



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE

PRESENTAZIONE DEI CANDIDATI ALL'ESAME FINALE XXVII CICLO

Dott.ssa Rachele Bigi

La Dott.ssa Rachele Bigi, durante il corso di Dottorato in Medicina Sperimentale, ha svolto la sua attività di ricerca presso i laboratori del Dipartimento di Medicina Sperimentale, Sapienza Università di Roma, sotto la direzione del Prof. Alberto Faggioni e la supervisione del Prof. Pankaj Trivedi, e presso i laboratori del Dittmer alla University of North Carolina at Chapel Hill, sotto la supervisione del Prof. Dirk.

Nel corso del Dottorato, la Dott.ssa Bigi si è occupata di valutare l'importanza dell'infezione di EBV nella patogenesi del linfoma delle effusioni primarie.

Human Herpesvirus 8 (HHV-8) è un Gammaherpesvirus associato caratteristicamente a patologie quali il sarcoma di Kaposi (KS) e il linfoma delle effusioni primarie (PEL). Questi tumori vengono generalmente riscontrati in soggetti con AIDS, ma sono presenti, con frequenza molto minore, anche in individui HIV negativi. Le linee cellulari derivanti da PEL mantengono un'infezione latente, caratterizzata dall'espressione di un piccolo gruppo di proteine virali, tra cui LANA, che media il mantenimento del genoma virale, e v-cyclin, che regola il ciclo cellulare.

Epstein-Barr Virus (EBV) infetta i linfociti B ed è la causa della mononucleosi infettiva. Il virus persiste nella cellula ospite in forma latente ed è coinvolto nella genesi di alcuni tipi di linfoma, come il linfoma di Burkitt e il PEL, e di alcuni tumori epiteliali, come il carcinoma nasofaringeo. In base alle proteine espresse, è possibile distinguere 3 programmi di latenza: tipo I, in cui vengono espressi gli EBV-encoded RNAs (EBERs) 1 e 2 e l'EBV nuclear antigen (EBNA) 1, fondamentale per la replicazione virale; tipo II, in cui vengono espresse anche le latent membrane proteins (LMP) 1 e 2; tipo III, in cui vengono espresse, oltre a tutte le proteine già citate, EBNA-3s, EBNA-LP ed EBNA-2, essenziale per la trasformazione cellulare perché agisce come transattivatore di diversi geni virali e cellulari. Tutti i PEL sono HHV-8 positivi e in circa il 70% dei casi si riscontra anche la presenza dell'EBV: ciò suggerisce un ruolo importante dei due herpesvirus nello sviluppo di questo linfoma, anche se il contributo di EBV nella sua patogenesi non è stato ancora totalmente chiarito. Da esperimenti svolti nel laboratorio dove la Dott.ssa Bigi ha preparato la sua tesi Dottorato, è stato dimostrato che l'infezione in vitro con EBV delle linee PEL contenenti HHV-8 avevano elevata capacità tumorigenica in topi SCID.

I microRNA (miR) sono piccole molecole di RNA non codificante, di circa 20-22 nucleotidi, che svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'espressione genica post-trascrizionale, riconoscendo e legandosi al 3' UTR dell'mRNA target e inibendo la sintesi proteica.

In molti tipi tumorali si assiste ad un'alterazione dei livelli di alcuni miR, che indica un ruolo importante di queste molecole nella carcinogenesi. Alcuni miR si comportano come oncogeni e vengono quindi chiamati oncomiR, mentre altri agiscono in modo opposto e vengono definiti miR-oncosoppressori; tale classificazione, però, è dibattuta perché è noto che talvolta lo stesso miR può avere diversa azione in sistemi diversi. È stato dimostrato in alcune linee PEL una down-regolazione di diversi microRNA classificati come oncosoppressori. Dato che le classiche proteine con funzione di oncosoppressione (come p53 o PTEN) non risultano mutate nel linfoma, tale alterazione potrebbe rappresentare una possibile alternativa al meccanismo di patogenesi.

