



# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA**

**Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
VIROLOGIA E BIOTECNOLOGIE MICROBICHE  
CICLO XX**

## **Analisi dell'effetto dell'infezione da citomegalovirus umano su cellule corticosurrenaliche**

**Coordinatore:** Ch.mo Prof. Giorgio Palù

**Supervisore:** Ch.mo Prof. Giorgio Palù

**Co-Supervisore:** Dott.ssa Luisa Barzon

**Dottorando:** Dott.ssa Marta Trevisan

**31 gennaio 2008**



# 1 INDICE

<b>1</b>	<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT</b>	<b>5</b>
<b>3</b>	<b>RIASSUNTO</b>	<b>7</b>
<b>4</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>11</b>
<b>4.1</b>	<b>Virologia di HCMV</b>	<b>11</b>
4.1.1	Struttura di HCMV	11
4.1.2	Genoma di HCMV	13
<b>4.2</b>	<b>Ciclo replicativo di HCMV ed espressione dei geni virali</b>	<b>14</b>
4.2.1	Permissività cellulare e crescita <i>in vitro</i>	14
4.2.2	Adesione e penetrazione di HCMV	15
4.2.3	Regolazione dell'espressione genica virale	15
4.2.4	Caratteristiche e funzioni delle proteine precocissime	16
4.2.5	Caratteristiche e funzioni delle proteine precoci	18
4.2.6	Replicazione del DNA virale	18
4.2.7	Caratteristiche e funzioni delle proteine tardive	19
4.2.8	microRNA di HCMV	19
4.2.9	Assemblaggio, maturazione e fuoriuscita dei virioni	20
<b>4.3</b>	<b>Sfruttamento delle vie regolatorie del ciclo cellulare della cellula ospite da parte di HCMV</b>	<b>21</b>
4.3.1	HCMV e ciclo cellulare	22
4.3.2	HCMV e apoptosi	23
4.3.2.1	P53 e IE2-86	24
4.3.2.2	HCMV UL37x1 e UL36: vMIA e vICA	25
4.3.2.3	Segnali pro-sopravvivenza	26
<b>4.4</b>	<b>Epidemiologia dell'infezione da HCMV</b>	<b>26</b>
<b>4.5</b>	<b>Patogenesi delle malattie associate ad infezione da HCMV</b>	<b>27</b>
4.5.1	Latenza di HCMV in cellule della linea mieloide	27
4.5.2	Riattivazione di HCMV dalla latenza	28
4.5.3	Meccanismi di evasione della risposta immunitaria	30
4.5.4	Infezione da HCMV e cancro	32
<b>4.6</b>	<b>HCMV e surrene</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>SCOPO DELLO STUDIO</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>39</b>
<b>6.1</b>	<b>Campioni di tessuto surrenalico</b>	<b>39</b>
6.1.1	Analisi quantitativa con real-time PCR delle sequenze genomiche di HCMV nei tessuti surrenalici	39
6.1.2	Individuazione di HCMV DNA nei campioni di sangue	39
6.1.3	Ricerca di anticorpi anti-HCMV	40

---

6.1.4	Analisi immunoistochimica	40
<b>6.2</b>	<b>Linee cellulari</b>	<b>40</b>
6.2.1	Cellule SW-13	40
6.2.2	Cellule NCI-H295R	41
6.2.3	Cellule MRC-5	41
6.2.4	Cellule HFF	42
6.2.5	Colture primarie umane di tumori corticosurrenali	42
<b>6.3</b>	<b>HCMV</b>	<b>42</b>
6.3.1	Isolati clinici di HCMV	42
6.3.2	HCMV AD169	42
<b>6.4</b>	<b>Produzione e titolazione di HCMV</b>	<b>43</b>
6.4.1	Produzione dello stock virale AD169	43
6.4.2	Determinazione del titolo virale	43
<b>6.5</b>	<b>Infezione delle cellule</b>	<b>44</b>
<b>6.6</b>	<b>Studio dell'espressione di proteine precoci e tardive di HCMV mediante immunofluorescenza</b>	<b>45</b>
<b>6.7</b>	<b>Dosaggi ormonali</b>	<b>45</b>
<b>6.8</b>	<b>Estrazione e purificazione dell'RNA cellulare</b>	<b>46</b>
<b>6.9</b>	<b>Analisi dell'espressione genica mediante real-time RT-PCR quantitativa</b>	<b>47</b>
<b>6.10</b>	<b>Trattamento con idrocortisone e aminoglutetimide di cellule infettate da AD169</b>	<b>47</b>
<b>6.11</b>	<b>Analisi dell'effetto citopatico dell'infezione da AD169</b>	<b>47</b>
<b>6.12</b>	<b>Analisi dell'apoptosi nelle cellule di carcinoma corticosurrenalico infettate con AD169</b>	<b>48</b>
<b>6.13</b>	<b>Analisi della proliferazione cellulare nelle cellule di carcinoma corticosurrenalico infettate con AD169</b>	<b>48</b>
<b>6.14</b>	<b>Analisi del ciclo cellulare nelle cellule di carcinoma corticosurrenalico infettate con AD169</b>	<b>49</b>
<b>6.15</b>	<b>Analisi del profilo di espressione genica con DNA microarray</b>	<b>49</b>
6.15.1	Amplificazione dell'RNA	49
6.15.2	Valutazione quantitativa e qualitativa dell'RNA	50
6.15.3	Marcatura dell'RNA	50
6.15.4	Analisi dei dati	50
<b>6.16</b>	<b>Analisi statistica</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>RISULTATI</b>	<b>53</b>
<b>7.1</b>	<b>Ricerca di sequenze genomiche di herpesvirus nei tessuti surrenali</b>	<b>53</b>
<b>7.2</b>	<b>HCMV infetta e replica in cellule corticosurrenali umane</b>	<b>55</b>
7.2.1	Infezione con isolati clinici di HCMV	55

7.2.2	Infezione con HCMV AD169 di linee cellulari umane di carcinoma corticosurrenalico	56
7.2.3	Infezione con HCMV AD169 di colture primarie umane di carcinoma corticosurrenalico	58
7.2.4	Cinetica di replicazione di AD169 in cellule corticosurrenaliche	60
<b>7.3</b>	<b>L'infezione da HCMV di cellule corticosurrenaliche stimola la produzione di cortisolo e modula l'espressione degli enzimi della steroidogenesi</b>	<b>61</b>
7.3.1	Effetto dell'infezione da HCMV sulla produzione di ormoni steroidei	62
7.3.2	Effetto dell'infezione di HCMV con particelle virali inattivate agli UV sulla produzione di ormoni steroidei	63
7.3.3	Effetto dell'infezione da HCMV sull'espressione degli enzimi della steroidogenesi	64
7.3.4	Effetto dell'infezione da HCMV sull'espressione di recettori nucleari implicati nella regolazione dell'espressione degli enzimi della steroidogenesi	67
7.3.5	Effetto dell'infezione da HCMV sull'espressione di citochine implicate nella regolazione dell'espressione degli enzimi della steroidogenesi	68
<b>7.4</b>	<b>Effetto degli ormoni steroidei sulla replicazione di HCMV</b>	<b>69</b>
<b>7.5</b>	<b>Effetto dell'infezione da AD169 HCMV sulla crescita delle cellule di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R</b>	<b>72</b>
7.5.1	Valutazione dell'effetto citopatico dovuto all'infezione da AD169 HCMV sulle cellule NCI-H295R: infezione litica o persistente?	72
7.5.2	Effetto dell'infezione di HCMV sulla morte cellulare programmata della linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R	73
7.5.3	Effetto dell'infezione di HCMV sulla proliferazione delle cellule della linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R	76
7.5.4	Impatto dell'infezione di HCMV sul ciclo cellulare della linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R	77
<b>7.6</b>	<b>Effetto di HCMV sul profilo di espressione genica di cellule corticosurrenaliche</b>	<b>78</b>
7.6.1	Analisi temporale del profilo di espressione genica di cellule SW-13 dopo infezione da HCMV AD169	80
7.6.2	Analisi temporale del profilo di espressione genica di cellule NCI-H295R dopo infezione da HCMV AD169	87
<b>7.7</b>	<b>Effetto di HCMV sul profilo di espressione genica di cellule corticosurrenaliche: Analisi Bayesiana</b>	<b>96</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSSIONE</b>	<b>99</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>113</b>
<b>10</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>115</b>
<b>11</b>	<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>129</b>
<b>12</b>	<b>ALLEGATI</b>	<b>131</b>



## 2 ABSTRACT

**Aim of the study:** HCMV has been reported to involve the adrenal gland and cause adrenalitis in immunosuppressed patients, but information in literature about the effect of human cytomegalovirus (HCMV) infection on adrenal function and its potential role in adrenal tumorigenesis is lacking. Aim of this study is to investigate the presence of HCMV in a large series of normal and tumor adrenal samples and to analyze whether HCMV infects and replicates in adrenocortical cells *in vitro* and the effects of HCMV infection on adrenocortical steroidogenesis, cell growth, and gene expression profile.

**Materials and Methods:** The clinical investigation was performed on a total of 127 human adrenal tissues, which were examined by real-time PCR for the presence of HCMV genome sequences. Adrenal samples included 20 normal adrenal tissues, 36 non-functioning adrenocortical adenomas, 16 cortisol producing adenomas, 12 aldosteronomas, 3 androgen producing adenomas, 16 adrenocortical carcinomas (ACCs), and 24 medullary tumors.

The *in vitro* study was performed on the human ACC cell lines NCI-H295R and SW-13 and in primary ACC cell cultures, which were infected with clinical isolates of HCMV and with the HCMV strain AD169. Expression of the HCMV early pp72 and late pp65 genes was evaluated in infected cells by immunofluorescence. Kinetics of viral replication in ACC cells was investigated by quantitative real-time PCR and plaque assay. Steroid hormone production in the supernatant of infected cells was measured by EIA. Evaluation of the impact of HCMV infection on host cell machinery was investigated in terms of cytopathic effect (microscope examination), cell cycle (analyzed by propidium iodide staining), apoptosis (through annexin-V test), and cellular proliferation (by BromoDeossiUridine test). Cellular gene expression profile after AD169 infection was assessed by quantitative RT-PCR and DNA microarray analysis in time-course experiments.

**Results:** Investigation of human adrenal tumors demonstrated the presence of HCMV genome sequences in 19% cortical adenomas, 12% pheochromocytomas and 1 normal tissue, but not in malignant tumors. Moreover, HCMV sequences were significantly more frequently detected and at higher titre in functioning than in nonfunctioning adrenocortical tumors. In these tumors, expression of both early (pp72) and late (pp65) HCMV genes was demonstrated by immunohistochemistry.

The *in vitro* study showed that both clinical isolates and laboratory strains of HCMV could replicate in ACC cells, as demonstrated by expression of early and late viral antigens and efficient production of infectious viral particles in infected adrenocortical cells, even if at lower levels than in fibroblasts. HCMV had a cytopathic effect on SW13 and NCI-H295R ACC cells, outlined by the presence

of apoptotic and vacuolized cells. Furthermore, it slightly: increased cellular S phase, inhibited cell proliferation, and induced apoptosis. The proapoptotic effect was markedly increased by co-treatment with etoposide, a topoisomerase II inhibitor.

AD169 infection of NCI-H295R cells, which are able to produce all adrenal steroids, significantly increased production of cortisol and 17 $\beta$ -estradiol, but not of aldosterone. Conceivably, this effect was due to viral replication and/or viral gene expression rather than interaction of the virion with the host cell, since UV-inactivated HCMV particles had no effect on steroidogenesis. Also, AD169 infection of NCI-H295R cells, markedly induced *CYP11B1* and *CYP19* expression, e.g., the genes encoding the key enzymes for cortisol and estrogens synthesis, and modulated expression of genes encoding the orphan nuclear hormone receptors DAX-1 and SF-1, that are involved in the transcriptional regulation of steroidogenic enzymes. Thus, the effect of HCMV infection on adrenal steroidogenesis seem to be mediated by induction of steroidogenic enzyme expression. Microarray analysis was employed to further elucidate the mechanism of induction of steroid hormone production. Interestingly, besides inducing genes promoting cell proliferation and tumor invasiveness and repressing tumor suppressor genes and pro-angiogenic genes, in agreement with its oncomodulatory effects, HCMV infection markedly induced a cluster of 12 genes in the first hours post-infection. Bayesian Gaussian Network analysis identified two crucial genes in the Bayesian Network structure, i.e., the genes encoding the purinergic receptors P2Y11 and P2X4, which play the role of dam genes controlling the modulation of the others. Since purinergic receptors are known to mediate induction of corticoid production, upregulation of these two genes could be a key event responsible of the effects of HCMV infection on adrenal steroidogenesis.

To investigate the effects of steroid hormones on HCMV replication, fibroblasts and ACC cells were treated during infection with hydrocortisone and with the inhibitor of steroidogenic enzymes aminoglutethimide. Hydrocortisone increased HCMV replication and yield in both fibroblasts and ACC cells, whereas aminoglutethimide enhanced viral release for infected cells.

**Conclusions:** The results of this study conducted with clinical specimens suggests that the adrenal gland could be a reservoir of HCMV and that hormone overproduction by the adrenal gland could represent a trigger for virus reactivation. These results of the *in vitro* study demonstrate for the first time that HCMV infects and replicates in human adrenocortical cells. HCMV infection stimulates adrenal cortisol and estrogen production by modulation of steroidogenic enzyme expression. These data represent the basis for further investigation on the implication of HCMV infection on adrenal diseases.



### 3 RIASSUNTO

**Scopo dello studio:** Nonostante in letteratura sia riportato che l'infezione da citomegalovirus umano (HCMV) coinvolga la ghiandola surrenalica nei pazienti immunosoppressi, mancano studi in letteratura sugli effetti dell'infezione da HCMV sulla funzione surrenalica e sul suo potenziale ruolo nella tumorigenesi surrenalica. Lo scopo di questo studio è quindi quello di ricercare la presenza di sequenze genomiche di HCMV in un'ampia casista di tumori surrenalici e di tessuti surrenalici normali ed inoltre di valutare se HCMV sia in grado di infettare e replicare in cellule corticosurrenaliche *in vitro*, valutando gli effetti dell'infezione sulla steroidogenesi surrenalica, sulla proliferazione cellulare, e sul profilo di espressione genica.

**Materiali e Metodi:** Lo studio clinico è stato eseguito su un totale di 127 tessuti surrenalici umani, esaminati per la presenza di sequenze genomiche di HCMV mediante real-time PCR. I campioni surrenalici includevano 20 surreni normali, 36 adenomi corticosurrenalici non funzionanti, 16 adenomi secernenti cortisolo, 12 aldosteronomi, 3 adenomi secernenti androgeni, 16 carcinomi corticosurrenalici (di cui 14 funzionanti e 2 non funzionanti) e 24 tumori della midollare del surrene (inclusi 21 feocromocitomi benigni, un feocromocitoma maligno, 2 ganglioneuromi).

Lo studio *in vitro* è stato effettuato sulle linee di carcinoma corticosurrenalico (ACC) umane NCI-H295R ed SW-13 e su colture primarie di ACC, le quali sono state infettate con isolati clinici di HCMV e con il ceppo di laboratorio HCMV AD169. Mediante immunofluorescenza è stata valutata l'espressione del gene precoce di HCMV pp72 e del gene tardivo pp65. Mediante real-time PCR quantitativa e saggio delle placche è stato titolato il virus per valutarne la cinetica di replicazione nelle cellule corticosurrenaliche. Nel sovrannatante delle cellule infettate sono stati dosati gli ormoni steroidei con saggi EIA. L'analisi dell'impatto dell'infezione da HCMV sul "macchinario" cellulare è stata valutata in termini di effetto citopatico (esame al microscopio), ciclo cellulare (analisi con il test del propidio di ioduro), apoptosi (tramite saggio con annexina-V) e, infine, proliferazione cellulare (attraverso il test della BromoDeossiUridina). Il profilo di espressione genica cellulare dopo infezione da AD169 è stato valutato con real-time RT-PCR quantitativa e con analisi dei DNA microarray in esperimenti di *time-course*.

**Risultati:** La ricerca nei tumori surrenalici umani ha dimostrato la presenza di sequenze genomiche di HCMV nel 19% degli adenomi, nel 12% dei feocromocitomi, in 1 tessuto normale, ma in nessuno dei tumori maligni. Le sequenze di HCMV sono state inoltre riscontrate più frequentemente ed in numero

più elevato nei tumori corticosurrenali funzionanti piuttosto che in quelli non funzionanti. In questi tumori, è stata dimostrata l'espressione sia delle proteine precoci (pp72) sia di quelle tardive (pp65) con analisi immunohistochimica.

Lo studio *in vitro* ha rivelato che sia gli isolati clinici sia il ceppo di laboratorio di HCMV impiegati replicavano nelle cellule ACC, come dimostrato dall'espressione sia di antigeni virali precoci (pp72) sia tardivi (pp65). L'analisi della cinetica di replicazione nelle cellule ACC mostrava un'efficiente produzione di particelle virali infettive, anche se a livelli assai inferiori rispetto ai fibroblasti, usati come controllo. L'infezione con HCMV ha dimostrato avere un effetto citopatico nelle cellule di ACC NCI-H295R ed SW13. Inoltre ha causato un lieve aumento della fase S del ciclo cellulare, inibizione della proliferazione cellulare, ed induzione dell'apoptosi. L'effetto pro-apoptotico è risultato particolarmente aumentato dal trattamento simultaneo con etoposide, un inibitore delle topoisomerasi II.

L'infezione con AD169 delle cellule corticosurrenali NCI-H295R, in grado di sintetizzare tutti gli ormoni steroidei surrenali, aumentava in modo significativo la produzione di cortisolo e di 17 $\beta$ -estradiolo, ma non di aldosterone. Questo effetto sembra essere dovuto alla replicazione virale e/o all'espressione dei geni virali piuttosto che alla mera interazione del virione con la cellula ospite, dal momento che particelle di HCMV inattivate agli UV non avevano alcun effetto sulla steroidogenesi. L'infezione da AD169 delle cellule NCI-H295R ha indotto in modo marcato l'espressione di *CYP11B1* e *CYP19*, cioè dei due enzimi chiave per la sintesi, rispettivamente, di cortisolo e 17 $\beta$ -estradiolo, e ha modulato l'espressione di geni codificanti recettori nucleari orfani responsabili della regolazione trascrizionale degli enzimi della steroidogenesi. L'effetto dell'infezione da HCMV sulla steroidogenesi surrenalica sembra quindi essere mediato dall'induzione dell'espressione degli enzimi della steroidogenesi. Per poter chiarire il meccanismo di induzione della produzione di ormoni steroidei, è stata impiegata l'analisi con microarray. Interessante sottolineare che, oltre all'induzione dei geni promuoventi la proliferazione cellulare e l'invasività tumorale, l'infezione da HCMV induceva in modo marcato un cluster di 12 geni durante le prime ore post-infezione. L'analisi di rete Bayesiana ha identificato due geni cruciali nella struttura della rete Bayesiana, cioè i geni che codificano per i recettori purinergici P2Y11 e P2X4, i quali svolgono un ruolo di geni diga nel controllare la modulazione degli altri geni. Dato che i recettori purinergici sono noti per mediare l'induzione della produzione di cortisolo, l'induzione di questi due geni potrebbe rappresentare un evento chiave responsabile degli effetti dell'infezione da HCMV sulla steroidogenesi surrenalica.

Per studiare gli effetti degli ormoni steroidei sulla replicazione di HCMV, i fibroblasti umani e le cellule ACC sono state trattate durante l'infezione con

idrocortisone e con l'inibitore degli enzimi della steroidogenesi aminoglutetimide. L'idrocortisone portava ad un incremento della replicazione di HCMV sia nei fibroblasti che le cellule ACC, mentre l'aminoglutetimide induceva un maggiore rilascio di virus dalle cellule infettate.

**Conclusioni:** I risultati dello studio clinico suggeriscono che la ghiandola surrenalica possa rappresentare un *reservoir* d'infezione per HCMV e che l'iperproduzione di cortisolo da parte del surrene rappresenti uno stimolo per la riattivazione del virus. In accordo con quanto dimostrato *in vivo*, i risultati dello studio *in vitro* dimostrano inoltre per la prima volta che HCMV è in grado di infettare e replicare in cellule corticosurrenaliche umane *in vitro*. L'infezione da HCMV stimola la produzione di cortisolo ed estrogeni, modulando l'espressione degli enzimi della steroidogenesi. D'altro canto, gli ormoni steroidei sono in grado stimolare la replicazione di HCMV. Questi dati rappresentano la base per ulteriori indagini sul coinvolgimento dell'infezione da HCMV nelle patologie surrenaliche.



## 4 INTRODUZIONE

Il citomegalovirus umano (HCMV) è un patogeno molto diffuso, generalmente responsabile di infezioni asintomatiche e persistenti nei soggetti sani. Può tuttavia causare malattie qualora manchi una risposta immunitaria efficiente, come nel caso di soggetti dal sistema immunitario immaturo o compromesso. L'impatto dell'infezione da HCMV è aumentato negli ultimi decenni per l'aumento dei trapianti d'organo, delle terapie immunosoppressive e per la diffusione dell'AIDS. HCMV è inoltre un'importante causa di difetti congeniti. Le patologie da HCMV che si osservano in questi soggetti immunodepressi o dal sistema immunitario immaturo hanno fatto emergere un suo possibile ruolo nello sviluppo di altre malattie, in particolare malattie cardiovascolari, malattie autoimmuni e, più recentemente, alcune forme di cancro. Il presente studio indaga un nuovo aspetto dell'infezione da HCMV: l'infezione del surrene e il suo effetto modulante sulla funzione endocrina corticosurrenalica.

### 4.1 Virologia di HCMV

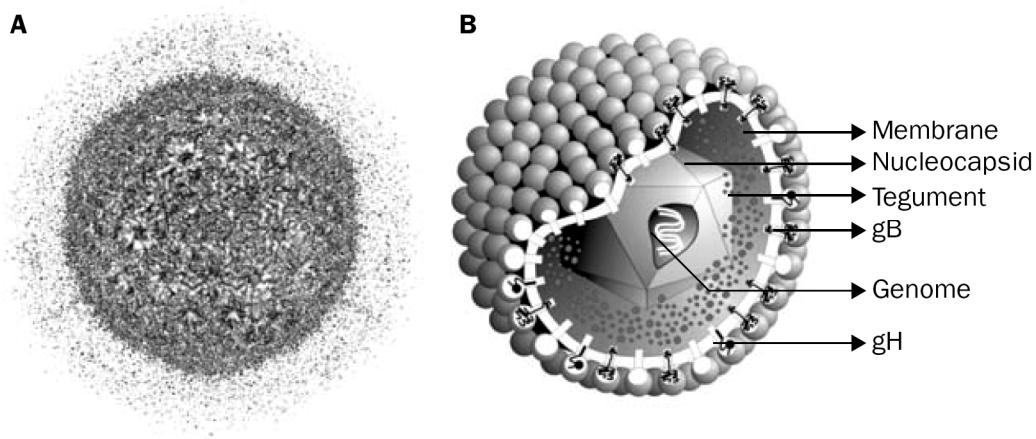
HCMV (HHV5) è un membro della sottofamiglia *betaherpesvirinae*, caratterizzato da struttura del virione, cinetica di espressione genica e persistenza nell'ospite simili a quelli di altri herpesvirus. Peculiari sono invece la sua stretta specie-specificità, il tropismo per le ghiandole salivari e la crescita lenta in colture cellulari (1).

#### 4.1.1 Struttura di HCMV

Il virione di HCMV è costituito da un nucleocapside icosaedrico di 100 nm di diametro contenente un genoma a doppio filamento lineare di DNA della lunghezza di 230 kbp, circondato da uno strato proteico, definito tegumento o matrice, che, a sua volta, è incluso in un doppio strato fosfolipidico contenente numerose glicoproteine virali. La particella virale matura ha un diametro di 150–200 nm (Figura 1).

Le colture cellulari infettate da HCMV producono virioni infettivi e altri due tipi di particelle: particelle con *envelope* non infettive e corpi densi (*dense bodies*). Le particelle con *envelope* non infettive sono particelle virali difettive composte da capsidi immaturi circondati da *envelope*, ma privi di DNA genomico e contenenti le proteine virali AP (*scaffolding/assembly protein*), normalmente assenti nel nucleocapside maturo. I *dense bodies* sono particelle circondate da *envelope* prive di nucleocapside e DNA virale, ma contenenti diverse proteine del

tegumento, delle quali la più abbondante è ppUL83 (pp65). La quantità relativa delle tre forme virali dipende dal numero dei passaggi in coltura cellulare e dal ceppo virale.



**Figura 1.** HCMV. (A) Rappresentazione schematica della ricostruzione tridimensionale della porzione icosaedrica di una particella intatta di HCMV. (B) Modello tridimensionale di HCMV, che ne dimostra le varie componenti (da Gandhi & Khanna, *Lancet Infect Dis* 2004).

Più di 30 proteine virali sono presenti nel virione completo infettivo, quattro delle quali (pUL46, pUL48.5, la *minor capsid protein* e la *major capsid protein*) costituiscono il capside, formato da 162 capsomeri. L'*envelope* contiene sei glicoproteine codificate dal virus: gpUL55 (gB), gpUL73 (gN), gp UL74 (gO), gpUL75 (gH), UL100 (gM), and gpUL115 (gL). Queste glicoproteine giocano un ruolo essenziale nell'ingresso del virus nella cellula ospite, nella diffusione da cellula a cellula e nella maturazione del virus. Altre 20–25 proteine strutturali del virione sono verosimilmente situate nello strato amorfo e ancora poco caratterizzato tra nucleocapside ed *envelope*. Le proteine del tegumento potrebbero contribuire alla maturazione dei virioni o influenzare eventi virali e cellulari nelle fasi iniziali dell'infezione, come il rilascio del DNA virale o la regolazione di sequenze promotrici virali e cellulari. La maggior parte delle proteine del tegumento sono fosforilate e assai immunogeniche. Le più abbondanti sono ppUL32 (pp150, o fosfoproteina basica) e pp65, quest'ultima impiegata come target per test rapidi di diagnosi di infezione da HCMV. Le proteine del tegumento ppUL69 e ppUL82 (pp71) sono dei transattivatori dell'espressione genica virale ed alterano in modo importante le funzioni della cellula ospite, bloccando la progressione del ciclo cellulare. In particolare, UL69 stimola l'espressione genica dall'*enhancer-promoter ie1/ie2*, il quale è necessario per la replicazione virale, e arrestano le cellule in fase G1, con un meccanismo non ancora noto (2). Anche UL82 stimola l'attività dell'*enhancer-promoter*

*ie1/ie2*, fungendo da attivatore trascrizionale di *activating transcription factor* (ATF)/*cyclic AMP-response element binding protein* (CREB) e di *activator protein-1* (AP-1). Aumenta inoltre l'infettività del DNA virale trasfettato, è necessaria per la replicazione virale a bassa molteplicità di infezione ed accelera la transizione dalla fase G1 ad S di cellule quiescenti (3,4).

In preparazioni altamente purificate di particelle virali infettive sono state identificate cinque molecole di RNA virali (denominate RNA del virione). Questi trascritti virali sono probabilmente situati nel tegumento e sono rilasciati nella cellula ospite nel momento dell'infezione. Il loro significato funzionale non è noto (5).

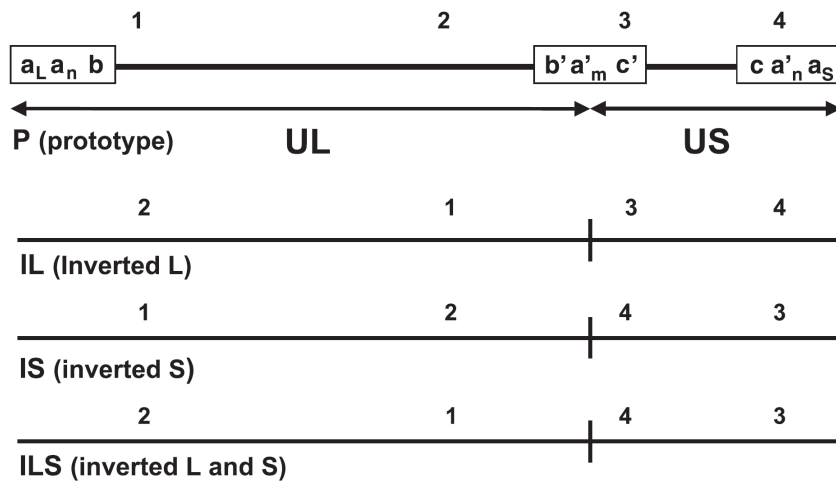
#### 4.1.2 Genoma di HCMV

Il genoma di HCMV è il più lungo dei genomi dei virus erpetici ed ha il più elevato contenuto di G+C. Come in herpes simplex virus-1, il genoma di HCMV è organizzato in regioni ripetute *unique long* (UL) e *unique short* (US). Poiché ciascuna regione può essere orientata in entrambe le direzioni, la progenie virale contiene 4 isomeri del genoma (Figura 2). Il genoma dei CMV animali e quello degli altri betaherpesvirus è invece lineare senza sequenze ripetute. L'inversione delle regioni UL eUS è mediato da sequenze ripetute dirette (*a*, *b*, *c*) situate alle estremità del genoma e da elementi ripetuti invertiti nella giunzione UL-US (*a'*, *b'*, *c'*). La sequenza ripetuta *a*, che consiste in un elemento diretto ad una estremità e in un elemento invertito nella giunzione UL/US, favorisce l'isomerizzazione del genoma in quanto contiene gli elementi *pac* (*packaging*) attivi in *cis*, necessari per il taglio del DNA.

