

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI

FEDERICO II



DIPARTIMENTO DI MEDICINA VETERINARIA E PRODUZIONI ANIMALI

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

IN

BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE IN MEDICINA

VETERINARIA

-XXVII CICLO -

“Modulazione dell’apoptosi indotta dall’infezione da
Caprine Herpesvirus 1 in una linea cellulare neuronale”

Relatore e Tutor

Chiar.mo Prof. Giuseppe Iovane

Coordinatore

Chiar.mo Prof. Giuseppe Cringoli

Candidato

dr. Claudio de Martinis

Anno Accademico 2014/2015

INDICE

ABSTRACT

1. INTRODUZIONE

1.1 Famiglia Herpesviridae

1.2 Caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1)

1.3 Apoptosi O Programmed Cell Death (pcd)

1.4 Infezioni virali e apoptosi

2. SCOPO DEL LAVORO

3. MATERIALI E METODI

3.1 Cellule e condizioni di coltura

3.2 Infezioni sperimentali

3.3 Apotex-Glo™ Triplex Assay

3.4 Rt² Profiler PCR Array System

3.5 Valutazione dell'apoptosi mediante Western Blotting

3.6 Analisi Statistica

4. RISULTATI

4.1 Apotex-Glo™ Triplex Assay

4.2 Rt² Profiler PCR Array System

4.3 Estrazione proteine ed analisi Western Blot

5. DISCUSSIONI

BIBLIOGRAFIA

RINGRAZIAMENTI

ABSTRACT

Come gli altri membri della sottofamiglia degli Alfaherpesvirus, il Caprine Herpesvirus tipo 1 (CpHV-1) è responsabile di infezioni latenti nelle cellule nervose del ganglio del trigemino. CpHV-1 induce apoptosi in cellule mononucleate di sangue di capra e in linee cellulari bovine, ma la capacità del virus di indurre apoptosi in cellule nervose rimane sconosciuta. In questo lavoro, è stata esaminata la suscettibilità di cellule della linea Neuro2A all'infezione da CpHV-1. In seguito all'infezione di cellule in coltura con il virus, è stata valutata l'espressione dei geni responsabili della morte cellulare utilizzando la Real-Time PCR. L'analisi delle cellule infette mediante Western Blot ha messo in evidenza l'attivazione della caspase-8, un marker della via estrinseca dell'apoptosi, e della caspase-9, un marker della via intrinseca dell'apoptosi a 12 e 24 ore dopo l'infezione. Un significativo aumento dei livelli della caspasi-3 cleavata è stata anche osservato all'apice dell'effetto citopatico a 24 ore dopo l'infezione. In particolare, a 3 e 6 ore dopo l'infezione, diversi geni proapoptotici erano sotto-espressi. A 12 ore dopo l'infezione diversi geni proapoptotici quali caspasi, TNF, CD70 e TRAF1 erano over-espressi mentre Bcl2a1a, Fadd e TNF geni erano sotto-espressi.

In conclusione, l'attivazione simultanea di caspasi-8 e caspasi-9 suggerisce che CpHV-1 può attivare il pathway di morte-recettore ed il pathway mitocondriale separatamente ed in parallelo.

ABSTRACT

Caprine herpesvirus type 1 (CpHV-1), like other members of the alpha subfamily of herpesviruses, establishes latent infections in trigeminal ganglion neurons. Our groups previously demonstrated that CpHV-1 induces apoptosis in goat peripheral blood mononuclear cells and in an epithelial bovine cell line, but the ability of CpHV-1 to induce apoptosis in neuronal cells remains unexplored. In this report, the susceptibility of Neuro 2A cells to infection by CpHV-1 was examined. Following infection of cultured cells with CpHV-1, expression of cell death genes was evaluated using real-time PCR and Western Blot assays.

Analysis of virus-infected cells revealed activation of caspase-8, a marker for the extrinsic pathway of apoptosis, and caspase-9, a marker for the intrinsic pathway of apoptosis at 12 and 24 hours post infection. Significant increase in the levels of cleaved caspase-3 was also observed at the acme of cytopathic effect at 24 hours post infection. In particular, at 3 and 6 hours post infection, several proapoptotic genes were under-expressed. At 12 hours post infection several proapoptotic genes such as caspases, TNF, Cd70 and Traf1 were over expressed while Bcl2a1a, Fadd and TNF genes were underexpressed.

In conclusion, the simultaneous activation of caspase-8 and caspase-9 suggests that CpHV-1 can trigger the death-receptor pathway and the mitochondrial pathway separately and in parallel.

Our findings are significant because this is the first published study showing the effect of CpHV-1 infection in neuronal cells in terms of gene expression and apoptosis modulation.

Key Words: Caprine Herpesvirus type 1, Apoptosis, Neurons, Gene expression.

1. INTRODUZIONE

L'apoptosi è un processo molto complesso regolato da una vasta gamma di segnali cellulari che portano infine alla frammentazione del DNA ed la demolizione delle cellule. Molte notizie sono state acquisite negli ultimi anni riguardo le vie di segnalazione e le proteine coinvolte, ma gli attuali modelli tendono ad attribuire gli effetti a pochi procedimenti noti, e molti altri, che giocano un ruolo chiave nella segnalazione restano da chiarire (Lavrik et al., 2010).

Due grandi cascate di segnale sono state individuate, in particolare la via estrinseca e la via intrinseca (Krammer et al., 2000). Entrambi coinvolgono centralmente le caspasi quali starter responsabili della attivazione dell'apoptosi (Lavrik et al., 2005). Le Caspasi iniziatrici sono, per definizione, le prime ad essere attivate. Esse a loro volta attivano caspasi effettrici, che innescano una serie di eventi proteolitici che alla fine portano alla morte cellulare (Fuentes-Prior et al., 2004).

La via estrinseca inizia quando alcuni recettori di morte (DR) sulla superficie cellulare sono attivati da ligandi di morte (DL). DR comprendono principalmente il fattore di necrosi tumorale (TNF), la famiglia dei recettori quali FAS, TNFR1 e il recettore TRAIL (TNF-correlato al ligando che induce apoptosi) (attivato dai rispettivi DL come Fas, TNF e TRAIL) (Ashkenazi et al., 1998). Il risultato del legame di un DL con un DR nella morte cellulare indotta è la formazione di un complesso (Kischkel et al., 1995), che riunisce le caspasi iniziatrice della via estrinseca, cioè procaspasi-8 e procaspasi-10 (Krammer et al., 2007). Il clivaggio di procaspasi-8 rilascia caspasi-8 nel citoplasma così da agire sulle caspasi effettrici.

La via intrinseca è innescata da una serie di fattori tra cui lo stress genotossico, irradiazione UV, alcuni ormoni (ad esempio glucocorticoidi) e privazione di citochine (Krammer et al., 2007). L'esposizione a tali fattori comporta permeabilizzazione della membrana esterna mitocondriale (MOMP) ed eventualmente rilascio del citocromo c dai mitocondri nel citosol (Green et al., 2004). Il rilascio di citocromo c dai mitocondri è inoltre regolata da proteine della famiglia del linfoma a cellule B2 (Bcl-2). La famiglia di Bcl-2 è divisa in due classi di molecole che hanno effetti opposti: membri antiapoptotici quali Bcl-2 e Bcl-xL che proteggono la cellula contro l'apoptosi, e membri proapoptotici come la proteina Bcl-2 X-associata (Bax) e Bcl-2 omologa antagonista/killer (Bak) che scatenano l'apoptosi. L'apoptosoma è formato tra il rilascio del citocromo c, fattore di attivazione apoptotica 1 e reclutamento di caspasi-9 che attiva la caspasi iniziatrice della via intrinseca, procaspasi-9. Il Clivaggio di procaspasi-9 libera caspasi-9, che a sua volta attiva le caspasi effettrici a valle (Brenner et al., 2009).

Un percorso finale comune per entrambe le cascate intrinseche ed estrinseche comporta l'attivazione delle caspasi effettrici (caspasi-3, caspasi-6 e della caspasi-7) tramite caspasi-8 nella via estrinseca o caspasi-9 nella via intrinseca. Questo poi innesca la scissione delle proteine cellulari, ritiro nucleare e la frammentazione del DNA (Krammer et al, 2007; Lo et al, 2011.).

Tra gli stimoli che sono stati associati con l'apoptosi, vi sono infezioni con virus a DNA e virus a RNA (Hay e Kannourakis, 2002). I virus possiedono vari meccanismi biochimici e genetici che eludono e/o inducono l'apoptosi nelle cellule infette attraverso le interazioni nelle diverse fasi del percorso apoptotico, ed è stato dimostrato che la modulazione dell'apoptosi attraverso proteine virus-codificate è

un passo fondamentale nella patogenesi degli herpesvirus (Cassady et al., 1998; Henderson et al., 1993; Hu et al., 1997; Longo et al., 2009; Pagnini et al., 2005; Wang et al., 1997; Pagnini et al., 2004).

Il nostro gruppo ha dimostrato in precedenza che CpHV-1 è in grado di indurre apoptosi in cellule mononucleate di sangue periferico di capra (Pagnini et al., 2005) e abbiamo indagato sul potenziale pro-apoptotico di CpHV-1 in una linea cellulare permissiva (cellule Madin Darby di rene bovino), valutando il profilo apoptotico come la condensazione della cromatina e laddering del DNA (Longo et al., 2009). In questo studio, al fine di caratterizzare in dettaglio il percorso intracellulare con cui CpHV-1 è in grado di indurre apoptosi, abbiamo analizzato la risposta genica durante la fase apoptotica di un'infezione di CpHV-1 in una linea cellulare neuronale Neuro 2A (Neuroblastoma di topo albino).

1.1 FAMIGLIA HERPESVIRIDAE

La famiglia Herpesviridae comprende numerosi agenti virali isolati in ospiti diversi quali uomo e differenti specie animali. Le caratteristiche fondamentali sono riassumibili come segue: hanno diametro compreso tra i 120 e i 200 nm; sono avvolti da un envelope bilaminare da cui sporgono particolari proiezioni superficiali di natura glicoproteica (gB, gC, gD) che fungono da siti di adsorbimento del virus; tra il capsid, a simmetria icosaedrica, e l'envelope è posto uno strato proteico asimmetrico definito tegumento; all'interno del capsid è contenuto il core costituito da materiale proteico di natura fibrillare al quale si avvolge l'acido nucleico associato a proteine; il genoma è costituito da dsDNA lineare e codifica per

numerose proteine alcune delle quali non sono essenziali per la replicazione virale, ma influenzano la virulenza del ceppo. Al virione sono associate trenta proteine, di cui dieci dell'envelope, sei del nucleocapside, due associate al DNA e le restanti nel tegumento (Levine 1992; Fenner et al. 1993).

Il ciclo replicativo si realizza in sede nucleare e determina la formazione di inclusioni caratteristiche, associate o meno alla comparsa di cellule giganti. In particolare, dopo la penetrazione del virus all'interno della cellula per fusione dell'envelope alla membrana cellulare, dal tegumento si libera una proteina denominata VHS (Virion Host Shut-off protein) che inibisce la sintesi delle proteine cellulari e l' α -TIF (α -gene Trans Inducing Factor) necessario ad avviare la prima fase trascrizionale. Il DNA raggiunge il nucleo della cellula ancora rivestito dal capsido che viene rilasciato a questo livello; la trascrizione del DNA avviene in tre fasi distinte e quindi anche l'espressione delle proteine risulta temporalmente regolata. In particolare le proteine vengono distinte in tre classi cinetiche in base all'ordine di sintesi nell'infezione in vitro (Hones & Roizman, 1974,1975); sono classificate in proteine immediate-early (IE o α), early (E o β), e tardive (L o γ). Le α sono espresse immediatamente dopo il rilascio del genoma virale dal capsido nel nucleo (Costanzo et al.,1977), le β dopo la sintesi delle α e la sintesi delle β risulta dipendere dalla presenza delle altre due. Inoltre i geni che codificano per le proteine β operano la trascrizione di enzimi (Timidino-Chinasi, DNA polimerasi) che rendono la replicazione virale totalmente indipendente dall'attività degli enzimi cellulari; la maggior parte delle proteine gamma entra a far parte della struttura del virus e dopo esser state prodotte nel citoplasma, rientrano nel nucleo per essere assemblate. L'envelope viene assemblato a partire dalla lamina interna della

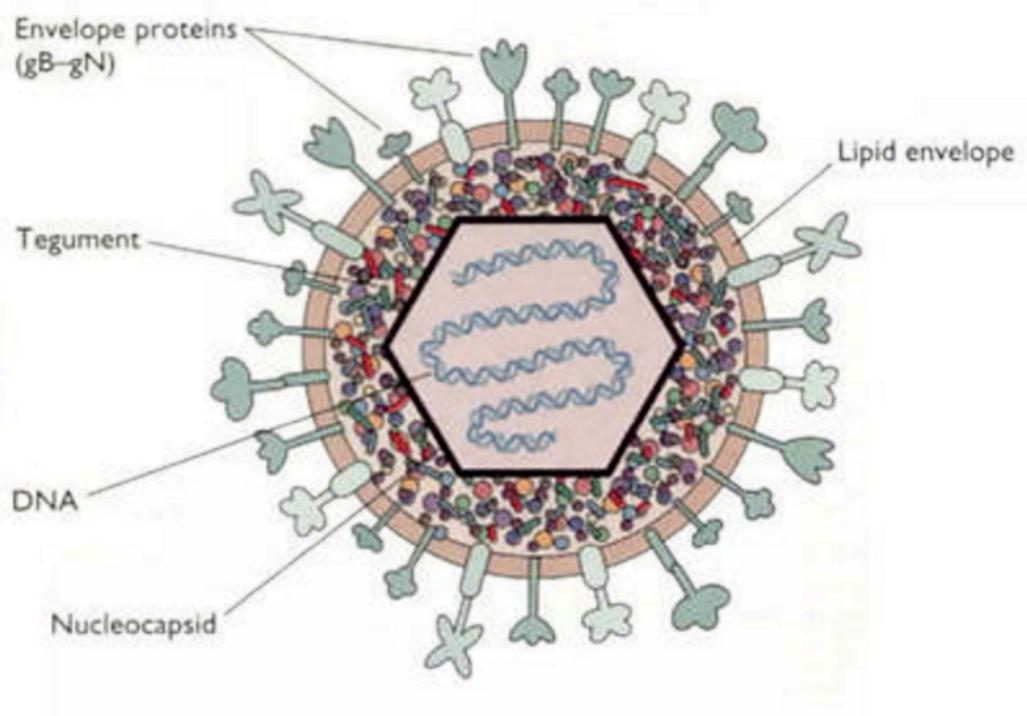
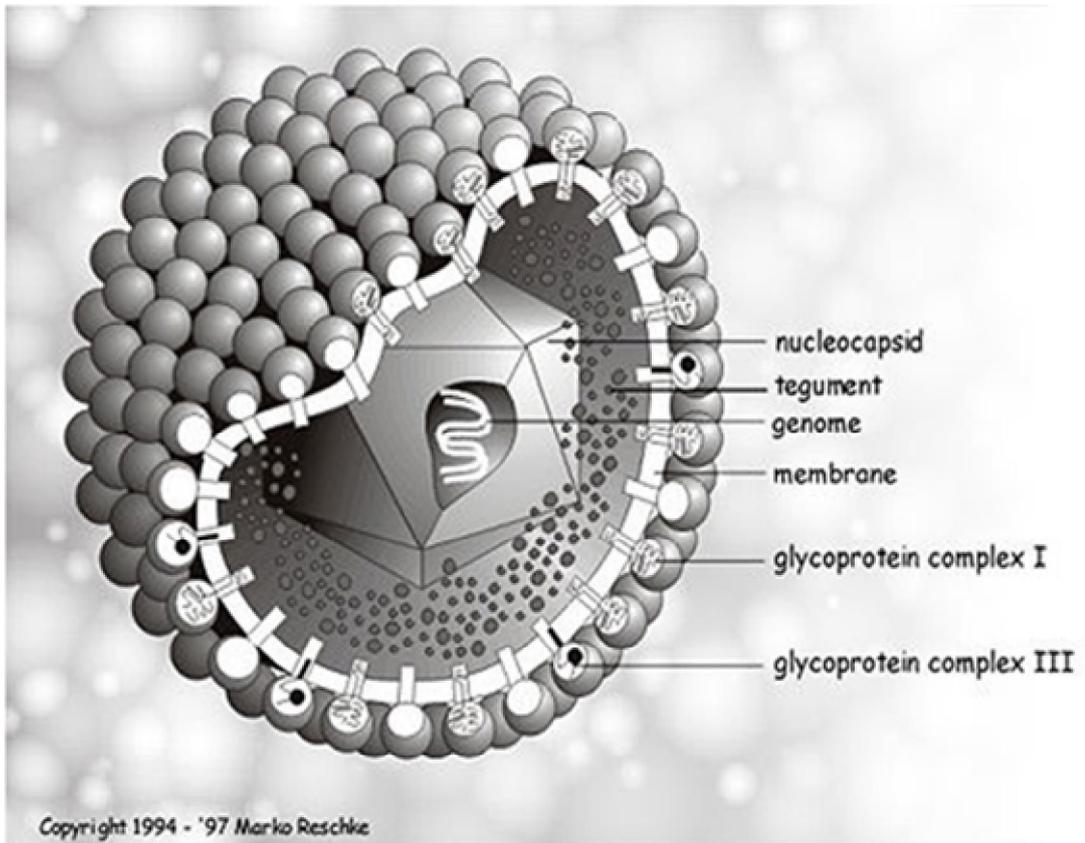
membrana nucleare; quindi le particelle vengono poi trasportate all'esterno mediante canalicoli che si formano nello spessore delle membrane cellulari.