La Dott.ssa Bigi si è proposta di analizzare l'espressione di LANA ed EBNA-1 tramite immunofluorescenza 3D e western blotting nelle tre linee cellulari PEL (BC3, CRO6 e CRO3) infettate con EBV, in relazione alle relative linee parentali infettate solamente con HHV-8, al fine di valutare se la presenza di EBV provochi variazioni sull'espressione della proteina di latenza di HHV-8, e, con la stessa tecnica, di dimostrare l'eventuale co-localizzazione di PCNA con LANA e con EBNA-1, al fine di valutare il ruolo di PCNA nella proliferazione delle cellule ospiti in presenza delle due proteine di latenza virali. Inoltre, la Dott.ssa Bigi si è proposta di studiare nelle stesse linee cellulari eventuali variazioni sia nell'attività degli elementi regolatori del genoma di HHV-8, tramite FAIRE-seq, sia a livello dell'espressione genica delle cellule ospiti, tramite Affymetrix GeneChip Analysis. Infine, ha considerato di valutare il profilo dei microRNA tramite MicroRNA Array Analysis, allo scopo di individuare una deregolazione di alcuni miR causata dalla specifica presenza di EBV.

I risultati ottenuti sull'espressione di LANA ed EBNA-1 hanno permesso di ottenere 2 tipi di informazioni: una quantitativa e l'altra qualitativa. Dal momento che LANA forma dei foci a livello nucleare, è stato possibile visualizzare la proteina sottoforma di dots e contarli cellula per cellula. È stato visto che in tutte le linee PELs usate i cloni EBVGFP infettati mostravano un incremento dell'espressione di LANA. Per quanto concerne l'informazione qualitativa, il risultato è stato che LANA ed EBNA-1 non co-localizzano. Ciò sembra indicare che le due proteine leghino differenti regioni del genoma dell'ospite. PCNA non co-localizza con LANA, ma co-localizza con EBNA-1. Ciò lascia intendere che la proteina potrebbe avere un ruolo chiave nella proliferazione della cellula ospite in presenza di EBV. Inoltre, per analizzare l'espressione degli elementi regolatori del genoma di HHV-8 è stata utilizzata la FAIRE-seq, ed è stata riscontrata una minima variazione nell'attività dell'ORF73, l'open reading frame codificante per LANA, nelle linee EBVGFP infettate rispetto alle proprie linee parentali. Questo rafforza la teoria che l'incremento di LANA osservato grazie all'immunofluorescenza 3D dipenda da eventi post-trascrizionali.

Per analizzare eventuali variazioni a livello dell'mRNA delle cellule ospiti è stata utilizzata l'Affymetrix GeneChip Analysis. I dati grezzi sono stati organizzati in heatmaps e inseriti nel software Ingenuity Pathways Analysis, in modo da poter individuare i pathways cellulari più coinvolti. Per valutare il profilo dei miR è stata utilizzata la tecnica delle TaqMan Array MicroRNA Cards, che permette di analizzare l'espressione di 384 miRs in modo quantitativo. Tale esperimento è stato effettuato comparando in ogni linea il profilo di espressione dei miR nei cloni infettati con EBV rispetto agli stessi infettati solamente con HHV-8. In particolare, i miR-146a, 125b, 99a, 200b e 200c risultano up-regolati, mentre i miR-27b e 27a risultano down-regolati.

PUBBLICAZIONI 2011-2014

Rosato P, Anastasiadou E, Garg N, Lenze D, Boccellato F, Vincenti S, Severa M, Coccia EM, **Bigi R**, Cirone M, Ferretti E, Campese AF, Hummel M, Frati L, Presutti C, Faggioni A, Trivedi P. Differential regulation of miR-21 and miR-146a by Epstein-Barr virus-encoded EBNA2. *Leukemia* 2012 Nov; 26(11):2343-52.

Il Collegio dei Docenti giudica l'attività scientifico-formativa della Dott.ssa **Rachele Bigi** in modo positivo, in base alla frequenza e all'attività di ricerca complessivamente svolta. Esprime parere favorevole alla presentazione di una tesi di Dottorato dal titolo:

ROLE OF EPSTEIN-BARR VIRUS IN THE PATHOGENESIS OF PRIMARY EFFUSION LYMPHOMA (PEL)

Il Segretario

Prof.ssa Patrizia Mancini

Il Coordinatore

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi