



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
“FEDERICO II”

Tesi di
DOTTORATO DI RICERCA
in
BIOLOGIA, PATOLOGIA E IGIENE AMBIENTALE
IN MEDICINA VETERINARIA

XXI CICLO
2005-06/ 2007-08

Meccanismi biochimici coinvolti nell’apoptosi CpHV-1-indotta

Tutor
Chiar.mo Prof.
Ugo Pagnini

Dottoranda
Dott.ssa Mariangela Longo

Coordinatore
Chiar.mo Prof.
Giuseppe Paino

Più studio la natura,
più rimango meravigliato del lavoro del Creatore.
Louis Pasteur

INDICE

ABSTRACT	pag. 5
INTRODUZIONE	pag. 9
Famiglia Herpesviridae	pag. 10
Caprine Herpesvirus 1	pag. 20
Apoptosi o Programmed Cell Death (PCD)	pag. 24
<i>Generalità</i>	pag. 24
<i>Regolazione della morte cellulare programmata</i>	pag. 31
Infezioni virali ed apoptosi	pag. 36
MATERIALI E METODI	pag. 45
Cellule e condizioni di coltura	pag. 45
CpHV-1 e titolo virale	pag. 45
Test di vitalità cellulare	pag. 45
Infezione sperimentale e osservazioni microscopiche	pag. 46
Valutazione dell'apoptosi	pag. 47
<i>Analisi morfologica mediante colorazione con Arancio d'Acridina</i>	pag. 47
<i>Colorazione con Ioduro di Propidio (PI) e determinazione del picco sub-G1</i>	pag. 48
<i>DNA laddering</i>	pag. 49
Caratterizzazione dell'apoptosi	pag. 50
<i>Estrazione delle proteine e Western blotting</i>	pag. 51
<i>Valutazione dell'attivazione delle caspasi mediante citofluorimetria</i>	pag. 52
<i>Inibizione dell'apoptosi</i>	pag. 53
<i>Determinazione del potenziale di membrana mitocondriale</i>	pag. 53
<i>Estrazione delle proteine citosoliche e mitocondriali</i>	pag. 54
<i>Estrazione dell'RNA e Northern blot</i>	pag. 54
Analisi statistica dei dati	pag. 55
RISULTATI	pag. 56
Effetto citopatico	pag. 56
Alterazione della vitalità delle cellule MDBK infettate con CpHV-1	pag. 56
Replicazione virale	pag. 59
Studio e caratterizzazione dell'attività apoptotica di CpHV-1	pag. 61
<i>Modificazioni nucleari determinate dall'infezione da CpHV-1</i>	pag. 61
<i>Citofluorimetria a flusso per la valutazione della popolazione cellulare in sub- G1</i>	pag. 64

<i>Frammentazione del DNA</i>	pag. 68
<i>Clivaggio di PARP</i>	pag. 68
<i>Analisi dell'attività delle caspasi</i>	pag. 70
<i>Inibizione dell'apoptosi</i>	pag. 78
<i>Eventi mitocondriali</i>	pag. 80
<i>Cambiamenti della membrana mitocondriale</i>	pag. 80
<i>Traslocazione del citocromo C</i>	pag. 83
<i>Famiglia Bcl-2</i>	pag. 85
DISCUSSIONE	pag. 91
BIBLIOGRAFIA	pag. 99
RINGRAZIAMENTI	pag. 112

Abstract

L'apoptosi è un processo fisiologico presente in tutti gli eucarioti multicellulari che si verifica durante le prime fasi dello sviluppo. Morfologicamente, l'apoptosi risulta caratterizzata da vacuolizzazione del citoplasma, condensazione della cromatina e formazione di corpi apoptotici, mentre da un punto di vista biochimico si distingue per l'attivazione di proteasi specifiche (caspasi) e per la degradazione del DNA in frammenti oligonucleosomiali. Gli eventi apoptotici possono essere indotti da molteplici stimoli intra-cellulari (danni al DNA, gravi stress al reticolo endoplasmatico o ai mitocondri) e/o extra-cellulari (azione di ormoni e di fattori di crescita; infezioni virali). In particolare, nell'apoptosi virus-indotta, gli Herpesvirus sembrano esercitare un fine controllo della risposta apoptotica cellulare, attraverso il coinvolgimento di meccanismi ancora non completamente conosciuti.

Caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1) è responsabile di infezioni sistemiche che colpiscono i capretti nelle prime due settimane di vita, con febbre, scolo nasale, diarrea. Ma il virus è stato isolato anche da capre con vulvovaginite, turbe respiratorie e lesioni proliferative a carico di labbra e palato duro. Inoltre, è in grado di esplicare attività abortigena e, al pari di altri Herpesvirus, dà luogo ad infezioni latenti suscettibili di riattivazione.

E' noto che CpHV-1 sia in grado d'indurre apoptosi in cellule mononucleate di sangue (Pagnini *et al.*, 2005), al pari di BoHV-1 (Hanon *et al.*, 1997, 1998; Winkler *et al.*, 1999; Delhon *et al.*, 2002), antigenicamente e geneticamente correlato ad esso. Dal momento che BoHV-1 induce apoptosi anche in cellule di origine epiteliale (Devireddy & Jones, 1999; Geiser *et al.*, 2008), abbiamo studiato la capacità di CpHV-1 di indurre

apoptosi, utilizzando come modello sperimentale la linea cellulare Madin Darby bovine kidney (MDBK), oggetto di questa tesi. Inoltre, sono state messe in luce alcune caratteristiche del processo apoptotico che si verifica in questo substrato. Pertanto, la descrizione della capacità di CpHV-1 di interagire con i meccanismi che presiedono alla morte cellulare programmata potrebbe aprire nuove prospettive nella comprensione dei meccanismi che sottintendono la patogenesi dell' infezione causata da questo virus. La scelta dell'argomento è correlata alla necessità di comprendere i meccanismi patogenetici che portano alle manifestazioni cliniche da CpHV-1, diffuso in diversi Paesi del Mediterraneo e, in particolare, in alcune regioni del sud Italia, dove provoca gravi perdite economiche, sia per i disordini riproduttivi di cui è direttamente responsabile, sia per le infezioni secondarie conseguenti allo stato di immunosoppressione degli animali.

In seguito all'infezione delle cellule MDBK con CpHV-1, a differenti molteplicità d'infezione (m.o.i.) (0.1, 1 e 10), si è riscontrata una riduzione della vitalità cellulare in maniera dose-tempo dipendente, utilizzando un saggio colorimetrico che misura l'attività metabolica cellulare (MTT test). Inoltre, è stata evidenziata l'associazione tra la diminuzione di vitalità cellulare e la produzione di nuova progenie virale. A partire da 12 ore post infezione (p.i.), la morfologia cellulare è apparsa drasticamente cambiata: le cellule, arrotondate, si staccavano dal monostrato infettato e, impiegando la colorazione con arancio d'acridina, è stato possibile visualizzare la frammentazione nucleare. Il ladder internucleosomiale tipico dell'apoptosi è stato rilevato già a 24 ore p.i.

Il fenomeno apoptotico è stato, poi, quantificato mediante colorazione del DNA delle cellule infette con propidio ioduro, metodica che mette in

evidenza il picco ipodiploide corrispondente alle cellule apoptotiche e ai corpi apoptotici. Il picco si apprezzava già a 8 ore p.i. nelle cellule infettate alle m.o.i più alte (1 e 10), e a 24 ore p.i. a m.o.i 0.1.

Tra i meccanismi coinvolti nell'apoptosi, attraverso analisi western blotting e citofluorimetria a flusso, è stato dimostrato che l'apoptosi indotta da CpHV-1 è associata all'attivazione sia di caspasi iniziatrici, quali caspasi-8 e caspasi-9, sia di caspasi effettrici, come caspasi-3. È stato evidenziato, inoltre, il clivaggio di PARP, enzima di riparo del DNA, necessario alla sopravvivenza cellulare, a partire da 8 ore p.i. Lo studio dell'effetto degli inibitori specifici delle caspasi sull'infezione da CpHV-1, è stata riscontrata la liberazione di nuova progenie virale.

I segnali che conducono alla morte cellulare programmata possono provenire sia dalle interazioni di ligandi extracellulari a recettori specifici esposti sulla membrana plasmatica, che da eventi apoptotici mitocondriali. Alcuni effetti che si riflettono sulla funzionalità mitocondriale riguardano il calo della differenza del potenziale transmembranario ($\Delta\psi_m$) e la liberazione del citocromo C eventi che in questo lavoro sono stati apprezzati già a 8 ore dall'infezione.

La modulazione tra segnali di morte e di sopravvivenza che coinvolgono la cellula durante l'apoptosi è effettuata da diverse proteine, come la famiglia Bcl-2 che comprende sia membri pro-apoptotici (come Bax o Bid), che anti-apoptotici (Bcl-X_L e Bcl-2). Nelle cellule infettate con CpHV-1, è stato dimostrato che sia l'mRNA di Bax che la proteina erano presenti a partire da 8 a 24 ore p.i., quando appunto Bid risultava attivato. Rispetto al controllo, i livelli di mRNA dei membri antiapoptotici studiati rimanevano invariati nel corso dell'infezione, mentre l'espressione delle proteine relative era inferiore già a partire da 8 ore p.i. Questi risultati dimostrano che non c'è alcuna interferenza da parte del virus nella trascrizione dei geni della

famiglia Bcl-2. Quindi la regolazione dell'espressione di Bcl-2 dipende dalle caspasi, attive già a 8 ore p.i.

I dati riportati in questo lavoro dimostrano chiaramente che CpHV-1 è in grado di indurre apoptosi in cellule MDBK, così come accade in altri substrati quali le PBMC (Pagnini *et al.*, 2005). Inoltre, in confronto all'apoptosi BoHV-1-indotta in cellule MDBK, dove gli eventi apoptosi sono stati descritti nelle ultime ore dell'infezione (Devireddy & Jones, 1999; Geiser *et al.*, 2008), CpHV-1 provoca precocemente apoptosi nelle MDBK, anche se cellule di origine epiteliale, che generalmente risultano più resistenti alla morte cellulare programmata (Wesselborg *et al.*, 1993).

L'apoptosi delle cellule infettate causa la distruzione dei tessuti e delle cellule stesse, così come le risposte infiammatorie. Di conseguenza, nelle infezioni associate al CapHV-1, l'apoptosi delle cellule costituenti i tessuti dell'apparato respiratorio e genitale potrebbe essere responsabile delle manifestazioni patologiche determinate dal virus.

INTRODUZIONE

Caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1) è responsabile di una forma di malattia sistemica, nei giovani capretti e subclinica, di tipo respiratorio e genitale, nelle capre adulte. Diffuso nei Paesi del Mediterraneo, ed in particolare in alcune regioni del sud Italia, il patogeno provoca gravi perdite economiche, sia per i disordini riproduttivi di cui è direttamente responsabile, sia per le infezioni secondarie conseguenti allo stato di immunosoppressione degli animali (Roperto *et al.*, 2000). Tuttavia, finora ben poco è noto circa i meccanismi patogenetici che portano alle manifestazioni cliniche da CpHV-1.

L'apoptosi, o morte cellulare programmata (PCD), è un processo fisiologico presente in tutti gli eucarioti multicellulari che si verifica durante le prime fasi dello sviluppo. Morfologicamente, la PCD risulta caratterizzata da vacuolizzazione del citoplasma, condensazione della cromatina e formazione di corpi apoptotici (Duvall & Wyllie, 1985), mentre da un punto di vista biochimico si distingue per la degradazione del DNA in frammenti oligonucleosomiali (Wyllie, 1981; Duvall & Wyllie, 1985; Arends *et al.*, 1990).

La PCD può essere indotta da molteplici stimoli intra-cellulari (danni al DNA, gravi stress al reticolo endoplasmatico o ai mitocondri) e/o extra-cellulari (azione di ormoni e di fattori di crescita; infezioni virali). In particolare, l'apoptosi è associata a diverse infezioni virali, *in vivo* e *in vitro*, sostenute specialmente da virus a DNA (Yoshida *et al.*, 1995; Alemañ *et al.*, 2001). La relazione tra virus e cellula ospite rappresenta, infatti, un classico conflitto di interesse, in cui il virus cerca di ottenere il massimo beneficio

dall'apparato replicativo della cellula, mentre quest'ultima cerca di minimizzare i danni dell'infezione (Krakauer & Payne, 1997). Alcuni geni virali stimolano l'apoptosi interagendo direttamente con i meccanismi che permettono la conservazione dell'equilibrio biochimico della cellula regolando così la morte cellulare; altri geni virali inibiscono l'apoptosi sia per prevenire la morte prematura della cellula ospite, facilitare lo sviluppo della progenie virale nelle infezioni litiche, oltre che permettere l'infezione persistente; i virus sono in grado di svolgere entrambe le funzioni (Shen & Shenk, 1995).

In particolare, la capacità degli Herpesvirus di modulare l'apoptosi rappresenta un'importante caratteristica patogenetica dell'infezione (Shen & Shenk, 1995; Teodoro & Branton, 1997). Di conseguenza, si è ritenuto opportuno studiare l'azione di CpHV-1 nei riguardi dell'apoptosi in cellule bovine Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK), substrato adeguato alla crescita del virus, individuando i meccanismi biochimici coinvolti in questo evento, al fine di caratterizzare gli eventi successivi all'interazione virus-cellula per meglio comprendere i meccanismi alla base della patogenesi da CpHV-1.

Famiglia Herpesviridae

La famiglia Herpesviridae comprende circa 200 virus isolati da ospiti diversi, quali molluschi, pesci, anfibi, rettili, uccelli e mammiferi (Roizman & Knipe, 2001). Si può infatti affermare che, nell'ambito dei vertebrati, per ogni specie animale per la quale siano state condotte ricerche accurate è stato riscontrato almeno un virus erpetico che ha compiuto la sua evoluzione congiuntamente al proprio ospite (*Tabella 1*).

Tabella 1: Alcuni virus appartenenti alla famiglia Herpesviridae
(Fields et al., 1996)

Designazione	Nome comune (sinonimo)	Sottofamiglia
<u>Virus dell'uomo</u>		
Human Herpesvirus 1	Herpes Simplex Virus 1	α
Human Herpesvirus 2	Herpes Simplex Virus 2	α
Human Herpesvirus 3	Varicella-Zoster Virus	α
Human Herpesvirus 4	Epstein-Barr Virus	γ
Human Herpesvirus 5	Cytomegalovirus	β
Human Herpesvirus 6		β
Human Herpesvirus 7		β
Human Herpesvirus 8		α
<u>Virus dei primati</u>		
Pongine Herpesvirus 1	Chimpanzee HV; Pan HV	γ
Pongine Herpesvirus 3	Gorilla HV	γ
<u>Virus dei mammiferi</u>		
<u>Bovidae</u>		
Bovine Herpesvirus 1	Infectious Bovine Rinotracheitis HV	α
Bovine Herpesvirus 2	Bovine Mammilitis Virus	α
Bovine Herpesvirus 4	Movar HV	γ
Bovine Herpesvirus 5	Bovine Encephalitis HV	α
Ovine Herpesvirus 1	Sheep Pulmonary Adenomatosis associated HV	
Ovine Herpesvirus 2	Sheep Associated Malignant Catarrhal Fever of Cattle	γ
Caprine Herpesvirus 1	Goat HV	α
<u>Canidae</u>		
Canid Herpesvirus 1	Canine HV	α

Tabella 1 (continua)

<u>Caviidae</u>		
Caviid Herpesvirus 1	Guinea Pig HV 1	β
Caviid Herpesvirus 2	Guinea Pig Cytomegalovirus	β
Caviid Herpesvirus 3	Guinea Pig HV 3	
<u>Elephantidae</u>		
Elephantid Herpesvirus	Elephant HV	
<u>Equidae</u>		
Equid Herpesvirus 1	Equine Abortion HV	α
Equid Herpesvirus 2	Equine Cytomegalovirus	α
Equid Herpesvirus 3	Equine Coital Exanthema Virus	α
Equid Herpesvirus 4	Equine Rhinopneumonosis Virus	α
Equid Herpesvirus 5	Equine HV 5	α
Equid Herpesvirus 6	Asinine HV 1	α
Equid Herpesvirus 7	Asinine HV 2	β
Equid Herpesvirus 8	Asinine HV 3	
<u>Felidae</u>		
Felid Herpesvirus 1	Feline HV 1; Feline Rinotracheitis HV	α
<u>Leporidae</u>		
Leporid Herpesvirus 1	Cottontail HV	γ
Leporid Herpesvirus 2	HV Cuniculi	
<u>Suidae</u>		
Suid Herpesvirus 1	Pseudorabies Virus	α
Suid Herpesvirus 2	Inclusion-Body Rhinitis Virus	β
<u>Virus degli uccelli</u>		
<u>Anatidae</u>		
Anatid Herpesvirus 1	Duck Plague HV	α
<u>Columbidae</u>		
Columbid Herpesvirus 1	Pigeon HV-1	

Tabella 1 (continua)

Gallidae

Gallid Herpesvirus 1	Infectious Laryngotracheitis Virus	α
Gallid Herpesvirus 2	Marek's Disease HV 1	α
Gallid Herpesvirus 3	Marek's Disease HV 2	α

Virus degli anfibi e dei rettili

Boidae

Boid Herpesvirus 1	Boa Herpesvirus
--------------------	-----------------

Iguanidae

Iguanid Herpesvirus	Green Iguana HV
---------------------	-----------------

Lacertidae

Lacertid Herpesvirus 1	Green Lizard HV
------------------------	-----------------

Ranidae

Ranid Herpesvirus 1	Lucke Frog HV
Ranid Herpesvirus 2	Frog HV 4

Virus dei pesci

Cyprinidae

Cyprinid Herpesvirus	Carp Pox HV
----------------------	-------------

Salmonidae

Salmonid Herpesvirus 1	HV Salmonis
Salmonid Herpesvirus 2	Oncorhynchus Masou HV

Il nome *Herpesvirus*, dal greco *erpein*, significa “nascondersi” e si riferisce alla capacità di tali virus di provocare infezioni che, dopo l'esaurimento della fase clinica conseguente all'infezione primaria, si mantengono allo stato *latente* in alcune cellule, riattivandosi occasionalmente, talora con manifestazioni cliniche conclamate e gravi, in seguito a stimoli diversi, generalmente in concomitanza ad una diminuzione della risposta immune cellulo-mediata.

La realizzazione dello stato di latenza è strategica per la sopravvivenza in natura degli Herpesvirus. Infatti, anche in presenza di una completa ed efficace risposta immunitaria, il genoma virale, sotto forma di episomi o

plasmidi extra-cromosomici, può persistere all'infinito nelle cellule dell'ospite e, attraverso periodiche riattivazioni, dovute a condizioni sfavorevoli di derivazione ambientale (stress fisico o emotivo, insorgenza di malattie acute-febbrili, immunodepressione), può essere immesso nell'ambiente esterno, dove può essersi accumulato un sufficiente numero di individui suscettibili all'infezione.

Gli Herpesvirus rilevanti nel campo della patologia infettiva degli animali risultano provvisti di una relativa plasticità biologica, poiché possono presentare localizzazioni differenti e, quindi, provocare sindromi a diversa fisionomia anatomico-clinica. Molto spesso le variazioni di comportamento della stessa infezione nascono da situazioni inerenti il periodo del ciclo produttivo dell'animale o il tipo di impiego dello stesso (riproduzione o ingrasso, giovane o adulto, inizio dell'attività riproduttiva o gravidanza in atto). inoltre, nonostante lo spettro d'ospite di CpHV-1 sia limitato, è stata descritta la possibilità della trasmissione dall'ospite naturale ad individui di specie diversa (Farina & Scatozza, 1998).

La famiglia Herpesviridae, cui appartiene CpHV-1 oggetto di studio di questa tesi, comprende tre sottofamiglie distinte sulla base di proprietà biologiche, strutturali e genomiche (Roizman, 1982):

- *Alphaherpesvirinae*, della quale fanno parte virus caratterizzati da spettro d'ospite piuttosto ampio; rapido ciclo replicativo; rapida disseminazione in colture cellulari con formazione di sincizi e corpi inclusi; notevole attività necrotizzante; ed infine capacità d'instaurare infezioni latenti nei gangli sensoriali. Questa sottofamiglia comprende, oltre al genere *Simplexvirus*, anche il genere *Varicellovirus* cui appartiene CpHV-1.
- *Betaherpesvirinae*, alla quale appartengono i generi *Cytomegalovirus*, *Muromegalovirus* e *Roseolovirus* che latentizzano negli endoteli, negli

epiteli e negli organi linfoidi. Sono caratterizzati da spettro d'ospite relativamente ristretto, lento ciclo replicativo e crescita *in vitro* solo su cellule fibroblastoidi, con comparsa di corpi inclusi e cellule dal volume aumentato (citomegalia).

- *Gammaherpesvirinae*, comprendente i generi *Lymphocryptovirus* e *Rhadinovirus* che hanno, salvo poche eccezioni, spettro d'ospite limitato alla famiglia o all'ordine di appartenenza dell'ospite naturale; replicano tutti in cellule linfoblastoidi; hanno tropismo specifico per i linfociti T e B e latentizzano nei tessuti linfoidi.

Gli Herpesvirus sono tra i più grandi e complessi virus animali finora conosciuti.

Il virione maturo ha una dimensione che varia dai 150 ai 200 nm. Nella particella virale, iniziando dalla regione più interna si riscontra, racchiuso dal nucleocapside, il genoma virale cui sono associate diverse nucleoproteine a formare il nucleoide. Il capsido proteico è costituito da capsomeri cavi che determinano una struttura icosaedrica del diametro di circa 100 nm. All'esterno del nucleocapside si trova uno strato di materiale proteico amorfo che prende il nome di tegumento. Infine, nella porzione più esterna, si trova l'involucro virale (envelope) costituito da lipidi, poliammine e da diverse glicoproteine quali, gH, gC, gE, gG, gI, gB e gD, che fungono da sito di adsorbimento del virus alle cellule (*Fig. 1*).

Gli Herpesvirus risultano relativamente labili a pH acido o alcalino, alle temperature di 33°-37°C e 50°-56°C e ai solventi organici.

La diffusione delle infezioni erpetiche si verifica prevalentemente per via diretta, attraverso i secreti, gli escreti e le cellule di desquamazione della cute e delle mucose; è possibile anche la trasmissione per via diaplacentare, al momento del parto, attraverso il latte o per emotrasfusione.

Il genoma degli Herpesvirus è costituito da DNA lineare a doppio filamento di circa 150 Kbp, in grado di codificare per proteine necessarie alla replicazione virale e influenzanti la virulenza del ceppo. La replicazione del DNA avviene nel nucleo, dove il genoma circolarizza (Garber *et al.*, 1993; McVoy & Adler, 1994) e si verifica la formazione di concatenameri (Roizman & Knipe, 2001), tagliati in siti specifici a formare molecole omogenee (Deiss & Frenkel, 1986). La presenza di sequenze invertite e ripetute nel genoma di questi virus ha consentito la classificazione in sei classi, definite con le lettere dell'alfabeto che vanno da A a F (Fig. 2). In particolare, alla classe D appartengono oltre al Caprine Herpesvirus 1, anche Varicella-Zoster Virus, Bovine Herpesvirus 1 ed Equine Herpesvirus 1. Il genoma della classe D è costituito da sequenze unite covalentemente, chiamate L (long) e S (short), ciascuna delle quali è costituita da sequenze uniche (U_L e U_S , rispettivamente). Quest'ultima risulta fiancheggiata da ripetizioni invertite definite IR (internal repeat) e TR (terminal repeat). Le due componenti U_L e U_S possono cambiare orientamento e formare quattro popolazioni di molecole di DNA che differiscono unicamente nell'ordine di queste sequenze (isomeri).

Per quanto riguarda il ciclo replicativo, è stato studiato approfonditamente il meccanismo d'azione dell'Herpes Simplex Virus (HSV) nell'ambito della sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* (White & Fenner, 1994) (Fig. 3).

L'infezione ha inizio con l'adsorbimento del virus alla cellula ospite mediante il riconoscimento di eparan solfato, presente nei proteoglicani, da parte della glicoproteina virale C (gC). Segue il legame di gD a molecole superficiali appartenenti alla famiglia dei recettori HVEM/TNF/NGF, cui fa seguito la fusione dell'envelope alla membrana plasmatica. Le proteine del tegumento si liberano nel citoplasma, mentre il nucleocapside viene trasportato, lungo il citoscheletro, fino ai pori nucleari, attraverso i quali il

DNA viene rilasciato per raggiungere il nucleo dove circolizza. L'espressione dei geni virali è finemente regolata da un meccanismo a cascata che vede la presenza di tre classi di mRNA, α , β , e γ , sintetizzate dall' RNA polimerasi II cellulare. Due proteine del tegumento, rispettivamente VHS (Virion Host Shutoff) e α -TIF (α -gene Trans Inducer Factor), svolgono un ruolo importante nelle prime fasi della replicazione virale. Infatti, mentre la prima determina nel citoplasma la disgregazione dei poliribosomi con conseguente blocco della sintesi proteica cellulare, α -TIF transattiva la trascrizione dei geni Immediate Early (IE) in α -mRNA. Dopo la traduzione, cinque delle sei proteine α sono ricondotte nel nucleo per regolare l'espressione dei geni virali Early (E) o β . Mentre la sesta proteina α blocca la presentazione dei peptidi antigenici sulla superficie cellulare in modo da permettere l'evasione dalla risposta immune. Le proteine β sono enzimi necessari non solo ad incrementare la sintesi dei nucleotidi (timidina chinasi e ribonucleotide reductasi), ma anche alla replicazione del genoma virale (DNA polimerasi, primasi-elicasi, topoisomerasi). Entrambi questi eventi stimolano l'espressione dei geni Late (L) o γ e quindi la sintesi delle proteine L, componenti strutturali del virione. Alcune si assemblano a formare il capsido e il tegumento, mentre altre si incorporano nella zona di membrana nucleare da cui il capsido acquisirà l'envelope. I virioni maturi vengono liberati per esocitosi.