I virus appartenenti alla famiglia Herpesviridae hanno la peculiare caratteristica di permanere all'interno dell'organismo ospite per molti anni se non per l'intera vita. Il termine Herpesvirus difatti, dal greco erpin, significa "nascondersi" e si riferisce alla capacità del virus di provocare infezioni latenti dopo l'esaurimento della fase clinica conseguente all'infezione primaria; il virus permane in alcune cellule e si riattiva occasionalmente, talora con manifestazioni cliniche conclamate e gravi. La realizzazione dello stato di latenza permette la sopravvivenza in natura degli Herpesvirus in quanto, anche in presenza di una efficiente risposta immunitaria, il genoma virale permane sotto forma di episomi o plasmidi extracromosomici nelle cellule ospiti e, attraverso periodiche riattivazioni conseguenti a condizioni sfavorevoli (stress fisico o emotivo, immunodepressioni, malattie concomitanti), viene immesso nell'ambiente esterno e a contatto con individui suscettibili all'infezione. All'interno della famiglia Herpesviridae è riconosciuta l'esistenza di tre sottofamiglie distinte in base alle proprietà biologiche, strutturali e genomiche (Roizman, 1982). I principali generi appartenenti alle tre sottofamiglie virali sono riportati in tabella.

Sottofamiglia Alphaherpesvirus

Virus	Lesioni/Malattia
Herpesvirus felino tipo 1	Rinotracheite infettiva virale
Herpesvirus canino tipo 2	Malattia emorragica dei cuccioli di età < 4 settimane; aborto ed ipofertilità negli adulti
Herpesvirus suino tipo 1	Pseudorabbia (Malattia di Aujeszky)
Herpesvirus bovino tipo 1	Rinotracheite infettiva; vulvovaginite/balanopostite pustolosa; aborto
Herpesvirus bovino tipo 2	Mammilite erpetica; pseudodermatosi nodulare
Herpesvirus bovino tipo 5	Encefalite
Herpesvirus caprino tipo 1	Congiuntivite; sindrome respiratoria
Herpesvirus equino tipo 1	Aborto 4° mese
Herpesvirus equino tipo 2	Rinite e congiuntivite
Herpesvirus equino tipo 4	rinopneumonite
Herpesvirus aviare tipo 1	laringotracheite
Herpesvirus delle anatre tipo 1	Peste dell'anatra
Cercopithecine herpesvirus tipo1	Infezione asintomatica delle scimmie; encefalite nell'uomo
Herpesvirus umano tipo 1	Herpes simplex
Herpesvirus umano tipo 2	Herpes simplex
Herpesvirus umano tipo 3	Varicella zooster
Channel catfish virus (CCV)	Malattia emorragica acuta negli avannotti di pesce gatto

<i>Sottofamiglia Betaherpesvirus</i>	
Cat Citomegalovirus	Sconosciuto
Herpesvirus suino tipo 2	Rinite atrofica; sindrome SMEDIA
Herpesvirus equino tipo 5	Sconosciuta
Herpesvirus equino tipo 2	Infezione da Citomegalovirus nell'equino
Herpesvirus bovino tipo 3	Infezione da Citomegalovirus nel bovino
<i>Sottofamiglia Gammaherpesvirus</i>	
Alcelaphine herpesvirus tipo 1	Febbre catarrale maligna del bovino
Herpesvirus bovino tipo 4	Sconosciuta
Virus dell'adenomatosi polmonare	Adenomatosi polmonare della pecora
Herpesvirus aviare tipo 2	Malattia di Marek
Herpesvirus del tacchino tipo 1	Apatogeno
Atelines herpesvirus tipo 2	Tumori delle scimmie?
Saimirine herpesvirus tipo 1	Tumori delle scimmie?
Cercopithecine herpesvirus tipo 2	Tumori delle scimmie?
Pongine herpesvirus tipo 1	Tumori delle scimmie?
Virus di Epstein-Barr	Mononucleosi infettiva; linfoma di Burkitt
Herpesvirus umano tipo 6	Esantema subitum (VI malattia)
Herpesvirus umano tipo 7	Sindromi febbrili acute
Herpesvirus umano tipo 8	Sarcoma di Kaposi



Rappresentazione schematica del virione erpetico.

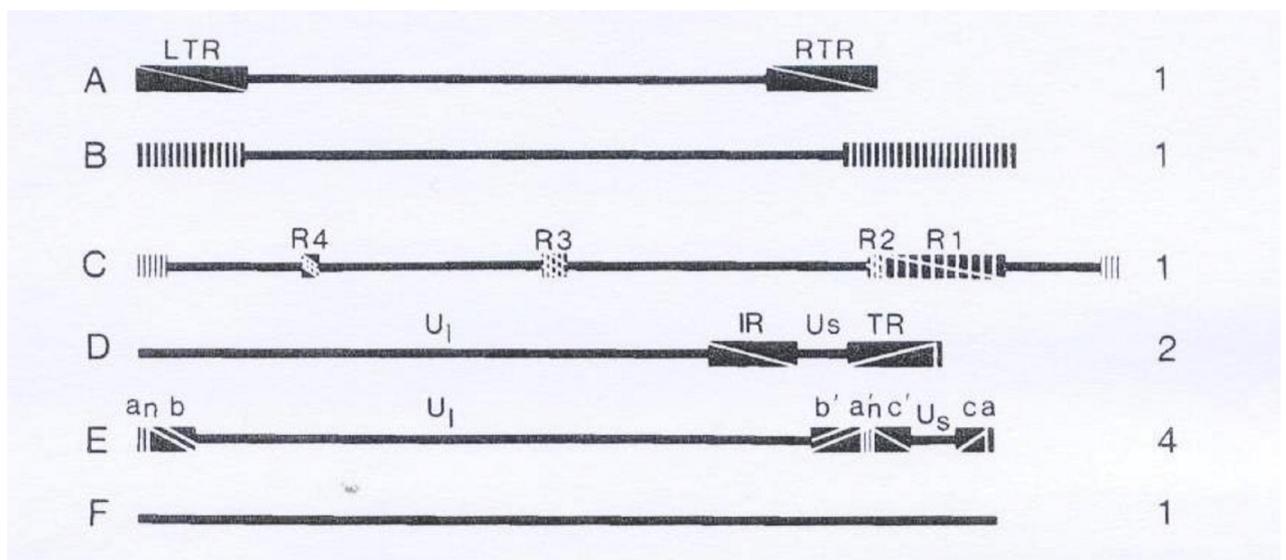
Alphaherpesvirus: spettro d'ospite relativamente ampio, rapido ciclo replicativo e rapida disseminazione in colture cellulari, efficiente attività necrotizzante, infezione latente localizzata ai gangli sensoriali. Questa sottofamiglia comprende il genere Simplexvirus e Varicellovirus; a quest'ultimo appartiene il CpHV-1.

Betaherpesvirus: spettro d'ospite relativamente ristretto, lento ciclo replicativo e lenta trasmissione per contiguità fra cellule coltivate in vitro nelle quali causa aumento di volume (citomegalia) e frequente acquisizione dello stato di portatore; la latenza è tipica delle cellule linforeticolari, epiteliali ed endoteliali. Appartengono a questa sottofamiglia i generi Cytomegalovirus, Muromegalovirus e Roseolovirus.

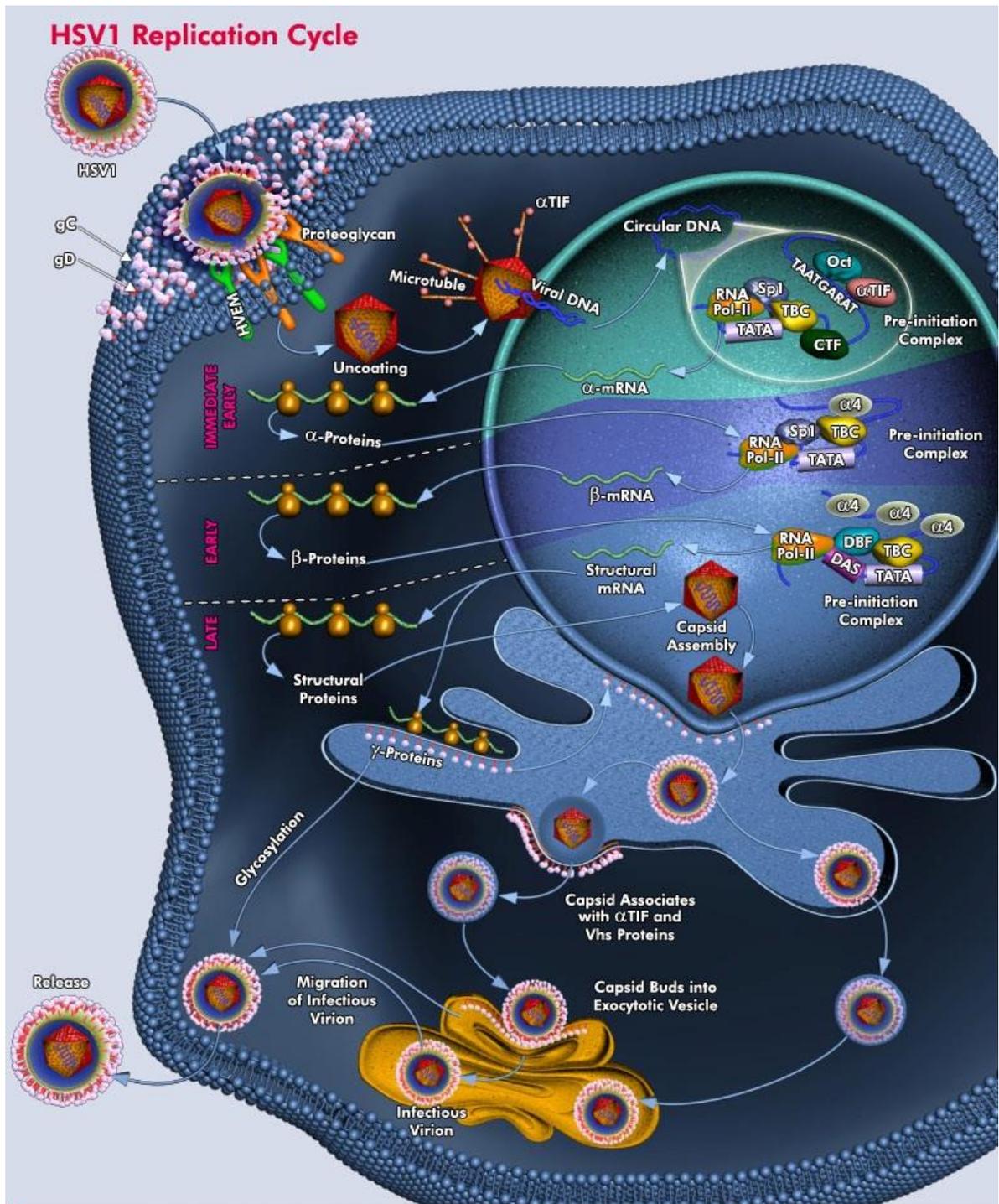
Gammaherpesvirus: salvo poche eccezioni, lo spettro d'ospite è limitato alla famiglia o ordine di appartenenza dell'ospite naturale; tutti replicano in cellule linfoblastoidi ed alcuni di essi causano lisi in colture cellulari dei tipi epitelioide e linfoblastoide; in generale si tratta di virus specifici per i linfociti T o B, la cui latenza viene osservata negli organi o tessuti linfoidi.