Il genoma del ceppo di laboratorio AD169 è l'unico ad essere stato completamente sequenziato. L'analisi di questo genoma, lungo 230 kbp, dimostra la presenza di 225 ORF (*open reading frames*) da circa 100 o più aminoacidi (6). Queste ORF sono denominate sequenzialmente, secondo la loro posizione all'interno delle regioni uniche e ripetute. Nei ceppi di laboratorio Towne e Toledo sono state identificate ulteriori ORF. In quest'ultimo, così come negli isolati clinici, la regione invertita ripetuta *b'* è assente e sostituita da una regione UL di circa 5 kbp, contenente 19 ORF aggiuntive che mancano nel genoma di HCMV AD169 (7).

Il confronto della sequenza aminoacidica di AD169 con quella del genoma di altri herpesvirus dimostra che i prodotti proteici di più di 40 ORF sono molto simili a proteine codificate dagli alpha- e gammaherpesvirus (8). Di queste ORF conservate tra gli herpesvirus, circa il 25% codifica funzioni relative al metabolismo e replicazione del DNA virale ed il restante 75% è coinvolto nella maturazione ed organizzazione strutturale dei virioni.

Ricerche di omologia di sequenza e studi sperimentali biochimici e genetici hanno consentito di assegnare una funzione soltanto ad alcune delle oltre 200 ORF. L'analisi del fenotipo di mutanti spontanei del ceppo AD169 con delezioni o inattivazioni in loci specifici ha tuttavia che i prodotti di più di 50 ORF non sono necessari per la replicazione virale produttiva in colture di fibroblasti. Questi risultati, insieme all'osservazione che le proteine responsabili di funzioni comuni a tutti gli altri herpesvirus (come la replicazione del DNA, l'organizzazione del virione, la maturazione) non rendono conto di tutte le ORF, indicano che la funzione di molte ORF deve essere ancora caratterizzata. E' probabile che molta della capacità codificante virale sia evoluta per ottimizzare l'infezione e la disseminazione del virus, la crescita nei tessuti bersaglio, i meccanismi patogenetici e la capacità di evadere la risposta immunitaria dell'ospite.



**Figura 2.** Struttura dei quattro isomeri del genoma di HCMV (da Landolfo et al. *Pharmacol Ther* 2003).

## 4.2 Ciclo replicativo di HCMV ed espressione dei geni virali

### 4.2.1 Permissività cellulare e crescita *in vitro*

Studi autoptici dimostrano che HCMV infetta un'ampia gamma di tessuti epiteliali. Le cellule più comunemente infettate sono quelle degli epiteli dei dotti ghiandolari, le quali sviluppano aspetti citopatici caratteristici (9). Durante l'infezione naturale HCMV replica in modo produttivo nelle cellule epiteliali, nelle cellule endoteliali, nelle cellule muscolari lisce, nelle cellule mesenchimali, negli epatociti, nei granulociti e nei monociti-macrofagi (9). Il DNA in forma latente può essere riscontrato nei progenitori dei macrofagi e granulociti del midollo osseo e nei monociti del sangue periferico (10). Al contrario, *in vitro*, le



uniche cellule completamente permissive per la replicazione sono i fibroblasti umani cutanei o polmonari, mentre gli isolati virali clinici replicano preferenzialmente in colture di cellule endoteliali. Anche alcune linee cellulari trasformate derivate da glioblastoma, come le U373MG, e le cellule muscolari lisce primarie di arteria consentono un'infezione produttiva, anche se a livelli inferiori rispetto ai fibroblasti (11,12). Nei fibroblasti il ciclo replicativo è lento, con un effetto citopatico tipico, caratterizzato da arrotondamento ed ingrandimento della cellula e dalla presenza di inclusioni intra- e perinucleari. Solamente i ceppi di laboratorio, come AD169 o Towne, producono un effetto citopatico generalizzato, con lisi dell'intero monostrato cellulare e rilascio di virioni a partire dal 3-4 giorno post-infezione (p.i.).

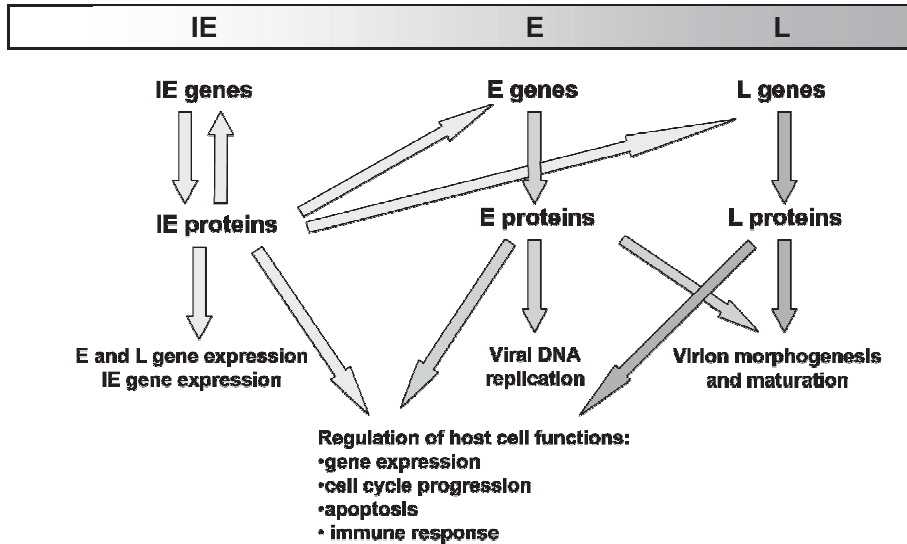
#### 4.2.2 Adesione e penetrazione di HCMV

L'adesione e la penetrazione del virus è rapida ed efficiente sia nelle cellule permissive che in quelle non permissive. Poiché la replicazione produttiva si osserva però in un *range* assai ristretto di cellule umane, dopo la penetrazione del virus deve esistere un blocco dell'espressione genica virale in modo da impedirne la replicazione nelle cellule non permissive. Il solo recettore, ancora scarsamente caratterizzato, di HCMV è ampiamente distribuito nei vari tipi di cellule dell'ospite e contribuisce all'ampio tropismo che si osserva nel corso dell'infezione naturale. L'ingresso del virus è il risultato di una cascata di interazioni tra proteine virali e cellulari che culmina nella fusione tra *envelope* e membrana plasmatica, mediante un processo indipendente dal pH. La fusione è seguita dall'ingresso del nucleocapside e delle proteine del tegumento nel citoplasma e dalla loro rapida traslocazione nel nucleo, dove pp65 viene dimostrata a meno di un'ora p.i. L'interazione delle glicoproteine di HCMV con i rispettivi recettori cellulari genererebbe delle vie di segnalazione intracellulare e conseguenti alterazioni dell'espressione genica, per lo più simili a quelle che si osservano dopo interazione degli interferoni con i loro recettori (13-15). Il ligando virale specifico che innesca questa risposta è verosimilmente gB e si ritiene che la sua interazione con un recettore non ancora conosciuto sia il meccanismo principale attraverso il quale HCMV modifica il profilo di espressione genica cellulare nelle fasi più precoci dell'infezione (16,17). Inoltre, il reclutamento delle glicoproteine gB e gH con i loro recettori è sufficiente per indurre l'attività dei fattori di trascrizione nucleari *nuclear factor-kB* (NF-kB) ed Sp1 (18).

#### 4.2.3 Regolazione dell'espressione genica virale

Durante l'infezione produttiva, il genoma di HCMV è espresso a cascata in una serie di eventi trascrizionali coordinati nel tempo, che portano alla sintesi di tre categorie di proteine virali, definite precocissime o *immediate-early* (IE o  $\alpha$ ),

precoci o *early* (E o  $\beta$ ), e tardivi o *late* (L o  $\gamma$ ) (Figura 3). L'espressione dei geni precoci e quindi la replicazione del DNA virale potrebbe rappresentare l'evento restrittivo che condiziona la permissività cellulare. I geni di HCMV sono trascritti dalla RNA polimerasi II cellulare con l'intervento di fattori di trascrizione cellulari, la cui attività può essere stimolata da transattivatori virali (19).



**Figura 3.** Espressione dei geni di HCMV e funzioni dei prodotti genici virali durante l'infezione produttiva (da Landolfo et al. *Pharmacol Ther* 2003).

#### 4.2.4 Caratteristiche e funzioni delle proteine precocissime

L'espressione dei geni di HCMV inizia da alcune proteine IE entro un'ora p.i. senza sintesi *de novo* di proteine. I geni IE comprendono i geni maggiori IE UL122/123 (IE1 ed IE2) e geni ausiliari, come UL36–UL38, UL115–UL119, IRS1/TRS1, e US3. Le proteine dei geni maggiori, da sole o in sinergia, sono richieste per la successiva espressione genica agendo da transattivatori o autostimolatori di geni virali. Queste proteine hanno inoltre un profondo impatto sulla fisiologia della cellula ospite, poiché regolano l'espressione di un numero elevato di geni dell'ospite (19). L'espressione dei geni maggiori EI è regolata da un elemento *enhancer* complesso, che funziona in modo specifico a seconda del tessuto, del tipo di cellula e del suo livello di differenziamento, e che esercita la sua forte attività trascrizionale interagendo con diversi fattori trascrizionali dell'ospite, i cui siti di legame sono presenti in questo elemento di regolazione trascrizionale. In un segmento di circa 500 bp a monte del TATA box dei geni *ie1/ie2*, la sequenza *enhancer* contiene diversi elementi ripetuti con siti di legame per NF- $\kappa$ B, AP-1, Sp1, e CREB/ATF. A monte della sequenza *enhancer* esiste una regione modulatrice che, in saggi di trasfezione transiente, è stata dimostrata in

grado di reprimere l'attività trascrizionale dell'*enhancer* in cellule indifferenziate (20).

La regione maggiore IE codifica 4 proteine, la più abbondante delle quali è la fosfoproteina nucleare pp72 (IE1-72), la cui funzione è richiesta per la replicazione virale a basse molteplicità di infezione. IE1-72 è in grado di autoregolare in senso positivo l'espressione dei geni *ie1/ie2* e *US3* attivando i corrispondenti elementi *enhancer* attraverso dei siti di legame per NF-κB. Coopera inoltre con un'altra proteina IE, IE2-86, per regolare l'espressione di geni virali appartenenti alle successive categorie. Stimola inoltre l'attività di diverse sequenze promotrici cellulari, tra cui quelle dei geni codificanti la diidrofolato reductasi, la DNA polimerasi α, *c-fos*, *c-myc*, NF-κB, e la timidilato sintasi. IE1-72 può anche avere effetti sulla regolazione del ciclo cellulare interagendo con la proteina p107 della famiglia del Retinoblastoma e con E2F1 (21). IE1-72 ha inoltre attività chinasi per cui si autofosforila e fosforila le proteine p107 e p130, E2F1, -2, e -3.

IE2-86 è una fosfoproteina nucleare la cui funzione è critica per la replicazione virale. IE2-86 è un potente regolatore trascrizionale che può sia stimolare che reprimere l'espressione di geni di HCMV e cellulari (19,22). Durante un'infezione produttiva, IE2-86 è la proteina chiave che regola la transizione dalla fase IE alla fase E e, probabilmente, anche alla fase L di espressione dei geni di HCMV. IE2-86 transattiva infatti sequenze promotrici di diversi geni E ed L, interagendo con fattori del complesso trascrizionale come *TATA-binding protein*, TFIIB, TAFII-130, e TFIID. Interagisce inoltre con altri fattori di trascrizione, come l'acetil-transferasi degli istoni, CREB, Sp1, c-Jun, e ATF-2, così come con fattori di regolazione del ciclo cellulare, tra cui p53, pRb, e p21 (23). Oltre ad attivare i geni E ed L, IE2-86 reprime l'espressione dei geni *ie1/ie2* e *US3*, tra cui la sua stessa espressione (19).

Inoltre, IE2-86 modula diversi processi cellulari, tra cui il controllo del ciclo cellulare e l'apoptosi (24). Infatti, IE2-86 blocca le cellule in fase S precoce, inibisce la sintesi del DNA cellulare e previene la divisione cellulare (25). Questo rende l'ambiente cellulare più favorevole alla replicazione virale, in quanto si rendono disponibili i precursori per la sintesi del DNA prodotti dalla cellula ospite, ma non più utilizzati dalla stessa cellula (23, 24).

Le funzioni degli altri geni IE sono eterogenee. TRS1 e IRS cooperano con IE1-72 e IE2-86 nella transattivazione dei promotori E. Le glicoproteine codificate dal gene *US3* sono implicate nell'evasione dalla risposta immunitaria. US3 è una glicoproteina localizzata nel reticolo endoplasmatico, dove impedisce il trasporto del complesso maggiore di istocompatibilità MHC-I verso il Golgi e quindi la presentazione dell'antigene (26,27).

La regione UL36–38 codifica invece proteine con proprietà antiapoptotiche, come UL36 e UL37 (28).

#### 4.2.5 Caratteristiche e funzioni delle proteine precoci

L'espressione dei geni E o  $\beta$  dipende dalla presenza di proteine funzionali IE, ma non da inibitori della replicazione del DNA virale. I geni E codificano per lo più proteine non strutturali, compresi fattori di replicazione del DNA virale, enzimi di riparazione e proteine coinvolte nell'evasione della risposta immunitaria. Mediante analisi del profilo di espressione genica virale è stato possibile disegnare la mappa temporale di espressione dei geni IE, E, ed L dell'intero genoma virale e dimostrare che l'espressione del 36% delle ORFs non era modificata dal trattamento con ganciclovir, che blocca la replicazione del DNA virale, e che quindi potevano essere classificate come E (29).

La trascrizione dei geni E è stimolata da IE2-86, da solo o in cooperazione con IE1-72, e mediata dalla transattivazione di TATA box e da fattori di trascrizione come CREB/ATF e Sp1.

#### 4.2.6 Replicazione del DNA virale

La replicazione, l'inversione e l'impacchettamento del genoma di HCMV avvengono nel nucleo delle cellule infettate. La sintesi del DNA virale inizia 16 ore p.i. Richiede l'attività di proteine essenziali e specifiche virali ed il contributo attivo di diverse proteine cellulari. Poiché HCMV, a differenza di altri virus erpetici, non codifica enzimi per la sintesi dei deossiribonucleotidi, esso dipende dal metabolismo della cellula ospite e, pertanto, non silenzia la sintesi di macromolecole dell'ospite, ma ne stimola la trascrizione e la traduzione genica. Nonostante l'induzione di uno stato simil-fase S, le cellule infettate da HCMV, come discusso sopra, non vanno incontro a replicazione del DNA e a divisione a causa del blocco del ciclo cellulare. In questo modo i precursori del DNA sono a disposizione del virus.

Sei ORF conservate del genoma di HCMV forniscono le proteine per la replicazione del DNA virale. Tra queste, ppUL57 impedisce il riappaiamento dei filamenti del DNA dopo lo srotolamento da parte del complesso elicasi-primasi. La replicazione richiede anche il contributo di altre proteine virali come la fosfoproteina codificata da *UL84*, la quale interagisce con IE2-86 e funge da fattore di inizio specifico dell'origine, stimolando la sintesi del DNA a partire dall'origine virale (*oriLyt*) (30).

La replicazione del DNA di HCMV prosegue attraverso una iniziale circolarizzazione del genoma entro 4 ore p.i., seguito dalla sintesi del DNA mediante un meccanismo bidirezionale  $\theta$  a partire da una singola origine di replicazione (*oriLyt*), la quale poi si tramuta in una fase tardiva di replicazione del

DNA in forma di *rolling circle*. Quest'ultima è responsabile della produzione della maggior parte del DNA virale, durante le fasi tardive di infezione, in forma di grandi unità di replicazione a concatamero, prive di frammenti terminali, che sono successivamente tagliate in frammenti di lunghezza tale da essere impacchettati.

Durante le ultime fasi della replicazione del DNA, i nuovi genomi sintetizzati maturano grazie ad inversione, taglio ed impacchettamento. L'inversione si verifica nelle unità concatameriche e porta alla formazione di una progenie di sequenze genomiche composte da un pool di quattro isomeri, i quali differiscono solamente per l'orientamento delle componenti L ed S. Segue quindi il taglio in corrispondenza dei segnali e l'impacchettamento dei genomi in capsidi preformati.

#### **4.2.7 Caratteristiche e funzioni delle proteine tardive**

Le proteine L, che hanno per lo più un ruolo strutturale, sono l'ultima classe di prodotti genici di HCMV espressi durante la sua replicazione e la cui trascrizione inizia più di 24 ore p.i. e necessita l'avvenuta replicazione del DNA virale. Si sa poco della regolazione della trascrizione dei geni L e dell'eventuale ruolo di fattori virali e/o cellulari nella loro espressione.

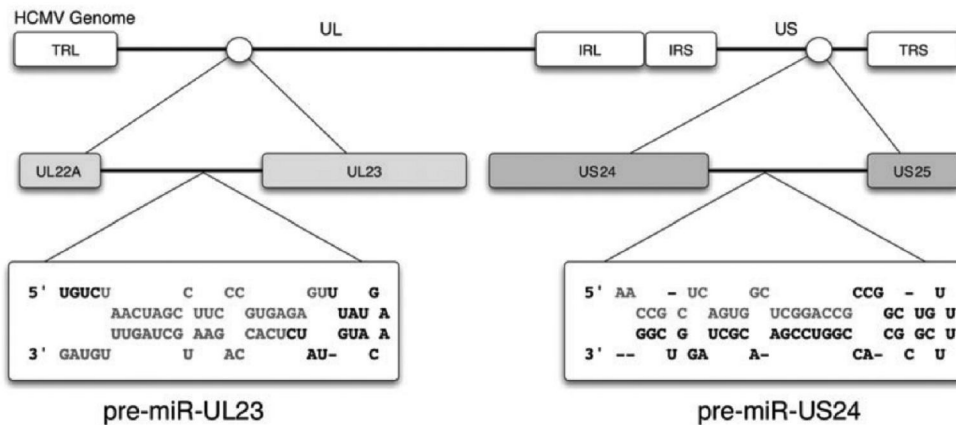
#### **4.2.8 microRNA di HCMV**

I microRNA (miRNA) svolgono probabilmente funzioni importanti nella regolazione dell'espressione genica in tutte le cellule somatiche di piante e animali. Finora sono stati identificati più di 300 diversi miRNA nell'uomo, e probabilmente un numero simile di miRNA è espresso negli altri vertebrati. Molti miRNA sono espressi in modo tessuto-specifico; sembra abbiano avuto una notevole importanza nell'evoluzione cellulare, promuovendo sia la selezione di importanti siti bersaglio per miRNA su mRNA la cui repressione è vantaggiosa per un determinato tessuto, sia la selezione contro potenziali siti bersaglio per miRNA su mRNA la cui espressione è richiesta in quello stesso tessuto. L'esistenza di meccanismi di regolazione genica post-trascrizionale mediata da miRNA potrebbe aver influenzato notevolmente anche l'evoluzione dei virus. Molti virus codificano miRNA, che possono agire sia sui geni virali che cellulari, mentre miRNA cellulari potrebbero svolgere un ruolo importante nel condizionare il tropismo virale.

Dal punto di vista del virus, i miRNA potrebbero essere degli strumenti per modificare l'ambiente cellulare al fine di massimizzare la replicazione virale (31). Innanzitutto, i miRNA potrebbero rappresentare un sistema estremamente specifico di inibizione dell'espressione di determinati geni cellulari in grado di inibire la replicazione virale; inoltre, ciascun miRNA maturo, comprese le

sequenze di regolazione in *cis*, occuperebbe poco spazio (meno di 200 nucleotidi o paia di basi), e ciò rappresenta un vantaggio se si considerano i vincoli stretti consentiti dalle dimensioni del genoma virale. Infine, i miRNA, a differenza delle proteine, non sono antigenici.

In teoria, i miRNA virali agirebbero solamente sugli mRNAs indotti dopo l'infezione, pertanto, i virus che vanno incontro rapidamente ad un ciclo di replicazione litico non dovrebbero codificare miRNA. E' più probabile, invece, che i miRNA siano codificati da virus nucleari a DNA, in grado di andare in latenza o di dare infezioni persistenti, come i virus erpetici. Infatti, tutti gli herpesvirus studiati finora codificano diversi miRNA, così come alcuni altri virus a DNA (SV40 ed adenovirus), a differenza dei virus a RNA, che non sembrano codificare miRNA. I miRNA espressi da HCMV finora identificati sono 11 (Figura 4): miR-UL22-1, miR-US5-1, miR-US5-2, miR-UL36-1, miR-UL112-1, miR-US25-1, miR-US25-2, miR-UL148D-1, miR-US33-1, miR-UL70-1, miR-US4-1 (32,33). L'espressione di questi miRNA potrebbe essere particolarmente utile durante la latenza o le infezioni persistenti; infatti, tutti i miRNA degli herpesvirus sono espressi nelle cellule in cui il virus è in latenza.



**Figura 4.** Sequenze e localizzazione genomica dei due pre-miRNA (pre-miR-UL23 e pre-miR-US24) codificanti tre miRNA di HCMV (miR-UL23-5p, miR-UL23-3p and miR-US24) (da Grey et al. J Virol 2005).

#### 4.2.9 Assemblaggio, maturazione e fuoriuscita dei virioni

La formazione di capsidi di HCMV e l'impacchettamento del DNA virale avvengono nel nucleo. Successivamente i nucleocapsidi acquisiscono un primo *envelope* gemmando dalla membrana nucleare, poi maturano mediante perdita e riacquisizione dell'*envelope* passando nel citoplasma, da dove vengono liberati all'esterno della cellula attraverso una meccanismo simile all'esocitosi (34).

I nucleocapsidi si accumulano in inclusioni che conferiscono al nucleo della cellula infettata il tipico aspetto ad "occhio di gufo". La fase iniziale è

l'interazione di pUL86 con la proteina *scaffold* AP pUL80.5 nel citoplasma; segue la sua traslocazione nel nucleo dove l'oligomerizzazione di questi complessi, catalizzata da AP, porta alla formazione degli esoni e dei pentoni, che interagiscono con i complessi pUL85-pUL46 per formare la struttura precursore del capsido. La successiva associazione di questa struttura intermedia con pUL48.5 completa la formazione del capsido, che diventa pronto per l'impacchettamento del DNA, dopo di che è rimossa AP. Durante la formazione dei capsidi, una serie di tagli proteolitici, catalizzati dalla proteina di assemblaggio pUL80a, porta alla maturazione del precursore UL80 in AP e alla dissociazione di UL86 da AP. I capsidi sono inizialmente avvolti da *envelope*, acquisito durante la gemmazione prima dal foglietto interno poi da quello esterno della membrana nucleare o del reticolo endoplasmatico, con la quale è contiguo. Passando al citoplasma, i capsidi perdono l'*envelope* primario e maturano acquisendo il tegumento. Ricevono l'*envelope* definitivo gemmando in vescicole dell'apparato di Golgi (35), attraverso il quale sono trasportati alla superficie cellulare.

La progenie virale si accumula nel citoplasma e le particelle virali vengono rilasciate nel compartimento extracellulare a partire da 72 ore p.i. Nelle fasi più tardive, comunque, un notevole numero di particelle virali è ancora associato alla cellula.

#### **4.3 Sfruttamento delle vie regolatorie del ciclo cellulare della cellula ospite da parte di HCMV**

Il principale obiettivo dei virus è quello di indurre dei cambiamenti metabolici, in grado di creare un ambiente cellulare ottimale per l'espressione genica e la replicazione del DNA e in grado di inibire selettivamente le funzioni cellulari, assicurando così che venga favorita la replicazione virale a discapito di quella cellulare. Gli effetti dell'infezione di HCMV sul ciclo cellulare cominciano con l'interazione tra le proteine del virione e i componenti del macchinario cellulare subito dopo l'entrata del virus. Il DNA virale viene trasportato nel nucleo e, se la cellula è in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, la trascrizione dei geni IE avviene senza ritardi. I prodotti dei geni IE interagiscono con alcune proteine del ciclo cellulare ed hanno un ruolo importante nel promuovere la sopravvivenza cellulare e nell'inibire l'apoptosi. Le proteine IE inoltre inducono l'espressione dei geni virali di classe E, le cui proteine sono richieste per la sintesi del DNA virale, il taglio e l'impacchettamento del genoma, e infine l'assemblaggio delle particelle virali. Le proteine *early* inoltre hanno anche un ruolo importante nel mantenere un ambiente intra ed extra-cellulare favorevole all'espressione genica virale ed alla

replicazione del DNA grazie alla sovversione del macchinario del ciclo cellulare (36, 37).

Molti studi in letteratura riportano la perturbazione della progressione del ciclo cellulare in cellule infettate con HCMV (38,39,40,41). Le cellule infettate in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> del ciclo cellulare non replicano più il loro DNA e si arrestano in una fase di pseudo G<sub>1</sub> (38, 42). Gli oncosoppressori pRb, p130, e p107, che inibiscono l'espressione dei geni E2F-responsivi e l'attività dei complessi della chinasi Cdk2, vengono mantenuti fosforilati nelle cellule infettate (43,36). Inoltre l'oncosoppressore p53 si accumula, ma non si osservano i suoi effetti sul promotore target (44). L'infezione è anche in grado di stimolare l'espressione dei proto-oncogeni *fos*, *jun* e *myc* e l'espressione di alcuni enzimi importanti per la replicazione del DNA (45,46). Viene inoltre disregolata anche l'attività delle chinasi ciclina-dipendenti.

#### **4.3.1 HCMV e ciclo cellulare**

Due proteine del virione, ppUL69 e pp71 (ppUL82), sono state implicate nella mediazione dell'arresto del ciclo cellulare. Facendo parte queste del tegumento del virione, possono attuare i loro effetti dopo l'entrata del virus nella cellula. La proteina codificata dal gene UL69 è stata inizialmente descritta come un transattivatore della trascrizione (47). Alcuni lavori successivi (2) la hanno implicata invece come iniziatore dell'arresto del ciclo cellulare osservato nelle cellule infettate con HCMV. In questi studi si è dimostrato che i fibroblasti umani non infettati transdotti con un retrovirus contenente il gene UL69 si accumulavano in fase G1 del ciclo cellulare. Più di recente, Hayashi (48) ha dimostrato che i virioni di HCMV che sono geno- e fenotipicamente negativi per UL69 non sono in grado di indurre il blocco del ciclo cellulare dopo infezione nei fibroblasti primari; fornendo in seguito UL69 in trans, il difetto di crescita veniva risolto. Questi risultati suggeriscono che ppUL69 potrebbe svolgere un ruolo precoce nell'iniziare l'arresto del ciclo cellulare nelle cellule infettate da HCMV. Anche la proteina pp71 è stata inizialmente identificata come transattivatore necessario per l'efficiente attivazione del promoter *major* IE durante le prime fasi di infezione (3,4). Al pari di UL69, la delezione del gene UL82 dal genoma virale causa gravi difetti di crescita che possono essere recuperati fornendo in trans il gene stesso (4, 49). Inoltre la proteina contiene un motivo LXCXD che si trova nelle proteine virali e cellulari e che è in grado di interagire con i soppressori di crescita pRb, p107, e p130 (50). Una delle vie che utilizzano queste proteine soppressori per scatenare i loro effetti sul ciclo cellulare è quella di formare dei complessi con il fattore di trascrizione legato al DNA E2F, portando quindi alla repressione della trascrizione. L'interazione richiede che pRb, p107 e p130 siano in uno stato di ipo-fosforilazione. In risposta agli stimoli di crescita, la fosforilazione di tali



proteine porta al rilascio di E2F permettendo quindi il richiamo del macchinario trascrizionale al DNA e l'espressione dei geni coinvolti nella progressione del ciclo cellulare. Sembra proprio che un ruolo suggerito per pp71 nella distruzione di questa via derivi dalla scoperta che pp71 espressa in maniera transiente in cellule non infettate sia in grado bersagliare la forma ipofosforilata di tali proteine degradandole (50,51).

Oltre alle proteine del virione sopra descritte, HCMV codifica due proteine IE che sono in grado di perturbare la normale progressione del ciclo cellulare in cellule non infettate. La regione *major* IE del genoma virale codifica le proteine IE1-72 e IE2-86; come già descritto, entrambe svolgono un ruolo importante nell'attivazione dell'espressione dei geni virali *early*. Hanno anche il potenziale di modulare il ciclo cellulare grazie alle loro attività trascrizionali e grazie al legame con le proteine chiave del ciclo cellulare. IE1-72 è in grado di indurre cellule quiescenti ad entrare in fase S e quindi provoca un ritardo nell'uscita dal ciclo cellulare (52) IE2-86, una delle proteine più studiate di HCMV, viene codificata dal gene UL122, ed è un potente transattivatore della trascrizione, essenziale per la progressione del ciclo litico di HCMV. Le funzioni di IE2-86 sembrano essere mediate attraverso interazioni proteina-proteina e proteina-DNA. IE2-86 è in grado di interagire con se stessa, con il prodotto del gene virale UL84, e con tutta una serie di proteine cellulari, tra cui anche quelle in grado di modulare il ciclo cellulare. La natura del ruolo di IE2-86 nel ciclo replicativo virale è critica, e rende quindi difficile la comprensione del ruolo di tale proteina nella modulazione del ciclo cellulare.

#### **4.3.2 HCMV e apoptosi**

La morte cellulare programmata, o apoptosi, è un processo di suicidio cellulare regolato geneticamente, importante nel controllo della proliferazione cellulare, del differenziamento e dell'eliminazione delle cellule danneggiate e infettate (53,54). Viceversa, la sovversione virale della regolazione dell'apoptosi, svolge un ruolo importante nella disseminazione e nella patogenesi di diverse infezioni virali (55,56). In genere, l'apoptosi può essere di tipo caspasi-dipendente o caspasi-indipendente. Dato che, per quanto riguarda l'infezione da HCMV, la via caspasi indipendente non è stata descritta ancora bene, la discussione verrà focalizzata sulle vie controllate dalle caspasi. I processi caspasi dipendenti sono ulteriormente suddivisi sulla base degli stimoli che promuovono la risposta apoptotica. L'apoptosi può scatenarsi da eventi all'interno della cellula che minano l'omeostasi come gli stress genotossici, le risposte agli stress del reticolo endoplasmatico, o la mancanza di stimoli alla crescita. In contrasto con questa via intrinseca, i segnali per la morte cellulare possono anche derivare dalla membrana plasmatica come risultato dell'attivazione esterna dei recettori di morte, per

esempio Fas/CD95 e il recettore del TNF. Questi eventi scatenano la via estrinseca di apoptosi.

*In vivo*, HCMV è in grado di indurre apoptosi in diversi tipi di cellule attraverso meccanismi differenti che possono favorire sia la *clearance* virale che lo sviluppo della patologia (57-60). HCMV codifica diverse proteine *immediate early* (IE), con proprietà antiapoptotiche, cioè IE1, IE2, vMIA e vICA (28, 61, 62). IE1 e IE2 inibiscono l'apoptosi indotta dal *tumor necrosis factor* (TNF) $\alpha$  o da adenovirus mancante della proteina E1B-19 kDa e inoltre IE2, ma non IE1, protegge le cellule della muscolatura liscia dall'apoptosi mediata da p-53 (63). vMIA blocca l'apoptosi a livello mitocondriale senza avere alcuna omologia strutturale con i membri della famiglia *bcl-2*. vICA inibisce l'apoptosi *Fas*-mediata legandosi al pro-dominio delle caspasi 8 e prevenendone l'attivazione.

#### **4.3.2.1 P53 e IE2-86**

P53 è in grado di coordinare molti processi cellulari attraverso la sua attività di attivatore trascrizionale e repressore in risposta allo stress e ai fattori di crescita, e svolge un ruolo fondamentale nel decidere se la cellula crescerà o andrà incontro ad apoptosi (64,65). L'attivazione di p53 viene modulata attraverso la sua fosforilazione, e la proteina è un substrato per diverse chinasi cellulari. La fosforilazione controlla l'associazione di p53 con MDM2, una proteina che si lega a p53 dirigendone la degradazione attraverso il proteosoma. In risposta ad un danno del DNA, a shock termici, mancanza di nutrienti, o ad altri insulti, i livelli di p53 vengono stabilizzati causando l'espressione dei geni p53-responsivi come l'inibitore delle Cdk p21; in ogni caso, la regolazione dell'apoptosi da parte di p53 è indipendente dall'arresto del ciclo cellulare indotto dall'espressione di p21 (66). Molti geni pro- apoptotici come Bax, PUMA, e Noxa vengono indotti da p53. Al contrario, l'espressione del gene pro-sopravvivenza Bcl2 viene repressa dalla sua attivazione. E' stato inoltre suggerito che p53 abbia un ruolo diretto nell'apoptosi promuovendo il rilascio del citocromo c nei mitocondri (67).

Nelle cellule infettate con HCMV, i livelli di p53 rimangono stabilizzati ma non si osserva l'espressione del gene target a valle p21, suggerendo che il virus codifichi delle proteine che impediscono la funzione di p53 (38,44,68,69). La proteina di HCMV IE2-86 si è dimostrata interagire fisicamente con p53 (70,71). L'espressione di IE2-86 infatti protegge alcune cellule dall'apoptosi mediata da p53 (63). Un lavoro recente di Hsu e colleghi (72) indica che in sistemi di espressione transiente, IE2-86 sia in grado di inibire il legame di p53 ai promotori target, come quello di p21, e quindi sia in grado di reprimere la trascrizione guidata da p53, come già precedentemente riportato (71,73). IE2-86 è quindi in grado di inibire l'attività post-trascrizionale di p53 e di contribuire all'inibizione dell'apoptosi osservata nelle cellule infettate da HCMV.

#### 4.3.2.2 HCMV UL37x1 e UL36: vMIA e vICA

Due proteine virali che inibiscono direttamente le tappe della via apoptotica a monte di p53 sono codificate dal locus UL36-38 (74-76). Questa regione include tre promotori che danno origine ad almeno cinque trascritti ed è indispensabile per la replicazione del DNA di HCMV (77-79). Ad ogni modo, solo il gene UL37 è essenziale nel contesto dell'infezione (49). Il più abbondante trascritto espresso dal promotore di UL37 è un RNA *unspliced* di 1.7-kb. Questo RNA è presente durante tutte le fasi dell'infezione e codifica una glicoproteina, UL37x1, anche chiamata *viral mitochondrial inhibitor of apoptosis* (vMIA) che ha come target i mitocondri (61,80). È proprio in questo sito che vMIA aiuta la soppressione dell'apoptosi indotta dalla risposta all'infezione virale prevenendo la permeabilizzazione dei mitocondri e, attraverso il sequestro di Bax (81), il rilascio del citocromo c, che attiva la procaspasi-9 e contribuisce quindi alla morte cellulare (61). vMIA protegge le cellule infettate dall'apoptosi nelle fasi tardive del ciclo vitale del virus e un mutante di HCMV vMIA-deficiente/vICA-deficiente non è in grado di replicare a meno che non infetti cellule che iper-esprimano un inibitore dell'apoptosi simile a Bcl-2 (82). Un altro membro della famiglia di proteine UL36-38 si è dimostrato agire a monte di UL37x1 e di interferire con l'attivazione della caspasi-8. La proteina codificata da UL36 è stata denominata vICA, *viral inhibitor of caspase activation*. Diversamente da UL37x1, UL36 non è essenziale per la crescita virale in coltura (49,28). vICA svolge un ruolo importante nel proteggere le cellule dall'apoptosi indotta dall'attivazione dei recettori di morte (*Fas*, *tumor necrosis factor receptor-1* (TNFR-I), and *Apo-2*) sulla superficie cellulare, prevenendo direttamente il taglio della procaspasi-8 alla forma attiva della caspasi-8. Sembra però proteggere solo marginalmente le cellule dall'apoptosi indotta dai farmaci citotossici o dall'infezione con adenovirus E1B19k deficiente. Il legame con *fas* porta al reclutamento della procaspasi 8 nelle porzione citoplasmatica di *fas* attraverso la proteina FADD, e seguente processazione proteolitica e attivazione delle procaspasi-8. vICA blocca l'apoptosi interferendo con l'attivazione della caspasi 8; si associa costitutivamente con la procaspasi 8 attraverso la regione con il dominio che contiene due domini effettori di morte (DED). Al contrario di quanto avviene con la pro-caspasi-8, FADD non co-immunoprecipita con vICA, e quindi sembra non associarsi con questo. Questo dato sembra favorire il modello in cui vICA blocca il reclutamento della procaspasi 8 al FADD. Resta ancora da determinare se vICA si associ direttamente, o attraverso un intermediario, con la pro-caspasi-8 (28). Dato che le funzioni di vICA si svolgono a monte dell'attivazione della caspasi-8, si può dedurre che la proteina sia in grado di proteggere una vasta gamma di cellule dall'apoptosi indotta dalla risposta immunitaria della cellula ospite.

### 4.3.2.3 Segnali pro-sopravvivenza

In aggiunta alle vie pro-apoptotiche perturbate o sfruttate da HCMV, il virus è anche in grado di stimolare vie coinvolte nella traduzione dei segnali di crescita dalla superficie cellulare al nucleo. Una delle più importanti proteine regolatorie cellulari è *Akt*, una chinasi coinvolta nel controllo traslazionale, nel metabolismo del glucosio, nella progressione del ciclo cellulare, e nell'inibizione dell'apoptosi (83). In risposta all'attivazione da parte dei fattori di crescita del recettore tirosin chinasi, la chinasi lipidica *PI3K* fosforila l'anello inositico del *PIP2*. Il prodotto di questa reazione, *PIP3*, porta al reclutamento e all'attivazione di *Akt* nella membrana plasmatica. La forma attiva di *Akt* può quindi fosforilare diversi substrati incluso *Bad*, caspasi-9, e il fattore di trascrizione *FKHR*. La modificazione di queste proteine inibisce la loro attività, promuovendo infine la sopravvivenza cellulare. Degli studi condotti da Johnson e collaboratori hanno dimostrato che nelle cellule infettate con HCMV avviene l'attivazione di *PI3K* e *Akt* (84). Sono state osservate due fasi di attivazione. Il legame del virus alla membrana plasmatica induce una prima attivazione transiente di *PI3K* che scema dopo 2 ore p.i. In seguito l'espressione dei geni virali è necessaria per sostenere l'attività di *PI3K* e *Akt*, che ha inizio dopo 4 ore p.i. Inibitori della via *PI3K/Akt* inibiscono la replicazione virale, suggerendo quindi che i segnali di sopravvivenza mediati da questa via sono importanti (84). Un lavoro successivo di Yu e Alwine ha confermato queste osservazioni e ha dimostrato in saggi di infezione transiente che gli effetti su *PI3K/Akt* vengono modulati da IE1-72 e IE2-86. Nel sistema sperimentale di questo studio viene anche mostrato come l'attivazione di *PI3K/Akt* sia importante per l'inibizione dell'apoptosi (85). Presi insieme, questi dati suggeriscono che l'attivazione della via di segnale *PI3K/Akt* promuove la sopravvivenza delle cellule infettate con HCMV durante le fasi di infezione precocissime (*early*) e precoci (*immediate-early*).

## 4.4 Epidemiologia dell'infezione da HCMV

HCMV è molto diffuso, sia nei paesi industrializzati che in via di sviluppo. Dopo l'infezione, è escreto nei fluidi corporei (urina, saliva, lacrime, seme, latte e secrezioni cervicali) per mesi o anni. Poiché l'infezione si accompagna in genere ad una sintomatologia lieve o subclinica, è comune la diffusione dell'infezione per via sia verticale che orizzontale. Circa il 10% dei bambini acquisce l'infezione entro i 6 mesi di vita, in seguito a trasmissione dalla madre per via placentare, durante il parto o l'allattamento. Dopo l'infezione primaria, il sistema immunitario dell'ospite non è in grado di eliminare il virus, che rimane in latenza e può perdurare per tutta la vita dell'ospite. In qualsiasi momento, HCMV può

riattivarsi dalla latenza e produrre virioni infettivi che diffondono nella saliva, urine e altri fluidi corporei. In genere, la riattivazione è asintomatica e consente al virus la facile trasmissione ad altri ospiti. Per ottenere questo stato di persistenza nell'ospite, HCMV ha evoluto strategie di elusione del sistema immunitario sia innato che adattativo.

Durante la latenza, HCMV risiede nelle cellule della linea mieloide; l'attivazione ed il differenziamento di queste cellule sono necessari per la riattivazione e la replicazione del virus. La riattivazione di HCMV è stata anche associata a stress, come per esempio si osserva negli astronauti durante i voli spaziali, nei pazienti ricoverati in terapia intensiva, o in condizioni di attivazione del sistema simpatico come dopo infarto del miocardio.

#### **4.5 Patogenesi delle malattie associate ad infezione da HCMV**

Negli individui immunocompetenti, l'infezione da HCMV è in genere asintomatica, mentre nei soggetti con sistema immunitario immaturo, come il feto, o compromesso, come il paziente con AIDS o trapiantato, l'infezione o la riattivazione virale può accompagnarsi a sintomi come febbre, astenia, epatite, polmonite interstiziale, gastroenterite o retinite. Circa il 50-90% dei soggetti sottoposti a trapianto di midollo o d'organo solido sviluppa un'infezione da HCMV nel periodo post-trapianto e la prevalenza di tale infezione raggiunge il 100% nei pazienti con infezione da HIV. Inoltre, con un'incidenza di infezione del 0.2-2%, HCMV è la più comune causa di difetti congeniti, come perdita dell'udito o ritardo mentale.

Più recentemente, l'infezione attiva da HCMV è stata associata a complicanze croniche nei pazienti sottoposti a trapianto d'organo, come aterosclerosi, sclerosi vascolare del trapianto, e *graft-versus-host disease* nei trapiantati di midollo osseo. La presenza di HCMV è stata dimostrata anche in placche psoriasiche e nell'intestino di soggetti affetti da malattia infiammatoria dell'intestino, così come in pazienti con artrite reumatoide, lupus eritematoso sistemico e sindrome di Sjogren (86), suggerendo un possibile ruolo di HCMV nella patogenesi delle malattie autoimmuni. Il virus è stato inoltre dimostrato in tumori del colon (87), della prostata (88) e nel glioblastoma multiforme (89).

##### **4.5.1 Latenza di HCMV in cellule della linea mieloide**

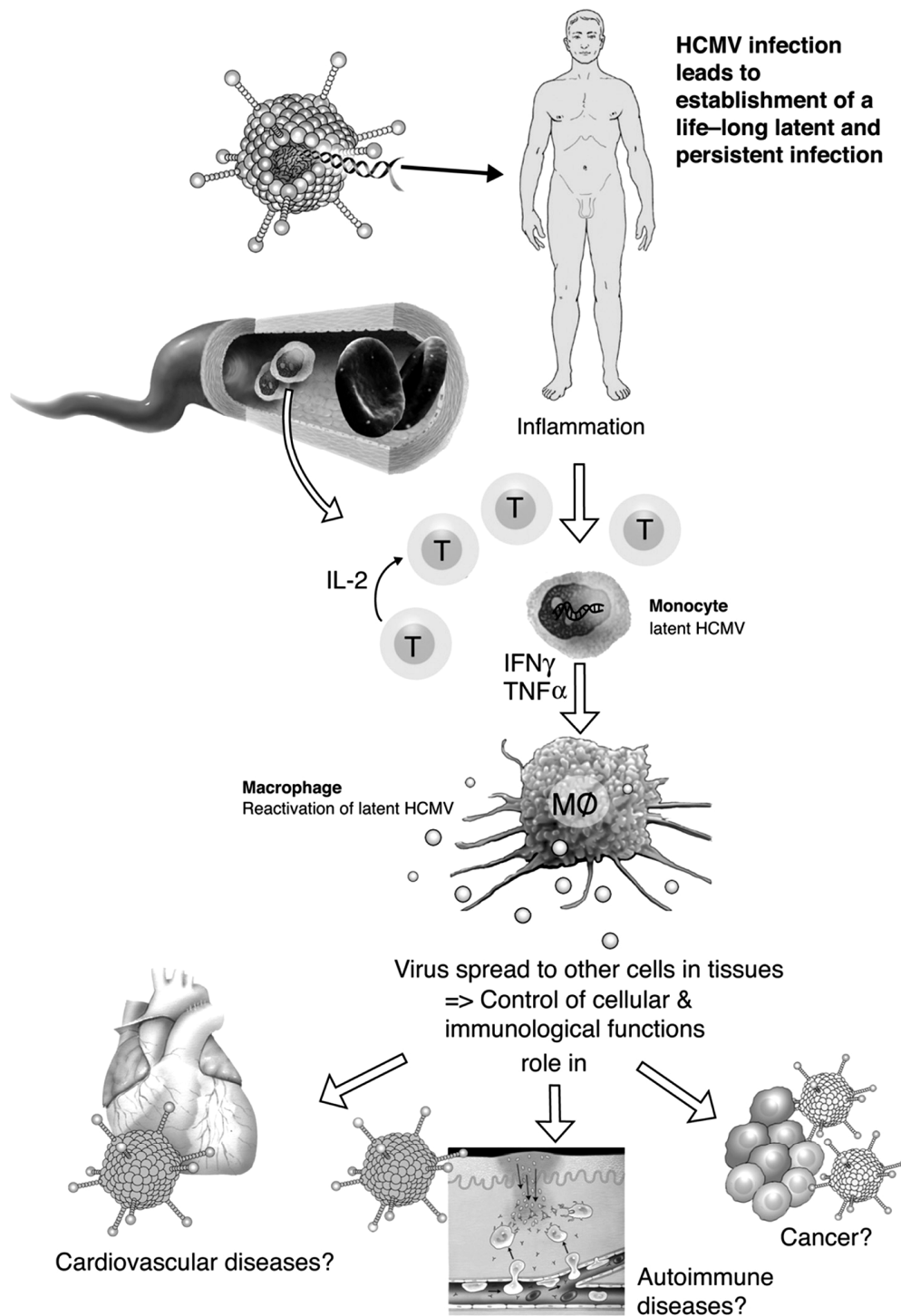
Durante la fase acuta dell'infezione da HCMV, virtualmente tutti gli organi possono essere coinvolti e dare origine a sintomi. L'analisi istologica ha dimostrato la presenza del virus in attiva replicazione nei tessuti di pazienti affetti da forme severe di infezione. Diversi tipi di cellule possono essere infettate, come

le cellule epiteliali, endoteliali, i macrofagi, i fibroblasti, le cellule muscolari lisce e gli epatociti, ma la capacità del virus di replicare varia a seconda del tipo di cellula. Per esempio, l'efficienza di replicazione è bassa nei macrofagi, nelle cellule dendritiche, nell'endotelio e nelle cellule epiteliali, mentre è elevata nei fibroblasti, i quali sono impiegati per coltivare il virus *in vitro*.

Nei soggetti sani sieropositivi, il DNA di HCMV, in assenza di espressione genica, è dimostrabile nei monociti, che sono quindi, per definizione, infettati dal virus in forma latente. HCMV infetta con difficoltà i monociti *in vitro*, nei quali la replicazione virale è abortiva o ristretta ai primi eventi di espressione genica (90). I macrofagi, invece, esprimono i geni virali tardivi, come si osserva nei pazienti con malattia da HCMV, e consentono la replicazione virale (90). Il blocco dell'espressione genica di HCMV nei monociti quiescenti non si verifica a livello di ingresso del virus, ma a livello trascrizionale o post-trascrizionale e sembra dipendere dal livello di differenziamento dei monociti/macrofagi (91). È stato inoltre dimostrato che la stimolazione allogenica dei linfomonociti del sangue periferico isolati da donatori sani HCMV-positivi può riattivare in HCMV dalla latenza in macrofagi *in vitro* (10). Pertanto, l'espressione di geni litici di HCMV nei monociti può essere indotta sia dal differenziamento in macrofagi che dalla presenza nell'ambiente di cellule infiammatorie attivate (92).

#### **4.5.2 Riattivazione di HCMV dalla latenza**

HCMV replica nei macrofagi, i quali derivano dal differenziamento dei monociti in seguito alla stimolazione da citochine, come interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (93). Queste citochine sono in genere prodotte da linfociti T attivati. TNF- $\alpha$  attiva il promotore IE nelle cellule mieloidi, aumentando così la replicazione virale, ma non è sufficiente per riattivare HCMV dalla latenza. Questo effetto può essere mediato da NF- $\kappa$ B (94). Nei preielociti indifferenziati si verifica invece la regolazione negativa della stessa sequenza promoter da parte di ATF/CREB, che quindi potrebbe condizionare la permissività di queste cellule (95). Queste osservazioni hanno importanti implicazioni cliniche: la riattivazione di HCMV dalla latenza nei macrofagi *in vivo* potrebbe essere un processo immuno-mediato che vede implicati l'attivazione dei linfociti T e la produzione di citochine come TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Figura 5). A sostegno di questa ipotesi, è stata dimostrata la riattivazione di HCMV in pazienti con elevati livelli sierici di TNF- $\alpha$ , come quelli con dermatite atopica (96), sepsi (97), o rigetto acuto del trapianto (98).



**Figura 5.** L'infezione primaria da HCMV porta all'instaurarsi di un'infezione latente e persistente per tutta la durata della vita dell'ospite. L'infiammazione porta alla riattivazione di HCMV dalla latenza nei macrofagi, i quali differenziano dai monociti in seguito alla stimolazione di citochine proinfiammatorie. Il virus diffonde poi ad altre cellule nei tessuti infiammati e, grazie alla sua capacità di alterare numerose funzioni cellulari ed immunitarie, potrebbe svolgere un ruolo patogenetico in malattie comuni, come le malattie cardiovascolari, le malattie autoimmuni e certi tipi di tumore (da Soderberger-Naucler C. *J Intern Med* 2006).

### 4.5.3 Meccanismi di evasione della risposta immunitaria

HCMV è uno degli antigeni immunodominanti più importanti incontrati dal nostro sistema immunitario e la risposta immunitaria specifica anti-HCMV, mediata da linfociti CD8+, può costituire anche il 50% dell'intero repertorio immunitario CD8+ nel soggetto sano di età avanzata (99). Per coesistere con l'ospite, HCMV ha quindi evoluto sistemi sofisticati di evasione del riconoscimento da parte del sistema immunitario ed è in grado di sfruttare specifiche funzioni del sistema immunitario per la sua stessa riattivazione e diffusione (Figura 6). HCMV è in grado di evadere il riconoscimento e l'eliminazione da parte delle cellule natural killer (NK) (100), così come il riconoscimento da parte delle cellule dendritiche - le più importanti cellule presentanti l'antigene - riducendo i livelli di espressione di MHC-I e MHC-II sulla loro superficie, la loro maturazione e migrazione in risposta a chemochine (101). In questo modo HCMV inibisce anche la risposta immunitaria cellulo-mediata contro altri virus. HCMV produce anche un omologo dell'interleuchina 10 (cmvIL-10), che può contribuire alla soppressione della funzione delle cellule dendritiche e dei monociti ed alterare la loro capacità di attivare i linfociti T (102).

Diverse proteine codificate da HCMV interferiscono in modo specifico con la presentazione dell'antigene, permettendo così alla cellula infettata di evadere il riconoscimento da parte dei linfociti T citotossici (103) e CD4+ (104). HCMV è anche in grado di sopprimere la risposta dei linfociti T direttamente, inibendo la loro proliferazione, come dimostrato *in vitro* (105).

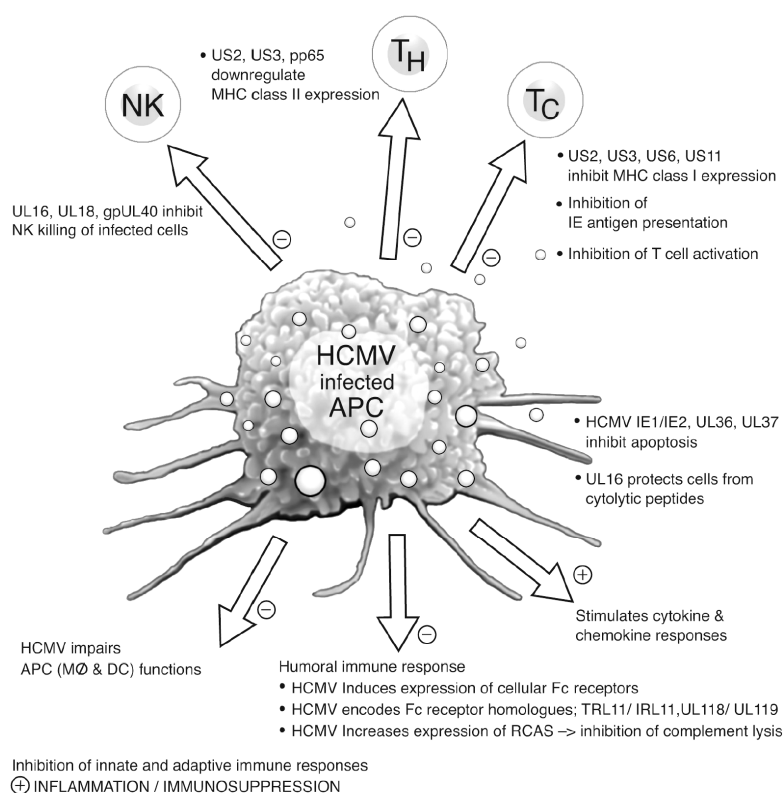
Per evadere la risposta immunitaria umorale, HCMV induce, nelle cellule infettate, l'espressione di un recettore Fc-gamma in grado di legare la regione Fc delle IgG (106); codifica inoltre dei suoi omologhi del recettore Fc, TR11/IRL11 (107) e UL119/118 (108). I recettori Fc codificati da HCMV possono nascondere le strutture antigeniche rivestendo la superficie della cellula infettata dal virus con IgG. Questo rivestimento impedisce l'interazione del complemento con la porzione Fc dell'anticorpo e protegge la cellula dalla citotossicità cellulare mediata da anticorpi. HCMV altera inoltre l'espressione cellulare di molecole regolatrici l'attivazione del complemento, come CD35, CD46 e Cd55 (109). In questo modo protegge la cellula infettata dalla lisi mediata da complemento.

I segnali mediati da citochine, chemochine e fattori di crescita orchestrano lo sviluppo ed il mantenimento della risposta immunitaria sia innata che adattativa all'infezione virale. L'infezione da HCMV induce la produzione di numerose citochine e chemochine, come IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IFN- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , monocyte chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  e RANTES (*regulated on activation, normal, T-cell expressed, and secreted*) (110-112). L'induzione delle citochine pro-infiammatorie è, almeno in parte, mediata dall'interazione di HCMV con il Toll-like receptor 2 e con il CD14 (113).



Il genoma di HCMV codifica due proteine omologhe delle chemochine, UL146 e UL147 (114), le quali potrebbero reclutare i neutrofilii nella sede di infezione, e quattro omologhi dei recettori delle chemochine, UL33, UL78, US27, US28, i quali sono in grado di legare chemochine come MCP-1 e MIP-1 $\alpha$  (115, 116). Si ritiene che questi omologhi recettoriali riducano le concentrazioni extracellulari di citochine, inibendo così il reclutamento di cellule dell'inflammatione nei tessuti infettati.

I diversi meccanismi impiegati da HCMV per distruggere specifiche funzioni del sistema immunitario hanno verosimilmente lo scopo di facilitare la persistenza del virus nel suo ospite. La distruzione di vie chiave della risposta immunitaria crea però una condizione generale di immunosoppressione, evento particolarmente grave nell'ospite immunodepresso come i pazienti trapiantati di organo solido o di midollo osseo, i quali sono maggiormente a rischio di infezioni batteriche o fungine gravi in corso di riattivazione della replicazione di HCMV (117).



**Figura 6.** HCMV infetta antigen-presenting cells (APC) come macrofagi e cellule dendritiche e ha sviluppato una serie di meccanismi sofisticati per impedire che le cellule infettate siano eliminate dal sistema immunitario. Questi meccanismi comprendono la produzione di proteine virali che inibiscono la risposta delle cellule NK, T helper e T citotossiche, così come meccanismi che inibiscono la risposta immunitaria umorale. Il virus controlla inoltre la produzione di citochine e chemochine e può stimolare un'inflammatione locale. Contemporaneamente, però, l'infezione da HCMV induce nell'ospite una condizione di soppressione generale del sistema immunitario (da Soderberger-Naucler C. *J Intern Med* 2006).

#### 4.5.4 Infezione da HCMV e cancro

Negli ultimi trent'anni numerosi studi hanno delineato una possibile implicazione di HCMV nell'eziologia di diversi tumori umani, ma, data l'elevata prevalenza dell'infezione nella popolazione, l'associazione causale tra l'infezione da HCMV e tumori non è stata ancora stabilita con certezza. HCMV è stato isolato da diversi tipi di tumore, come il cancro della cervice uterina, carcinoma coloretale, cancro della prostata, gliomi maligni, neuroblastoma, tumore di Wilm, sarcoma di Kaposi e linfoma di Hodgkin EBV-negativo (87-89,118,119) (Figura 7). In questi tumori HCMV appare in attiva replicazione, a differenza delle cellule normali circostanti, che risultano negative alla ricerca di HCMV. In certi tipi di tumore sembra quindi essere presente un'infezione persistente e attiva da HCMV. L'infezione è presente però in poche cellule, per cui può essere dimostrata solo con metodiche molto sensibili, mentre non è documentabile dall'analisi istopatologica.

HCMV non è stato dimostrato essere in grado di trasformare cellule umane normali, pertanto non è considerato oncogeno. Questo virus è stato invece definito un oncomodulatore, ovvero un virus in grado di modificare la biologia della cellula neoplastica, senza trasformarla direttamente (71). È stato dimostrato che, nelle cellule tumorali, le proteine regolatrici codificate da HCMV interferiscono con diverse vie di trasduzione del segnale portando all'aumento della proliferazione della cellula, favorendone la sopravvivenza, l'angiogenesi, la motilità e l'adesione, contribuendo quindi alla progressione neoplastica. La stimolazione dei sistemi di replicazione cellulare si deve, in parte, al blocco della funzione dell'oncosoppressore cellulare Rb operato dalle proteine virali IE-72, IE-86 e dalla proteina del tegumento pp71 (50,51,120), e, in parte, all'interazione di IE-86 con l'oncosoppressore cellulare p53 (71). Si attivano, di conseguenza, numerosi fattori dell'ospite che facilitano la replicazione virale spingendo la cellula ad entrare in fase S. Diversi prodotti genici virali codificati dai loci UL36-38 agiscono, inoltre, prevenendo i segnali apoptotici che attivano le caspasi. Questo fenomeno è opposto a quanto si osserva nei fibroblasti, che, dopo infezione da HCMV, si bloccano in fase G1/S e G2/M (121,71). È probabile quindi che le proteine di HCMV agiscano in modo diverso nelle cellule tumorali rispetto a quelle normali e a quelle delle linee cellulari, in grado di sostenere un'infezione attiva da HCMV.

Diverse linee cellulari umane, come quelle di glioblastoma, sarcoma osteogenico e neuroblastoma, sono in grado di sostenere a lungo un'infezione produttiva *in vitro*, fornendo quindi utili modelli per studiare le conseguenze a lungo termine dell'infezione, come per esempio la resistenza all'apoptosi e l'aumento dell'invasività tumorale (123). L'infezione attiva persistente in questi sistemi cellulari sembra essere associata ad un basso tasso di replicazione virale.

