

*Alla mia famiglia,
perché senza di voi non sarei mai arrivato così lontano*



Università degli Studi di Ferrara

DOTTORATO DI RICERCA IN
"FARMACOLOGIA E ONCOLOGIA MOLECOLARE"

CICLO XXI

COORDINATORE Prof. Pier Andrea Borea

Analisi delle proprietà immunologiche e
carcinogeniche di
Epstein-Barr Nuclear Antigen 1

Settore Scientifico Disciplinare BIO/10

Dottorando
Dott. Marescotti Diego

Tutore
Prof. Gavioli Riccardo

(firma)

(firma)

Anni 2006/2008

INDICE

Introduzione	2
Materiali e metodi	20
Introduzione allo studio.....	28
Scopo della ricerca “studio immunogenicità”	29
Risultati e discussione “studio immunogenicità”	30
Conclusioni “studio immunogenicità”	39
Scopo della ricerca “studio carcinogenicità”	42
Risultati e discussione “studio carcinogenicità”	43
Conclusioni “studio carcinogenicità”	51
Bibliografia	53
Lista delle pubblicazioni.....	56
Ringraziamenti.....	57

INTRODUZIONE

I virus causa di diverse patologie umane

I virus sono microrganismi intracellulari in grado di infettare cellule viventi e di moltiplicarsi al loro interno utilizzando gli enzimi della cellula ospite, inclusi quelli coinvolti nella sintesi proteica e nella sintesi dell'acido nucleico, andando così ad interferire con le normali funzioni cellulari. Dopo l'ingresso nella cellula ospite, i virus possono provocare danno tissutale e diverse patologie, portando anche alla morte della cellula stessa, si parla in questo caso di infezione litica. Alcuni virus hanno anche la capacità di stabilire un'infezione latente, durante la quale si insediano nella cellula ospite e in essa producono le proteine virali necessarie alla sopravvivenza, o integrando il proprio materiale genetico nel genoma dell'ospite o mantenendo il proprio genoma in forma episomale ¹. Il nostro organismo risponde all'infezione virale, cercando di neutralizzare e distruggere le cellule infettate, attraverso l'immunità innata e l'immunità cellulo mediata, o specifica. Il principale meccanismo dell'immunità innata è rappresentato da cellule natural killer che, senza stimolazione antigenica specifica, sono in grado di lisare le cellule infettate; in alternativa la riproduzione virale viene inibita per mezzo di interferoni, prodotti da linfociti o da fagociti. Meccanismi di difesa dell'immunità specifica sono invece mediati da anticorpi e linfociti T, in grado di assicurare risposte immuni sufficienti, nella maggioranza dei casi, al controllo o all'eliminazione dell'infezione. In particolare un ruolo chiave è svolto dai linfociti T citotossici (CTL) che possono riconoscere e quindi uccidere cellule che presentano proteine non-self ².

Meccanismi di evasione della risposta immunitaria da parte di un virus

Il sistema immunitario controlla e protegge l'organismo da agenti estranei; un ruolo fondamentale in questo è svolto dai linfociti T citotossici².

I virus, per eludere questa difesa, hanno sviluppato molteplici meccanismi di escape virale, che permettono l'ingresso e il mantenimento nelle cellule del virus stesso. Una delle vie maggiormente colpite è il pathway ubiquitina-proteasoma³, che genera frammenti peptidici poi presentati sulla superficie cellulare delle molecole del maggior complesso d'istocompatibilità di classe I (MHC-I). Le proteine virali agiscono direttamente sull'espressione delle molecole di MHC di classe I e per la maggior parte provocano una

riduzione dell'espressione di queste molecole sulla superficie cellulare mediando la loro internalizzazione o degradazione ⁴.

Un'altra strategia utilizzata dai virus per eludere il sistema immunitario è quella di interferire con i processi di proteolisi o di trasporto degli antigeni virali, interferendo con l'attività del proteasoma o di altre peptidasi coinvolte nella generazione di peptidi antigenici. Questo meccanismo porterebbe alla formazione di epitopi errati, incapaci di legarsi al trasportatore TAP (transporter associated with antigen processing) e di essere poi veicolati all'interno del reticolo endoplasmatico o essere legati all'MHC-I.

Un ulteriore potenziale meccanismo di escape virale è la down-regolazione di TAP, dato che un minor trasporto di peptidi antigenici all'interno del reticolo endoplasmatico si traduce in una riduzione della formazione di complessi MHC-I/peptide riconosciuti dai CTL

⁵.

I linfociti T citotossici

I linfociti T citotossici sono cellule responsabili dell'immunità specifica o acquisita, deputate al riconoscimento e all'eliminazione delle cellule estranee, tumorali, o infettate da virus. I linfociti T vengono prodotti nel midollo osseo e poi migrano al timo dove maturano e poi entrano nel circolo sanguigno ¹. I linfociti T si dividono in tre gruppi: linfociti T helper in grado di richiamare ed attivare altri linfociti; linfociti T soppressori e linfociti T citotossici. I linfociti T per mezzo di un recettore di superficie detto TCR (T cell receptor) sono in grado di riconoscere antigeni non self, quando vengono presentati sulla superficie di cellule nucleate, in associazione alle molecole di MHC. Esistono due diverse classi di molecole MHC (di classe I e II); gli antigeni processati dal proteasoma si legano alle molecole MHC di classe I e vengono riconosciuti dai linfociti T citotossici, mentre gli antigeni processati da lisosomi si legano alle molecole MHC di classe II che vengono riconosciute dai recettori dei linfociti T helper, che in seguito si attivano e producono citochine, con la funzione di stimolare l'attivazione dei macrofagi e il differenziamento dei linfociti B. L'interazione del complesso MHC/peptide col recettore TCR, contemporaneamente all'interazione di molecole accessorie del linfocita con molecole costimolatorie espresse sulla superficie delle antigen presenting cells (APC), ha come effetto finale l'attivazione del linfocita T citotossico (CTL) che uccide la cellula infettata o tumorale ².

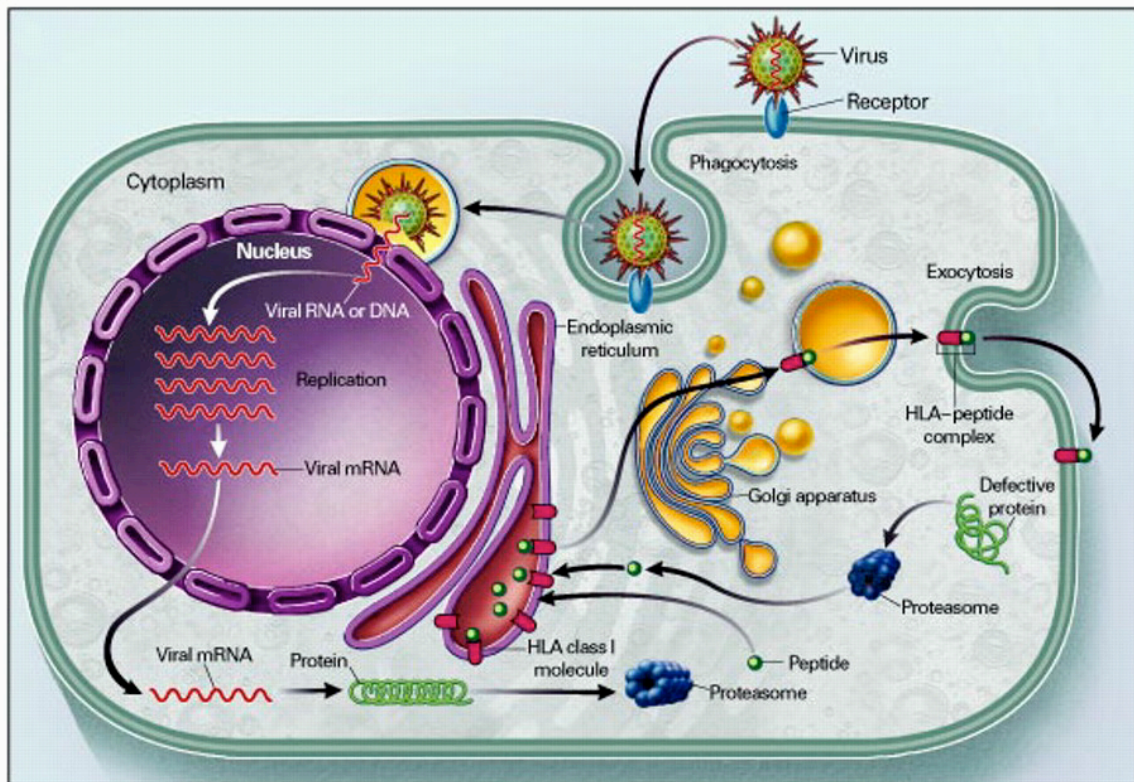


Figura 1. Processing e presentazione degli antigeni in cellule infettate da virus.

Le proteine virali sintetizzate nel citoplasma della cellula ospite vengono degradate dal proteasoma e associate alle molecole di MHC di classe I. Il complesso MHC-I/peptide virale presentato sulla superficie della cellula infettata viene riconosciuto dai linfociti T citotossici specifici.

Generazione dei ligandi per le molecole di MHC di classe I

I ligandi per le molecole di MHC-I sono generati, nella maggioranza dei casi, dal proteasoma 26S, un complesso proteolitico che svolge un ruolo fondamentale nella degradazione delle proteine e nella regolazione di numerose funzioni cellulari^{6, 7}. Il proteasoma 26S è una proteasi presente nel citoplasma e nel nucleo di tutte le cellule nucleate e per svolgere le sue funzioni richiede energia sotto forma di ATP⁸. È formato da un core 20S ad attività proteolitica associato a 2 complessi regolatori^{6, 9}. Il regolatore più comunemente associato al core 20S è il complesso 19S (detto anche PA700). Il regolatore 19S è deputato al riconoscimento delle proteine ubiquitinate e alla loro successiva deubiquitinazione. Ogni subunità del 19S si associa alle subunità del core 20S e il complesso che ne risulta è chiamato 26S.

Sotto stimolo dell'IFN- γ , una citochina immunomodulatoria secreta dalle cellule T e dai natural killer (NK) durante le risposte immuni, il complesso regolatorio 19S viene sostituito da quello 11S detto anche PA28. Questo complesso permette alle proteine di accedere

più facilmente alla camera proteolitica del proteasoma^{6, 8, 10}. Le tre subunità catalitiche del proteasoma, associate a tre diverse attività peptidasiche⁶, sotto stimolo dell'IFN- γ , vengono sostituite da altre subunità dette *low molecular weight protein* (LMP) caratterizzate da una diversa attività proteolitica^{6, 8}. Il proteasoma che presenta queste subunità indotte dall'IFN- γ è definito immunoproteasoma⁶.

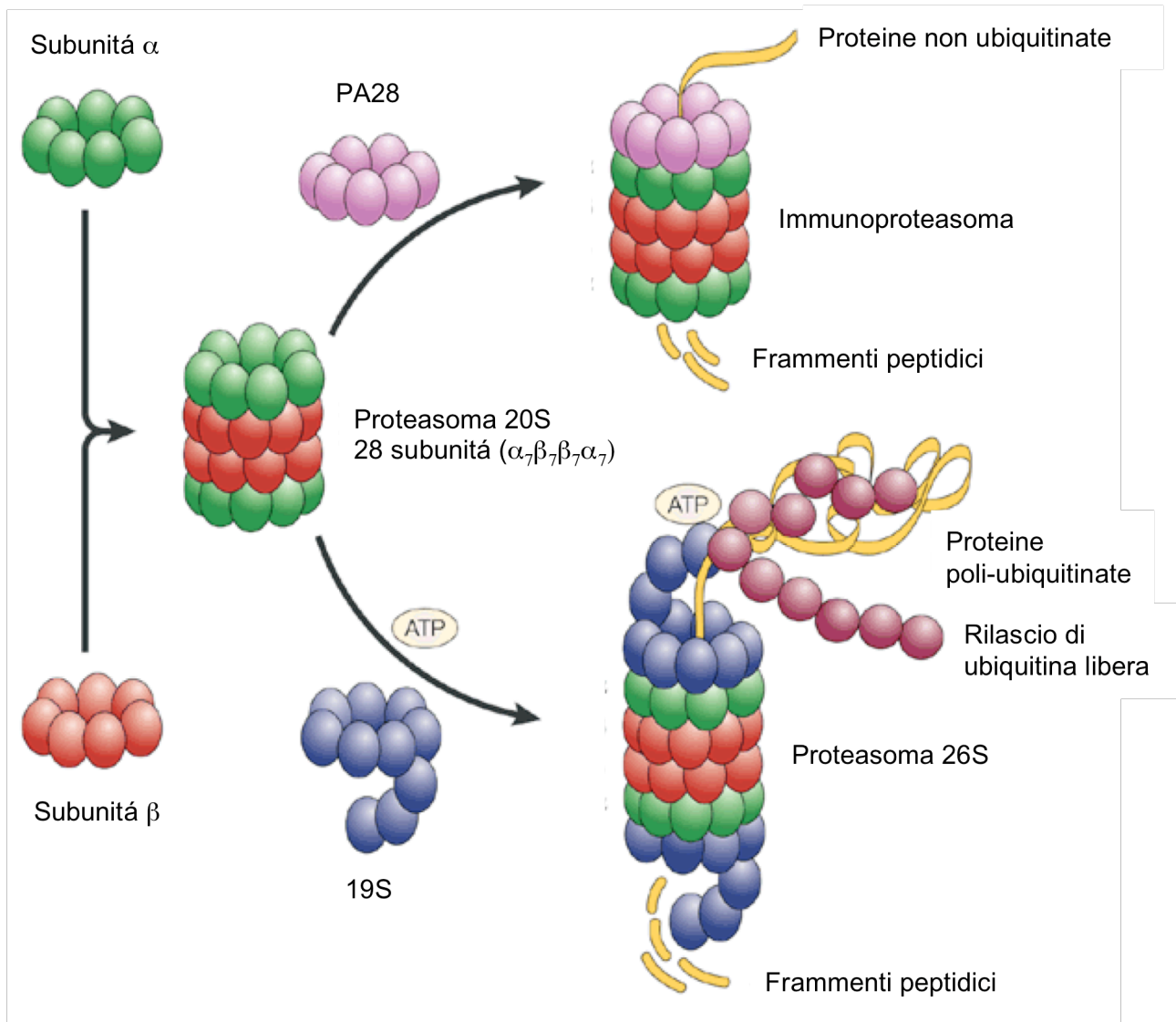


Figura 2. Strutture e composizione del proteasoma 26S e dell'immunoproteasoma.

L'immunoproteasoma ha un ruolo chiave nella formazione di peptidi antigenici che vengono associati a molecole di MHC-I e presentati ai linfociti T citotossici (CTL). Infatti, accanto alla degradazione di proteine danneggiate e di proteine ad attività regolatoria, la

generazione di peptidi antigenici è l'altra importante funzione del proteasoma che viene quindi ad avere un ruolo fondamentale nel processo noto col nome di *antigen processing*. Affinché una proteina sia degradata dal proteasoma è necessaria la sua coniugazione ad una catena a più monomeri di ubiquitina, una piccola proteina globulare ubiquitaria e altamente conservata di 8 KDa, costituita da 76 aa^{6, 8}.

Molecole del maggior complesso di istocompatibilità' di classe I

Le molecole di MHC di classe I, note anche con il nome di HLA (human leucocyte antigen), sono formate da una catena α associata in modo non covalente ad un polipeptide denominato β_2 -microglobulina. Sono costituite da una tasca extracellulare per il legame del peptide, una regione tipo Ig che contiene una sequenza di legame per il corecettore CD8 dei CTL, un segmento transmembrana ed una regione citoplasmatica. La tasca di legame per il peptide ha due pareti formate da α -eliche ed un pavimento costituito da un foglietto β ad otto nastri antiparalleli; è chiusa alle due estremità e può quindi accogliere peptidi di lunghezza non superiore a 8-11 aminoacidi (Figura 3).

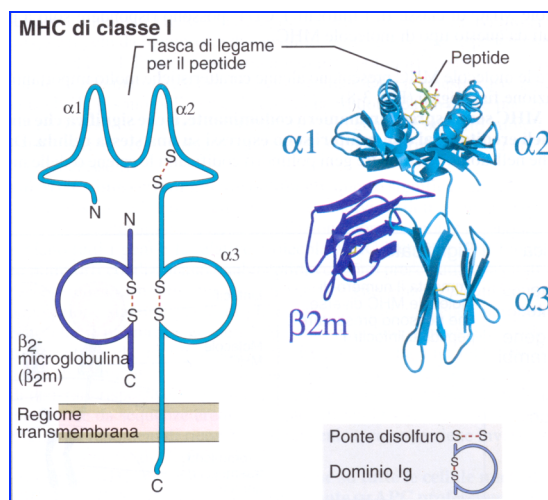


Figura 3. Struttura dell'MHC di classe I

Studi effettuati sulle molecole di HLA hanno dimostrato come sia possibile individuare il sito di binding del peptide. Il *binding motif* è la sequenza aminoacidica caratteristica di ogni allele di classe I e per ogni singolo HLA di classe I si può identificare la posizione specifica per ogni peptide. È stato dimostrato che ogni allele dell'HLA lega un set di peptidi con caratteristiche simili e, in particolare, si sono identificati in precise posizioni del peptide

aminoacidi identici o affini, presenti nelle posizioni 2 e 9 e chiamate posizioni “ancore”. Questi aminoacidi determinano per ogni HLA un caratteristico e conservato binding motif dei diversi peptidi che potranno legare^{6, 11, 12}.

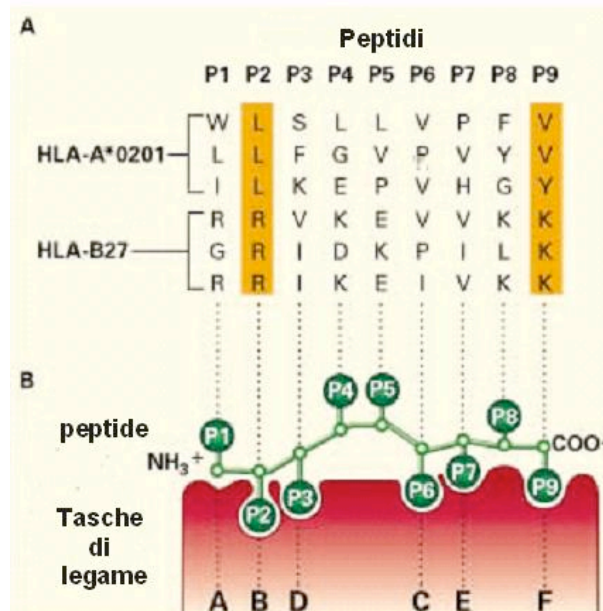


Figura 4 A) Esempi di binding motif per le molecole di HLA-A2 e A24: le ancore primarie sono evidenziate in arancione. **B)** Rappresentazione schematica della tasca di legame delle molecole di MHC-I.

Il virus di Epstein-Barr (EBV)

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è un γ -herpes virus umano con spiccato tropismo per i linfociti B^{13, 14, 15, 16, 17}. Rappresenta l'agente eziologico di un numero crescente di tumori tra i quali il linfoma di Hodgkin, il linfoma di Burkitt, il carcinoma nasofaringeo e linfomi immunoblastici. Il genoma virale di EBV è costituito da una molecola di DNA a doppio filamento lineare di 172 kbp, racchiuso da un nucleocapside con 162 capsomeri, un envelope esterno e tra di essi una proteina tegumento.