Gli Herpesvirus sono tra i più grandi e complessi virus animali finora conosciuti; la diffusione dell'infezione si verifica prevalentemente per via diretta, attraverso i secreti, gli escreti e le cellule di desquamazione della cute e delle mucose; è possibile la trasmissione anche per via diaplacentare, al momento del parto, attraverso l'assunzione di latte o per emotrasfusione. Gli Herpesvirus rilevati nel campo della patologia infettiva risultano provvisti di notevole plasticità biologica potendo presentare localizzazioni differenti e quindi sindromi con diverse caratteristiche anatomocliniche. In linea di massima lo spettro d'ospite è limitato anche se tuttavia in natura è nota la possibilità di trasmissione ad individui diversi dall'ospite naturale; sul piano sperimentale l'ampiezza dello spettro d'ospite è

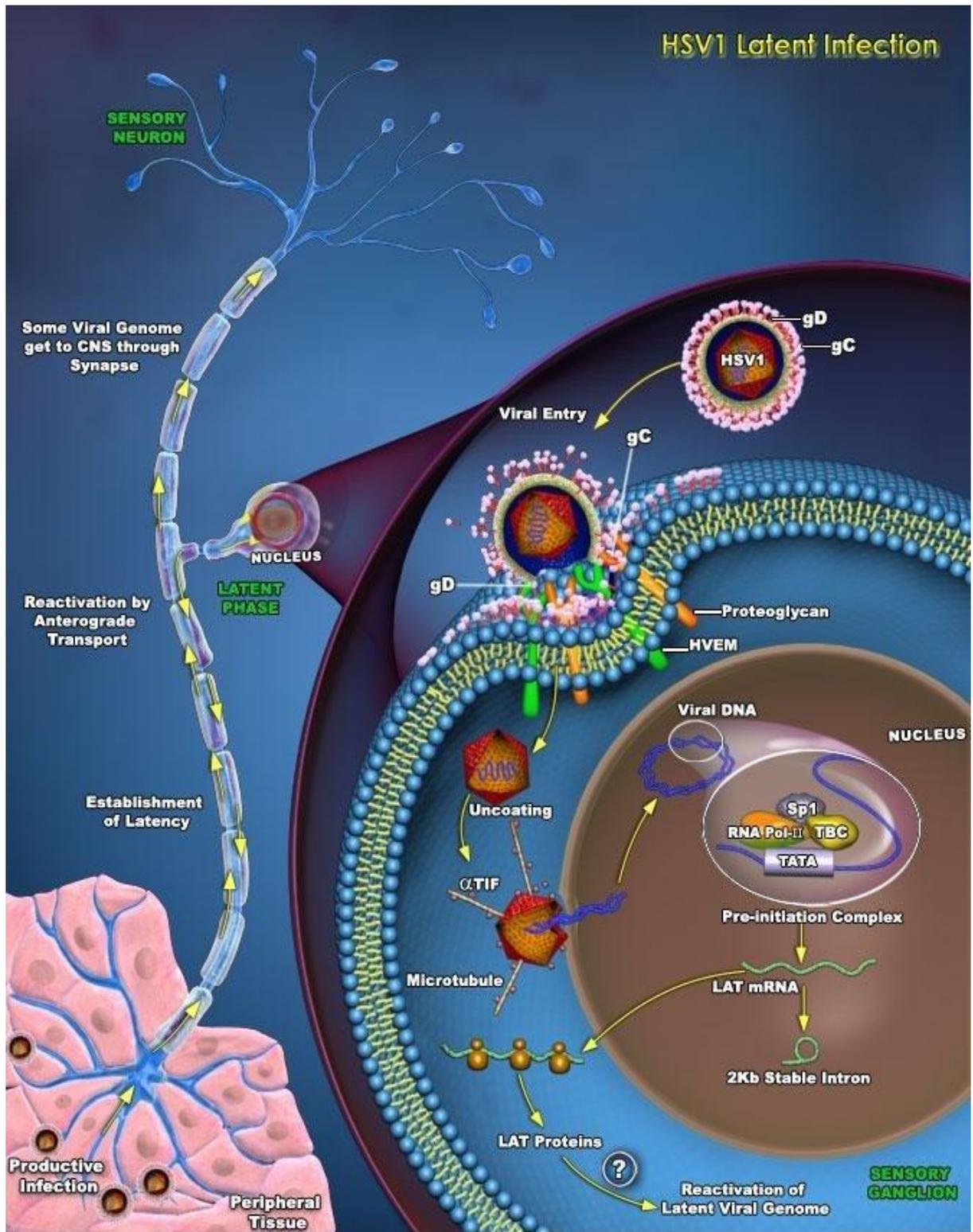
massima per gli Alphaherpesvirus e decresce nell'ordine per i Betaherpesvirus e Gammaherpesvirus. Salvo il caso di individui immunodepressi, le infezioni da Herpesvirus esitano nella guarigione clinica dell'individuo a cui segue inevitabilmente la latenza; quest'ultima è un evento caratteristico delle infezioni erpetiche, particolarmente studiata nei membri della famiglia Alpha. In particolare, la localizzazione primaria del virus nei tessuti di rivestimento è seguita da replicazione e reazione immunitaria, quest'ultima responsabile della regressione dei sintomi e guarigione clinica; tuttavia, una quota virale sfugge alla reazione immunitaria e, attraverso gli assoni dei neuroni sensitivi, raggiunge i gangli cranici e spinali; nelle cellule di questi ultimi il virus si localizza nel nucleo dove permane in forma inerte sotto forma di plasmidi o episomi. La riattivazione, che consegue a stress fisici o emotivi e immunodepressione, talora è associata a sintomatologia clinicamente manifesta ma talvolta alla riattivazione non segue l'insorgenza dei sintomi; in entrambi i casi si avrà però escrezione virale e diffusione delle relative infezioni.



*Diagramma schematico delle classi dei genomi degli Herpesvirus
(Fields B.N. et al., 1996)*



Ciclo replicativo dell'Herpesvirus.



Rappresentazione della fase di latenza dell'Herpesvirus.

1.2 CAPRINE HERPESVIRUS 1 (CPHV-1)

Appartiene alla sottofamiglia degli Alphaherpesvirus ed in passato era noto come BHV-6 (Ludwig,1983). Fu isolato per la prima volta, nel 1974,in California da capretti di 7 giorni affetti da una grave forma di enterite (Saito et al.,1974), mentre qualche anno dopo, nel 1979, è stato riscontrato in un allevamento svizzero (Mettler et al.,1979). Il virus è stato identificato non solo in diverse nazioni europee tra cui Italia (Roperto et al.,2000), Grecia (Koptopoulos et al.,1988), Spagna (Keuser et al.,2004), Germania (Muluneh et al.,1990) e Svizzera (Plebani et al.,1983),ma anche in California (Uzal et al.,2004),in Australia (Grewal et al.,1986;Piper et al.,2008), in Canada (Chennier et al.,2004), in Nuova Zelanda (Horner et al.,1982). La prevalenza della malattia è variabile: in alcune nazioni come la Grecia o nel sud Italia, dove le capre rappresentano una fonte economica importante, va dal 30% al 50% (Koptopoulos et al.,1988 Tempesta et al.,1994; Guercio et al.,1998). La malattia naturale è nota nelle capre e la patogenesi dell'infezione è molto simile a quella da BoHV-1 nei bovini; in entrambi i casi l'infezione è localizzata all'apparato respiratorio e genitale, a cui segue la viremia associata alle cellule mononucleate che determina infezione sistemica e aborto. La fonte principale di infezione è rappresentata da scolo nasale, oculare e genitale; quest'ultima via rappresenta il sito di ingresso del virus ed è responsabile della persistenza dell'infezione nell'allevamento (Tempesta et al.,2000). L'infezione può manifestarsi con sintomatologia differente a seconda dell'età dei soggetti; nei capretti induce infezione sistemica, rapido esordio e progressivo dimagrimento fino alla morte (Saito et al.,1974; Mettler et al.,1979;Lugt e Rendles,1993; Buonavoglia et al.,1996).

Negli adulti l'infezione può essere inapparente oppure manifestarsi con sintomi clinici a carico dell'apparato respiratorio quali dispnea, rinite, congiuntivite e/o a carico dell'apparato genitale quali vulvovaginite/balanopostite ulcerosa e aborto. Quest'ultimo, riproducibile anche per via sperimentale attraverso l'inoculazione intranasale ed endovenosa del virus (Tempesta et al.,2004; Uzal et al.,2004), avviene nella seconda metà della gravidanza. Il virus viene escreto per via nasale, oculare e genitale; attraverso la via nasale il virus inizialmente replica in situ, provocando lesioni erosive, ulcerative e necrotiche, poi diffonde per via sistemica raggiungendo l'apparato genitale da cui viene eliminato (Tempesta et al.,1999); attraverso la via genitale replica solo in situ, provocando eritema, edema e lesioni vescicolari/necrotiche (Horner et al.,1982; Tempesta et al.,2000). Il quadro anatomopatologico è rappresentato da lesioni ulcerative, erosive e necrotiche a carico della mucosa gastrointestinale, nonché edema polmonare, lesioni emorragiche a carico della mucosa vescicale, lesioni necrotiche a livello epatico. All'esame istopatologico si evidenzia perdita dello strato epiteliale della mucosa intestinale, mentre la lamina propria presenta infiltrazione di cellule mononucleate, in particolare macrofagi contenenti inclusioni intracellulari eosinofile; è presente anche necrosi dei tessuti linfoidei (Roperto et al.,2000). Come gli altri Herpesvirus, il CpHV-1 è in grado di indurre infezioni latenti suscettibili di riattivazione (Engels et al.,1983); dopo aver replicato nei siti di infezione, diffonde sia negli spazi extracellulari che da cellula a cellula, raggiungendo e penetrando negli assoni delle cellule nervose a livello dei gangli regionali, da cui è stato isolato mediante PCR (Tempesta et al.,1998). La riattivazione dell'infezione si osserva durante la stagione di monta, mentre in condizioni sperimentali risulta difficoltosa

(Buonavoglia et al.,1996; Tempesta et al.,2002); l'infezione si manifesta analogamente a quella primaria: negli animali infettati per via nasale il virus viene eliminato per entrambe le vie (nasale e genitale) mentre in quelli infettati per via genitale il virus è escreto solo per questa via (Tempesta et al.,2000). La diagnosi di sospetto può essere fatta sulla base delle manifestazioni cliniche che, seppur non patognomoniche, sono abbastanza caratteristiche soprattutto per il diverso comportamento del virus nell'animale adulto rispetto a quello giovane. La diagnosi di certezza si ottiene per via diretta e indiretta. Nel primo caso è possibile isolare il virus a partire dall'essudato oculonasale, vaginale e prepuziale. L'effetto citopatico del virus su cellule permissive è caratterizzato da arrotondamento e aumentata rifrangenza delle cellule, formazioni di sincizi, vacuoli e ponti intercellulari (Berrios et al.,1975; Engels et al.,1983). Le tecniche sierologiche utilizzabili sono la sieroneutralizzazione ed il test ELISA (Plebani et al.,1983), nonostante la possibilità di reazioni crociate con gli altri Alphaherpesvirus correlati (Nixon et al.,1988; Lyaku et al.,1992; Lyaku et al.,1996). Per quanto riguarda la biologia molecolare, è possibile ricorrere alla PCR per ottenere l'amplificazioni in campioni positivi di un frammento di 414 bp (Tempesta et al.,1998) e alla PCR Real Time con lo scopo di quantificare il DNA virale (Elia et al.,2008); la REA (Restriction Endonuclease Analysis) consente l'identificazione dei virus isolati e la discriminazione dei microrganismi correlati, ma essendo costosa e laboriosa risulta poco conveniente per diagnosi di routine. Attualmente la profilassi è esclusivamente sanitaria; non esistono presidi immunizzanti nonostante diversi studi abbiano messo in evidenza la possibilità di proteggere le capre con vaccini sia inattivati (Tempesta et al.,2001) che vivi attenuati eterologhi (Thiry et al.,2006).

1.3 APOPTOSI O PROGRAMMATED CELL DEATH (PCD)

L'apoptosi, dal greco apoptosis che significa letteralmente caduta delle foglie dagli alberi, è un meccanismo di autodistruzione cellulare geneticamente controllato e altamente conservato nel corso dell'evoluzione (Metzsein et al.,1998). E' un evento fisiologico, descritto in tutti gli eucarioti multicellulari (Ellis et al.,1991), che si verifica durante le prime fasi di sviluppo ed ha un ruolo chiave nella morfogenesi (Vaux et al.,1994), nella differenziazione sessuale e nei processi epigenetici di auto-organizzazione del sistema immunitario e nervoso (Ameisen,2002); inoltre, bilanciando il rapporto vita/morte delle cellule danneggiate nell'adulto, permette l'omeostasi dei tessuti (Orrenius et al.,2003). Al contrario della necrosi, che è una forma di morte cellulare conseguente ad un acuto stress o trauma cellulare, l'apoptosi è portata avanti in modo ordinato e regolato, richiede consumo di energia (ATP) e generalmente porta a un vantaggio durante il ciclo vitale dell'organismo (è infatti chiamata da alcuni morte altruista o morte pulita). Pertanto, mentre la necrosi è un processo di morte che la cellula subisce passivamente, con l'innescò di una risposta infiammatoria e rilascio di citochine da parte dei macrofagi, l'apoptosi è un processo regolato a cui la cellula partecipa attivamente, con una serie di eventi morfologicamente e biochimicamente ripetibili e definiti. Una cellula in apoptosi manifesta delle alterazioni morfologiche facilmente riconoscibili al microscopio quali arrotondamento della cellula e perdita di contatti con le cellule circostanti e la scomparsa di strutture proprie di membrana come i microvilli e le regioni specifiche di contatto con le altre cellule. Al contempo, la perdita di acqua e ioni determina una riduzione del volume della cellula con conseguente condensazione

del citoplasma (Kerr,2002). A livello nucleare si verifica la perdita del nucleolo e la condensazione della cromatina in ammassi densi e circoscritti che si addossano alla membrana nucleare (nucleo picnotico); successivamente la matrice nucleare interna viene solubilizzata esponendo il DNA a processi degradativi che provocano la frammentazione dell'acido nucleico in frammenti ad alto peso molecolare. Al termine della condensazione della cromatina il nucleo risulterà in frammenti che racchiudono anche organuli cellulari, circondati da membrana nucleare e inglobati in vescicole (Blebbs) che si formano grazie ad un processo che prende appunto il nome di blebbing. La membrana che circonda tali protuberanze, che si formano sulla superficie della cellula, si salda dando origine ai "corpi apoptotici", rapidamente fagocitati e digeriti dai macrofagi.