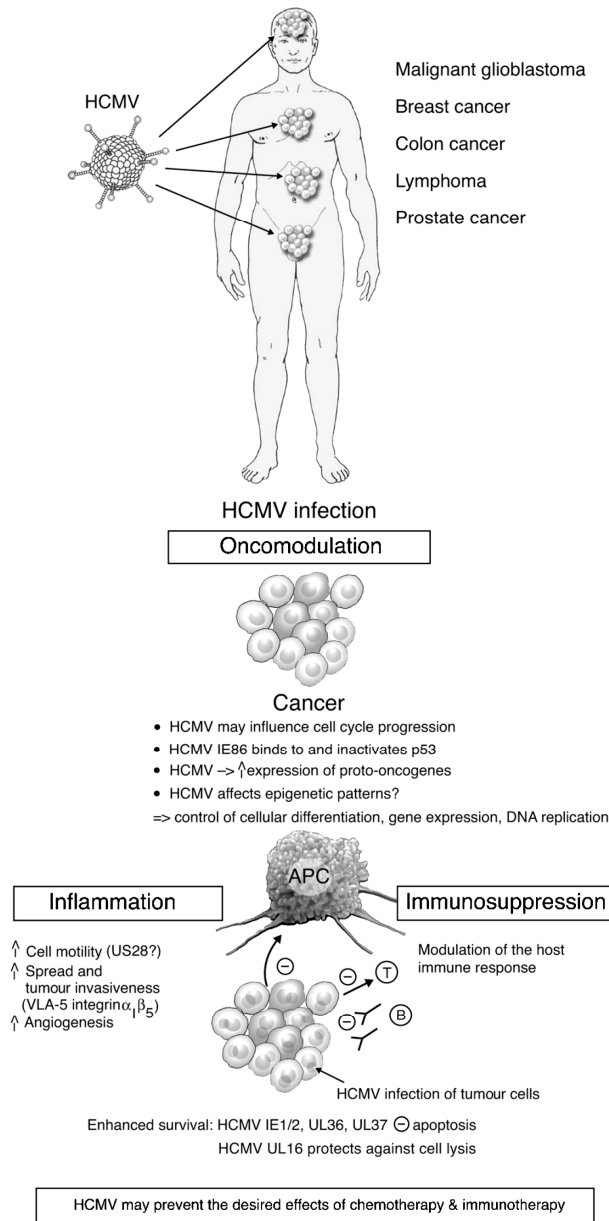
In questo contesto possono essere selezionati ceppi mutanti privi di determinate sequenze del DNA e con alterazioni della capacità di influenzare i *checkpoints* del ciclo cellulare (121,71). Di conseguenza, la presenza di infezione attiva e persistente nelle cellule tumorali potrebbe dipendere dalla selezione di ceppi di HCMV dalla crescita lenta e con mutazioni di geni codificanti proteine regolatrici. L'esistenza di un delicato equilibrio nel rapporto HCMV-cellula tumorale è dimostrato anche dalla perdita del virus quando si tenta di subcoltivarlo dal tessuto tumorale.

HCMV è in grado di modificare lo stato epigenetico della cellula, alterandone così indirettamente le funzioni genomiche. I meccanismi epigenetici che sembrano influenzati da HCMV comprendono la metilazione del DNA, modificazioni (acetilazione e metilazione) degli istoni e la produzione di molecole di RNA non codificante con funzione regolatrice. Per esempio, HCMV non è in grado di replicare in cellule di teratocarcinoma che esprimono l'istone deacetilasi 3 (HDAC3), mentre replica dopo specifica inibizione dell'enzima (124). Inibitori delle istone deacetilasi possono ripristinare in ceppi virali difettivi per IE1 la capacità di replicare nei fibroblasti (125). Sembra che sia IE1 che IE2 interagiscano in modo specifico con HDAC3 e che il rimodellamento della cromatina da parte di questi enzimi sia fondamentale per l'attivazione trascrizionale di IE1 e IE2. Lo stato epigenetico di una cellula ne può condizionare il livello di differenziamento, e quindi regolare la latenza e la riattivazione di HCMV. Pertanto, modificazioni epigenetiche nella cellula tumorale potrebbero portare alla riattivazione di HCMV dalla latenza e all'infezione attiva e persistente (126).

HCMV è in grado di alterare il pattern delle molecole di adesione espresse sulla superficie cellulare con conseguente aumento della migrazione e della invasività delle cellule, come nel caso di cellule di glioblastoma multiforme (127,128).

L'apoptosi è un meccanismo di eliminazione delle cellule infettate da virus. Le proteine IE-1, IE-2, UL36 e UL37 inibiscono l'apoptosi e, di conseguenza, la capacità di HCMV di sopravvivere nella cellula tumorale infettata (82,61,62,129).

Infine, un altro meccanismo attraverso il quale HCMV potrebbe favorire la tumorigenesi è l'evasione dalla risposta immunitaria. Diversi tumori infettati da HCMV dimostrano un infiltrato infiammatorio. In particolare, la ciclo-ossigenasi 2 (COX-2), che è iper-espressa in tumori del colon, della mammella, della prostata e del polmone e che rappresenta un fattore prognostico negativo, è indotta da HCMV *in vivo* (130), mentre il genoma di HCMV di *rhesus* codifica un omologo di COX-2, la cui funzione è ancora sconosciuta (131). L'inibizione di COX-2 blocca la replicazione di HCMV. Potrebbe quindi esistere un nesso tra HCMV, COX-2 e cancro.



**Figura 7.** Recenti dati descrivono una elevata frequenza di cellule infettate da HCMV in diversi tipi di tumore. HCMV potrebbe contribuire alla progressione neoplastica modulando le funzione della cellula tumorale (oncomodulazione) mediante produzione di proteine in grado di alterare il differenziamento cellulare, l'espressione genica, la replicazione del DNA e la progressione del ciclo cellulare. L'infezione da HCMV è stata anche implicata nell'aumento dell'invasività tumorale per l'aumento della migrazione delle cellule infettate. Il virus porta anche ad immunosoppressione, che può debilitare la difesa immunitaria dell'ospite contro la crescita tumorale. Le cellule tumorali infettate dal virus possono dimostrare una maggior sopravvivenza per l'aumento dell'espressione di proteine virali ad attività anti-apoptotica. Inoltre, la proteina di HCMV UL16 può conferire resistenza alla lisi cellulare da parte di cellule NK e linfociti T. Pertanto l'infezione delle cellule tumorali da HCMV può prevenire gli effetti desiderati della chemioterapia ed immunoterapia e dovrebbe essere tenuta in considerazione nei pazienti oncologici (da Soderberger-Naucler C. *J Intern Med* 2006).

## 4.6 HCMV e surrene

L'importanza del surrene nell'infezione da HCMV è messa in evidenza da vari studi condotti su pazienti affetti da AIDS. Nei soggetti HIV-positivi il virus è riscontrato con una frequenza che, pur variando nelle diverse casistiche dal 50% (132) a più del 90% (133), è così elevata da permetterci di considerare HCMV come il più comune agente patogeno virale opportunista nell'AIDS. In questi soggetti l'infezione da HCMV coinvolge molti organi, causando soprattutto polmonite e retinite, ma anche insufficienza surrenalica per coinvolgimento del surrene, con una prevalenza che varia dal 56% al 95% (134). L'insufficienza surrenalica, che si manifesta clinicamente quando più del 90% del tessuto surrenalico è distrutto, si manifesta nelle fasi più avanzate dell'AIDS ed è un'importante causa di morte dei soggetti HIV-positivi (134). Una diagnosi ed un trattamento tempestivo dell'insufficienza surrenalica potrebbero migliorare la sopravvivenza di questi pazienti. D'altro canto, il trattamento sostitutivo con glucocorticoidi può aumentare il rischio di infezioni opportunistiche, così come stimolare la replicazione di HCMV. Infatti, un aumento dell'incidenza di infezioni da HCMV si verifica in seguito a terapia immunosoppressiva con glucocorticoidi in soggetti sottoposti a trapianto di midollo osseo o di organo solido. Il virus, infatti, può essere riattivato nel ricevente o trasmesso attraverso componenti cellulari del sangue o cellule dell'infiammazione presenti nell'organo trapiantato.

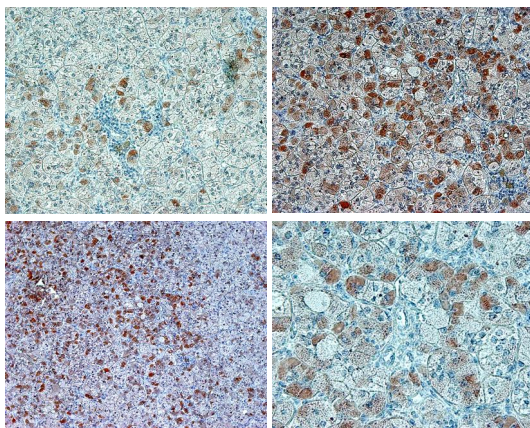
L'effetto degli ormoni corticosteroidi sulla replicazione virale è stato studiato in diversi tipi di cellule *in vitro*. Il trattamento con dosi terapeutiche di idrocortisone di colture di macrofagi infettate con HCMV AD169 rendeva queste cellule, normalmente semipermissive, permissive all'infezione produttiva da HCMV. Infatti la produzione di virus da parte di macrofagi infettati risulta aumentata di 100 volte dal trattamento con idrocortisone (135). Il meccanismo attraverso il quale si verifica un tale incremento nella produzione virale, non è ben chiaro. Sappiamo, però, che i glucocorticoidi hanno diversi effetti sui macrofagi *in vitro*. La produzione di molecole infiammatorie (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , anioni superossido) è inibita, mentre l'espressione di HLA-DR e del recettore per INF $\gamma$  aumenta. E' perciò possibile che l'idrocortisone aumenti indirettamente la replicazione di HCMV alterando la funzione cellulare e l'interazione del virus con la cellula ospite. E' inoltre probabile che l'idrocortisone o gli effetti fisiologici da esso indotti abbiano un effetto diretto sulla replicazione virale. Il complesso idrocortisone-recettore potrebbe legarsi direttamente al genoma virale oppure i secondi messaggeri, generati a seguito della stimolazione con tale glucocorticoide, potrebbero interagire con gli acidi nucleici (DNA o RNA) di HCMV. Queste conclusioni (aumento della permissività all'infezione e incremento della produzione virale) sembrano essere confermate anche da studi simili fatti in altri

tipi cellulari e con altri glucocorticoidi, come cellule umane embrionali di polmone trattate con desametasone (136), cellule neonatali umane di prepuzio e fibroblasti umani embrionali di rene trattati con cortisolo (137), dimostrando, ancora una volta, che i glucocorticoidi possono giocare un ruolo importante nella permissività a HCMV.

Da un punto di vista fisiologico, i glucocorticoidi sono importanti poiché, insieme alle catecolamine, in condizioni di stress orchestrano la risposta “combatti o fuggi”, che consiste nella rapida mobilitazione delle riserve energetiche dai siti di deposito (si parla di effetti diabetogeni e catabolici del cortisolo) al cervello e ai muscoli critici, accompagnata da un aumento della frequenza cardiaca per facilitare il trasporto di nutrienti e ossigeno ai tessuti bersaglio, assicurando così la sopravvivenza dell’organismo.

I glucocorticoidi hanno anche proprietà antinfiammatorie correlate alla soppressione delle citochine infiammatorie e agli effetti sul microcircolo. Mantengono la responsività vascolare ai vasocostrittori circolanti e si oppongono a un aumento della permeabilità capillare durante l’infiammazione acuta. Inibiscono la produzione e l’azione di mediatori dell’infiammazione come prostaglandine e citochine. Indeboliscono, perciò, la risposta immunitaria per limitare l’entità delle reazioni cellulari e tissutali, che, se protratte per un lungo periodo, porterebbero a una seria compromissione dell’organismo stesso.

Per quanto riguarda il ruolo di HCMV nella tumorigenesi surrenalica, non esistono studi riportati in letteratura, a parte un caso clinico da noi recentemente pubblicato (138). Si tratta del caso di una paziente in cui sono stati riscontrati casualmente un adenoma corticosurrenalico non funzionante ed un mielolipoma in regione surrenalica, entrambi asportati chirurgicamente. L’adenoma mostrava alterazioni cellulari suggestive di infezione da HCMV, confermate dalla ricerca del DNA virale e dall’analisi immunohistochimica dell’espressione delle proteine virali IE ed E (Figura 8). L’adenoma surrenalico era inoltre positivo alla ricerca di sequenze di BKV.



**Figura 8.** Analisi immunohistochimica dell’espressione di proteine precocissime e precoci di HCMV in un adenoma corticosurrenalico (da Pomara et al. *Eur J Histochem* 2006).

## 5 SCOPO DELLO STUDIO

Sulla base di evidenze della letteratura in cui viene riportato che HCMV può infettare il surrene in pazienti immunodepressi, scopo del presente studio è quello di verificare se il virus può essere riscontrato anche nei tumori surrenalici e inoltre quello di valutare l'effetto dell'infezione da HCMV su cellule corticosurrenaliche *in vitro*.

In particolare, obiettivi di questo studio sono:

- Ricercare in un'ampia casistica di tessuti surrenalici normali e neoplastici la presenza di sequenze genomiche di HCMV e l'espressione genica virale.
- Verificare se HCMV infetta e replica in cellule corticosurrenaliche *in vitro* e valutarne la cinetica di replicazione rispetto a cellule permissive come i fibroblasti umani.
- Verificare l'effetto dell'infezione da HCMV sulla secrezione ormonale e sull'espressione di geni coinvolti nella sintesi degli ormoni steroidei.
- Valutare, viceversa, l'effetto degli ormoni steroidei sulla replicazione di HCMV.
- Valutare se l'infezione con HCMV delle linee cellulari di carcinoma corticosurrenalico sia di tipo litico o persistente analizzando un eventuale effetto citopatico; valutare inoltre l'effetto dell'infezione virale sul ciclo cellulare, sul processo di apoptosi e sulla proliferazione cellulare.
- Valutare, infine, il profilo di espressione genica globale delle cellule corticosurrenaliche infettate da HCMV.





## 6 MATERIALI E METODI

### 6.1 Campioni di tessuto surrenalico

La casistica di tessuti surrenalici risulta composta da 20 surreni normali, 37 adenomi corticosurrenalici non funzionanti, 16 adenomi secernenti cortisolo, 12 aldosteronomi, 3 adenomi secernenti androgeni, 16 carcinomi corticosurrenalici (di cui 14 funzionanti e 2 non funzionanti) e 24 tumori della midollare del surrene (inclusi 21 feocromocitomi benigni, un feocromocitoma maligno, 2 ganglioneuromi).

#### 6.1.1 Analisi quantitativa con real-time PCR delle sequenze genomiche di HCMV nei tessuti surrenalici

Per l'analisi quantitativa in real-time PCR delle sequenze di HCMV DNA nei tessuti surrenalici, è stato isolato il DNA dai tessuti congelati o paraffinati dei campioni surrenalici con il QIAamp<sup>®</sup> DNA mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany) e il EX-WAX<sup>™</sup> kit (Chemicon<sup>®</sup> International Inc., U.K.), rispettivamente, seguendo le istruzioni della casa produttrice. La quantità media di DNA estratto da un campione era di circa 10 µg ed è stata diluita fino ad ottenere una concentrazione di 10 ng/µl, mentre la quantità media per tessuto paraffinato era di 500 ng di DNA (diluita a 6 ng/µl). Sono stati utilizzati circa 200 ng di DNA totale per l'analisi quantitativa delle sequenze di DNA virale in real-time PCR. Sia le purificazioni degli acidi nucleici che le analisi di PCR sono state effettuate almeno in doppio per confermare i risultati e ad ogni corsa sono stati aggiunti tre controlli negativi contenenti acqua per verificare che non ci fossero contaminazioni. Un campione è stato considerato positivo per la presenza di sequenze genomiche virali quando tutti i test ripetuti davano risultati positivi concordanti. La corsa di Real-time PCR è stata effettuata sullo strumento ABI PRISM 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, U.S.A.) utilizzando dei primers a oligonucleotidi (Sigma Aldrich, U.S.A.) e una sonda TaqMan (Applied Biosystems, U.S.A.) riportati nella Tabella 1. La quantità e la qualità del DNA purificato è stata valutata in Real-time PCR quantitativa amplificando il gene della β-globina come già riportato. La sensibilità del saggio di real-time PCR è stata stimata essere circa di 5 copie di genoma per reazione.

#### 6.1.2 Individuazione di HCMV DNA nei campioni di sangue

La rilevazione del DNA di HCMV è stata effettuata su circa 200.000 linfomonociti isolati da sangue periferico. La purificazione del DNA è stata effettuata con il QIAamp DNA *blood kit* in una stazione automatizzata (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

L'individuazione di DNA virale è stata realizzata in real-time PCR con l'utilizzo di primers a oligonucleotidi e sonde TaqMan specifiche per HCMV (Tabella 1). Le reazioni di Real-time PCR sono state preparate sulla stazione di lavoro ABI-PRISM 6700 (Applied Biosystems, U.S.A.) e corse sulla ABI-PRISM 7900HT *Real Time PCR System* (Applied Biosystems, U.S.A.). La quantificazione assoluta è stata valutata nei confronti di una curva standard ottenuta dall'amplificazione delle sequenza di DNA corrispondenti subclonate nel vettore pGEM®-T Easy Vector System (Promega Corporation, U.S.A.). Il numero di copie di genomi virali nei campioni clinici è stato calcolato direttamente dal software SDS della ABI PRISM 7900 e sono stati espressi come numero di copie di HCMV DNA/1x10<sup>5</sup> linfomonociti. Il numero di cellule presenti in ogni campione è stato misurato attraverso la conta cellulare e confermato con l'amplificazione in real-time PCR quantitativa della sequenza del gene della  $\beta$ -globina.

### **6.1.3 Ricerca di anticorpi anti-HCMV**

L'analisi degli anticorpi IgM e IgG per l'infezione da HCMV è stata effettuata mediante un saggio ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) utilizzando un kit presente in commercio (Enzygnost CMV; Dade Behring, Marburg, Germany).

### **6.1.4 Analisi immunoistochimica**

I tessuti surrenalici sono stati fissati in formalina, inclusi in paraffina e tagliati in sezioni di 4  $\mu$ m. L'analisi immunoistochimica è stata effettuata per la rilevazione dell'antigene ppUL83 (Argene SA, Varilhes, France, CINApool) di HCMV. Gli anticorpi primari sono stati incubati per un ora a temperatura ambiente. Come sistema di rilevazione è stato utilizzato il NovoLink Polymer (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK).

## **6.2 Linee cellulari**

Per la produzione virale e gli esperimenti di infezione sono stati utilizzati rispettivamente fibroblasti umani di polmone MRC-5, fibroblasti embrionali di prepuzio umano HFF e le due linee cellulari umane di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R e SW-13.

### **6.2.1 Cellule SW-13**

La linea SW-13 umana (American Type Culture Collection, ATCC, CCL-105) è stata allestita partendo da un carcinoma corticosurrenalico primario a cellule piccole non secernente di una donna di razza caucasica di 55 anni (139).

Le cellule aderiscono alle comuni plastiche dei contenitori di coltura cellulare e proliferano, assumendo una morfologia epiteliale, formando monostrati. La propagazione in coltura è stata ottenuta utilizzando il terreno di crescita Leibovitz L-15 con L-glutammina 2 mM ed L-amminoacidi (89%), addizionato con siero fetale bovino (FBS, 10%) ed antibiotici (pennicillina 10.000 I.U./ml e streptomycina 10.000 µg/ml, 1%) e incubando le cellule a 37°C in atmosfera priva di CO<sub>2</sub>. Generalmente e' stato impiegato un tasso di subcoltivazione pari a 1:4 - 1:6, cambiando il terreno di coltura 2-3 volte alla settimana.

### **6.2.2 Cellule NCI-H295R**

La linea NCI-H295R umana (ATCC, CRL-2128) è stata allestita più recentemente partendo da un carcinoma corticosurrenalico secernente di una donna bianca di 48 anni (140). Le cellule NCI-H295R aderiscono alle comuni plastiche dei contenitori di coltura e proliferano, assumendo una morfologia epiteliale, formando monostrati. Questa linea risulta di particolare interesse negli studi coinvolgenti la steroidogenesi surrenalica data la sua capacità di produrre tutti gli steroidi del corticosurrene. La propagazione in coltura è stata ottenuta utilizzando il terreno di crescita RPMI-1640: 10 mM HEPES, 1 mM piruvato di sodio, 2 mM L-glutammina, 4.500 mg di glucosio/L, 1.500 mg di bicarbonato di sodio/L (96%), addizionato con siero fetale bovino (FBS, 2%), antibiotici (pennicillina e streptomycina, 1%) e una soluzione di insulina-transferrina-selenio (ITS-A 100X, 1%) (Invitrogen, U.S.A.) e incubando le cellule a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. Generalmente e' stato impiegato un tasso di subcoltivazione pari a 1:2 - 1:4, cambiando il terreno di coltura 2-3 volte alla settimana.

### **6.2.3 Cellule MRC-5**

La linea cellulare MRC-5 (ATCC, CCL-171) è stata ottenuta, nel 1966 da J. P. Jacobs, partendo dal tessuto polmonare sano di un feto maschio di 14 settimane (141). Le cellule MRC-5 aderiscono alle comuni plastiche dei contenitori di coltura e proliferano, assumendo una morfologia fibroblastoide, formando monostrati. Il loro comportamento di crescita in coltura è lo stesso che si osserva comunemente con linee cellulari di fibroblasti umani. Le cellule MRC-5 possiedono la caratteristica di essere suscettibili all'infezione erpetica, particolarmente da HCMV. La propagazione in coltura è stata ottenuta utilizzando il terreno di crescita: Minimum essential medium (Eagle) contenente 2 mM di L-glutammina e BSS Earle 1.5 g/L bicarbonato di sodio, 0.1 mM amminoacidi non-essenziali, 1.0 mM piruvato di sodio (90%), addizionato con FBS (10%) e incubando le cellule a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. Generalmente è stato impiegato un tasso di subcoltivazione pari a 1:6 con una frequenza di 2-3 volte a

settimana. Per il mantenimento in coltura è stato, invece, fornito lo stesso terreno arricchito al 2% di FBS.

#### **6.2.4 Cellule HFF**

I fibroblasti HFF (ATCC, SCRC-1041™) sono stati isolati nel 2003 da un pool di cellule di prepuzio umano appartenenti a due individui maschi neonati. Le cellule HFF aderiscono alle comuni plastiche dei contenitori di coltura e proliferano, assumendo una morfologia fibroblastoide, formando monostrati. Il loro comportamento di crescita in coltura è lo stesso che si osserva comunemente con linee cellulari di fibroblasti umani; possiedono la caratteristica di essere suscettibili all'infezione erpetica, particolarmente da HCMV. La propagazione in coltura è stata ottenuta utilizzando il terreno di crescita: Dulbecco's modified Eagle's medium contenente 4 mM di L-glutamina e BSS Earle 1.5 g/L bicarbonato di sodio, 0.1 mM amminoacidi non-essenziali, 1.0 mM piruvato di sodio (90%), addizionato con FBS (10%) e incubando le cellule a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. Generalmente è stato impiegato un tasso di subcoltivazione pari a 1:6 con una frequenza di 2-3 volte a settimana. Per il mantenimento in coltura è stato, invece, fornito lo stesso terreno arricchito al 2% di FBS.

#### **6.2.5 Colture primarie umane di tumori corticosurrenalici**

Le colture primarie sono state allestite a partire da campioni di carcinoma corticosurrenalico, adenoma surrenalico e feocromocitoma. I tessuti tumorali sono stati sminuzzati, sottoposti a digestione in medium di coltura addizionato di proteinasi K e DNAsi a 37°C in bagno temostatato in agitazione per 90 minuti, centrifugate e risospese in terreno di coltura DMEM, addizionato di FBS 10%, antibiotici (penicillina e streptomina, 1%), amfotericina 1%, e ITS-A 1%, seminate su piastre per coltura cellulare e fatte crescere in incubatore a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>.

### **6.3 HCMV**

#### **6.3.1 Isolati clinici di HCMV**

Isolati clinici di HCMV sono stati ottenuti mediante coltivazione in cellule MRC-5 di campioni di urine ottenute da pazienti con infezione da HCMV.

#### **6.3.2 HCMV AD169**

Il ceppo virale AD169 (ATCC, VR-538), appartenente alla famiglia degli *Herpesviridae* (*Betaherpesvirinae*, *Cytomegalovirus*, Human herpesvirus 5), è

stato isolato dalle tonsille di una bambina di 7 anni. Fornito come stock congelato, AD169 è stato adattato in laboratorio per l'infezione di fibroblasti in coltura. L'ospite consigliato è, infatti, la linea cellulare MRC-5. In coltura cellulare *in vitro*, AD169 dà effetto citopatico (CPE), evidenziato da spaziature tra le cellule, cellule rotondeggianti e non adese. Viene raccomandato un livello di sicurezza di 2 (BL2) nel maneggiare il virus ed è richiesto un lungo periodo di tempo (10-11 giorni) di incubazione dello stock fornito prima della manifestazione dell'effetto citopatico.

## **6.4 Produzione e titolazione di HCMV**

### **6.4.1 Produzione dello stock virale AD169**

Per la produzione dello stock virale concentrato di HCMV AD169 si procede all'infezione e all'espansione delle cellule permissive al virus con conseguente produzione virale. Alle cellule MRC-5 non completamente confluenti, fatte crescere in fiasche T75, viene aggiunta un'aliquota (corrispondente ad una molteplicità di infezione, MOI, molto bassa, compresa tra 0.1 e 0.01) dello stock virale AD169 conservato in azoto liquido. Le fiasche vengono incubate a 37°C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub>. Dopo circa 10-11 giorni, osservato il caratteristico effetto citopatico evidenziato dalla presenza di cellule megaliche (ingrandite ed allargate), si procede alla raccolta del virus ed alla sua purificazione. Le cellule infettate vengono distaccate meccanicamente, per mezzo di *scrapers*. La sospensione cellulare viene riposta in falcon da 50 ml e centrifugata a 3000 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente. Il surnatante contenente il virus viene conservato momentaneamente in ghiaccio (4°C), mentre il pellet cellulare viene risospeso in terreno di coltura e sottoposto a tre cicli di shock termico (un ciclo: in azoto liquido per qualche minuto, successivamente a 37°C per qualche minuto) ed a sonicazione per 15 minuti. Il prodotto sonicato e successivamente centrifugato (15' a 3000 rpm a 4°C) per eliminare i detriti cellulari, viene unito al surnatante. Lo stock virale concentrato viene aliquotato in tubi da congelamento sterili e riposto a -80°C in un bagnetto di isopropanolo che permette allo stock di perdere temperatura molto lentamente (1°C ogni minuto), infine viene conservato in azoto liquido.

### **6.4.2 Determinazione del titolo virale**

La titolazione è stata eseguita mediante saggio delle placche, immunofluorescenza per pp72 delle cellule infettate, real-time PCR quantitativa.

Nel saggio di immunofluorescenza sono state utilizzate delle colture di MRC-5 in *shell vials*, nelle quali le cellule erano seminate alla concentrazione di

150.000 cellule/provetta e fatte crescere fino alla confluenza. Ciascuna provetta di cellule è stata infettata con 1 ml di terreno di coltura contenente diluizioni seriali 1:10 dello stock virale (da  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ) in duplicato. Dopo aver lasciato le cellule in incubazione a  $37^{\circ}\text{C}$  per 24h, si è proceduto con la ricerca dell'espressione dell'antigene precocissimo di HCMV pp72 tramite immunofluorescenza utilizzando l'anticorpo anti-pp72 di HCMV (E13 IgG1 type, Chemicon<sup>®</sup> International Inc., U.K.). Le cellule sono state osservate al microscopio a fluorescenza per la conta delle cellule positive, prendendo in esame le cellule infettate con le diluizioni  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ . Il titolo virale medio ottenuto era di  $1-2 \cdot 10^6$  paricelle virali infettanti/ml.

Nel saggio delle placche sono stati infettati fibroblasti MRC-5 (150.000 cellule/pozzetto), seminati in piastre da 24 pozzetti, con 250  $\mu\text{l}$  delle diluizioni seriali 1:10 dello stock virale da titolare e lasciati in incubazione a  $37^{\circ}$  per 2h prima dell'aggiunta di una matrice di metilcellulosa, per impedire al virus di diffondere. Dopo circa 10 giorni le cellule sono state fissate e colorate con cristal violetto e le placche contate al microscopio. Sono state esaminate solo le cellule infettate con le diluizioni  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ . Il titolo virale medio ottenuto era  $1-2 \cdot 10^6$  pfu/ml. Per gli esperimenti riportati in questo studio è stato preso in considerazione il risultato della titolazione con saggio delle placche. Il virus titolato era conservato in azoto liquido.

Negli esperimenti di time course di infezione, la titolazione di HCMV è stata eseguita mediante real time PCR quantitativa con sonde TaqMan (Applied Biosystems, U.S.A.), previa estrazione del DNA con il kit QIAmp DNA mini kit (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany).

## **6.5 Infezione delle cellule**

Le cellule surrenaliche subconfluenti sono state infettate con HCMV AD169 alla MOI desiderata. L'infezione era eseguita sostituendo al medium di coltura, un medium privo di siero contenente la diluizione del virus. Dopo 2 ore il medium di infezione era rimosso e sostituito con il medium di coltura. Il controllo negativo è stato ottenuto trattando le cellule nello stesso modo senza però l'aggiunta del virus. A 8h, 24h, 72h dopo l'infezione, le cellule sono state sia fissate per l'immunofluorescenza sia raccolte per l'estrazione dell'RNA totale utilizzato nell'analisi con microarray. Per l'esperimento di replicazione virale e di espressione dei geni virali, le cellule e il sovrinatante sono stati raccolti dopo 1, 3, 5, 7, 11 giorni dopo l'infezione. Per l'analisi del ciclo cellulare, le cellule sono state sincronizzate tramite privazione di siero nelle 24 ore antecedenti l'infezione e poi raccolte dopo 3 e 7 giorni dall'infezione. Per l'analisi dell'apoptosi e della

proliferazione cellulare, le cellule sono state raccolte dopo 24 e 72 ore dall'infezione.

