SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DOTTORATO DI RICERCA IN MEDICINA SPERIMENTALE**

**PRESENTAZIONE DEI CANDIDATI ALL'ESAME FINALE**
**XXVIII CICLO**

**Dott.ssa Shivangi Yadav**

La Dott.ssa Shivangi Yadav, 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. Pankaj Trivedi e del Prof. Alberto Faggioni.

Durante il corso di dottorato, la Dott.ssa Yadav ha studiato le interazioni tra le proteine della fase latente di EBV ed il sistema di riparazione del danno al DNA (DDR). L'obiettivo principale è stato quello di comprendere come EBV possa attivare la risposta del DDR mediante microRNA e come questo possa contribuire alla instabilità genomica ed infine allo sviluppo di linfomi di tipo B.

Il virus di Epstein-Barr (EBV), il primo virus oncogeno, fu identificato da Epstein e Barr in cellule di linfoma di Burkitt (BL) in coltura. Appartiene alla famiglia dei γ-herpesvirus. EBV è l'agente causale della mononucleosi infettiva e di disordini linfoproliferarivi di pazienti immunocompromessi. Tra i linfomi non-Hodgkin, l'associazione con EBV riguarda il BL endemico e i linfomi B dell'ospite immunodeficiente. I linfomi B diffusi a grandi cellule (DLBCL) sono un gruppo eterogeneo di tumori, di cui circa il 10% è associato alla infezione da EBV. La loro elevata incidenza (dal 30 al 40% di tutti i linfomi) rende questo tumore uno dei più frequenti nell'adulto. EBV è unico per la sua capacità di trasformare linfociti B umani. Le risultanti linee cellulari linfoblastoidi (LCL) esprimono sei proteine virali nucleari (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C e 5), tre proteine latenti di membrana (LMP1, 2A e 2B), 2 RNA non codificanti (EBER 1 e 2) e 25 microRNA. Tra le nove proteine latenti virali, EBNA2 è indispensabile per la capacità trasformante del virus, in quanto il ceppo virale P3HR1 privo di EBNA2 non è in grado di immortalizzare linfociti B. Strutturalmente EBNA2 è una proteina nucleare di 497 aminoacidi ed un attivatore della trascrizione. EBNA2 non si lega direttamente al DNA ma attiva la trascrizione legandosi ad una proteina adattatrice, RBPjK/CBF1. Inoltre EBV è un transattivatore trascrizionale di geni virali quali LMP-1 e 2A ma anche di geni cellulari quali CD21 e CD23.

Poichè circa il 15% dei tumori umani hanno un'eziologia infettiva, vi è un grande interesse sia da un punto scientifico che clinico su come questi agenti patogeni modulino le funzioni della cellula ospite. E' noto da tempo che l'introduzione di aberrazioni cromosomiche è una caratteristica comune delle infezioni virali, ed è stato riportato che la presenza di EBV promuove l'instabilità genomica nei BL. Numerose ricerche nel corso degli ultimi due decenni hanno successivamente dimostrato che i virus interagiscono specificamente con i meccanismi cellulari responsabili per il

riconoscimento e la riparazione delle lesioni al DNA, collettivamente noti come risposta al danno del DNA (DDR). Queste interazioni possono coinvolgere l'attivazione e la disattivazione di pathways individuali di DDR come il reclutamento di proteine specifiche nei siti di replicazione virale. Poichè il sistema DDR è evoluto per proteggere il genoma cellulare dall'accumulo di mutazioni nocive, la sua disregolazione è inevitabilmente associata con un rischio aumentato di formazione di tumori. I microRNA (miRs) partecipano nella regolazione genica di un ampio spettro di pathways biologici mediante il fine controllo dei livelli di espressione proteica. La loro espressione aberrante è caratteristica di una varietà di malattie. Molte proteine coinvolte nel DDR sono soggette ad una precisa regolazione a livello trascrizionale e posttrascrizionale. I miR regolano negativamente l'espressione dei geni della riparazione del DNA e così bloccano la riparazione stessa. L'infezione virale è percepita dalla cellula ospite come un danno al DNA, e di conseguenza vengono attivati i meccanismi di difesa. Durante la riparazione delle rotture della doppia elica (DSB), la proteina H2AX, una proteina chiave della riparazione, è fosforilata dal gene dell'ataxia telangiectasia mutato (ATM) per formare foci di γ-H2AX nei siti nascenti di DSB. Quando H2AX è fosforilata, i foci di γ-H2AX possono essere visualizzati quali marker di danno al DNA in atto. La dottoressa Yadav ha studiato i segnali di γ-H2AX in cellule di DLBCL (U2392) transfettate con EBNA2 mediante tre diverse metodiche, immunofluorescenza, sistema di conta automatica degli spot ed immunoblotting. Indipendentemente dal metodo usato, è sempre stato riscontrato un aumento significativo dell'espressione di γ-H2AX nelle cellule di linfoma esprimenti EBNA2.