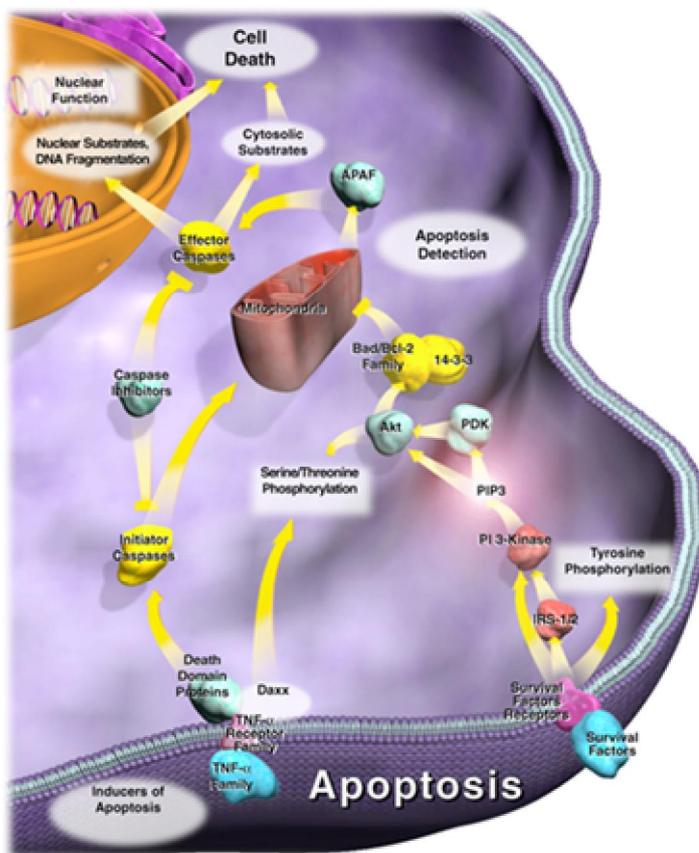


Fig.5. Apoptosi cellulare

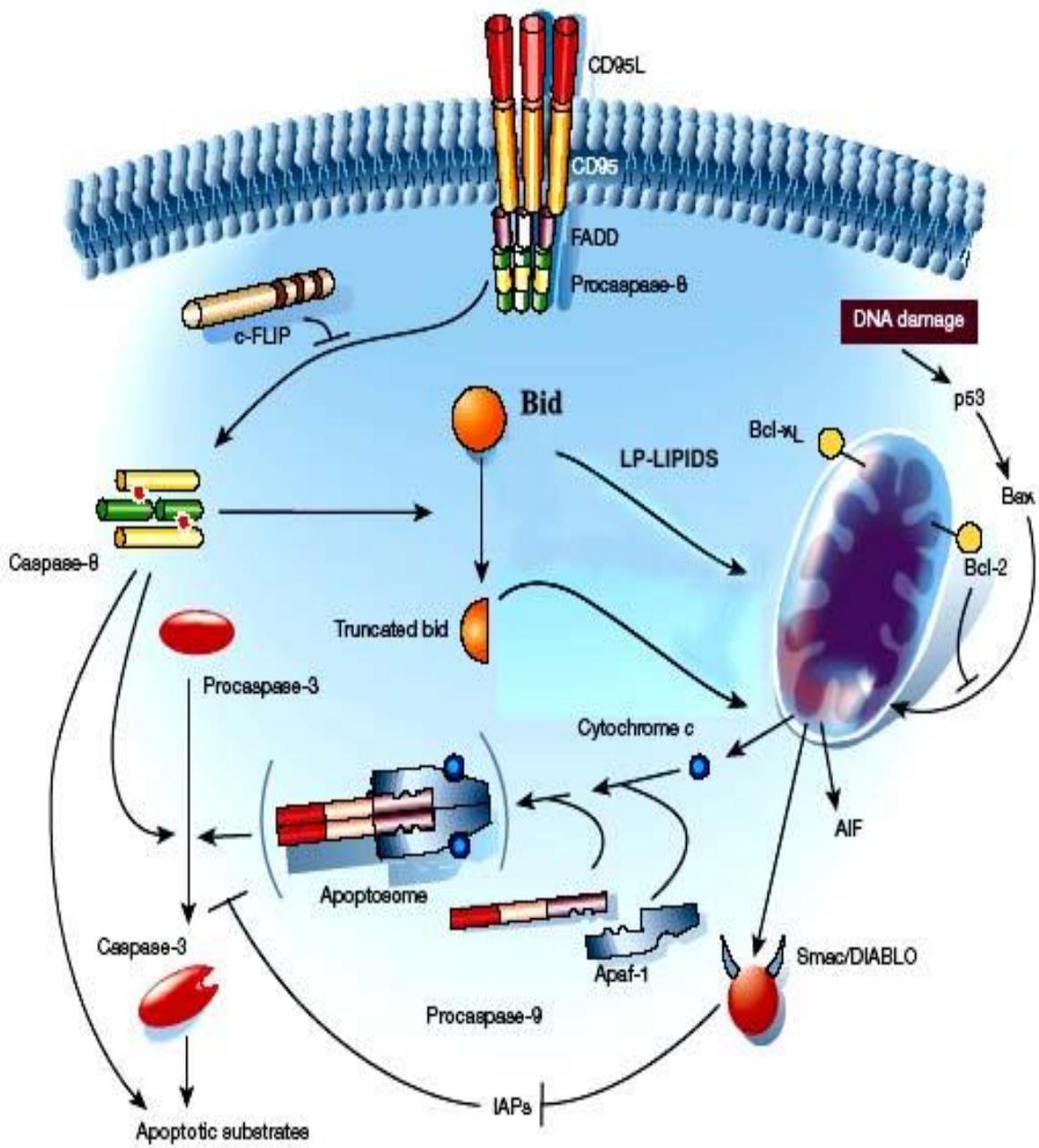
Il processo apoptotico può essere schematizzato in tre fasi:

❖ *Induzione*: comprende l'invio di segnali che inducono la cellula all'apoptosi e l'attivazione delle vie primarie da essi innescate e che portano ad essa. Sono stati identificate due principali cascate di segnali, denominate via intrinseca ed estrinseca (Krammer et al.,2000); entrambe coinvolgono la famiglia di proteine delle caspasi, quest'ultime distinte in caspasi iniziatrici (caspasi 2 ,8, 9, 10) ed effettrici (caspasi 3, 6, 7). Le caspasi iniziatrici sono, per definizione, le prime ad essere attivate nel processo apoptotico; esse a loro volta attivano le caspasi effettrici che innescano una serie di eventi proteolitici che portano alla morte cellulare (Fuentes-Prior et al.,2004). La via estrinseca è attivata quando i recettori che codificano per la morte cellulare (DR) presenti sulla superficie della cellula sono attivati in seguito al legame con ligandi specifici (DL). I DR comprende principalmente la famiglia di recettori del Tumor Necrosis Factor (TNF) che include i recettori FAS, TNFR1 e TRAIL (attivati dai rispettivi ligandi DL come il ligando FAS, TNF e TRAIL) (Ashkenazi et al.,1998). Il legame DR-DL induce la formazione di una serie di complessi segnali tra cui l'attivazione delle caspasi iniziatrici della via estrinseca, quali procaspase-8 e procaspase-10 (Krammer et al.,2007). In seguito al clivaggio della procaspase-8 si rilascia nel citosol la caspase -8 che agisce sulle caspasi effettrici. La via intrinseca è innescata da una varietà di fattori che includono stress genotossici, radiazioni UV, influenze ormonali (es. glucocorticoidi) e la privazione di citochine (Krammer et al., 2007). L'esposizioni a questi fattori determina modificazioni mitocondriali come l'alterazione della permeabilità di membrana che esita nell'apertura dei pori della membrana mitocondriale e liberazione nel citoplasma di fattori normalmente contenuti nello spazio intermembrana come il

citocromo C (cytC) o L'AIF (Apoptosis Inducing Factor) (Saelens et al,2004). Il rilascio del citocromo dal mitocondrio è regolato da proteine della famiglia Bcl2; la famiglia è suddivisa in due classi di molecole che hanno effetti opposti: proteine antiapoptotiche come Bcl2 e Bcl-xl che proteggono le cellule dall'apoptosi, e proteine proapoptotiche come Bax e Bak che attivano l'apoptosi. L'aptosoma formato tra il citocromo c rilasciato, il fattore 1 attivato dell'apoptosi e caspase-8 recluta e attiva la caspase iniziatrix della via intrinseca, procaspase-9. Il clivaggio della procaspase-9 libera la caspase-9 che a sua volta attiva le caspasi effettrici (Brenner et al.,2009).

❖ *Esecuzione:* durante questa fase, entrambe le vie, estrinseca e intrinseca, convergono verso l'attivazione della caspase-3, caspase 6 e caspase-7 da parte della caspase-8 nella prima via, e da parte della caspase-9 nella seconda via. Le caspasi effettrici agiscono su substrati specifici eterogenei che si distinguono per attività, funzione e localizzazione subcellulare, responsabili dei cambiamenti morfologici e biochimici osservati nelle cellule apoptotiche.

❖ *Fagocitosi:* la membrana plasmatica dei corpi apoptotici in superficie espone molecole quali la fosfatidil-serina, normalmente localizzata nel citosol (Bratton et al,1997), o la calreticulina (Gardai et al,2005), che vengono riconosciute dai recettori specifici dei macrofagi e successivo innesco della fagocitosi.



Fattori attivati in corso di apoptosi

1.4 INFEZIONI VIRALI E APOPTOSI

L'apoptosi, oltre ad intervenire nel differenziamento e nell'omeostasi degli organismi cellulari, svolge una funzione importante nella risposta a differenti insulti quali neoplasie (Wyllie et al,1987; Wright et al,1994), malattie autoimmuni (Cohen et al,1992; Watanabe-Fukunaga et al,1992), malattie degenerative (Esposito et al,2007; Kalinichenko et al,2007), infezioni virali (Banda et al,1992).

Numerosi virus hanno la capacità di indurre e presiedere alla morte cellulare programmata attraverso la manipolazione di una varietà proteine che svolgono un ruolo chiave nel processo apoptotico. Un virus può beneficiare ed istigare sia la promozione che l'inibizione dell'apoptosi; numerosi studi hanno infatti messo in evidenza il duplice ruolo svolto dall'apoptosi virus-indotta durante le infezioni virali. Talvolta rappresenta un meccanismo difensivo, talvolta un espediente messo in atto dal virus per disseminare progenie virale, evadendo il sistema immunitario, proteggendo i virioni da enzimi ed anticorpi neutralizzanti e limitando la risposta infiammatoria (Koyama et al,1998; Thomson et al,2001; Hay & Kannourakis,2002). L'apoptosi virus-indotta, associata ad una significativa diminuzione della progenie virale, è stata descritta per la prima volta in cellule infette con un adenovirus mutante (Pidler et al,1984). Secondo studi condotti successivamente su virus infettanti insetti, l'apoptosi rappresenta un meccanismo di difesa cellulare messo in atto prematuramente al fine di limitare la replicazione virale all'interno della cellula ospite (Clem et al,1991; Koyama et al,1998); inoltre consente alle cellule infettate, ridotte a corpi apoptotici, di essere fagocitate dai macrofagi limitando in

questo modo la reazione infiammatoria e permettendo l'attivazione del sistema immunitario (Vaux et al,1994; Razvi et al,1995).

Tuttavia, se da un lato la cellula cerca di minimizzare i danni dell'infezione, il virus cerca di ottenere il massimo beneficio dall'apparato replicativo della cellula (Krakauer & Payne,1997). I virus sono infatti capaci di influenzare il processo apoptotico interagendo in alcuni casi con le strutture che innescano la traduzione del segnale fino alla morte cellulare programmata (es. recettore TNF), possedendo in altri casi geni o proteine che mimano l'azione delle molecole cellulari che regolano l'apoptosi. L'evento apoptotico non sempre rappresenta un meccanismo sfavorevole per il virus; quando infatti è già avvenuto l'assemblaggio dei virioni, l'apoptosi ne facilita la diffusione (Mi et al,2001). La capacità invece di inibire l'apoptosi è necessaria per prevenire la morte prematura della cellula ospite, che impedirebbe la replicazione virale e l'assemblaggio dei virioni e quindi risulterebbe sfavorevole per l'instaurarsi dell'infezione persistente (Shen & Shenk,1995). Diversi studi hanno messo in evidenza la sensibilità delle cellule nelle prime fasi dell'infezione (adsorbimento e ingresso del virus) studiando la natura pro-apoptotica di alcune proteine strutturali del virione. Per quanto riguarda gli Herpesvirus, è stato dimostrato che la modulazione dell'apoptosi attraverso proteine codificate dal virus rappresenta la chiave della patogenesi dell'infezione (Cassady et al.,1998; Henderson et al.,1993; Hu et al.,1997; Longo et al.,2009; Pagnini et al.,2005; Wang et al.,1997). L'apoptosi può essere impedita qualora la sintesi proteica venga inibita; la morte cellulare programmata viene "soppressa" per azione di alcuni geni virali antiapoptotici (Koyama et al,1998) che interferiscono con una protein chinasi (PKR) la quale normalmente funge sia da mediatore delle funzioni antivirali

dell'interferone, sia induce apoptosi anche mediante l'attivazione del dominio di morte associato a FAS (FADD) (Ubol et al,1994). Per quanto riguarda BoHV-1 è una componente del virione a fungere da ligando per i death receptors, e più precisamente recettori appartenenti alla superfamiglia Fas/TNF (Ashkenazi & Dixit,1998; Schwarz,1996). La morte cellulare programmata indotta da BoHV-1 si può considerare un evento tardivo poiché si verifica durante gli ultimi stadi dell'infezione virale (Devireddy & Jones,1999).

CpHV-1 è responsabile di infezioni sistemiche che da un punto di vista clinico si manifesta diversamente nei soggetti giovani ed adulti. L'apoptosi è alla base di meccanismi patogenetici di diverse infezioni ed in particolare delle infezioni da virus erpetici (Shen & Shenk,1995; Teodoro & Barton,1997). Questo lavoro ha lo scopo di mettere in evidenza la capacità di CpHV-1 di indurre apoptosi in cellule della linea Neuro 2A (Neuroblastoma di topo albino).

3. MATERIALI E METODI

3.1 CELLULE E VIRUS

È stata utilizzata la linea cellulare Neuro2A (Neuroblastoma di topo albino-CCL31 American Type Culture Collection, USA). Le cellule sono state coltivate in Dulbecco's modified minimal essential medium (DMEM), addizionato con il 5% di siero fetale bovino (FCS) pestivirus-free, penicillina 100 U/ml e streptomina 100mg/ml. Le linee cellulari erano esenti da micoplasma e dal virus della diarrea virale bovina.

È stato utilizzato il ceppo virale di riferimento per CpHV-1 Swiss strain E/CH (Mettler et al., 1979). Il virus è stato messo in coltura mediante infezione su monostrati di MDBK, successivamente estratto mediante tre cicli di congelamento/scongelo (Criolisi), centrifugazione, ed infine conservato a -80°. Il titolo infettante è stato calcolato impiegando il metodo della microtitolazione su piastra a 96 pozzetti per ottenere la più alta diluizione capace di determinare effetto citopatico nel 50% delle colture inoculate (Dose Infettante Tessuto Coltura 50 o TCID₅₀) (Reed & Muench, 1938).

3.2 INFEZIONI SPERIMENTALI

Per le infezioni sperimentali sono stati utilizzati monostrati di cellule Neuro 2A coltivate in piastre da 6 pozzetti in incubatore a 37°, in atmosfera di CO₂ al 5% per 24 ore, tempo necessario alla formazione del monostrato. I monostrati cellulari sono stati inoculati con CpHV-1 a MOI 1 (Multiplicity Of Infection), mentre i monostrati di controllo sono stati inoculati con cellule Neuro 2A criolizzate (mock infection). Dopo un periodo di adsorbimento di 2 ore, dalle colture cellulari è stato allontanato

il medium contenente il virus o il criolisato cellulare ed è stato sostituito con DMEM al 2% di FCS. Le colture cellulari, infettate e non, sono state poi incubate a 37° in atmosfera al 5% di CO₂ e a differenti tempi post-infezione (3, 6, 12, 24, 48 ore); successivamente è stata valutata l'apoptosi indotta da CpHV-1.