## **6.6 Studio dell'espressione di proteine precoci e tardive di HCMV mediante immunofluorescenza**

Le cellule infettate sono state lavate due volte con PBS, fissate in acetone 90% freddo e successivamente fatte incubare per trenta minuti a 37°C con l'anticorpo primario murino contro l'antigene "immediate early" di HCMV pp72 (E13 IgG1 type, Chemicon<sup>®</sup> International Inc., U.K.) o quello per la fosfoproteina della matrice pp65 (CINA IgG1 type, Chemicon<sup>®</sup> International Inc., U.K.) e infine sono state marcate per 30 minuti a 37 °C in assenza di luce con un anticorpo secondario di capra anti-IgG di topo coniugato a fluoresceina (Ig-FITC, Chemicon<sup>®</sup> International Inc., U.K.). Nel dettaglio, gli anticorpi primari utilizzati nello studio riconoscono le proteine virali precocissime (*immediate early*) pp72, pp52 e pp86, codificate dai geni IE1-72, IE2-86 (UL122/123) e la proteina virale tardiva (*early late*) pp65, codificata dal gene UL83. L'anticorpo monoclonale murino E13 riconosce le proteine virali non-strutturali precocissime di HCMV (pp72, 52 e 86) e marca specificatamente un epitopo comune codificato dall'esone 2 del gene MIE (*Major Immediate Early*). Questo antigene viene espresso, a livello nucleare, dopo circa 2 ore post-infezione e raggiunge il suo picco di massima produzione a 48 ore dopo l'infezione, persistendo durante l'intero ciclo infettivo di HCMV. L'anticorpo monoclonale murino CINA è specifico per la fosfoproteina strutturale virale della matrice interna di 65-68 kDa denominata pp65. Questa è una proteina tardiva del ciclo replicativo virale che viene espressa a livello dei nuclei e del citoplasma delle cellule permissive all'infezione da HCMV. La sua presenza o la sua assenza depongono a favore di un'infezione di tipo produttivo o di tipo abortivo, rispettivamente.

## **6.7 Dosaggi ormonali**

Per il dosaggio del cortisolo, aldosterone ed estradiolo sono stati utilizzati dei saggi EIA (Cortisol, Aldosterone and Estradiol EIA Kit, Cayman<sup>®</sup> Chemical, U.S.A.), mentre per DHEAS un ELISA competitivo (DHEAS Direct ELISA Kit, Diagnostic Biochem Canada Inc., Canada).

Il protocollo dell'EIA si basa sulla competizione tra l'ormone da analizzare e lo stesso ormone coniugato all'acetilcolinesterasi (AchE-tracer) per un numero limitato di siti di legame dell'antisiero di coniglio ormone-specifico. Visto che la

concentrazione del tracer viene mantenuta costante, mentre la concentrazione di ormone-analita varia, la quantità di tracer in grado di legare l'antisiero di coniglio sarà inversamente proporzionale alla concentrazione dell'ormone-analita aggiunto al pozzetto. Il complesso analita-antisiero di coniglio (sia libero che sotto forma di tracer) si lega agli anticorpi monoclonali IgG di topo anti-coniglio già legati alla superficie del pozzetto di reazione. Infine viene aggiunto il reagente di Ellman (contenente il substrato per l'AchE). Il prodotto di questa reazione enzimatica risulta di colore giallo e assorbe fortemente a 412 nm. L'intensità di questo colore, determinata spettrofotometricamente, è direttamente proporzionale alla quantità di ormone-tracer che si è legato al pozzetto che a sua volta è inversamente proporzionale alla quantità di analita libero aggiunto al pozzetto stesso.

La reazione prevede il caricamento della standard e dei campioni insieme all'ormone coniugato all'enzima e alla soluzione di anticorpo murino. Dopo un incubazione di 16 ore a 4° C, viene aggiunto il substrato per l'acetilcolinesterasi e viene effettuata la lettura dell'assorbanza.

Il principio del test immuno-enzimatico per il dosaggio di DHEAS segue il tipico protocollo del legame competitivo. La competizione avviene tra un antigene non coniugato (presente nella standard, nel controllo e nei campioni da analizzare) e l'antigene coniugato alla perossidasi per un numero limitato di siti di legame dell'anticorpo nel pozzetto dove avviene la reazione. Dopo il lavaggio, si aggiunge il substrato per la perossidasi e si lascia in incubazione a temperatura ambiente fino a fermare la reazione con una soluzione di H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Si legge infine l'assorbanza a 450 nm. L'intensità del colore che si forma dalla reazione è inversamente proporzionale alla concentrazione di DHEAS nel campione.

## **6.8 Estrazione e purificazione dell'RNA cellulare**

Dalle cellule NCI-H295R ed SW-13 infettate e di controllo non infettate è stato estratto l'RNA totale utilizzando il kit Quiagen© RNeasy Mini Kit secondo il protocollo del produttore (QIAGEN GmbH, Hilden, Germany). La quantificazione dell'RNA purificato è stata effettuata tramite misurazione spettrofotometrica a 260 nm (ND-1000 Spectrophotometer; NanoDrop®, U.S.A.). La valutazione qualitativa dell'RNA è stata invece effettuata utilizzando l'Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, U.S.A.). L'RNA è stato infine retrotrascritto mediante MuLV (Applied Biosystems, U.S.A.).



## **6.9 Analisi dell'espressione genica mediante real-time RT-PCR quantitativa**

Mediante real-time RT-PCR quantitativa sono state valutate le variazioni nell'espressione di alcuni fattori di trascrizione ed enzimi chiave coinvolti nella steroidogenesi e di alcune citochine coinvolte nella reazione immunitaria e infiammatoria. I geni analizzati sono: *CYP17*: 17 $\alpha$ -idrossilasi; *CYP21*: 21 $\beta$ -idrossilasi; *CYP11B1*: 11 $\beta$ -idrossilasi; *CYP11B2*: aldosterone sintetasi; *CYP11A*: cholesterol side-chain cleavage; *CYP19*: aromatasi; *StAR*: steroidogenic acute regulatory protein; *3 $\beta$ -HSD2*: 3 $\beta$ -idrossisteroidodeidrogenasi; *IL6*: interleuchina 6; *DAX1*: dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene-1; *LRH*: liver receptor homolog; *SF1*: steroidogenic factor-1; *SHP*: small heterodimer partner. E' stata inoltre valutata l'espressione del gene *housekeeping GAPDH* per la normalizzazione dei dati. Nelle tabelle 1 e 2 vengono riportate le sequenze dei primers e delle sonde utilizzate, scelte in modo tale da amplificare il solo mRNA (*intron-spanning*) e non il DNA cellulare, e le relative temperature di annealing. Per quanto riguarda i geni per i quali vengono descritti i soli primers e non le sonde, questi sono stati amplificati utilizzando la metodica del SYBR Green. E' stata eseguita infine la quantificazione assoluta del numero di trascritti utilizzando curve standard ottenute da diluizioni progressive di plasmidi in cui era subclonato l'amplicone dei geni di interesse.

## **6.10 Trattamento con idrocortisone e aminoglutetimide di cellule infettate da AD169**

Le cellule SW13, NCI-H295R e MRC5 sono state pre-trattate con idrocortisone 10  $\mu$ M (Solu-Cortef®, idrocortisone sodio succinato; Pharmacia, Sweden) o aminoglutetimide 300  $\mu$ M ((S)-(-)Aminoglutethimide, Sigma Aldrich, U.S.A.) durante le 48 ore antecedenti l'infezione con HCMV. Dopo infezione (MOI=0,1) e contemporaneo trattamento con l'uno o l'altro farmaco, sono stati raccolti i sovranatanti e le cellule ai giorni 1, 3, 5, 7, 9, 11 e ne è stata valutata la carica virale tramite real time PCR previa estrazione del DNA.

## **6.11. Analisi dell'effetto citopatico dell'infezione da AD169**

Per lo studio dell'effetto citopatico, le cellule NCI-H295R, seminate in fiasche T75, sono state infettate con HCMV AD169 (MOI=2) e sono state coltivate per un periodo di circa 30 giorni, nel quale sono state passate con una

frequenza di due volte alla settimana. Le fiasche rappresentanti il controllo negativo sono state trattate nello stesso modo eccetto per la presenza del virus. Ad intervalli di 2-3 giorni, le cellule sono state seminate in *shell vials* e sottoposte al test di immunofluorescenza per la ricerca dell'antigene precoce pp72, al fine di verificare la presenza del virus. La presenza di effetto citopatico è stata esaminata con microscopio ottico.

### **6.12 Analisi dell'apoptosi nelle cellule di carcinoma corticosurrenalico infettate con AD169**

Questo tipo di analisi è stata effettuata utilizzando il *Vybrant Apoptosis Assay Kit* (Molecular Probes™, Invitrogen, U.S.A.), in grado di misurare l'apoptosi attraverso caratteristiche morfologiche e chimiche cellulari. Le cellule vengono marcate con due coloranti, il ioduro di propidio e l'annexina V coniugata a FITC, i quali permettono di distinguere le cellule vive da quelle in apoptosi, necrosi post-apoptotica o necrosi. Lo ioduro di propidio è un colorante impermeabile alle cellule vive ma in grado di entrare in quelle morte e di legarsi al DNA, portando quindi ad una fluorescenza rossa. L'annexina V è una proteina legante i fosfolipidi, calcio-dipendente che si lega con alta affinità alla fosfatidilserina, fosfolipide meglio conosciuto come costituente la matrice strutturale di tutte le membrane cellulari. Nelle cellule sane, la fosfatidilserina è collocata nello strato più interno della membrana cellulare, ma già nelle prime fasi dell'apoptosi, questo fosfolipide viene traslocato nel lato esterno, dove viene esposto al legame con l'annexina V esogena aggiunta. L'annexina V, coniugata alla molecola fluorescente FITC, può essere distinta facilmente dalla fluorescenza del ioduro di propidio.

Le cellule NCI-H295R subconfluenti sono state seminate in piastre da 24 pozzetti da e trattate con HCMV AD169 (MOI 2), Etoposide 100  $\mu$ M (Sigma Aldrich, U.S.A.), o entrambi. A 24 e 72 ore dall'infezione, le cellule sono state raccolte, lavate in PBS e marcate con anticorpo anti-annexinaV coniugato a FITC e propidio ioduro. Le cellule marcate sono quindi state analizzate in citometria a flusso con il FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). L'emissione di fluorescenza è stata misurata a 530 nm e > 575 nm.

### **6.13 Analisi della proliferazione cellulare nelle cellule di carcinoma corticosurrenalico infettate con AD169**

Per effettuare questo tipo di saggio è stato utilizzato il *BrdU Cell Proliferation Assay* (Calbiochem®, Germany), test della BromoDeossiUridina (BrdU), in grado di analizzare la proliferazione delle cellule utilizzando la BrdU,

analogo della timidina, incorporata nel DNA sintetizzato dalle cellule in attiva divisione. La misura dell'incorporazione della BrdU si riflette nell'intensità dell'assorbanza della reazione finale. Le cellule NCI-H295R sono state seminate in pozzetti da 96 ed infettate con diverse MOI di AD169 HCMV (0.1, 2, 10). Durante le ultime 16 ore di infezione, le cellule sono state trattate con la BrdU e, allo scadere dell'infezione, sono state fissate e incubate con un anticorpo anti-BrdU per 1 ora. Si è proceduto quindi incubando per mezz'ora le cellule fissate con un anticorpo secondario (coniugato con una perossidasi di rafano). La reazione è stata poi bloccata con una *stop solution* e l'assorbanza è stata letta ad una lunghezza d'onda tra 450-595 nm, utilizzando un lettore di piastre spettrofotometrico (Tecan, Switzerland).

#### **6.14 Analisi del ciclo cellulare nelle cellule di carcinoma corticosurrenalico infettate con AD169**

Per questo tipo di analisi è stato utilizzato il test con ioduro di propidio, colorante che quando si intercala nel DNA a doppia elica, forma un complesso sufficientemente stabile da emettere una fluorescenza rossa quando eccitato. Mediante questa colorazione è possibile discriminare in una popolazione eterogenea, cellule con diverso contenuto di DNA e quindi valutarne la distribuzione in base a questo.

Le cellule di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R subconfluenti sono state sincronizzate, tramite privazione di siero, 24 ore prima dell'infezione virale. Trascorso tale periodo, le cellule sono state infettate con HCMV AD169 ad una MOI di 2 e dopo 3 e 7 giorni sono state raccolte, lavate in etanolo 70% a -20°C per 30 minuti, trattate con RNase (Sigma Aldrich, U.S.A.) per 30 minuti circa e colorate con una soluzione di propidio ioduro (Sigma Aldrich, U.S.A.). Le cellule colorate sono state successivamente analizzate (WinMDI 2.8, <http://facs.scripps.edu/>) in citometria a flusso con il al FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). I risultati dell'analisi sono stati espressi sotto forma di *Histogram Plot* e *Dot Plot*.

#### **6.15 Analisi del profilo di espressione genica con DNA microarray**

##### **6.15.1 Amplificazione dell'RNA**

Dopo purificazione e valutazione qualitativa-quantitativa, l'RNA totale è stato amplificato utilizzando il protocollo *SuperScript™ Indirect RNA Amplification System* fornito da Invitrogen (Invitrogen, U.S.A.). Tale protocollo

prevede una prima fase di sintesi di cDNA a doppio filamento a partire da circa un µg di RNA totale. Questa procedura è composta da una prima fase in cui avviene la sintesi del primo filamento seguita da una seconda fase in cui si completa la sintesi del secondo filamento del cDNA. Dopo purificazione tramite *spin columns* fornite nel kit, si procede alla trascrizione *in vitro*, in cui si genera aRNA dal cDNA a doppio filamento attraverso l'utilizzo della RNA polimerasi e degli ammino-allil UTP.

### **6.15.2 Valutazione quantitativa e qualitativa dell'RNA**

Per la misurazione quantitativa dell'aRNA sintetizzato è stato utilizzato lo spettrofotometro effettuando una lettura a 260 nm (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, U.S.A.). La valutazione quantitativa è stata invece effettuata tramite corsa su chip del 2100 *Agilent Bioanalyzer* (Agilent technologies, U.S.A.) utilizzando l'RNA *nano kit* (Agilent Technologies, U.S.A.) secondo protocollo fornito dal produttore.

### **6.15.3 Marcatura dell'RNA**

Una volta effettuata l'analisi qualitativa-quantitativa dell'aRNA, questo è stato marcato con Cy<sup>TM</sup>3 e Cy<sup>TM</sup>5 (Amersham CyScribe<sup>TM</sup> Post-Labeling Kit Amersham, U.K.) per 2 ore a temperatura ambiente e al riparo dalla luce. I fluorofori non incorporati sono stati eliminati mediante purificazione con *spin columns* fornite nel kit. Si è quindi proceduto ad una lettura spettrofotometrica (NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer, U.S.A.) per la rilevazione della quantità di cianine incorporate. La quantità stabilita di aRNA marcato (mai inferiore alle 120 picomoli) è stata infine ibridata per 16 ore a 39 °C su microarray contenenti 21.329 oligonucleotidi depositati (CRIBI, Università di Padova, Italy) nella stazione di ibridazione automatizzata HS 400<sup>TM</sup> Hybridisation station (Tecan, Switzerland). Gli esperimenti sono stati effettuati in duplicato ed è stata applicata l'inversione dei fluorofori.

### **6.15.4 Analisi dei dati**

Le immagini sono state ottenute tramite lo scanner Affymetrix 428 e analizzate con i software ImaGene e GeneSight (BioDiscovery Inc., U.S.A.). I dati sono stati filtrati in base alla concordanza tra le due repliche interne all'array. Questa operazione è stata eseguita valutando la compatibilità dei valori di ogni istante temporale preso singolarmente e poi considerandoli tutti insieme.

## 6.16 Analisi statistica

I dati sono riportati come media  $\pm$  deviazione standard. L'analisi statistica dei risultati dei microarray è stata eseguita utilizzando i software ImaGene e GeneSight (BioDiscovery Inc., U.S.A.) ed il pacchetto R, come riportato nei risultati.

**Tabella 1.** Sequenze nucleotidiche dei primers utilizzati per amplificare in real time-PCR i geni di interesse e le relative temperature di annealing.

Gene	Primer sense	Primer antisense	T°a
<i>HCMV</i>	TCATCCACACTAGGAGAGCAGACT	GCCAAGCGGCCTCTGAT	60
<i>Bgl</i>	AGGGCCTCACCACCAACTT	GCACCTGACTCCTGAGGAGAA	60
<i>CYP17</i>	TCTCTGGGCGGCCTCAA	AGGCGATACCCTTACGGTTGT	60
<i>CYP21</i>	TCAGGTTCTTCCCAATCCA	TCCACGATGTGATCCCTCTTC	60
<i>CYP11B1</i>	GGCAGAGGCAGAGATGCTG	TCTTGGGTTAGTGTCTCCACCTG	58
<i>CYP11B2</i>	GGCAGAGGCAGAGATGCTG	CTTGAGTTAGTGTCTCCAGGA	68
<i>CY11A</i>	TCCAGAAGTATGGCCCGATT	CATCTTCAGGGTCGATGACATAAA	60
<i>CYP 19</i>	TCACTGGCCTTTTCTCTTGGT	GGGTCCAATTCCCATGCA	60
<i>StAR</i>	CCACCCTAGCACGTGGA	TCCTGGTCACTGTAGAGAGTCTCTTC	60
<i>3<math>\beta</math>-HSD2</i>	GCGGCTAATGGGTGGAATCTA	CATTGTTGTTCAAGGCCTCAT	60
<i>DAX1</i>	CCAAGGAGTACGCCTACCTCAA	ACTGGAGTCCCTGAATGTACTTCC	60
<i>LRH</i>	TACCGACAAGTGGTACATGGAA	CGGCTTGTGATGCTATTATGGA	60
<i>SF1</i>	GGAGTTTGTCTGCCTCAAGTTCA	CGTTCTTTCACCAGGATGTGGTT	60
<i>SHP</i>	CCTCAATGCTGTCTGGAGTCCTT	CTGCAGGTGCCCAATGTG	60
<i>IL6</i>	GGG AAG GTGAAG GTC GG	TGG ACT CCA CGACGT ACT CAG	60
<i>P2rx4</i>	TCTGTCAAGACGTGTGAGGTG	AGTGAAGTTTCTGCAGCCTTT	60
<i>GAPDH</i>	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC	60

**Tabella 2.** Sequenze delle sonde utilizzate per amplificare in real time-PCR i geni di interesse.

Gene	SEQUENZA SONDA
<i>HCMV</i>	ACTGGGCAAAGACCTTCATGCAGATCTC
<i>Bgl</i>	ATCCACGTTACCTTGCCCCACA
<i>CYP17</i>	TGGCAACTCTAGACATCGCGTCC
<i>CYP11B1*</i>	TGCTGCACCATGTGCTGAAACACCT
<i>CYP11B2*</i>	CTGCACCACGTGCTGAAGCACT
<i>3<math>\beta</math>-HSD2</i>	TGATACCTTGTACACTTGTGCGTTAAGACCCA
<i>P2RX4</i>	n. 88 (SISTEMA ROCHE)*
<i>GAPDH</i>	CAAGCTTCCCGTTCTCAGCC

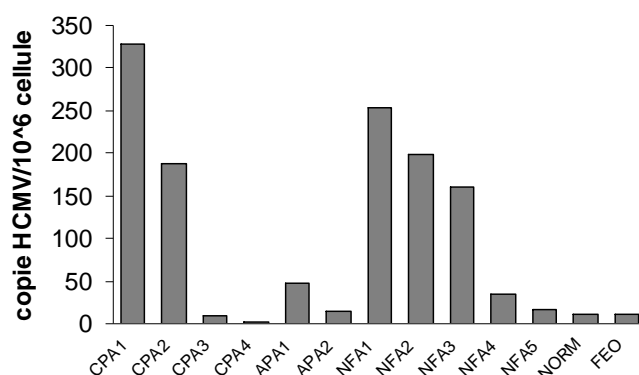
\* sonda #88 del sistema Universal Probe Library UPL (Roche Diagnostic)



## 7 RISULTATI

### 7.1 Ricerca di sequenze genomiche di herpesvirus nei tessuti surrenalici

In questa prima parte dello studio, abbiamo sottoposto a screening per la ricerca di sequenze di virus erpetici un'ampia casistica di tessuti surrenalici, comprendenti 20 surreni normali, 37 adenomi corticosurrenalici non-funzionanti (NFA), 16 adenomi secernenti cortisolo (CPA), 12 aldosteronomi (APA), 3 adenomi secernenti androgeni (TPA), 16 carcinomi corticosurrenalici (ACCs) (di cui 14 funzionanti e 2 non funzionanti) e 24 tumori della midollare del surrene (inclusi 21 feocromocitomi benigni, un feocromocitoma maligno, 2 ganglioneuromi). I risultati della ricerca di sequenze virali sono riassunti in Tabella 3 (Barzon et al, *Oncogene*, 2007). Per quanto concerne HCMV, in particolare, abbiamo dimostrato la presenza di sequenze virali in 2 (17%) aldosteronomi (1 dei quali era anche positivo per EBV DNA), 4 (25%) adenomi secernenti cortisolo (3 EBV-positivi), 5 (14%) adenomi corticosurrenalici non funzionanti (1 EBV-positivo), 1 (5%) tessuto surrenalico normale (anche EBV-positivo), 3 (13%) feocromocitomi, ma non nei carcinomi corticosurrenalici.



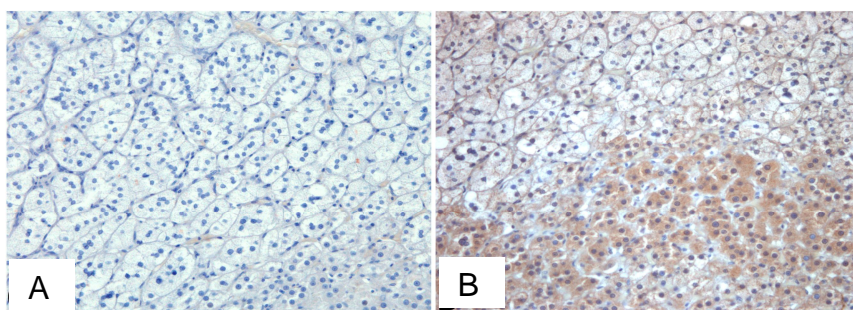
**Figura 9.** Analisi del titolo virale di HCMV presente nei campioni di tessuto surrenalico, valutato come numero di copie di HCMV per  $10^6$  cellule tramite real-time PCR.

Il numero di copie genomiche di HCMV variava da 10 a 13.000 copie di DNA/ $10^6$  cellule, ed i titoli virali più elevati si osservavano negli adenomi secernenti cortisolo, associati a sindrome di Cushing grave (Figura 9-10). La presenza di HCMV era più frequente nei tumori benigni funzionanti, rispetto agli altri tipi di tumore, anche se tale differenza non era statisticamente significativa.

L'analisi immunohistochimica ha dimostrato l'espressione di pp65 di HCMV nei casi positivi, compatibile con un'infezione di tipo produttivo (Figura 10).

Di un sottogruppo di 26 pazienti consecutivi con tumori surrenalici (8 ACC, 4 APA, 3 CPA, 5 NFA e 6 feocromocitomi), erano disponibili rispettivamente per

lo screening degli anticorpi e la rilevazione del DNA virale anche il siero e il DNA estratto da sangue. Tutti i pazienti tranne uno sono risultati positivi per le IgG anti-HCMV, ma in nessun paziente sono state riscontrate nel sangue periferico sequenze di DNA di virus erpetici. Di questo sottogruppo di 26 pazienti, solo 3 erano risultati positivi per il DNA di virus erpetici a livello del tumore surrenalico: un NFA positivo per il DNA di HCMV, HSV e HHV8 (il paziente aveva anche alti titoli di anticorpi litici anti-HHV8), un feocromocitoma positivo per il DNA di HCMV e HSV, e un CPA positivo per il DNA di EBV (il paziente presentava un lieve aumento delle IgM anti-EBV). La presenza di virus erpetici nei tumori surrenalici, quindi, sembrerebbe essere associata con la riattivazione della replicazione litica virale, come dimostrato anche dalla rilevazione in analisi immunocitochimica di antigeni virali litici nelle cellule tumorali (Figura 10).



**Figura 10.** Colorazione immunocitochimica con anticorpi anti-HCMV pp65 (Argene, CINApool) di un adenoma corticosurrenalico HCMV-negativo (A) ed uno HCMV-positivo (B) (da Barzon et al. *Oncogene*, 2007).

**Tabella 3.** Dimostrazione di DNA di virus erpetici in tessuti surrenalici umani.

Tipo di tumore	N. di casi	<i>Herpesviridae</i> *							
		HSV1	HSV2	VZV	HCMV	HHV6	HHV7	EBV	HHV8
Aldosteronoma	12	1 (8,3)	0	0	2 (16,7)	0	0	2 (16,7)	0
Adenoma/iperasia secernente cortisolo	16	0	0	0	4 (25)	2 (12,5)	0	5 (31,3)	1 (6,2)
Adenoma/iperasia secernente androgeni	3	0	0	0	0	0	0	0	1 (33,3)
Adenomona corticosurrenalico non funzionante	36	4 (11,1)	0	0	5 (13,9)	1 (2,8)	0	2 (5,6)	2 (5,6)
Carcinoma corticosurrenalico	16	1 (6,3)	0	0	0	2 (12,5)	0	0	0
Feocromocitoma/ganglioneuroma benigno	23	1 (4,3)	0	0	3 (13,0)	2 (8,7)	0	0	0
Feocromocitoma maligno	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Surrene normale	20	0	0	0	1 (5,0)	3 (15,0)	0	1 (5,0)	1 (5,0)

\* Numero di campioni positivi (%).

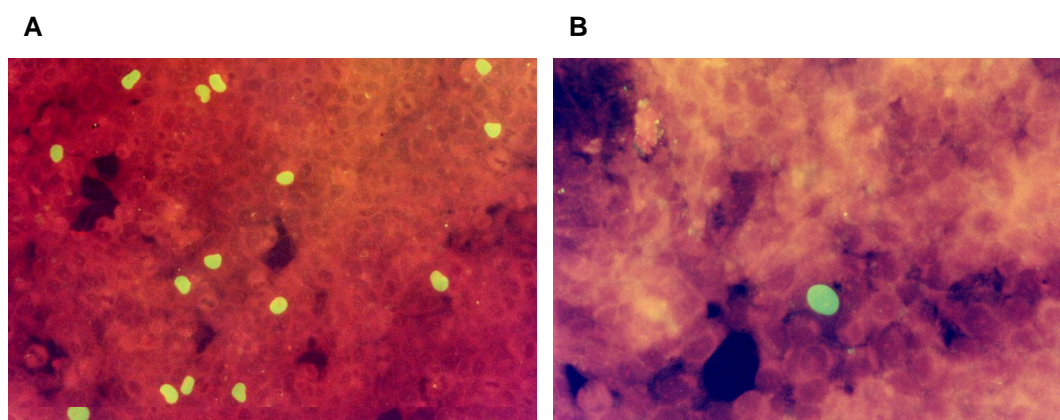


## 7.2 HCMV infetta e replica in cellule corticosurrenaliche umane

Questa parte dello studio dimostra che isolati clinici di HCMV ed il ceppo di laboratorio HCMV AD169 infettano e replicano in cellule di carcinoma corticosurrenalico umano.

### 7.2.1 Infezione con isolati clinici di HCMV

Isolati clinici di HCMV, ottenuti da campioni di urina, sono stati impiegati per infettare le cellule della linea di carcinoma corticosurrenalico umano NCI-H295R. L'infezione è stata eseguita per centrifugazione ed adsorbimento delle particelle virali sul monostrato cellulare ottenuto da *shell vial culture* (SVC). Il controllo positivo era costituito da cellule ML (polmone di visone), suscettibili ad infezione da HCMV. L'infezione è stata valutata, dopo 24 ore dall'infezione, mediante immunofluorescenza specifica per l'antigene precoce pp72 di HCMV.