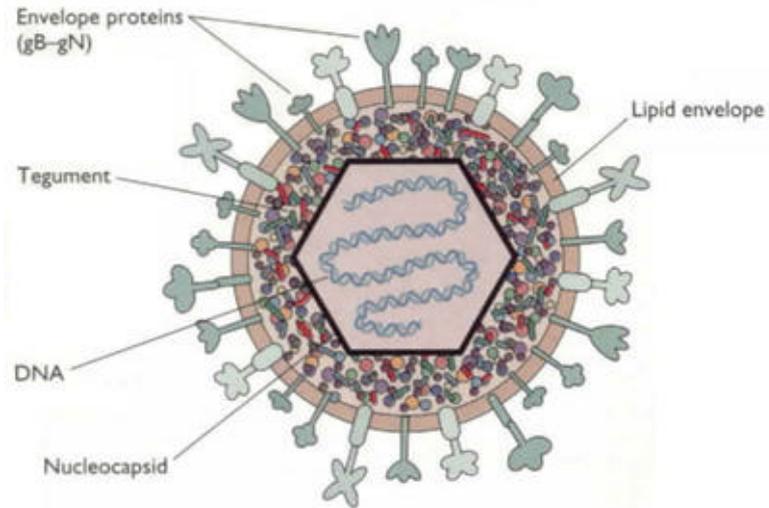


Fig. 1: Rappresentazione schematica del virione erpetico
 (www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/Animal Viruses.html)

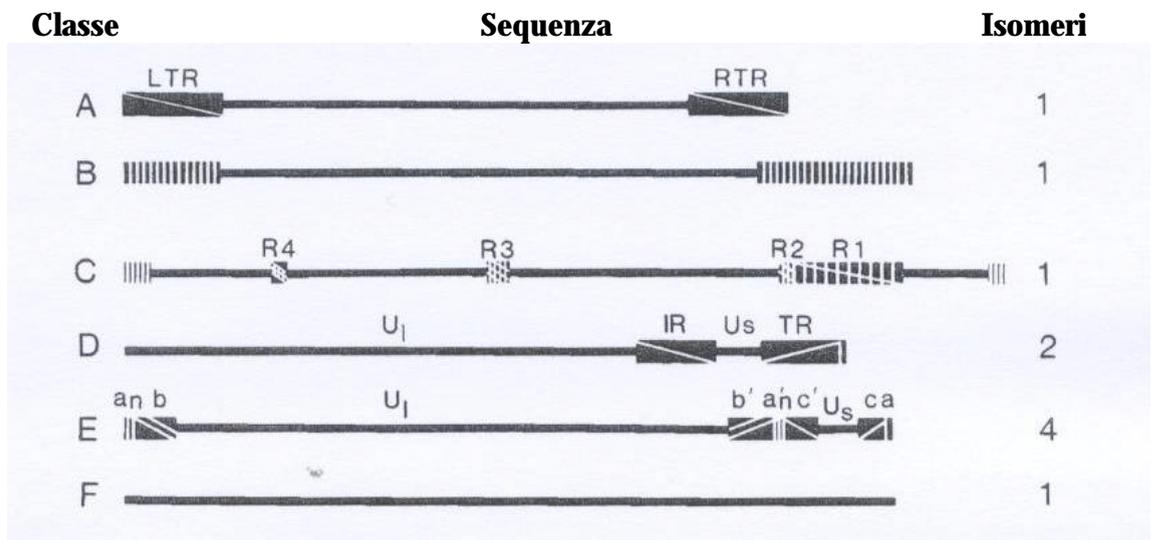


Fig. 2: Diagramma schematico delle classi dei genomi degli Herpesvirus
 (Fields et al., 1996)

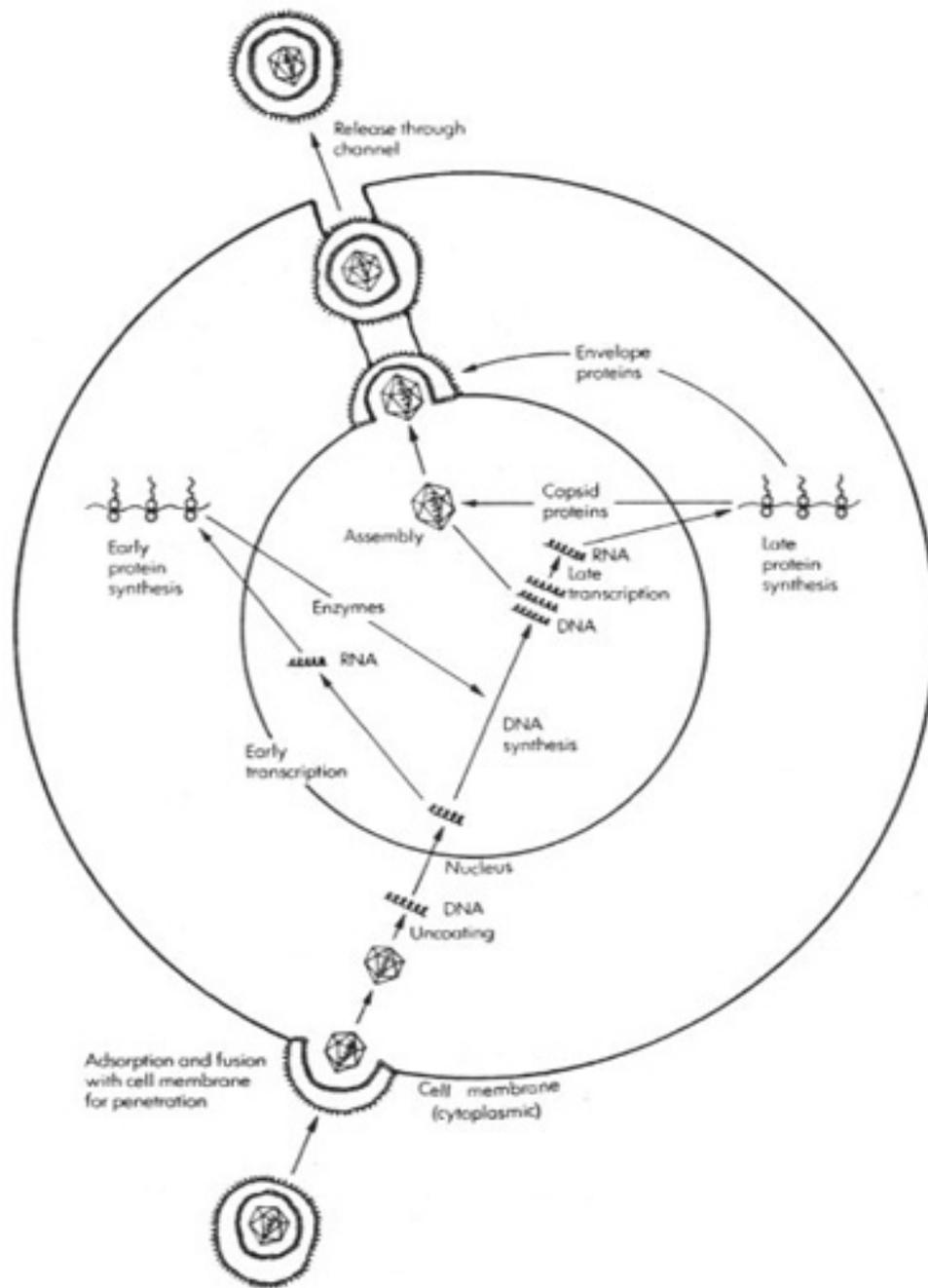


Fig. 3: Rappresentazione schematica del ciclo replicativo degli Herpesvirus
 (www.bact.wisc.edu/themicrobialworld/herpes.html)

Caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1)

Tra gli *Alphaherpesvirus* che infettano i ruminanti, il prototipo è rappresentato da Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1), responsabile nei bovini di due sindromi principali, rinotracheite infettiva/vulvovaginite pustolosa (IBR/IPV), e di una varietà di segni clinici diversi, quali congiuntivite, encefalite, aborto e shipping fever, una complicata infezione delle vie respiratorie superiori (Tikoo *et al.*, 1995; Jones, 2003). Nel corso degli anni sono stati isolati e caratterizzati numerosi Alphaherpesvirus correlati a BoHV-1, tra i quali Caprine Herpesvirus 1 (CpHV-1).

CpHV-1 è stato 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). Nonostante la distribuzione dell'infezione non sia stata studiata sistematicamente nelle capre, CpHV-1 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 Australia (Grewal *et al.*, 1986; Piper *et al.*, 2008), Canada (Chenier *et al.*, 2004), California (Uzal *et al.*, 2004), 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, è elevata (Tempesta *et al.*, 1994; Koptopoulos *et al.*, 1988; Guercio *et al.*, 1998). Mentre, finora, non sono stati riportati dati relativi all'identificazione dell'infezione in Belgio e in Gran Bretagna.

La patogenesi dell'infezione da CpHV-1 nelle capre e da BoHV-1 nei bovini è molto simile. Infatti, in entrambi i casi, all'infezione localizzata

dell'apparato respiratorio o genitale segue la viremia associata alle cellule mononucleate, che determina infezione sistemica e aborto. La fonte principale d'infezione è rappresentata da animali con infezione acuta o latente che possono eliminare il virus attraverso lo scolo nasale, oculare e genitale. Quest'ultima via rappresenta il sito d'ingresso del virus ed è responsabile della persistenza dell'infezione nell'allevamento (Tempesta *et al.*, 2000).

CpHV-1 è responsabile di due diverse forme di malattia nella capra, a seconda dell'età dei soggetti colpiti. Negli adulti l'infezione può rimanere inapparente oppure manifestarsi con sintomi a carico degli apparati genitale e respiratorio, come vulvovaginite/balanopostite ulcerative, dispnea, lesioni proliferative su labbra/palato duro (Horner *et al.*, 1982; Rosadio *et al.*, 1984; Williams *et al.*, 1997; Tempesta *et al.*, 1998). Durante la seconda metà della gravidanza, si può manifestare anche aborto, riproducibile mediante infezione sperimentale, attraverso l'inoculazione intranasale ed endovenosa del virus (Tempesta *et al.*, 2004; Uzal *et al.*, 2004). Nei capretti di due settimane di vita, invece, CpHV-1 induce malattia sistemica caratterizzata da elevate morbilità e mortalità, rapido esordio e progressivo dimagrimento che spesso porta alla morte (Saito *et al.*, 1974; Mettler *et al.*, 1979; Van der Lugt & Randles, 1993; Buonavoglia *et al.*, 1996).

Dal punto di vista anatomo-patologico, CpHV-1 provoca lesioni erosive, ulcerative e necrotiche a carico della mucosa gastro-intestinale, specialmente nel grosso intestino, inoltre è responsabile di edema polmonare, lesioni emorragiche a carico della mucosa vescicale, foci necrotici a livello epatico. All'esame isto-patologico, è evidente una diffusa perdita di cellule epiteliali a livello della mucosa intestinale, mentre la lamina propria risulta infiltrata da cellule mononucleate, soprattutto macrofagi

contenenti inclusioni intranucleari eosinofile; è presente anche necrosi dei tessuti linfoidei (Roperto *et al.*, 2000).

Al pari degli altri *Alphaherpesvirus*, CpHV-1 è capace di interferire con le risposte immunitarie dell'ospite (Hutchings *et al.*, 1990; ^aTempesta *et al.*, 1999; Hinkley *et al.*, 2000; Barcy & Corey, 2001; Pagnini *et al.*, 2005), e di instaurare infezioni latenti suscettibili di riattivazione (Engels *et al.*, 1983). Infatti, in seguito all'infezione e alla replicazione virale, sulle mucose degli apparati genitale e respiratorio, CpHV-1 diffonde sia negli spazi extracellulari che da cellula a cellula. Attraverso questi meccanismi, riesce a penetrare negli assoni delle cellule nervose e, quindi, a raggiungere i corpi dei neuroni sensoriali, a livello dei gangli regionali.

Generalmente, 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), nonostante possa essere ottenuta, provocando immunosoppressione, mediante la somministrazione di dosi elevate di desametasone (4,4 mg/kg per 6 giorni consecutivi) (Buonavoglia *et al.*, 1996). Dopo quest'evento, il comportamento patogenetico del virus è analogo a quello dell'infezione primaria: gli animali infettati per via nasale eliminano il virus per entrambe le vie (nasale e vaginale), mentre quelli infettati per via vaginale eliminano il virus solo per questa via (Tempesta *et al.*, 2000). L'escrezione virale, dopo la riattivazione, è associata a titoli anticorpali relativamente bassi (Tempesta *et al.*, 1998) e si verifica a livello dei secreti nasale, genitale, rettale e oculare, facendo supporre la presenza di diversi potenziali siti di latenza, come ad esempio i gangli sacrali, dove la presenza del DNA virale è stata rivelata mediante PCR (^{a, b}Tempesta *et al.*, 1999, 2002).

La diagnosi di sospetto d'infezione può essere impostata sulla base dei segni clinici, non patognomonicamente ma abbastanza caratteristici, soprattutto per

quanto riguarda il diverso comportamento del virus nell'animale giovane rispetto all'adulto. La conferma diagnostica si ottiene sia per via diretta che indiretta. Nel primo caso, si considera l'isolamento virale a partire dall'essudato oculo-nasale, vaginale e prepuziale. L'effetto citopatico indotto dal virus su cellule permissive derivate da specie diverse è caratterizzato da arrotondamento e aumentata rifrangenza delle cellule, formazione 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), anche se non bisogna sottovalutare le reazioni crociate dovute agli *Alphaherpesvirus* correlati (Nixon *et al.*, 1988; Lyaku *et al.*, 1992; Lyaku *et al.*, 1996). A tal proposito, è possibile ricorrere alla biologia molecolare che permette l'amplificazione, in campioni positivi, di un frammento di 414 bp (Tempesta *et al.*, 1998), e alla PCR real-time, analisi quantitativa per la rilevazione e la quantificazione del DNA virale nella capra (Elia *et al.*, 2008). Infine, un'altra tecnica che consente l'identificazione dei virus isolati e la discriminazione dai microrganismi correlati è la Restriction Endonuclease Analysis (REA) (Rimstad *et al.*, 1992; Williams *et al.*, 1997; Pratelli *et al.*, 2000), che però non risulta conveniente per diagnosi di routine essendo notevolmente costosa e laboriosa.

Allo stato attuale delle conoscenze, la profilassi è esclusivamente sanitaria. Non esistono presidi immunizzanti, sebbene diversi lavori sperimentali dimostrino la possibilità di proteggere le capre con vaccini, sia inattivati (Tempesta *et al.*, 2001) che vivi attenuati eterologhi (Thiry *et al.*, 2006).

Apoptosi o Programmed Cell Death (PCD)

Generalità

La morte cellulare è un processo che può essere scatenato da molteplici stimoli differenti: le più importanti vie metaboliche attraverso cui si manifesta sono la necrosi e l'apoptosi (Krysko *et al.*, 2008).

La necrosi è un processo passivo, patologico, scatenato in risposta ad un danno acuto quale ipossia, ipotermia, radiazioni, infezioni virali, risposta immunitaria, agenti chimici e farmaci (Dive *et al.*, 1992). Questi eventi portano ad una perdita dell'integrità delle membrane degli organelli, incluso il nucleo, con conseguente rilascio del loro contenuto (ATP, proteasi e lisozimi), fino alla rottura dell'intera cellula e alla degradazione del DNA in modo aspecifico. Tale fenomeno, che la cellula subisce passivamente, innesca una risposta infiammatoria con rilascio di citochine da parte dei macrofagi.

Il termine apoptosi, dal greco *apoptosis* che significa letteralmente caduta delle foglie dagli alberi, viene utilizzato per descrivere la morte cellulare programmata, un meccanismo cellulare geneticamente controllato e altamente conservato nel corso dell'evoluzione (Metzstein *et al.*, 1998). Descritto in tutti gli eucarioti multicellulari (Ellis *et al.*, 1991), l'apoptosi è un evento fisiologico che si verifica durante le prime fasi dello 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).

L'apoptosi è dunque un processo regolato, al quale la cellula partecipa attivamente, con una serie di eventi morfologicamente e biochimicamente ripetibili e ben definiti. I cambiamenti cellulari iniziano con un arrotondamento della cellula, cui conseguono la perdita dei 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. Nel contempo, la perdita di acqua e di ioni determina una riduzione del volume cellulare con conseguente condensazione citoplasmatica (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 all'attacco enzimatico di nucleasi, che provocano la rottura dell'acido nucleico in frammenti ad alto peso molecolare. Al termine della condensazione cromatinica, il nucleo si presenta distrutto in frammenti che racchiudono anche organuli cellulari (mitocondri e porzioni del reticolo endoplasmico), circondati da membrana nucleare ed inglobati in protuberanze, che si formano alla superficie della cellula (*blebs*). La membrana plasmatica che delimita tali protuberanze si salda, dando origine ai "corpi apoptotici", rapidamente fagocitati e digeriti dai macrofagi (*Fig. 4*).

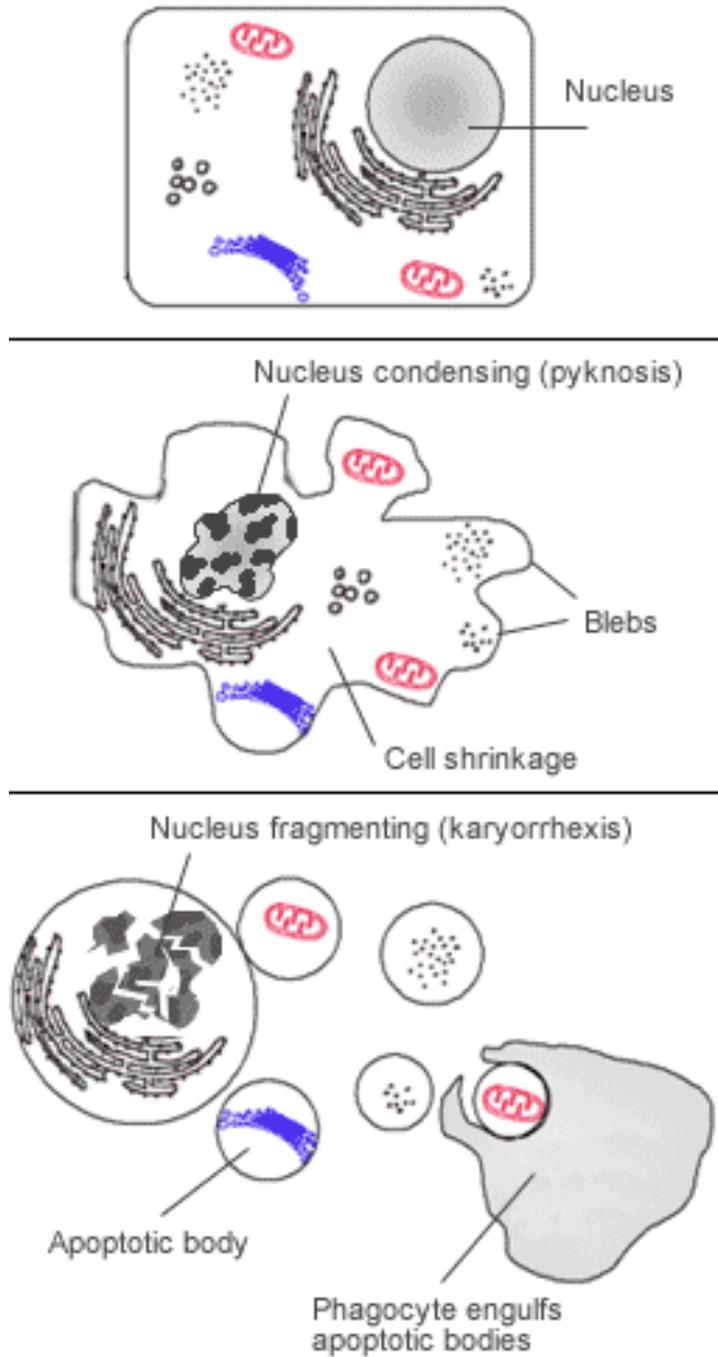


Fig. 4: Eventi cellulari dell'apoptosi
 (<http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Apoptosis.png>)

Il processo apoptotico può essere suddiviso schematicamente in tre fasi:

1. *Induzione*: comprende l'invio di segnali che porteranno la cellula all'apoptosi e le vie primarie di trasduzione da essi innescate. I segnali pro-apoptotici si distinguono in intrinseci ed estrinseci, a seconda se provengono dall'ambiente esterno o all'interno della cellula. I primi interagiscono con recettori transmembrana appartenenti alla superfamiglia dei recettori Tumor Necrosis Factor (TNF) (Locksley *et al.*, 2001); i secondi, invece, determinano delle modificazioni a carico del mitocondrio, come la diminuzione del potenziale di membrana ed un'eccessiva produzione di specie radicaliche, con conseguente apertura di pori nella membrana mitocondriale (*megachannel o mitochondrial pores*) e liberazione nel citoplasma di fattori normalmente sequestrati nello spazio intermembrana come il citocromo C (cytC) o l'AIF (*Apoptosis Inducing Factor*) (Saelens *et al.*, 2004)
2. *Esecuzione*: durante questa fase entrambe le vie, estrinseca ed intrinseca, convergono nell'attivazione di una classe di proteasi dette *caspi* (**c**ystein dependent **a**spartate specific prote**a**se), caratterizzate dalla presenza di un residuo di cisteina nel proprio sito catalitico e dalla specificità per substrati contenenti un residuo di aspartato. Le proteasi coinvolte nel suicidio cellulare si distinguono in caspi iniziatrici (caspi-2, -8, -9, -10), effettrici (caspi-3, -6, -7), ed infiammatorie (caspi-1, -4, -5) (Elmore, 2007). In particolare, le prime rispondono allo stimolo nocivo e sono responsabili dell'attivazione delle caspi effettrici, che garantiscono la continuità del processo nei suoi eventi catalitici principali.

Nella via intrinseca, in presenza di deoxy-Adenosil-Tri-Phosphate (dATP), il cytC libero definisce un cambio conformazionale di una proteina scaffold, Apoptotic-proteaseactivating-factor-1 (Apaf-1), che si lega alla caspasi-9 attraverso i domini di reclutamento caspatico, Caspase Recruitment Domain, (CARD). Si forma quindi l'apoptosoma, un complesso eptamerico al cui centro vengono accolti sette monomeri di caspasi-9 che si attiva grazie a modificazioni allosteriche e dimerizzazioni (Chang *et al.*, 2003) (*Fig 5*).

Nella via estrinseca, caspasi-8 è attivata in risposta al legame di una proteina extracellulare, come FasL, al recettore Fas/CD95/Apo-1. La coda citoplasmatica di quest'ultimo si associa al dominio DD (Death Domain) dell'adattatore molecolare FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), che recluta le procaspasi-8 e -10, tramite interazione con i domini DED (Death Effector Domain), presenti sull'N-terminale. Dall'assemblaggio di queste proteine nasce un complesso chiamato Death-Inducing Signaling Complex (DISC) al cui interno, le molecole di proenzima sono in grado di dimerizzare e autoattivarsi, grazie all'intrinseca parziale attività proteasica (Boatright & Salvesen, 2003) (*Fig 6*).

Le caspasi iniziatrici agiscono sulle effettrici attivandole (Murphy *et al.*, 2003) e queste ultime, a loro volta, agiscono su substrati specifici eterogenei, che si distinguono per attività, funzione e localizzazione subcellulare, tra cui citocheratine, PARP, proteine citoscheletriche e la proteina nucleare NuMA, responsabili dei cambiamenti biochimici e morfologici osservati nelle cellule apoptotiche (Elmore, 2007): ciò dimostra come la funzione di queste proteasi coinvolga l'intero apparato cellulare e ne determini le sorti (*Tabella 2*).

Tabella 2: *Proteine bersaglio delle caspasi effettrici*
(Fisher et al., 2003)

Proteina	Funzione	Effetto del taglio	Referenze
<u>Proteine strutturali</u>			
α Fodrina	Componente del citoscheletro corticale	Blebbing della membrana plasmatica	Martin & al., 1996
Gas 2	Componente del citoscheletro	Ricordinamento del citoscheletro	Brancolini C. & al., 1995
Lamina A/B	Componente della lamina nucleare	Disassemblaggio della lamina nucleare	Lazebnik & al., 1995
β catenina	Componente delle giunzioni cellulari	Disassemblaggio delle giunzioni cellulari	Brancolini & al., 1997
<u>Proteine coinvolte nella trasduzione del segnale</u>			
MEKK-1	Proteina chinasi	Costitutivamente attiva, proapoptotica	Cardone M. H. & al., 1997
PKC δ	Proteina chinasi	Chinasi costitutivamente attiva, proapoptotica	Emoto Y. & al., 1995
Rb	Regolatore del ciclo cellulare	Promuove l'apoptosi	Janicke & al., 1996
NF- κ B	Fattore di trascrizione	Il taglio genera un frammento proapoptotico	Ravi & al., 1998
<u>Metabolismo del DNA/RNA</u>			
DNA-PK	Enzima di riparo del DNA	Cala l'attività	Casciola R. L. & al., 1996
PARP	Enzima di riparo del DNA	Cala la sintesi di poly (ADP-ribose)	Kaufmann & al., 1993
<u>Proteine coinvolte nell'apoptosi</u>			
Bcl-2	Inibitore dell'apoptosi	Si genera un frammento proapoptotico	Cheng & al., 1997
Bcl-xL	Inibitore dell'apoptosi	Si genera un frammento proapoptotico	Bellows & al., 2000
Bid	Attivatore dell'apoptosi	Si genera un frammento proapoptotico miristolato	Li & al., 1998
Bax	Attivatore dell'apoptosi	Sconosciuto	Yanase & al., 2000
ICAD	Inibitore della Dnasi CAD	Il taglio libera la CAD attiva	Enari & al., 1998
<u>Proteine coinvolte nelle patologie neurodegenerative</u>			
Huntingtina	Proteina coinvolta nel morbo di Huntington	Forma degli aggregati	Wellington & al., 2000

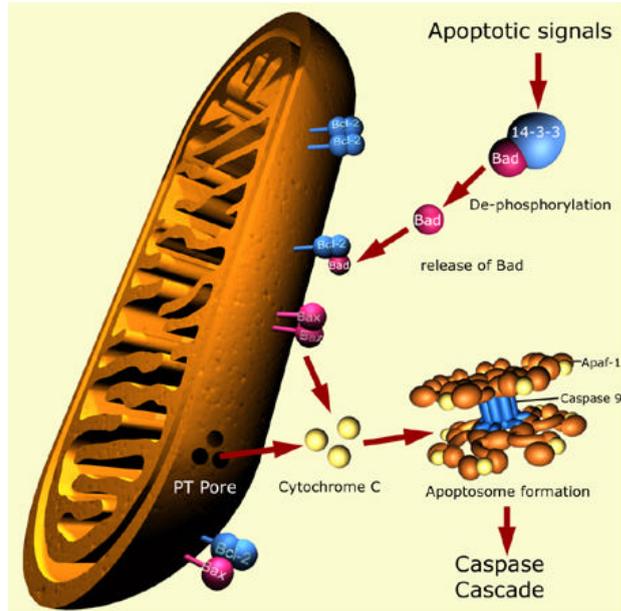


Fig 5. Apoptosi: via intrinseca
 (www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash)

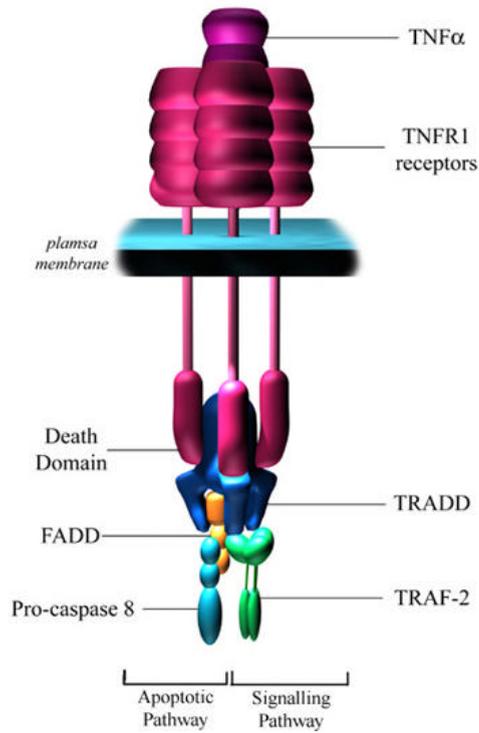


Fig 6. Apoptosi: via estrinseca
 (www.sgul.ac.uk/dept/immunology/~dash)

3. *Fagocitosi*: la membrana plasmatica dei corpi apoptotici in superficie espone molecole quali la fosfatidil-serina, normalmente localizzata nello strato citosolico (Bratton *et al.*, 1997), o la calreticulina (Gardai *et al.*, 2005), che vengono riconosciute da recettori specifici presenti sui macrofagi, segnando l'inizio della fagocitosi.

Regolazione della morte cellulare programmata

Prima che le caspasi effettrici entrino in azione, rendendo irreversibile il cammino verso la morte cellulare, deve essere completata la fase di induzione, durante la quale vengono valutati i segnali che giungono alla cellula. Infatti, la cellula riceve segnali di morte per via recettoriale, oppure innesca un processo endogeno (causato, ad esempio, da stress genotossici) che attiva la via mitocondriale, ma al contempo, può ricevere segnali di sopravvivenza, veicolati da fattori di crescita, citochine o integrine e molecole di adesione. I principali protagonisti di questa modulazione sono proteine appartenenti, rispettivamente, alla famiglia Bcl-2 e p53.

- ✓ **Famiglia Bcl 2:** Fino ad oggi sono stati identificati 22 membri della famiglia Bcl-2 (*B-cell lymphoma gene 2*), classificati sulla base di sequenze-elica conservate, conosciute come domini di omologia Bcl-2 (BH, *Bcl-2 Homology domains*) (Scorrano & Korsmeyer, 2003) (*Fig. 7*). Per semplicità, sono stati suddivisi in due gruppi, in base ai tipi di domini che contengono. Il primo gruppo comprende gli elementi inibenti l'apoptosi, come Bcl-2 e Bcl-X_L, e contiene quattro domini BH (da BH1 a BH4). Il secondo, che raccoglie gli elementi apoptotici, è diviso a sua volta in due classi, proteine con tre domini BH (come Bax e Bak) e proteine con un solo dominio BH3 (Bad, Bid, Bim, Bik, Bmf) (Martin & Vuori, 2004). Queste ultime operano

bloccando l'azione delle proteine anti-apoptotiche (Bcl-2, Bcl-X_L) o attivando le proteine pro-apoptotiche Bax e Bak (Ward *et al.*, 2004). Le proteine di questa famiglia hanno una localizzazione dipendente dal ruolo svolto. Gli elementi anti-apoptotici Bcl-2 e Bcl-X_L sono situati soprattutto sulle membrane degli organelli (reticolo endoplasmatico, nucleo e membrana esterna del mitocondrio). Bax, invece, è situata principalmente nel citoplasma, ancorata alle strutture citoscheletriche (Desagher & Martinou, 2000). Gli stimoli apoptotici, scoprendo il residuo C-terminale idrofobico, determinano la dimerizzazione di Bax che può, quindi, intercalarsi tra i lipidi della membrana mitocondriale esterna (*Fig. 8*). Ne consegue la caduta del potenziale mitocondriale ($\Delta\psi_m$) e la fuoriuscita non solo di molecole come Smac/Diablo, che inattivano gli inibitori delle caspasi, ma anche di ioni calcio, radicali liberi e glutatione, responsabili dell'amplificazione del segnale. D'altra parte anche Bax e Bak possono agire sul reticolo endoplasmatico controllando l'omeostasi del calcio (Scorrano & Korsmeyer, 2003).