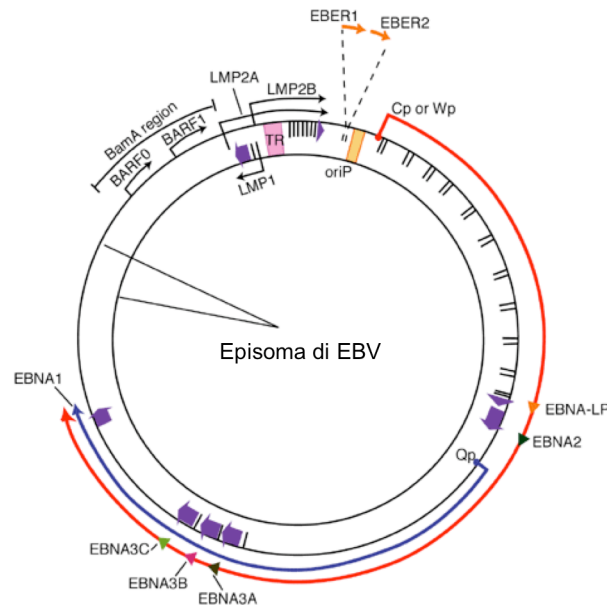


Figura 5. Genoma di EBV

L'infezione primaria si verifica principalmente durante l'infanzia, ma può avvenire anche durante l'adolescenza o nell'età adulta. Il virus è in grado di penetrare nella cellula bersaglio grazie all'interazione di una glicoproteina dell'envelope (gp350) con un recettore presente sulla superficie della cellula (il recettore CD21/CR2). All'interno della cellula ospite il virus mantiene il proprio genoma a livello episomale, dando inizio al ciclo virale. In seguito all'infezione primaria, il virus permane all'interno dei linfociti B dell'uomo, in un iniziale stato di latenza asintomatico. Ci sono infatti due distinti stadi dell'infezione virale: una prima fase, detta di latenza, e una seconda fase, nota come fase litica. Il sito primario della replicazione virale non è nei linfociti B, ma nell'epitelio orofaringeo, dove il virus stabilisce una persistente infezione delle cellule epiteliali, attraverso un continuo ciclo di infezione, replicazione virale e nuove infezioni. Durante la fase primaria dell'infezione tutte le proteine latenti primarie sono espresse in numero limitato e il genoma è mantenuto ad un numero costante di copie. L'infezione latente è una caratteristica comune a tutti gli herpes virus e, durante questo stadio dell'infezione, il virus esprime sei antigeni nucleari (EBNA 1-6), tre proteine latenti di membrana (LMP1, LMP2A, LMP2B) e due RNAs non poliadenilati EBERs (EBV-encoded RNAs) e BARTs (BamH1-A rightward transcripts) ¹³. La fase litica invece è caratterizzata da una notevole trascrizione di geni virali e dall'espressione di proteine virali precoci, come BZLF1, attivatori della replicazione, trans

attivatori, BMRF1 e BMLF1, una DNA polimerasi, una timidina chinasi, antigeni tardivi citoplasmatici e attivatori della maturazione dei virioni ¹⁶, che vengono rilasciati per la lisi della cellula ospite e sono in grado di originare un nuovo ciclo infettivo. I linfociti T citotossici svolgono un ruolo fondamentale nel controllo sia della fase primaria che della fase litica dell'infezione. Una caratteristica tipica di EBV è l'esistenza di tre diversi programmi di latenza (di tipo I, II o III), ognuno dei quali caratterizzato dall'espressione di specifici antigeni virali. Il programma di latenza III è caratterizzato dall'espressione dei sei antigeni nucleari di EBV e delle proteine latenti di membrana LMP1, LMP2A, LMP2B ¹⁶. Questo programma di latenza è contraddistinto dalla proliferazione autonoma delle cellule B ed è probabilmente necessario per espandere il pool iniziale di cellule infettate e per incrementare le possibilità per il virus di accedere al compartimento delle cellule memoria, è inoltre quello riscontrabile nelle cellule LCL (Lymphoblastoid cell line).

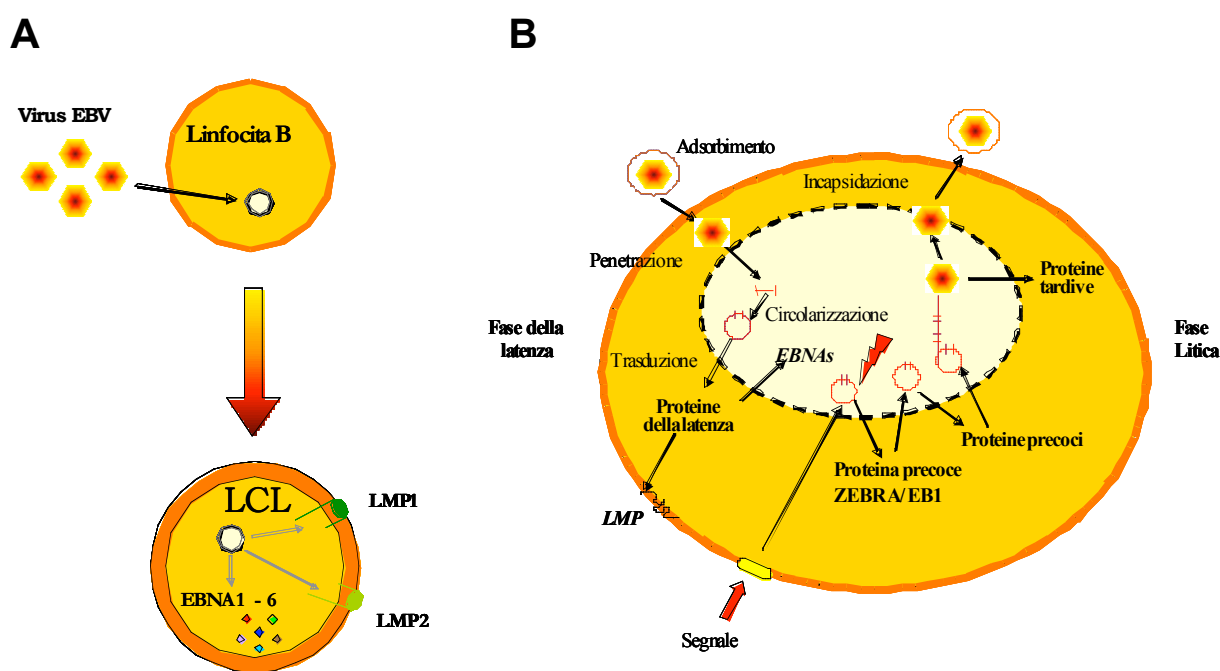


Figura 6. A) Infezione di un linfocita B da parte del virus di EBV ed espressione degli antigeni della latenza. **B)** Fasi del ciclo replicativo del virus di EBV

Il programma di latenza II è caratterizzato dall'espressione virale di EBNA1 ed LMP1; mentre il programma di latenza I dall'esclusiva espressione della proteina EBNA1 ¹⁸. Quello che accomuna i diversi programmi di latenza è l'espressione in ognuno di essi di EBNA1, la sola tra le proteine virali, che si riteneva non fosse target delle risposte immuni.

Geni virali ⇒		EBNA						LMP			Patologie
		1	2	3	4	5	6	1	2A	2B	
Programmi di latenza ⇒	I										Linfoma di Burkitt
	II	■						■	■	■	Linfoma di Hodgkin Carcinoma nasofaringeo
	III	■	■	■	■	■	■	■	■	■	Mononucleosi infettiva Linfomi delle cellule B in soggetti AIDS

Tabella 1. Antigeni espressi nei differenti programmi di latenza e relative patologie EBV-associate

Patologie associate ad EBV

Il virus di Epstein-Barr è stato il primo virus ad essere identificato come causa di tumori umani. EBV infetta circa il 90% della popolazione umana adulta, ma causa tumori solo in piccole percentuali tra le persone affette. Le patologie correlate ad EBV comprendono tumori a carico della linea linfoide e delle cellule epiteliali, come il linfoma di Burkitt, il linfoma di Hodgkin, il carcinoma nasofaringeo, linfomi immunoblastici ed altre patologie associate indirettamente ad EBV, come la sindrome di Sjögren, l'artrite reumatoide e la mononucleosi. Tutte le patologie associate ad EBV sono caratterizzate da uno specifico programma di latenza che prevede l'espressione di specifici antigeni virali. Caratteristica comune ai tumori indotti da EBV è l'espressione della proteina EBNA1, unico antigene sempre presente in ogni forma di latenza.

Linfoma di Burkitt (BL)

Il linfoma di Burkitt (BL) è un tumore a carico delle cellule B, con alta incidenza nella popolazione infantile delle aree tropicali dell'Africa e della Nuova Guinea. Esistono tre forme di BL: una forma endemica, una forma sporadica e una forma associata all'AIDS ¹⁶. La causa del BL è una traslocazione cromosomica a carico del gene c-myc, che viene traslocato dal cromosoma 8 al cromosoma 14, inducendo una overespressione del gene con conseguente proliferazione incontrollata dei linfociti B. All'overespressione del gene c-myc è associata una alterazione della proteolisi ubiquitina dipendente, una elevata

espressione ed attività del TPPII, che inattiva le colecistochinine ed ha attività endopeptidasica ed una downregolazione dell'espressione delle proteine di trasporto TAP1 e TAP2¹⁸. L'attività di c-myc di attivatore trascrizionale può inoltre contribuire alla deregolazione di una serie di geni cellulari coinvolti nel controllo del ciclo cellulare e dell'apoptosi. Nei linfomi di Burkitt è presente un programma di latenza di tipo I e solo la proteina EBNA1 è regolarmente espressa, mentre EBNA2 e LMP1, principali effettori dell'attivazione e dell'immortalizzazione delle cellule B, sono assenti; sono quindi assenti molecole di attivazione, di adesione e costimolatorie e le cellule affette da BL non sono in grado di presentare antigeni attraverso la via dell'MHC di classe I e sono incapaci di indurre risposte EBV-specifiche. Il turnover proteico rimane però ad elevati livelli, grazie alla presenza di altri sistemi enzimatici, quali enzimi deubiquitinanti, precursori della poliubiquitina e ubiquitina isopeptidasi. Inoltre c-myc, che viene degradato dal sistema ubiquitina-proteasoma in un arco di tempo di 20-30 minuti nelle cellule normali, nelle cellule affette da Burkitt viene degradato in un lasso di tempo maggiore da due a sei volte e studi recenti hanno dimostrato come esso si sia stabilizzato nelle cellule tumorali.

Linfoma di Hodgkin (HL) e carcinoma nasofaringeo (NPC)

Il linfoma di Hodgkin è un tumore nel 90% dei casi EBV positivo. Questo tumore colpisce i linfonodi e può diffondere facilmente attraverso il sistema linfatico ai vari organi e tessuti. Nel linfoma di Hodgkin è espresso il programma di latenza II e sono presenti le proteine EBNA1, LMP1, LMP2A e LMP2B. Nel HD (Hodgkin's disease) si riscontra un'elevata espressione di antigeni di attivazione e di antigeni dell'MHC II. In pazienti affetti da carcinoma nasofaringeo (NPC) si è riscontrata una significativa depressione delle risposte CTL-EBV specifiche. Il carcinoma nasofaringeo colpisce le cellule epiteliali presenti sulla superficie del nasofaringe e può essere di tre tipi: a cellule squamose, non cheratinizzato, o indifferenziato. E' una forma di tumore a prevalente incidenza nel sud della Cina, in Alaska e nelle regioni dell'est dell'Asia. Il carcinoma presenta un programma di latenza II, con espressione della proteina EBNA1 e della proteina LMP1, presentante però delle mutazioni nella propria sequenza, che ne limitano l'immunogenicità rispetto alla medesima proteina nelle LCL¹⁶. Diversi studi hanno rilevato che il pathway dipendente dal proteasoma/TAP per la presentazione dell'antigene rimane intatto nelle cellule tumorali nel linfoma di Hodgkin e nel carcinoma nasofaringeo.

possibilità che si generino i DRiPs (Detective Ribosomal Products), che sono substrato della degradazione del proteasoma. Nel complesso gli effetti del GAR limitano l'immunogenicità della proteina EBNA1, interferendo con la generazione degli epitopi CTL. Il processing della proteina EBNA1 da parte di una serin proteasi ²² potrebbe però separare il dominio GAR dalla proteina, rendendola così sensibile alla degradazione del proteasoma ²¹. Gli epitopi di EBNA1 non sono quindi il risultato della degradazione di proteine mature, ma potrebbero derivare dal processamento di proteine non correttamente sintetizzate o GAR delete. Inizialmente quindi EBNA1 era considerata una proteina non immunogenica, in quanto non erano state rilevate risposte citotossiche contro di essa, ma studi più recenti hanno dimostrato l'esistenza di alcuni epitopi di EBNA1, presentati da molecole MHC-I. L'esistenza di risposte citotossiche EBNA1 specifiche può essere spiegata attraverso un meccanismo di cross priming della proteina EBNA1 mediato dalle cellule dendritiche (DC)^{23, 24}. L'antigene esogeno viene fagocitato dalle DC ed epitopi derivati dalla proteina esogena vengono presentati alle cellule T naive, che vengono così indotte a proliferare e formano cloni CTL EBNA1 specifici. Quindi malgrado l'espressione stabile di EBNA1 nelle cellule B, si è visto che epitopi da essa derivanti sono processati e presentati alle cellule T CD8. Ulteriori studi hanno dimostrato che CTL memoria EBNA1 specifici possono essere riattivati in vitro, stimolando le cellule con linea linfoblastoide autologa (LCL autologa).

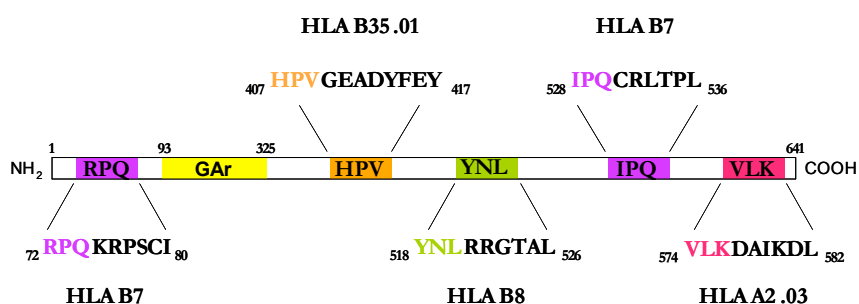


Figura 8. Epitopi noti di EBNA1 presentati dalle molecole di MHC-I.

Se la proteina EBNA1 full-length è espressa in modo endogeno, non si riscontrano risposte CTL specifiche, mentre si rilevano risposte citotossiche contro epitopi di EBNA1, quando la cellula DC viene pulsata con la proteina full-length esogena. La proteina full-length endogena risulta dunque protetta dalla degradazione del proteasoma per la presenza nel suo interno del dominio GAR; mentre la proteina esogena è soggetta a degradazione secondo un pathway proteasoma-indipendente, e ciò dà una spiegazione

all'esistenza di risposte CTL dirette contro epitopi da essa derivanti, quali IPQ₅₂₈₋₅₃₆ (IPQCRLTPL) e RPQ₇₂₋₈₀ (RPQKRPSCI), entrambi presentati dall'HLA-B7²³.

Sulla base di queste osservazioni ci si è poi chiesti se non sia possibile allo stesso modo indurre la processazione di EBNA1 full-length e la presentazione di epitopi da essa derivanti, pulsando cellule LCL con frammenti della proteina esogena, con e senza GAR nella loro sequenza e si sono riscontrate risposte CTL specifiche contro l'epitopo VLK₅₇₄₋₅₈₂ (VLKDAIKDL), presentato dall'HLA-A2²⁵. Per elucidare il meccanismo attraverso cui sono generati altri epitopi di EBNA1, quali YNL₅₁₈₋₅₂₆ (YNLRRGTAL) presentato dall'HLA-B8¹⁷ e HPV₄₀₇₋₄₁₇ (HPVGEADYFEY), presentato dall'HLA-B35²⁶ alcuni studiosi hanno pensato di trattare cellule LCL con inibitori del proteasoma, quali ZAL e lactacistina. Usando inibitori del proteasoma si blocca la degradazione endogena della proteina EBNA1 full-length, da parte del proteasoma, ma non si blocca la degradazione di EBNA1 nelle cellule epiteliali; quindi non è un'inibizione assoluta e si rilevano comunque risposte CTL contro gli epitopi YNL e HPV. Questi epitopi di EBNA1 quindi non possono derivare dalla proteina full-length, che non viene degradata, ma potrebbero essere il prodotto della rapida degradazione dei DRiPs; infatti se le cellule LCL vengono incubate con e senza cicloesimide, o con e senza emetina, due sostanze che sono inibitori della sintesi proteica, si vede che solo in presenza di questi inibitori non si rilevano risposte CTL specifiche. Ciò dimostra che cellule infettate da EBV possono direttamente presentare epitopi di EBNA1 alle cellule T, e la loro presentazione procede attraverso un pathway in cui il processamento endogeno degli epitopi è indipendente dalla degradazione della proteina full-length²⁶.

Nuovi approcci terapeutici nella lotta ai tumori

Negli ultimi anni si è fatta sempre più strada la prospettiva di strategie terapeutiche atte ad aumentare e potenziare il riconoscimento di cellule infettate e neoplastiche da parte del sistema immunitario; approcci terapeutici di questo tipo costituiscono nel complesso l'immunoterapia.^{27 28}

L'immunoterapia può essere di vari tipi: passiva cellulare; passiva umorale; specifica attiva. L'immunoterapia passiva cellulare basa il trattamento della patologia sull'uso di cellule effettrici specifiche, attivate, che vengono direttamente infuse nel paziente e non indotte o espanse nell'organismo, dall'esterno. Un tipico approccio terapeutico è l'isolamento e l'espansione della popolazione linfocitaria infiltrante il tumore che pertanto può avere una elevata specificità tumorale. L'espansione in vitro e la seguente reinfusione

di questi linfociti dovrebbe aumentare le risposte citotossiche contro il tumore. Un'altra modalità di immunoterapia cellulare passiva può essere l'uso di interferoni, che modula i sistemi di processing e presentazione degli antigeni, favorendo nel tumore l'immunogenicità di epitopi TAA (Tumor associated antigen) o TSA (Tumor specific antigen) derivati, causando quindi l'uccisione delle cellule tumorali da parte delle cellule effettrici. L'immunoterapia passiva di tipo umorale invece è contraddistinta dall'individuazione e generazione in vitro di anticorpi monoclonali diretti contro varie neoplasie ²⁹. In alcuni studi con anticorpi monoclonali murini diretti contro antigeni associati a melanomi e linfomi si sono rilevate risposte molto significative. Approcci più recenti però prevedono l'uso combinato di entrambi i meccanismi di immunoterapia passiva, e la realizzazione di complessi anticorpali a doppia specificità costituiti da un anticorpo che riconosce la cellula tumorale e legato ad un secondo anticorpo, che a sua volta riconosce una cellula effettrice citotossica, al fine di renderla maggiormente reattiva e specifica per il tumore. L'immunoterapia specifica attiva invece è un approccio terapeutico mirato ad indurre una immunità cellulare in un ospite che alla prima presentazione dell'antigene non è stato in grado di sviluppare un'efficiente risposta contro di esso. La procedura terapeutica prevede la presentazione di antigeni tumorali alle cellule effettrici dell'ospite. L'approccio più promettente si è rivelato la generazione di vaccini con antigeni tumorali ³⁰. Il maggiore vantaggio è l'efficacia della tecnica di immunizzazione e la facilità di valutazione delle risposte. Un numero sempre crescente di antigeni è stato fin'ora identificato come target di risposte CTL specifiche ³¹. L'immunità cellulare verso specifici antigeni può essere indotta pulsando in vitro cellule APC con peptidi specifici e introducendole poi per via endovenosa nell'organismo, al fine di generare risposte citotossiche specifiche per l'antigene presentato. Le cellule più efficaci nella presentazione degli antigeni e nel priming dei linfociti T sono le cellule dendritiche, utilizzate in diversi protocolli di immunizzazione. Ad esempio nell'ambito di tumori EBV-associati, si è visto che le DC pulstate con una proteina latente di membrana di EBV, LMP2 e poi reintrodotte nei linfonodi inguinali di pazienti con carcinoma nasofaringeo, sono in grado di generare una immunità CTL specifica che potrebbe indurre una regressione del tumore ²². Futuri approcci terapeutici potrebbero prevedere anche l'uso della proteina EBNA1, nel tentativo di risposte CTL per essa specifiche, perché questa proteina è spesso l'unico antigene presente in tutte le forme di latenza dei tumori EBV-associati. L'identificazione di epitopi di EBNA1 risulta dunque di notevole importanza, dal momento che essi rappresentano il target ottimale per nuove strategie di immunoterapia dirette contro i tumori associati al

virus di Epstein-Barr ¹⁵. e la generazione di specifiche risposte CTL dirette contro questi epitopi costituisce la possibilità di controllo dello switch tra la fase latente e la fase litica del ciclo virale e della successiva replicazione del virus all'interno della cellula ospite ¹⁷.

Specie reattive dell'ossigeno (ROS)

Le specie reattive dell'ossigeno, meglio note come ROS, sono piccole molecole derivanti dall'ossigeno che si generano tramite diverse reazioni partendo dalla produzione di superossido. I membri più noti e rappresentativi di questa famiglia sono: i radicali dell'ossigeno, gli idrossili, i perossili e alcune forme non radicali tra cui l'acido ipocloroso, l'ozono e l'idrogeno perossido ^{32, 33}.

I ROS interagiscono facilmente con un'ampia varietà di molecole, tra cui vi sono piccole molecole inorganiche, proteine, carboidrati, lipidi, e acidi nucleici. Tramite queste interazioni possono alterare e irreversibilmente danneggiare la struttura e la funzionalità delle suddette molecole; di conseguenza i ROS vengono considerati la principale causa di danno negli organismi biologici ³⁴⁻³⁶.

Considerando che l'evoluzione ha portato allo sviluppo di veri e propri sistemi biologici finalizzati alla regolazione dei livelli intra- ed extra-cellulari dei ROS è evidente come queste molecole svolgano anche altri ruoli essenziali per la funzionalità cellulare ^{37, 38}.

Il primo esempio ci viene dalle cellule del sistema immunitario ^{39, 40}, le quali utilizzando la produzione dei ROS per l'eliminazione d'agenti patogeni, proteggono l'organismo dal rischio di infezioni. Inoltre negli ultimi anni è apparso sempre più evidente come i ROS siano coinvolti nel signalling cellulare, infatti lo stato redox dei vari compartimenti cellulari può influenzare lo stato d'attivazione di alcuni enzimi, quali chinasi e fosfatasi, che a loro volta attivano o reprimono vari pathway di signalling cellulare ⁴¹.

Inizialmente i ROS erano ritenuti essere un sottoprodotto di altre reazioni biologiche, tuttavia sono stati identificati enzimi che hanno come primaria funzione quella di generare ROS in maniera controllata. Il primo enzima di questa famiglia ad esser stato scoperto è una NADPH oxidase (NOX) che è stato identificato nei fagociti. La successiva scoperta di altri membri della famiglia dei NOX ha evidenziato come il loro ruolo non sia legato alla sola fagocitosi, altri membri sono infatti localizzati in quasi ogni tipo di tessuto ⁴².

I membri della famiglia dei NOX

Tutti i membri della famiglia dei NOX sono proteina transmembrana che sono in grado di trasportare elettroni attraverso le membrane biologiche per ridurre l'ossigeno allo stato di

superossido. Caratteristiche strutturali comuni includono: 1) un sito di legame per il NADPH all'estremità C-terminale, 2) un sito di legame per il FAD, 3) sei domini transmembrana e 4) quattro siti di legame per il gruppo eme.

Il membro per eccellenza di questa famiglia è considerato il NOX2, noto anche come gp91phox, essendo il componente più studiato e caratterizzato⁴². Con il termine NOX2 si identifica in realtà la sola subunità catalitica del complesso enzimatico che risulta formato da diverse subunità. Questa subunità è inoltre caratterizzata da una modificazione post-traduzionale, risulta infatti altamente glicosilata ed in western blot è possibile detectare le diverse forme. Per quanto concerne invece la sua espressione, si trova prevalentemente localizzata nei fagociti ma è anche presente nelle cellule B, nei neuroni, nell'endotelio e nel muscolo liscio⁴³.

L'attivazione del complesso enzimatico avviene tramite una complessa serie di interazioni proteina-proteina. La subunità gp91phox è costitutivamente associata a livello citosolico con la p22phox che ha la funzione di stabilizzarla. Questo complesso migra a livello della membrana dove interagisce con altri fattori tra cui la forma fosforilata di p47phox che richiama a sua volta le subunità p67phox e p40phox. L'ultimo componente che viene coinvolto è la GTPase Rac. Una volta formato questo complesso, l'enzima risulta attivo ed in grado di trasferire elettroni da molecole di NADPH all'ossigeno⁴².

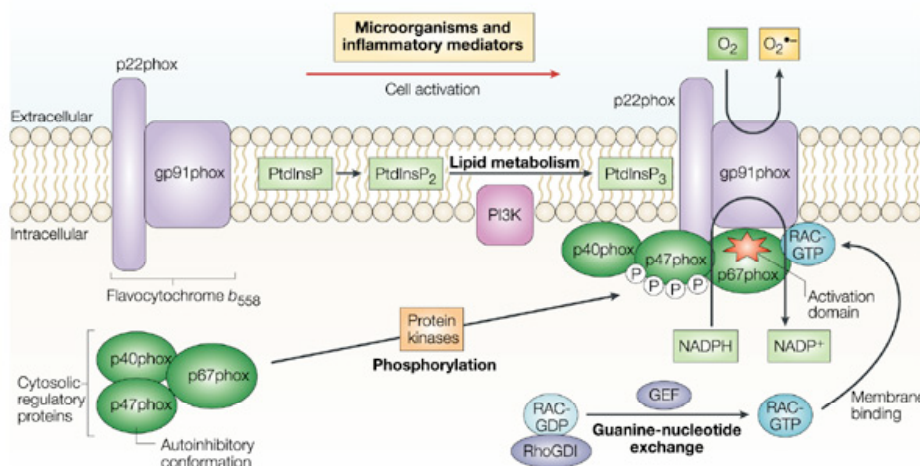


Figura 9. Struttura e meccanismo d'attivazione del complesso enzimatico NADPH ossidasi

Ad ulteriore conferma del ruolo di questo enzima in alcune cellule del sistema immunitario, si è scoperto che l'IFN- γ è in grado di indurre la trascrizione del gene della subunità catalitica (gp91phox) grazie alla presenza ad IREs (interferon responsive element) nella sequenza del promotore⁴⁴.

Danneggiamento e riparazione del DNA

Con il termine “DNA repair” si intende un insieme di processi tramite i quali la cellula identifica e corregge i danni subiti dal DNA. La capacità di una cellula nell’identificare e riparare i danni del proprio DNA risulta di vitale importanza per mantenere la corretta integrità genomica e quindi le sua funzionalità⁴⁵.

La maggior parte dei danni a carico del DNA compromettono direttamente la struttura primaria della molecola, comportando modificazioni chimiche dei singoli nucleotidi, che si può riflettere in una alterata organizzazione della doppia elica o un non corretto avvolgimento del DNA attorno agli istoni.

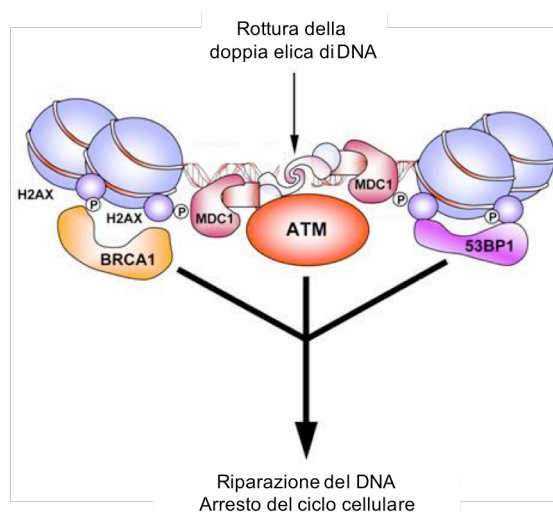


Figura 10. Complesso proteico coinvolto nella riparazione della rottura della doppia elica del DNA

Le principali cause che possono comportare danni al DNA sono suddivise in due categorie: endogene (ROS)⁴⁶ ed esogene (UV, radiazioni, tossine, agenti chimici)⁴⁷. Le tipologie di danno possono variare a seconda della causa, nel caso dei ROS è possibile riscontrare ossidazioni, alchilazioni o idrolisi delle basi azotate; mentre le cause esogene possono indurre dimerizzazione delle pirimidine, depurinazione e rottura dell’elica di DNA. Al fine di contrastare i numerosi eventi di danneggiamento del materiale genetico che la cellula subisce si sono evoluti una serie di meccanismi volti al controllo e al riconoscimento delle alterazioni del materiale genetico al fine di poterle riparare e consentire così il mantenimento dell’integrità genomica.

In base al tipo di danno subito vengono attivati diversi meccanismi di riparazione per il recupero e il mantenimento dell'informazione genetica, per esempio quando risulta possibile viene utilizzata l'elica complementare come stampo per riparare quella danneggiata. In questo caso si possono verificare tre diversi meccanismi: 1) Base excision repair (BER), 2) Nucleotide excision repair (NER) e 3) Mismatch repair (MMR) in base al tipo di danno che si è verificato su di una singola elica. Quando invece il danno colpisce entrambe le eliche di DNA vi sono due meccanismi di riparazione: 1) non homologous and joining (NHEJ), 2) recombinational repair⁴⁵.

Quando la frequenza degli eventi di danno al DNA superano la capacità della cellula di riconoscerli e ripararli allora l'accumulo di questi errori genetici possono portare ad una precoce senescenza, all'apoptosi o nel caso più grave allo sviluppo di cellule tumorali.

MATERIALI E METODI

Separazione del sangue periferico

Questa metodica è applicata per isolare i linfociti dal sangue umano, fornito dalla Banca del Sangue di Ferrara. Si procede stratificando il sangue su Ficoll e centrifugando; quello che si ottiene è un fondello costituito da globuli rossi e neutrofilii, un anello di PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) corrispondente principalmente a linfociti, monociti e plasma.

Per isolare i PBL (Peripheral Blood Leucocyte) si separa l'anello contenente i PBMC, lo si lava tre volte con PBS (Phosphate Buffer Solution) e si mettono le cellule in adesione in una fiasca per 90 minuti. I monociti restano adesi alla plastica, mentre i linfociti che sono nel surnatante vengono aspirati e piastrati in terreno RPMI 10% FCS Hyclone (inattivato a 57°C per 30 minuti).

Linee linfoblastoidi umane (LCL) trasformate con EBV

Si ottengono in vitro infettando i linfociti B dei donatori con il supernatante della linea cellulare B95.8. Si incubano i PBL per un'ora con il supernatante contenente il virus, una volta lavate poi si risospendono in terreno supplementato con 10% di FCS e si trattano per tre giorni con Ciclosporina A, al fine di eliminare i linfociti T presenti nella coltura. Si coltivano successivamente in RPMI 1640 arricchito con antibiotici (penicillina e streptomina) e L-Glutamina + 10% di Fetal Calf Serum (FCS).

Linee di blasti-PHA

Si ottengono a partire dai linfociti periferici trattati per tre giorni con PHA (fitoemoagglutinina) alla concentrazione di 1 mg/ml. Si lavano e si coltivano in RPMI con 10% di siero fetale bovino e 10 U/ml di IL-2 (Interleuchina 2).

Caratterizzazione dell'aplotipo dei donatori

I donatori sono stati tipizzati sierologicamente per le molecole di HLA di classe I dalla Dott.ssa Teresa Grappa della sezione di Genetica Medica del Dipartimento di Medicina Sperimentale e Diagnostica dell'Università di Ferrara.

Predizione epitopi

L'indagine delle possibili sequenze che possono avere elevata affinità per le molecole di HLA-A2 e A24 è stata eseguita utilizzando uno specifico programma di predizione di epitopi che si basa sul binding motif dei diversi HLA per valutare l'affinità della sequenza per la molecola indagata.

Il risultato è espresso tramite uno score che è indicativo del tempo d'emivita del complesso MHC-I/peptide. Il programma è un software free chiamato "HLA Peptide Binding Predictions" utilizzabile all'indirizzo web http://thr.cit.nih.gov/cgi-bin/molbio/ken_parker_comboform.

Peptidi

Tutti i peptidi utilizzati in questo studio sono stati sintetizzati e purificati dall'UFP del Dipartimento di Scienze Farmaceutiche dell'Università di Ferrara. Tali peptidi sono stati purificati tramite HPLC e presentano un grado di purezza maggiore del 98%. La sequenza aminoacidica di ogni peptide è stata confermata attraverso risonanza magnetica nucleare (NMR). I peptidi sono stati inizialmente solubilizzati in dimetilsolfossido (DMSO) alla concentrazione di 10^{-2} M e diluiti prima dell'uso con PBS.

Preparazione delle APC

Le cellule T2 vengono incubate overnight a 26°C in modo che esprimano alte quantità di molecole di MHC vuote sulla superficie cellulare; il giorno successivo vengono trattate con mitomicina C a 26°C per 1 ora per bloccarne la crescita; nel caso invece si utilizzino cellule dendritiche queste vengono trattate con mitomicina C per 1 ora a 37°C. Dopo il trattamento con mitomicina C, le cellule T2 e dendritiche vengono lavate due volte con RPMI per eliminare l'eccesso di mitomicina ed incubate con l'epitopo di interesse alla concentrazione 10^{-5} M. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C vengono lavate per eliminare l'epitopo che non si è legato, sospese in RPMI+10% FCS e piastrate in rapporto 1 a 20 con i CTL.

Generazione di colture CTL

I PBL ottenuti dal sangue periferico dei donatori vengono sospesi in RPMI 10% FCS Hyclone e piastrati in piastra da 24 pozzetti ad una concentrazione di $1,8 \times 10^6$ /ml. Questi linfociti poi verranno stimolati una volta ogni sette giorni per un totale di tre volte utilizzando protocolli sperimentali di stimolazione. In generale come stimolatori sono state

utilizzate LCL autologhe trattate con peptidi di sintesi oppure direttamente il solo peptide o i monociti pulsati con il peptide. Il giorno dopo la seconda stimolazione il terreno viene sostituito con RPMI addizionato di 10 U/ml di IL-2. La specificità di queste colture di CTL viene testata il giorno prima di ogni stimolazione con test di citotossicità.

Clonaggio

Per ottenere colture clonali si effettuano diluizioni seriali dei CTL della coltura policlonale al fine di piastrare 10, 5 ed 1 cellula per pozzetto in piastre da 96. Ad ogni pozzetto vengono poi aggiunti 1×10^5 PBMCs trattati con PHA ed irradiati con radiazioni γ . La cocultura viene mantenuta in terreno IL-2 che viene cambiato ogni 3 giorni. I cloni che proliferano sono poi testati singolarmente in test di citotossicità e quelli che presentano le risposte più elevate sono poi ulteriormente espansi.

Test di citotossicità

Si basa sulla valutazione del rilascio di ^{51}Cr da parte di cellule target precedentemente marcate ed incubate con cellule effettrici. Le cellule target si marcano con $0,1 \mu\text{C}/10^6$ cellule di $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ a 37°C per 1 ora in presenza o non di peptidi. Al termine dell'incubazione le cellule sono lavate tre volte, contate e valutate per la vitalità con il test di esclusione del Trypan blue. Le cellule target si pongono in piastre da 96 pozzetti assieme agli effettori in opportuni rapporti effettori/target. Dopo l'incubazione di 5h a 37°C si determina il rilascio di ^{51}Cr nel supernatante e questo è indice della percentuale di citotossicità. Il rilascio massimo di ^{51}Cr si valuta trattando le cellule target con Triton X-100, mentre il rilascio spontaneo delle cellule target è sempre inferiore al 20% di quello massimo. La radioattività contenuta nel surnatante di ogni campione si misura con un γ -counter e la percentuale di lisi specifica viene calcolata con la formula seguente:

$$\% \text{ lisi specifica} = \frac{\text{cpm campione} - \text{cpm spontaneo}}{\text{cpm massimo} - \text{cpm spontaneo}} \times 100$$

dove:

cpm: indica la misura in colpi per minuto del rilascio di Cr^{51} da parte del campione;

spontaneo: indica la misura del rilascio spontaneo di Cr^{51} da parte delle cellule target non trattate

massimo: indica la misura del rilascio massimo di Cr⁵¹ da parte delle cellule target trattate con Triton X-100.

Valutazione delle anomalie cromosomiche

Cellule in rapida fase di crescita sono trattate per 90 minuti con 30 ng/ml di colcemide (KaryoMAX® Invitrogen) per indurre arresto in metafase, lavate in una soluzione tampone ipotonica contenente 75mM di KCl, fissate su di un vetrino e colorate con una soluzione contenente DAPI (Vectashield®, Vector Labs). Cinquanta metafasi per ogni linea cellulare sono state valutate per la presenza di cromosomi dicentrici, frammenti cromosomici e rotture cromosomiche. Le immagini vengono poi ottenute tramite un microscopio a fluorescenza LEITZ-BMRB equipaggiato con una fotocamera ed in seguito analizzate con Adobe Photoshop®.

Determinazione di danni al DNA

L'analisi delle rotture della doppia elica del DNA è stata fatta tramite il "comet assay". $1 \cdot 10^5$ cellule vengono risospese in una soluzione di 1% agarosio e depositate su di un vetrino che viene posto a 4°C fino a solidificazione della matrice di agarosio. Si incuba poi in un tampone di lisi (2.5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris HCl, 0.5% Triton-X-100, 10% DMSO, pH 9.5) per 60 minuti. I vetrini vengono poi posti in una camera elettroforetica orizzontale immersi in un tampone di corsa (300mM sodium acetate, 100mM Tris HCl, pH 8.5), si applica una corrente di 25V per 25 minuti e al termine si lavano per 3 volte in un tampone neutralizzante (0.4M Tris, pH 7.5) e colorati con DAPI. Le immagini vengono poi ottenute tramite un microscopio a fluorescenza LEITZ-BMRB equipaggiato con una fotocamera ed in seguito analizzate con Adobe Photoshop®.

Risposte ai danni al DNA

L'attivazione della proteina ATM e la fosforilazione dell'istone H2AX sono stati detectati tramite immunofluorescenza. $3 \cdot 10^4$ cellule sono state depositate su di un vetrino tramite centrifugazione e fissate con una soluzione di formaldeide al 4% per 10 minuti. L'anticorpo primario anti-pH2AX o anti-ATM viene poi aggiunto overnight a 4°C. L'eccesso di anticorpo viene poi lavato con PBS ed in seguito viene aggiunto l'anticorpo secondario goat-anti-rabbit o goat anti-mouse IgG Alexa Fluor488. Le immagini vengono poi ottenute

tramite un microscopio a fluorescenza LEITZ-BMRB equipaggiato con una fotocamera ed in seguito analizzate con Adobe Photoshop®.