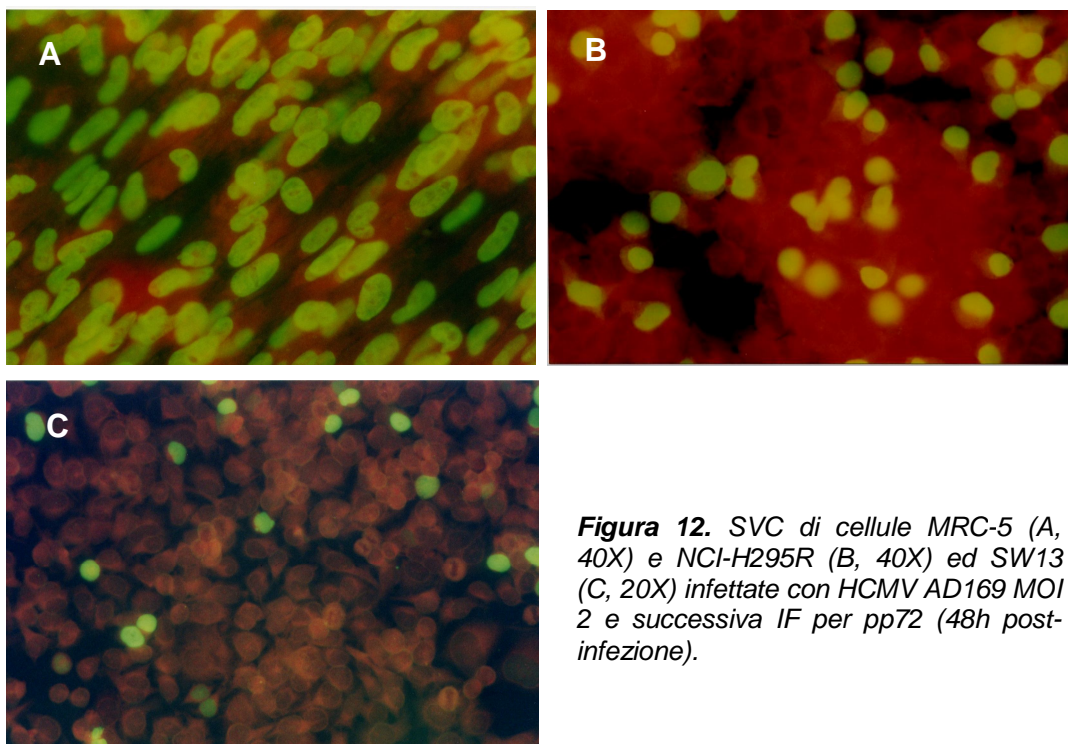
**Figura 11.** A) SVC di cellule ML infettate con un isolato clinico di HCMV e successiva immunofluorescenza contro l'antigene precoce virale pp72 (controllo positivo), 20X, +24h post-infezione. B) SVC di cellule NCI-H295R infettate con un isolato clinico di HCMV e successiva immunofluorescenza contro l'antigene precoce virale pp72, 40X, +24h post-infezione

Come dimostrato in Figura 11, sia le cellule ML che le cellule NCI-H295R infettate con un isolato clinico di HCMV dimostravano espressione nucleare di pp72, anche se il numero di cellule corticosurrenaliche positive era inferiore rispetto alle cellule ML di controllo.

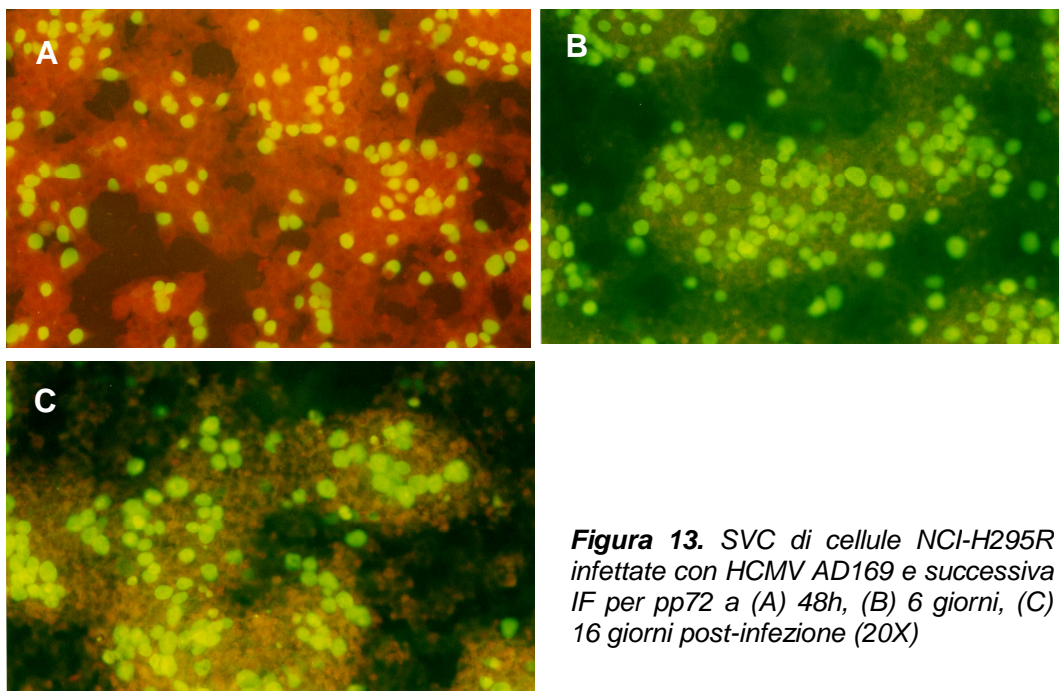
### 7.2.2 Infezione con HCMV AD169 di linee cellulari umane di carcinoma corticosurrenalico

Dopo aver dimostrato che isolati clinici di HCMV sono in grado di infettare cellule di carcinoma corticosurrenalico *in vitro*, è stato utilizzato il ceppo AD169 di HCMV per i successivi studi di infezione delle cellule SW-13 e NCI-H295R. Il virus usato per l'infezione è stato ottenuto attraverso infezione ed espansione in cellule MRC-5 e titolato mediante saggio delle placche. L'infezione è stata eseguita con MOI 2 per centrifugazione ed adsorbimento delle particelle virali sul monostrato cellulare ottenuto dalla SVC. Il controllo di infezione era costituito da cellule MRC-5. L'infezione è stata valutata attraverso immunofluorescenza specifica per gli antigeni precoci (pp72) e tardivi (pp65) di HCMV.

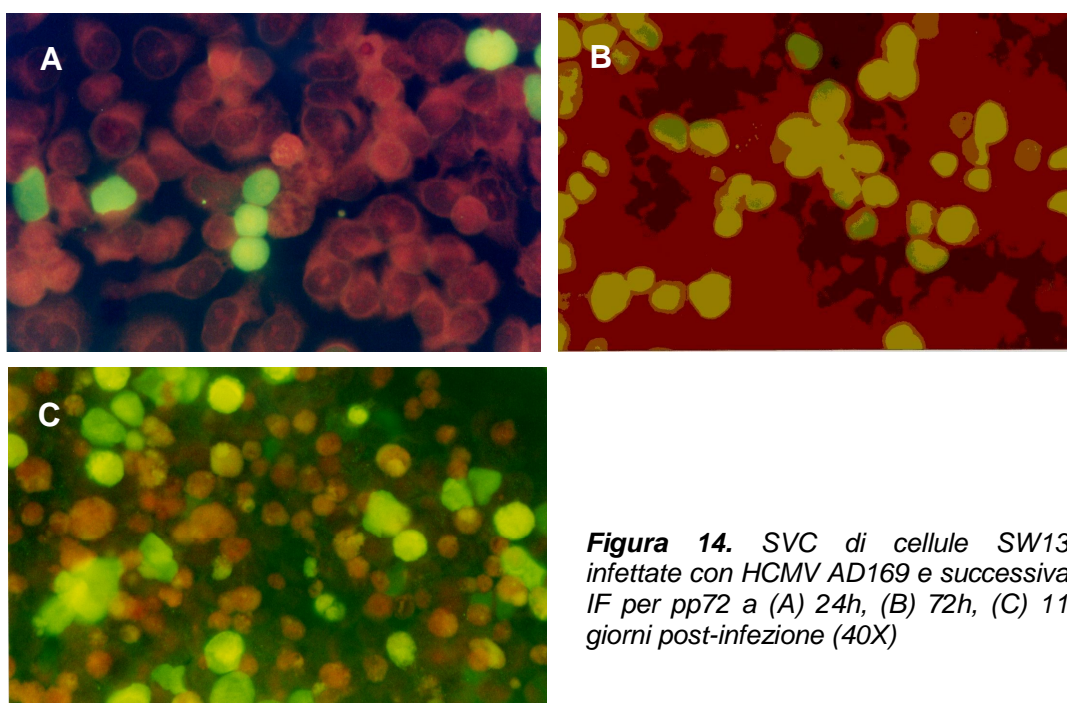
A 48 post-infezione, una elevata percentuale di cellule NCI-H295R ed SW13 dimostrava positività nucleare per pp72 (Figura 12), segno di una notevole suscettibilità all'infezione da AD169. Alla medesima MOI, circa il 100% delle cellule MRC-5 di controllo risultava positivo. In tempi successivi l'infezione, si osservava un aumento del numero di cellule positive all'immunofluorescenza per pp72, indice della replicazione virale e della diffusione del virus alle cellule non infettate circostanti (Figure 13 e 14).



**Figura 12.** SVC di cellule MRC-5 (A, 40X) e NCI-H295R (B, 40X) ed SW13 (C, 20X) infettate con HCMV AD169 MOI 2 e successiva IF per pp72 (48h post-infezione).

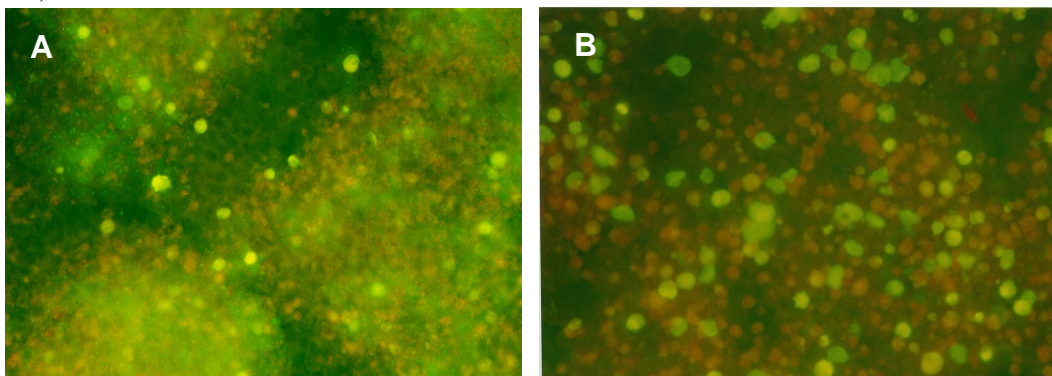


**Figura 13.** SVC di cellule NCI-H295R infettate con HCMV AD169 e successiva IF per pp72 a (A) 48h, (B) 6 giorni, (C) 16 giorni post-infezione (20X)



**Figura 14.** SVC di cellule SW13 infettate con HCMV AD169 e successiva IF per pp72 a (A) 24h, (B) 72h, (C) 11 giorni post-infezione (40X)

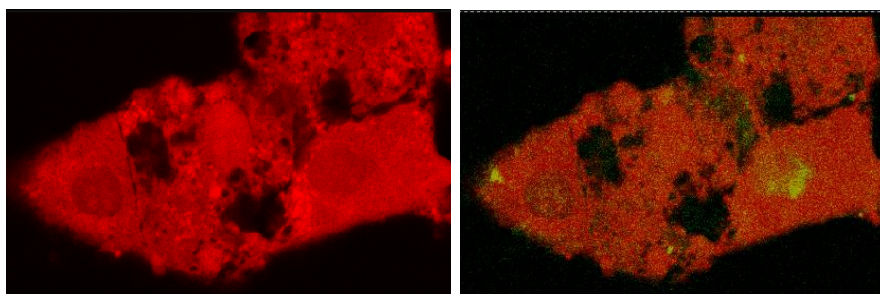
L'espressione dell'antigene tardivo virale pp65, valutata due settimane circa dopo l'infezione con AD169, è stata dimostrata sia a livello del nucleo sia del citoplasma delle cellule NCI-H295R ed SW13. Questo risultato è un'ulteriore dimostrazione che il virus replica nelle cellule corticosurrenaliche umane (Figura 15).



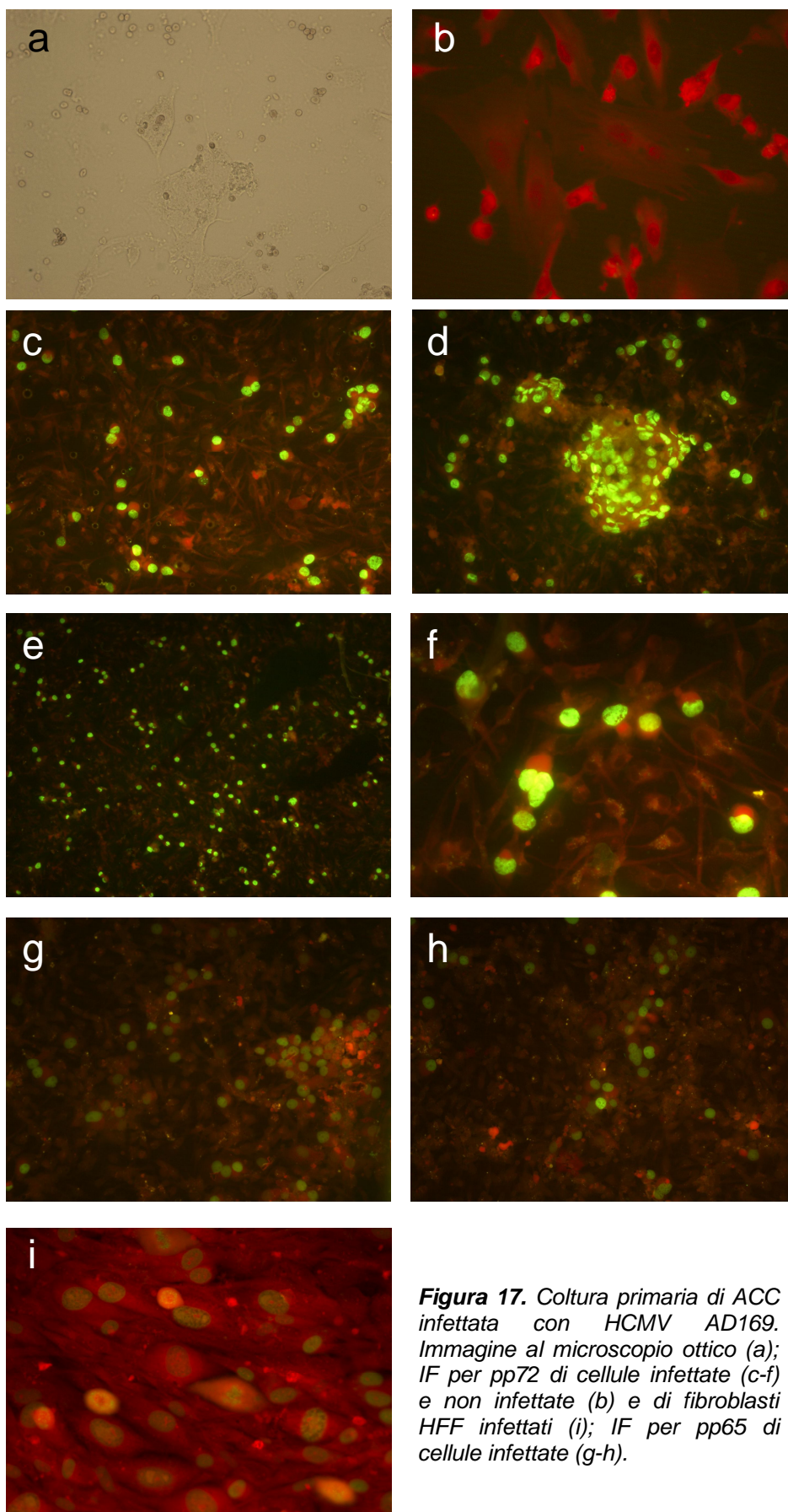
**Figura 15.** SVC di cellule (A) NCI-H295R e (B) SW13 infettate con HCMV AD169 e successiva IF contro l'antigene tardivo virale pp65, 20X, +16gg e +11gg post-infezione, rispettivamente.

### 7.2.3 Infezione con HCMV AD169 di colture primarie umane di carcinoma corticosurrenalico

Il ceppo AD169 di HCMV è stato utilizzato anche per infettare, con un *time-course*, colture primarie di carcinomi corticosurrenalici, feocromocitomi e adenomi surrenalici umani al fine di verificare la suscettibilità di tali cellule all'infezione da HCMV. Le colture primarie sono state infettate con HCMV AD169 ad una MOI di 2 e a 8, 24 e 72 ore dopo l'infezione le cellule sono state fissate e sottoposte al medesimo test di immunofluorescenza, sia per pp72 che per pp65. Le cellule sono risultate positive alla colorazione in immunofluorescenza per entrambi gli antigeni (Figure 16 e 17) e il numero di cellule positive aumentava con l'aumentare dei giorni post- infezione indicando la replicazione del virus nelle cellule surrenaliche.



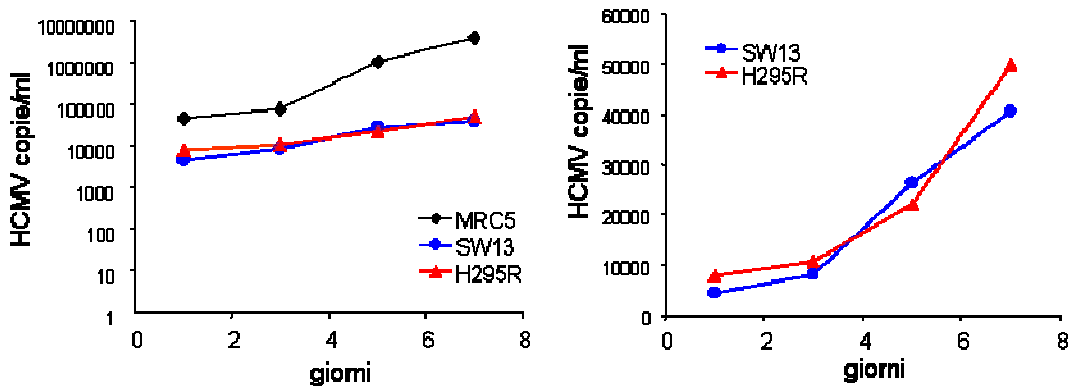
**Figura 16.** Cellule da coltura primaria di ACCs infettate con HCMV AD169 ed analizzate mediante IF per pp72. (A-C) immagini ottenute con microscopio confocale in cui si possono notare i nuclei cellulari (A) e gli stessi nuclei fluorescenti dopo colorazione nell'immagine in sovrapposizione (B).



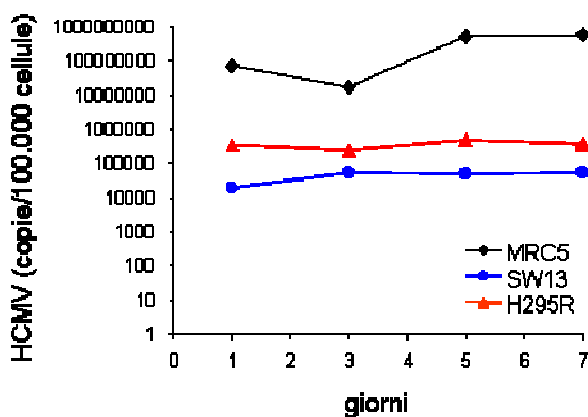
**Figura 17.** Coltura primaria di ACC infettata con HCMV AD169. Immagine al microscopio ottico (a); IF per pp72 di cellule infettate (c-f) e non infettate (b) e di fibroblasti HFF infettati (i); IF per pp65 di cellule infettate (g-h).

### 7.2.4 Cinetica di replicazione di AD169 in cellule corticosurrenaliche

Una volta confermata la capacità di HCMV AD169 di replicare nelle linee cellulari corticosurrenaliche SW13 e NCI-H295R, è stata valutata la cinetica di replicazione del virus nelle cellule corticosurrenaliche, rispetto alle cellule di controllo MRC-5. Questo esperimento prevedeva l'infezione delle cellule NCI-H295R e SW13, seminate alla concentrazione di 100.000 cellule/pozzetto in piastre da 12 pozzetti, con HCMV AD169 con una MOI particolarmente bassa (pari a 0,1). Le cellule e il medium di coltura sono stati raccolti dopo 1, 3, 5, 7 giorni dall'infezione per la titolazione del virus, che è stata effettuata sia mediante real-time PCR quantitativa sia tramite il saggio delle placche. I risultati sono riportati nei grafici illustrati nelle figure 19 e 20, che dimostrano un incremento del titolo virale col trascorre del tempo, sia nel medium di coltura che nelle cellule.



**Figura 18.** Analisi della cinetica di replicazione di HCMV effettuata misurando il numero di copie genomiche di HCMV nel medium di coltura delle cellule SW13, H295R e MRC5: analisi con real-time PCR quantitativa.



**Figura 19.** Analisi della cinetica di replicazione di HCMV AD169 nelle cellule di carcinoma corticosurrenalico SW13 e H295R durante il "time course" d'infezione: analisi con real-time PCR quantitativa del numero di copie genomiche di HCMV presenti negli estratti cellulari.

Dal grafico nella Figura 18, dove sono messi a confronto i dati relativi alle due linee corticosurrenaliche rispetto a quelli ottenuti dalle cellule di controllo MRC5, si rileva che nelle cellule surrenaliche NCI-H295R e SW13 il virus ha efficienza di replicazione simile, con una cinetica di tipo esponenziale. L'efficienza di replicazione è però nettamente inferiore a quella osservata nei fibroblasti MRC5. Bisogna comunque tener conto che il ceppo virale utilizzato è stato selezionato così da infettare con elevata efficienza le cellule MRC5. Dal grafico della Figura 19, risulta che, benché in entrambe le linee cellulari si registri un aumento del titolo virale, questo è più marcato nelle cellule NCI-H295R (l'aumento è circa 5,7 volte maggiore nelle cellule NCI-H295R rispetto alle cellule SW13 a 7 giorni post-infezione). Una maggiore efficienza di replicazione virale nelle cellule NCI-H295R è stata osservata anche titolando il virus nel medium di coltura cellulare, essendo il titolo virale nel medium di coltura delle NCI-H295R, a 7 giorni dall'infezione, maggiore del 25% rispetto a quello nel mezzo di coltura delle SW13. E' da sottolineare che le cellule NCI-H295R producono ormoni steroidei, mentre le cellule SW13 non sono funzionanti.

Questo esperimento di replicazione è in accordo con quanto già dimostrato da altri, che hanno condotto un simile studio di replicazione con MCMV (MOI=0,1) in una linea cellulare continua Y-1, derivata da carcinoma corticosurrenalico murino, usando come controllo fibroblasti murini (142). In questo studio, la replicazione virale è stata valutata nel corso di cinque giorni, sia nelle cellule sia nel medium di coltura, mediante un test di immunofluorescenza indiretta. I risultati hanno dimostrato la capacità di MCMV di infettare le cellule corticosurrenaliche murine Y-1, anche se l'efficienza di infezione nei fibroblasti è risultata maggiore sia nelle cellule (di circa il 90%) sia nel sovrinatante (1,6 volte superiore al quinto giorno).

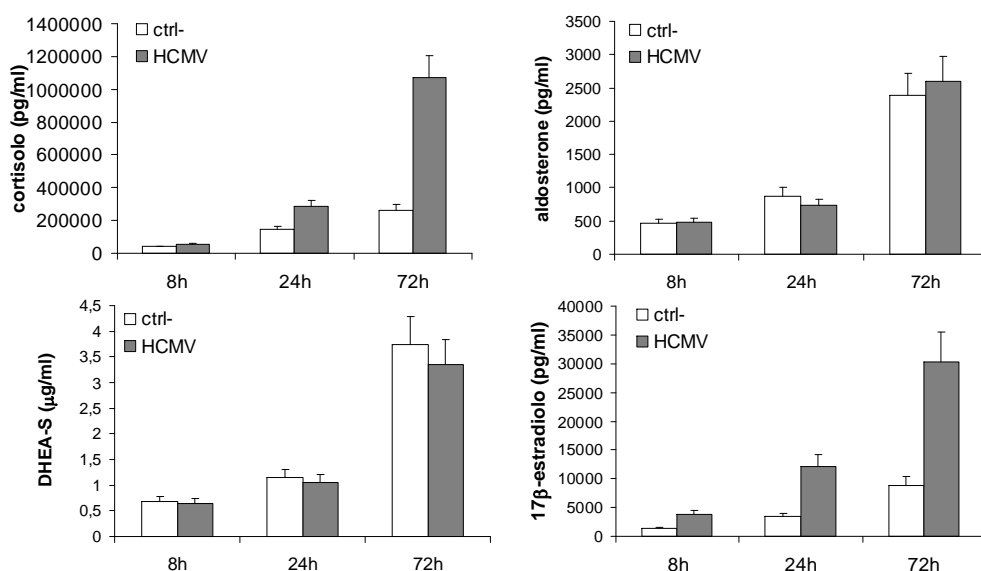
### ***7.3 L'infezione da HCMV di cellule corticosurrenaliche stimola la produzione di cortisolo e modula l'espressione degli enzimi della steroidogenesi***

Dopo aver dimostrato che il virus infetta e replica nelle cellule corticosurrenaliche umane, si è proceduto con lo studio dell'effetto dell'infezione virale sulla funzione delle cellule corticosurrenaliche NCI-H295R, scelte per la loro capacità di sintetizzare tutti gli ormoni steroidei corticosurrenalici e di mantenere molte delle caratteristiche funzionali del surrene normale (capacità di risposta a stimoli fisiologici, espressione di recettori cellulari, produzione di citochine, oltre a ormoni steroidei e peptidici). Per questi esperimenti, le cellule NCI-H295R sono state infettate con HCMV AD169 MOI 2, in modo da garantire

una elevata percentuale di cellule infettate. A 8h, 24h, 72h post-infezione sono stati raccolti sia il medium di coltura, per la rilevazione di possibili variazioni nella secrezione ormonale attraverso dosaggio di steroidi, sia le cellule, da cui è stato estratto l'RNA per valutare con real-time RT-PCR eventuali effetti dell'infezione virale sull'espressione genica cellulare. La scelta dei *time points* è stata fatta facendo riferimento al precedente esperimento di analisi della cinetica di replicazione virale. L'esperimento è stato condotto due volte in duplicato.

### 7.3.1 Effetto dell'infezione da HCMV sulla produzione di ormoni steroidei

Raccolto il medium di coltura nei *time point* prestabiliti, sono stati dosati i principali ormoni steroidei della via mineralcorticoide (aldosterone), glucocorticoide (cortisolo), e androgenica (DHEA-S e 17 $\beta$ -estradiolo, prodotto di aromatizzazione del testosterone), mediante dei saggi ormonali (EIA ed ELISA competitivo). I risultati ottenuti sono espressi in pg/ml (tranne per DHEAS, i cui valori sono espressi in  $\mu$ g/ml) e sono riportati nei grafici della Figura 20. Nel sovrinatante delle cellule infettate, le concentrazioni DHEAS sono lievemente inferiori rispetto al controllo, mentre le concentrazioni di aldosterone non variano significativamente. Ben più interessanti risultano essere i dati ottenuti per l'estradiolo e, soprattutto, per il cortisolo. Per entrambi si rileva un aumento della secrezione nelle cellule infettate rispetto ai controlli; tale incremento si accentua col passare del tempo e diventa netto alle 72h, quando sia cortisolo che 17 $\beta$ -estradiolo risultano aumentati più di tre volte rispetto al controllo.

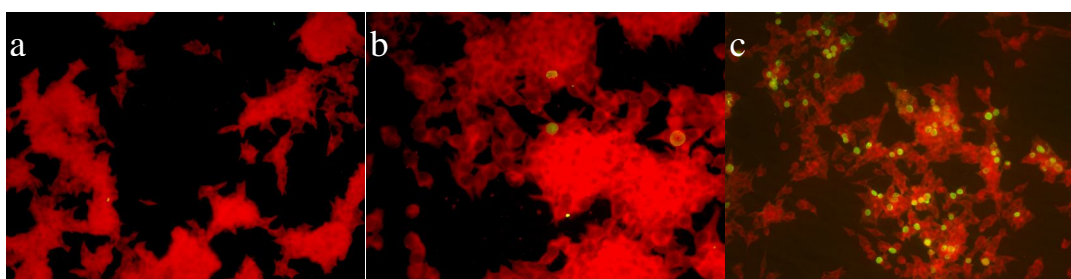


**Figura 20.** Analisi della secrezione ormonale da parte di cellule NCI-H295R infettate con HCMV AD169 a MOI=2 (CMV) e non infettate (CTRL) a 8h, 24h, 72h post infezione. Il dosaggio ormonale è stato effettuato mediante saggi ELISA o EIA.

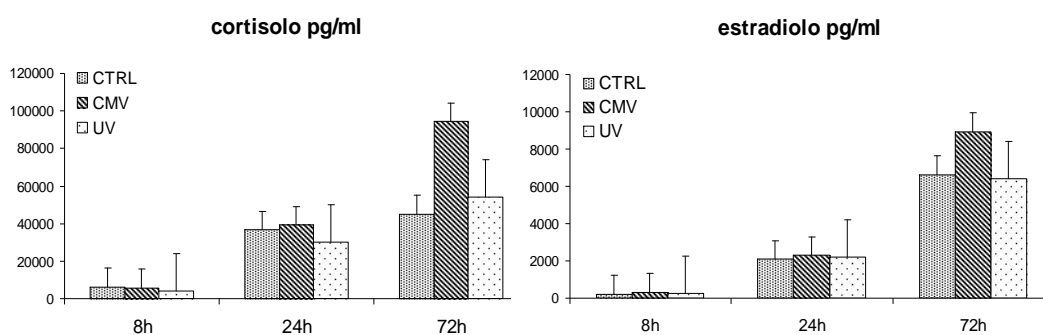


### 7.3.2 Effetto dell'infezione di HCMV con particelle virali inattivate agli UV sulla produzione di ormoni steroidei

In questo esperimento si è voluto verificare se l'effetto di aumento della produzione di ormoni steroidei indotto dall'infezione da HCMV sulle cellule di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R fosse dovuto alla replicazione del virus e/o all'espressione dei geni virali, oppure all'interazione della particella virale con la cellula ospite. A tale scopo le cellule NCI-H295R subconfluenti sono state infettate con HCMV AD169 (MOI 2) o con particelle dello stesso stock virale, inattivate agli UV e quindi non replicanti. Le cellule di controllo sono state trattate nello stesso modo, fatta eccezione per la presenza del virus. A 8, 24, e 72 ore dopo l'infezione è stato prelevato il sovrinatante e in questo si sono dosati cortisolo ed estradiolo tramite saggi EIA. Per confermare la differenza di infezione tra il virus attivo e le particelle virali inattivate agli UV, le cellule sono state sottoposte al test di immunofluorescenza per la proteina precoce pp72 (Figura 21).