Bisogna ricordare, infine, che il mitocondrio è interessato dai fenomeni di apoptosi anche quando il segnale parte dai recettori di membrana, in quanto la caspasi iniziatrice 8 determina il clivaggio di Bid, un modulatore pro-apoptotico, che si localizza appunto su questo organello (*Fig. 8*). Questo rappresenta un esempio di "cross-talk" tra i pathways recettoriale e mitocondriale (Elmore, 2007).

- ✓ **p53:** il gene codificante per la proteina p53 è un oncosoppressore, il cui ruolo principale consiste nel prevenire una proliferazione inappropriata delle cellule in risposta al danno subito dal DNA. Una volta attivata, p53 può indurre, a seconda delle circostanze, l'arresto del ciclo cellulare in G1 o l'apoptosi. L'induzione della morte

cellulare programmata avviene in maniera dipendente o meno dall'attività trascrizionale (Moll & Zaika, 2001) (*Fig. 9*). Nel primo caso, p53 attiva la trascrizione dei recettori di morte (DR5, CD95, Fas), di proteine proapoptotiche della famiglia Bcl-2 (Bax, PUMA, NOXA, Bid), nonché di adattatori apoptotici come Apaf-1. Inoltre, p53 reprime la trascrizione di proteine anti-apoptotiche quali Bcl-2 e Bcl-X_L (Sionov & Haupt, 1999).

Nel caso in cui l'induzione sia indipendente dalla trascrizione, p53 si comporterebbe come un sensibilizzatore dell'apoptosi, al pari di Bad e Bik, legandosi direttamente a Bcl-2 e Bcl-X_L e, quindi, attivando solo indirettamente Bak e Bax (Mihara *et al.*, 2003).

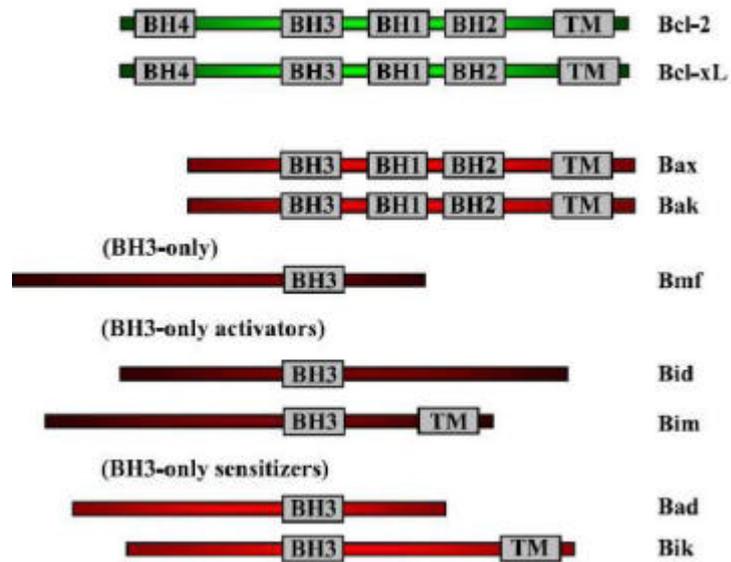


Fig 7: Struttura dei domini dei membri della famiglia Bcl-2. TM:dominio transmembrana (Martin & Vuori, 2004).

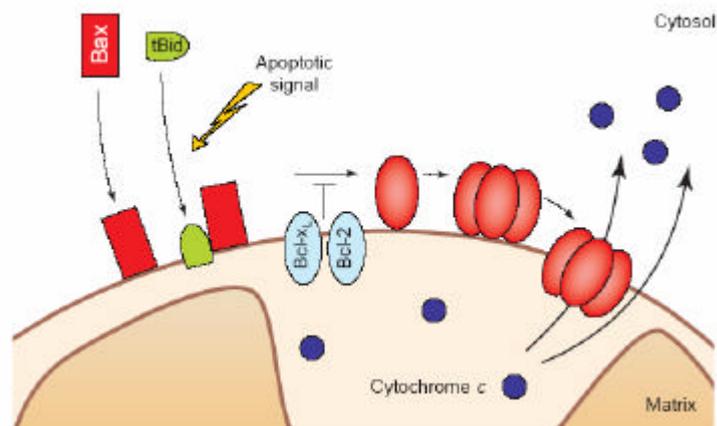


Fig 8: Meccanismo d'azione delle proteine pro-apoptiche appartenenti alla famiglia Bcl-2 (Desagher & Martinou, 2000)

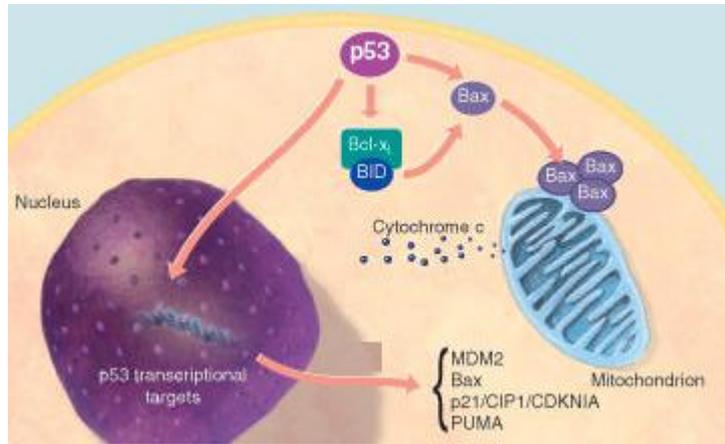


Fig. 9: Induzione dell'apoptosi da parte di p53
 (www.rndsystems.com/cb_detail_objectname_SP04_p53.aspx)

Infezioni virali ed apoptosi

L'apoptosi, oltre al suo ruolo essenziale nel differenziamento e nell'omeostasi degli organismi multicellulari, svolge una funzione importante nella risposta cellulare a differenti insulti, tra cui le infezioni virali.

L'apoptosi virus-indotta, associata ad una significativa diminuzione della produzione di progenie virale, è stata descritta per la prima volta in cellule infette con un adenovirus mutante (Pidler *et al.*, 1984). Successivamente, studi condotti su virus infettanti gli insetti hanno accreditato la teoria secondo cui, nelle cellule eucariotiche, la morte cellulare programmata è un meccanismo di difesa innato contro le infezioni in quanto, attraverso la lisi prematura delle cellule, l'ospite mette un freno alla replicazione virale (Clem *et al.*, 1991; Koyama *et al.*, 1998). Con il passare degli anni, sono state scoperte importanti interazioni tra alcuni virus animali e morte cellulare programmata. Anche in questo caso, l'induzione dell'apoptosi da parte del virus rappresenta una risposta di difesa dell'ospite all'infezione, poiché consente alle cellule infettate, ridotte a corpi apoptotici, di essere fagocitate dai macrofagi, limitando in questo modo la reazione infiammatoria e permettendo l'inizio delle risposte immunitarie specifiche (Vaux *et al.*, 1994; Razvi *et al.*, 1995) (*Fig. 10*).

Tuttavia, la relazione tra virus e cellula ospite rappresenta un classico conflitto di interesse, in cui la cellula cerca di minimizzare i danni dell'infezione, mentre il virus cerca di ottenere il massimo beneficio dall'apparato replicativo della cellula (Krakauer & Payne, 1997). I virus, infatti, sono capaci di influenzare il processo apoptotico. In alcuni casi interagiscono direttamente con le strutture che innescano la traduzione del segnale fino alla morte cellulare programmata (es. recettore TNF), in altri

casi possiedono geni o proteine che mimano l'azione delle molecole cellulari che regolano l'apoptosi (*Tabella 3 e 4*)

Tabella 3: Virus che producono proteine pro-apoptotiche (Hay & Kannourakis, 2002)

Virus	Proteina o Gene pro-apoptotico	Meccanismo d'azione	Bibliografia
<u>Adenoviridae</u> Adenovirus	E1A	Si associa con le proteine della famiglia pRb/p300 e induce apoptosi p53-dipendente	Heise <i>et al.</i> (2000); Lowe & Ruley (1993)
	E4orf4	Coopera con E1A per promuovere apoptosi in assenza di p53; Interagisce con PP2A	Marcellus <i>et al.</i> (1996b) Shtrichman & Kleinberger (1998); Shtrichman <i>et al.</i> (1999)
		Utilizza il pathway caspase/FADD	Livne <i>et al.</i> (2001)
<u>Circoviridae</u> Chicken anaemia virus	Apoptin (VP3)	Non richiede l'attivazione delle caspasi a valle Capace di inibire Bcl-2 e p35	Jeurissen <i>et al.</i> (1992) Danen-van Oorschot <i>et al.</i> (2000)
Pestivirus	Erns	Inibizione della sintesi proteica (glicoproteina con funzione di RNasi)	Bruschke <i>et al.</i> (1997); Meyers <i>et al.</i> (1999); Schneider <i>et al.</i> (1993)
<u>Retroviridae</u> HIV	Tat	Aumento dell'attivazione delle chinasi ciclina-dipendenti Diminuzione dell'espressione della superossido-dismutasi manganese dipendente	Li <i>et al.</i> (1995) Westendorp <i>et al.</i> (1995)

Tabella 3 (continua)

		Up-regulation di caspasi-8	Bartz & Emerman (1999)
		Aumento di Fas (CD95) attraverso un processo che coinvolge NF κ B	Li-Weber <i>et al.</i> (2000)
	gp120/gp41	Formazione di sincizi e crosslinking con CD4	Laurent-Crawford <i>et al.</i> (1993, 1995); Maldarelli <i>et al.</i> (1995); Sylwester <i>et al.</i> (1997)
	Vpr	Pathway caspasi 8-mediato e modulato dalla famiglia Bcl-2	Chang <i>et al.</i> (2000); Conti <i>et al.</i> (2000); Patel <i>et al.</i> (2000); Stewart <i>et al.</i> (1997)
	Nef	Aumento dell'espressione di TNF sulla superficie cellulare	Lama & Ware (2000)
<u>Togaviridae</u>			
Semliki Forest virus	sconosciuta	Induce apoptosi p53-indipendente	Allsopp <i>et al.</i> (1998); Murphy <i>et al.</i> (2000)
Rubella virus	Capside	Fattore localizzato nel Reticolo Endoplasmatico	Duncan <i>et al.</i> (2000); Law <i>et al.</i> (2001); Pugachev & Frey (1998)

Tabella 4: Virus che producono proteine anti-apoptotiche
(Hay & Kannourakis, 2002)

Virus	Proteina o Gene anti-apoptotico	Meccanismo d'azione	Bibliografia
<u>Adenoviridae</u> Adenovirus	E1B-19K	Inibisce l'apoptosi indotta da E1A, Fas, TNF	Farrow <i>et al.</i> (1995); Marcellus <i>et al.</i> (1996a); Perez & White (2000)
		Si lega alla lamina nucleare	Rao <i>et al.</i> (1997)
		Famiglia Bcl-2	Debbas & White (1993)
	E1B-55K	Si lega a p53, inattivandola	Teodoro & Branton (1997b); White <i>et al.</i> (1992); Yew <i>et al.</i> (1994)
	E3-6.7	Si complessa con 10.4 e 14.5, determinando la downmodulation dei recettori 1 e 2 per TRAIL	Benedict <i>et al.</i> (2001)
	E3-10.4	Inibisce l'apoptosi indotta da E1A o TNF	Gooding <i>et al.</i> (1988, 1991)
		Inibisce il rilascio di acido arachidonico indotto da TNF	Krajcsi <i>et al.</i> (1996)
	E3-14.5	Diminuisce la presentazione di Fas sulla superficie cellulare	Shisler <i>et al.</i> (1997)
		Inibisce l'apoptosi indotta da E1A o TNF	Gooding <i>et al.</i> (1991)
	E3-14.7K	Inibisce il rilascio di acido arachidonico indotto da TNF	Krajcsi <i>et al.</i> (1996)
Diminuisce la presentazione di Fas sulla superficie cellulare		Shisler <i>et al.</i> (1997)	
	Inibisce l'apoptosi indotta da E1A o TNF	Gooding <i>et al.</i> (1988)	

Tabella 4 (continua)

<u>Baculoviridae</u> Baculovirus	P35	Inibisce le caspasi-1, -3, -6, -8 e -10	Bertin <i>et al.</i> (1996); Clem <i>et al.</i> (1991); Viswanath <i>et al.</i> (2000) ; Zhou <i>et al.</i> (1998)
	IAP	Inibisce lo stress ossidativo Inibisce le caspasi-3, -6 e -7	Sah <i>et al.</i> (1999) Crook <i>et al.</i> (1993); Deveraux <i>et al.</i> (1997)
<u>Herpesviridae</u> Bovine Herpesvirus-4	BORFE2	Inibisce l'apoptosi indotta da Fas e TNF. Contiene i domini effettori di morte che interagiscono con caspasi-8	Wang <i>et al.</i> (1997)
EBV	BHRF1	Proteina Bcl-2-related	Henderson <i>et al.</i> (1993); Tarodi <i>et al.</i> (1994); Young <i>et al.</i> (1999)
	LMP-1	Interagisce con TRAFs e TRADD e up-regola NF κ B	Devergne <i>et al.</i> (1996); Kawanishi (1997); Mosialos <i>et al.</i> (1995)
		Induce l'espressione di Bcl-2 e A20	Henderson <i>et al.</i> (1991); Laherty <i>et al.</i> (1992); Young <i>et al.</i> (1999)
		Up-regola la produzione di interleuchina-10	Vockerodt <i>et al.</i> (2001)
Equine Herpesvirus	BALF1	Proteina Bcl-2-related	Marshall <i>et al.</i> (1999)
	E8	Interazione DED-mediata Contiene domini effettori di morte e interagisce con caspasi-8	Bertin <i>et al.</i> (1997) Hu <i>et al.</i> (1997)

Tabella 4 (continua)

HSV	?34.5 gene	Pathway IFN-mediato. Diminuisce la fosforilazione di eIF-2 α da parte di PKR	Cassady <i>et al.</i> (1998); Chou & Roizman (1992); Randazzo <i>et al.</i> (1997)
	US3	Ser/Thr chinasi che previene l'apoptosi virus indotta	Jerome <i>et al.</i> (1999)
	US5	Coopera con US3	Jerome <i>et al.</i> (1999)
Bovine Herpesvirus	UL14	Impedisce la frammentazione del DNA e l'attivazione delle caspasi;	De Martino L. <i>et al.</i> , 2007
	LR	Inibisce l'attivazione della caspasi-3	Henderson G. <i>et al.</i> , 2004
<u>Papovaviridae</u> Human papillomavirus	E6	Si lega e degrada p53	Pan & Griep (1995)
		Inibisce l'apoptosi dipendente e non da p53	Thomas & Banks (1998, 1999)
SV40	Large T	Meccanismo indipendente dall'inattivazione di p53	Conzen <i>et al.</i> (1997); Fromm <i>et al.</i> (1994); Tsai <i>et al.</i> (2000)
		Inibizione dell'apoptosi p53-indipendente attraverso la famiglia Rb	Slinsky <i>et al.</i> (1999)
<u>Retroviridae</u> HIV	GPx	Detossifica da perossidi e radicali liberi	Zhao <i>et al.</i> (2000)
	Tat	Pathway del PI3 e chinasi Akt/PKB	Borgatti <i>et al.</i> (1997); Gibellini <i>et al.</i> (1995)
	Vpr	Interrompe l'apoptosi TCR-mediata; regola NF κ B	Ayyavoo <i>et al.</i> (1997); Fukumori <i>et al.</i> (1998)
	p17/p24	Produzione di epitopi antagonisti che inibiscono la lisi ottemperata dai linfociti T citotossici	Klenerman <i>et al.</i> (1994)

L'evento apoptotico non rappresenta sempre un meccanismo sfavorevole per i virus. Infatti, qualora si verifichi dopo l'assemblaggio dei virioni, l'apoptosi ne facilita la diffusione, all'interno dei corpi apoptotici o associati ad essi (Mi *et al.*, 2001). La capacità di inibire l'apoptosi, invece, è necessaria per prevenire la morte prematura delle cellule ospiti, facilitare lo sviluppo della progenie virale nelle infezioni litiche e consentire l'infezione persistente (Shen & Shenk, 1995). La sensibilità delle cellule alle prime fasi dell'infezione virale, come l'adsorbimento e l'ingresso del virus, è stata studiata in diversi lavori che hanno evidenziato la natura pro-apoptotica di alcune proteine strutturali del virione. In particolare, valutando gli Herpesvirus, l'induzione della morte cellulare programmata da parte di HSV rappresenta un evento precoce legato all'espressione di un gene IE o ad una proteina strutturale introdotta nella cellula infetta (Leopardi & Roizman, 1996). Qualora la sintesi proteica venga inibita, l'apoptosi non si verifica. Tuttavia, l'apoptosi viene "soppressa" grazie all'azione di alcuni geni virali antiapoptotici (Koyama *et al.*, 1998) che interferiscono specificamente con una protein chinasi, PKR (*dsRNA-dependent serine/threonine protein kinase*) che, normalmente, non solo funge da mediatore delle funzioni antivirali dell'interferone, ma induce apoptosi anche mediante l'attivazione del dominio di morte associato a FAS (FADD) (Ubol *et al.*, 1994).

Per quanto riguarda BoHV-1, invece, una componente strutturale del virione funge da ligando per i death receptors dal momento che è stata osservata apoptosi anche in cellule esposte al virus inattivato: d'altra parte, è stato dimostrato il legame dei virus ai death receptors appartenenti alla superfamiglia Fas/TNF (Ashkenazi & Dixit, 1998; Schwarz, 1996). Ciò nonostante, al pari di HSV, 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 colpiscono i capretti nelle prime due settimane di vita. Le infezioni sono caratterizzate da febbre, scolo nasale, diarrea, ma il virus è stato isolato anche da capre con vulvovaginite, turbe respiratorie e lesioni proliferative a carico di labbra e palato duro. Inoltre, è in grado di esplicare attività abortigena e, al pari di altri Herpesvirus, dà luogo ad infezioni latenti suscettibili di riattivazione, indotta anche sperimentalmente mediante trattamento con corticosteroidi (Palomba *et al.*, 1995).

Numerosi studi hanno messo in evidenza il duplice ruolo svolto dall'apoptosi durante le infezioni virali. Infatti, in alcuni casi quest'evento rappresenta un meccanismo difensivo delle cellule infettate, in altri un espediente del virus per disseminare la progenie virale, dal momento che riesce ad evadere il sistema immunitario dell'ospite, a proteggere i virioni da enzimi ed anticorpi neutralizzanti e a limitare la risposta infiammatoria (Koyama *et al.*, 1998; Thomson *et al.*, 2001; Hay & Kannourakis, 2002).

Spesso, l'apoptosi è alla base dei meccanismi patogenetici di diverse infezioni ed in particolare delle infezioni erpetiche (Shen & Shenk, 1995; Teodoro & Branton, 1997). A tale proposito, in questo lavoro è stata evidenziata la capacità di CpHV-1 di indurre apoptosi in cellule MDBK, valutando i pathways biochimici coinvolti in questo evento, non ancora riportato in letteratura.

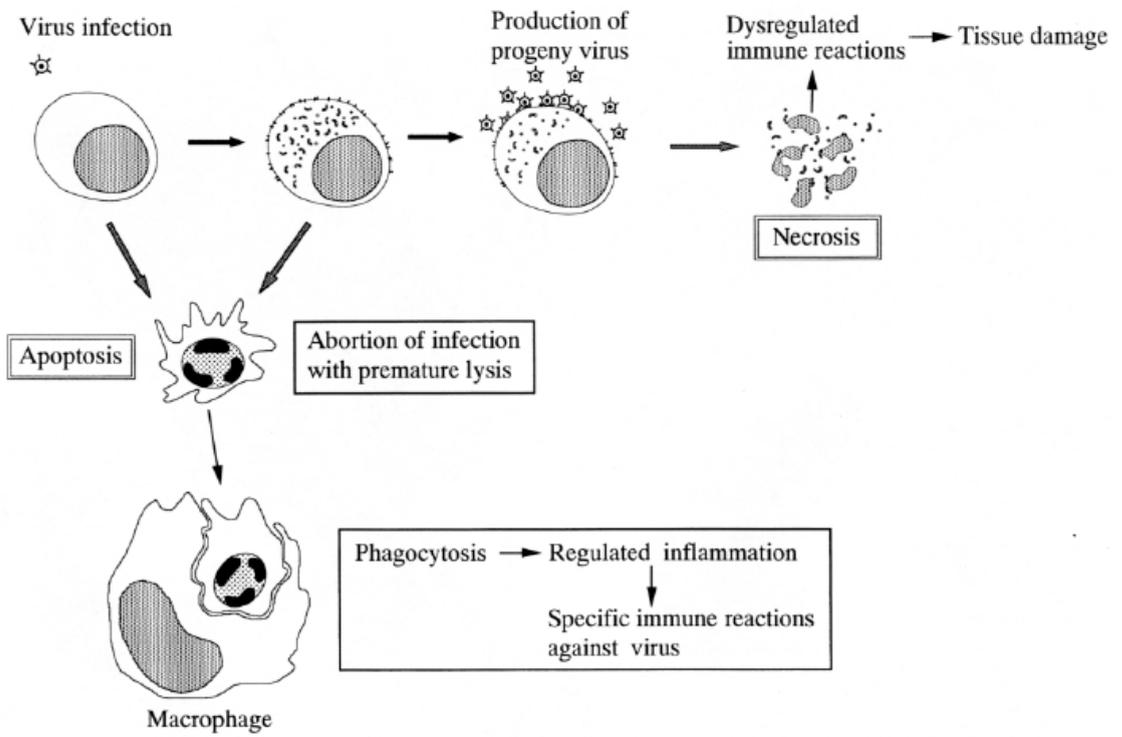


Fig. 10: Ruolo dell'apoptosi nelle infezioni da virus animali (Koyama et al., 2000)

MATERIALI E METODI

Cellule e condizioni di coltura

È stata utilizzata la linea cellulare Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) (CCL22-American Type Culture Collection, Manassaa, Va, USA), ottenuta da rene di bovino adulto sano. Le cellule sono state coltivate in incubatori umidificati ad una temperatura di 37°C e in atmosfera di CO₂ al 5%, nel terreno di coltura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) addizionato con il 10% di siero fetale bovino (FCS), L-glutammina 2 mM, penicillina e streptomina 100 U/ml.

CpHV-1 e titolo virale

Questo lavoro è stato realizzato utilizzando Swiss strain E/CH, ceppo virale di riferimento per CpHV-1 (Mettler *et al.*, 1979). Stocks virali sono stati ottenuti dopo aver infettato monostrati di MDBK, successivamente sottoposti a tre cicli di congelamento/scongelo (criolisi) e conservati a -80°C. Il titolo infettante è stato calcolato mediante 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).

Test di vitalità cellulare

La vitalità delle cellule MDBK infettate con CpHV-1 è stata valutata mediante un test eseguito con MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2ile)-2,5-difeniltetrazolio bromuro, Sigma-Aldrich Fine Chemicals]. Il test fornisce indicazioni sulle funzioni metaboliche cellulari, poiché misura l'attività di

deidrogenasi presenti nei mitocondri delle cellule vive. Il sale di tetrazolio ciclico di colore giallo (MTT) viene ridotto dagli enzimi deidrogenasi, per generare equivalenti riducenti di NADH o NADPH, trasformandosi in formazan intracellulare color porpora. Il formazan può essere solubilizzato e quantificato mediante misure spettrofotometriche.

I monostrati cellulari (da 2×10^4 cellule/pozzetto), ottenuti dopo 24 ore d'incubazione, in piastre da 96 pozzetti, sono stati infettati con CpHV-1 a m.o.i. 0.1, 1 e 10 ed incubati. A 4, 8, 12, 24, 36, 48 e 72 ore p.i., la soluzione di MTT (5 mg/ml) è stata aggiunta alle cellule, che sono state incubate per 3 ore a 37°C (CO₂ al 5%), al buio. Dopo l'incubazione, il mezzo è stato asportato e le cellule sono state solubilizzate mediante isopropanolo acidificato con HCl 0.1 N. A questo punto, è stata effettuata un'incubazione di 15 min a 37°C, al buio. Infine, è stata eseguita la lettura spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 570 nm, con correzione di background tra 620-650 nm. L'assorbanza è proporzionale al numero di cellule vive (Mosmann, 1983).

Infezione sperimentale e osservazioni microscopiche

Cellule MDBK, sospese in DMEM completo, sono state coltivate in fiasche da 25 cm², in incubatore a 37°C e 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 differenti **molteplicità** di **infezione** (m.o.i.) (0.1, 1 e 10), mentre i monostrati di controllo sono stati inoculati con cellule MDBK 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 SFB. Le colture cellulari, infettate e non, sono state poi incubate a 37°C, in atmosfera al 5% di CO₂ e, a differenti tempi post-infezione, sono

state esaminate al microscopio a contrasto di fase per valutare l'effetto citopatico (CPE).

Valutazione dell'apoptosi

Analisi morfologica mediante colorazione con Arancio d'Acridina

I cambiamenti nucleari delle cellule sono stati valutati mediante colorazione con Arancio di Acridina, fluorocromo basico con elevata affinità per gli acidi nucleici, capace di intercalarsi nel DNA che, al microscopio a fluorescenza, appare di colore verde; inoltre, il colorante si lega, non intercalandosi, all'RNA che invece si presenta di colore rosso-arancio.

Cellule MDBK, sospese in terreno DMEM completo, sono state coltivate in piastre da 24 pozzetti, sul cui fondo è posto un vetrino, per 24 ore in incubatore a 37°C, in atmosfera di CO₂ al 5%. I monostrati sono stati infettati con CpHV-1 a m.o.i. 0.1, 1 e 10. A 4, 8, 12, 24, 36 e 48 ore dall'infezione, le cellule sono state colorate con arancio di acridina (0.2 mg/ml) e, successivamente, sono state lavate con PBS per rimuovere l'eccesso di colorante. Infine i vetrini sono stati posizionati su vetrino portaoggetti e valutati al microscopio a fluorescenza. Il controllo positivo è stato ottenuto aggiungendo alle cellule camptotecina (CPT) (1 µg/ml) (Roche Molecular Biochemicals), sostanza in grado di indurre apoptosi (Darzynkiewicz *et al.*, 1992). L'identificazione delle cellule apoptotiche è stata effettuata visualizzando nuclei uniformemente colorati, nei quali è stato possibile riscontrare la cromatina condensata e la frammentazione nucleare in corpi apoptotici, come descritto precedentemente (Fiorito *et al.*, 2008).

Colorazione con Ioduro di Propidio (PI) e determinazione del picco sub-G₁

È stata eseguita l'analisi dell'apoptosi mediante citofluorimetria a flusso con PI, valutando la minore fluorescenza dei nuclei delle cellule apoptotiche rispetto alle cellule vive, come è stato precedentemente descritto (Pagnini *et al.*, 2005).

Per effetto dell'attivazione di endonucleasi con affinità per le regioni internucleosomali del DNA, una parte di DNA nelle cellule apoptotiche si trova sotto forma di frammenti mono o oligonucleosomici a basso peso molecolare. Tuttavia, per un certo lasso di tempo dopo l'inizio dell'apoptosi, la rimanente parte del DNA nella cellula resta ancora sotto forma di lunghi frammenti di catena, alcuni dei quali associati alla matrice nucleare. Nucleosomi singoli o corte catene di oligonucleosomi possono quindi fuoriuscire dal nucleo o dai frammenti nucleari (granuli cromatinici) ma non possono abbandonare la cellula poiché la membrana plasmatica è ancora integra. La fissazione delle cellule in fissativi precipitanti (alcoli, acetone) non consente di mantenere all'interno della cellula apoptotica la parte di DNA degradata e di bassa massa molecolare, che fuoriesce dalla cellula durante il successivo lavaggio. Di conseguenza, dopo il processo di permeabilizzazione della membrana citoplasmatica con il fissativo e il successivo lavaggio, rimangono all'interno della cellula soltanto frammenti di DNA non degradato e catene oligonucleosomiche troppo lunghe per poter essere estratte in queste condizioni. Pertanto, nelle cellule apoptotiche si colora una quantità inferiore di DNA rispetto alle cellule non apoptotiche, e ciò avviene indipendentemente dal fluorocromo utilizzato. Le cellule apoptotiche, quindi, danno origine, negli istogrammi di DNA, a un picco di fluorescenza inferiore (picco sub G₁) rispetto alle cellule non apoptotiche in G₁. Il grado di degradazione del DNA varia in dipendenza

del tipo cellulare, della natura dell'agente induttore di apoptosi, nonché dello stadio di avanzamento del fenomeno apoptotico (iniziale o finale).