Per analizzare ulteriormente la capacità di EBV di indurre un danno al DNA, è stato utilizzato il comet assay (test della cometa). Nelle cellule esprimenti EBNA2 è stato sempre osservato un aumento significativo delle dimensioni della cometa. Per identificare il pathway di DDR coinvolto, la Dott.ssa Yadav ha analizzato i livelli totali e fosforilati delle due protein chinasi ATM e ATR, ed ha osservato livelli aumentati di ATM e pATM, mentre quelli di ATR e pATR rimanevano invariati. ATM attiva successivamente la molecola effettrice CHK2 che media l'arresto del ciclo cellulare e la riparazione del DNA. Sono stati pertanto esaminati i livelli di pCHK2, che sono risultati aumentati nella cellule U2932 transfettate con EBNA2. Per determinare se l'inibizione dell'attività fosforilante della kinasi ATM potesse abbassare i livelli di γH2AX nelle cellule esprimenti EBNA2, le cellule U2932-EBNA2 sono state trattate con l'inibitore di ATM KU-55933, ed effettivamente la Dott.ssa Yadav ha riscontrato una diminuzione dei livelli di γH2AX.

La Dott.ssa Yadav ha anche investigato l'effetto di una seconda proteina latente virale, LMP1, sull'espressione di ATM, osservando che, in contrasto con EBNA2, ATM veniva downregolata in presenza di LMP1. Infine, la Dott.ssa Yadav ha studiato se la diversa regolazione di ATM da parte di EBNA2 e LMP1 fosse dovuta ad una diversa espressione di microRNA cellulari. miR-26a è stato implicato nel meccanismo di DDR avendo come bersaglio ATM. Mediante real time PCR, la Dott.ssa Yadav ha osservato che miR-26a è effettivamente upregolato in presenza di LMP1, e significativamente downregolato nelle cellule U2932 esprimenti EBNA2.

In conclusione, la Dott.ssa Yadav ha dimostrato che le interazioni tra le proteine latenti di EBV ed il sistema DDR possono contribuire all'instabilità genomica durante l'infezione virale. Di interesse, è sufficiente EBNA2 per indurre il danno, come visto dalla upregolazione di γH2AX e dalla formazione della coda della cometa, le principali caratteristiche di un aumentato danno al DNA. EBNA2 induce la fosforilazione di H2AX senza modificarne l'epressione, come pure quella di 53BP1, suggerendo una modulazione selettiva della fosforilazione di H2AX. Inoltre è stato dimostrato che l'attivazione di DDR da parte di EBNA2 è mediata da un pathway dipendente da ATM. La Dott.ssa Yadav ha osservato che miR-26a è differenzialmente regolato da EBNA2 e da LMP-1. Questo miR regola ATM, suggerendo che l'alterata regolazione di ATM da parte di EBNA2 e LMP-1 è dovuta ad una alterata espressione di miR-26a da parte di queste due proteine latenti virali. Nel complesso, questo studio ha mostrato per la prima volta come la proteina latente virale EBNA2 possa attivare il sistema DDR attraverso l'alterazione di un microRNA cellulare, e sottolinea il ruolo di questo virus oncogeno nel processo di linfomagenesi mediante la perturbazione di pathways di riparazione del danno al DNA.

**PUBBLICAZIONI 2012-2015**

Arivazhagan A, Krishna S, **Yadav S**, Shah HR, Kumar P, Ambasta RK. Synergy of bone marrow transplantation and curcumin ensue protective effects at early onset of diabetes in mice. J Diabetes. 2015 Jul;7(4):473-84.

Anastasiadou E, Garg N, Bigi R, **Yadav S**, Campese AF, Lapenta C, Spada M, Cuomo L, Botta A, Belardelli F, Frati L, Ferretti E, Faggioni A, Trivedi P. Epstein-Barr virus infection induces miR-21 in terminally differentiated malignant B cells. Int J Cancer. 2015 Sep 15;137(6):1491-7.

Il Collegio dei Docenti giudica l'attività scientifico-formativa della Dott.ssa **Shivangi Yadav** 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 PERTURBATION OF DNA DAMAGE REPAIR IN B-CELL LYMPHOMA**

Il Segretario

Prof.ssa Patrizia Mancini

Il Coordinatore

Prof.ssa Maria Rosaria Torrisi