**Figura 21.** Analisi dell'efficienza di infezione di AD169 (c), AD169 trattato con gli UV (b) e controllo (a) nella linea cellulare NCI-H295R; saggio di immunofluorescenza per l'antigene precoce pp72.



**Figura 22.** Analisi della secrezione di cortisolo ed estradiolo da parte di cellule NCI-H295R infettate con HCMV AD169 (CMV), AD169 inattivato agli uv (UV) a MOI=2 e non infettate (CTRL) a 8h, 24h, 72h post infezione. Il dosaggio ormonale è stato effettuato mediante saggi ELISA o EIA sul medium di coltura.

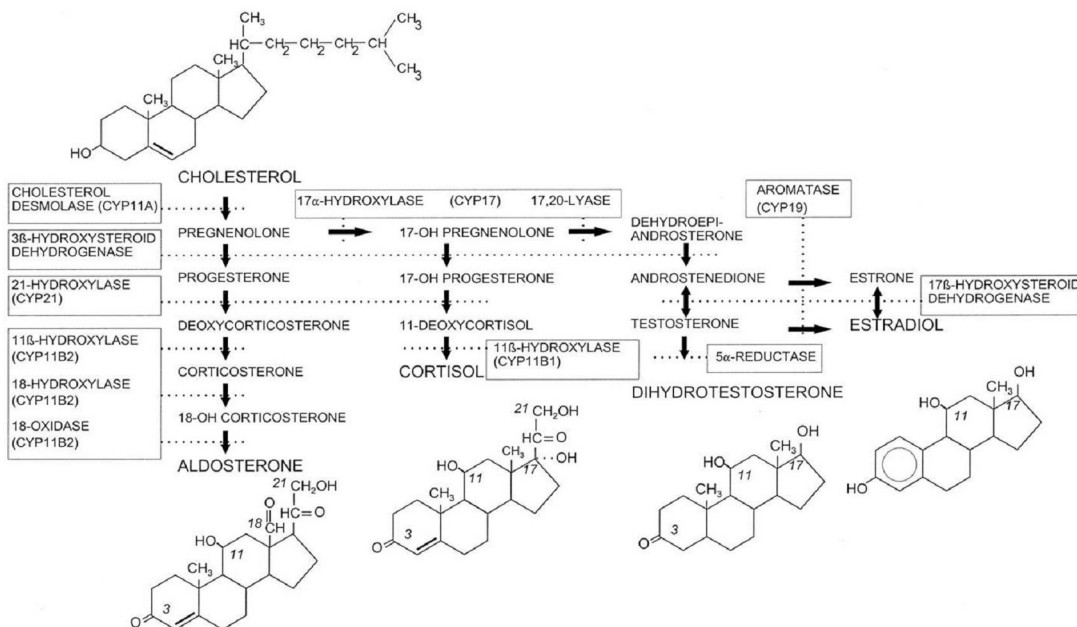
Come si può notare nei grafici della Figura 22, a conferma del risultato ottenuto precedentemente, nel sovrinatante delle cellule infettate con il virus replicante a 72 ore p.i., il cortisolo risulta aumentato di circa due volte rispetto al controllo, e l'estradiolo di un terzo. Nel sovrinatante delle cellule infettate con le

particelle virali inattivate agli UV, invece, le concentrazioni di cortisolo ed estradiolo risultano lievemente superiori rispetto al controllo, ma comunque simili a questo, indicando che l'effetto di aumento nella concentrazione di cortisolo è dovuto alla presenza di particelle virali replicanti (Figura 22).

### 7.3.3 Effetto dell'infezione da HCMV sull'espressione degli enzimi della steroidogenesi

Per capire se l'effetto dell'infezione da HCMV sulla steroidogenesi fosse associato a un cambiamento dell'espressione dei geni codificanti gli enzimi deputati alla sintesi di ormoni steroidei, è stata studiata l'espressione di alcuni di questi enzimi mediante real-time RT-PCR quantitativa.

A tal fine, l'RNA totale estratto e purificato dalle cellule NCI-H295R dopo retrotrascrizione è stato valutato tramite real-time RT-PCR per l'analisi dell'espressione dei seguenti geni: 17 $\alpha$ -idrossilasi (*CYP17*) 11 $\beta$ -idrossilasi (*CYP11B1*), aldosterone sintetasi (*CYP11B2*), 21 $\beta$ -idrossilasi (*CYP21*), *cholesterol side-chain cleavage* (*CYP11A*), aromatasi (*CYP19*), *steroidogenic acute regulatory protein* (*StAR*), 3 $\beta$ -idrossisteroidodeidrogenasi (*HSD3B2*). Il loro ruolo nella steroidogenesi è rappresentato nello schema della Figura 23.



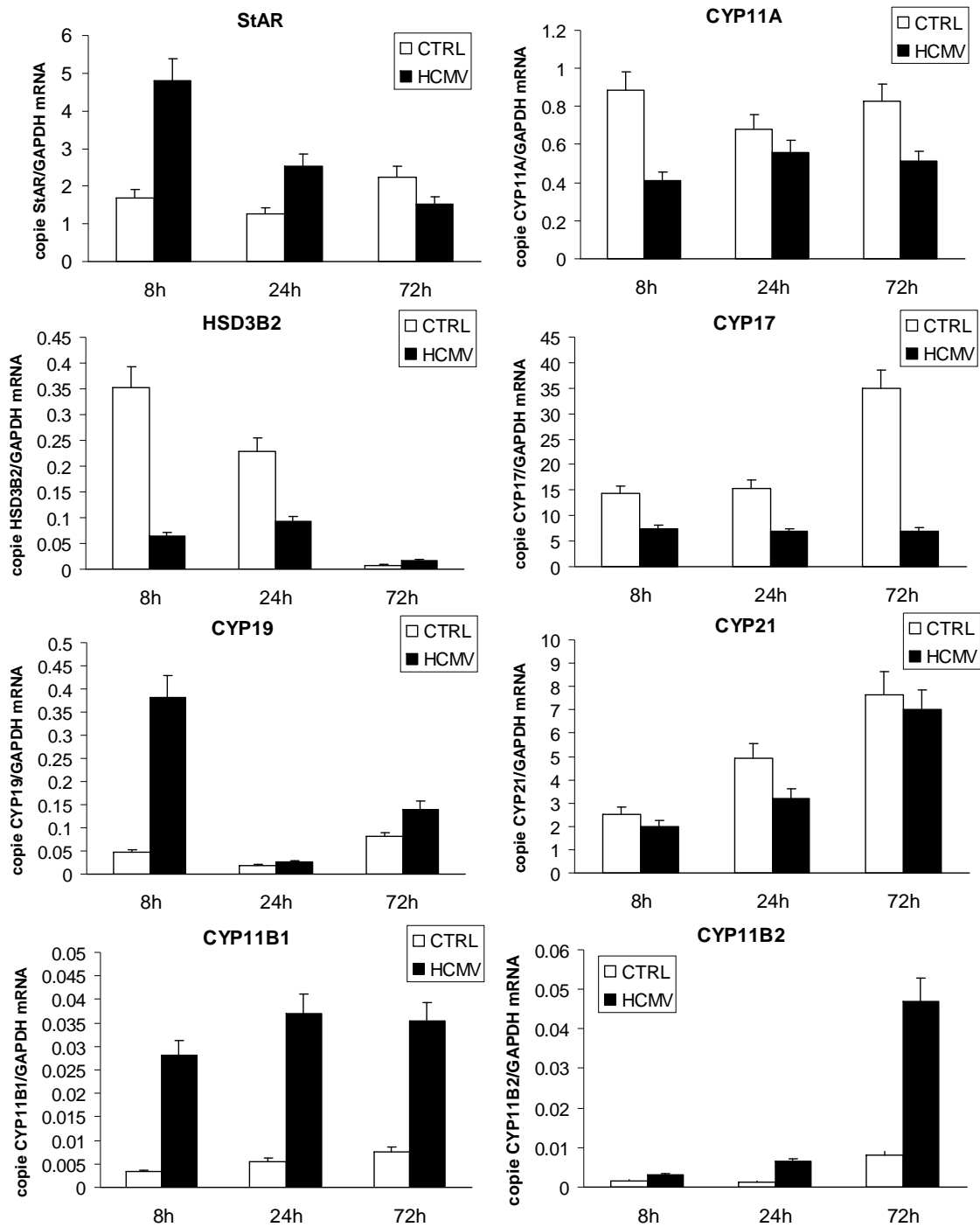
**Figura 23.** Schema rappresentante la successione delle reazioni coinvolte nella steroidogenesi, insieme agli enzimi che le catalizzano e ai loro substrati e prodotti.

I risultati ottenuti, espressi come numero di copie del trascritto target rispetto alle copie del gene *housekeeping* GAPDH, sono riportati nei grafici della Figura 24. L'espressione di StAR, enzima ubicato a monte del *pathway* della steroidogenesi e coinvolto nella risposta allo stress, aumentava nelle cellule infettate da AD169 rispetto al controllo, soprattutto durante le prime fasi dell'infezione, in accordo con una possibile risposta da stress promossa dall'entrata di HCMV nelle cellule. Al contrario, i trascritti di *CYP11A* e, soprattutto, di *HSD3B2*, codificanti enzimi coinvolti nelle fasi iniziali della steroidogenesi, risultano inibiti.

L'espressione del gene *CYP17*, codificante l'enzima 17 $\alpha$ -idrossilasi/17-20-liasi, importante per la produzione dei 17-idrossisteroidi e degli ormoni sessuali, risultava ridotta di circa 5 volte nelle cellule infettate rispetto al controllo. Questo risultato è concordante con la ridotta produzione di DHEA-S nelle cellule infettate da HCMV. L'espressione di *CYP21* (enzima che catalizza una tappa iniziale della sintesi del cortisolo), invece, risulta inibita dall'infezione virale. L'espressione di *CYP11B1*, codificante l'enzima che catalizza l'ultima tappa della produzione del cortisolo, è in pieno accordo con i dati dei saggi ormonali. Infatti, già a 8h dall'infezione, si rileva un forte incremento dell'espressione dell'enzima nelle cellule infettate, che aumenta ulteriormente nelle due successive raccolte.

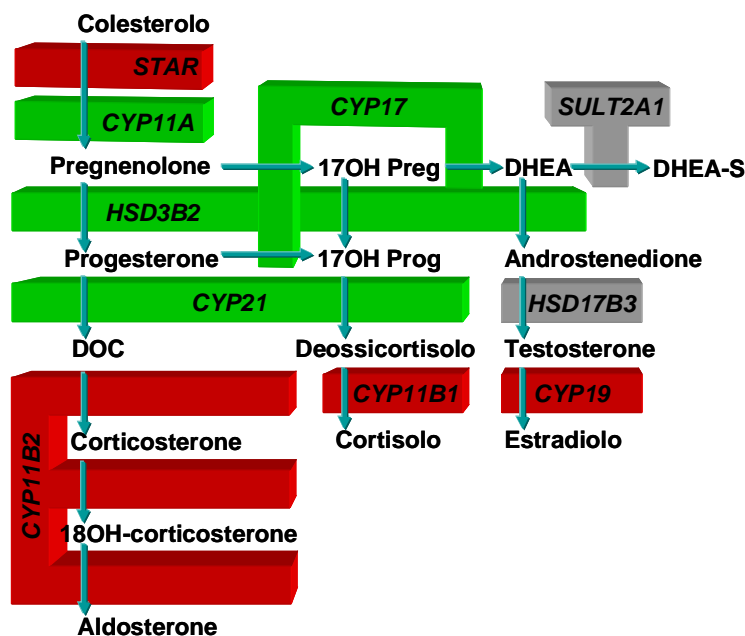
L'espressione di *CYP11B2* (aldosterone sintetasi, che catalizza le ultime reazioni per la sintesi di aldosterone) rileva un aumento di circa 6 volte a 72h dall'infezione nelle cellule infettate rispetto al controllo. Questo risultato è in contrasto con quanto rilevato nel saggio di secrezione dell'aldosterone, che non subiva, infatti, alcuna alterazione dopo infezione. Un esperimento più prolungato nel tempo consentirà di verificare se l'aumento tardivo dell'espressione di *CYP11B2* si accompagna ad un aumento della sintesi di aldosterone.

Anche l'espressione dell'aromatasi o *CYP19*, enzima chiave per la sintesi dell'estradiolo; risultano particolarmente aumentati durante le prime ore dopo l'infezione, in accordo con un l'aumento del 17 $\beta$ -estradiolo riscontrato con il dosaggio ormonale.



**Figura 24.** Grafici illustranti l'espressione dei trascritti dei geni StAR, CYP11A, CYP17 e HSD3B2, CYP19, CYP21, CYP11B1 e CYP11B2 misurata mediante real-time PCR quantitativa in cellule NCI-H295R infettate da HCMV AD169 MOI 2 (HCMV) o non infettate (CTRL).

I risultati di questi esperimenti sono sintetizzati in Figura 25.

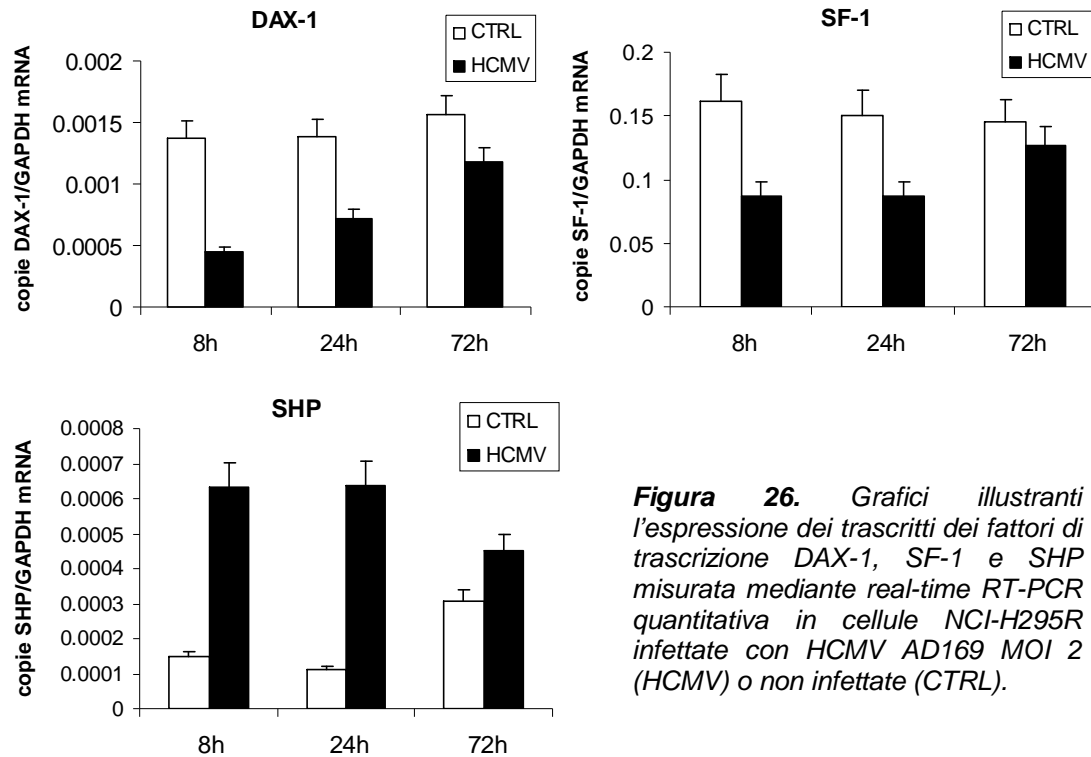


**Figura 25.** Schema dell'espressione degli enzimi della steroidogenesi, misurati nelle cellule NCI-H295R infettate da HCMV AD169. Sono evidenziati in verde e in rosso i geni che sono risultati rispettivamente repressi o indotti.

#### 7.3.4 Effetto dell'infezione da HCMV sull'espressione di recettori nucleari implicati nella regolazione dell'espressione degli enzimi della steroidogenesi

Nei medesimi esperimenti di infezione riportati sopra, nei quali sono stati dosati gli ormoni steroidei prodotti dalle cellule infettate da AD169 e l'espressione degli enzimi della steroidogenesi, è stata valutata, mediante real-time RT-PCR quantitativa, l'espressione di alcuni fattori di trascrizione in grado di modulare la steroidogenesi: *dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene-1 (DAX1)*, *liver receptor homolog (LRH)*, *steroidogenic factor-1 (SF1)*, e *small heterodimer partner (SHP)*. Tutti questi fattori fanno parte della superfamiglia dei recettori nucleari che consiste di una serie di fattori trascrizionali in grado di modulare l'espressione genica in risposta a diversi stimoli fisiologici e di avere un ruolo importante nell'omeostasi cellulare e nello sviluppo. DAX-1 e SHP fanno parte della famiglia di recettori orfani *NROB* e la loro funzione sembra essere quella di inibire l'azione di molti recettori nucleari attraverso interazioni eterodimeriche. DAX-1, tra le sue varie funzioni, ha anche quella di inibire l'espressione di StAR portando, di conseguenza, ad un blocco della produzione di ormoni steroidei (143); è inoltre in grado di agire come proteina co-regolatrice inibente l'attività trascrizionale di diversi recettori nucleari tra cui *NR5A1* codificante per il fattore di trascrizione

SF-1 (144). SF-1 è infatti un regolatore chiave dell'espressione genica delle idrolasi e viene espresso a diversi livelli del sistema riproduttivo. Numerosi studi dimostrano che SF-1 e DAX1 agiscono come antagonisti nella regolazione di molti processi mediati dall'ACTH. I grafici della Figura 26 mostrano gli andamenti dell'espressione genica di tali fattori di trascrizione nelle cellule corticosurrenaliche NCI-H295R dopo infezione con HCMV. Come si può notare dai grafici, l'espressione di DAX1 risulta inibita durante tutto il *time-course* d'infezione in accordo con l'aumentata produzione di ormoni steroidei riscontrata nei dosaggi ormonali e con l'aumentata espressione del gene StAR rilevata tramite real-time RT-PCR. Non chiaro sembra essere il meccanismo attraverso il quale si ha un'inibizione di SF1, antagonista di DAX1, e un'induzione di SHP, inibitore della steroidogenesi, anche se questo dato potrebbe essere spiegato come risultato di un meccanismo di *feed-back* negativo.

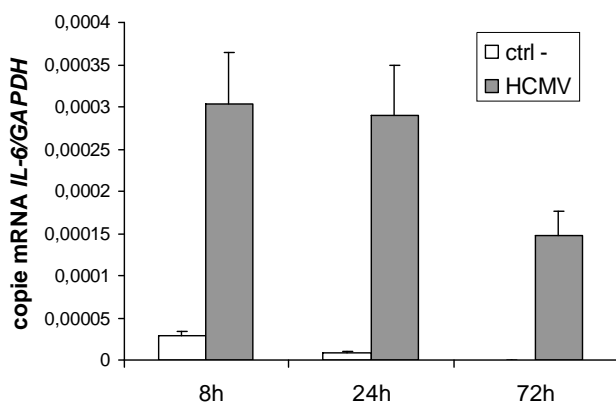


**Figura 26.** Grafici illustranti l'espressione dei trascritti dei fattori di trascrizione DAX-1, SF-1 e SHP misurata mediante real-time RT-PCR quantitativa in cellule NCI-H295R infettate con HCMV AD169 MOI 2 (HCMV) o non infettate (CTRL).

### 7.3.5 Effetto dell'infezione da HCMV sull'espressione di citochine implicate nella regolazione dell'espressione degli enzimi della steroidogenesi

Poiché è ormai nota la capacità del sistema immunitario di interagire col sistema endocrino in condizioni di stress attraverso alcune citochine proinfiammatorie come IL-6, si è voluto studiare mediante real-time RT-PCR

quantitativa l'espressione dei trascritti di questa proteina. Il grafico riportato in Figura 27 mostra che l'infezione virale determina un netto aumento della trascrizione di questo gene, soprattutto a 8 e 24 h dall'infezione. Alla misurazione mediante saggio ELISA, la citochina prodotta nel medium di coltura delle cellule risultava però indosabile.



**Figura 27.** Risultati dell'analisi dell'espressione di IL-6 mRNA, valutata tramite real-time RT-PCR a 8h, 24h, 72h post infezione in cellule NCI-H295R infettate con HCMV AD169 a MOI=2 (HCMV) e non infettate (ctrl -).

#### **7.4 Effetto degli ormoni steroidei sulla replicazione di HCMV**

Studi riportati in letteratura hanno dimostrato che il trattamento con corticosteroidi di fibroblasti e di cellule embrionali di rene infettate da HCMV aumenta la produzione di virioni infettivi (136,137). Il trattamento con idrocortisone rende inoltre permissivi all'infezione da HCMV macrofagi in coltura (135).

In questa parte dello studio si è voluto valutare se il trattamento con idrocortisone modifica la cinetica di replicazione di HCMV in cellule corticosurrenaliche e se l'inibizione della steroidogenesi surrenalica con aminoglutetimide modula la replicazione di HCMV nelle stesse cellule.

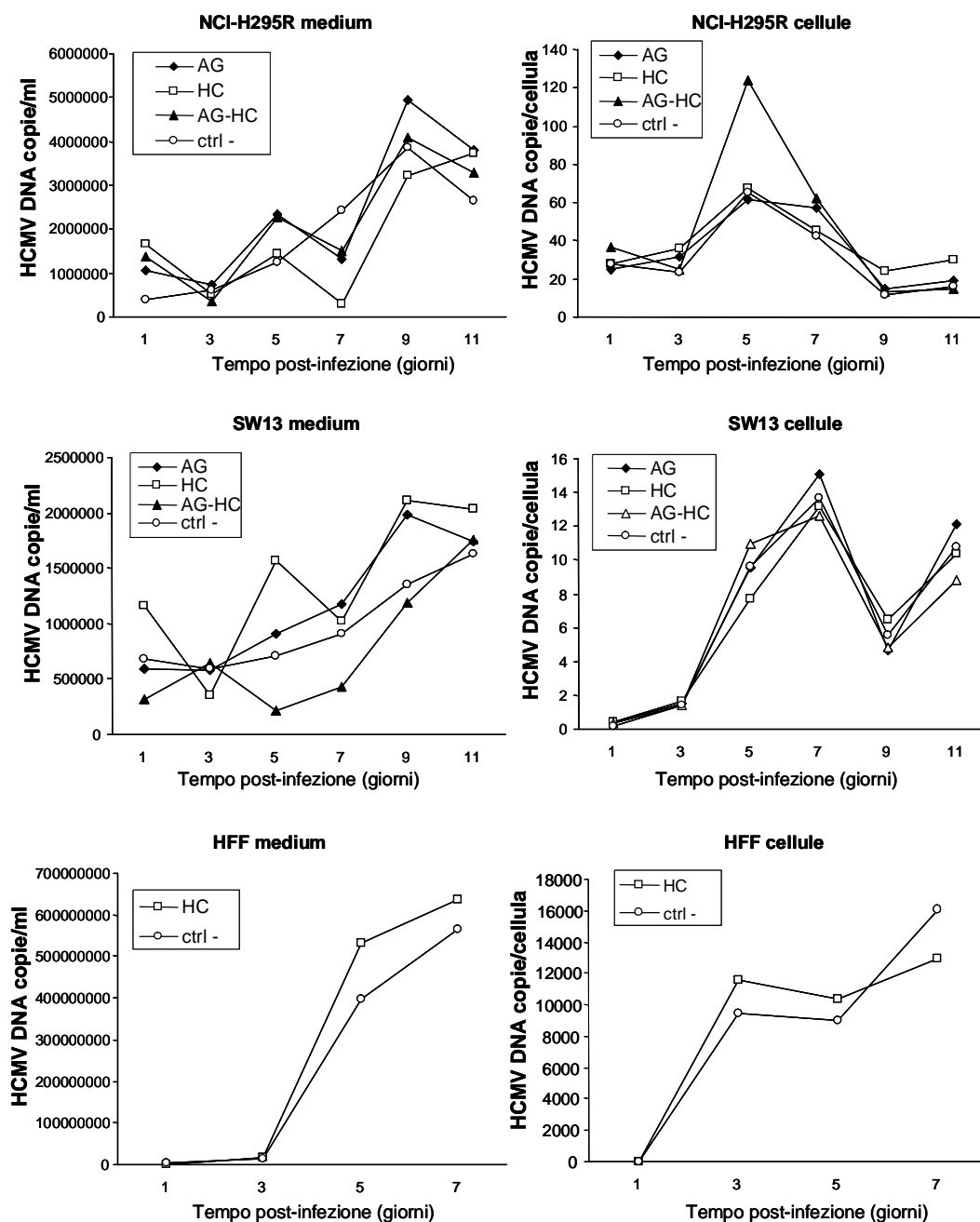
A tale scopo, le cellule NCI-H295R ed SW13 sono state pre-trattate con idrocortisone 10  $\mu$ M o, in alternativa, con aminoglutetimide 300  $\mu$ M durante le 48 ore antecedenti l'infezione virale. Dopo infezione con HCMV AD169 (MOI=0,1) e contemporaneo trattamento con l'uno o l'altro farmaco (o la combinazione di idrocortisone e aminoglutetimide), sono stati raccolti sia il mezzo di coltura che le cellule ai giorni 1, 3, 5, 7, 9, 11 per la misurazione della carica virale tramite real-time PCR, previa purificazione del DNA. I fibroblasti MRC-5, utilizzati come controllo d'infezione, sono stati invece pre-trattati con il solo idrocortisone 10  $\mu$ M e dopo 48 ore sono stati infettati con HCMV AD169 (MOI=0,1); le raccolte delle cellule e del mezzo di coltura, in questo caso, sono avvenute a 1, 3, 5, 7 giorni dopo l'infezione.

I fibroblasti MRC-5 trattati con idrocortisone dimostrano un titolo di HCMV AD169 più elevato rispetto al controllo non trattato. L'aumento del titolo virale si osserva sia nelle cellule che nel mezzo di coltura e, fatto interessante, l'aumento del titolo virale nelle cellule precede l'aumento del titolo osservato nel medium di coltura (terza e quinta giornata, rispettivamente (Figura 28).

Nelle cellule NCI-H295R infettate da AD169 si osserva un picco di produzione virale in corrispondenza del quinto giorno post-infezione; il titolo virale torna a livelli più bassi nei giorni successivi. Nel mezzo di coltura delle stesse cellule il titolo virale aumenta progressivamente, fino a raggiungere un picco in nona giornata post-infezione. Nelle cellule NCI-H295R trattate con idrocortisone non si osserva un significativo aumento del titolo virale e nel mezzo di coltura delle stesse cellule il titolo virale sembra addirittura più basso rispetto al controllo non trattato, soprattutto in settima giornata post-infezione. Il trattamento con aminoglutetimide da solo non modifica significativamente il titolo virale intracellulare, mentre sembra indurre dei picchi di produzione del virus nel mezzo di coltura in corrispondenza della quinta e nona giornata post-infezione. Analogo andamento del titolo virale si osserva nelle cellule trattate con la combinazione idrocortisone-aminoglutetimide.

Rispetto alle cellule NCI-H295R, le cellule SW13 infettate con AD169 dimostrano un minor titolo virale sia intracellulare che nel mezzo di coltura. Ciò potrebbe indicare una minore suscettibilità delle cellule SW13 all'infezione da AD169 o una minore permissività alla replicazione virale. Dopo l'infezione, il titolo virale aumenta progressivamente sia nelle cellule che nel mezzo di coltura. L'osservazione fino all'undicesima giornata post-infezione non sembra dimostrare picchi di produzione virale, oltre a una fase di plateau in nona giornata. Nelle cellule SW13 trattate con idrocortisone non si osserva un significativo aumento del titolo virale, mentre nel mezzo di coltura delle stesse cellule si osservano picchi con elevato titolo virale in quinta ed in nona giornata post-infezione. Il trattamento con aminoglutetimide da solo non modifica significativamente il titolo virale intracellulare, mentre sembra indurre un picco di produzione del virus nel mezzo di coltura in corrispondenza della nona giornata post-infezione. Nelle cellule trattate con la combinazione idrocortisone-aminoglutetimide il titolo virale nel mezzo di coltura risulta più basso rispetto al controllo non trattato.





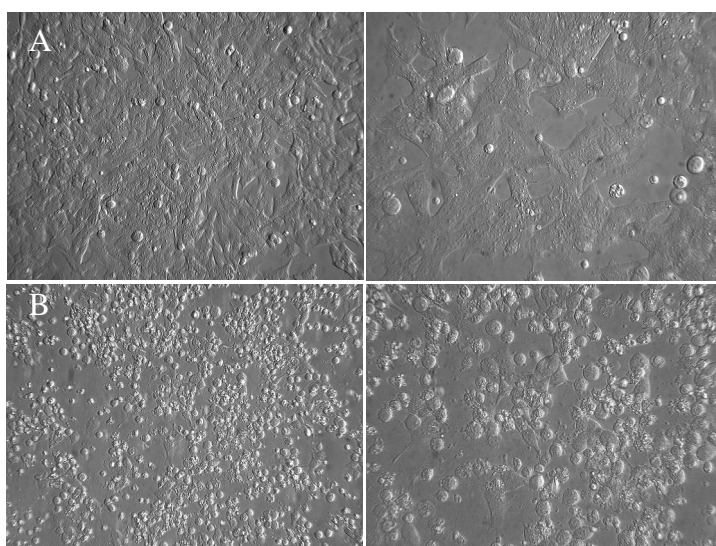
**Figura 28.** Andamento del titolo virale di HCMV AD169 nel medium di coltura o associato alle cellule dopo infezione e contemporaneo trattamento con idrocortisone 10  $\mu$ M, aminoglutetimide 300  $\mu$ M o entrambi i farmaci.