Quantificazione dei ROS

I livelli cellulari di ROS sono stati analizzati tramite Diclorofluorescina diacetato (DCFDA), un composto permeabile alla membrana cellulare che una volta ossidato diventa fluorescente. 1×10^6 di cellule sono state marcate per 45 minuti con una soluzione 2 μ M DCFDA in PBS e poi incubate overnight a 4°C. La fluorescenza è stata analizzata utilizzando un citofluorimetro FACScalibur (Becton–Dickinson). Dove indicato si sono utilizzate cellule trattate con 3.5 mM Ebselen (Ebs, Alexis Biochemicals) un mimetico dell'enzima glutatione perossidasi o con 1 mM di acido citrico.

RT-PCR

RNA totale è stato estratto da 4×10^6 di cellule lisandole in 0.5 ml di Trizol per 5 minuti in ghiaccio. Dopo aver aggiunto 0.1ml di cloroformio si è centrifugato per 5 minuti a 14.000 rpm, recuperata la fase acquosa è stata mescolata con 0.25ml di isopropanolo e centrifugata per 10 minuti a 14.000 rpm. Il pellet è stato lavato con etanolo al 70% e risospeso in acqua bidistillata. Per produrre i rispettivi cDNA è stata eseguita la retroscrizione utilizzando come primer oligo dT (0.05 mg/ml, Invitrogen) in modo da trascrivere i soli mRNA. Una volta ottenuta la libreria di cDNA tramite PCR semi-quantitativa si è andati a valutare i livelli di trascrizione dei geni d'interesse utilizzando il GAPDH come controllo. I primer utilizzati sono i seguenti: GAPDH: forward CAT CAC CAT CTT CCA GGA GC, reverse GAG TCC TTC CAC GAT ACC; NOX2: forward ATC CAT GGA GCT GAA CGA TTG, reverse CTC TGT CCA GTC CCC AAC GAT; GPX1: forward GAA CGC CAA GAA CGA AGA GAT T, reverse GCA TGA AGT TGG GCT CGAA; ACOX1: forward CTC ACT CGC AGC CAG CGT TA, reverse ATT GAG GCC CAC AGG TTC CCA. Numero di cicli e temperatura di annealing della PCR: GAPDH 21 cicli a 55°C, NOX2 31 cicli a 65°C, GPX1 28 cicli a 65°C e ACOX1 29 cicli a 57°C.

Saggio della Luciferasi con il promotore del NOX2

Il frammento corrispondente alla sequenza del promotore del gene del NOX2 (da -533 a +6) è stato amplificato per PCR (forward: 5'-GATGGTAGATCTTTTT

CAGCACACACACACAAGTATA-3', reverse: 5'-GTGGCAGATCITGAATGTGTTGTGTTGCCTTTCTTC-3') e clonato all'interno di un plasmide pGL3-Enhancer vector (Promega) codificante per la proteina firefly luciferasi. 2×10^6 di cellule della linea HL60 sono state trasfettate con 1mg del plasmide NOX2-Luc in assenza o in presenza di quantità crescenti di un plasmide codificante per la proteina EBNA1. Inoltre 0.1 mg del plasmide codificante la renilla luciferase è stato cotrasfettato come controllo. Il plasmide pGL3-enhancer vuoto e pGL3-SV40 sono stati poi utilizzati rispettivamente per valutare il background e la massima attività. Dopo 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state lisate secondo il protocollo suggerito dal kit (Dual luciferase assay, Promega) e l'attività del promotore è stata così calcolata: $(\text{NOX2-Luc} - \text{pGL3}) / (\text{pGL3-SV40} - \text{pGL3}) \times 100$. L'espressione di EBNA1 è stata poi confermata in western blot.

Inibizione del NOX2

L'inibizione del NOX2 è stata ottenuta trattando le cellule over-night con Apocynin (Apo) che inibisce la formazione del complesso enzimatico oppure tramite Diphenylene Iodonium (DPI) che inibisce tutte le NADPH ossidasi. Per ottenere una maggiore specificità si è inoltre utilizzato un sistema di siRNA retrovirale utilizzando due diverse sequenze target per inibire la traduzione della proteina (TRC000004264, cl.64, TRC000004266, cl.66, Mission® shRNA NOX2 Transduction particles).

Western blotting

Lisati cellulari totali sono stati ottenuti lisando le cellule in LDS buffer e corsi in precasted gel SDS-PAGE, il trasferimento è avvenuto su membrane PVDF (Millipore). Sono stati poi utilizzati i seguenti anticorpi: anti-EBNA1 (OT1X, fornito da Y. Middeldorp, Vrije Universiteit, Amsterdam, Olanda), β -actin (AC-15, 1:2000, Sigma), anti-Nox2 (1:100, White Label).

Immunostaining

3×10^4 cellule risospese in 100ml di PBS sono state depositate su un vetrino tramite cytopspin e fissate con formaldeide al 4% per 10 minuti. Gli anticorpi primari per pH2AX e ATM sono stati aggiunti over-night. Si è poi utilizzato un anticorpo secondario coniugato con Alexa Fluor 488, rispettivamente anti-rabbit e anti-mouse. L'analisi è poi stata eseguita utilizzando un microscopio a fluorescenza LEITZ-BMRB (Leica).

Introduzione allo studio

Il virus di Epstein-Barr (EBV) è altamente diffuso a livello mondiale, circa il 90% della popolazione adulta risulta infetto. Persiste normalmente nell'individuo instaurando una infezione latente nelle cellule B memoria che viene tenuta sotto stretto controllo dal sistema immunitario, l'infezione quindi risulta spesso asintomatica. Nonostante queste caratteristiche EBV risulta frequentemente associato a diverse patologie quali il linfoma di Burkitt, il linfoma di Hodgkin ed il carcinoma nasofaringeo⁴⁸⁻⁵⁰. Le differenti patologie sono caratterizzate da diversi programmi di latenza che determinano l'espressione di diverse proteine virali; l'unica proteina presente in tutti i diversi programmi, e quindi sempre espressa nei tumori EBV associati, è EBNA1.

Oggetto di questo studio è la proteina EBNA1. Abbiamo voluto indagare due importanti aspetti che caratterizzano questo antigene: l'immunogenicità e la carcinogenicità. Nel primo studio, affrontando il problema dell'immunogenicità si sono studiate e valutate nuove risposte CTL-mediate con lo scopo di identificare nuovi target per immunoterapie. Nel secondo invece si è valutato il possibile ruolo di EBNA1 nello sviluppo delle patologie EBV associate, in particolare si è indagato come l'antigene potesse favorire il fenomeno dell'instabilità genomica nei linfomi di Burkitt.

Scopo della ricerca

“Studio Immunogenicità”

La popolazione delle cellule T ed in particolare i linfociti T citotossici (CTL) rappresentano il più efficace meccanismo che il sistema immunitario ha per distruggere cellule infettate da virus o tumorali. I linfociti T sono in grado di riconoscere gli antigeni sotto forma di peptidi generati dalla degradazione da parte dei sistemi proteolitici cellulari e presentati sulla membrana in associazione alle molecole di HLA di classe I. Tuttavia i virus sono in grado di eludere il sistema immunitario e di agire all'interno dell'organismo andando ad interferire con i meccanismi di generazione, di trasporto e presentazione degli antigeni virali³.

Il nostro studio si focalizza in particolare sul virus di Epstein-Barr e su una delle proteine virali espresse durante la latenza, la proteina EBNA1. Caratteristica peculiare di questa proteina è la sua presenza in tutti i tumori EBV-associati. EBNA1, considerata inizialmente una proteina non immunogenica, risulta ora di notevole interesse per nuovi approcci terapeutici nella lotta ai tumori associati ad EBV, data la recente identificazione di alcuni suoi epitopi riconosciuti dai linfociti T citotossici^{22, 23, 51-53}.

Lo scopo di questo lavoro è lo studio di risposte T citotossiche EBNA1-specifiche, in particolare si è cercato di individuare nuovi epitopi derivanti dalla proteina e i processi biologici che sono coinvolti nella loro generazione.

L'identificazione dei meccanismi che stanno alla base dell'antigen processing della proteina EBNA1 riveste un ruolo molto importante in quanto potrebbe permettere lo sviluppo di nuove terapie volte ad aumentare l'immunogenicità delle cellule tumorali infettate dal virus, in modo che possano essere riconosciute ed eliminate in modo più efficiente da parte dei linfociti T citotossici. Lo studio delle risposte CTL EBNA1-specifiche e l'analisi dei processi implicati nella generazione dell'epitopo bersaglio hanno quindi una notevole importanza per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici contro i tumori associati al virus di Epstein-Barr.

La caratterizzazione di nuovi epitopi e la comprensione dei meccanismi alla base della loro generazione e presentazione è fondamentale per ottenere le informazioni necessarie per la progettazione di terapie farmacologiche e di vaccini in grado di stimolare il sistema immunitario per proteggere l'organismo dalle infezioni di EBV e da tumori EBV-associati.

Risultati e discussione

“Studio Immunogenicità”

Tutti i tumori associati al virus di Epstein-Barr hanno come caratteristica comune l'espressione della proteina EBNA1, unico antigene sempre presente in ogni forma di latenza. EBNA1 rappresenta dunque il principale target di strategie di immunoterapia mirate al controllo e all'eliminazione di tumori EBV-associati da parte dei linfociti T citotossici specifici per EBNA1⁵⁴. Di recente, diversamente da quanto si riteneva in passato, sono stati identificati alcuni epitopi di EBNA1 in grado di essere presentati dalle molecole di MHC-I, rivalutando così il potenziale immunogenico della proteina^{23, 51-53}.

Il primo obiettivo della ricerca è stato quindi l'identificazione di nuovi epitopi di EBNA1 al fine di ampliare il pool di epitopi immunogenici contro cui dirigere futuri approcci terapeutici. Inoltre, la comprensione del processing che la proteina subisce, affinché si formino i corretti epitopi, risulta di fondamentale importanza nel contesto di uno sviluppo vaccinale mirato a proteggere l'organismo dalle infezioni causate da EBV e/o per la terapia di tumori EBV-associati.

Lo studio è iniziato con la tipizzazione delle molecole di HLA di classe I di un pannello di donatori sani EBV-positivi. Considerata la maggiore frequenza di donatori HLA-A2 positivi (12 su 19) e HLA-A24 positivi (10 su 19) si è deciso di analizzare potenziali epitopi in grado di legare queste due molecole.

A tal fine è stato utilizzato un programma informatico (HLA Peptide Binding Predictions) di predizione di epitopi che analizzando la sequenza di una proteina è in grado di valutare sequenze contigue, di lunghezza variabile tra 8 e 10 aminoacidi, che siano in grado di legare determinati sottotipi delle molecole di HLA sulla base del loro binding motif. Tale programma fornisce tutte le possibili sequenze dei peptidi specifici per un determinato HLA elencandoli in ordine decrescente d'affinità in base alla stima del tempo d'emivita del complesso MHC-I/peptide. L'indagine è stata quindi eseguita per valutare quali sequenze avrebbero potuto legare le molecole di HLA di tipo A2 o A24. Ogni epitopo, in base agli aminoacidi presenti in posizione 2 e 9, chiamate posizioni “ancora”, è in grado di legarsi ad una specifica molecola di HLA. In particolare le molecole di HLA-A2 prevedono la presenza in posizione 2 di residui di Leucina (L) o Metionina (M) mentre in posizione 9 residui di Valina (V) o Leucina (L); per le molecole di HLA-A24 invece in posizione 2 è richiesta una Tirosina (Y) e in posizione 9 una Leucina (L), una Isoleucina (I) oppure una Fenilalanina (F).

Dalla lista dei possibili epitopi predetti sono stati selezionati solamente quelli con gli score maggiori, un parametro indicativo della stabilità del complesso MHC-I/peptide, pur non escludendo che anche sequenze con score inferiori potrebbero comunque risultare immunogeniche.

Il nostro studio è stato condotto su quattro sequenze: due che potenzialmente si legano alle molecole di HLA-A2, FLQTHIFAEV e SIVCYFMVFL, e due alle molecole di HLA-A24, VYGGSKTSL e LYNLRRGTAL. Al fine di valutare l'esistenza di questi epitopi predetti sono stati utilizzati i linfociti T separati dal sangue periferico di donatori EBV positivi per generare CTL peptide-specifici.

HLA	Posizione aa										HLA	Sequenza	Nome	EBNA1 aa	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
A2		L				V				V		A2	FLQTHIFAEV	FLQ	565-574
		M								L				SIVCYFMVFL	SIV
A24		Y			I	F				I		A24	VYGGSKTSL	VYG	509-517
					V					L	F			LYNLRRGTAL	LYN

Tabella 1: Pannello a sinistra: Ancore primarie (in grassetto) e secondarie delle molecole HLA-A2 e A24. Pannello a destra: Epitopi predetti e selezionati per questo studio, derivanti dalla proteina EBNA1. In grassetto sono evidenziate le ancore primarie presenti nella loro sequenza.

La generazione delle colture CTL è stata realizzata partendo dai PBL (Peripheral Blood Leucocyte) che vengono purificati e stimolati per tre volte, a distanza di sette giorni con la linea T2-A2 o A24 pulsata con i diversi peptidi. Dopo la terza stimolazione si è testata la specificità della coltura tramite test di citotossicità utilizzando come target blasti autologhi pulsati e non con il peptide d'interesse.

Oltre alle stimolazioni con i 4 potenziali epitopi derivanti da EBNA1, si sono effettuate stimolazioni per altri epitopi noti di EBV (controlli positivi). In particolare sono stati utilizzati gli epitopi CLGGLLTMV (LMP2), SVRDRLARL (EBNA3) e LLWTLVLL (LMP2) che sono in grado di legare le molecole di HLA-A2, l'epitopo TYSAGIVQI (EBNA4) che lega le molecole di HLA-A24 e l'epitopo HPVGEADYFEY (EBNA1) che lega le molecole di HLA-B35. Queste ulteriori stimolazioni sono state effettuate per verificare se i soggetti utilizzati in questo studio avessero effettivamente risposte CTL specifiche contro le proteine virali di EBV, e nel caso dell'epitopo HPV, che vi fossero risposte anche contro la proteina EBNA1.

Come mostrato in figura 1a, solamente 3 donatori non hanno mostrato alcuna risposta EBV specifica, mentre tutti gli altri hanno presentato almeno una risposta positiva per gli epitopi di controllo utilizzati. Per quanto riguarda invece i 4 epitopi potenziali derivanti da EBNA1, solamente uno, il decamero FLQ ha dato risposte specifiche in 3 diversi donatori sui 12

testati (fig 1b). Ciò dimostra come una stimolazione di tipo memoria sia in grado di amplificare CTL specifici per il suddetto epitopo e che questi 3 donatori testati già presentavano risposte CTL specifiche per il peptide FLQ, evidenziando quindi l'esistenza di questa sequenza immunogenica.

Dalla coltura CTL originale del donatore C.S. sono state ottenute, tramite diluizione seriale, quattro colture clonali FLQ-specifiche che sono state poi utilizzate per eseguire i successivi esperimenti (fig. 1c).

Poiché la maggioranza dei peptidi immunogenici riconosciuti dai linfociti T citotossici hanno una lunghezza che varia dagli 8 ai 10 amino acidi, si è voluto valutare se il decamero FLQ utilizzato rappresentasse già la sequenza minima richiesta per indurre la risposta CTL. A tal fine si è eseguita la titolazione del decamero e dei due nonameri ottenuti eliminando alternativamente il primo e l'ultimo aminoacido. Come mostrato in figura 1d oltre al decamero FLQ..anche il nona mero LQT è in grado di indurre risposte CTL specifiche; inoltre concentrazioni inferiori di peptide LQT inducono risposte maggiori rispetto a quelle indotte dal decamero portando a definire LQT la minima sequenza immunogenica.

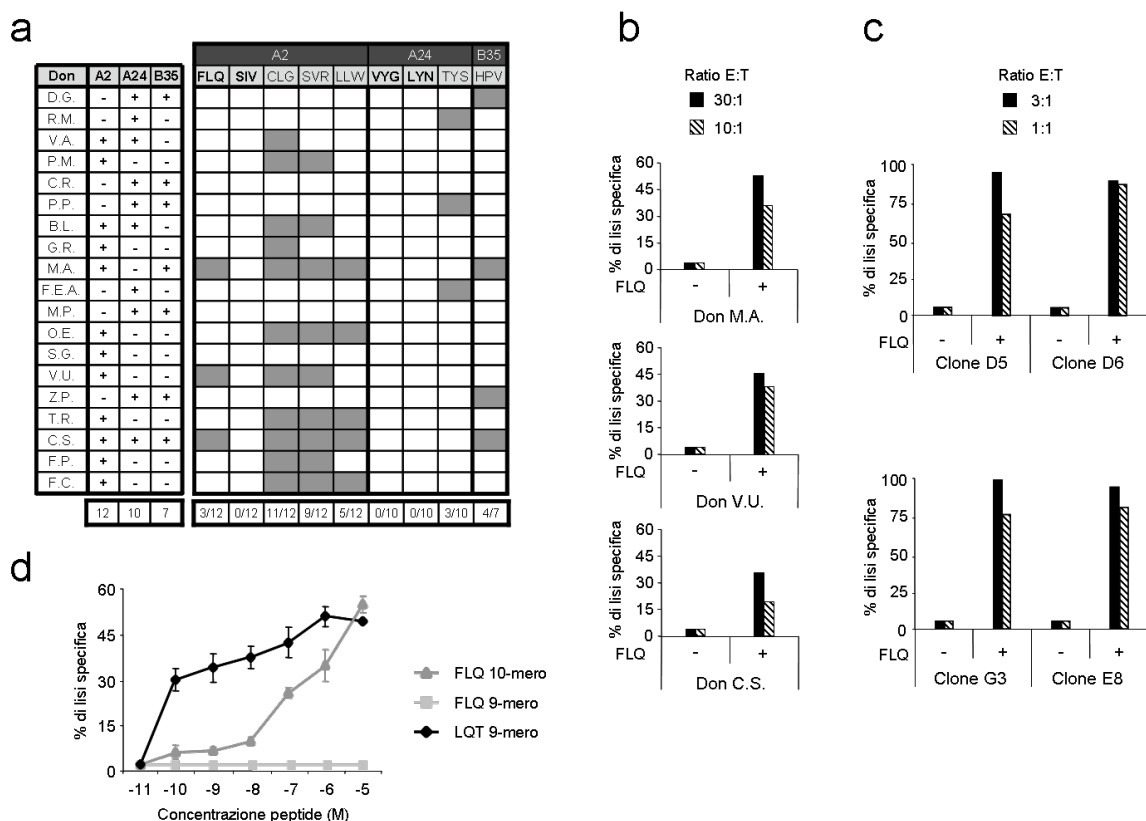


Figura 1 a) Lista dei donatori AVIS EBV+ utilizzati in questo studio, sono riportate le relative positività per le molecole HLA-A2, A24 e B35. Le caselle grigie nella griglia evidenziano l'ottenimento della coltura CTL per il relativo epitopo, in fondo sono riportate le frequenze di risposta ottenute. Le singole colture sono state testate in test di citotossicità utilizzando blasti autologhi pulsati e non con il peptide esogeno (10^{-5} M). **b)** Risultato del test di citotossicità dei tre donatori che hanno positivamente risposto alla stimolazione con l'epitopo predetto

FLQ. **c)** Specificità delle quattro popolazioni monoclonali ottenute tramite diluizioni limite dal donatore C.S. Le singole colture sono state testate in test di citotossicità utilizzando blasti autologhi pulsati e non con il peptide esogeno (10^{-5} M). **d)** Titolazione dell'epitopo per identificare la minima sequenza immunogenica. La sequenza di 10aa (FLQTHIFAEV: FLQ 10-mero) e le due possibili sequenze di 9aa (FLQTHIFAE: FLQ 9-mero e LQTHIFAEV: LQT 9-mero), sono state titolate in test di citotossicità utilizzando blasti autologhi come target e un rapporto effetto:target di 3:1.

Si è poi verificata la capacità del nonamero LQT di stimolare la proliferazione di CTL specifici partendo dai PBL degli stessi donatori che precedentemente avevano dato risultati positivi tramite stimolazione con il decamero FLQ. Anche il nonamero ci ha permesso di ottenere CTL specifici (dato non mostrato) confermando di fatto la sua effettiva immunogenicità; negli esperimenti di seguito descritti si utilizzerà quindi l'epitopo LQT.

Successivamente si è valutata l'immunogenicità di questo nuovo epitopo nelle cellule EBNA1 positive e i sistemi cellulari responsabili della sua generazione.

Il primo dato indagato è stata l'espressione dell'epitopo LQT nelle linee LCL che rappresentano il modello in vitro dell'infezione latente di tipo III di EBV, tutte le linee cellulari LCL esprimono endogenamente la proteina EBNA1. Sulla base di questa considerazione si è voluto valutare in che modo tali linee generassero e presentassero l'epitopo LQT. Tramite test di citotossicità si è quindi valutata la presentazione dell'epitopo in linee LCL HLA-A2+ pulsate o meno con il peptide sintetico e come si può vedere in figura 2a nessuno dei cloni utilizzati è in grado di riconoscere le linee HLA-A2+. Non vi sono infatti differenze tra le lisi delle linee A2 positive e quella della linea A2 negativa evidenziando come l'epitopo LQT non sia espresso nelle linee LCL. Quando però l'epitopo viene somministrato esogenamente è in grado di sensibilizzare le LCL nei confronti della lisi CTL mediata.

A questo punto ci siamo domandati quale potesse essere la ragione della mancata presentazione dell'epitopo LQT da parte delle LCL. Questa indagine potrebbe avere interessanti risvolti applicativi, infatti l'identificazione del difetto di generazione/presentazione dell'epitopo potrebbe permettere interventi farmacologici volti alla modulazione della generazione e presentazione dell'epitopo LQT in pazienti affetti da tumori EBV+ .

L'approccio utilizzato, presupponendo che la mancata presentazione fosse dovuta alla degradazione dell'epitopo, ha previsto l'utilizzo di inibitori dell'attività proteolitica delle due maggiori proteasi coinvolte nell'antigen processing, ovvero il proteasoma e la tripeptidil peptidasi II (TPPII). Utilizzando due differenti inibitori per ciascuna delle proteasi (Epoxomicina e MG132 per il proteasoma, AAF-CMK e Butabindide per il TPPII) abbiamo parzialmente inibito la loro attività proteolitica (dato confermato tramite saggi enzimatici in vitro non mostrati) e conseguentemente valutato tramite saggio di citotossicità se si verificava la presentazione dell'epitopo LQT. Nonostante l'efficacia dei trattamenti fatti non si

è comunque ottenuto nessun aumento della presentazione dell'epitopo (fig.2b), escludendo perciò la degradazione da parte del proteasoma o del TPPII come causa della mancata presentazione. Ad ulteriore conferma dei dati di presentazione sin ora ottenuti abbiamo voluto valutare l'immunogenicità delle linee LCL trattate e non anche tramite saggio elispot, metodica più sensibile per la valutazione delle risposte CTL, soprattutto delle risposte nei confronti degli epitopi derivanti da EBNA1.

Come mostrato in figura 2c, anche tramite elispot si sono ottenuti gli stessi dati precedentemente riscontrati tramite test di citotossicità, non vi sono infatti differenze di rilascio di IFN- γ da parte dei CTL LQT specifici quando vengono stimolati da LCL A2+ o LCL A2- (mismatched) e nessun trattamento che inibisca il proteasoma o il TPPII è in grado di indurre la presentazione dell'epitopo.

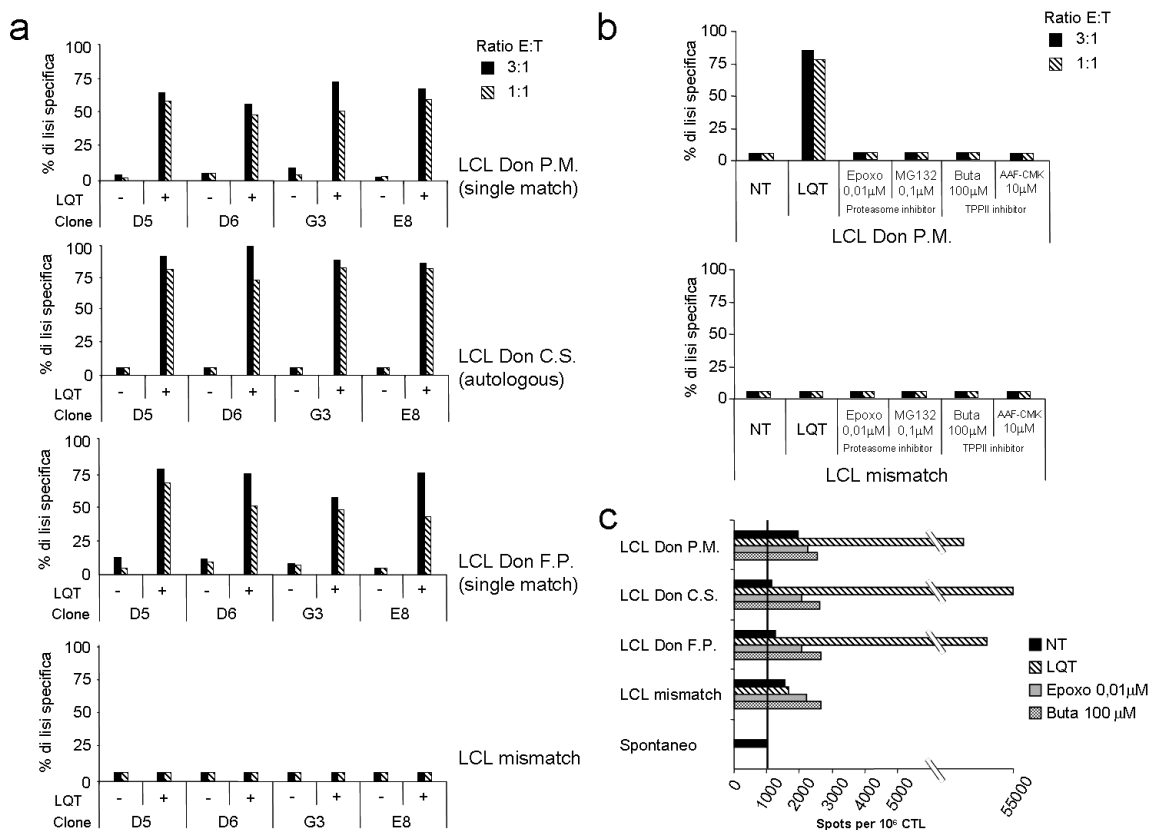


Figura 2 a) Riconoscimento di linee linfoblastoidi (LCL) da parte dei CTL LQT specifici. La linea LCL autologa e due altre linee single match per le molecole di HLA-A2 sono state testate in test di citotossicità per valutarne il riconoscimento da parte delle quattro diverse colture clonali, il peptide esogeno è stato aggiunto come controllo positivo ed una linea LCL mismatch è stata usata come controllo negativo. **b)** Effetto degli inibitori del proteasoma e del TPPII sulla mancata generazione dell'epitopo LQT. Una linea LCL single match e una mismatch sono state trattate over-night con diversi inibitori del proteasoma e del TPPII, l'avvenuta inibizione è stata valutata tramite saggio enzimatico d'attività (risultato non mostrato). L'effetto dei trattamenti sulla generazione dell'epitopo è stata poi valutata tramite test di citotossicità. **c)** Riconoscimento di linee linfoblastoidi (LCL) da parte dei CTL LQT specifici ed effetto di inibitori del proteasoma e del TPPII testati tramite saggio Elispot utilizzando un rapporto effetto:target di 3:1.

A questo punto abbiamo voluto valutare la presentazione dell'epitopo LQT in un diverso modello d'infezione di EBV, il linfoma di Burkitt, in quanto è noto che il linfoma di Burkitt presenti caratteristiche dal punto di vista dell'antigen processing differenti rispetto al modello delle LCL. Abbiamo quindi utilizzato un pannello di linee che includesse sia Burkitt EBV+ che EBV-, ed inoltre un pannello di BJAB utilizzando la linea EBV-, la linea infettata dal ceppo di EBV B95.8 e la linea trasfettata con EBNA1. Come mostrato in figura 3a, nessuno dei Burkitt EBNA1 positivi, la cui espressione è stata verificata tramite western blot, è stato in grado d'indurre una lisi LQT specifica. Solamente quando il peptide veniva somministrato esogenamente si è ottenuto un riconoscimento della cellula target a dimostrazione che la mancata lisi è dovuta all'assenza delle molecole di HLA-A2 responsabili della presentazione dell'epitopo.

Ciò che caratterizza la proteina EBNA1 è la presenza all'interno della sua struttura di un dominio caratterizzato da numerosi residui di glicina ed alanina ripetuti denominato GAR, è noto come questo dominio sia in grado d'inibire la degradazione proteasoma dipendente della proteina stessa e di conseguenza di limitare la generazione di epitopi per la classe I. È stato inoltre dimostrato come la rimozione di questo dominio permettesse la degradazione di EBNA1 proteasoma dipendente e la conseguente generazione epitopi presentati poi dalle molecole di classe I⁵³. A tal proposito abbiamo voluto valutare se tale fenomeno si verificasse anche per l'epitopo da noi caratterizzato.

Abbiamo quindi utilizzato una linea che esprimesse la proteina EBNA1 deleta del dominio GAR (E1ΔGA), che come dimostrato dal western blot in figura 3b, tramite un esperimento di inibizione della sintesi proteica con cicloesemide, risulta meno stabile della forma wild type. Questa linea è stata quindi utilizzata in test di citotossicità per valutare la presentazione dell'epitopo LQT, inoltre come controllo dell'avvenuto processamento è stata testata nei confronti di CTL HPV specifici in quanto è noto che l'epitopo HPV in assenza del GAR viene maggiormente presentato.

Come mostrato in figura 3b, nonostante avvenga il processamento dell'antigene con la relativa presentazione dell'epitopo HPV, i CTL LQT specifici non sono comunque in grado di riconoscere la linea che esprime E1ΔGA (controllo positivo). Questo dato dimostra come nel caso dell'epitopo LQT il GAR non influenzi la sua generazione, in quanto anche in assenza di questo dominio l'epitopo non viene comunque generato e presentato.

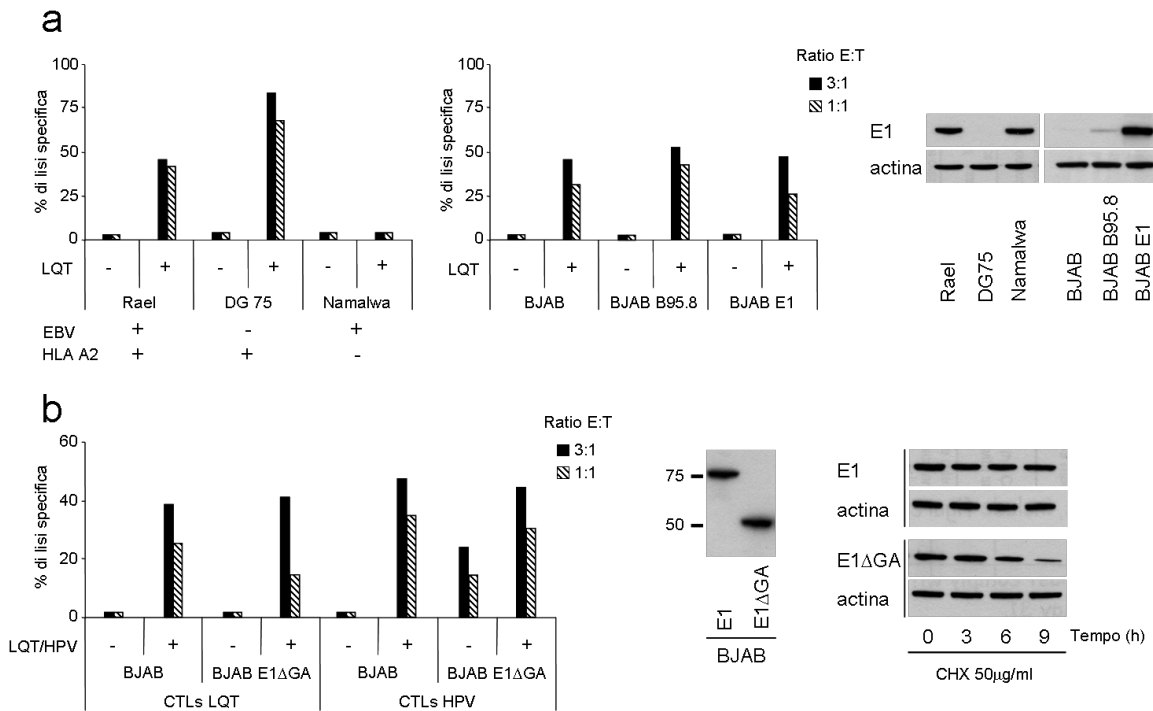


Figura 3 a) Riconoscimento di linee di Burkitt linfoma da parte dei CTL LQT specifici. Un pannello di linfomi, sia EBV positivi che negativi, ed un pannello della linea cellulare BJAB, tra cui la line EBV negativa, infettata in vitro (BJAB B95.8), e stabilmente trasfettata per l'espressione di EBNA1 (BJAB E1), sono stati utilizzati per valutare la presentazione dell'epitopo LQT. Sono inoltre riportati i relativi western blot a conferma dell'espressione dell'antigene virale. **b)** Degradazione di EBNA1 e presentazione degli epitopi nel modello GAR-deleto. La linea BJAB stabilmente trasfettata con un plasmide per l'espressione della proteina E1 deleta della porzione del GAR (BJAB E1ΔGA) è stata utilizzata in test di citotossicità per valutare la presentazione dell'epitopo LQT, la presentazione dell'epitopo HPV è stata utilizzata come controllo positivo. La presenza dell'antigene GAR-deleto è stata valutata in western blot; si è inoltre confermata la maggiore sensibilità alla degradazione di questa proteina rispetto alla wild type trattando le cellule con cicloesemide (CHX), alle concentrazioni e tempi indicati

Non avendo riscontrato nessun dato sperimentale che dimostrasse la presentazione dell'epitopo LQT tramite il processamento della proteina abbiamo voluto valutare la potenziale immunogenicità dell'epitopo veicolandolo direttamente all'interno della cellula nella sua forma corretta per verificare la sua potenziale presentazione endogena.

A tal proposito abbiamo sfruttato un sistema basato sull'utilizzo di una molecola chimerica chiamata *trojan antigen* (T.A.). Il T.A. è caratterizzato dalla presenza dell'epitopo CTL (LQT) e da un nonamero derivato dalla proteina Tat di HIV (RKKRRQRRR) che grazie alla sua natura basica è in grado di attraversare in maniera passiva la membrana cellulare e raggiungere il reticolo endoplasmatico; tra le due sequenze è presente un linker di quattro aminoacidi, sensibile (RVKR) o resistente (VRVV) al riconoscimento e alla lisi da parte di un enzima presente nel reticolo endoplasmatico detto furina che determina il rilascio della sequenza corretta dell'epitopo che a questo punto può legarsi alle molecole di HLA-A2 e generare quindi il complesso MHC-I/peptide.

L'associazione dell'epitopo al trojan antigen si è dimostrata in grado di indurre la liberazione dell'epitopo CTL direttamente nel reticolo endoplasmatico. Utilizzando infatti il costrutto T.A. LQT con il linker furina-sensibile a seguito di una incubazione overnight in linee LCL e la linea BJAB poi utilizzate come target in test di citotossicità, si è ottenuto il riconoscimento e la sensibilizzazione alla lisi da parte dei CTL LQT specifici (figura 4a). Quando invece è stato utilizzato il costrutto contenente il linker furina-resistente non vi è stata alcuna presentazione a dimostrazione che il riconoscimento precedentemente ottenuto fosse interamente dovuto all'azione della furina che è appunto in grado di liberare la forma corretta dell'epitopo dall'intero complesso. Per assicurarsi inoltre che il riconoscimento ottenuto fosse determinato dal solo epitopo liberato nel reticolo endoplasmatico e successivamente presentato in superficie, piuttosto che dal legame aspecifico del costrutto direttamente alle molecole di HLA-A2, si è ridotto il tempo d'incubazione a 45 minuti. Un tempo così limitato non è sufficiente per ottenere la liberazione e la successiva presentazione dell'epitopo ma permetterebbe l'eventuale legame diretto alle molecole di HLA-A2, come avviene per l'epitopo LQT non incluso nel costrutto. Il risultato del test dimostra che in seguito ai 45 minuti di trattamento in presenza del costrutto T.A. LQT non si ottiene alcuna sensibilizzazione delle linee LCL alla lisi LQT specifica, evidenziando come il complesso non sia quindi in grado di legarsi direttamente alle molecole di HLA-A2 (figura 4b).

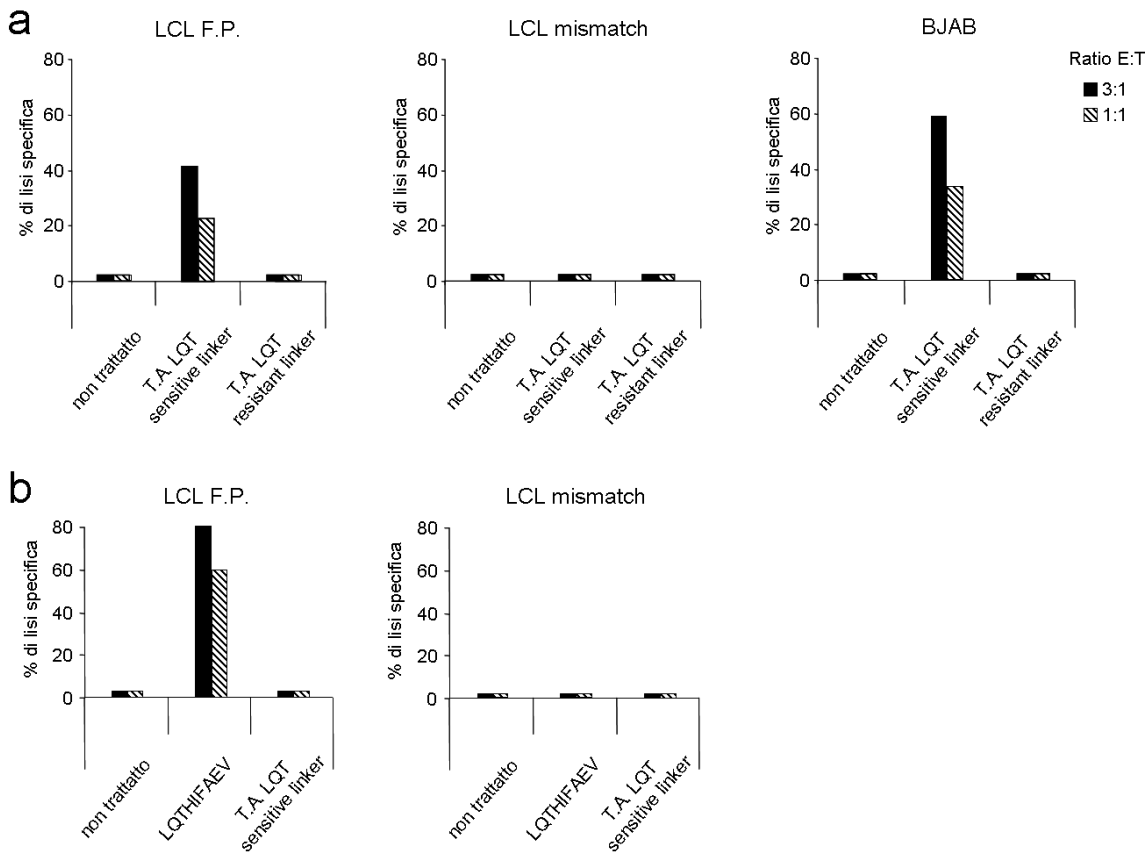


Figura 4 a) Utilizzo del Trojan antigen per veicolare l'epitopo nella cellula. Utilizzando una sequenza aminoacidica, in grado di veicolare e rilasciare all'interno della cellula l'epitopo ad essa legato, abbiamo valutato tramite test di citotossicità se l'epitopo LQT potesse almeno potenzialmente venire presentato quando fosse correttamente generato. La struttura del trojan antigen prevede al suo interno un linker di 4 aa sensibile all'azione di un enzima noto come Furin, che ha in questo caso il compito di tagliare l'epitopo dalla sequenza del trojan antigen. Al fine di controllare il sistema si sono utilizzati due diverse sequenze del trojan antigen, una contenente un linker Furin sensibile ed una Furin resistente che non permettesse quindi il taglio dell'epitopo. **b)** Il riconoscimento non è dovuto al legame diretto alle molecole di HLA-A2. Come ulteriore conferma che il riconoscimento fosse dovuto dal complesso internalizzato e poi processato si è verificato che l'intero complesso non fosse in grado di indurre alcun riconoscimento semplicemente legandosi esternamente alle molecole di HLA-A2. A tal proposito le cellule sono state incubate con il trojan antigen solo per 90', tempo sufficiente affinché l'epitopo LQT 9-mero si possa legare dall'esterno.