3.3 APOToX-GLO™ TRIPLEX ASSAY

ApoTox-Glo™ Triplex Assay è stato utilizzato al fine di valutare gli eventi vitalità, citotossicità ed attivazione della caspasi all'interno di un singolo pozzetto. Nella prima parte del test, viene misurata simultaneamente l'attività di due proteasi; la prima è un marker di vitalità cellulare e l'altra è un marker di citotossicità. Il Substrato Peptidico (glycylphenylalanyl-aminofluoro-cumarina; GF-AFC) penetra nelle cellule intatte dove viene scisso dall'attività di proteasi cellulari per generare un segnale fluorescente proporzionale per il numero di cellule viventi. Questa proteasi cellulare diventa inattiva in caso di perdita di integrità della membrana cellulare e di dispersione nel mezzo di coltura circostante. Un secondo Substrato Peptidico (bis-alanyl-lalanyl-fenilalanil-rodamina 110; bis-AAF-R110) viene quindi utilizzato per misurare l'attività della proteasi legata alle cellule morte, essa viene rilasciata dalle cellule che hanno perso l'integrità della membrana. Bis-AAF-R110 non ha permeabilità cellulare, pertanto nessun segnale viene generato da questo substrato in cellule vitali intatte. Le due proteasi producono prodotti diversi, AFC e R110, che hanno diversi livelli di eccitazione e spettri di emissione, permettendo quindi di essere rilevate simultaneamente. Nella seconda parte del test,

il reagente caspasi-Glo® 3/7, aggiunto in un formato "add-mix-measure", provoca la lisi delle cellule, seguite dal clivaggio da parte delle caspasi del substrato e la generazione di un segnale luminescente "glow-type" prodotto dalla luciferasi.

Circa 500 cellule Neuro 2A per pozzetto sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti (Becton Dickinson Labware, USA) in triplo. Quattro diversi tipi di controlli, positivi, infetti, negativi e controllo di fondo sono stati utilizzati. I controlli positivi avevano cellule con mezzo di coltura trattato con staurosporina 10 μM a 3, 6, 12, 24 e 48 ore per indurre apoptosi. Le colture cellulari infettate contenevano cellule trattate con CapHV-1 a MOI 1 per 3, 6, 12, 24 e 48 ore. I controlli negativi erano costituito da cellule Neuro 2A non infettate ed il controllo di fondo (cell-free) conteneva solo terreno di coltura senza cellule (Pelzl et al., 2009).

Dopo 3, 6, 12, 24 e 48 ore post-infezione è stato aggiunto a ciascun pozzetto 20 μl di reagente Viabilità/Citotossicità contenente sia GF-AFC che bis-AAF-R110 e brevemente mixato da un agitatore orbitale a 300-500 rpm per 30 secondi e poi incubati a 37 ° C per 30-180 minuti. La fluorescenza è stata misurata a 400Ex / 505 Em (vitalità) e 485Ex/520Em (citotossicità) utilizzando un lettore di piastre multipozzetto Glomax Multi Detection System (Promega Corporation, USA). In seguito è stato aggiunto ad ogni pozzetto 100 μl di Caspase-Glo 3/7 e brevemente mixato tramite agitatore orbitale a 300-500 rpm per 30 secondi e poi incubate a temperatura ambiente per 30-180 minuti. La luminescenza è stata misurata con un lettore di piastre multipozzetto Glomax Multi Detection System (Promega Corporation, USA) con protocollo luminescenza che è proporzionale alla quantità di attività delle caspasi presente.

3.4 VERIFICA DEL PROFILO DI ESPRESSIONE GENICA APOPTOTICA IN CELLULE NEURO 2A INFETTATE DA CPHV-1- TRAMITE REAL-TIME PCR QUANTITATIVA

L' RT² Profiler PCR Mouse Signal Transduction Pathway Array kit (numero catalogo PAMM-012, SABiosciences, Frederick, MD) comprendente 84 geni implicati nelle vie di trasduzione del segnale e cinque geni housekeeping e tre controlli, è stato utilizzato per analizzare gli effetti dell'infezione da CpHV-1 in funzione dell'espressione genica in cellule della linea Neuro2A. L'RNA completo è stato isolato dalle cellule infette (MOI 1) e mock infected utilizzando un kit di estrazione RNAsi Mini Kit (Qiagen), a 3, 6, 12, 24 e 48 ore post infezione. Il cDNA è stato ottenuto da 1 µg totale di RNA utilizzando il RT² PCR Array First Strand Kit secondo i protocolli della casa produttrice. Il template è stato combinato con RT² SYBRGreen fluoresceinato PCR master mix. Eguali quantità di questa mix (25µl) sono state aggiunte ad ogni pozzetto della piastra dell' RT²PCR contenente l'insieme di primer specifici predisposti per i geni, e la reazione è stata eseguita utilizzando un rivelatore di sequenza (StepOnePlus; Applied Biosystems) in accordo con i protocolli della casa produttrice.

L'analisi dei dati è basata sul metodo del Ct con l'aiuto di un foglio elettronico Excel (Microsoft Excel; Microsoft, Redmond, WA) contenente algoritmi forniti dalla casa produttrice (RT²ProfilerPCR Array data Analysis software (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>)). I livelli di espressione dell'mRNA di ciascun gene sono stati normalizzati utilizzando l'espressione dei geni

housekeeping GAPDH. Un valore positivo indica che il gene è stato iper-espresso mentre un valore negativo indica che il gene è stato ipo-espresso.

3.5 ESTRAZIONE DI PROTEINE E VALUTAZIONE DELL'APOPTOSI MEDIANTE WESTERN BLOT

Elettroforesi su gel di poliacrilamide sodio dodecil solfato è stata eseguita su cellule Neuro 2A infettate con CpHV-1 e mock-infected. Sono state studiate la presenza delle caspasi 3, 8, 9 e l'espressione di proteine che regolano il processo apoptotico quali P53 e Bcl2 mediante la tecnica del Western Blot.

Le cellule Neuro 2A in fiasche da 75 cm², in confluenza, sono state infettate con CpHV-1 a MOI 1. A 3, 6, 12, 24 e 48 ore post infezione le cellule attaccate sono state lavate due volte con PBS e raschiate. Le cellule sono state poi mescolate con cellule precedentemente raccolte, in seguito ad una centrifugazione, dal surnatante della stessa fiasca e ri-sospese in PBS. Il pellet, ottenuto dalla centrifugazione, è stato conservato a -20°C. Per misurare l'attivazione delle caspasi sono stati utilizzati almeno 1×10^6 cellule. Le cellule sono state omogeneizzate direttamente nel buffer di lisi (50 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; EDTA 1 mM; Acido 0,25% desossicolico, 1% Triton X-100) con 20 mM sodio pirofosfato, 0,1 mg/mL aprotinina, 2 mM phenylmethylsulphony fluoruro (PMSF), 10 mM sodio orthovanadate (Na₂VO₃) e 50 mM fluoruro di sodio (NaF). Le concentrazioni proteiche sono state determinate mediante l'uso di un kit per testare le proteine (Bio-Rad Laboratories). I campioni sono stati sottoposti a bollitura e caricati in gel di acrilammide; successivamente

sono stati sottoposti a elettroforesi. Le proteine sono state poi trasferite su membrane di nitrocellulosa; queste ultime sono state bloccate con siero albumina bovina (BSA) al 5% in TBS (Tris buffered Saline: 12.5 mM Tris HCl pH 7.4; 125 mM NaCl) a temperatura ambiente, lavate con Tween TBS-0.1% incubate overnight con l'anticorpo primario.

Sono stati eseguiti esperimenti con anticorpo rabbit anti-cleaved caspasi 3 (Cell Signaling Technologies catalog no. 9662; 1:1000 dilution); Ac rabbit anti-caspasi 8 p18 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; catalog no. sc-7890; 1:200 dilution); Ac rabbit anti-caspasi 9 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; catalog no. sc-8355; 1:200 dilution); Ac mouse anti-P53 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; catalog no. sc-99; 1:200 dilution); Ac rabbit anti-Bcl2 (Abcam plc, Cambridge, UK; catalog no. ab7973; 1:100 dilution). Infine le membrane, dopo essere state sottoposte a diversi cicli di lavaggio, sono state incubate con anticorpo secondario Anti-rabbit IgG (GE Healthcare, UK, catalog no. NA934) o anti-mouse IgG (GE Healthcare, UK, catalog no. NA931) per almeno un'ora, alla diluizione di 1:1000. I Blots sono stati strippati ed incubati nuovamente con anticorpo secondario mouse anti-actina (Calbiochem, San Diego, CA; catalog no. CP10) alla diluizione di 1:1500, per confermare la presenza della medesima quantità di proteine in ciascun pozzetto. I livelli di espressione delle proteine sono stati quantificati valutando alla densitometria le bande proteiche in rapporto alle bande di riferimento della α -actina, utilizzando uno scanner Gel Doc (Bio-Rad).

3.6 ANALISI STATISTICA

Tutti i risultati sono presentati come media \pm deviazione standard (SD) di tre esperimenti indipendenti. Analisi ANOVA con Turkey's post-test è stato effettuata utilizzando GraphPad InStat Version 3.00 for Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, CA). Un P-value <0.05 è stato considerato statisticamente significativo.

4. RISULTATI

4.1 APO_{TOX}-GLOTM TRIPLEX ASSAY

In una prima serie di esperimenti abbiamo analizzato l'effetto dell'infezione di CpHV-1 sulla citotossicità, vitalità e apoptosi in un singolo pozzetto, utilizzando il ApoTox-GloTM Triplex Assay.

I grafici in Figura 1 illustrano i risultati di un test APO-TOX-Glo Triplex mostrano la citotossicità, la vitalità e l'apoptosi delle cellule Neuro 2A infettate con CpHV-1 a MOI 1.

Dopo 24 e 48 ore dopo l'infezione, la citotossicità in cellule infettate con CpHV-1, rispetto alle cellule mock-infected, risultava aumentata significativamente in funzione del tempo (Fig.1B)

Il grafico in Figura 1A illustra i risultati di un test Triplex APO-TOX relativamente alla vitalità delle cellule Neuro 2A infettate con CpHV-1 a MOI 1. Dopo 24 e 48 ore post-infezione, la vitalità delle cellule infettate con CpHV-1 è diminuita in modo significativo rispetto alle cellule di controllo non trattate.

La Figura 1C mostra i risultati di un test APO-TOX relativamente all'attivazione della caspasi 3 in cellule Neuro 2A infettate con CpHV-1 a MOI 1 a 3, 6, 12, 24 e 48 ore post-infezione. Le cellule infettate con CpHV-1 hanno mostrato un'elevata attivazione della caspasi 3 a 24 e 48 ore post-infezione rispetto a cellule di controllo mock-infected.

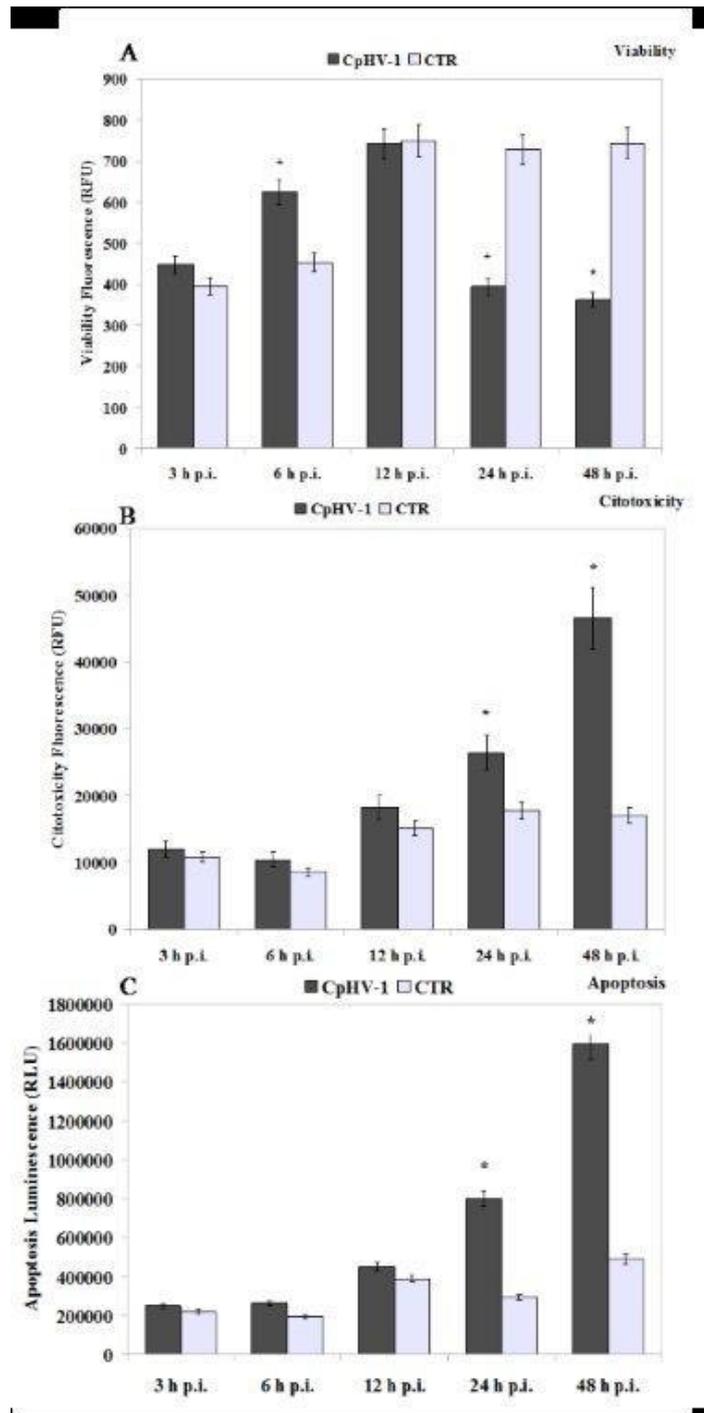


Figura 1: CPHV-1 induce apoptosi nelle cellule Neuro 2A. Colture di cellule Neuro 2A erano mock-infected o infettate mediante inoculo costituito da cellule Neuro 2A infettate criolisate. Inoculo era stato precedentemente titolato, e la MOI era di circa 1. A diversi tempi post-infezione, la viabilità, citotossicità e apoptosi sono stati analizzati mediante test APOTOX GLO Triplex. I risultati sono espressi come unità relative di fluorescenza (RFU) e unità relative di luminescenza (RLU) e segnalati come la media \pm SD di tre esperimenti separati. Un valore di $P < 0.05$ è stato selezionato come significativo.

4.2 VERIFICA DELL' ESPRESSIONE GENICA DEL PROFILO APOPTOTICO MEDIANTE REAL-TIME PCR QUANTITATIVA IN CELLULE NEURO 2A INFETTATE CON CPHV-1.

Per rilevare i geni apoptotici coinvolti in corso di apoptosi CpHV-1-indotta, abbiamo valutato l'espressione di 84 geni connessi all'apoptosi mediante RT2 Profiler PCR microarray (tabelle da 1 a 5). Un ampio spettro di geni coinvolti nei meccanismi apoptotici risultavano up-regolati e down-regolati durante l'infezione da CpHV-1.

In particolare, a 3 ore dopo l'infezione, diversi geni proapoptotici quali Fas, Fadd, TNF e caspasi erano sotto-espressi (Tabella 1).