Le cellule (2×10^6) infettate con CpHV-1 a m.o.i. 0.1, 1 e 1, a 4, 8, 12, 24, 36 e 48 ore p.i., sono state fissate in etanolo al 75% a -20°C per circa 4 ore, al fine di rendere permeabile la membrana citoplasmatica. Sono state risospese poi in PBS e centrifugate, per allontanare la parte di DNA degradata e di basso peso molecolare. Di seguito, la sospensione cellulare è stata trattata con una soluzione ipotonica contenente $20 \mu\text{g/ml}$ di PI, fluorocromo che si lega al DNA cellulare e, dopo un'incubazione di 30 minuti al buio e a temperatura ambiente, è stata analizzata al citofluorimetro (Dako-Parteck).

DNA laddering

La morte cellulare programmata è responsabile della degradazione del DNA cromosomiale in frammenti delle dimensioni di mono o oligonucleosomi (multipli interi di 180 paia di basi), noti come DNA laddering. L'attivazione delle endonucleasi che determinano questo fenomeno è un evento caratteristico dell'apoptosi che si verifica negli ultimi stadi di tale processo.

I monostrati cellulari (2×10^6 cellule), ottenuti dopo 24 ore d'incubazione, in fiasche da 75 cm^2 sono stati infettati con CpHV-1 a m.o.i. 0.1, 1 e 10. A 24, 48 e 72 ore post infezione, è stata realizzata l'estrazione del DNA genomico utilizzando il GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich), seguendo le istruzioni del fornitore. Quindi, è stata eseguita una corsa elettroforetica in gel di agarosio all'1.5 %, contenente 0.1 mg di etidio bromuro per ml. Il DNA laddering è stato visualizzato esaminando il gel alla luce ultravioletta.

Caratterizzazione dell'apoptosi

Due sono le cascate di segnali che conducono alla morte cellulare programmata: una è la via estrinseca, iniziata dalle interazioni di ligandi extracellulari a recettori specifici esposti sulla membrana plasmatica; l'altra è quella intrinseca, caratterizzata dagli eventi apoptotici mitocondriali. In entrambi i casi le caspasi svolgono una funzione fondamentale poiché il meccanismo a cascata del quale sono responsabili rappresenta il punto cardine di trasmissione e di amplificazione del segnale di morte (Cryns & Yuan, 1999; Nicholson, 1999; Timmer & Salvesen, 2007). Tale cascata vede il coinvolgimento di proteine con differenti funzioni, tra cui la proteina poli-ADP-ribosio-polimerasi (PARP), enzima di riparo del DNA (Kauffman *et al.*, 1993) e le proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2, impegnate nella regolazione dell'apoptosi stessa (Strasser *et al.*, 2000). In particolare, sia i membri antiapoptotici della famiglia Bcl-2, Bcl-2 e Bcl-X_L, che quelli proapoptotici, Bid e Bax, influenzano il pathway apoptotico mitocondriale che può essere avviato sia da segnali di morte extracellulari che intracellulari (Strasser *et al.*, 2000) e che ha inizio con la variazione del potenziale di membrana mitocondriale ed il conseguente rilascio del citocromo C.

Alla luce di queste considerazioni, è stato ritenuto importante caratterizzare l'apoptosi indotta da CpHV-1 in cellule MDBK, mediante la valutazione dell'attivazione delle caspasi, del clivaggio della proteina poli-ADP-ribosio-polimerasi (PARP) e degli eventi che interessano il mitocondrio. Inoltre, i risultati dell'MTT test e degli esperimenti preliminari (colorazione con arancio d'acridina, valutazione del picco ipodiploide e DNA laddering) hanno giustificato la valutazione dei parametri necessari alla caratterizzazione del processo apoptotico, ad intervalli post infezione più

brevi rispetto a quelli utilizzati in precedenza e ad una molteplicità d'infezione intermedia (m.o.i. 1).

Estrazione delle proteine e Western blotting

La presenza delle caspasi, l'espressione di proteine che regolano il processo apoptotico appartenenti alla famiglia Bcl-2, il clivaggio della proteina poli-ADP-ribosio-polimerasi (PARP) e la traslocazione del citocromo C sono state studiate mediante Western blot.

A 4, 8, 12, 24 e 36 ore post infezione, le cellule MDBK (2×10^6), infettate e non con CpHV-1 a m.o.i. 1, sono state omogeneizzate direttamente sul lysis buffer (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glicerolo, 1% Triton X-100, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro, 1 μ g/ml aprotinina, 0.5 mM sodio ortovanadato, e 20 mM sodio pirofosfato) ed i lisati sono stati chiarificati mediante centrifugazione a 14.000 g per 10 minuti. Dopo aver determinato la concentrazione proteica mediante un saggio colorimetrico (Bio-Rad), i campioni sono stati sottoposti a bollitura in Laemmli buffer (0.125 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 20% glicerolo, 10% 2-mercaptoetanolo, e 0.002% blu di bromofenolo) per 5 minuti e, successivamente, sono stati sottoposti ad elettroforesi in condizioni denaturanti (SDS-PAGE), su un gel di poliaccrilammide al 12.5%. Dopo l'elettroforesi, le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa (Immobilon, Millipore Corp., Bedford, MA) ed il blot è stato incubato overnight con l'anticorpo primario diluito in NFDm (No Fat Dry Milk) allo 0.5%.

Sono stati eseguiti esperimenti con anticorpo policlonale (PAb) anti-caspasi-3 (1:1000) (Cell Signaling); PAb anti-caspasi-8 (1:1000)(Abcam); PAb anti-Bid (1:1000)(Santa Cruz); PAb anti-caspasi-9 (1:1000)(Stressgen); PAb anti-cytochrome C (1:1000) (Abcam); PAb che riconoscono le

proteine della famiglia Bcl-2 (Bax, Bcl-2, Bcl-X_L) (1:1000) (Abcam); PAb anti-PARP (1:1000) (Biomol) e con anticorpo monoclonale (MAb) anti- β -actina (1:7500)(Cell Signaling).

Infine, le membrane sono state incubate con anticorpo secondario coniugato con horseradish peroxidase (1:10000) a temperatura ambiente e la reazione è stata valutata con un sistema a chemiluminescenza (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK).

Le immagini delle bande specifiche ottenute mediante l'immunoblot sono state visualizzate grazie al sistema d'immagine Gel Logic 1500 (Kodak) e l'espressione delle proteine è stata quantificata valutando la densità delle bande, mediante il programma UVgeltec, in rapporto alla densità della banda di riferimento della β -actina.

Valutazione dell'attivazione delle caspasi mediante citofluorimetria

L'attivazione delle caspasi è stata studiata utilizzando diversi carboxyfluorescein FLICA Assay kits (B-Bridge International, Inc., Sunnyvale, CA, USA) che prevedono l'impiego di Inibitori delle Caspasi marcati con Fluorocromi (FLICA), permeabili alla membrana citoplasmatica e non citotossici, capaci di legarsi covalentemente alle caspasi stesse. La quantità di fluorescenza che viene misurata dopo il trattamento con questi inibitori è pertanto una misura diretta del numero di caspasi attive presenti nelle cellule. In particolare, sono stati utilizzati FAM-DEVD-FMK, FAM-LETD-FMK e FAM-LEHD-FMK rispettivamente come inibitori di caspasi-3/7, di caspasi-8 e di caspasi-9. A 4, 8, 12, 24 e 36 ore post infezione, i FLICA sono stati aggiunti ai monostrati cellulari (2×10^6 cellule/ml) infettate e non con CpHV-1 a m.o.i. 1. Dopo un'ora di incubazione a 37°C e al buio, è stata quantificata la fluorescenza della sospensione cellulare al citofluorimetro.

Inibizione dell'apoptosi

Dopo aver appurato il coinvolgimento delle caspasi nell'evento apoptotico, in alcuni esperimenti sono stati impiegati, ad una concentrazione di 25 μ M, inibitori delle caspasi (Calbiochem, EMD Biosciences), sciolti in Dimetilsolfossido (DMSO), quali Z-DEVD-FMK, inibitore della caspasi-3; Z-IETD-FMK, inibitore della caspasi-8; Z-LEHD-FMK, inibitore della caspasi-9; Z-VAD-FM, inibitore generale delle caspasi.

Prima di effettuare l'infezione con CpHV-1, le cellule coltivate in piastre da 96 pozzetti, sono state incubate in presenza delle suddette sostanze, per due ore, a 37°C. A 24 ore dopo l'infezione, è stata misurata l'apoptosi utilizzando un test, Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche), che svela la presenza di mono e oligo-nucleosomi ed esprime l'evento apoptotico come *enrichment factor* ossia il rapporto tra l'assorbanza a 405 nm delle cellule infette e l'assorbanza a 405 nm delle cellule controllo.

Determinazione del potenziale di membrana mitocondriale

La liberazione di molecole coinvolte nell'apoptosi, come il citocromo c, dal compartimento mitocondriale è la conseguenza dell'apertura del MTP (Mitochondrial Transition Pore). Questo evento può essere determinato dal rilascio di ioni Calcio dal reticolo endoplasmatico o dall'interazione delle proteine della famiglia Bcl-2 con il canale stesso. L'apertura dell'MTP determina il passaggio di soluti con massa molecolare maggiore a 1.5 kDa ed è, quindi, responsabile della transizione della permeabilità della membrana mitocondriale interna interessata dal potenziale transmembranario ($\Delta\psi_m$), gradiente elettrochimico che costituisce l'evento iniziale alla base della conservazione dell'energia.

La caduta del potenziale di membrana mitocondriale ($\Delta\psi_m$) è stata valutata mediante l'utilizzo della tetramethylrhodamine ethylester o Mitoshift™ dye (Trevigen), un fluorocromo (Ex: 510-560 nm; Em: >590 nm) che si accumula esclusivamente nei mitocondri integri delle cellule vive. L'assenza di fluorescenza, pertanto, evidenzia la presenza di cellule morte o con mitocondri depolarizzati. Essendo un evento precoce, la caduta del potenziale di membrana è stata misurata ai primi tempi successivi all'infezione (4, 8 e 12 ore p.i.). Le cellule MDBK (2×10^6), infettate e non con CpHV-1 a m.o.i. 1 sono state incubate con Mitoshift™ (100 nM), per un'ora, a temperatura ambiente e al buio. Quindi sono stati effettuati due lavaggi con PBS ed i campioni sono stati analizzati al citofluorimetro.

Estrazione delle proteine citosoliche e mitocondriali

La separazione delle frazioni mitocondriale e citosolica è stata effettuata utilizzando un protocollo modificato da Kluck *et al.* A 4, 8, 12, 24 e 36 ore post infezione, le cellule MDBK (2×10^6), infettate e non, con CpHV-1 a m.o.i. 1 sono state lavate due volte con PBS. Il pellet è stato poi risospeso in lysis buffer (1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 1% NP-40, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 1 μM PMSF, e 100 μM NaVO_4). I campioni sono stati incubati successivamente su ghiaccio per 20 minuti e centrifugati a 14.000 rpm per 15 minuti. Infine, è stato raccolto il surnatante ed è stata valutata la concentrazione proteica mediante il test di Bradford.

Estrazione dell'RNA e Northern blot

Per valutare la presenza dell'mRNA di geni regolatori per l'apoptosi è stato eseguito il Northern blot.

È stato estratto l'RNA dalle cellule (2×10^6), dopo 8, 12, 24 e 36 ore dall'infezione con CpHV-1, utilizzando il Tri Reagent (Sigma-Aldrich

Chemie GmbH, Taufkirchen, Germany). L'RNA estratto è stato risospeso in acqua contenente DiEthylPyroCarbonate (DEPC). Dopo aver stabilito la concentrazione dell'acido nucleico, misurando l'assorbanza della soluzione acquosa a 260 nm con biofotometro, l'RNA è stato sottoposto ad elettroforesi su gel agarosio-formaldeide all' 1.2% e, successivamente, è stato trasferito su una membrana di nitrocellulosa (blot) che è stata posta overnight a contatto, in hybridization buffer (5 × SSPE/ 10 × Denhardt's solution/100 µg/ml salmon sperm DNA/ 50% formamide/ 2% SDS), con sonde di DNA marcate con [alfa-32P]dCTP, corrispondenti a regioni codificanti nel bovino per Bax, Bcl-2, Bcl-X_L e β-actina. Infine il blot è stato sottoposto a lavaggio con 0.2 × SSC/ 0.1% SDS a 50°C.

Analisi statistica dei dati

Tutti i risultati sono presentati come media ± deviazione standard (SD) di tre esperimenti indipendenti. L'analisi statistica è stata effettuata mediante un software GraphPad InStat, version 3.00 for Windows 95 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

RISULTATI

Effetto citopatico

Prima di esaminare la capacità del CpHV-1 di interagire con i pathway apoptotici, sono state studiate le caratteristiche della morte cellulare determinata dall'infezione delle cellule MDBK con il ceppo E/CH. In cellule bovine, infettate a differenti molteplicità d'infezione (m.o.i. 0.1, 1 e 10), già a 12 ore post infezione (p.i.), è stato visualizzato l'effetto citopatico (ECP), caratterizzato da arrotondamento cellulare (aspetto a palloncino), formazione di ammassi di cellule, comparsa di cellule multinucleate (sincizi), perdita dei contatti intercellulari e/o formazione di ponti tra le cellule e distacco delle stesse dal monostrato (*Fig. 11 B*). Tali cambiamenti morfologici diventavano ancora più evidenti a 24 ore p.i. (*Fig. 11 C*), mentre nel controllo, il monostrato risultava integro (*Fig. 11 A*).

Alterazione della vitalità delle cellule MDBK infettate con CpHV-1

La vitalità delle cellule infettate è stata misurata col test MTT. I risultati mostrano che alle m.o.i. più alte (1 e 10), la riduzione della vitalità cellulare avveniva in maniera dose-tempo dipendente: essa diminuiva in maniera significativa a 8 ore p.i., con una riduzione di circa il 20 % rispetto al controllo e andava incontro ad un progressivo e considerevole decremento fino a 72 ore post-infezione quando la diminuzione della vitalità cellulare era pari a circa il 72% della popolazione cellulare totale. Per quanto riguarda il gruppo trattato con m.o.i. 0.1, la riduzione della vitalità cellulare risultava significativa a partire da 12 ore p.i., quando solo il 40% della popolazione cellulare era ancora vitale. La vitalità cellulare diminuiva, anche in questo

caso, in maniera tempo dipendente e, a 72 ore p.i., la percentuale di riduzione della vitalità cellulare era pari a circa il 75% della popolazione cellulare totale (*Fig. 12*).

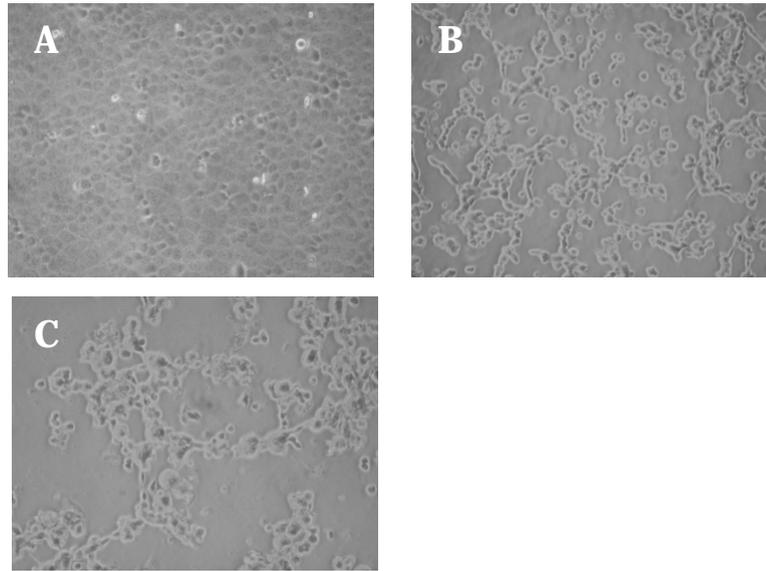


Fig.11: CPE in cellule MDBK infettate con CpHV-1 a m.o.i. 1

Legenda. A: MDBK mock infected; B: CPE da CpHV-1 su MDBK, 12 ore p.i.; C: CPE da CpHV-1 su MDBK, 24 ore p.i.

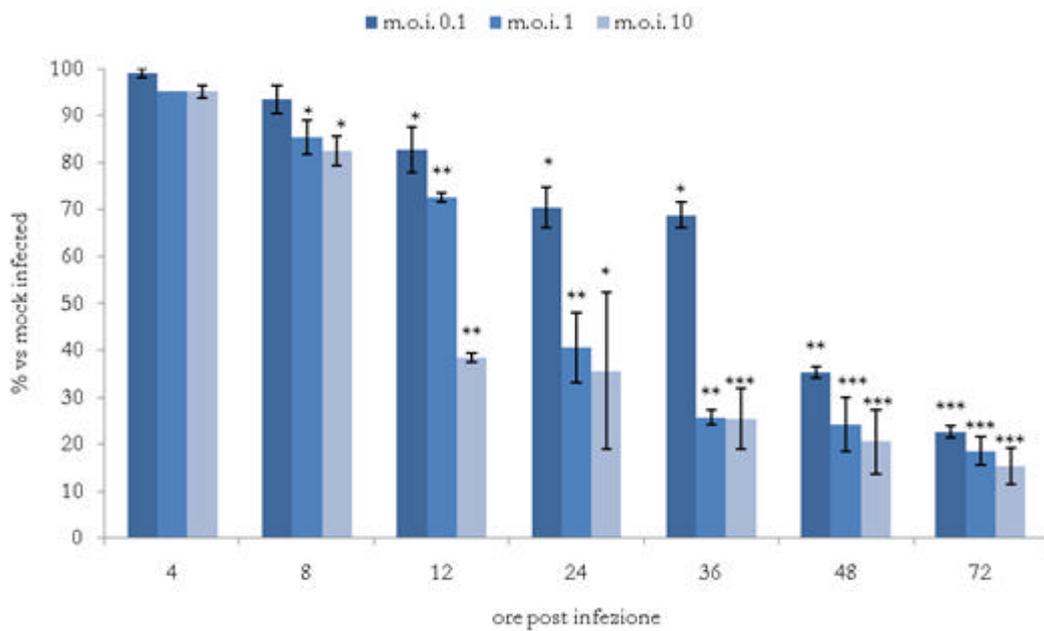


Fig. 12: Vitalità cellulare (MTT test)

I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

Replicazione virale

La correlazione tra la morte cellulare e la produzione di nuova progenie virale è stata chiaramente dimostrata da un progressivo incremento del titolo virale, valutato su criolisati ottenuti da cellule infettate a m.o.i. 0.1, 1 e 10, a 4, 8, 12, 24, 36, 48 e 72 ore p.i. (*Fig. 13*). In particolare, a 4 ore p.i. il titolo virale diminuiva, rispetto al titolo iniziale, di 5.2, 2.4 e 3 logaritmi, rispettivamente per m.o.i. 0.1, 1 e 10. A partire da 8 ore p.i. invece si verificava un incremento del titolo virale, che risultava pari a 3 TCID₅₀/ml per m.o.i. 0.1 e a 4 TCID₅₀/ml per m.o.i. 1 e 10 ed aumentava progressivamente nel tempo successivi, per raggiungere il valore più alto a 48 ore p.i. (8.3 TCID₅₀/ml).

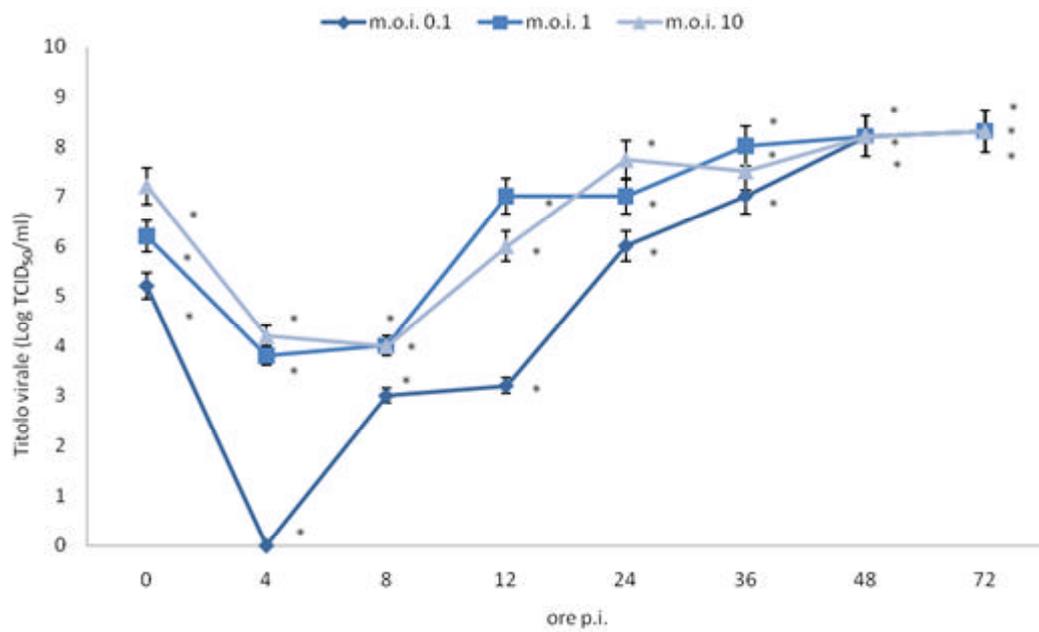


Fig. 13: Titolo virale del CpHV-1
 I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti (* P < 0.05).

Studio e caratterizzazione dell'attività apoptotica di CpHV-1

Attualmente possono essere eseguiti diversi saggi che consentono l'individuazione degli eventi apoptotici, distinti in gruppi diversi a seconda dell'evento rilevato: osservazione delle modificazioni nucleari, analisi mediante citofluorimetria a flusso, frammentazione del DNA, valutazione dell'attività delle caspasi, test mitocondriali (Elmore, 2007).

Al fine di individuare dettagliatamente la capacità del Caprine Herpesvirus-1 di indurre apoptosi in cellule MDBK, sono stati condotti esperimenti che rilevano eventi apoptotici precoci caratteristici della fase di induzione o d'innescio ed esperimenti che individuano gli eventi della fase di esecuzione.

Modificazioni nucleari determinate dall'infezione da CpHV-1

Sono stati valutati nelle MDBK i cambiamenti nucleari in corso d'infezione da CpHV-1, mediante colorazione con arancio di acridina che colora le cellule, rendendo il nucleo di colore verde ed il citoplasma rosso-arancio.

A tutti i tempi p.i. considerati, i nuclei delle cellule di controllo apparivano ben colorati in verde e mostravano il contenuto nucleare ben evidente (*Fig. 14 A*).

Il controllo positivo costituito da cellule trattate con camptotecina mostrava una differente disposizione del monostrato. In particolare, si evidenziavano i nuclei apoptotici in cui la cromatina appariva condensata a forma di semicerchio ad un'estremità del nucleo o anche come grani sferici brillanti. Il citoplasma perdeva l'organizzazione solita (*Fig. 14 E*).

L'osservazione della cromatina nelle cellule infettate con CpHV-1 mostrava che a già a 8 ore p.i. i nuclei erano condensati, intensamente colorati e frammentati, risultando altresì paragonabili a quelli delle cellule in apoptosi,

ottenute dal trattamento con camptotocina. Inoltre, in alcune cellule, era possibile visualizzare il materiale nucleare disperso nel citoplasma, ad indicare la morte cellulare per necrosi. Infatti, una cellula che va incontro a necrosi subisce delle modificazioni che determinano la perdita dell'integrità delle membrane degli organelli, compreso il nucleo, con conseguente rilascio del loro contenuto (*Fig. 14 B*). A 12 ore p.i., era ancora più evidente la cromatina compattata in granuli che veniva visualizzata in prossimità della membrana plasmatica, fornendo alle cellule un aspetto simile a bolle (blebbing)(*Fig. 14 C*). Infine, a 24 ore p.i. venivano visualizzate le poche cellule rimaste completamente prive di citoplasma, ridotte a corpi apoptotici (*Fig. 14 D*).

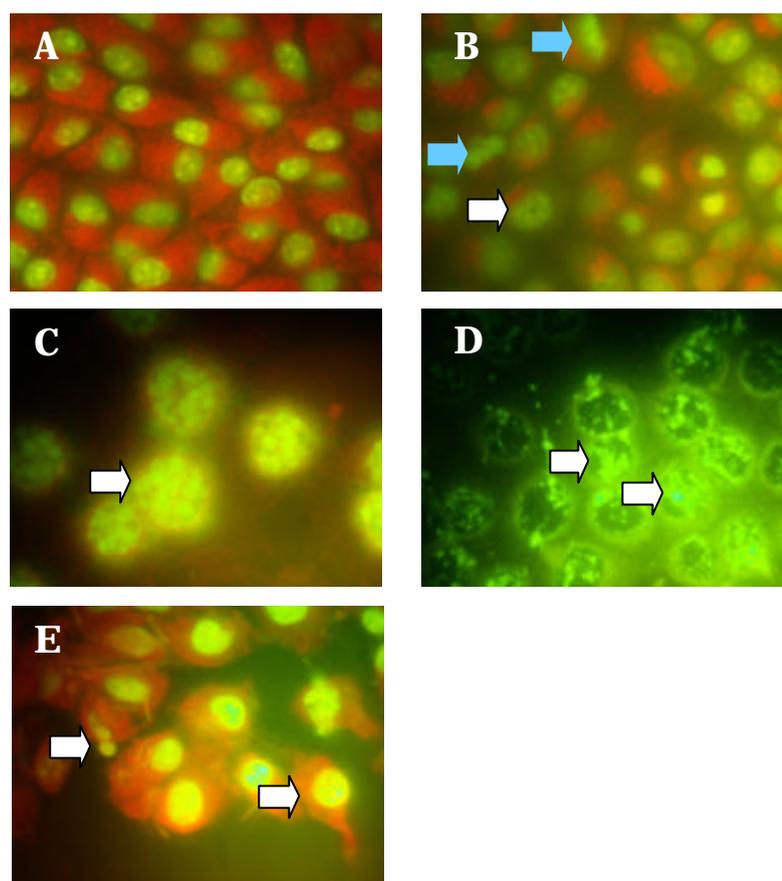


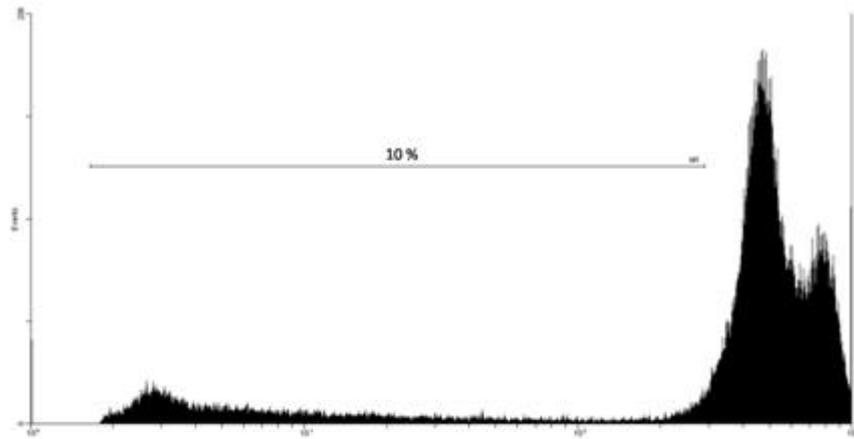
Fig. 14: Colorazione con Arancio d'Acridina

Legenda. Le frecce celesti indicano le cellule in necrosi, le frecce bianche segnalano le cellule in apoptosi. A: MDBK mock infected; B: MDBK infettate con CpHV-1 (m.o.i. 10), 8 ore p.i.; C: MDBK infettate con CpHV-1 (m.o.i. 10), 12 ore p.i.; D: MDBK infettate con CpHV-1 (m.o.i. 10), 24 ore p.i.; E: MDBK trattate con camptotecina (controllo positivo)

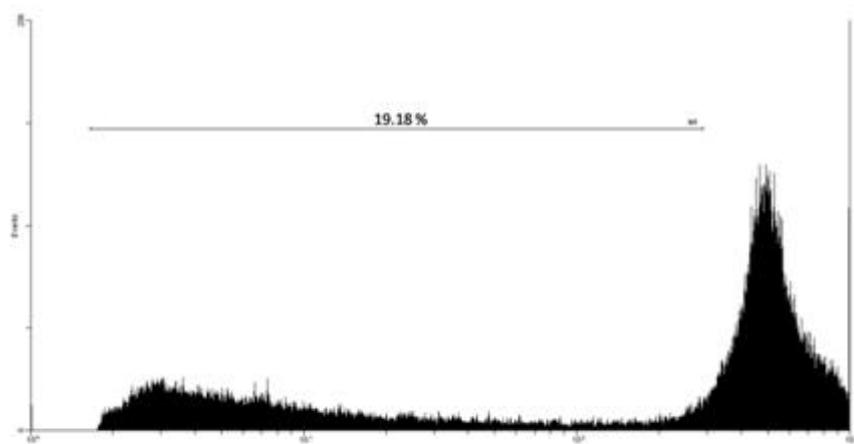
Citofluorimetria a flusso per la valutazione della popolazione cellulare in sub- G1

Il fenomeno apoptotico è stata studiato quantitativamente attraverso la valutazione dell'alterata capacità di diffondere la luce nelle cellule apoptotiche, in seguito a condensazione/frammentazione nucleare, degradazione del DNA e perdita della permeabilità di membrana. Le cellule apoptotiche, contenenti una quantità inferiore di DNA, colorate con propidio ioduro, mostravano infatti un picco di fluorescenza inferiore (picco sub G1 o subdiploide) rispetto alle cellule non apoptotiche. In figura 15 sono stati riportati gli istogrammi relativi all'infezione delle cellule MDBK con CpHV-1 a m.o.i. 1.