Nel complesso questi dati dimostrano quindi la potenziale immunogenicità dell'epitopo LQT, il quale quando correttamente generato è in grado di legarsi alle molecole di HLA-A2 e di venire presentato sulla superficie cellulare inducendo il riconoscimento da parte dei CTL LQT-specifici.

Conclusioni

“Studio Immunogenicità”

Una delle principali funzioni del sistema immunitario è l'immunosorveglianza, ovvero la capacità di riconoscere e distruggere cellule infettate da virus o cellule tumorali. Il sistema immunitario è in grado di controllare e proteggere l'organismo da agenti estranei, uccidendo le cellule che esprimono sulla membrana citoplasmatica peptidi, derivanti dalla processazione dell'antigene tumorale, in associazione a molecole di MHC di classe I.

Con l'evoluzione però i virus, hanno sviluppato molteplici meccanismi di immunoevasione, per eludere questi meccanismi di difesa, così da permettere il loro ingresso e la loro permanenza nelle cellule.

Comprendere i meccanismi che sono alla base dell'escape virale è fondamentale per individuare nuove strategie e nuovi approcci terapeutici mirati ad aumentare l'immunogenicità di cellule infettate e neoplastiche al fine d'ottenere l'eliminazione dell'infezione o del tumore. In questo contesto si inserisce la nostra ricerca, che si è concentrata sullo studio del virus di Epstein-Barr (EBV) presente in circa il 90% della popolazione umana adulta mostrando uno spiccato tropismo per i linfociti B e rimanendo nell'ospite anche per tutta la vita in uno stato di latenza.

Il virus di Epstein-Barr è di particolare interesse in quanto è stato tra i primi virus ad essere identificati come causa di tumori umani. All'interno dell'ospite EBV è in grado di produrre diverse proteine virali, tra le quali la proteina nucleare EBNA1 che risulta l'unico antigene della latenza sempre espresso in tutti i diversi programmi e in tutti i tumori EBV-positivi. Questa caratteristica rende EBNA1 un target ottimale per immunoterapie mirate al controllo e all'eliminazione dei tumori associati ad EBV. Di notevole importanza risultano a tale scopo i meccanismi che sono alla base della generazione dei suoi epitopi considerando che la proteina EBNA1 ha come caratteristica peculiare la presenza nella sua sequenza di un dominio di motivi glicina-alanina ripetuti (Gly-Ala repeat o GAR) che inibisce la degradazione da parte del proteasoma.

In questo lavoro abbiamo cercato di individuare nuovi epitopi di EBNA1, al fine di ampliare il pool di target verso cui indirizzare nuovi approcci terapeutici. Ci si è concentrati in modo particolare su due sequenze peptidiche di EBNA1 che legano le molecole di HLA-A2, FLQTHIFAEV e SIVCYFMVFL, e due che legano le molecole di HLA-A24, YVGGSKTSL e LYNLRRGTAL. Inizialmente si è cercato di dimostrare l'esistenza di questi epitopi predetti e

partendo da ciò ci si è poi rivolti a valutarne l'immunogenicità e la generazione. Nel corso degli esperimenti condotti sulle quattro sequenze però solamente una ha dato risultati positivi, la sequenza FLQ. Le indagini successive sono state per questo poi maggiormente indirizzate allo studio di tale epitopo. Si è inizialmente verificata la sequenza minima immunogenica per definire l'epitopo e si è visto come il vero epitopo fosse in realtà il nonamero LQTHIFAEV. A questo punto si è valutata l'espressione endogena nella linea cellulare LCL e tale linea è risultata insensibile alla lisi CTL mediata evidenziando come tale epitopo non venga espresso. Solo quando la somministrazione del suddetto epitopo avviene dall'esterno può sensibilizzare le linee LCL ed indurre lisi CTL specifica. Gli stessi dati sono stati poi ulteriormente confermati tramite saggio elispot, che risulta essere una metodica più sensibile per detectare le risposte CD8.

L'espressione endogena dell'epitopo è stata poi valutata anche nel modello del linfoma di Burkitt, che pur essendo sempre un modello d'infezione di EBV presenta caratteristiche a livello dell'antigen processing differenti rispetto alle LCL. Anche utilizzando linee di Burkitt EBV+ non si è comunque ottenuto nessun riconoscimento mediato dai CTL LQT, indice del fatto che anche in queste cellule l'epitopo non viene presentato.

Caratteristica peculiare della proteina EBNA1 è la presenza al suo interno di un dominio ricco di Glicine e Alanine detto GAR (Gly-Ala repeat) che come noto ne previene la degradazione proteasoma dipendente. La rimozione di tale dominio permette la degradazione della proteina via proteasoma e di conseguenza la generazione degli epitopi CD8. Abbiamo quindi valutato se utilizzando questa forma della proteina fosse possibile ottenere la presentazione dell'epitopo LQT, ma nonostante la rimozione del dominio non si è ottenuta la sensibilizzazione alla lisi CTL LQT mediata, cosa invece che si è verificata per un altro epitopo noto di EBNA1.

Un esperimento chiave ha poi dimostrato che, se veicolato all'interno della cellula, l'epitopo lega correttamente le molecole di HLA per poi venir espresso sulla superficie cellulare sensibilizzando le cellule alla lisi CTL mediata. Questo ci dimostra come l'espressione dell'epitopo nei Burkitt o nelle linee LCL non sia limitata dai meccanismi di presentazione ma sia molto probabilmente causata da un errato processamento della proteina che non permette la corretta formazione dell'epitopo LQT.

La nostra ricerca in conclusione ci ha permesso di individuare un nuovo epitopo di EBNA1, l'epitopo LQT, che non è espresso dalle linee LCL. Le informazioni raccolte su di esso ci permettono di affermare che la sua sequenza aminoacidica gli permette di competere con altri epitopi non limitandone il legame alle molecole di HLA-A2. La sua mancata espressione

nelle linee LCL non è dunque causata dalla sua bassa affinità per le molecole di HLA ma probabilmente da un errato processamento della proteina. Questi risultati rappresentano quindi un nuovo punto di partenza per l'indagine dei meccanismi di processazione della proteina EBNA1 che dovranno essere modulati al fine di favorire l'espressione dell'epitopo LQT. La caratterizzazione di ulteriori epitopi di EBNA1 è dunque indispensabile per l'ampliamento del pool di target per il disegno di efficaci e nuove strategie vaccinali nella lotta ai tumori EBV-associati. Allo stesso modo risulta importante la comprensione dei meccanismi alla base della loro generazione e presentazione per poterne modulare l'espressione da parte delle cellule bersaglio così da renderle maggiormente sensibili alla lisi CTL mediata. Nel complesso i dati futuri potrebbero aprire la strada a nuove strategie di immunoterapia mirate al potenziamento della presentazione dell'epitopo nelle cellule infettate al fine di aumentare l'immunogenicità dei tumori associati ad EBV, favorendo l'azione di immunosorveglianza del sistema immunitario.

Scopo della ricerca

“Studio Carcinogenicità”

Il virus di EBV è da sempre considerato un virus con potenzialità oncogene, ed è spesso associato alla patogenesi di numerosi tumori, in particolare linfomi e carcinomi. Le più note patologie associate al virus di EBV sono il linfoma di Burkitt, il carcinoma nasofaringeo ed il linfoma di Hodgkin. Nell'ambito di queste patologie sono numerosi i casi di pazienti positivi a tale virus. Nonostante queste evidenze bisogna però considerare come il virus di EBV sia ampiamente diffuso a livello della popolazione mondiale, circa il 90% infatti ne risulta infetto, e nella maggior parte dei casi l'infezione risulta asintomatica^{50 48 49}.

È quindi altamente controversa la questione sull'effettiva tumorigenicità del virus di EBV vista la limitata frequenza delle patologie rispetto al numero degli individui infetti; non è infatti stato ancora completamente chiarito se il virus abbia un ruolo attivo nello sviluppo del tumore o se sia semplicemente un ospite della cellula che non interferisce con la sua trasformazione in cellula tumorale. In pazienti immunosoppressi è stato dimostrato che il virus favorisce lo sviluppo di linfomi immunoblastici ma per altre patologie, come ad esempio il linfoma di Burkitt, ancora non è chiaro quale sia l'effettivo contributo del virus.

L'instabilità genomica, ossia la rottura della doppia elica del DNA con possibili conseguenti riarrangiamenti anomali, è una caratteristica che contraddistingue diversi tumori umani ed è uno dei fenomeni che maggiormente contribuisce allo sviluppo del tumore⁵⁵. Per quanto l'origine di questo fenomeno sia stata ben stabilita per molti di essi, i processi e i geni coinvolti in questo fenomeno nel caso di tumori che non sono di tipo ereditario ma sporadico restano ancora ampiamente ignoti.

Nelle patologie EBV-associate è stata ripetutamente dimostrata la ricorrenza di questo fenomeno seppur non sia ancora chiaro quale contributo possa avere sul fenotipo tumorale. In particolare, proprio nelle linee di linfoma di Burkitt si è osservato come la presenza del virus fosse associata ad una maggior frequenza di fenomeni relativi all'instabilità genomica⁵⁶. In questo contesto si è quindi sviluppato il nostro studio, utilizzando un pannello di linee di Burkitt linfoma abbiamo indagato quale potesse essere la relazione tra la presenza del virus e la maggior frequenza di tali fenomeni.

Risultati e discussione

“Studio Carcinogenicità”

Partendo da una precedente osservazione che riportava come le linee di Burkitt linfoma EBV+ presentassero un diverso fenotipo dal punto di vista dell'instabilità genomica⁵⁶ si è voluto indagare attraverso quali meccanismi il virus di Epstein-Barr potesse indurre questo effetto. In particolare si era precedentemente osservato come in presenza di EBV fossero più frequenti i fenomeni di anomalie cromosomiche tra cui la frammentazione cromosomica, i cromosomi dicentrici e rotture cromatidiche. Oltre a questi fenomeni si era osservato anche un aumento dello stato di fosforilazione dell'istone H2AX che a seguito della presenza di danni al DNA risulta attivato tramite fosforilazione (pH2AX)⁵⁷. Osservando questi fenomeni nei tre diversi tipi di latenza si è visto come, seppur con frequenze diverse, fossero presenti in tutti i programmi. Essendo EBNA1 l'unica proteina espressa nelle tre diverse latenze, ed anche l'unica espressa nel programma di tipo I questo ci ha portato a supporre che la sola proteina EBNA1 potesse essere in grado di indurre parte del fenotipo osservato, e che l'aumento del fenomeno negli altri due programmi fosse probabilmente dovuto ad una seconda proteina virale.

Inizialmente abbiamo valutato se effettivamente la sola proteina EBNA1 fosse in grado di indurre lo stesso fenotipo precedentemente osservato nei linfomi di Burkitt EBV+ caratterizzati dal programma di latenza I. Si è proceduto quindi all'analisi e alla quantificazione delle anomalie cromosomiche in piastre metafasiche utilizzando i pannelli cellulari delle BJAB e delle DG75 confrontando le linea parentale EBV- con le rispettive linee stabilmente trasfettate per l'espressione di EBNA1. La sola presenza della proteina EBNA1 ha indotto nelle cellule un aumento delle anomalie cromosomiche (figura 1a) confermando quindi quanto precedentemente osservato nelle linee di Burkitt EBV+. Inoltre anche l'attivazione di H2AX e ATM (figura 1b), risulta aumentata in presenza della sola proteina virale testimoniando come sia aumentato il grado di danneggiamento del DNA. Ulteriore conferma dello stato di frammentazione del DNA è stato poi ottenuto tramite “comet assay”⁵⁸ (figura 1c), in assenza di trattamenti le cellule BJAB E1 presentano una coda della cometa più lunga rispetto alla linea parentale EBNA1 negativa. Sfruttando poi il sistema inducibile tet-off che ci permette di modulare l'espressione della proteina EBNA1 tramite l'utilizzo della tetraciclina, abbiamo verificato sempre tramite comet assay come il grado di danno al DNA fosse direttamente proporzionale all'espressione della proteina anche in termini quantitativi. Rimuovendo o aggiungendo la tetraciclina nel terreno di coltura abbiamo rispettivamente

indotto o inibito la sintesi della proteina EBNA1, a diversi intervalli di tempo si è poi eseguito il comet assay per valutare il grado di frammentazione del DNA in funzione dell'espressione di EBNA1. Come mostrato in figura 1d, la lunghezza della coda della cometa aumenta all'aumentare dell'espressione della proteina virale e diminuisce quando la sua sintesi viene inibita, l'espressione della proteina è stata verificata in parallelo tramite western blot.

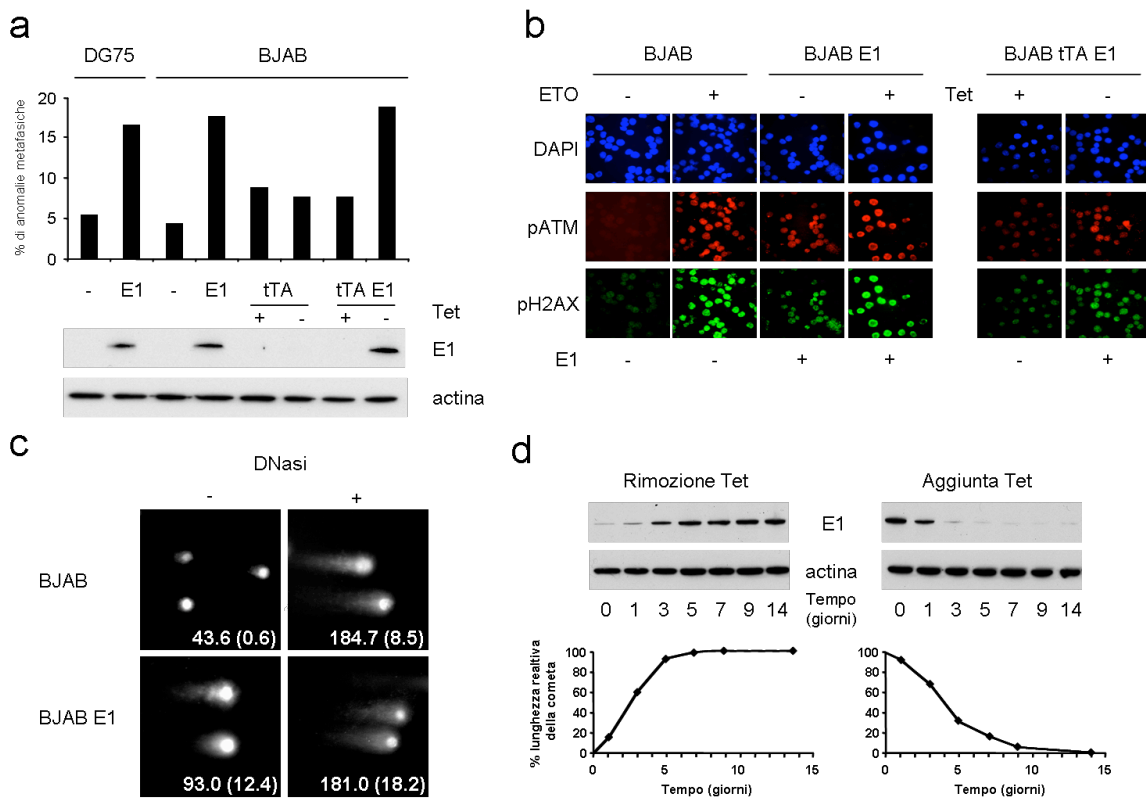


Figura 1 a) Analisi cromosomi in metafase. Nelle linee cellulari BJAB, DG75 e le loro relative varianti esprimenti stabilmente la proteina EBNA1, è stata analizzata la struttura dei cromosomi in metafase. Cento diverse metafasi di ogni linea cellulare sono state osservate per valutare la presenza di cromosomi dicentrici, frammenti, rotture o micro associazioni che sono poi state considerate come anomalie cromosomiche. La presenza di EBNA1 è stata valutata tramite western blot utilizzando l'espressione dell'actina come controllo. **b)** L'espressione di EBNA1 è associata con l'attivazione di DDR. L'attivazione dei marker di DDR (DNA Damage Response), pATM (in rosso) e pH2AX (in verde) è stata valutata tramite immunostaining confrontando il loro stato d'attivazione nel pannello della linea BJAB. Cellule trattate con Etoposide (2mg/ml) sono state usate come controllo positivo. **c)** EBNA1 induce rottura della doppia elica. Tramite comet assay si è valutato il grado di frammentazione dei cromosomi, e riportato un esperimento rappresentativo, la media e la deviazione standard della lunghezza delle comete e riportato per ogni condizione. Cellule trattate con Etoposide (1mg) sono state usate come controllo positivo. **d)** I danni al DNA sono proporzionali alla presenza di EBNA1. Utilizzando il sistema tet-off si è indotta o repressa la sintesi della proteina EBNA1, e si è valutato tramite comet assay il grado di frammentazione dei cromosomi. I valori sono espressi come percentuale relativa considerando come 0% la linea cellulare in cui l'espressione è repressa e come 100% la stessa linea quando l'espressione è costantemente indotta. La presenza della proteina è stata poi confermata in western blot utilizzando l'espressione dell'actina come controllo.

A questo punto risulta evidente il coinvolgimento della proteina EBNA1 nei fenomeni di instabilità genomica e danni al DNA che caratterizzano i linfomi di Burkitt EBV+. Resta quindi

da capire quali siano i meccanismi molecolari alla base di questo fenotipo. Come noto, nei tumori, gli eventi che possono portare a causare danni al DNA sono fondamentalmente lo stress replicativo dovuto all'attivazione di oncogeni quali *myc* e *ras* oppure diversi fenomeni endogeni o esogeni che portano ad una aumentata produzione di ROS. Considerando che EBNA1 non è in grado di agire come un oncogene e non induce sintesi del DNA, abbiamo ipotizzato che i ROS fossero coinvolti nel danneggiamento del DNA.