Table 1: Genes Over and Under-Expressed at 3 h post infection by CpHV-1					
Symbol	Description	Fold change	Symbol	Description	Fold change
Cradd	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	5,5644	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	4,0695
Abl1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	-3,8019	Cd40	CD40 antigen	-5,5257
Aifm1	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1	-7,3549	Cidea	CD40 ligand	-2,2402
Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1	-6,3038	Dad1	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A	-2,6346
Apaf1	Apoptotic peptidase activating factor 1	-9,9738	Dapk1	Death associated protein kinase 1	-7,7399
Api5	Apoptosis inhibitor 5	-4,2568	Dffb	DNA fragmentation factor, beta subunit	-3,18
Atf5	Activating transcription factor 5	-2,6639	Diablo	Diablo homolog (Drosophila)	-7,7399
Bag1	Bcl2-associated athanogene 1	-3,3355	Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	-3,6342
Bag3	Bcl2-associated athanogene 3	-4,1664	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	-2,9981
Bak1	BCL2-antagonist/killer 1	-8,8519	Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	-17,0168
Bax	Bcl2-associated X protein	-3,2272	Lhx4	LIM homeobox protein 4	-7,6796
Bel10	B-cell leukemia/lymphoma 10	-4,7136	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	-7,6803
Bel2	B-cell leukemia/lymphoma 2	-17,6559	Mcl1	Myeloid cell leukemia sequence 1	-7,205
Bel2a1a	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	-2,6827	Naip2	NLR family, apoptosis inhibitory protein 2	-8,527
Bel2l1	Bcl2-like 1	-3,1334	Nme5	Non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase)	-4,5562
Bel2l10	Bcl2-like 10	-5,7487	Nod1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	-4,8126
Birc3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	-4,8778	Nol3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)	-2,3031
Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	-5,4074	Polb	Polymerase (DNA directed), beta	-7,7399
Bnip2	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2	-192,3201	Prdx2	Peroxiredoxin 2	-2,2155
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3	-7,7399	Pycard	PYD and CARD domain containing	-7,0338
Bnip3l	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like	-23,202	Ripk1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	-4,3588
Bok	BCL2-related ovarian killer protein	-9,2989	Tnf	Tumor necrosis factor	-3,1233
Card10	Caspase recruitment domain family, member 10	-2,0503	Tnfrsf11b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	-3,6758
Casp1	Caspase 1	-7,8312	Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	-25104851,5815
Casp12	Caspase 12	-3,2708	Tnfrsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	-3,538
Casp14	Caspase 14	-2,1739	Tnfrsf12	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	-3,1993
Casp2	Caspase 2	-2,3658	Traf1	Tnf receptor-associated factor 1	-7,7399
Casp3	Caspase 3	-7,7399	Traf2	Tnf receptor-associated factor 2	-9,2416
Casp4	Caspase 4	-3,247	Traf3	Tnf receptor-associated factor 3	-3,3477
Casp7	Caspase 7	-7,7399	Trp53bp2	Transformation related protein 53 binding protein 2	-13,3396
Casp8	Caspase 8	-9,3871	Trp73	Transformation related protein 73	-3,1029
Casp9	Caspase 9	-2,2536			

Partendo da 6 ore post-infezione Fas e TNF risultavano sovraespressi (Tabella 2).

Table 2: Genes Over and Under-Expressed at 6 h post infection by CpHV-1

Symb ol	Description	Fold change	Symbol	Description	Fold change
Fas1	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	6,4839	Nol3	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	2,1385
Tnf	Tumor necrosis factor	2,233			
Abl1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	-2,9488	Dad1	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A	-10,4774
Aifm1	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1	-5,7699	Dffa	DNA fragmentation factor, alpha subunit	-19,7952
Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1	-6,4817	Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	-5,6866
Api5	Apoptosis inhibitor 5	-2,4396	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	-11,8323
Atf5	Activating transcription factor 5	-4,4826	Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	-2,009
Bag1	Bcl2-associated athanogene 1	-2,3089	Il10	Interleukin 10	-3,9316
Bak1	BCL2-antagonist/killer 1	-2,6708	Lhx4	LIM homeobox protein 4	-5,7746
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	-3,1533	Ltbr	Lymphotoxin B receptor	-2,4825
Bcl2a1a	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	-3,4393	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	-11,6602
Bcl2l10	Bcl2-like 10	-6,9293	Naip2	NLR family, apoptosis inhibitory protein 2	-2,2603
Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	-6,5965	Nfkb1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1, p105	-4,5239
Bcl2l2	Bcl2-like 2	-5,9661	Nod1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	-6,7005
Bid	Bcl2-like 1	-2,5608	Prdx2	Peroxiredoxin 2	-3,2921
Birc2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	-66,5446	Pycard	PYD and CARD domain containing	-13,4001
Birc3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	-16,7838	Ripk1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	-2,798
Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	-20,4182	Tnfrsf10b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	-38,9134
Bnip2	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3	-5916,5031	Tnfrsf11b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	-3,8718
Bnip3l	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like	-20,6852	Tnfsf12	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	-2,5211
Bok	BCL2-related ovarian killer protein	-3,7808	Traf3	Tnf receptor-associated factor 3	-2,2858
Card10	Caspase recruitment domain family, member 10	-2,5367	Trp53	Transformation related protein 53	-24,684
Casp6	Caspase 6	-5,4272	Trp63	Transformation related protein 63	-3,9655
Casp8	Caspase 8	-16,4795	Trp73	Transformation related protein 73	-49,0112
Cidea	CD40 ligand	-3,1964	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	-6,1029

A 12 ore post-infezione diversi geni proapoptotici come caspasi (1, 3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14), TNF, CD70 e TRAF1 erano over-espressi. Per contro, a 12 ore post-infezione Bcl2a1a, Fadd e geni del TNF erano sottoespressi (vedi tabella 3).

Table 3: Genes Over- and Under-Expressed at 12 h post infection by CpHV-1

Symbol	Description	Fold change	Symbol	Description	Fold change
Abl1	C-abl oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase	2,5434	Cd70	CD70 antigen	10,4642
Anxa5	Annexin A5	11,706	Cideb	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B	3,1213
Apaf1	Apoptotic peptidase activating factor 1	2,1478	Cradd	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	6,7399
Bad	BCL2-associated agonist of cell death	2,0824	Dapk1	Death associated protein kinase 1	13,4782
Bag3	Bcl2-associated athanogene 3	3,2227	Dffa	DNA fragmentation factor, alpha subunit	2,1903
Bax	Bcl2-associated X protein	5,2575	Dffb	DNA fragmentation factor, beta subunit	5,8786
Bcl10	B-cell leukemia/lymphoma 10	13,4782	Diablo	Diablo homolog (Drosophila)	13,4782
Bcl2l1	Bcl2-like 1	4,2583	Fasl	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	3,5359
Bcl2l2	Bcl2-like 1/Bcl2-like 2	9,147	Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	3,4116
Bnip2	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2	13,4782	Igflr	Insulin-like growth factor I receptor	10,4614
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2	13,4782	Il10	Interleukin 10	2,7443
Bnip3l	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like	4,2965	Mcl1	Myeloid cell leukemia sequence 1	8,6676
Bok	BCL2-related ovarian killer protein	8,6406	Naip2	NLR family, apoptosis inhibitory protein 2	5,6412
Card10	Caspase recruitment domain family, member 10	3,5986	Polb	Polymerase (DNA directed), beta	13,4782
Casp1	Caspase 1	13,4782	Tnfrsf10b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	2,9891
Casp12	Caspase 12	4,7559	Tnfrsf11b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	4,381
Casp14	Caspase 14	3,596	Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	8,3783
Casp3	Caspase 3	13,4782	Tnfrsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2,2295
Casp4	Caspase 4	13,4782	Tnfrsf12	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	2,1111
Casp6	Caspase 6	5,7523	Traf1	Tnf receptor-associated factor 1	13,4782
Casp7	Caspase 7	13,4782	Traf2	Tnf receptor-associated factor 2	2,4416
Casp8	Caspase 8	4,0298	Trp63	Transformation related protein 63	2,2063
Cd40	CD40 antigen	8,4609			
Bcl2a1a	B-cell leukemia/lymphoma 2 related protein A1a	-2,3584	Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	-3,5719
Tnf	Tumor necrosis factor	-3,5503			

Dopo 24 e 48 ore post-infezione molti geni erano up e down-regolati, probabilmente a causa del massiccio effetto citopatico (vedi Tabelle 4 e 5)

Table 4: Genes Over and Under-Expressed at 24 h post infection by CpHV-1

Symbol	Description	Fold change	Symbol	Description	Fold change
Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	4,0695			
Aifm1	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1	-15,9044	Dad1	Defender against cell death 1	-3,2977
Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1	-3,1839	Dffb	DNA fragmentation factor, beta subunit	-2,6608
Api5	Apoptosis inhibitor 5	-14,4781	Fadd	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	-10,5391
Atf5	Activating transcription factor 5	-2,1774	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	-17,8168
Bad	BCL2-associated agonist of cell death	-3,938	FasL	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	-60,2972
Bag1	Bcl2-associated athanogene 1	-6,3526	Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	-4,0851
Bag3	Bcl2-associated athanogene 3	-6,6082	Igf1r	Insulin-like growth factor I receptor	-10,0671
Bak1	BCL2-antagonist/killer 1	-37,8345	Il10	Interleukin 10	-11,7901
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	-19,0913	Lhx4	LIM homeobox protein 4	-5,8171
Bcl2l10	Bcl2-like 10	-32,9371	Ltbr	Lymphotoxin B receptor	-7,3538
Bcl2l11	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	-6,8497	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	-5,0789
Bcl2l2	Bcl2-like 2	-2,4005	Naip1	NLR family, apoptosis inhibitory protein 1	-13,7733
Bid	BH3 interacting domain death agonist	-7,3919	Naip2	NLR family, apoptosis inhibitory protein 2	-4,0633
Birc2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	-3,1317	Nod1	Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1	-107,9962
Birc3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	-19,8521	Polb	Polymerase (DNA directed), beta	-2,209
Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	-2,0833	Prdx2	Peroxisome oxidin 2	-11,77
Bnip3l	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like	-9,7815	Pycard	PYD and CARD domain containing	-39,7069
Bok	BCL2-related ovarian killer protein	-101,9957	Ripk1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	-12,1399
Card10	Caspase recruitment domain family, member 10	-2,3448	Tnfrsf11b	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegerin)	-3,0839
Casp2	Caspase 2	-4,3444	Tnfrsf12	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	-7,3892
Casp6	Caspase 6	-2,7112	Traf2	Tnf receptor-associated factor 2	-4,7817
Casp8	Caspase 8	-6,6039	Traf3	Tnf receptor-associated factor 3	-2,9862
Casp9	Caspase 9	-4,2025	Trp53	Transformation related protein 53	-2,0039
Cd40lg	CD40 ligand	-5,9645	Trp53bp2	Transformation related protein 53 binding protein 2	-30,856
Cideb	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B	-3,5427	Trp63	Transformation related protein 63	-9,5018
Cradd	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	-2,7054			

Table 5: Genes Over- and Under-Expressed at 48 h post infection by CpHV-1

Symbol	Description	Fold change	Symbol	Description	Fold change
Aifm1	Apoptosis-inducing factor, mitochondrion-associated 1	2,0531	Casp9	Caspase 9	2,013
Akt1	Thymoma viral proto-oncogene 1	2,0509	Cd40	CD40 antigen	4,9025
Anxa5	Annexin A5	4,3591	Cd70	CD70 antigen	4,4661
Bax	Bcl2-associated X protein	5,5601	Cidea	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector A	4,8141
Bcl10	B-cell leukemia/lymphoma 10	4,9081	Cradd	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	58,7839
Bcl2	B-cell leukemia/lymphoma 2	16,0066	Dapk1	Death associated protein kinase 1	3,7831
Bcl2l1	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	6,1211	Diablo	Diablo homolog (Drosophila)	6,1211
Birc5	Baculoviral IAP repeat-containing 5	3,0134	Mapk1	Mitogen-activated protein kinase 1	7,4227
Bnip2	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2	6,1211	Mcl1	Myeloid cell leukemia sequence 1	10,4372
Bnip3	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 2	6,1211	Nme5	Non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase)	2,4022
Bnip3l	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like	3,7832	Polb	Polymerase (DNA directed), beta	2,2492
Casp14	Caspase 14	2,8301	Tnfrsf1a	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1a	2,7313
Casp2	Caspase 2	4,5538	Tnfrsf10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2,4444
Casp3	Caspase 3	4,7171	Traf2	Tnf receptor-associated factor 2	3,3169
Casp4	Caspase 4	6,1211	Trp53bp2	Transformation related protein 53 binding protein 2	5,0888
Casp7	Caspase 7	6,1211			
Api5	Apoptosis inhibitor 5	-2,7489	Dad1	Defender against cell death 1	-2,2515
Atf5	Activating transcription factor 5	-4,8525	Dffb	DNA fragmentation factor, beta subunit	-2,6478
Bcl2l2	Bcl2-like 1/Bcl2-like 2	-2,6165	Fas	Fas (TNF receptor superfamily member 6)	-2,8243
Bid	BH3 interacting domain death agonist	-2,6999	Gadd45a	Growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha	-2,3895
Birc2	Baculoviral IAP repeat-containing 2	-3,6729	Lhx4	LIM homeobox protein 4	-3,7444
Birc3	Baculoviral IAP repeat-containing 3	-2,3721	Ltbr	Lymphotoxin B receptor	-2,3913
Bok	BCL2-related ovarian killer protein	-2,3496	Pycard	PYD and CARD domain containing	-3,2115
Casp6	Caspase 6	-2,0995	Ripk1	Receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	-2,5729
Casp8	Caspase 8	-2,068	Tnfrsf12	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12	-2,3227
Cideb	Cell death-inducing DNA fragmentation factor, alpha subunit-like effector B	-2,9094	Xiap	X-linked inhibitor of apoptosis	-3,8246

4.3 ESTRAZIONE PROTEINE ED ANALISI WESTERN BLOT

Per indagare la modulazione della via apoptotica in Neuro 2A infettate con CPHV-1, abbiamo anche misurato l'espressione delle proteine apoptotiche mediante analisi Western Blot.

L'attivazione del DNasi responsabile degradazione oligonucleosomiale della cromatina nucleare dipende dal cleavaggio di un inibitore complessato con la molecola DNasi [Sakahira et al., 1998]

Il cleavaggio è mediato dalla caspasi-3, che a sua volta viene attivato da caspasi-8 o caspasi-9. Caspasi-8 e caspasi-9 rappresentano rispettivamente i percorsi estrinseci ed intrinseci scatenanti la cascata apoptosi.

Al fine di caratterizzare il percorso che innesca la cascata apoptotica durante l'infezione con CPHV-1, abbiamo esaminato il cleavaggio di caspasi-8 e caspasi-9 in campioni di cellule Neuro 2A mock-infected ed infettate con CPHV-1 raccolte a 3, 6, 12, 24, e 48 ore dopo l'infezione mediante l'utilizzo di Western blotting ed anticorpi specifici per caspasi. I risultati hanno mostrato variazioni significative delle quantità di caspasi 8 a 24 ore dopo l'infezione (Fig. 2A, B). Infatti, abbiamo osservato, al tempo stesso, una banda proteica di 18 kDa corrispondente alla forma lavorata della caspasi-8 che viene rilevata dal stesso anticorpo. Analogamente, l'aspetto di una proteina di 37-kDa corrispondente alla forma cleavata di caspasi-9 è stata osservata a partire 24h post-infezione (Fig. 2A, C). Una volta processata, caspasi-9 cleava procaspasi-3, producendo quindi l'attivazione della caspasi-3. Un frammento cleavato di caspasi-3 corrispondente alla banda proteica di 17- kDa è

stata rilevata a partire da 12h post-infezione (Fig. 2A, D), con un acme a 24h post-infezione.