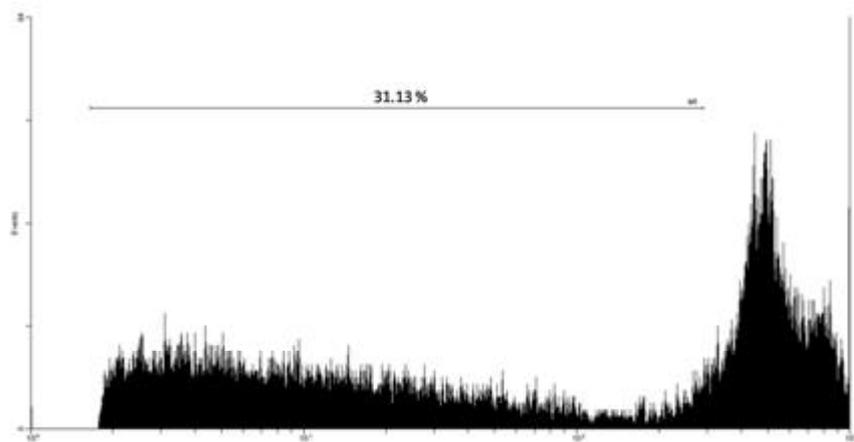
La popolazione cellulare in sub-G1 nel controllo è stata in media del 10% (*Fig. 15 A*). A 8 ore p.i., nelle cellule infette alle m.o.i. più alte (1 e 10), la percentuale in sub-G1 subiva un incremento di circa il 50% (*Fig. 15 B*), mentre a 12 ore p.i. aumentava di 3 volte rispetto al controllo nelle cellule infette a m.o.i. 1 (*Fig. 15 C*) e di 7 volte nelle cellule infette a m.o.i. 10. A 24 ore p.i., le cellule in apoptosi della popolazione cellulare infettata a m.o.i. 1 e a m.o.i. 10 erano rispettivamente il 65% (*Fig. 15 D*) e l'85%. Il picco subdiploide non aumentava (85%) ai tempi successivi per le cellule infettate a m.o.i. 10, mentre per le cellule infettate a m.o.i. 1 s'innalzava a 36 ore p.i. (82.15%) e rimaneva invariato a 48 ore p.i. (*Fig. 15 E*). Per quanto riguarda le cellule infettate a m.o.i. 0.1, il picco subdiploide diventava significativo a 24 ore p.i. ed era pari al 32.68%. Tale percentuale rimaneva tale a 36 ore p.i. e rappresentava il 77% della popolazione cellulare infettata a 48 ore p.i. (*Fig. 16*).



A



B



C

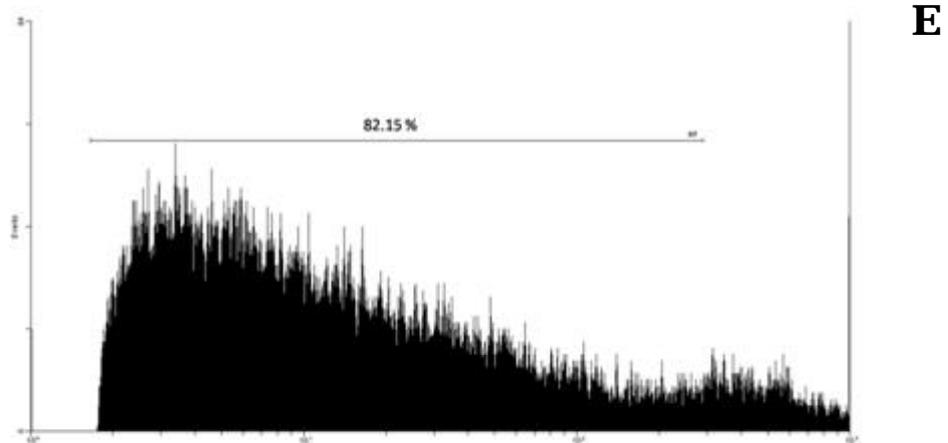
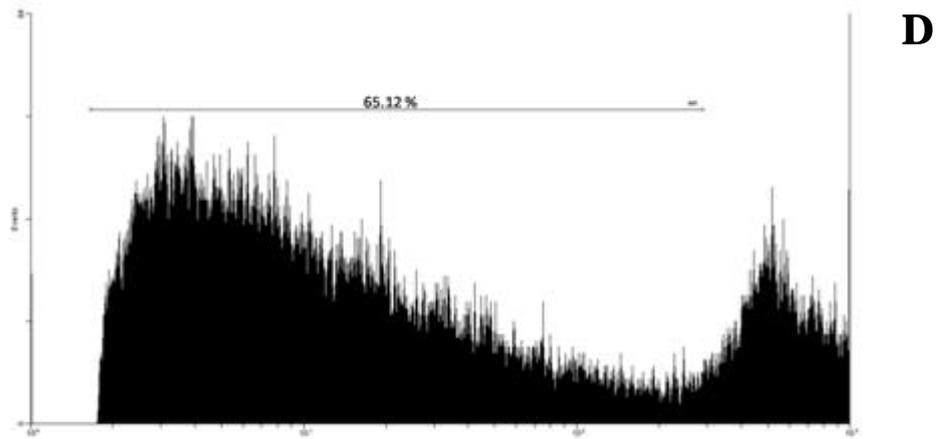


Fig. 15: Valutazione del picco sub-G1 mediante citofluorimetria a flusso

Legenda. A: Istogramma delle cellule mock infected; B: Istogramma delle cellule MDBK infettate con CpHV-1 m.o.i. 1 a 8 ore p.i.; C: Istogramma delle cellule MDBK infettate con CpHV-1 m.o.i. 1 a 12 ore p.i.; D: Istogramma delle cellule MDBK infettate con CpHV-1 m.o.i. 1 a 24 ore p.i.; E: Istogramma delle cellule MDBK infettate con CpHV-1 m.o.i. 1 a 36 ore p.i.

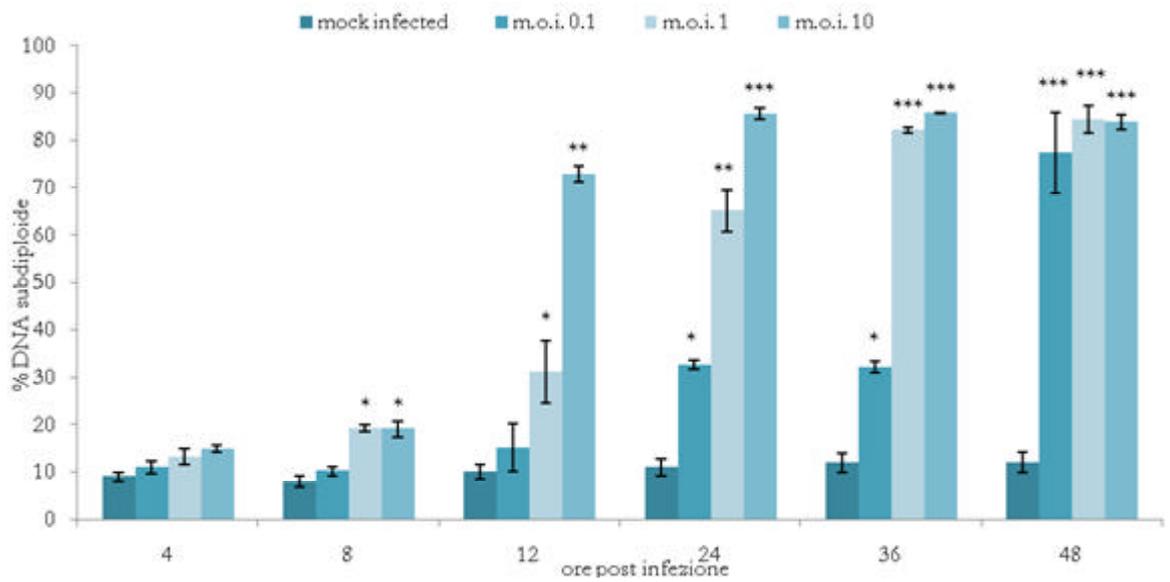


Fig. 16: Quantificazione del picco sub-diploide

I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001)

Frammentazione del DNA

Un parametro importante per la valutazione della modalità di morte cellulare è la degradazione del DNA.

È ben nota la corrispondenza tra la comparsa di morfologie apoptotiche e la frammentazione del DNA. Nelle fasi tardive dell'apoptosi, infatti, endonucleasi attivate dalle caspasi degradano il DNA cromatinico in frammenti dalle dimensioni di mono o oligonucleosomi. Per visualizzarlo è sufficiente estrarre il DNA genomico e sottoporlo a elettroforesi su gel di agarosio: l'entità del fenomeno è proporzionale alla quantità di cellule apoptotiche. I frammenti oligonucleosomali, che danno origine al tipico *laddering*, erano evidenti già a 24 ore p.i. a tutte le m.o.i., mentre la presenza di DNA *laddering* non si è manifestata nelle cellule mock infected (*Fig 17*).

Clivaggio di PARP

La presenza di rotture nel DNA è in grado di attivare PARP che sintetizza polimeri di ADP-ribosio per riparare al danno subito. Durante l'apoptosi, PARP è inattivata dalle caspasi che la tagliano in due subunità: ciò fa sì che si verifichi la frammentazione del DNA cromosomiale. Contrariamente a quanto accadeva nel gruppo di controllo, il clivaggio di PARP è stato riscontrato nelle cellule infettate con CpHV-1 a m.o.i. 1 già a 8 ore p.i. (*Fig 18*).

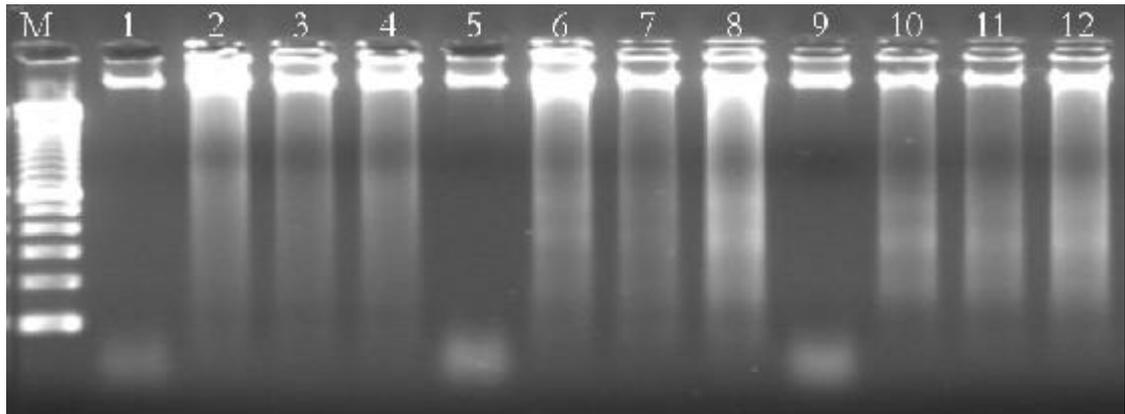


Fig. 17: Dna Laddering

Legenda. M: ladder 100 bp; 1: MDBK mock infected; 2: CpHV-1 m.o.i. 0.1 24 ore p.i.; 3: CpHV-1 m.o.i. 0.1 48 ore p.i.; 4: CpHV-1 m.o.i. 0.1 72 ore p.i.; 5: MDBK mock infected; 6: CpHV-1 m.o.i. 1 24 ore p.i.; 7: CpHV-1 m.o.i. 1 48 ore p.i.; 8: CpHV-1 m.o.i. 1 72 ore p.i.; 9: MDBK mock infected; 10: CpHV-1 m.o.i. 10 24 ore p.i.; 11: CpHV-1 m.o.i. 10 48 ore p.i.; 12: CpHV-1 m.o.i. 10 72 ore p.i.

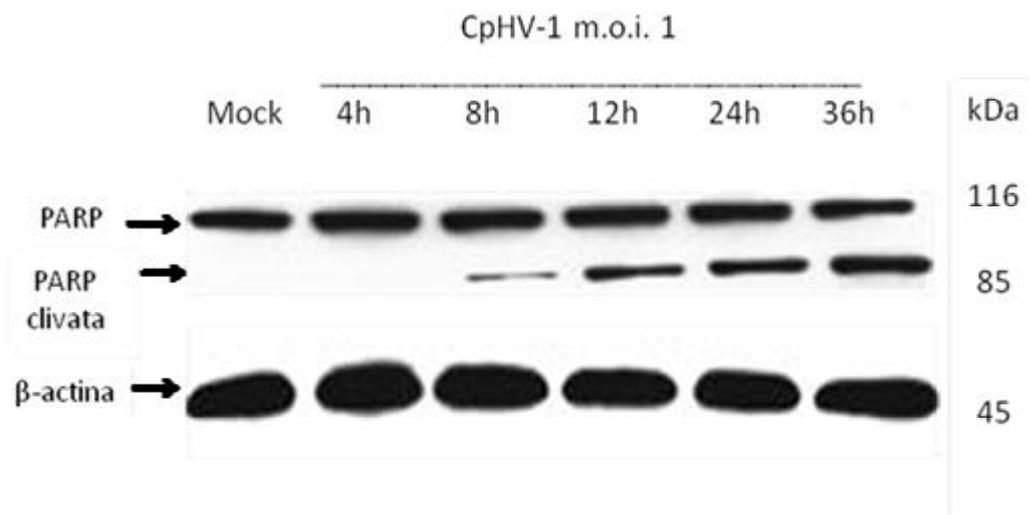


Fig. 18: Western blotting per la valutazione del clivaggio di PARP

Analisi dell'attività delle caspasi

L'attivazione delle caspasi è stata rilevata in numerosi sistemi cellulari quale evento cruciale attraverso cui il meccanismo apoptotico opera. Per questo, l'attività caspatica può essere studiata come marker biochimico dell'apoptosi in popolazioni cellulari analizzate sia *in vitro* che *in vivo*. La rivelazione dell'attività delle caspasi è stata eseguita con i seguenti metodi:

– Western blotting: la presenza delle caspasi nelle cellule infettate con CpHV-1 a m.o.i. 1 è stata evidenziata mediante analisi western blotting. A tale scopo, sono stati impiegati anticorpi policlonali che riconoscono caspasi-8, caspasi-9 e caspasi-3. Le *figure 19 A, 20 A e 21 A* mostrano il clivaggio delle caspasi iniziatrici 8 e 9 e di caspasi-3 a partire da 8 ore p.i. La determinazione della densità delle bande corrispondenti a tali proteine e alla β -actina nonché il rapporto tra le relative densità sono state analizzate mediante il programma UVgeltec. In base a tale analisi, a 8 ore p.i., l'espressione delle caspasi iniziatrici 8 e 9 si sovrapponevano (0.65 e 0.6), mentre l'espressione di caspasi 3 era inferiore (0.58). A 12 ore p.i., si è assistito ad un significativo incremento di caspasi-9 (1.16), che diminuiva a 24 ore p.i. (0.68). Mentre caspasi-8 e caspasi-3 aumentavano progressivamente, in maniera tempo-dipendente a partire da 8 ore p.i. fino alla fine dell'infezione (*Fig. 19 B, 20 B, 21 B*).

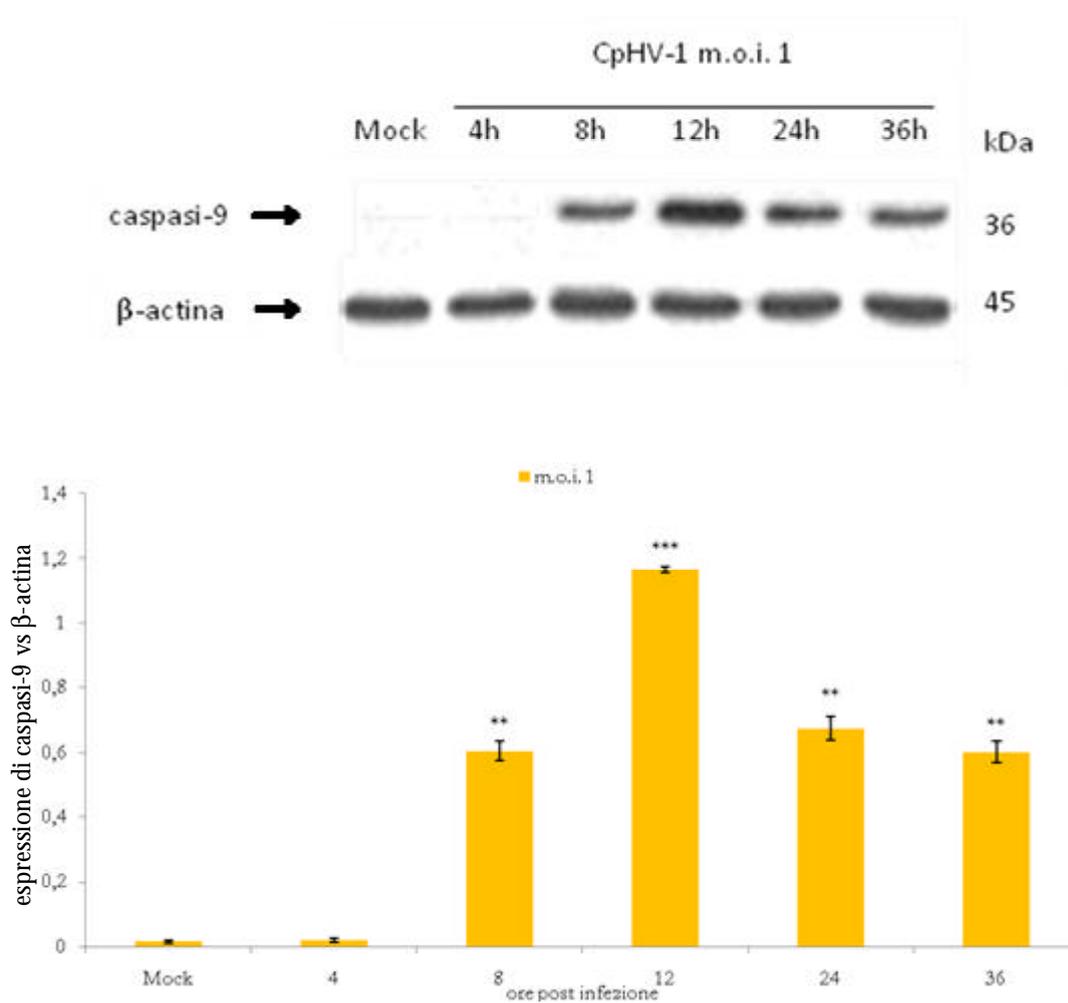
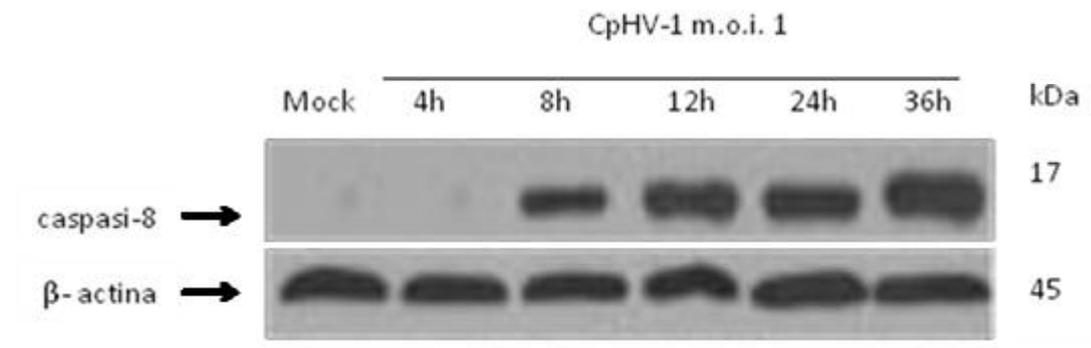
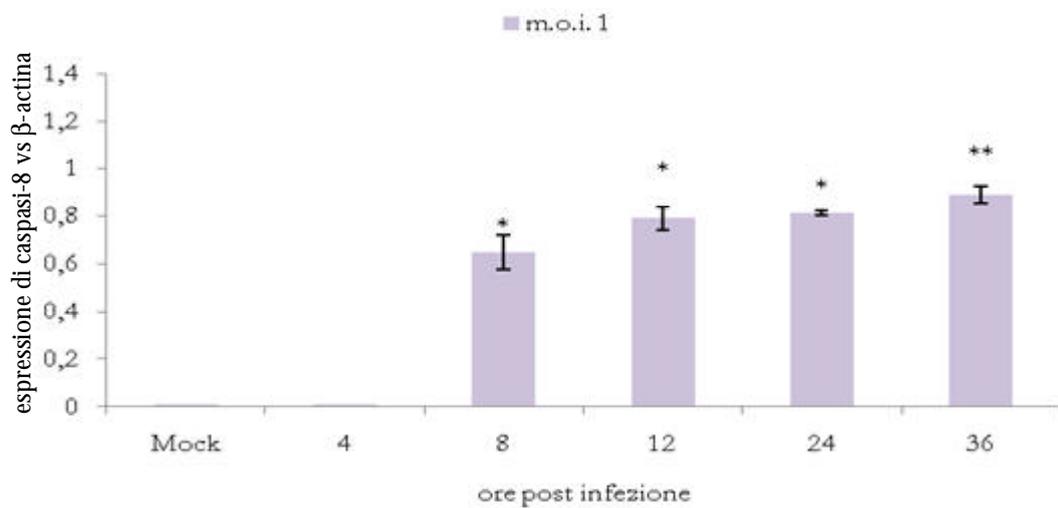


Fig. 19: Clivaggio di caspasi-9

Effetti di CpHV-1 sull'attivazione di caspasi-9. L'analisi Western Blotting è stata eseguita con un anticorpo specifico per caspasi-9 e β -actina. La β -actina è stata adoperata come controllo interno *Legenda*. A: Western blotting; B: Analisi densitometrica. I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).



A



B

Fig.20: Clivaggio di caspasi-8

Effetti di CpHV-1 sull'attivazione di caspasi-8. L'analisi Western Blotting è stata eseguita con un anticorpo specifico per caspasi-8 e β -actina. La β -actina è stata adoperata come controllo interno. *Legenda.* A: Western blotting; B Analisi densitometrica. I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$).

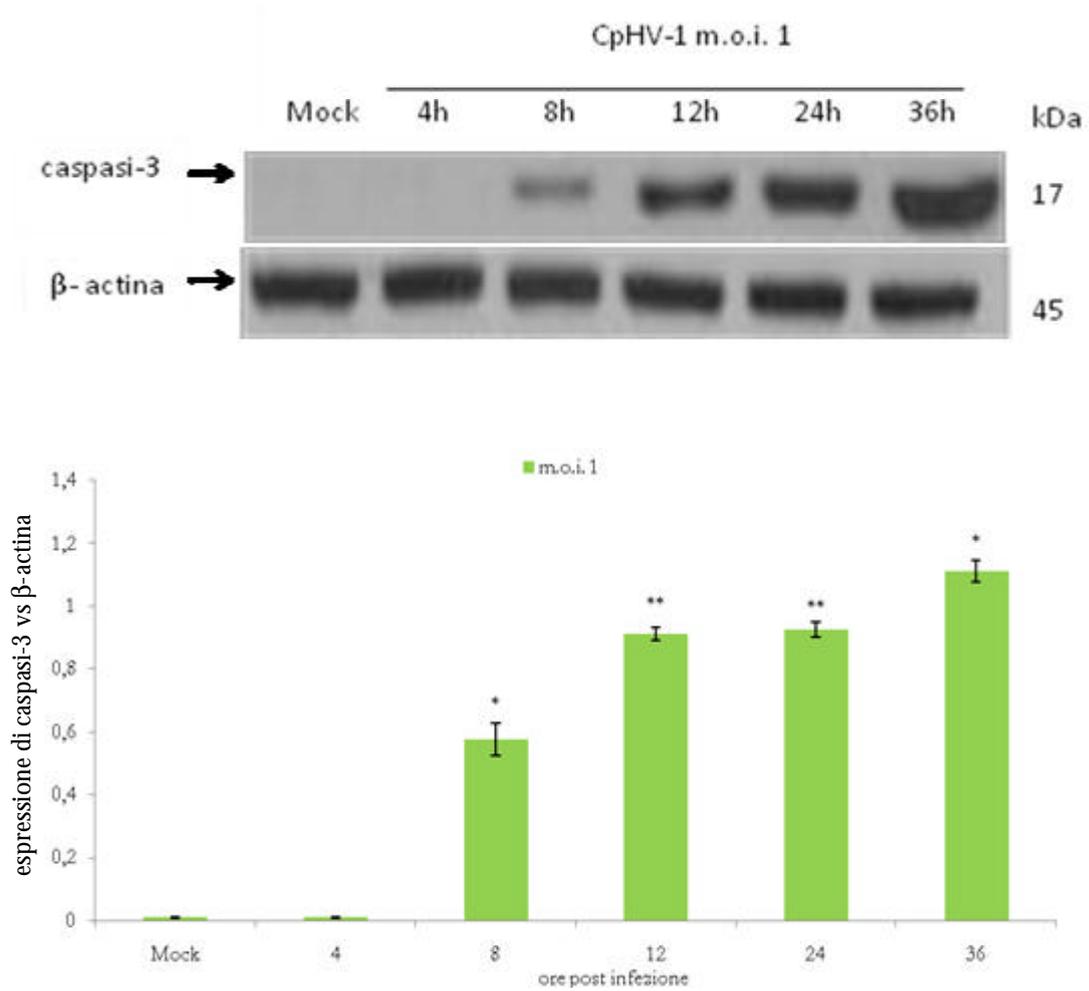


Fig.21: Clivaggio di caspasi-3

Effetti di CpHV-1 sull'attivazione di caspasi-3. L'analisi Western Blotting è stata eseguita con un anticorpo specifico per caspasi-3 e β-actina. La β-actina è stata adoperata come controllo interno. *Legenda.* A: Western blotting; B Analisi densitometrica. I valori rappresentano la media (± SD) di tre esperimenti indipendenti (**P<0.01, ***P<0.001).

- Saggio con inibitori fluorescenti delle caspasi (Flica assay kit): la quantificazione dell'attività caspatica è stata effettuata con l'utilizzo di inibitori delle caspasi marcati con FITC, o carbossifluoresceina (FAM), oppure con sulforodamina (SR), fluorocromi che si legano alle caspasi attivate, permettendo la colorazione *in situ* di tali proteasi. Come è stato precedentemente dimostrato con il western blotting, l'infezione delle cellule MDBK con CpHV-1 a m.o.i. 1 determina l'attivazione delle caspasi esaminate. In particolare, la quantificazione dell'attività di caspasi-9, valutata mediante questo saggio, ha confermato i dati ottenuti attraverso l'analisi della densità delle bande (*Fig 22*), così come l'attività di caspasi 8 che è risultata significativa a partire da 8 ore post infezione, per aumentare progressivamente nei tempi successivi (*Fig 23*). Infine, in *Figura 24*, è rappresentata l'attività delle caspasi-3/7 che, significativa già da 8 ore p.i., aumentava di circa 8 volte rispetto al controllo, a 36 ore p.i.