Per valutare quindi i livelli endogeni di ROS, diverse linee di linfoma di Burkitt sono state analizzate tramite DC-FDA (diclorodidrofluoresceina diacetato) staining ed analizzate al citofluorimetro (FACS). Questo composto è in grado di entrare nelle cellule diffondendo attraverso la membrana cellulare, una volta all'interno della cellula può venir ossidato dai ROS diventando così fluorescente e misurabile tramite citofluorimetria., maggiore è lo stato ossidativo nella cellula e maggiore sarà il segnale rilevato. Tutte le linee testate hanno mostrato come in presenza di EBNA1, sia in cellule EBV+ che in cellule trasfettate con EBNA1, vi fosse uno stress ossidativo maggiore (figura 2a). Si è poi quindi voluto indagare se l'aumentato livello di danni al DNA fosse correlato con l'aumento dei livelli endogeni dei ROS. A tal fine la linea BJAB E1 è stata trattata con due diversi agenti antiossidanti, ebselen e acido citrico, ed una volta verificato l'effetto del trattamento sui livelli dei ROS che sono quindi risultati inferiori si è analizzato il grado di attivazione dell'istone pH2AX come parametro per quantificare il grado di danno al DNA. Come mostrato in figura 2b è risultato evidente come il trattamento con antiossidanti, avendo abbassato i livelli endogeni dei ROS, ha portato ad una diminuzione del livello di danni al DNA che si riflette in una minor attivazione di pH2AX. Ulteriore conferma di questa correlazione si è avuta trattando le stesse cellule con gli antiossidanti per un periodo più esteso, tre e sette giorni, e andando a verificare il numero di anomalie cromosomiche che è risultato essere diminuito nel tempo (figura 2c).

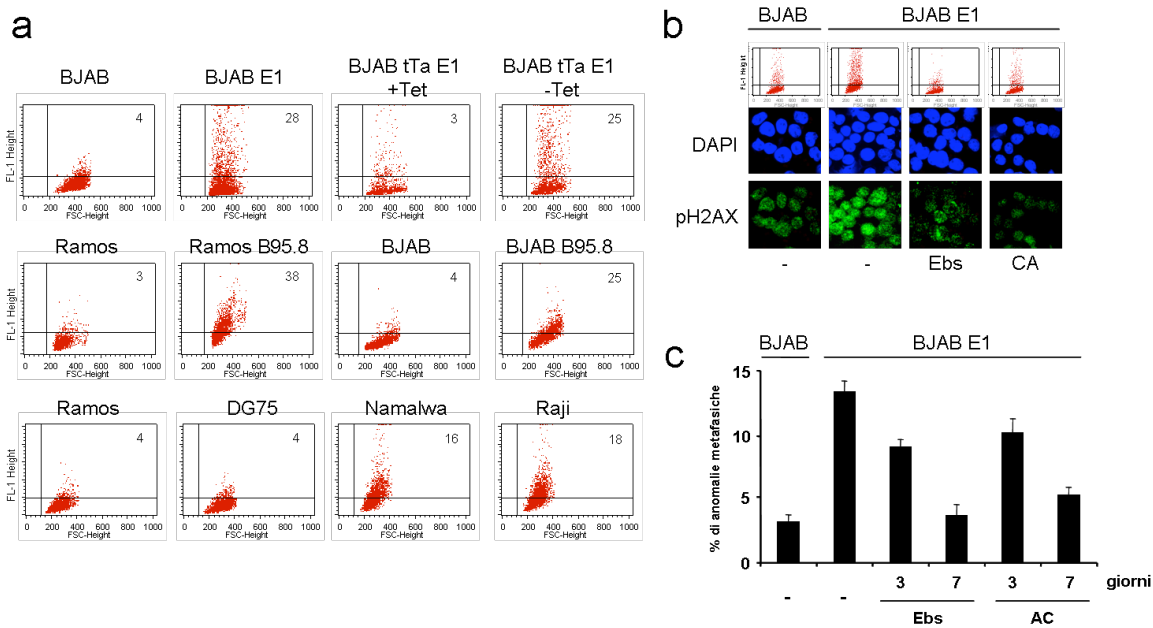


Figura 2 a) L'espressione di EBNA1 è associata all'aumento di ROS. I livelli endogeni di ROS sono stati valutati tramite DCFDA, un composto in grado di diffondere attraverso le membrane che diventa fluorescente una volta ossidato dai ROS. Linee cellulari EBNA1 negative, stabilmente trasfettate con EBNA1, o linee cellulari EBV positive sono state utilizzate per valutare l'effetto dell'espressione di EBNA1 sulla produzione di ROS. Nella figura sono riportati FACS plots rappresentativi per ogni linea, la MFI media (mean fluorescence intensity) è riportata all'interno del plot. **b)** Effetto degli antiossidanti sull'attivazione dei DDR. Il trattamento con antiossidanti (0.35mM ebselen o 1mM acido citrico) comporta una diminuzione dei livelli cellulari di ROS, che si riflette in una diminuzione del livello d'attivazione di pH2AX. **c)** Effetto degli antiossidanti sulla presenza di anomalie cromosomiche. Il trattamento della linea BJAB E1 con due differenti antiossidanti diminuisce nel tempo la presenza delle anomalie cromosomiche dovute alla presenza di EBNA1, dopo 7 giorni di trattamento i livelli sono comparabili a quelli riscontrati nella linea EBNA1 negativa.

Nel complesso questi dati ci suggeriscono come i ROS siano direttamente implicati nel causare le anomalie cromosomiche e i danni al DNA precedentemente evidenziati nelle linee tumorali che esprimono EBNA1, e che il fenotipo risulta reversibile utilizzando agenti antiossidanti.

Avendo individuato che i ROS sono la causa dell'instabilità genomica, ci si è chiesti il meccanismo molecolare che la proteina EBNA1 utilizza per causare il loro aumento.

L'aumento dei livelli dei ROS può fondamentalmente essere causato da una alterazione del loro metabolismo, ovvero un aumento della loro produzione oppure una diminuzione della loro degradazione. Poiché nel mantenimento dei livelli dei ROS sono implicati diversi enzimi e diverse molecole ad azione antiossidante, è stato consultato un database pubblico del NCBI, che riporta i risultati di un ampio studio di microarray condotto su numerose linee di tumori e linfomi correlati ad EBV. Tra tutte queste linee ci siamo focalizzati solamente sui linfomi di Burkitt EBV+ ed EBV-. Di tutti i geni presenti nel database abbiamo considerato solamente quelli relativi al metabolismo dei ROS, questi geni sono poi stati analizzati per

trovare eventuali differenze di espressione quando si confrontano i Burkitt EBV+ e quelli EBV-. Di tutti i circa 120 geni considerati, 4 hanno mostrato una interessante alterazione dovuta alla presenza di EBV, nello specifico ACOX1, GPX1 e NOX2 sono risultati significativamente up-regolati mentre LOXL2 è risultato significativamente down-regolato (figura 3a).

L'espressione del mRNA di questi geni è stata quindi valutata tramite RT-PCR nel pannello cellulare di Ramos e BJAB (figura 3b), valutando sia le linee infettate che quelle stabilmente trasfettate con EBNA1. Dei 4 geni testati uno ha presentato una evidente up-regolazione del trascritto in presenza di EBV o della sola proteina EBNA1, questo gene è quello che codifica per la proteina NOX2. Questa proteina, nota anche con il nome di gp91^{phox}, è la subunità catalitica del complesso enzimatico NADPH ossidasi. Per valutare se l'aumentata trascrizione portasse poi ad un aumento dei livelli proteici abbiamo testato in western blot l'espressione della proteina sulle stesse linee ed effettivamente in presenza di EBV o di EBNA1 i livelli di NOX2 risultano maggiori rispetto alle linee cellulari che non esprimono EBNA1.

Per confermare ulteriormente il ruolo della proteina EBNA1 nell'up-regolazione del NOX2 abbiamo utilizzato il sistema tet-off. Utilizzando cellule che sono state costantemente coltivate in presenza di tetraciclina, che quindi non esprimevano la proteina EBNA1, se ne è indotta l'espressione rimuovendo la tetraciclina dal terreno di coltura. Come è stato chiaramente dimostrato tramite western blot il graduale aumento dell'espressione di EBNA1 è accompagnato dall'up-regolazione del NOX2, a dimostrazione del fatto che in qualche modo la proteina EBNA1 è in grado d'indurre l'aumento dei livelli proteici del NOX2.

In seguito abbiamo voluto capire tramite quale meccanismo EBNA1 inducesse l'up-regolazione del NOX2. Un aumento dei livelli proteici può essere fondamentalmente causato da due fenomeni, un'aumentata sintesi dovuta all'aumento della trascrizione del gene oppure un diminuita degradazione della proteina NOX2. Considerando che anche i livelli di mRNA per NOX2 sono risultati up-regolati nelle linee EBNA1 positive, è stato ipotizzato che l'effetto di EBNA1 avvenisse a livello trascrizionale. Per dimostrare ciò si è utilizzato il saggio della luciferasi, il promotore del NOX2 è stato clonato a monte del gene della luciferasi e questo plasmide è stato poi cotrasfettato con quantità crescenti di un plasmide codificante per EBNA1. Dopo 48h dalla trasfezione si è eseguito il saggio della luciferasi, come mostrato in figura 3d l'espressione dell'antigene virale induce una aumentata trascrizione del gene della luciferasi valutata tramite un aumento della attività dell'enzima. L'espressione della proteina EBNA1 è stata poi valutata in western blot.

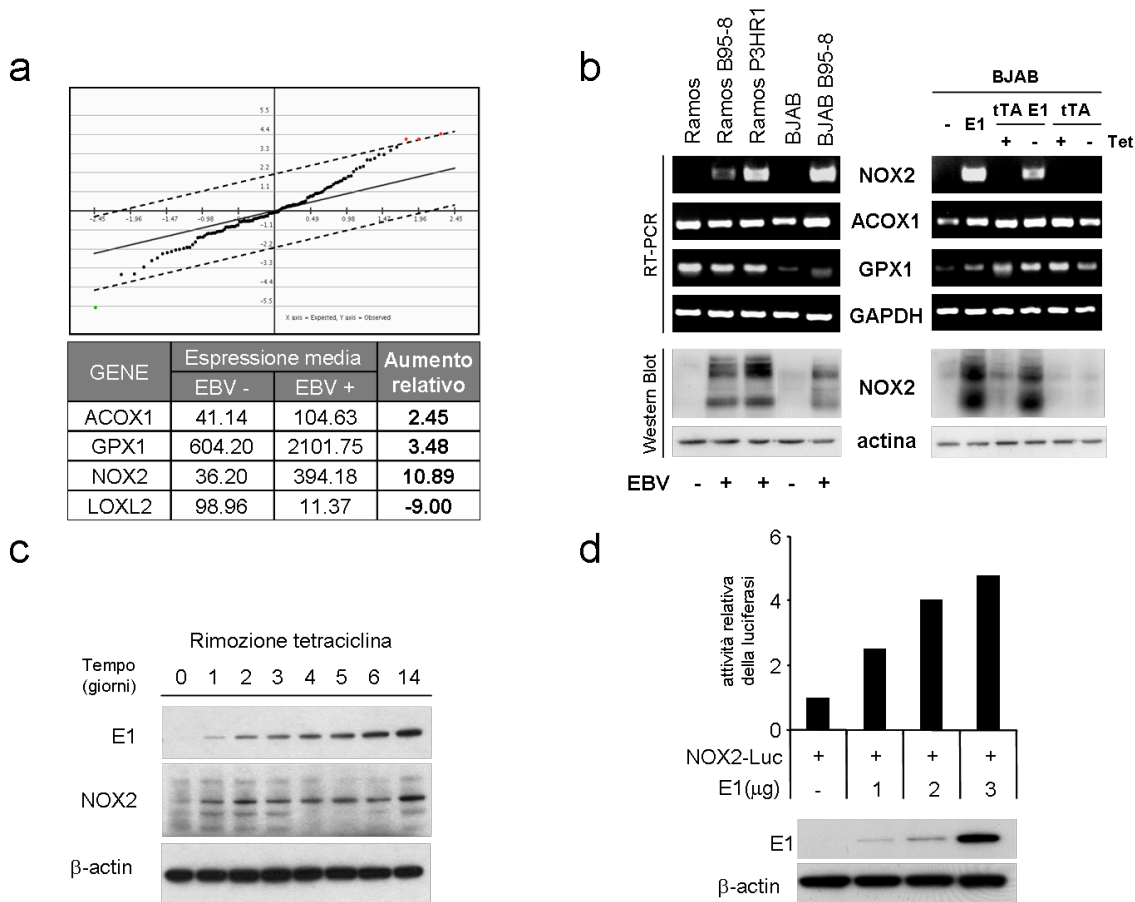


Figura 3 a) Analisi di tutte le proteine correlate con il metabolismo dei ROS tramite un NCBI microarray database, si sono valutate le differenze all'interno confrontando linfomi di Burkitt EBV- e EBV+. Di 120 diversi geni, 4 sono risultati significativamente di sregolati, nello specifico ACOX1, GPX1 e NOX2 sono risultati up-regolati mentre LOXL1 è risultato down-regolato. **b)** Analisi delle proteine relative al metabolismo dei ROS. Inizialmente si è verificata la trascrizione tramite RT-PCR, una volta identificata l'up-regolazione della trascrizione del NOX2 se ne è verificata l'espressione tramite western blot. L'analisi è stata eseguita sul pannello delle Ramos e delle BJAB. **c)** Aumento della espressione del NOX2 nel modello E1 tet-off. A seguito della rimozione della tetraciclina dal terreno di coltura viene indotta l'espressione della proteina E1, e come conseguenza si verifica un aumento dell'espressione del NOX2. **d)** Saggio della luciferasi per valutare l'effetto di E1 sulla trascrizione del NOX2. Quantità crescenti di un plasmide codificante per E1 sono state cotrasfettate con il plasmide della luciferasi contenente il promotore del NOX2, l'aumentata espressione della proteina E1 induce un aumentata trascrizione della luciferasi e quindi della sua attività enzimatica.

Per dimostrare il diretto coinvolgimento del NOX2 nella generazione dei ROS che caratterizza le linee EBNA1 positive sono stati utilizzati due diversi inibitori del complesso NADPH ossidasi, l'apocynin (Apo) e il diphenyleneiodonium (DPI). Trattando le linee BJAB E1 e BJAB tTA E1 -Tet per 18h si è poi andati a valutare i livelli endogeni di ROS. Come mostrato in figura 4a risulta evidente come tramite l'inibizione del complesso del NADPH ossidasi si ottenga un significativo abbassamento dei livelli di ROS. In particolare l'utilizzo del DPI determina un livello di ROS paragonabile a quello della linea cellulare EBNA1

negativa dimostrando chiaramente come l'aumentata produzione dei ROS nelle linee EBNA1 positive sia completamente dovuta all'attività del complesso del NADPH ossidasi. Effetto secondario dell'inibizione del complesso del NADPH ossidasi è la diminuita fosforilazione dell'istone H2AX (figura 4b), indice del fatto che anche i danni al DNA risultano diminuiti, ulteriore conferma di questo fenomeno è stata ottenuta tramite comet assay, i trattamenti con gli inibitori riducono infatti la lunghezza della coda della cometa che è proporzionale al grado di frammentazione del DNA dovuto alle rotture della doppia elica di DNA.

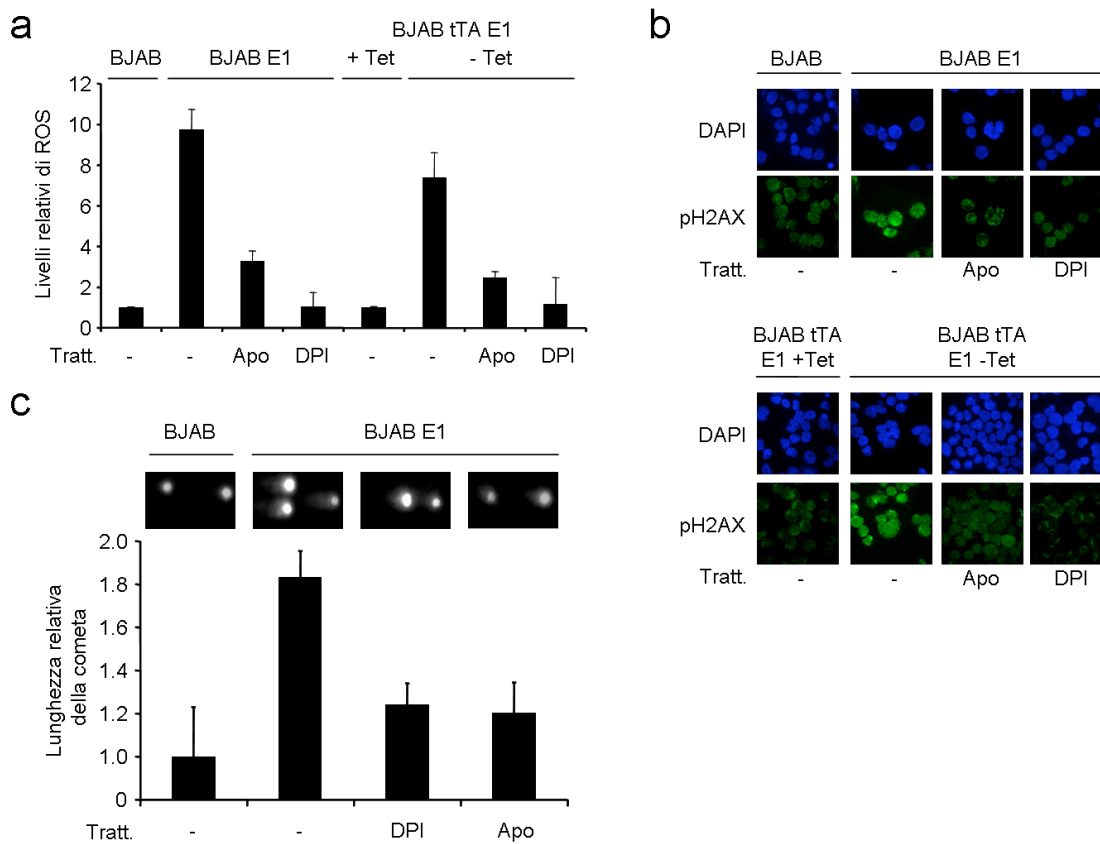


Figura 4 a) Effetto degli inibitori del NOX2 sui livelli di ROS. Il trattamento delle linee E1 positive, che presentano una aumentata espressione di NOX2, con inibitori della attività catalitica, quali apocynin 100mM o diphenyleneiodonium 40mM per 18h, induce una abbassamento dei livelli di ROS. **b)** Effetto degli inibitori del NOX2 sullo stato di DNA damage. L'inibizione dell'attività del NOX2 diminuisce il grado di DNA damage della cellula, risulta infatti una minore attivazione di pH2AX. **c)** Effetto degli inibitori del NOX2 sul grado di frammentazione del DNA. Gli stessi trattamenti portano inoltre alla diminuzione del grado di rottura del DNA, valutato tramite comet assay, la lunghezza della coda della cometa risulta infatti diminuita quando le cellule vengono trattate con questi inibitori.

Per confermare ulteriormente il ruolo della subunità catalitica NOX2 si è deciso di inibirne la sintesi tramite RNA interference, tramite infezione lentivirale si è quindi ottenuto il knock-down della proteina. Come mostrato in figura 5a, utilizzando due differenti sequenze

antisense si è ottenuta 48h dopo l'infezione una down-regolazione pari al circa 50%. A seguito della down-regolazione della subunità, si verifica un abbassamento dei livelli di ROS (figura 5b) ed una conseguente minor attivazione dell'istone H2AX (figura 5c) ad indicare un minor stato di danneggiamento del DNA.

