *J. Leukoc. Biol.* 79: 363-368.

Zhang S., Cherwinski H.M., Sedgwick J.D. and Phillips J.H., 2004. Molecular mechanism of CD200 inhibition of mast cell activation. *J. Immunol.* 173: 6786-6793.

Zhong W. and Ganem D., 1997. Characterization of ribonucleoprotein complexes containing an abundant polyadenylated nuclear RNA encoded by kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *J. Virol.* 71: 1207-1212.

Zhu F.X., Chong J.M., Wu L. and Yuan Y., 2005. Virion proteins of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 79: 800-811.

Zhu F.X., King S.M., Smith E.J., Levy D.E. and Yuan Y., 2002. A Kaposi's sarcoma-associated herpesviral protein inhibits virus-mediated induction of type I interferon by blocking IRF-7 phosphorylation and nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 16: 5573-5578.

Zhu F.X., Li X., Zhou F., Gao S.J. and Yuan Y., 2006. Functional characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF45 by bacterial artificial chromosome-based mutagenesis. *J. Virol.* 80: 12187-12196.

Zufferey R., Dull T., Mandel R.J., Bukovsky A., Quiroz D., Naldini L. and Trono D., 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* 72: 9873-9880.