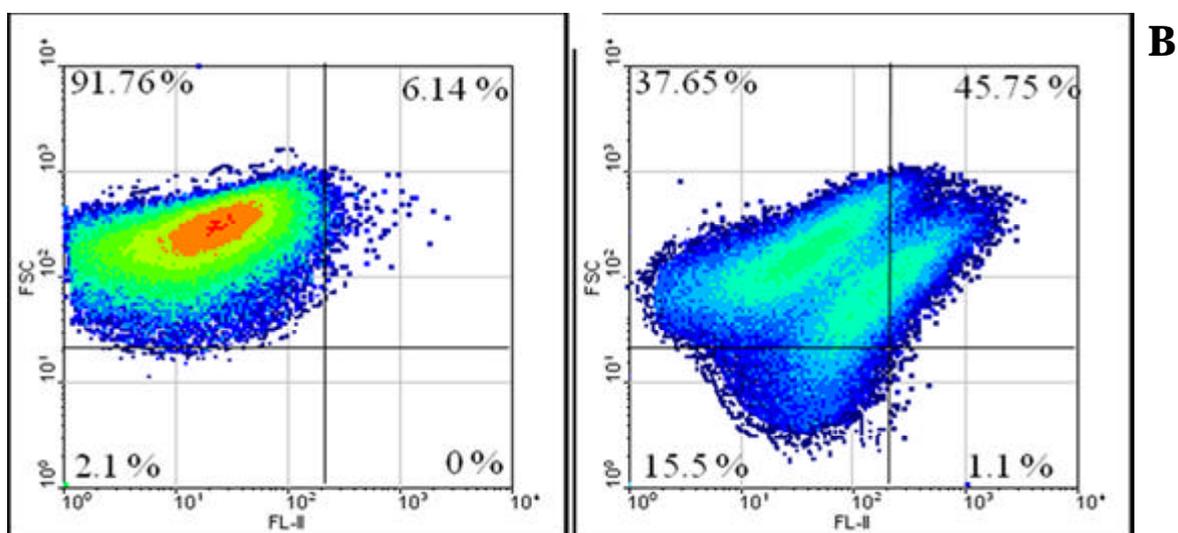
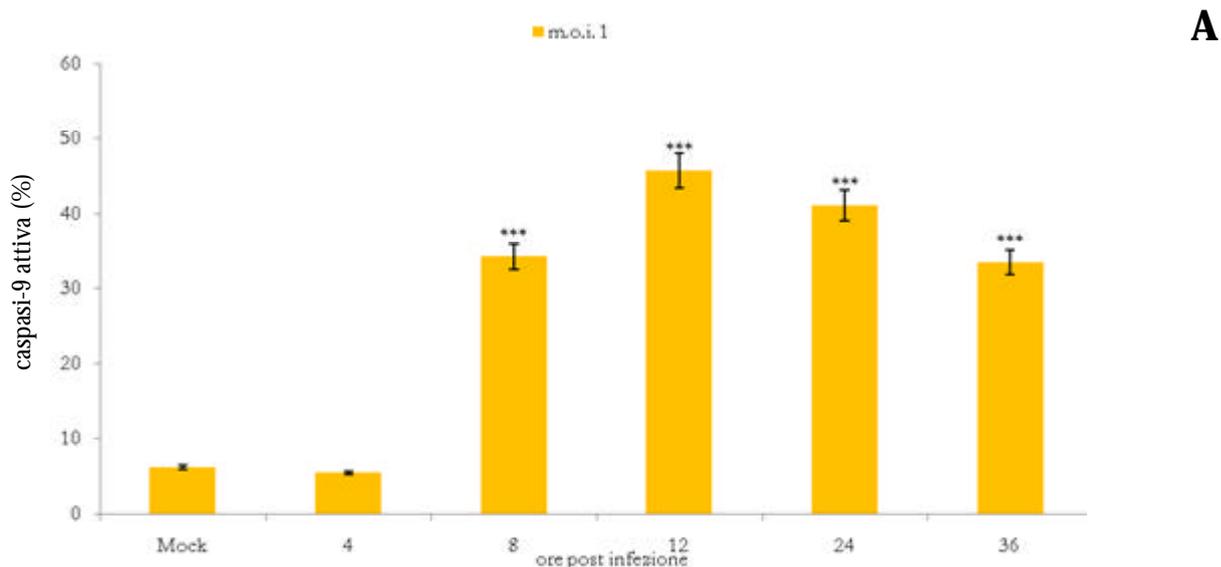


Fig.22: Test Flica per caspasi-9

Legenda. A: Quantificazione dell'espressione di caspasi-9 mediante citofluorimetria a flusso. I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (*P <0.05, **P<0.01, ***P<0.001); B: Esempio di analisi citofluorimetriche eseguite con Flica Assay kit. A sinistra, Dot Plot delle cellule MDBK mock infected; a destra, Dot Plot delle cellule MDBK infettate a 12 ore p.i.

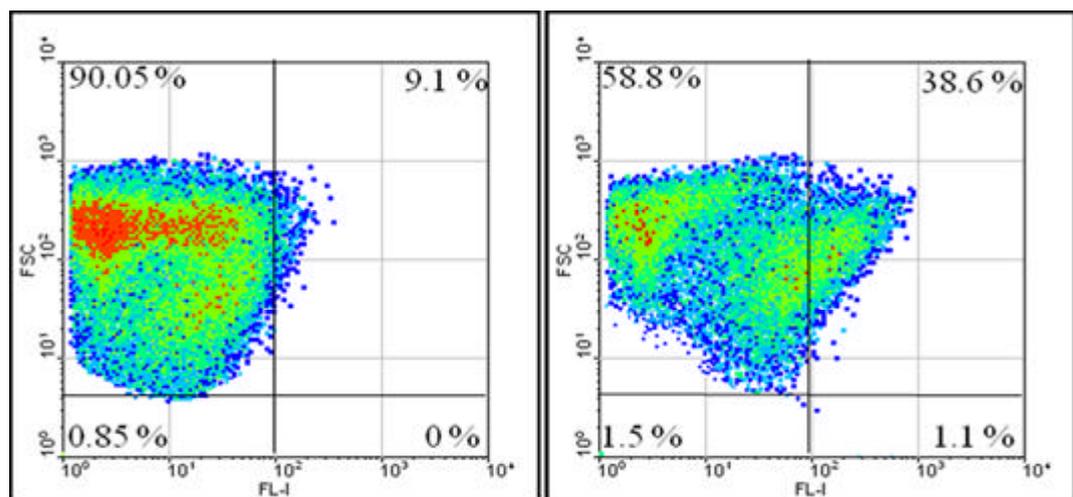
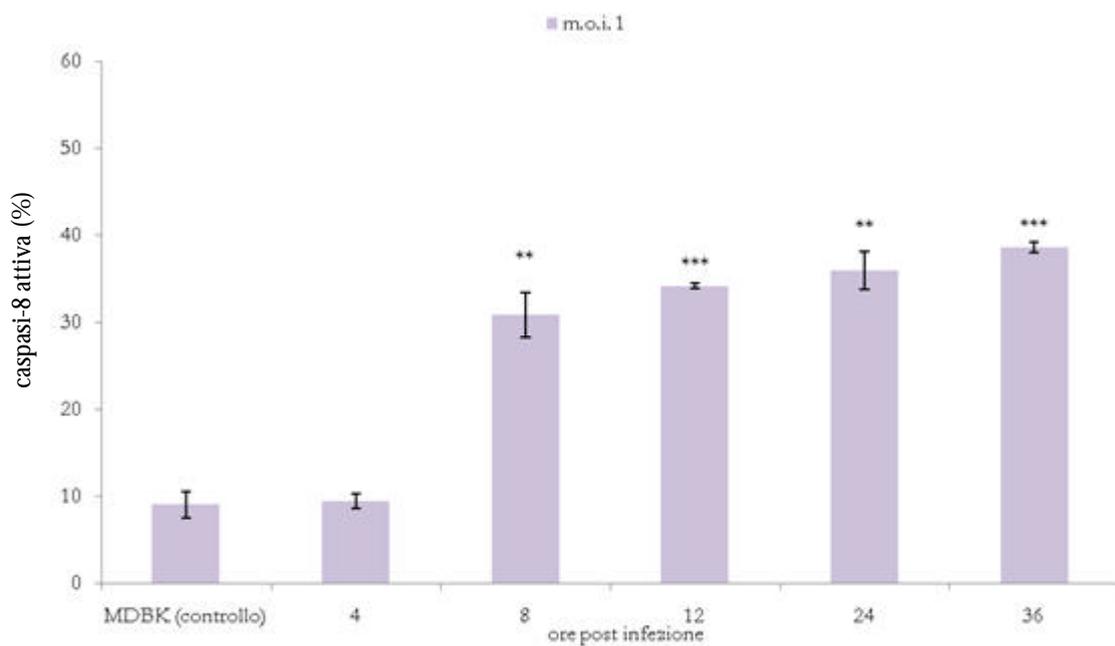


Fig.23: Test Flica per caspasi-8

Legenda. A: Quantificazione dell'espressione di caspasi-8 mediante citofluorimetria a flusso. I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (**P<0.01, ***P<0.001); B: Esempio di analisi citofluorimetriche eseguite con Flica Assay kit. A sinistra, Dot Plot delle cellule MDBK mock infected; a destra, Dot Plot delle cellule MDBK infettate, a 12 ore p.i.

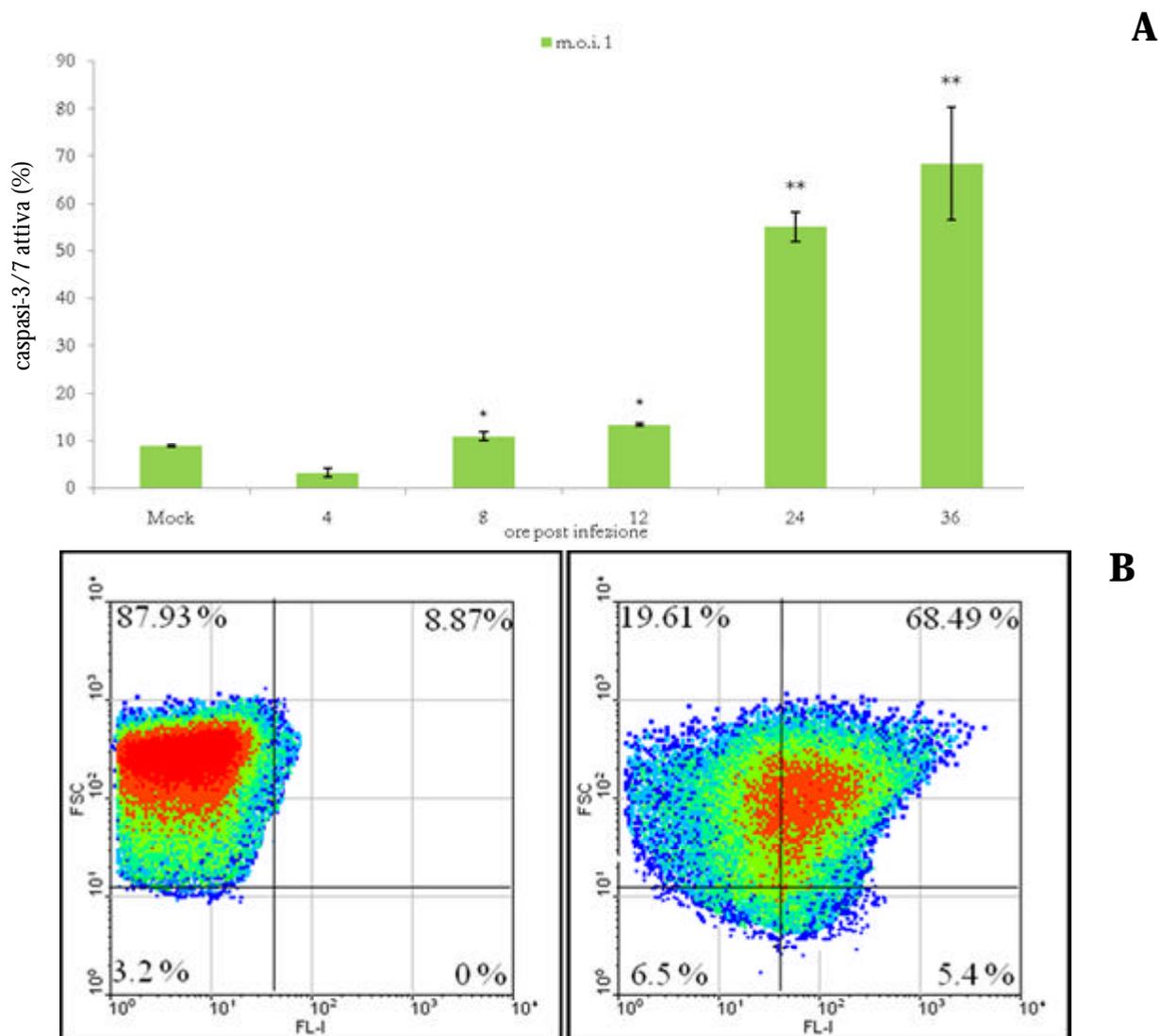


Fig.24: Test Flica per caspasi-3/7

Legenda. A: Quantificazione dell'espressione di caspasi-3 mediante citofluorimetria a flusso. I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$); Esempio di analisi citofluorimetriche eseguite con Flica Assay kit. B: A sinistra, Dot Plot delle cellule MDBK mock infected; a destra, Dot Plot delle cellule MDBK infettate a 24 ore p.i.

Inibizione dell'apoptosi

La caratterizzazione degli eventi apoptotici indotti da CpHV-1 in cellule MDBK è stata poi valutata con l'impiego di inibitori delle caspasi. A 24 ore p.i., in cellule MDBK infettate con CpHV-1 a m.o.i. 1 è stata riscontrata, esclusivamente nelle cellule trattate con gli inibitori delle caspasi, una riduzione dell'apoptosi, significativa ($p < 0.05$) in presenza dell'inibitore generale delle caspasi (Z-VAD-FM) e dell'inibitore di caspasi-9 (Z-LEHD-FMK), estremamente significativa nel caso dell'utilizzo dell'inibitore di caspasi-3 (Z-DEVD-FMK) e dell'inibitore di caspasi-8 (Z-IETD-FMK) (*Fig. 27*). Inoltre, si è assistito ad un aumento del titolo virale in cellule infettate con CpHV-1 a m.o.i. 1 trattate con Z-VAD-FM, Z-DEVD-FMK e con Z-IETD-FMK (*Fig. 28*).

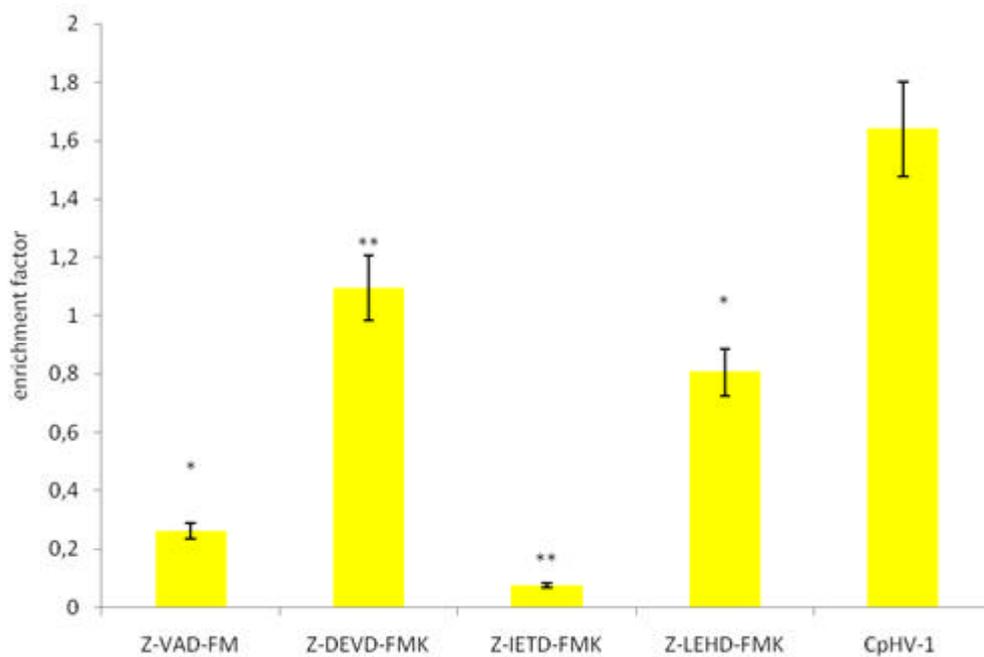


Fig. 25: Inibizione dell'apoptosi

I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

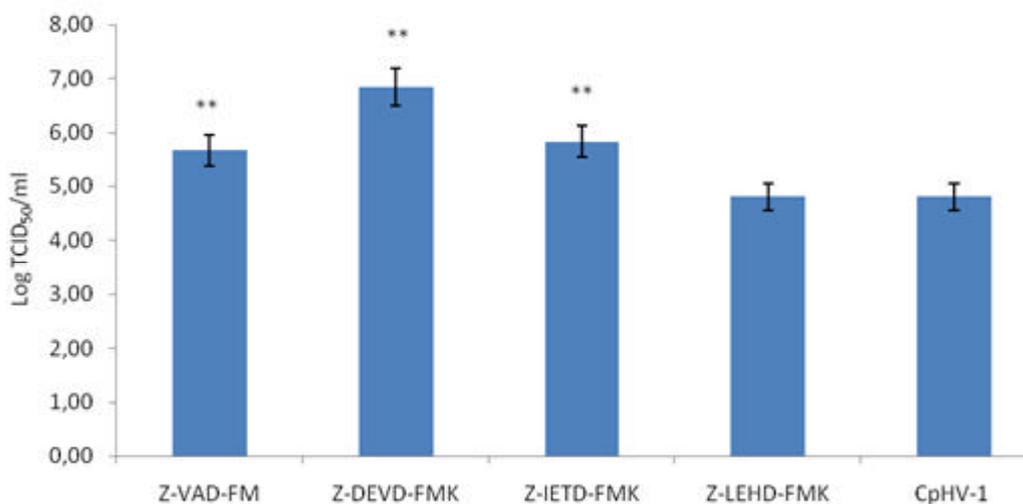


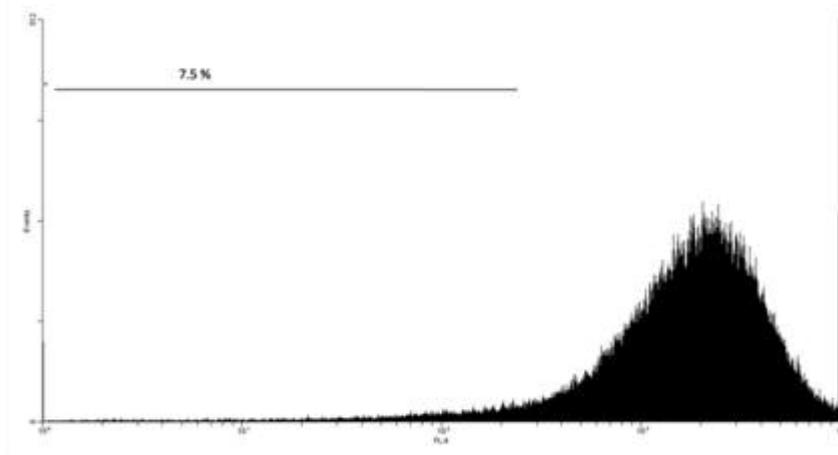
Fig. 26: Effetto degli inibitori delle caspasi sul titolo virale

I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (** $P < 0.01$)

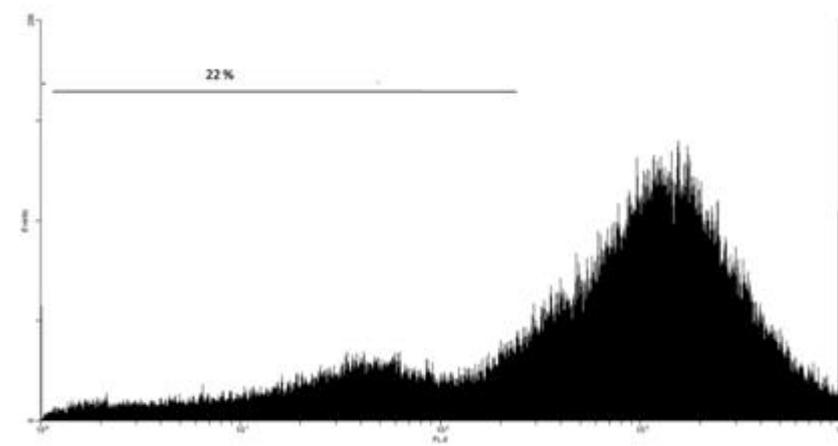
Eventi mitocondriali

- Cambiamenti della membrana mitocondriale

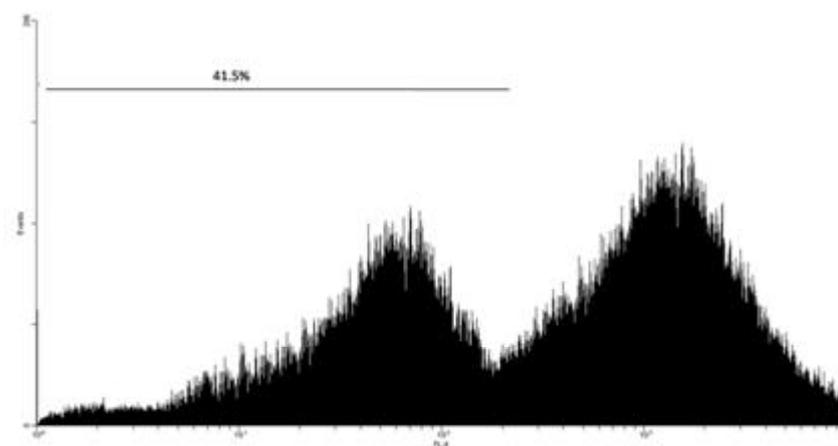
Dopo l'induzione dell'apoptosi, uno dei primi eventi intracellulari che si verifica è la perdita di potenziale della membrana interna mitocondriale che coincide con l'aumento della permeabilità mitocondriale, portando infine al rilascio del citocromo c. In *Fig. 27*, sono riportati gli istogrammi raffiguranti l'intensità di fluorescenza (FL-1 channel) delle cellule MDBK, infettate con CpHV-1, a 24 ore p.i. Dall'analisi dell'istogramma delle cellule mock infected (*Fig. 27 A*), si evidenziava una ridotta percentuale di cellule che presentano un'alterata permeabilità di membrana (7.5%). Nelle cellule infettate è stata osservata, invece, una distribuzione bimodale dell'intensità di fluorescenza, indice che una parte delle cellule è in apoptosi. Gli esperimenti eseguiti hanno dimostrato che già 8 a ore post infezione, circa il 22% della popolazione cellulare infettata con CpHV-1 a m.o.i. 1 presentava una riduzione significativa ($p < 0.05$) del potenziale di membrana (*Fig. 27 B*), che a 12 e 24 ore p.i. si riduceva, in modo estremamente significativo ($p < 0.01$) rispetto al controllo, del 41.5% e del 63.6% (*Fig. 27 C e D*) (*Fig. 28*).



A



B



C

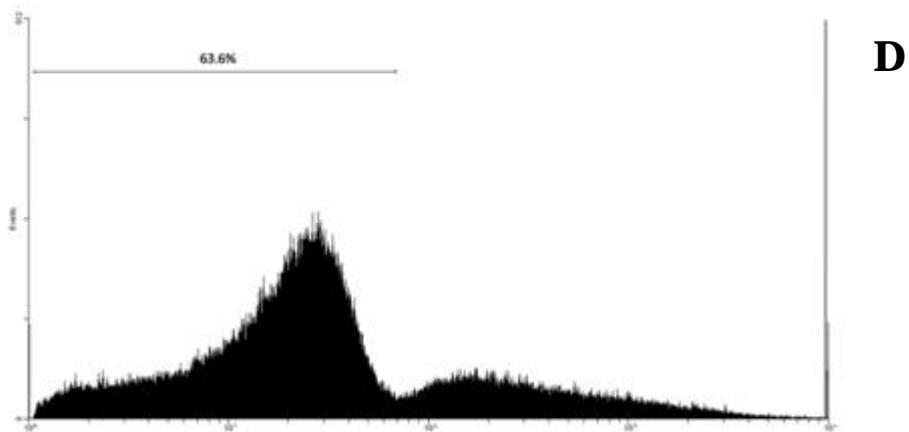


Fig. 27: Valutazione del potenziale di membrana mitocondriale mediante citofluorimetria a flusso

Legenda. A: Istogramma delle cellule mock infected; B: Istogramma delle cellule MDBK infettate con CpHV-1 m.o.i. 1 a 8 ore p.i.; C: Istogramma delle cellule MDBK infettate con CpHV-1 m.o.i. 1 a 12 ore p.i.; D: Istogramma delle cellule MDBK infettate con CpHV-1 m.o.i. 1 a 24 ore p.i.;

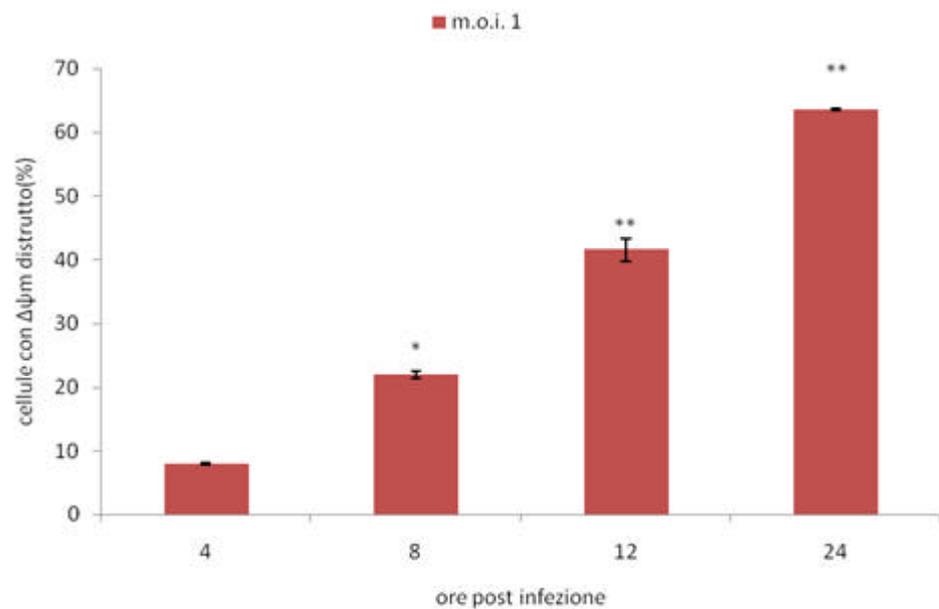


Fig. 28: Quantificazione del potenziale di membrana interna mediante citofluorimetria a flusso

I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (*P < 0.05, **P < 0.01)

- *Traslocazione del citocromo C*

L'apoptosi indotta attraverso il pathway mitocondriale è attivata in risposta sia a stimoli pro-apoptotici interni che a segnali extracellulari. In entrambi i casi, si verifica il rilascio di diverse proteine coinvolte nel proseguo dell'apoptosi come la proteina secondaria attivatrice delle caspasi (SMAC), il fattore inducente l'apoptosi (AIF) e il citocromo c (Orrenius, 2003). Quest'ultimo interagisce con il recettore inositolo trifosfato (IP3) presente sul reticolo endoplasmatico, causando il rilascio di ioni calcio (Ca^{2+}) che a sua volta attiva caspasi-9. In cellule MDBK infettate con CpHV-1 a m.o.i. 1 è stato possibile visualizzare la presenza del citocromo C nel citosol già a partire da 8 ore p.i. (*Fig 29*).