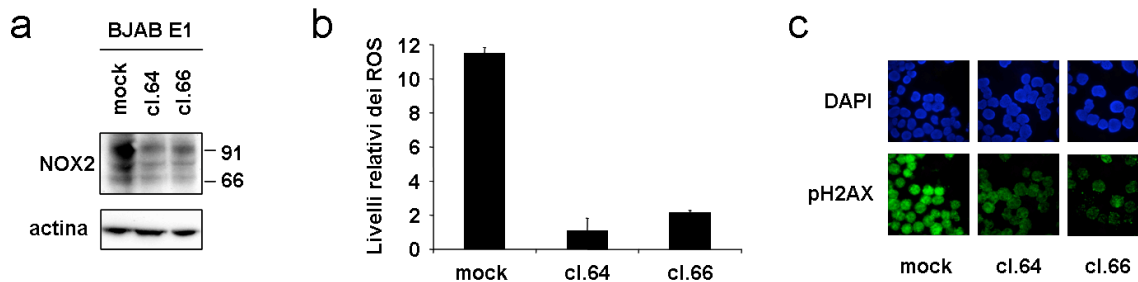


Figura 5 a) Down-regolazione del NOX2 tramite lentivirus. Espressione della proteina NOX2 nella linea BJAB E1 a seguito dell'infezione. **b)** Livelli relativi di ROS valutati tramite analisi al FACS. LA downregolazione dell'espressione proteica determina una diminuzione dei livelli di ROS. **c)** Livelli di DNA damage a seguito della downregolazione del NOX2. Tramite staining per pH2AX si è valutato il grado di DNA damage cellulare e si è visto come l'inibizione dell'espressione del NOX2 porta ad una diminuzione del fenomeno.

L'inibizione dell'attività enzimatica del NOX2 in pratica permette di ottenere gli stessi effetti che si hanno utilizzando gli antiossidanti, nel complesso quindi possiamo affermare che l'aumento dei livelli di ROS nelle linee EBNA1 positive è completamente dovuto all'aumentata attività del complesso del NADPH ossidasi, e che l'inibizione del complesso abbassa i livelli dei ROS diminuendo anche gli effetti dannosi che questi hanno a livello del DNA. Inoltre è risultato evidente come l'up-regolazione della subunità catalitica NOX2 sia dovuta ad un effetto trascrizionale della proteina EBNA1.

Conclusioni

“Studio Carcinogenicità”

Il linfoma di Burkitt fu identificato e descritto per la prima volta nel 1958 e alcuni anni dopo venne scoperta una stretta correlazione tra questa patologia ed il virus di EBV, ed ancora oggi a poco più di 50 anni da queste scoperte il rapporto tra il virus e la patologia non è ancora stato chiarito completamente⁴⁹. Caratteristica fondamentale che identifica il linfoma di Burkitt è la presenza della traslocazione dell'oncogene *c-myc* sotto il controllo del promotore delle immunoglobuline, al contrario la presenza del virus nelle cellule di linfoma è solamente un evento altamente ricorrente ma non necessario per l'insorgenza della patologia, dimostrato dal fatto che vi sono linfomi di Burkitt EBV negativi. Inoltre il tipo di latenza instaurata dal virus, in questa patologia prevede l'espressione della sola proteina EBNA1, di conseguenza nessuna delle proteine virali in grado d'indurre proliferazione cellulare, quali EBNA2 e LMP1, viene espressa.

Nonostante queste considerazioni si è sempre creduto che il virus di EBV potesse avere un ruolo nella trasformazione cellulare.

In questo studio si è affrontata la questione dell'oncogenicità del virus di Epstein-Barr indagando possibili meccanismi che inducono il fenomeno della instabilità genomica nelle linee di linfoma di Burkitt. Tale fenomeno, in generale, risulta essere di fondamentale importanza nel contribuire alla selezione clonale delle cellule maligne, permettendo quindi al tumore di crescere e metastatizzare in altri distretti anatomici.

Era già noto come alcune proteine virali fossero in grado di causare instabilità genomica interferendo con i meccanismi di riparazione del DNA o checkpoint del ciclo cellulare, non era però chiaro l'esistenza di questo fenomeno anche nei programmi di latenza che non esprimessero le suddette proteine, tra cui appunto il linfoma di Burkitt che come noto, essendo caratterizzato dal programma di latenza di tipo I, esprime la sola proteina EBNA1.

In questo studio si è dimostrato come la sua sola espressione sia sufficiente ad indurre una cascata di eventi che può portare alla formazione di aberrazioni cromosomiche e danni al DNA. Pur non agendo come un vero e proprio oncogene, può sinergizzare con altri oncogeni favorendo la trasformazione della cellula.

Come dimostrato dai nostri dati la maggiore frequenza dei fenomeni di instabilità genomica nelle linee di Burkitt EBV+ è strettamente correlata all'aumento dei livelli endogeni dei ROS che sono stati riscontrati in queste linee. Il fenomeno è inoltre risultato reversibile tramite

l'utilizzo di antiossidanti che eliminando i ROS determinano la scomparsa degli eventi di instabilità genomica.

Il meccanismo tramite cui EBNA1 è in grado di indurre un aumentato livello di ROS all'interno della cellula si basa sull'up-regolazione della subunità catalitica dell'enzima NADPH ossidasi anche nota con il nome di NOX2. Si è visto come l'up-regolazione avvenga a livello trascrizionale, la presenza di EBNA1 è infatti in grado di indurre l'attivazione del promotore del NOX2.

Oltre che nell'indurre uno stress di tipo ossidativo, i ROS sono anche coinvolti come secondi messaggeri in numerosi controllando quindi eventi cellulari quali la crescita, il differenziamento, l'apoptosi ed il ciclo cellulare.

È noto come i livelli di stress ossidativo siano importanti durante l'infezione di EBV, ed in particolare si è visto come la generazione in vitro di linee linfoblastoidi sia favorita in condizione di stress ossidativo mentre risulta inibita a seguito dell'utilizzo di anti-ossidanti.

Questo suggerisce quindi che la capacità di EBV d'aumentare i livelli di stress ossidativo possa essere un meccanismo chiave nel processo d'infezione virale mirato al favorire la stabilizzazione del genoma virale nella cellula ospite.

Il fenomeno dell'instabilità genomica in questo contesto risulterebbe quindi un effetto collaterale del meccanismo utilizzato dal virus per infettare le cellule B. Le potenziali dannose conseguenze sarebbero tenute sotto stretto controllo in individui sani tramite specifiche risposte immunitarie che limiterebbero il propagarsi delle cellule infettate. Solamente quando questo controllo, a causa di immunosoppressioni, non sia in grado di limitare la proliferazione delle cellule B infettate, potrebbero verificarsi fenomeni di espansione clonale di cellule B che porterebbero all'insorgenza di linfomi EBV associati.

Nel complesso questi dati suggeriscono un meccanismo tramite il quale il virus di EBV potrebbe favorire la trasformazione cellulare e quindi l'insorgenza di una patologia linfoproliferativa.

Bibliografia

1. Parham P. Immunologia. Zanichelli 2005.
2. Abbas A, Lichtman A, Pober J. Immunologia molecolare e cellulare. Piccin 2002.
3. Masucci M. Epstein-Barr virus oncogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Oncogene* 2004;23:2107-15.
4. Hewitt E. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 2003;110:163-9.
5. Ploegh H. Viral strategies of immune evasion. *Science* 1998;280:248-53.
6. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 1999;17:739-79.
7. Niedermann G, Butz S, Ihlenfeldt HG, Grimm R, Lucchiari M, Hoschützky H, Jung G, Maier B, Eichmann K. Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity* 1995;2:289-99.
8. Princiotta MF, Finzi D, Qian SB, Gibbs J, Schuchmann S, Buttgereit F, Bennink JR, Yewdell JW. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 2003;18:343-54.
9. Myung J, Kim K, Crews C. The ubiquitin-proteasome pathway and proteasome inhibitors. *Med. Res. Rev.* 2001;21:245-73.
10. Yamano T, Murata S, Shimbara N, Tanaka N, Chiba T, Tanaka K, Yui K, Udono H. Two distinct pathways mediated by PA28 and hsp90 in major histocompatibility complex class I antigen processing. *J. Exp. Med.* 2002;196:185-96.
11. Ruppert J, Sidney J, Celis E, Kubo RT, Grey HM, Sette A. Prominent role of secondary anchor residues in peptide binding to HLA-A2.1 molecules. *Cell* 1993;74:929-37.
12. Falk K, Rötzschke O, Grahovac B, Shendel D, Stevanovic S, Gnau V, Jung G, Strominger JL, Rammensee H-G. Allele-specific peptide ligand motifs of HLA-C molecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1993;90:12005-9.
13. Kuppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat. Rev. Immunol.* 2003;3:801-12.
14. Callan M. The evolution of antigen-specific CD8+ T cell responses after natural primary infection of humans with Epstein-Barr virus. *Viral Immunol.* 2003;16:3-16.
15. Houssaint E, Saulquin X, Scotet E, Bonneville M. Immunodominant CD8 T cell response to Epstein-Barr virus. *Biomed. Pharmacother.* 2001;55:373-80.
16. Khanna R, Burrows S, Moss D. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Microbiol. Rev.* 1995;59:387-405.
17. Voo K, Fu T, Wang H, Tellam J, Heslop H, Brenner M, Rooney C, Wang R. Evidence for the presentation of major histocompatibility complex class I-restricted Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 peptides to CD8+ T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 2004;199:459-70.
18. Dantuma N, Masucci M. The ubiquitin/proteasome system in Epstein-Barr virus latency and associated malignancies. *Semin. Cancer Biol.* 2003;13:69-76.
19. Levitskaya J, Coram M, Levitsky V, Imreh S, Steigerwald-Mullen PM, Klein G, Kurilla MG, Masucci MG. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature (London)* 1995;375:685-8.

20. Levitskaya J, Sharipo A, Leonchiks A, Ciechanover A, Masucci MG. Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94:12616-21.
21. Apcher S, Fahraeus R, Manoury B. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system by interfering with defective ribosomal products. *Microbes Infect.* 2004;6:1212-8.
22. Munz C. Epstein-barr virus nuclear antigen 1: from immunologically invisible to a promising T cell target. *J. Exp. Med.* 2004;199:1301-4.
23. Blake N, Haigh T, Shaka'a G, Croom-Carter D, Rickinson A. The importance of exogenous antigen in priming the human CD8+ T cell response: lessons from the EBV nuclear antigen EBNA1. *J. Immunol.* 2000;165:7078-87.
24. Bickham K, Goodman K, Paludan C, Nikiforow S, Tsang ML, Steinman RM, Munz C. Dendritic cells initiate immune control of epstein-barr virus transformation of B lymphocytes in vitro. *J. Exp. Med.* 2003;198:1653-63.
25. Blake N, Lee S, Redchenko I, Thomas W, Steven N, Leese A, Steigerwald-Mullen PK, MG, Frappier L, Rickinson A. Human CD8+ T cell responses to EBV EBNA1: HLA class I presentation of the (Gly-Ala)-containing protein requires exogenous processing. *Immunity* 1997;7:791-802.
26. Tellam J, Connolly G, Green K, Miles J, Moss D, Burrows S, Khanna R. Endogenous presentation of CD8+ T cell epitopes from Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1. *J. Exp. Med.* 2004;199:1421-31.
27. Tortora G, Daniele G. New frontiers for the cancer treatment. *Recenti Prog. Med.* 2006;97:781-6.
28. Bach J. Therapeutic monoclonal antibodies. *Ann. Pharm. Fr.* 2006;64:308-11.
29. Melero I, Hervas-Stubbs S, Glennie M, Pardoll D, Chen L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 2007;7:95-106.
30. Simons F, HayGlass K. Immunotherapy with a ragweed vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2007;356:86-7.
31. Leen A, Rooney C, Foster A. Improving T Cell Therapy for Cancer. *Annual Review of Immunology* 2006;27.
32. Thannickal VJ, Fanburg BL. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L1005-28.
33. Klebanoff SJ. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Intern. Med.* 1980;93:480-9.
34. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 1996;313 (Pt 1):17-29.
35. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J.* 2000;14:1889-900.
36. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000;21:361-70.
37. Djordjevic T, Pogrebniak A, BelAiba RS, Bonello S, Wotzlaw C, Acker H, Hess J, Gorlach A. The expression of the NADPH oxidase subunit p22phox is regulated by a redox-sensitive pathway in endothelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 2005;38:616-30.
38. Hunter T. Signaling--2000 and beyond. *Cell* 2000;100:113-27.
39. Rada B, Hably C, Meczner A, Timar C, Lakatos G, Enyedi P, Ligeti E. Role of Nox2 in elimination of microorganisms. *Semin Immunopathol* 2008;30:237-53.
40. Rada B, Leto TL. Oxidative innate immune defenses by Nox/Duox family NADPH oxidases. *Contrib Microbiol* 2008;15:164-87.
41. Genestra M. Oxy radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cell. Signal.* 2007;19:1807-19.

42. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol. Rev.* 2007;87:245-313.
43. Cheng G, Cao Z, Xu X, van Meir EG, Lambeth JD. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 2001;269:131-40.
44. Eklund EA, Luo W, Skalnik DG. Characterization of three promoter elements and cognate DNA binding protein(s) necessary for IFN-gamma induction of gp91-phox transcription. *J. Immunol.* 1996;157:2418-29.
45. Christmann M, Tomicic MT, Roos WP, Kaina B. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 2003;193:3-34.
46. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2003;3:276-85.
47. Goetz ME, Luch A. Reactive species: a cell damaging route assisting to chemical carcinogens. *Cancer Lett.* 2008;266:73-83.
48. Young LS, Rickinson AB. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat. Rev. Cancer* 2004;4:757-68.
49. Thorley-Lawson DA, Allday MJ. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma. *Nat Rev Microbiol* 2008;6:913-24.
50. Young LS, Murray PG. Epstein-Barr virus and oncogenesis: from latent genes to tumours. *Oncogene* 2003;22:5108-21.
51. Voo KS, Fu T, Wang HY, Tellam J, Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM, Wang RF. Evidence for the presentation of major histocompatibility complex class I-restricted Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 peptides to CD8+ T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 2004;199:459-70.
52. Tellam J, Connolly G, Green KJ, Miles JJ, Moss DJ, Burrows SR, Khanna R. Endogenous presentation of CD8+ T cell epitopes from Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1. *J. Exp. Med.* 2004;199:1421-31.
53. Lee SP, Brooks JM, Al-Jarrah H, Thomas WA, Haigh TA, Taylor GS, Humme S, Schepers A, Hammerschmidt W, Yates JL, Rickinson AB, Blake NW. CD8 T cell recognition of endogenously expressed Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *J. Exp. Med.* 2004;199:1409-20.
54. Khanna R, Burrows SR, Moss DJ. Immune regulation in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Microbiol. Rev.* 1995;59:387-405.
55. Raptis S, Bapat B. Genetic instability in human tumors. *EXS* 2006:303-20.
56. Kamranvar SA, Gruhne B, Szeles A, Masucci MG. Epstein-Barr virus promotes genomic instability in Burkitt's lymphoma. *Oncogene* 2007;26:5115-23.
57. Kinner A, Wu W, Staudt C, Iliakis G. Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res* 2008;36:5678-94.
58. Blasiak J, Kowalik J, Malecka-Panas E, Drzewoski J, Wojewodzka M. DNA damage and repair in human lymphocytes exposed to three anticancer platinum drugs. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 2000;20:119-31.

Lista delle pubblicazioni

1. Preta G, **Marescotti D**, Fortini C, Carcoforo P, Castelli C, Masucci M, Gavioli R. Inhibition of serine-peptidase activity enhances the generation of a survivin-derived HLA-A2-presented CTL epitope in colon-carcinoma cells. *Scand J Immunol.* 2008 Dec;68(6):579-88
2. Gruhne B, Sompallae R, **Marescotti D**, Kamranvar SA, Gastaldello S, Masucci MG. The Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 promotes genomic instability via induction of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jan 12. [Epub ahead of print]
3. **Marescotti D**, Destro F, Baldisserotto A, Marastoni M, Coppotelli G, Masucci MG and Gavioli R. Evidence for a new HLA-A2 restricted EBNA1 derived epitope. *Manuscript*

Ringraziamenti

Alla **mia famiglia**, che sempre mi ha supportato e consigliato senza mai farmi sentire il peso delle scelte fatte anche quando queste mi hanno portato lontano da casa. Questo traguardo non sarebbe stato possibile senza di voi, siatene orgogliosi quanto ne sono io.

A **Miky**, mia compagna di vita che mai mi ha abbandonato in questo lungo percorso spingendomi sempre ad affrontare ogni sfida a testa alta, a te che più di tutti hai silenziosamente sofferto ed accettato ogni mia scelta. Grazie per non avermi mai lasciato solo, grazie per aver condiviso con me la tua vita.

A **Riccardo Gavioli**, mio tutor italiano, Grazie per questa indimenticabile avventura. Grazie per avermi aperto le porte a questo mondo, per avermi sempre sostenuto e per aver fatto in modo che fossi sempre pronto e maturo nel prendere le decisioni importanti.

A **Federica**, instancabile collega e amica che ha condiviso con me le “gioie della citotossicità”. Grazie per tutto il tuo aiuto, senza di te LQT sarebbero solamente tre lettere dell’alfabeto. Ti auguro ogni fortuna!

A **Eleonora**, talvolta insopportabile ma pur sempre indispensabile e a suo modo “unica” collega. Questa tesi non sarebbe la stessa senza il tuo indispensabile aiuto. Grazie per tutto ciò che mi hai insegnato e per avermi “portato con te” nella mia prima esperienza svedese.

A **Silvia**, una amica prima ancora che collega. Spero che la vita ti sorrida sempre come eri solita fare tu, non dimenticherò mai tutte le nostre risate, è stato bello vivere il laboratorio con te!

A **Marcello** e **Giulia**, lavorare con voi (ma abbiamo davvero lavorato???) è stata una esperienza indimenticabile. Grazie per tutte le risate e le belle ore passate insieme...”agli aperitivi di dipartimento”.

A **Michela** e **Laura**, le mie prime laureande, croce e delizia del mio primo periodo di dottorato. Vi ricorderò sempre con affetto.

A **Giulio**, co-autore del mio primo lavoro. Spero che il tuo entusiasmo nella ricerca ti porti lontano.

A **Maria Masucci**, mia tutor “svedese” che mi ha ospitato per la seconda parte del dottorato. È stato un onore lavorare con te e per te, grazie per tutto quello che mi hai insegnato e per la passione che mi hai trasmesso. Prima o poi EBNA1 la degradiamo!

A **Pino, Teresa e Stefano**, *the Italian gang*, senza di voi le mie giornate svedesi non sarebbero state così luminose. Grazie per avermi fatto ridere e vivere ogni giorno lavorativo come una festa. Non vi dimenticherò mai, siete stati compagni di lavoro e di vita fantastici!

Ad **Andrea, Diego e Filippo**, amici di una vita intera. Grazie per la vostra amicizia e per esserci sempre stati nei momenti importanti.

A **Lucio e Nicola**, fedeli compagni di mille avventure, per quanto il lavoro mi possa portare lontano so che voi ci sarete sempre. Vi auguro tanta felicità!

Ad **Elisa ed Irene**, compagne ed amiche degli anni universitari, la vostra amicizia è un dono bellissimo, è un onore avervi nella mia vita.

A **Silvia Martinelli**, tutto questo non sarebbe mai stato possibile senza di te. La passione per la biologia e la chimica che mi hai trasmesso sui banchi del liceo mi ha portato sin qua. L'origine di questo successo sei tu!