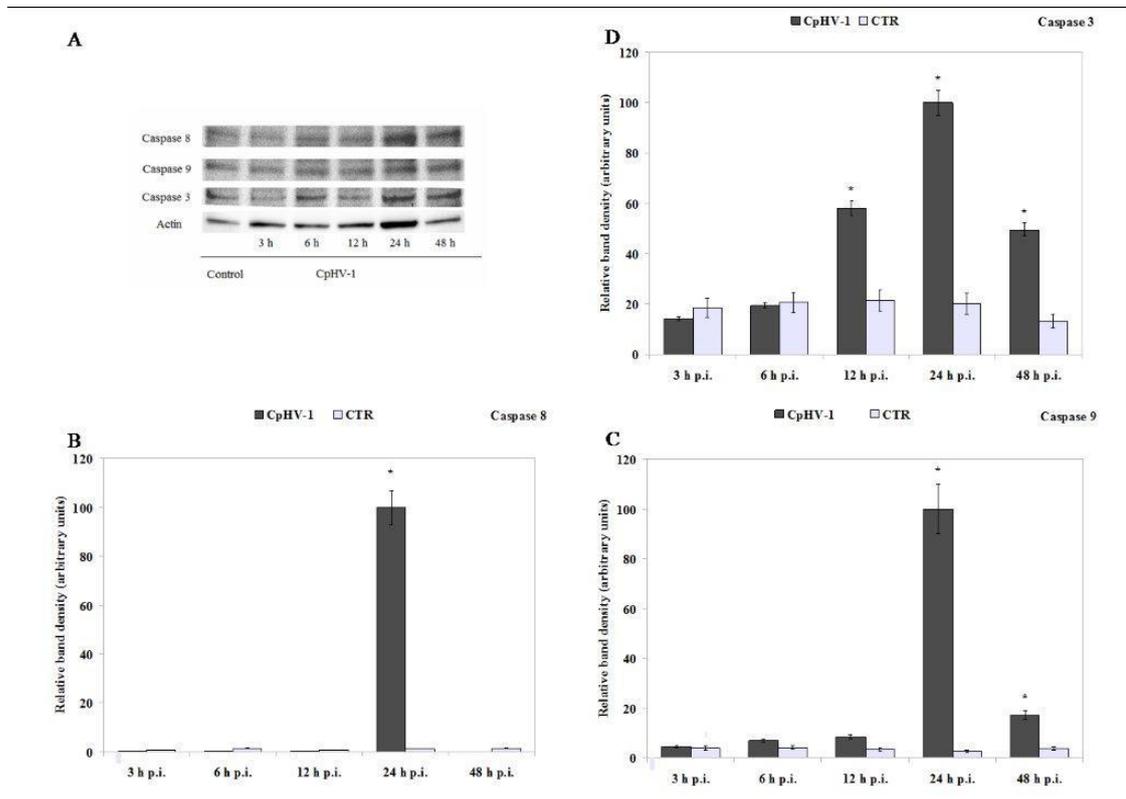


Figura 2: L'attivazione delle caspasi è indotta nelle cellule infettate con Neuro 2A CPHV-1. A diversi tempi dopo l'infezione, le cellule sono state raschiate, raccolte, lisate e sottoposte ad analisi Western Blot con anticorpi contro caspasi 8, 9 e 3. Sono stati rilevati i livelli di actina per garantire il caricamento della stessa quantità di proteine (A). Analisi densitometrica dei blots relativi a caspasi 8, 9 e 3 (B, C e D). I risultati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti separati, un valore $P < 0.05$ è stato selezionato come significativo.

Nelle cellule Neuro 2A CPHV-1-infette l'espressione di Bcl2 e fosfo-Bcl2 era significativamente aumentata a 12 e 24 in modo tempo-dipendente (Fig. 3).

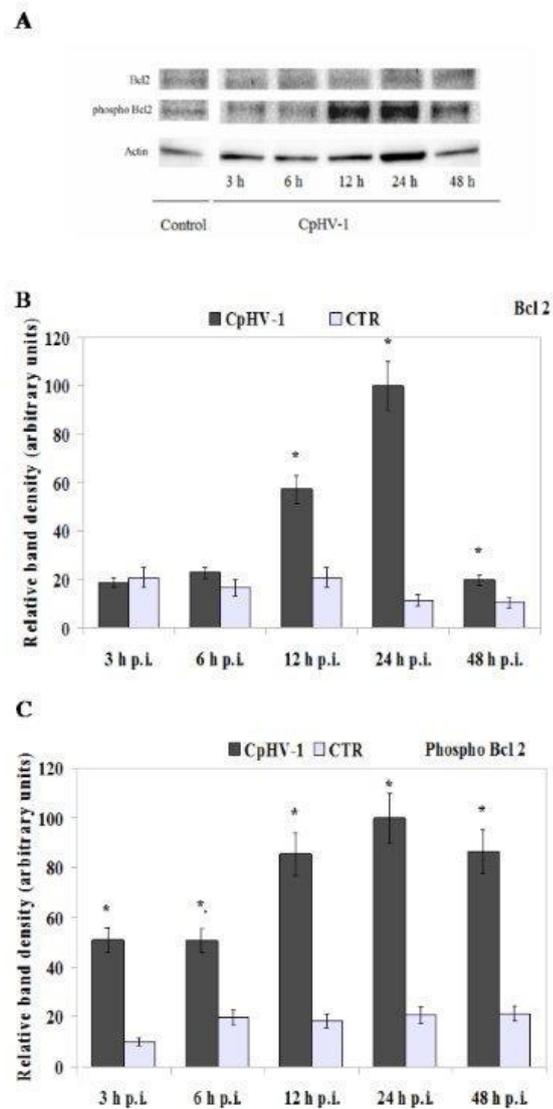


Figura 3: CPHV-1 up-regola Bcl2 e fosfo Bcl2. A diversi tempi post-infezione, le cellule sono state raschiate, raccolte, lisate e sottoposte ad analisi Western Blot con anticorpi per actina, Bcl2 e fosfo-Bcl2. Livelli di actina sono stati rilevati per garantire il caricamento della stessa quantità di proteine (A). Analisi densitometrica relativa a Bcl2 e fosfo-Bcl2 (B e C). I risultati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti separati, un valore $P < 0.05$ è stato selezionato come significativo.

Abbiamo anche testato p53 e l'espressione di fosfo-p53 in cellule infettate Neuro 2A CPHV-1-infette e mock-infected. A 24 ore post-infezione p53 era significativamente aumentata, mentre fosfo-p53 risultava aumentata a partire da 3 ore post-infezione con un acme a 12 ore post-infezione (Fig. 4).

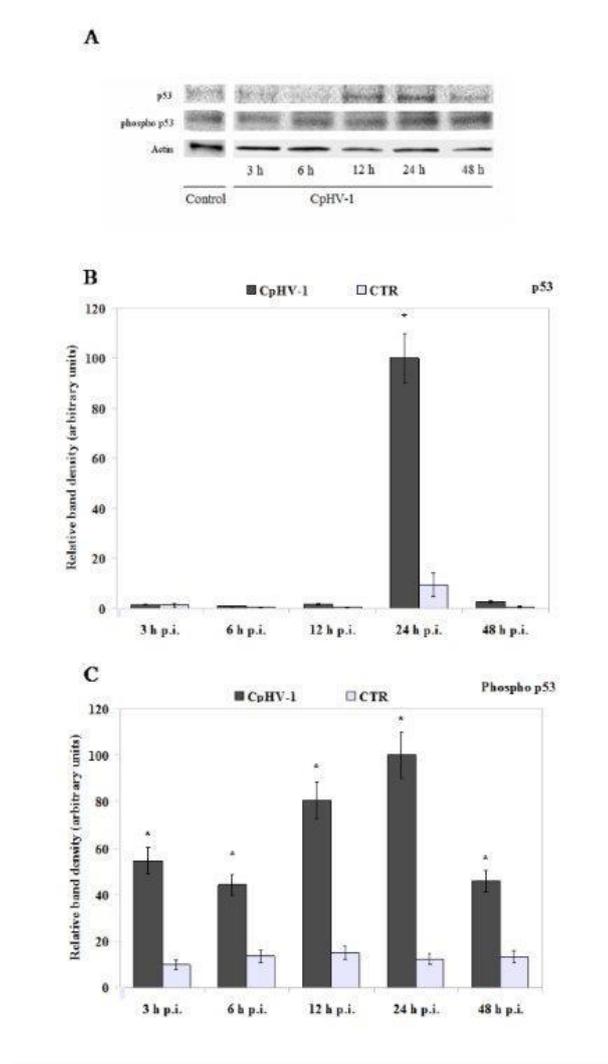


Figura 4: CPHV-1 up-regola p53 e fosfo-p53. A diversi tempi post-infezione, le cellule sono state raschiate, raccolte, lisate e sottoposti ad analisi Western Blot con anticorpi contro l'actina, p53 e fosfo-p53. Livelli di proteine actina sono stati rilevati per garantire il caricamento della stessa quantità di proteine (A). Analisi densitometrica relativa a p53 e fosfo-p53 (B e C). I risultati sono espressi come media \pm SD di tre esperimenti separati, un valore $P < 0.05$ è stato selezionato come significativo.

5. DISCUSSIONI

L'apoptosi o morte cellulare programmata è un programma di suicidio codificato che permette l'eliminazione delle cellule che sono state prodotte in eccesso, sviluppate in modo improprio, o che hanno subito danni genetici.

Molti virus provocano l'apoptosi nelle cellule infette in una fase precoce di infezione quando le particelle virali interagiscono con i recettori sulla superficie cellulare o al momento della fusione con la membrana cellulare e smontaggio (Ramsey-Ewing et al, 1998;.. Jan et al, 2000 ; Barton et al, 2001; Connolly et al, 2002, Bok et al, 2009). Inoltre, alcuni virus inducono apoptosi nelle fasi tardive della replicazione, fornendo un meccanismo per la diffusione del virus progenie.

Cambiamenti apoptotici in cellule infette da Herpesvirus sono stati documentati per diversi virus erpetici (Delhon et al, 2002; Odeberg et al, 2006; Gardell et al, 2006; Longo et al, 2009; Brazeau et al, 2010; Pagnini et al., 2005), nel presente studio abbiamo descritto il meccanismo di morte cellulare in una linea cellulare di neuroblastoma per indagare sul processo apoptotico indotto da CpHV-1 durante l'infezione.

In una prima serie di esperimenti, abbiamo valutato la capacità di CpHV-1 di indurre apoptosi utilizzando ApoTox-Glo™ Triplex Assay. Questi esperimenti, ci hanno permesso di determinare la vitalità, la citotossicità e l'attivazione della caspasi 3 in linea cellulare Neuro 2A. La citotossicità di CpHV-1 in cellule infette è aumentata significativamente in modo dipendente dal tempo e la vitalità delle cellule infette è diminuita in modo significativo rispetto alle cellule di controllo non trattate inducendo apoptosi a 24 e 48 h post-infezione (Fig 1).

Così, abbiamo chiarito la via apoptotica in cellule Neuro 2A grazie alle analisi RT2 Profiler PCR microarray e Western blot per fornire la prova che CpHV-1 induce la morte cellulare per apoptosi in vitro, coinvolgendo sia iniziatori che effettori caspasi.

I nostri dati indicano che CpHV-1 attiva apoptosi nelle cellule neuronlike e che questo processo avviene rapidamente post-infezione. Infatti, in queste cellule una sovra espressione di geni pro apoptotici come Cradd, Fas e TNF è intervenuta a partire da 6 h post-infezione.

Cradd è un dominio di morte (DD) contenente una molecola adattatore/segnalatore che promuove l'apoptosi. Ha una struttura a doppio dominio simile a quella di FADD, un dominio di omologia caspasi NH₂-terminale che interagisce con caspasi-2 e DD C-terminale che interagisce con il recettore-proteina interagente (RIP). Cradd recluta caspasi e induce l'attivazione della cascata apoptotica (Ahmad et al., 1997).

A 12 e 24 ore post-infezione abbiamo trovato che l'infezione CpHV-1 innesca l'attivazione di geni delle caspasi, in particolar caspasi 8, che confermano il coinvolgimento di recettori di morte (DR). Inoltre, a 24 ore post-infezione, l'analisi Western Blot, ha mostrato la presenza di caspasi 9, caspasi 8 e 3.

Attivazione dell'apoptosi e attivazione delle caspasi può essere avviata attraverso due percorsi principali. La "via intrinseca o mitocondriale" comporta cambiamenti di permeabilità nella membrana mitocondriale che sono regolati da una famiglia di proteine Bcl-2-correlate. Membri proapoptotici attivati di questo gruppo (Bax, Bad, Bok) formano pori nella membrana mitocondriale e promuovono la perdita di fattori apoptotici sequestrati dai mitocondri, come il citocromo c e Smac / DIABLO,

che è risultato sovraespresso a 12 ore post-infezione (Tabella 3), ed è direttamente collegato alla permeabilità della membrana esterna (Annis et al, 2005;.. Epanand et al, 2002). La perdita di integrità della membrana mitocondriale e il rilascio citocromo c, sfocia nella formazione di un apoptosoma e la lavorazione di procaspase-9 seguita dall'attivazione a cascata dell'esecutore caspasi-3 (Jiang et al., 2004).

La sovraespressione della famiglia dei geni recettori caspasi, FasL e TNF a 6 e 12 ore post-infezione, suggeriscono che l'induzione di apoptosi da infezione CpHV-1 coinvolge anche la via estrinseca.

L'over espressione di geni FasL indica che l'attivazione caspasi-8 in cellule neuronali infette con CpHV-1 può essere mediata dal pathway Fas/FasL. Tuttavia, come l'espressione di FasL sia regolata da CpHV-1 rimane poco chiaro, e ulteriori studi sono in corso per chiarire il meccanismo di regolazione FasL in cellule MDBK infette con CpHV-1.

Questi dati sono confermati mediante saggio Western blot, infatti abbiamo trovato a 12 e 24 ore post-infezione un significativo aumento della caspasi 8, 9 e 3.

I nostri dati concordano con i risultati di Gautier et al., (2003), che ha descritto l'induzione di apoptosi in cellule neuro-like infettate con HSV-1 in fase precoce, con i risultati di Xu et al., (2012), che ha riportato risultati simili per BHV-1 nella linea cellulare MDBK e con diversi studi che hanno segnalato concomitante attivazione di caspasi-8 e caspasi-9 in vari sistemi apoptotici (Aubert et al, 2007; St-Louis e Archambault, 2007; Fiorito et al., 2008; Longo et al., 2009).

In realtà, a 12 ore post-infezione il profilo genico ha mostrato un eccesso di espressione di geni che svolgono un ruolo importante in percorsi intrinseci ed estrinseci della apoptosi come caspasi 8, Apaf1 che attiva la caspasi 9, Bax, Bad, Bok,

Bcl10 che codificano per il reclutamento di un dominio della proteina caspasi (CARD) e hanno dimostrato di indurre apoptosi e per attivare NF- κ B, Card10, Dapk1, polb, Diablo e le altri geni caspasi.