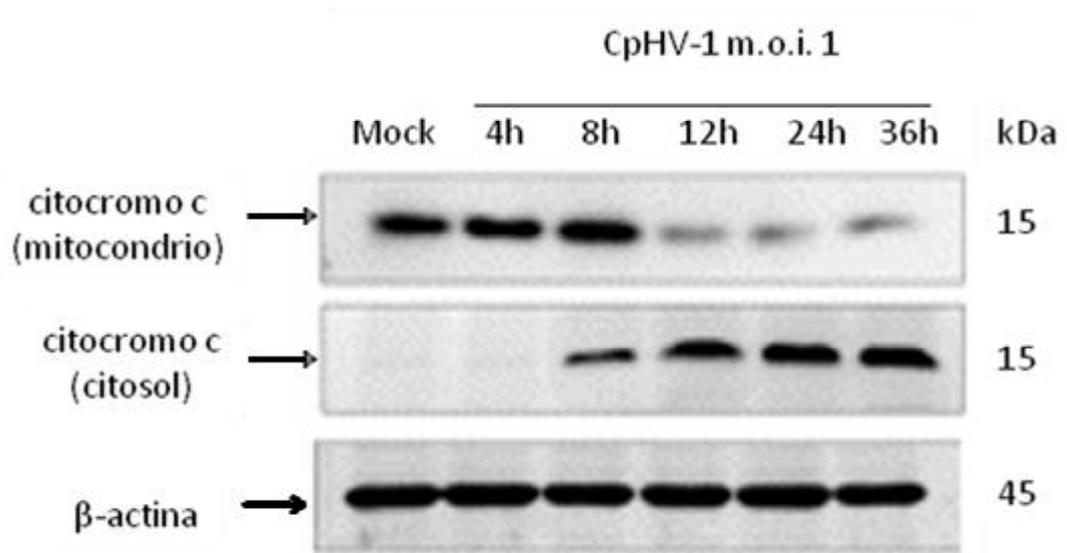


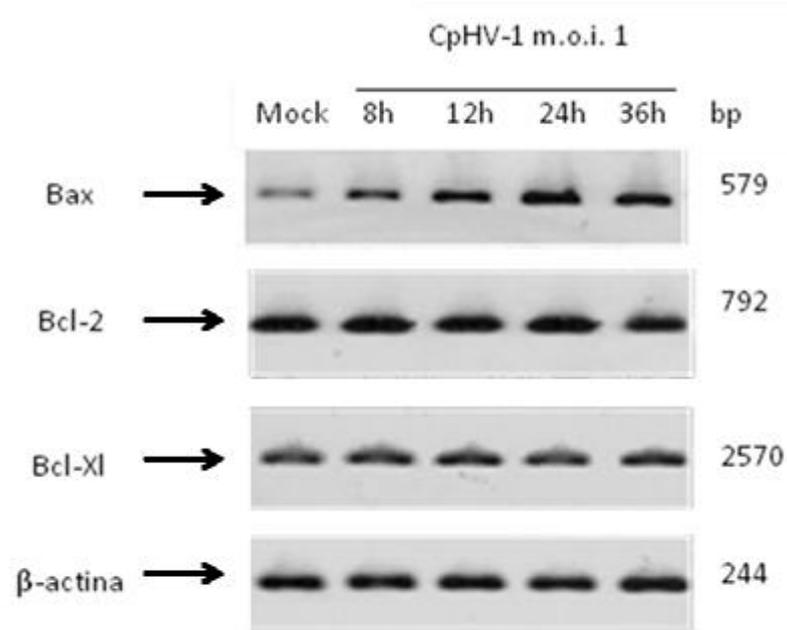
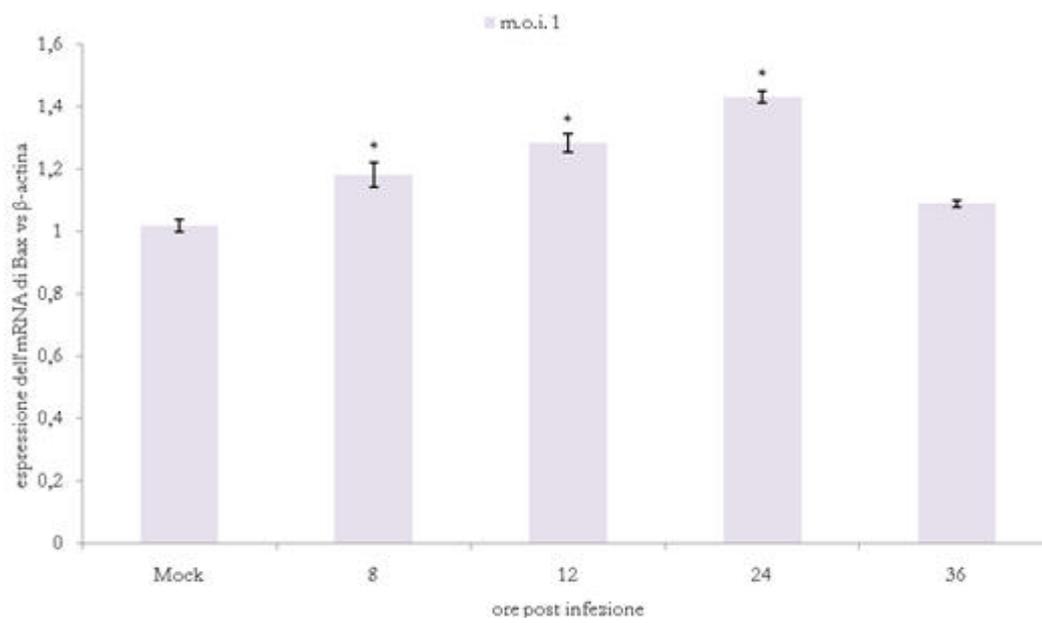
Fig 29: Traslocazione del Citocromo C

- *Famiglia Bcl-2*

Le proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 sono responsabili della regolazione dell'apoptosi attraverso il coinvolgimento del pathway mitocondriale. Esse controllano la permeabilità di membrana dei mitocondri e si distinguono in membri pro-apoptotici, come Bax e Bid, e anti-apoptotici, come Bcl-2 e Bcl-X_L.

Inizialmente, mediante analisi Northern Blotting, è stato analizzato il livello di RNA messaggero (mRNA) dei geni di alcuni membri della famiglia Bcl-2 (*Fig. 30 A*). L'infezione delle MDBK con CpHV-1 a m.o.i. 1 determina un incremento significativo ($p < 0.05$) dell'espressione dell'mRNA di Bax (*Fig. 30 B*), gene pro-apoptico, da 8 ore p.i. a 24 ore p.i., per poi diminuire a 36 ore p.i. Mentre i livelli di mRNA di Bcl-2 e Bcl-X_L non erano significativamente differenti dal controllo a tutti i tempi studiati (*Fig. 30 C e D*).

È stata valutata poi tramite Western Blotting, anche l'espressione delle proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 (*Fig. 31 A*). I livelli di Bax, espresso durante tutta l'infezione, aumentavano significativamente rispetto al controllo già a partire da 8 ore p.i., mentre da 12 a 36 ore p.i. l'incremento diminuiva in maniera tempo-dipendente (*Fig. 31 B*). Mentre l'espressione di Bid, presente durante tutta l'infezione, diminuiva significativamente già da 8 ore p.i. fino alla fine dell'infezione stessa (*Fig. 31 C*). I livelli di Bcl-2, espresso durante tutta l'infezione, sono risultati inferiori rispetto al controllo già a partire da 8 ore p.i. con un decremento sempre più spinto, durante tutta l'infezione (*Fig. 31 D*). Mentre l'espressione di Bcl-X_L nelle cellule infettate con CpHV-1 era valutata durante tutta l'infezione e non differiva da quella del controllo a tutti i tempi testati (*Fig. 31 E*).

A**B**

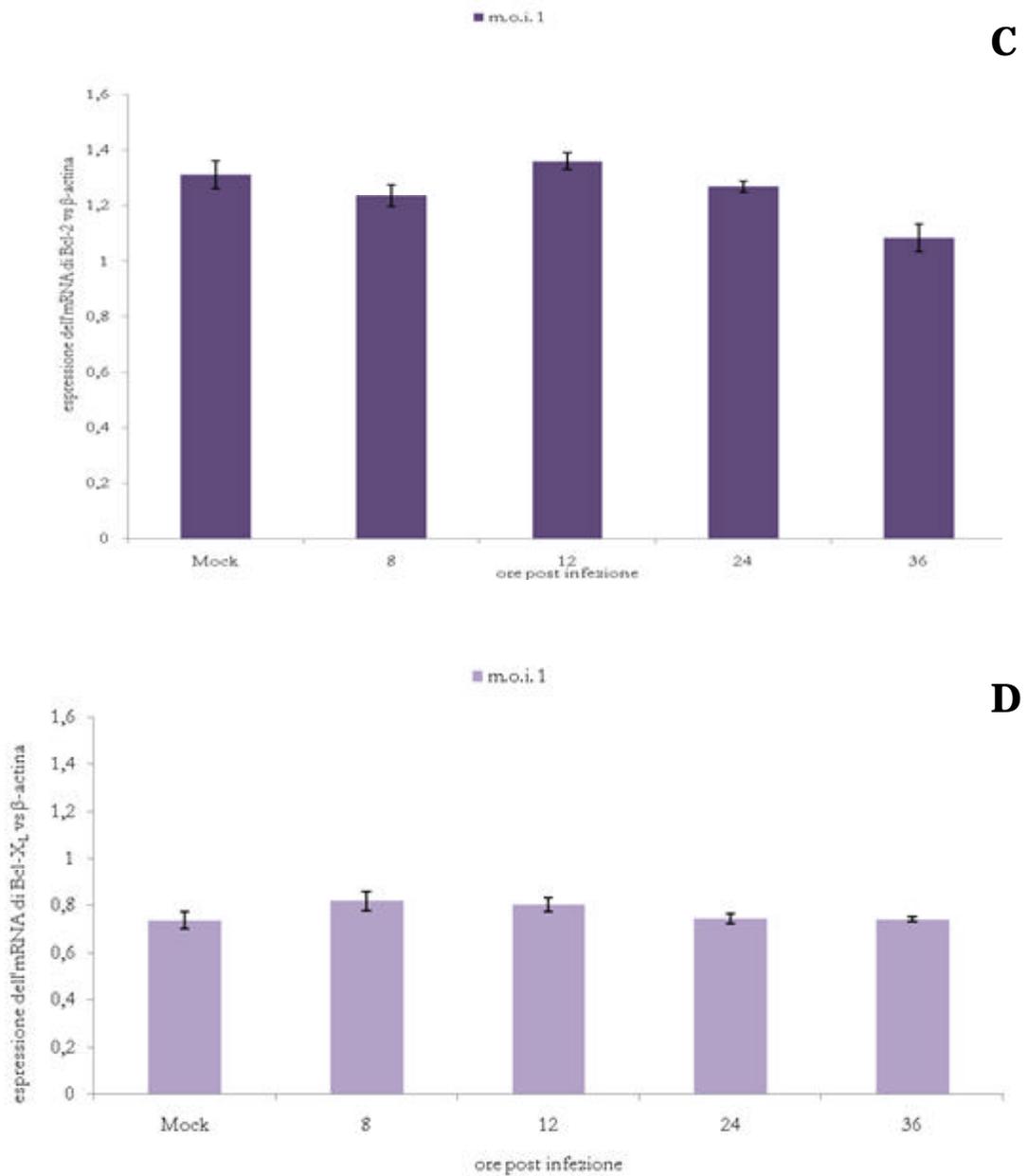
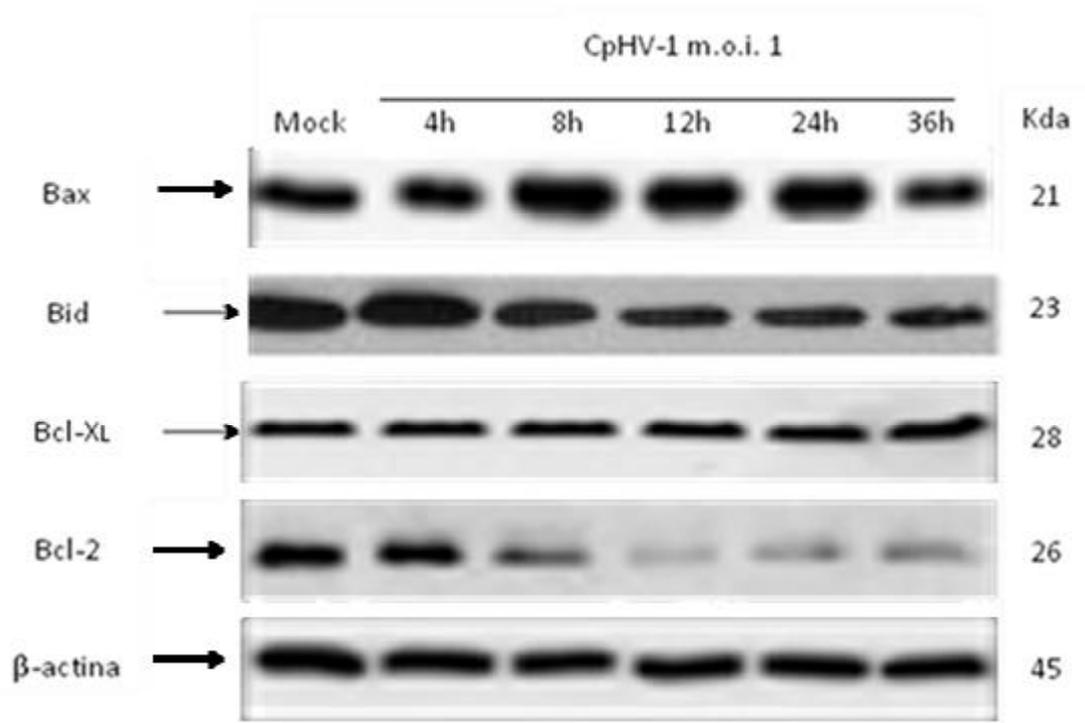
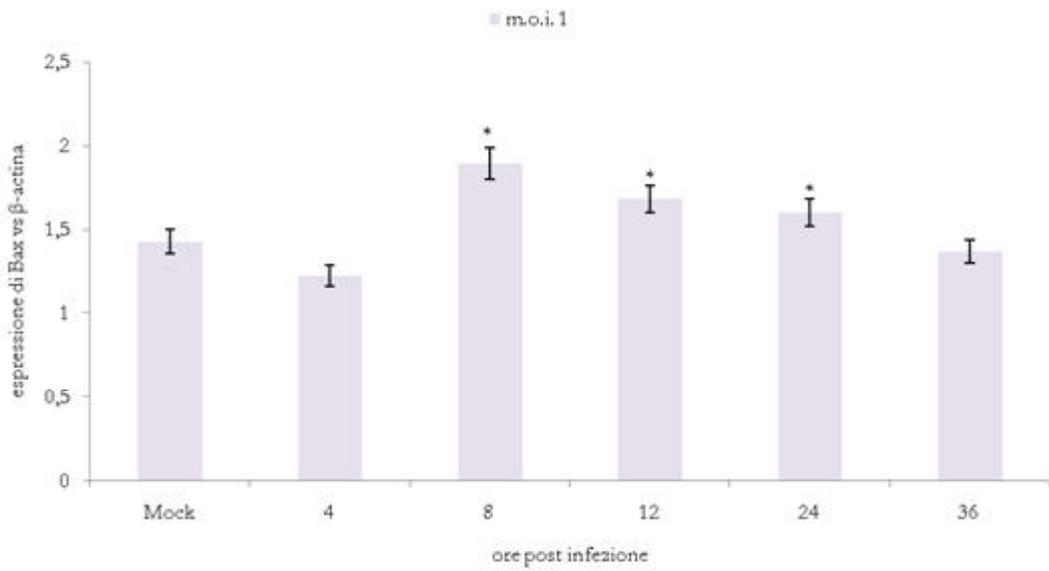


Fig. 30: Espressione dell'mRNA di alcuni membri della famiglia Bcl-2

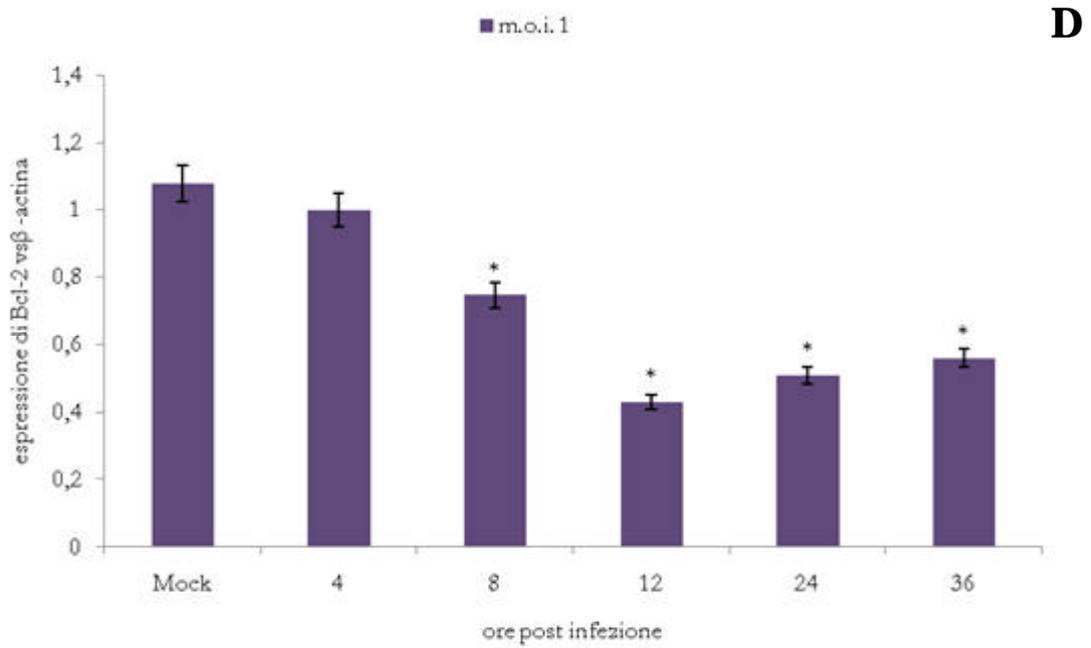
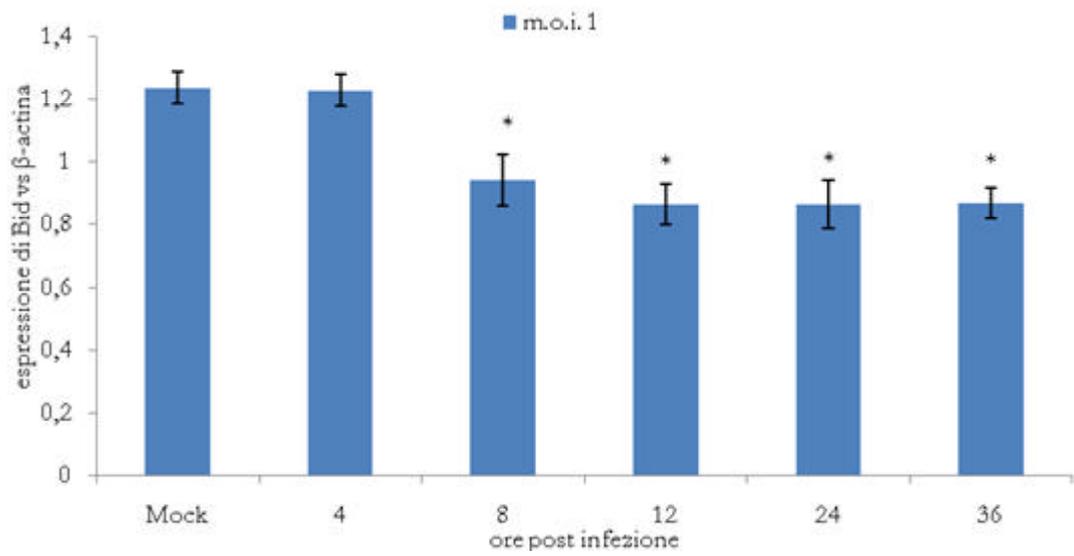
A: Northern Blotting di alcuni membri della famiglia Bcl-2; B: mRNA di Bax (β -actina: controllo interno). I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (P * $<$ 0.05); C B: mRNA di Bcl-2 (β -actina: controllo interno). I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (P * $<$ 0.05); D B: mRNA di Bcl-X_L (β -actina: controllo interno). I valori rappresentano la media (\pm SD) di tre esperimenti indipendenti. (P * $<$ 0.05)



A



B



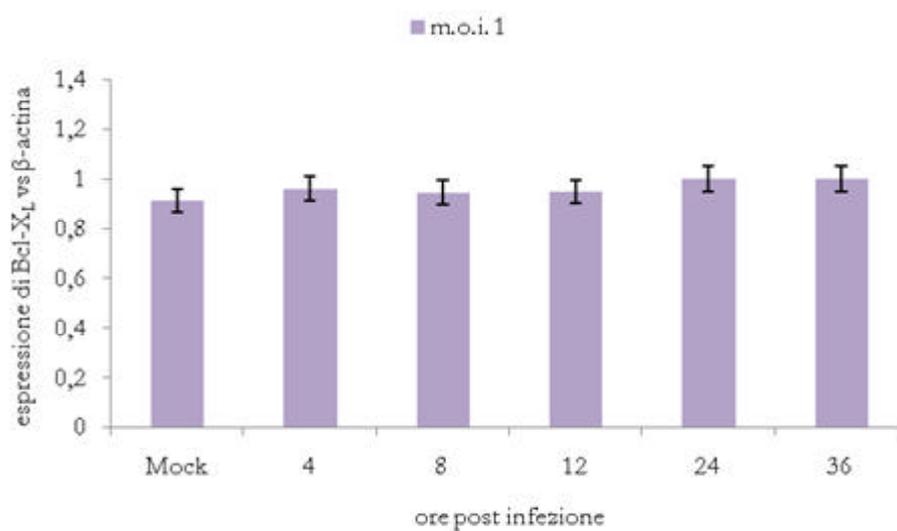
E

Fig. 31: Espressione di alcuni membri della famiglia Bcl-2

A: Western blotting di alcuni membri della famiglia Bcl-2; B: Bax (β-actina: controllo interno). I valori rappresentano la media (± SD) di tre esperimenti indipendenti ($P < 0.05$); C: Bid (β-actina: controllo interno). I valori rappresentano la media (± SD) di tre esperimenti indipendenti ($P < 0.05$); D: Bcl-2 (β-actina: controllo interno). I valori rappresentano la media (± SD) di tre esperimenti indipendenti ($P < 0.05$); E: Bcl-X_L (β-actina: controllo interno).

DISCUSSIONE

L'apoptosi è una forma di morte cellulare, finemente regolata e direttamente attivata dalle cellule in risposta a stimoli diversi, endogeni ed esogeni, che intervengono durante il normale sviluppo dell'organismo o in corso di situazioni patologiche, come le infezioni virali (Thompson, 1995). Lo studio dei meccanismi attraverso cui i virus controllano l'apoptosi ha fornito già in passato delucidazioni importanti, relative ad alcune fasi centrali del processo apoptotico.

Caprine Herpesvirus 1 è responsabile di infezioni sistemiche e letali nei capretti di 1-2 settimane di vita, mentre nei soggetti adulti provoca infezioni respiratorie subcliniche, ma anche infezioni genitali, come vulvovaginite e balanopostite, ed aborto (Roperto *et al.*, 2000). Studi precedenti hanno dimostrato che CpHV-1 determina apoptosi in cellule mononucleate di sangue (Pagnini *et al.*, 2005), al pari di BoHV-1 (Hanon *et al.*, 1997, 1998; Winkler *et al.*, 1999; Delhon *et al.*, 2002), antigenicamente e geneticamente correlato ad esso. Poiché BoHV-1 induce apoptosi anche in cellule di origine epiteliale (Devireddy & Jones, 1999; Geiser *et al.*, 2008), in questo lavoro è stata analizzata, per la prima volta, la capacità di CpHV-1 di indurre apoptosi in cellule epiteliali permissive, quali le MDBK. Inoltre, sono state messe in luce alcune caratteristiche del processo apoptotico che si verifica in questo substrato. Pertanto, la descrizione della capacità di CpHV-1 di interagire con i meccanismi che presiedono alla morte cellulare programmata potrebbe aprire nuove prospettive nella comprensione dei meccanismi che sottintendono la patogenesi dell'infezione causata da questo virus.

Al fine di dimostrare ma anche di caratterizzare l'apoptosi CpHV-1-indotta, sono stati utilizzati parametri diversi che hanno evidenziato i tipici cambiamenti morfologici e biochimici delle cellule che vanno in apoptosi. In questo lavoro, innanzitutto, è stata dimostrata la diminuzione dose-tempo dipendente della vitalità cellulare in seguito al contatto tra CpHV-1 e le cellule MDBK, oltre che l'associazione tra tale diminuzione e la produzione di nuova progenie virale. Ciò indica la capacità di CpHV-1 di interagire e di utilizzare l'apparato biosintetico delle cellule MDBK a proprio vantaggio, rilasciando nuova progenie virale. Tale comportamento era stato già riscontrato nell'interazione tra BoHV-1 e cellule MDBK (Devireddy & Jones, 1999).

Dal punto di vista morfologico, già a 12 ore p.i. è stato possibile riscontrare nelle cellule infettate con CpHV-1 il compattamento del nucleo e della cromatina, la contrazione del citoplasma fino al collasso in corpi apoptotici, la frammentazione nucleare ed il blebbing della membrana plasmatica. Questi fenomeni sono espressione di reazioni biochimiche che avvengono nella cellula, come la degradazione del DNA cromosomico. A partire da 24 ore p.i., infatti, è stato visualizzato il DNA laddering nelle cellule infettate a tutte le m.o.i. testate. Questi dati dimostrano chiaramente che CpHV-1 è in grado di indurre apoptosi in cellule MDBK, così come accade in altri substrati quali le PBMC (Pagnini et al., 2005). Inoltre, in confronto all'apoptosi BoHV-1-indotta in cellule MDBK, dove la condensazione della cromatina era presente in una minima parte della popolazione cellulare infettata a 24 ore p.i., mentre il fenomeno s'intensificava progressivamente a 36 e 48 ore p.i. (Devireddy & Jones, 1999) ed il DNA laddering si evidenziava solo a partire da 48 ore p.i. (Devireddy & Jones, 1999), CpHV-1 provoca precocemente apoptosi nelle

MDBK, cellule di origine epiteliale, che generalmente risultano più resistenti alla morte cellulare programmata (Wesselborg *et al.*, 1993).

Così come era stato riportato precedentemente per le cellule della serie bianca (Pagnini *et al.*, 2005), i risultati del nostro lavoro hanno dimostrato che CpHV-1 induce apoptosi nelle cellule di origine epiteliale in maniera dose-tempo dipendente, anche se tale evento si verifica anticipatamente rispetto alle PBMC. L'analisi del picco ipodiploide, infatti, ha messo in evidenza che il processo apoptotico nelle MDBK infettate con CpHV-1 a m.o.i. 1 e 10 aveva inizio a 8 ore p.i. e s'intensificava a 12 ore p.i. Nella popolazione cellulare infettata a m.o.i. 0.1, invece, il picco diventava significativo a 12 ore p.i. e aumentava notevolmente a 24 ore p.i. Mentre a 36 ore p.i. le cellule infettate a tutte le m.o.i. testate mostravano un'elevata percentuale di apoptosi. Gli esperimenti condotti sulle PBMC da Pagnini *et al.* (2005), invece, avevano provato che la percentuale della popolazione cellulare infettata con CpHV-1 a m.o.i. 10 in sub G1 era piuttosto bassa a 12 ore p.i., ma saliva ai tempi successivi. Anche nella popolazione cellulare infettata a m.o.i. 0.1, veniva riscontrata una bassa percentuale di nuclei ipodiploidi a 24 ore p.i., mentre a 48 ore p.i. le cellule infettate a tutte le m.o.i. testate mostravano apoptosi in maniera dose-tempo dipendente (Pagnini *et al.*, 2005). Infine, nel confronto con l'apoptosi BoHV-1-indotta in cellule bovine, dove l'analisi citofluorimetrica evidenzia la morte cellulare programmata solo nelle ultime ore d'infezione (Geiser *et al.*, 2008), ancora una volta i nostri dati mostrano che CpHV-1 induce precocemente apoptosi in cellule MDBK.

I segnali che conducono alla morte cellulare programmata possono provenire sia dalle interazioni di ligandi extracellulari a recettori specifici esposti sulla membrana plasmatica, che da eventi apoptotici mitocondriali.

I principali effetti sulla funzionalità mitocondriale riguardano la perdita del controllo sulla catena respiratoria e sul mantenimento del volume dell'organello, la permeabilizzazione della membrana esterna ai soluti e alle proteine, il calo della differenza del potenziale transmembranario ($\Delta\psi_m$), la liberazione del citocromo C. Tutti questi eventi costituiscono un momento essenziale della cascata apoptotica e contribuiscono al suo svolgimento. In seguito all'infezione delle MDBK con CpHV-1, si verifica la caduta del potenziale di membrana già a 8 ore p.i., quando risultano attive principalmente le caspasi iniziatrici 8 e 9, ed in minima parte anche caspasi-3. Questi dati confermerebbero l'ipotesi secondo la quale il mitocondrio sarebbe uno dei bersagli più precoci dell'attivazione delle caspasi durante l'apoptosi (Ricci *et al.*, 2003). In generale, le caspasi svolgono un ruolo centrale nell'esecuzione del processo apoptotico. In seguito all'attivazione, questi enzimi processano substrati specifici e mediano molte delle alterazioni morfologiche e biochimiche che avvengono nelle cellule apoptotiche (Elmore, 2007). L'apoptosi indotta da CpHV-1 risulta associata all'attivazione sia di caspasi-8 che di caspasi-9. Tale correlazione è stata rilevata mediante western blotting e citofluorimetria a flusso. In particolare, per quanto riguarda gli Herpesvirus, anche BoHV-1 induce contemporaneamente l'attivazione delle caspasi iniziatrici 8 e 9 in cellule MDBK, nonostante tale evento si verifichi solo a partire da 12 ore p.i. (Fiorito *et al.*, 2008), così come l'infezione da Herpes Simplex Virus 1 in cellule epiteliali determina il clivaggio di caspasi-9 e, anche se in minima parte, l'attivazione di caspasi-8, sempre a 12 ore p.i. (Aubert *et al.*, 2007). Tuttavia, è ipotizzabile che il pathway biochimico protagonista dell'apoptosi indotta da CpHV-1 interessi principalmente caspasi-8 che determina l'attivazione di caspasi-9 e delle caspasi effettrici, a cui segue la frammentazione del DNA ed il

clivaggio di PARP. Infatti, nonostante la differenza nell'attivazione di caspasi-8 e di caspasi-9 non risulti estremamente significativa a 8 ore p.i., l'attivazione di caspasi-8 si manteneva costante nel tempo fino a 36 ore p.i., a differenza di caspasi-9, la cui attivazione diminuiva già a 24 ore p.i. Inoltre, il clivaggio di Bid, da 8 ore p.i. fino alla fine dell'infezione produttiva, indica che i segnali apoptotici dal pathway di caspasi-8 vengono convogliati nel pathway mitocondriale, determinando il rilascio del citocromo C nel citoplasma che determina l'attivazione della caspasi-9. Questo rappresenta un esempio di "cross-talk" tra i pathways recettoriale e mitocondriale (Elmore, 2007). Questi risultati differiscono da quelli ottenuti da ^bFiorito *et al.* (2008) che hanno dimostrato l'espressione costante di Bid durante tutta l'infezione indotta da BoHV-1 in cellule MDBK, e la diminuzione dei livelli della proteina solo dopo 24 ore dall'infezione.

In generale, l'attivazione di caspasi-8 è mediata da molecole presenti sulla superficie cellulare come ad esempio Fas o TNF, pertanto è possibile che CpHV-1 attivi caspasi-8 durante l'ingresso nella cellula. I risultati da noi ottenuti concordano con lo studio effettuato da Geiser *et al.* (2008) che ha dimostrato la capacità di BoHV-1 di indurre apoptosi in cellule MDBK, in seguito all'interazione recettoriale virus-cellula. Infine, nelle cellule infettate con CpHV-1, la caspasi-3 risulta attiva a partire da 8 ore p.i., così come, a questo stesso tempo, è possibile valutare il clivaggio di PARP. BoHV-1, invece, determina più tardivamente l'attivazione della caspasi effettrice e il taglio in due subunità della proteina poli-ADP-ribosio-polimerasi (Devireddy and Jones, 1999; ^bFiorito *et al.*, 2008).

Durante l'apoptosi, il bilanciamento tra i membri pro-apoptotici (come Bax, Bid, o Bad) e anti-apoptotici (Bcl-X_L e Bcl-2) della famiglia Bcl-2

viene compromesso. In particolare, l'attivazione di Bid da parte di caspasi-8 determina la formazione di oligomeri di Bax che rendono permeabile la membrana mitocondriale esterna, permettendo la liberazione del citocromo C, necessario per l'attivazione di caspasi-9 (Korsmeyer *et al.*, 2000). Nelle cellule infettate con CpHV-1, è stato dimostrato che sia l'mRNA di Bax, sia la proteina Bax sono significativamente presenti a partire da 8 ore p.i. fino a 24 ore p.i., quando appunto si attiva Bid.

Per quanto riguarda invece i membri anti-apoptotici della famiglia Bcl-2, cioè Bcl-2 e Bcl-X_L, i livelli di mRNA nelle cellule MDBK rimanevano invariati nel corso dell'infezione da CpHV-1 rispetto al controllo, mentre l'espressione delle relative proteine era inferiore rispetto al controllo già a partire da 8 ore p.i. Questo dimostra che non c'è alcuna interferenza da parte del virus nella trascrizione dei geni della famiglia Bcl-2 ma che, com'è stato dimostrato in passato (Fadeel *et al.*, 1999), la regolazione dell'espressione di Bcl-2 dipende dalle caspasi, che risultano attive già a 8 ore p.i. L'espressione delle proteine appartenenti alla famiglia Bcl-2 nelle cellule MDBK infettate con BoHV-1 è stata studiata recentemente da Fiorito *et al.* (2008) che hanno dimostrato un aumento di espressione di Bax in funzione del tempo ed una diminuzione dei livelli di Bcl-2 e Bcl-X_L solo dopo 36 ore p.i. Questi risultati hanno messo in evidenza la capacità di BoHV-1 di indurre apoptosi nelle ultime fasi dell'infezione a differenza di CpHV-1 che è responsabile di questi eventi più precocemente.

Infine, dallo studio degli effetti degli inibitori specifici delle caspasi sull'infezione da CpHV-1 nelle cellule MDBK, si deduce che l'inibizione dei pathway biochimici principalmente coinvolti nell'apoptosi CpHV-1-indotta facilita la liberazione di nuova progenie virale. Al contrario, durante l'infezione delle cellule MDBK con BoHV-1, l'utilizzo dell'inibitore di caspasi-3 riduceva il rilascio del virus, facendo ipotizzare che l'attivazione

delle caspasi interferisse con la liberazione della progenie virale (Devireddy & Jones, 1999). In generale, si suppone che l'apoptosi indotta dal virus e/o l'attivazione delle caspasi siano eventi sfavorevoli alla replicazione del virus e alla sua diffusione. Ma l'infezione virale rappresenta anche uno stimolo che può agire in maniera positiva sull'apoptosi (Elmore, 2007). Inoltre, l'apoptosi indotta dal virus è vista anche come un evento per promuovere la diffusione virale, poiché il virus stesso potrebbe dare inizio al programma apoptotico per promuovere la sua stessa disseminazione (Everett & McFadden, 1999).

L'apoptosi indotta da CpHV-1 potrebbe spiegare alcuni aspetti dell'infezione virale, ancora poco conosciuti, e gettare luce su meccanismi di interazione tra cellule e virus, che andranno ulteriormente indagati.

Nelle cellule infettate, l'apoptosi rappresenta un efficiente meccanismo sfruttato dal virus per indurre la morte cellulare e disseminare la progenie virale, limitando la risposta infiammatoria e immunitaria. Infatti è probabile che tale evento venga indotto nella cellula nel momento in cui la replicazione virale è stata completata, e che i virioni vengano disseminati all'interno dei corpi apoptotici, isolati dall'azione di molecole extracellulari di vario tipo (anticorpi neutralizzanti, citochine, enzimi) (Hardwick, 1998; Griffin & Hardwick, 1999). Entrambi questi significati potrebbero essere attribuiti all'apoptosi indotta da CpHV-1 che, come abbiamo dimostrato in questo lavoro, è in grado di indurre una precoce e potente attività apoptotica in cellule MDBK. Inoltre, l'apoptosi indotta dal virus potrebbe contribuire alla conoscenza del meccanismo patogenetico, alla citotossicità e alle manifestazioni cliniche legate alla malattia così come riferiscono Teodoro & Branton (1997). Il meccanismo patogenetico con cui CpHV-1 induce malattia non è noto in tutti i suoi aspetti. Ulteriori studi si rendono

necessari per meglio indagare gli altri aspetti dell'apoptosi indotta da CpHV-1, con l'obiettivo di chiarire quanto prima la patogenesi di una malattia che, soprattutto negli allevamenti ovi-caprini del Sud Italia, è ancora responsabile di gravi perdite economiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Alemañ N, Quiroga MI, López-Peña M, Vázquez S, Guerrero FH, Nieto JM. Induction and inhibition of apoptosis by pseudorabies virus in the trigeminal ganglion during acute infection of swine. *J Virol.* 2001; 75(1):469-79.
2. Ameisen JC. On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ.* 2002; 9(4):367-93.
3. Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol.* 1990; 136(3):593-608.
4. Ashkenazi A & Dixit VM Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281:1305-1308
5. Aubert M, Pomeranz LE, Blaho JA. Herpes simplex virus blocks apoptosis by precluding mitochondrial cytochrome c release independent of caspase activation in infected human epithelial cells. *Apoptosis* 2007; 12:19–35
6. Barcy S & Corey L. Herpes simplex inhibits the capacity of lymphoblastoid B cell lines to stimulate CD4+ T cells. *J. Immunol.* 2001; 166(10):6242-6249.
7. Berrios PE, McKercher DG, Knight HD. Pathogenicity of a caprine herpesvirus. *Am. J. Vet. Res.* 1975; 36:1763-1769.
8. Boatright KM & Salvesen GS. Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol.* 2003; 15(6):725-31.
9. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires

- calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem.* 1997; 272(42):26159-65.
10. Buonavoglia C, Tempesta M, Cavalli A, Voigt V, Buonavoglia D, Conserva A, Corrente M. Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1996; 19:275–281.
 11. Chang DW, Ditsworth D, Liu H, Srinivasula SM, Alnemri ES, Yang X. Oligomerization is a general mechanism for the activation of apoptosis initiator and inflammatory procaspases. *J Biol Chem.* 2003; 278(11):16466-9.
 12. Chenier S, Montpetit C, Helie P. Caprine herpesvirus-1 abortion storm in a goat herd in Quebec. *Can. Vet. J.* 2004; 45:241–43.
 13. Clem RJ & Miller LK. Induction and inhibition of apoptosis by insect viruses, in: Tomei LD, Cope FO (Eds.), *Apoptosis II; The Molecular Basis of Cell Death*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1991; pp. 89–110.
 14. Cryns V & Yuan J. Proteases to die for. *Genes. Dev.* 1999; 13(3):371.
 15. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; 13:795– 808.
 16. Deiss LP & Frenkel N. Herpes simplex virus amplicon: cleavage of concatemeric DNA is linked to packaging and involves amplification of the terminally reiterated a sequence. *J. Virol.* 1986; 57:933–941.
 17. Delhon GA, González MJ, Murcia PR. Susceptibility of sensory neurons to apoptosis following infection by bovine herpesvirus type 1. *J Gen Virol.* 2002; 83(Pt 9):2257-67

18. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol.* 2000; 10(9):369-77.
19. Devireddy LR & Jones CJ. Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J. Virol.* 1999; 73(5):3778–3788.
20. Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim Biophys Acta*, 1992, 1133(3):275-85
21. Duvall E, Wyllie AH, Morris RG. Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunology* 1985; 56(2):351-8.
22. Elia G, Tarsitano E, Camero M, Bellacicco AL, Buonavoglia D, Campolo M, Decaro N, Thiry J, Tempesta M. Development of a real-time PCR for the detection and quantitation of caprine herpesvirus 1 in goats. *J Virol Methods.* 2008;148(1-2):155-60.
23. Ellis RE, Yuan Y, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death *Annu Rev Cell Biol.* 1991; 7:663-98.
24. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death *Toxicol Pathol* 2007; 35(4):495–516.
25. Engels M, Gelderblom H, Darai G, Ludwig H. Goat herpesvirus: biological and physicochemical properties. *J. Gen. Virol.* 1983;
26. Everett H & McFadden G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* 1999 Apr;7(4):160-5. Review.
27. Fadeel B, Zhivotovsky B, Orrenius S. All along the watchtower: on the regulation of apoptosis regulators. *FASEB J* 1999; 13:1647–1657.
28. Farina R & Scatozza F. *Trattato di malattie infettive degli animali domestici.* 1998. UTET

29. Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Virology, third edition. 1996
Lippincott-Raven publisher Philadelphia
30. ^aFiorito F, Marfè G, De Blasio E, Granato GE, Tafani M, De Martino L, Montagnaro S, Florio S, Pagnini U. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin regulates Bovine Herpesvirus type 1 induced apoptosis by modulating Bcl-2 family members. *Apoptosis* 2008; 13(10):1243-52.
31. ^bFiorito F, Pagnini U, De Martino L, Montagnaro S, Ciarcia R, Florio S, Pacilio M, Fucito A, Rossi A, Iovane G, Giordano A. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin Increases Bovine Herpesvirus Type-1 (BHV-1) replication in Madin-Darby Bovine Kidney (MDBK) cells in vitro. *J Cell Biochem*, 2008; 103:221–233.
32. Fischer U, Janicke RU, Schulze-Osthoff K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates *Cell Death Differ.* 2003; 10:76–100.
33. Garber DA, Beverley SM, Coen DM. Demonstration of circularization of herpes simplex virus DNA following infection using pulsed field gel electrophoresis. *Virology* 1993; 197:459–462.
34. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, Bratton DL, Oldenborg PA, Michalak M, Henson PM. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 2005; 123(2):321-34.
35. Geiser V, Rose S, Jones C. Bovine herpesvirus type 1 induces cell death by a cell-type-dependent fashion. *Microb Pathog.* 2008; 44(6):459-66.
36. Grewal AS & Wells R, Vulvovaginitis of goats due to a herpesvirus, *Aust. Vet. J.* 1986; 63:79–82.

37. Griffin DE & Hardwick JM. Perspective: virus infections and the death of neurons. *Trends Microbiol.* 1999;7(4):155-60.
38. Guercio A, Greco G, Lanizzoto G, Di Marco V, Todaro M. Valutazione della diffusione di anticorpi anti Herpes Virus della capra in allevamenti caprini della Sicilia, *Atti. SIPAOC 12 1998*; 138–142.
39. Hanon E, Hoornaert S, Dequiedt F, Vanderplasschen A, Lyaku J, Willems L, Pastoret PP. Bovine herpesvirus 1-induced apoptosis occurs at the G0/G1 phase of the cell cycle. *Virology* 1997; 232(2):351-8.
40. Hanon E, Lambot M, Hoorneart S, Lyaku J, Pastoret PP. Bovine herpes virus 1-induced apoptosis: phenotypic characterization of susceptible peripheral blood mononuclear cells. *Arch. Virol.* 1998; 143, 441–452.
41. Hardwick JM Viral interference with apoptosis. *Semin Cell Dev Biol.* 1998; 9(3):339-49.
42. Hay S & Kannourakis G. J A time to kill: viral manipulation of the cell death program *Gen Virol.* 2002; 83(Pt 7):1547-64.
43. Hinkley S, Ambagala AP, Jones CJ, Srikumaran S. A vhs-like activity of bovine herpesvirus-1. *Arch. Virol.* 2000; 145(10):2027-2046.
44. Horner GW, Hunter R, Day AM. An outbreak of vulvovaginitis in goats caused by a caprine herpesvirus, *N. Z. Vet. J.* 1982; 30, 152
45. Hutchings DL, Campos M, Qualtiere L, Babiuk LA. Inhibition of antigen-induced and interleukin-2-induced proliferation of bovine peripheral blood leukocytes by inactivated bovine herpesvirus 1. *J. Virol.* 1990; 64(9):4146-4151.
46. Jones C. Herpes simplex virus type-1 and Bovine Herpesvirus-1 latency. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16:79–95.

47. Kaufmann SH, Desnoyers S, Ottaviano Y, Davidson NE and Poirier GG. Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.* 1993; 53:3976–3985.
48. Kerr JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 2002; 181-182:471-4
49. Keuser V, Espejo-Serrano J, Schynts F, Georjin JP, Thiry E. Isolation of caprine herpesvirus type 1 in Spain, *Vet. Rec.* 2004; 154:395–399
50. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275:1132-1136.
51. Koptopoulos G, Papanastasopoulou M, Papadopoulos O, Ludwig H. The epizootiology of caprine herpesvirus (BHV-6) infections in goat populations in Greece, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1988; 11:199–205
52. Korsmeyer SJ, Wei MC, Saito M, Weiler S, Oh KJ, Schlesinger PH. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. *Cell Death Differ.* 2000; 7:1166-73.
53. Koyama AH, Irie H, Fukumori T, Hata S, Iida S, Akari H, Adachi A. Role of virus-induced apoptosis in a host defense mechanism against virus infection, *J. Med. Invest.* 1998; 45:37–45.
54. Krakauer DC & Payne RJ. The evolution of virus-induced apoptosis. *Proc. Biol. Sci.* 1997; 264(1389):1757-62.
55. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, Vandenabeele P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods.* 2008;44(3):205-21.

56. Leopardi R & Roizman B. The herpes simplex virus major regulatory protein ICP4 blocks apoptosis induced by the virus or by hyperthermia Proc. Natl. Acad. Sci. USA Cell Biology 1996; 93:9583-9587.
57. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 2001; 104(1):487-501.
58. Lyaku JRS, Nettleton PF, Mardsen HS. A comparison of serological relationship among five ruminant Alphaherpesvirus by ELISA. Arch. Virol. 1992; 124:333-341.
59. Lyaku JR, Vilcek S, Nettleton PF, Mardsen HS. The distinction of serologically related ruminant alphaherpesviruses by the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. Vet. Microbiol. 1996; 48:135-142.
60. Martin SS & Vuori K. Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis. Biochim Biophys Acta. 2004;1692(2-3):145-57.
61. McVoy MA & Adler SP. Human cytomegalovirus DNA replicates after early circularization by concatemer formation, and inversion occurs within the concatemer. J. Virol. 1994; 68:1040–1051.
62. Mettler F, Engels M, Wild P, Bivetti A. Herpesvirus infection in kids in Switzerland, Schweiz. Arch. Tierheilkd. 1979; 121: 655– 662 (in German).
63. Metzstein MM, Stanfield GM, Horvitz HR. Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. Trends Genet. 1998; 14(10):410-6
64. Mi J, Li ZY, Ni S, Steinwaerder D, Lieber A. Induced apoptosis supports spread of adenovirus vectors in tumors. Hum Gene Ther. 2001; 12(10):1343-52.

65. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll U.M. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*. 2003; 11(3):577-90.
66. Moll UM & Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. *FEBS Lett*. 2001; 493(2-3):65-9.
67. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth*. 1983; 65:55-63.
68. Muluneh A & Liebermann H. Occurrence of caprine herpesvirus (BHV-6) infection in goat population of the GDR, *Arch. Exp. Veterinar med*. 1990; 44:254-257.
69. Murphy BM, O'Neill AJ, Adrain C, Watson RW, Martin SJ. The apoptosome pathway to caspase activation in primary human neutrophils exhibits dramatically reduced requirements for cytochrome C. *J Exp Med*. 2003; 197(5):625-32.
70. Nicholson DW Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. 1999; 6(11):1028-42.
71. Nixon P, Edwards S, White H. Serological comparison of antigenically related herpesvirus in cattle, red deer and goats. *Vet. Res.Commun*. 1988; 12:335-362.
72. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003; 4(7):552-65
73. Pagnini U, Montagnaro S, Sanfelice di Monteforte E, Pacelli F, De Martino L, Roperto S, Florio S, Iovane G. Caprine herpesvirus-1 (CapHV-1) induces apoptosis in goat peripheral blood mononuclear cells. *Vet. Immunol. and Immunopathology* 2005; 103:283-293.

74. Palomba E, Arpentì C, Iovane G, Martone F. Diffusione di Caprine Herpesvirus in allevamenti caprini dell'Italia meridionale. *Acta Med. Vet.* 1995; 41:201-205.
75. Pídlér S, Logan J, Shenk T. Deletion of the gene encoding the adenovirus 5 early region 1B 21,000-molecular weight polypeptide leads to degradation of viral and host cell DNA, *J. Virol.* 1984; 52:664-671.
76. Piper KL, Fitzgerald CJ, Ficorilli N, Studdert MJ. Isolation of caprine herpesvirus 1 from a major outbreak of infectious pustular vulvovaginitis in goats. *Aust Vet J.* 2008; 86(4):136-8.
77. Plebani GF, Engels M, Metzler AE, Wyler R. Caprine herpesvirus in Switzerland: distribution, incidence and latency of infection, *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 1983; 125:395-411 (in German).
78. Pratelli A, Greco G, Dall'Ara P, Engels M, Tempesta M, Buonavoglia C. Restriction endonuclease analysis of the genome of two Italian caprine herpesvirus 1 strains, *Arch. Virol.* 2000; 145:845-851.
79. Razvi ES, Welsh RM. Apoptosis in viral infections. *Adv. Virus Res.* 1995; 45:1-60.
80. Reed LJ & Muench H. A simple method of estimating 50 % end points. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493-497.
81. Ricci JE, Gottlieb RA, Green DR. Caspase-mediated loss of mitochondrial function and generation of reactive oxygen species during apoptosis. *J Cell Biol.* 2003; 160(1):65-75.
82. Rimstad E, Krona R, Hyllseth B. Comparison of herpesviruses isolated from reindeer, goats, and cattle by restriction endonuclease analysis, *Arch. Virol.* 1992; 123:389-397.

83. Roizman B. The family Herpesviridae: general description, taxonomy and classification, in Roizman B. (ed.) "The herpesviruses" Plenum Press. New York and London, 1982, pp. 1-23.
84. Roizman B & Knipe DM Herpes simplex viruses and their replication, in: Knipe DM, Howley PM (Eds.), Fields Virology, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2001, pp. 2399–2459.
85. Roperto F, Pratelli A, Guarino G, Ambrosio V, Tempesta M, Galati P, Iovane G, Buonavoglia C. Natural caprine herpesvirus 1 (CpHV-1) infection in kids, *J. Comp. Pathol.* 2000; 122:298–302.
86. Rosadio RH, Evermann JF, Mueller GM. Spectrum of naturally occurring disease associated with herpesvirus infections of goats and sheep. *Agri-Practice* 1984; 5:20-27.
87. Saelens X, Festjens N, Vande Walle L, van Gurp M, van Loo G, Vandenabeele P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene.* 2004; 23(16):2861-74.
88. Saito JK, Gribble DH, Berrios PE, Knight HD, Mc Kercher DG. A new herpesvirus isolate from goats: Preliminary report, *Am. J. Vet. Res.* 1974; 35:847–848.
89. Schwarz KB. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic. Biol. Med.* 1996; 21:641-649.
90. Scorrano L & Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 304(3):437-44.
91. Shen Y & Shenk TE. Viruses and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1995; 5(1):105-111.
92. Sionov RV & Haupt Y. The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 1999; 18(45):6145-57.

93. Strasser A, Puthalakath H, Bouillet P, Huang DC, O'Connor L, O'Reilly LA, Cullen L, Cory S, Adams JM. The role of bim, a proapoptotic BH3-only member of the Bcl-2 family in cell-death control. *Ann N Y Acad Sci.* 2000; 917:541-8.
94. Tempesta M, Cavalli A, Voigt V, Buonavoglia D. Presenza di anticorpi per Caprine Herpesvirus 1 (CapHV-1) in allevamenti caprini dell'Italia meridionale, *Atti. SIPAOC 11 1994*; 121–122.
95. Tempesta M, Buonavoglia D, Sagazio P, Pratelli A, Buonavoglia C. Natural reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats, *Vet. Rec.* 1998; 143:200.
96. ^aTempesta M, Pratelli A, Corrente M, Buonavoglia C. A preliminary study on the pathogenicity of a strain of caprine herpesvirus-1, *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1999; 22:137–143.
97. ^bTempesta M, Pratelli A, Greco G, Martella V, Buonavoglia C. Detection of Caprine Herpesvirus 1 in sacral ganglia of latently infected goats by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1999; 37:1598–1599.
98. Tempesta M, Pratelli A, Normanno G, Camero M, Buonavoglia D, Greco G, Buonavoglia C. Experimental intravaginal infection of goats with caprine herpesvirus 1. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 2000; 47:197–201.
99. Tempesta M, Camero M, Greco G, Pratelli A, Martella V, Buonavoglia C. A classical inactivated vaccine induces protection against caprine herpesvirus 1 infection in goats. *Vaccine* 2001; 19:3860-3864.
100. Tempesta M, Greco G, Pratelli A, Buonavoglia D, Camero M, Martella V, Buonavoglia C. Reactivation of Caprine Herpesvirus 1 in experimentally infected goats. *Vet. Rec.* 2002; 150:116–117.

101. Tempesta M, Camero M, Sciorsci RL, Greco G, Minoia R, Martella V, Pratelli A, Buonavoglia C. Experimental infection of goats at different stages of pregnancy with caprine herpesvirus 1. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 2004; 27:25–32.
102. Teodoro JG & Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol.* 1997; 71(3):1739-46.
103. Thiry J, Tempesta M, Camero M, Tarsitano E, Bellacicco AL, Thiry E, Buonavoglia C. A live attenuated glycoprotein E negative bovine herpesvirus 1 vaccine induces a partial cross-protection against caprine herpesvirus 1 infection in goats. *Vet. Microbiol.* 2006; 13(3-4):303-8.
104. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-1462.
105. Thomson BJ. Viruses and apoptosis. *Int J Exp Pathol* 2001; 82(2): 65-76.
106. Tikoo SK, Campos M, Babiuk LA. Bovine Herpesvirus 1 (BoHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res* 1995; 45:191–223.
107. Timmer JC & Salvesen GS. Caspase substrates. *Cell Death Differ.* 2007; 14(1):66-72.
108. Ubol S, Tucker PC, Griffin DE, Hardwick JM. Neurovirulent strains of Alphavirus induce apoptosis in bcl-2-expressing cells: role of a single amino acid change in the E2 glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91:5202-5206.
109. Uzal FA, Woods L, Stillian M, Nordhausen R, Read DH, Van Kampen H, Odani J, Hietala S, Hurley EJ, Vickers ML, Gard SM. Abortion and ulcerative posthitis associated with Caprine Herpesvirus-1 infection in goats in California. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2004; 16:478–484.

110. Van der Lugt JJ & Randles JL. Systemic herpesvirus infection in neonatal goats. *J S Afr Vet Assoc.* 1993; 64(4):169-71.
111. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell* 1994; 76(5):777-9.
112. Ward MW, Kögel D, Prehn JH. Neuronal apoptosis: BH3-only proteins the real killers? *J Bioenerg Biomembr.* 2004; 36(4):295-8.
113. Wesselborg S, Janssen O, Kabelitz D. Induction of activation-driven death (apoptosis) in activated but not resting peripheral blood T cells. *J Immunol* 1993; 150:4338–4345.
114. White DO & Fenner FJ. *Medical Virology*, fourth edition 1994 Academic Press
115. Williams NM, Vickers ML, Tramontin RR, Petrites-Murphy MB, Allen GP. Multiple abortions associated with caprine herpesvirus infection in a goat herd, *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1997; 211:89–91.
116. Winkler MT, Doster A, Jones C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *J Virol.* 1999; 73(10):8657-68.
117. Wyllie AH, Beattie GJ, Hargreaves AD. Chromatin changes in apoptosis. *Histochem J.* 1981; 13(4):681-92.
118. Yoshida H, Sumichika H, Hamano S, He X, Minamishima Y, Kimura G, Nomoto K. Induction of apoptosis of T cells by infecting mice with murine cytomegalovirus. *J Virol.* 1995; 69(8):4769-75.

RINGRAZIAMENTI

Grazie ai miei genitori perché mi hanno generosamente donato le ali per poter volare lontano da casa quando ho voluto intraprendere questo percorso di studi...quelle stesse ali che adesso mi riportano da loro! Grazie perché vi devo tutto ciò che sono adesso...

Grazie a Gianluca, punto fermo nel vortice tormentato dei miei pensieri...non servono parole quando niente e nessuno è più importante di te!

Grazie al prof. Iovane che mi ha accolto nella Sezione di Malattie Infettive prima da tesista, poi da dottoranda.

Grazie al prof. Pagnini per aver assecondato la mia voglia di “scienza” concedendo libero sfogo alla mia passione per il laboratorio...

Grazie a Milena, non solo per l'indispensabile e competente supporto scientifico, ma anche perché la lealtà, la generosità e l'affetto che mi ha dimostrato gratuitamente in questi anni mi hanno aiutato a combattere la nostalgia di casa.

Grazie a Serena con la quale la mia “avventura” nella Sezione di Malattie Infettive è incominciata...non so proprio come riuscirò a fare i calcoli senza di te...

Voglio ringraziare anche le mie compagne di stanza, Karina e Sandra, e Bruna che mi ha insegnato il vero significato della frase “Dio ci pensa”: soprattutto insieme a loro ho vissuto “la stanza dell'amicizia”!

Grazie alla dott.ssa Arpenti, dolce figura materna della Sezione, alla prof.ssa De Martino, a Geppy, a Sante...grazie a tutte le persone che ho conosciuto in questi anni, vicine, lontane o in cielo, che hanno contribuito ad arricchire di umanità ed esperienza la mia vita...una parte del mio cuore rimarrà qui per sempre...