Nel nostro studio i livelli di proteine p53 e fosfo-p53 sono aumentati post-infezione, suggerendo che p53 ha un ruolo nell'apoptosi indotta da CpHV-1. I geni che sono regolati da p53 (come Bax, per esempio) sono stati indotti in maniera p53-dipendente. È stato dimostrato che la scissione di p53 si verifica in risposta al danno del DNA, generando p50 o p40, e di conseguenza altera l'attività regolatoria trascrizionale di p53 (Chen et al, 1996 (Molinari et al., 1996); Horikoshi et al. , 1995; Hupp et al, 1992). Diversi altri herpesvirus, come HSV-1, HSV-2 e BHV-1 inducono danni al DNA post-infezione (Pilon et al, 1986;... Schlehofer et al, 1982 Devireddy et al, 1999), suggerendo che l'infezione anche da CpHV-1 può portare a danni al DNA e induzione p53.

Nel nostro studio è sorprendente che i livelli di proteina Bcl-2 e la sua forma fosforilata siano aumentati post-infezione proprio per il ruolo antiapoptotico della proteina Bcl-2 (Gross et al., 1999). L'aumento simultaneo di Bcl2 e fosfo Bcl2 a 12 ore post-infezione, preceduta da un aumento di fosfo p53 a 6 ore post-infezione suggeriscono che l'induzione di apoptosi da infezione con CpHV-1 coinvolge anche via estrinseca.

Bcl-2 è normalmente espressa in una vasta gamma di tessuti ed è necessaria per lo sviluppo e la manutenzione del sistema immunitario normale (Veis et al., 1993).

La funzione cellulare dei membri della famiglia Bcl-2 è disciplinata in parte dalle caspasi. Bellows et al. hanno riferito che caspasi-3 cliva Bcl-2 in Asp-34 e Bcl-xL in Asp-61 e Asp-76 per la produzione di proteine tronche N-terminali che

hanno perso le loro attività antiapoptotiche (Cheng et al., 1997; Clem et al, 1998;.. Fujita et al, 1998; Grandgirard et al, 1998;.. Kirsch et al, 1999; Bellows et al, 2000). E' ipotizzabile che questi clivaggi siano fisiologicamente significativi, poiché la mutazione dei siti di taglio di Bcl-2 e Bcl-xL esaltano le loro attività antiapoptotiche (Cheng et al, 1997; Clem et al., 1998). Infatti i prodotti clivati dalle caspasi di Bcl-2 e Bcl-xL sono potentemente proapoptotici, e ciò è stato dimostrato sulla base di studi di trasfezione che esprimevano frammenti di proteine equivalenti ai prodotti dal clivaggio delle caspasi (Cheng et al, 1997;.. Clem et al, 1998). Pertanto, la generazione di questi frammenti all'interno delle cellule possono accelerare la morte cellulare amplificando la cascata di caspasi ed, a sostegno di questa ipotesi, è stato dimostrato che Bcl-2 troncata N-terminale stimola il rilascio del citocromo c dai mitocondri, analogamente a Bax (Jurgensmeier et al, 1998; Kirsch et al, 1998).

In conclusione, l'attivazione simultanea di caspasi-8 e caspasi-9 suggerisce che CpHV-1 può attivare il percorso di morte recettore dipendente così come la via mitocondriale separatamente e in parallelo. Potrebbe essere interessante investigare i segnali a monte che attivano queste due vie a seguito di infezione con CpHV-1.

BIBLIOGRAFIA

1. Ahmad M, Srinivasula SM, Wang L, Talanian RV, Litwack G, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. 1997. CRADD, a novel human apoptotic adaptor molecule for caspase-2, and FasL/tumor necrosis factor receptor-interacting protein RIP. *Cancer Res* 15;57(4):615-9.
2. Annis MG, Soucie EL, Dlugosz PJ, Cruz-Aguado AJ, Penn LZ, Leber B, and Andrews DW. 2005. Bax forms multispinning monomers that oligomerize to permeabilize membranes during apoptosis. *EMBO J* 24: 2096-2103.
3. Ashkenazi A, Dixit VM. 1998. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281: 305-1308.
4. Aubert M, Pomeranz LE, Blaho JA. 2007. Herpes simplex virus blocks apoptosis by precluding mitochondrial cytochrome c release independent of caspase activation in infected human epithelial cells. *Apoptosis* 12(1):19-35.
5. Barton E S, Chappell JD, Connolly JL, Forrest JC, Dermody TS. 2001. Reovirus receptors and apoptosis. *Virology* 290:173-180.
6. Bellows DS, Chau BN, Lee P, Lazebnik Y, Burns WH, Hardwick JM. 2000. Antiapoptotic herpesvirus Bcl-2 homologs escape caspase-mediated conversion to proapoptotic proteins. *J Virol* 74(11):5024-31.
7. Berrios PE, McKercher DG, Knight HD, 1975. Pathogenicity of a caprine herpesvirus. *Am. J Vet Res* 36, 1763-1769.
8. Bok K, Prikhodko VG, Green KY, Sosnovtsev SV. 2009. Apoptosis in murine norovirus-infected RAW264.7 cells is associated with downregulation of survivin. *J Virol*. 83(8):3647-56.
9. Brazeau E, Mahalingam R, Gilden D, Wellish M, Kaufer BB, Osterrieder N, Pugazhenti S. 2010. Varicella-zoster virus-induced apoptosis in MeWo cells is accompanied by down-regulation of Bcl-2 expression. *J Neurovirol* 16(2):133-40.
10. Brenner D, Mak TW. 2009. Mitochondrial cell death effectors. *Curr Opin Cell Biol* 21: 871-877.
11. Buonavoglia C, Tempesta M, Cavalli A, Voigt V, Buonavoglia D, Conserva A, Corrente M, 1996. Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 19, 275-281.
12. Cassady KA, Gross M, Roizman, B. 1998. The second-site mutation in the herpes simplex virus recombinants lacking the γ 134.5 genes precludes shut-off of protein

- synthesis by blocking the phosphorylation of eIF-2 β . *Journal of Virology* 72, 7005–7011.
13. Chen J, Wu X, Lin J, Levine AJ. 1996. mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 16:2445–2452.
 14. Cheng EHY, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science* 278:1966–1968.
 15. Clem RJ, Cheng EHY, Karp CL, Kirsch DG, Ueno K, Takahashi A, Kastan MB, Griffin DE, Earnshaw WC, Velicuona MA, Hardwick JM. 1998. Modulation of cell death by Bcl-xL through caspase interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:554–559.
 16. Connolly JL, Dermody TS. 2002. Virion disassembly is required for apoptosis induced by reovirus. *J Virol* 76:1632–1641.
 17. Delhon GA, González MJ, Murcia PR. 2002. Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by bovine herpesvirus type 1. *J Gen Virol* 83(Pt 9):2257–67.
 18. Devireddy LR, Jones CJ. 1999. Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J Virol* 73(5):3778–88.
 19. Epand RF, Martinou JC, Montessuit S, Epand RM, Yip CM. 2002. Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochem Biophys Res Commun* 298:744–749.
 20. Fiorito F, Marfè G, De Blasio E, Granato GE, Tafani M, De Martino L, Montagnaro S, Florio S, Pagnini U. 2008. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin regulates bovine herpesvirus type 1 induced apoptosis by modulating Bcl-2 family members. *Apoptosis* 13(10):1243–52.
 21. Fuentes-Prior P, Salvesen GS. 2004. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384:201–232.
 22. Fujita N, Nagahashi A, Nagashima K, Rokudai S, Tsuruo T. 1998. Acceleration of apoptotic cell death after the cleavage of Bcl-xL protein by caspase-3-like proteases. *Oncogene* 17:1295–1304.
 23. Gardell JL, Dazin P, Islar J, Menge T, Genain CP, Lalive PH. 2006. Apoptotic effects of Human Herpesvirus-6A on glia and neurons as potential triggers for central nervous system autoimmunity. *J Clin Virol* 37 Suppl 1:S11–6.
 24. Gautier I, Coppey J, Durieux C. 2003. Early apoptosis-related changes triggered by HSV-1 in individual neuronlike cells. *Exp Cell Res* 10;289(1):174–83.

25. Geiger KD, Gurushanthaiah D, Howes EL, Lewandowski GA, Grandgirard D, Studer E, Monney L, Belser T, Fellay I, Borner C, Michel MR. 1998. Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *EMBO J* 17:1268–1278
26. Green DR, Kroemer G. 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305:626–629.
27. Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ, 1999. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Dev* 13: 1899–1911.
28. Hay S, Kannourakis G. 2002. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* 83(Pt 7): 1547–64.
29. Henderson S, Huen D, Rowe M, Dawson C, Johnson G, Rickinson A. 1993. Epstein-Barr virus-coded BHRF1 protein, a viral homologue of Bcl-2, protects human B cells from programmed cell death. *PNAS, USA* 90, 8479–8483.
30. Horikoshi N, Usheva A, Chen J, Levine AJ, Weinmann R, Shenk T. 1995. Two domains of p53 interact with the TATA-binding protein, and the adenovirus 13S E1A protein disrupts the association, relieving p53-mediated transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 15:227–234.
31. Horner GW, Hunter R, Day AM. 1982. An outbreak of vulvovaginitis in goats caused by a caprine herpesvirus. *NZ Vet J* 30, 152.
32. Hu S, Vincenz C, Buller M, Dixit VM. 1997. A novel family of viral death effector domain-containing molecules that inhibit both CD-95- and tumor necrosis factor receptor-1-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 272, 9621–9624.
33. Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP. 1992. Regulation of the specific DNA binding function of the p53. *Cell* 71:875–886.
34. Jan JT, Chatterjee S, Griffin DE. 2000. Sindbis virus entry into cells triggers apoptosis by activating sphingomyelinase, leading to the release of ceramide. *J Virol* 6425–6432.
35. Jiang X, Wang X. 2004. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem.* 73:87–106.
36. Jones C. 1998. Alpha herpesvirus latency: its role in disease and survival of the virus in nature. *Advances in Virus Research* 51, 81–133.
37. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC. 1998. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *PNAS USA* 95:4997–5002.

38. Kirsch DG, Doseff A, Chau BN, Lin DS, de Souza-Pinto NC, Hansford R, Kastan MB, Lazebnik YA, Hardwick JM. 1999. Caspase-3-dependent cleavage of Bcl-2 promotes release of cytochrome c. *J Biol Chem* 274:21155–21161.
39. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. 1995. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14: 5579–5588.
40. Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. 2007. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 7:532–542.
41. Krammer PH. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407: 789–795.
42. Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. 2005. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115: 2665–2672.
43. Lavrik IN. 2010. Systems biology of apoptosis signaling networks. *Curr Opin Biotechnol* 21: 551–555.
44. Longo M, Fiorito F, Marfè G, Montagnaro S, Pisanelli G, De Martino L, Iovane G, Pagnini U. 2009. Analysis of apoptosis induced by Caprine Herpesvirus 1 in vitro. *Virus Res* 145(2):227–35.
45. Mettler F, Engels M, Wild P, Bivetti A. 1979. Herpesvirus infection in kids in Switzerland. *Schweiz Arch Tierheilkd* 121, 655–662.
46. Molinari M, Okorokov AL, Milner J. 1996. Interaction with damaged DNA induces selective proteolytic cleavage of p53 to yield 40 kDa and 35 kDa fragments competent for sequence-specific DNA binding. *Oncogene* 21;13(10):2077–86.
47. Mori CM, Mori E, Favaro LL, Santos CR, Lara MC, Villalobos EM, Cunha EM, Brandao PE, Richtzenhain LJ, Maiorka PC. 2012. Equid herpesvirus type-1 exhibits neurotropism and neurovirulence in a mouse model. *J Comp Pathol* 146(2–3):202–10.
48. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Seiger A, Söderberg-Nauclér CJ. 2006. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. *Virology* 80(18):8929–39.
49. Pagnini U, Montagnaro S, Pacelli F, De Martino L, Florio S, Rocco D, Iovane G, Pacilio M, Gabellini C, Marsili S, Giordano A. 2004. The involvement of oxidative stress in bovine herpesvirus type 4-mediated apoptosis. *Front Biosci* 2004 1;9:2106–14.

50. Pagnini U, Montagnaro S, Sanfelice di Monteforte E, Pacelli F, De Martino L, Roperto S, Florio S, Iovane G. 2005. Caprine herpesvirus-1 (CapHV-1) induces apoptosis in goat peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 10;103(3-4):283-93.
51. Pelzl C, Arcizet D, Piontek G, Schlegel J, Heinrich D. 2009. Axonal guidance by surface microstructuring for intracellular transport investigations. *Chemphyschem* 10(16):2884-2890.
52. Pilon L, Langelier Y, Royal A. 1986. Herpes simplex virus type 2 mutagenesis: characterization of mutants induced at the hprt locus of non-permissive XC cells. *Mol Cell Biol* 6:2977-2983.
53. Plebani GF, Engels M, Metzler AE, Wyler R. 1983. Caprine herpesvirus in Switzerland: distribution, incidence and latency of infection. *Schweiz Arch Tierheilkd* 125, 395-411.
54. Pugazhenthii S, Nair S, Velmurugan K, Liang Q, Mahalingam R, Cohrs RJ, Nagel MA, Gildea D. 2011. Varicella-zoster virus infection of differentiated human neural stem cells. *J Virol* 85(13):6678-86.
55. Ramsey-Ewing A, Moss B. 1998. Apoptosis induced by a postbinding step of vaccinia virus entry into Chinese hamster ovary cells. *Virology* 242: 138-149.
56. Reed LJ, Muench H, 1938. A simple method of estimating 50% end points. *Am J Hyg* 27, 493-497.
57. Rock DL, Nesburn AB, Ghiasi H, Ong J, Lewis TL, Lokensgard JR, Wechsler SL. 1987. Detection of latency-related viral RNAs in trigeminal ganglia of rabbits latently infected with herpes simplex virus type 1. *J Virol* 61(12):3820-3826.
58. Rock DL. 1993. Latent infection with bovine herpesvirus type 1. *Seminars in Virology* 5, 233-240.
59. Roperto F, Pratelli A, Guarino G, Ambrosio V, Tempesta M, Galati P, Iovane G, Buonavoglia C. 2000. Natural caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) infection in kids. *J Comp Pathol* 122, 298-302.
60. Sadzot-Delvaux C, Thonard P, Schoonbroodt S, Piette J, Rentier B. 1995. Varicella-zoster virus induces apoptosis in cell culture, *J Gen Virol*, 76: 2875-2879.
61. Sakahira H, Enari M, Nagata S. 1998. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391:96-99.
62. Schlehofer JR, Hausen H. 1982. Induction of mutations within the host cell genome by partially inactivated HSV-1. *Virology* 122:471-475.

63. St-Louis MC, Archambault D. 2007. The equine arteritis virus induces apoptosis via caspase-8 and mitochondria-dependent caspase-9 activation. *Virology* 10;367(1):147-55.
64. Stevens JG, Wagner EK, Devi-Rao GB, Cook ML, Feldman LT. 1987. RNA complementary to a herpesvirus alpha gene mRNA is prominent in latently infected neurons. *Science* 27;235(4792):1056-9.
65. Tisdall DJ, Bentley CB, Collins DM. 1984. New Zealand caprine herpes virus: comparison with an Australian isolate and with bovine herpesvirus type 1 by restriction endonuclease analysis. *NZ Vet J* 32, 99-100.
66. Veis DJ, Sorenson CM, Shutter SR, Korsmeyer SJ. 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell* 75:229-240.