## **7.5 Effetto dell'infezione da AD169 HCMV sulla crescita delle cellule di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R**

In questa parte dello studio si è voluto verificare l'impatto dell'infezione da HCMV AD169 sulle cellule NCI-H295R in termini di effetto citopatico, apoptosi, ciclo cellulare e proliferazione cellulare.

### **7.5.1 Valutazione dell'effetto citopatico dovuto all'infezione da AD169 HCMV sulle cellule NCI-H295R: infezione litica o persistente?**

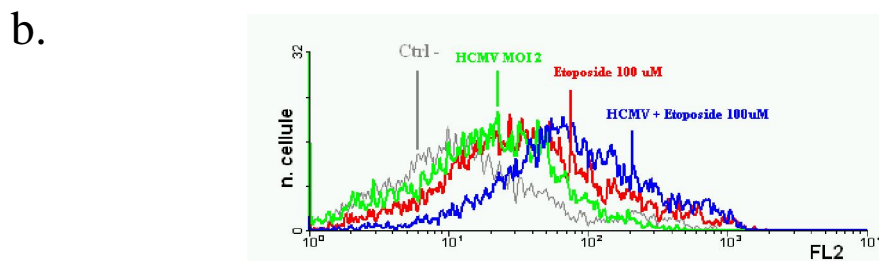
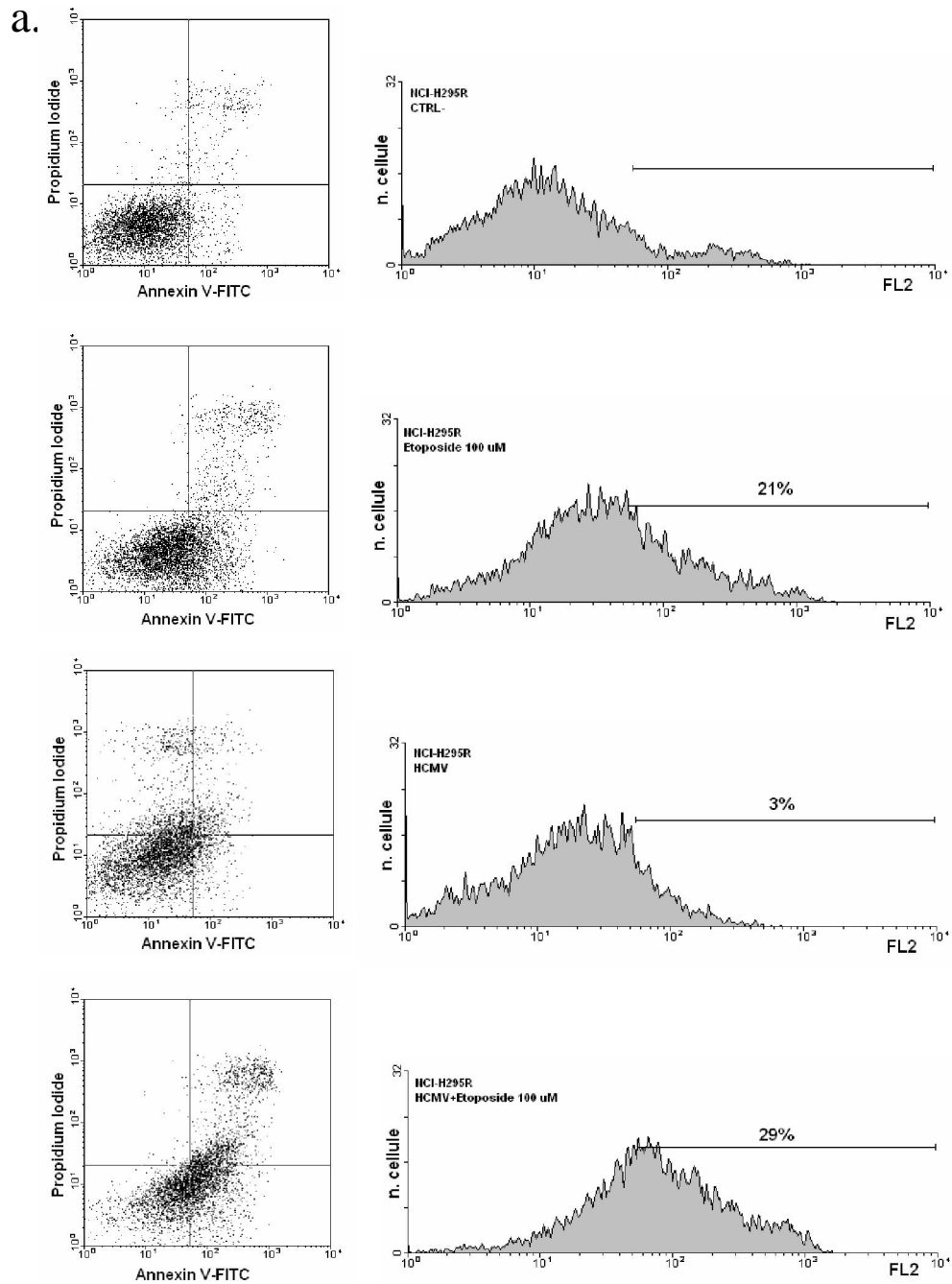
Al fine di valutare se l'infezione da HCMV AD169 sia in grado di produrre un effetto di tipo citopatico e se l'infezione sia di tipo persistente oppure di tipo litico, le cellule NCI-H295R, seminate in fiasche T75, sono state infettate con HCMV AD169 (MOI 2) e coltivate per diverse settimane. Le cellule di controllo sono state trattate come le cellule infettate fatta eccezione per la presenza del virus. Per poter valutare l'efficienza di infezione, sia le cellule infettate che quelle di controllo sono state periodicamente seminate in shell vials ed il grado di infezione è stato valutato tramite la tecnica di immunofluorescenza per l'antigene precoce pp72. La morfologia cellulare è stata valutata giornalmente tramite microscopia ottica confrontando le cellule infettate con quelle di controllo. Dopo 3 settimane dall'infezione si è osservato un effetto citopatico caratterizzato dalla presenza di cellule apoptotiche vacuolizzate, che nei successivi passaggi, sono andate incontro a necrosi (Figura 29).



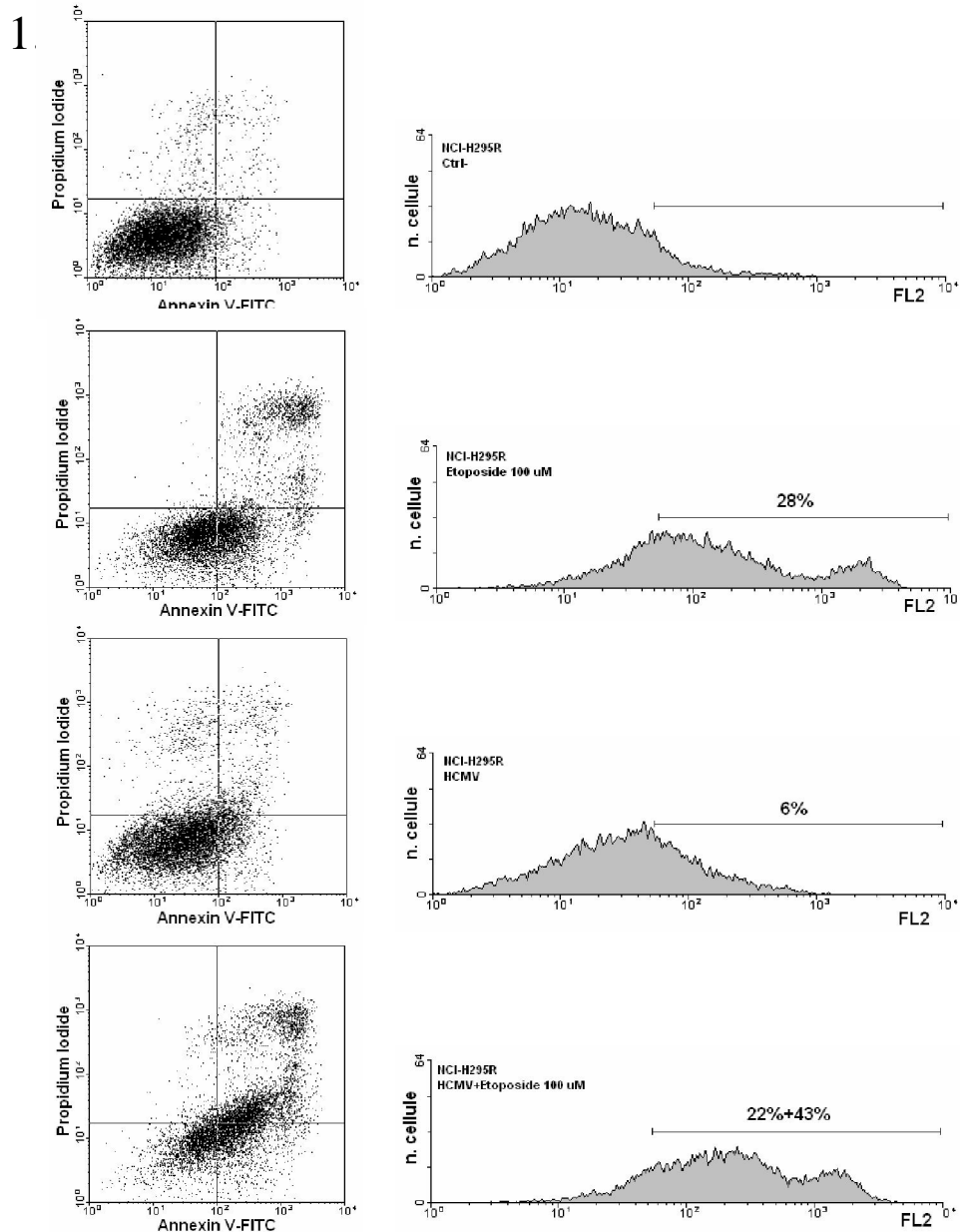
**Figura 29.** Immagini ottenute al microscopio ottico delle cellule NCI-H295R infettate con HCMV AD169 (MOI2) (B), e del relativo controllo (A), dopo 21 giorni d'infezione, a due ingrandimenti diversi.

### 7.5.2 Effetto dell'infezione di HCMV sulla morte cellulare programmata della linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R

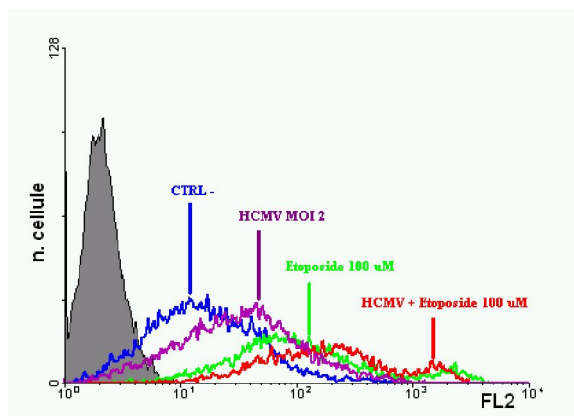
Dopo aver valutato l'effetto citopatico causato dall'infezione di HCMV sulla linea NCI-H295R, si è voluto valutare l'effetto dell'infezione da HCMV sulla morte cellulare programmata o apoptosi. Le cellule NCI-H295R, seminate in pozzetti da 24 wells, sono state trattate con HCMV AD169 (MOI 2), con etoposide 100  $\mu$ M (induttore di apoptosi), o con entrambi. Dopo 24 e 72 ore dall'infezione le cellule sono state colorate con un anticorpo anti-annexina V legato a FITC e con propidio ioduro, e sono state analizzate in citometria a flusso con il FACSCalibur leggendo l'emissione di fluorescenza a 530 nm e > 575 nm (figure 30-31). Essendo l'etoposide in grado di indurre apoptosi agendo a livello delle topoisomerasi II, tale farmaco è stato utilizzato come controllo positivo di infezione. Dopo sole 24 ore dall'infezione infatti, il 20% in più di cellule risultano apoptotiche rispetto al controllo. Le cellule infettate con HCMV AD169 presentano una percentuale di cellule apoptotiche che supera il controllo del 3%, mentre risultano aumentate del 16% in più le cellule in necrosi, conseguenza dell'effetto diretto dell'infezione virale. Interessante notare come l'infezione con HCMV MOI 2 combinata al trattamento con etoposide 100  $\mu$ M risulti in un effetto sinergico che porta il numero di cellule apoptotiche a superare il controllo del 29% a sole 24 p.i. (Figura 32). A 72 ore dall'infezione l'andamento dell'apoptosi nelle cellule NCI-H295R risulta simile, ma l'effetto è sicuramente più marcato. Nelle cellule trattate con etoposide, quelle apoptotiche risultano essere il 28% in più rispetto alle cellule di controllo e, nel caso delle cellule infettate con HCMV, il 6%. L'effetto sinergico di etoposide 100  $\mu$ M e HCMV risulta ancora più importante alle 72 h p.i. Il 22% in più delle cellule rispetto a quelle di controllo risulta infatti in stato di apoptosi mentre il 43% delle cellule rispetto al controllo risulta essere in stato di necrosi post-apoptotica, stadio successivo all'entrata delle cellule stesse in apoptosi. Le cellule vive in quest'ultimo caso infatti risultano essere del 64% inferiori al controllo.



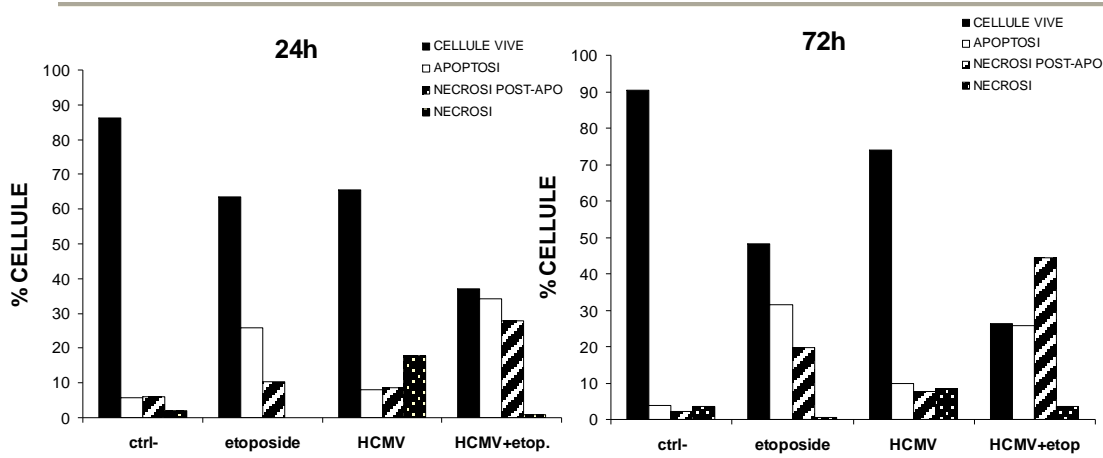
**Figura 30.** Dot plot ed istogrammi dell'analisi di apoptosi effettuata al citofluorimetro a 24 ore dall'infezione di HCMV AD169 sulla linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R (a). Sovrapposizione dei quattro istogrammi (b).



2.



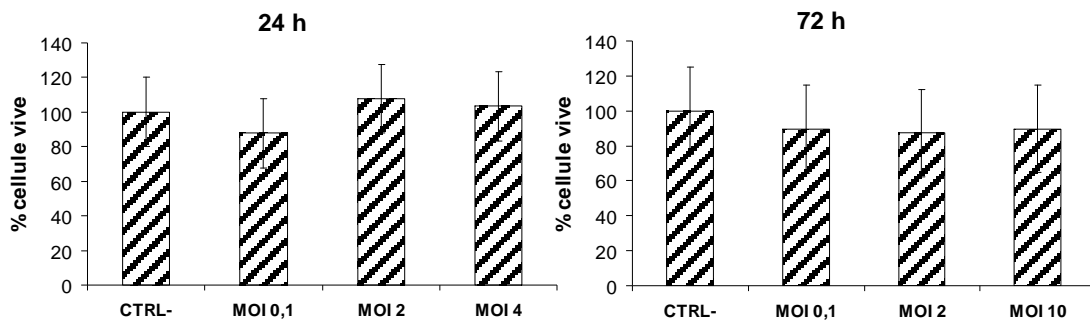
**Figura 31.** Dot plot ed istogrammi dell'analisi di apoptosi effettuata al citofluorimetro a 72 ore dall'infezione di HCMV AD169 sulla linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R (1). Sovrapposizione dei quattro istogrammi (2).



**Figura 32.** Analisi dell'apoptosi cellulare causata da HCMV AD169, etoposide 100  $\mu$ M e la combinazione dei due, nella linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R, a 24 e 72 ore post-infezione.

### 7.5.3 Effetto dell'infezione di HCMV sulla proliferazione delle cellule della linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R

Al fine di poter valutare l'impatto dell'infezione da HCMV sulla proliferazione delle cellule della linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R, tali cellule sono state seminate in micropiastre da 96 wells e infettate con HCMV AD169 ad una MOI di 0.1, 2 e 4. Nelle ultime 16 ore precedenti alla raccolta (24 e 72 ore) le cellule sono state trattate con BromodeossiUridina (BrdU) e, a 24 e 72 ore dall'infezione, le cellule sono state fissate, denaturate, e trattate con un anticorpo primario anti-BrdU. Le cellule sono quindi state incubate con un anticorpo secondario coniugato ad una perossidasi di rafano e infine la reazione è stata bloccata con una *stop solution*. Dal calcolo dell'assorbanza (450 nm) si è riusciti a risalire alla quantità di DNA sintetizzato rispetto al controllo (Figura 33).



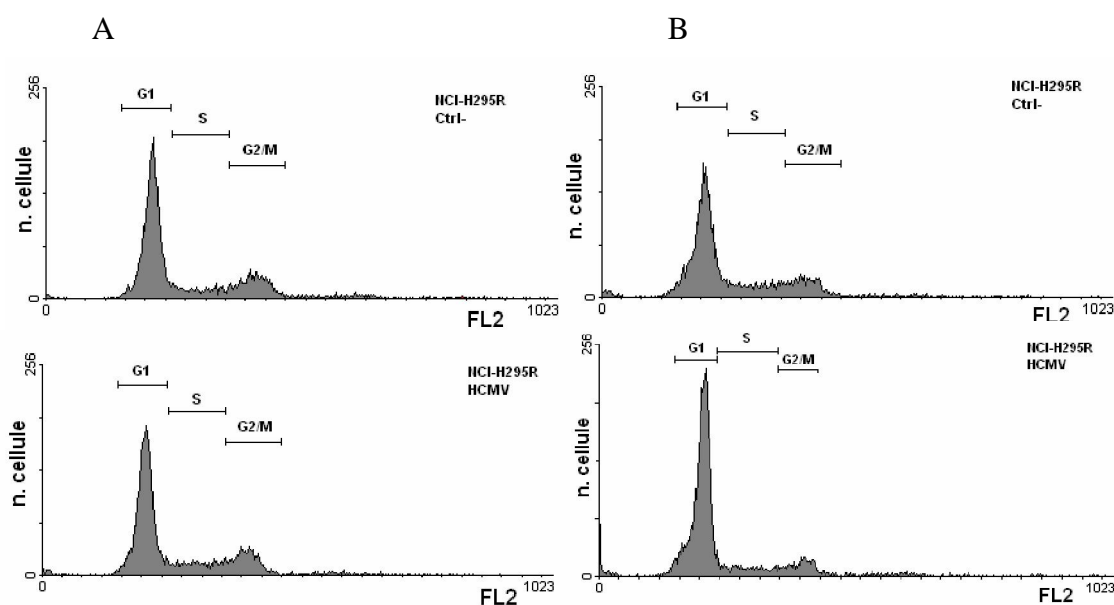
**Figura 33.** Analisi della proliferazione delle cellule NCI-H295R infettate con HCMV AD169 alle MOI di 0.1, 2, 4 dopo 24 e 72 ore dall'infezione. Saggio della BrdU.

Come si può notare dai grafici riportati in Figura 33, che rappresentano la percentuale di BrdU incorporata nel DNA sintetizzato rispetto al controllo, durante le prime 24 ore p.i. la quantità di DNA rimane invariata nelle cellule infettate rispetto al controllo, fatta eccezione per le cellule trattate con una MOI bassa (0.1),

nelle quali si può notare una lieve diminuzione della proliferazione cellulare. A 72 h p.i., invece, la sintesi del DNA cellulare, e quindi la proliferazione cellulare, risulta ridotta di una percentuale che varia in base alla MOI d'infezione dal 20 al 35%, rispetto al controllo.

#### 7.5.4 Impatto dell'infezione di HCMV sul ciclo cellulare della linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R

Al fine di valutare l'impatto dell'infezione virale di HCMV sul ciclo cellulare della linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R, le cellule subconfluenti, seminate in piastre da 6 wells, sono state sincronizzate per mezzo della privazione di siero nelle 24 ore antecedenti l'infezione, infettate con HCMV AD169 (MOI 2) e sono state raccolte a 72 ore e 7 giorni dall'infezione. Le cellule sono state successivamente fissate in etanolo 70%, lavate con un buffer fosfato-citrato, trattate con RNase, colorate con Propidio Ioduro (PI) e analizzate al citofluorimetro per valutare la quantità di PI incorporata nel DNA (Figura 34).



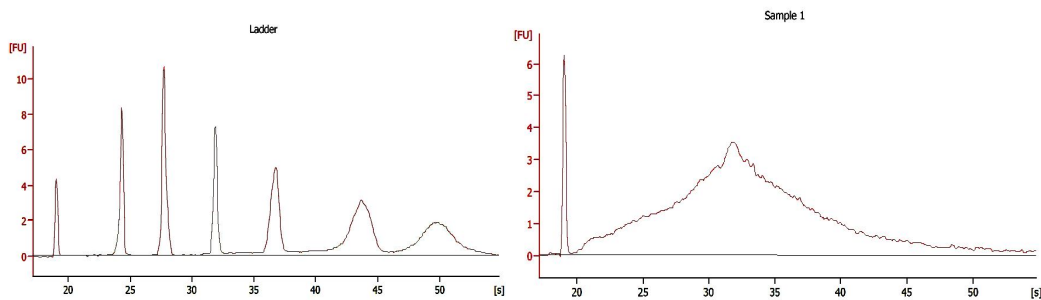
**Figura 34.** Istogrammi di analisi del ciclo cellulare delle cellule NCI-H295R infettate con HCMV AD169 (MOI 2) (pannello in basso) e delle stesse cellule non infettate (pannello in alto) colorate con PI a 3 (A) e 7 (B) giorni post-infezione.

Dopo 72 ore dall'infezione con HCMV il 4% delle cellule NCI-H295R rispetto al controllo risulta in fase S del ciclo cellulare. La fase G<sub>2</sub> risulta in concomitanza diminuita per la stessa percentuale; le cellule presenti in fase G<sub>1</sub> rimangono invece costanti nel numero. Ad una settimana dall'infezione la

situazione rimane quasi invariata. Vi è infatti un lieve aumento della fase S a discapito sia della fase  $G_1$  che  $G_2$ .

## 7.6 Effetto di HCMV sul profilo di espressione genica di cellule corticosurrenaliche

In questa parte dello studio la tecnica dei microarray a DNA è stata utilizzata per poter meglio comprendere gli effetti dell'infezione da HCMV sulle cellule di carcinoma corticosurrenalico SW13 e NCI-H295R. A questo scopo è stato eseguito un esperimento time-course di infezione delle cellule con HCMV MOI=2 e raccolta delle cellule per l'estrazione di RNA e analisi dei microarray a 8h, 24h e 72h p.i.. La scelta dei tempi dell'esperimento è basata sulle conoscenze sul ciclo replicativo di HCMV ed effetto sul profilo di espressione genica nei fibroblasti (14). L'RNA totale delle cellule infettate e non infettate è stato purificato, quindi amplificato utilizzando il kit *SuperScript™ Indirect RNA Amplification System* dell'Invitrogen e ne è stata effettuata una valutazione di tipo quali-quantitativa tramite tecnologia Agilent (Bioanalyzer 2100, Figura 35); dopo tale valutazione l'aRNA così ottenuto è stato marcato e ibridato in ugual quantità su microarray rappresentativi del genoma umano. L'esperimento è stato condotto due volte in duplicato con inversione dei fluorocromi.



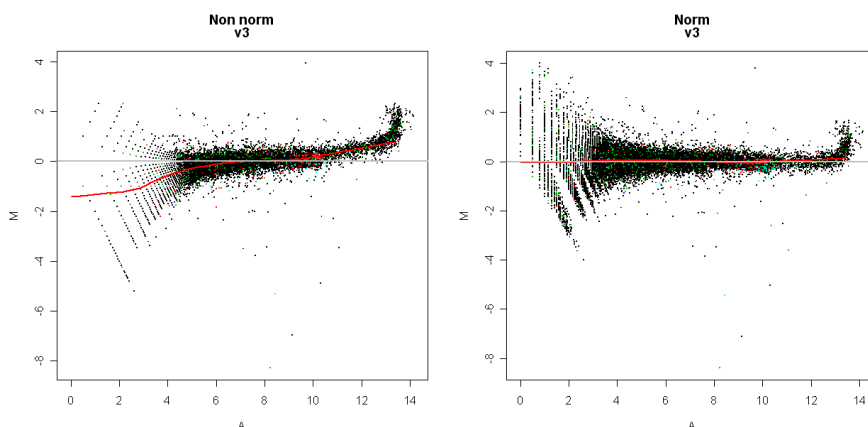
**Figura 35.** Esempio di analisi quali-quantitativa effettuata con il Bioanalyzer 2100 dell'Agilent sull'aRNA amplificato. A sinistra si può vedere il ladder di controllo e a destra l'esempio di un campione.

Prima di procedere all'analisi statistica dei risultati, dati (corrispondenti a 47616 spot depositati in duplicato) sono stati normalizzati, sia all'interno che fra gli array, applicando la tecnica che è risultata migliore in termini di deviazione mediana assoluta, ossia i valori di background delle sottogriglie (vedi Tabella 4 ed esempio di normalizzazione in Figura 36).



**Tabella 4.** Risultati della normalizzazione dei dati dei microarray utilizzando diversi metodi di normalizzazione.

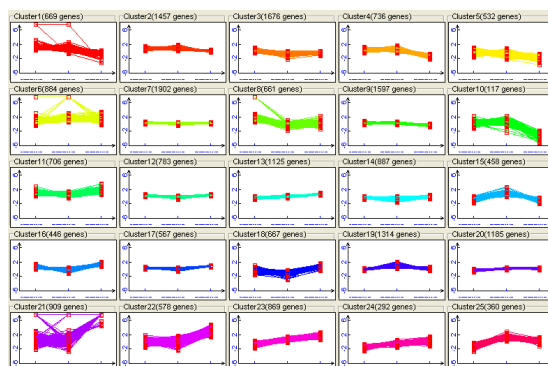
MAD	v1	v2	v3	v4	v5	v6
None	0.8319102	0.4775622	0.5374211	0.6208756	0.6811533	0.6773372
Median	0.8319102	0.4775622	0.5374211	0.6208756	0.6811533	0.6773372
Lowess	0.7321004	0.4749107	0.3278327	0.3645438	0.5986083	0.5116818
Print-tip	0.7192199	0.4507349	0.3111587	0.3486752	0.5345165	0.4833085
TwoD	0.79815	0.4672532	0.5205538	0.5781198	0.6730334	0.6699129



**Figura 36.** Esempio di normalizzazione di dati di un microarray secondo “print-tip”.

Dal dataset sono stati successivamente tolti 4960 spot (*absent, empty, alignment, intensity*) in modo da lavorare solamente sugli spot che codificano per i geni. È stato quindi ottenuto un set di 21328 spot replicati. Prima di eseguire l’analisi sono stati inoltre eliminati i geni che presentavano almeno un valore mancante in quanto era necessaria una matrice completa di dati. Di conseguenza, la selezione dei geni differenzialmente espressi è stata effettuata su un dataset di geni che presentavano tutti i valori delle repliche.

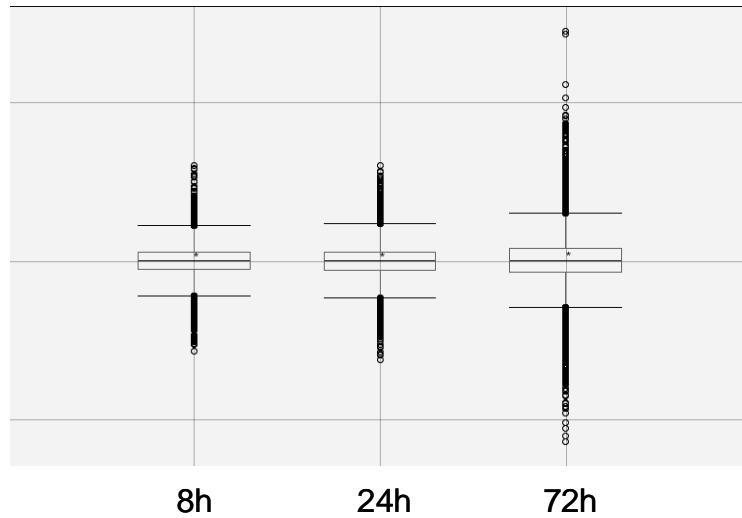
I geni differenzialmente espressi sono stati ordinati utilizzando una statistica basata sulla non-costanza del livello di espressione dei geni nel tempo tenendo in considerazione la struttura di correlazione fra gli istanti temporali e le repliche (esempio in Figura 37). Questa statistica include anche una moderazione per limitare i falsi positivi.



**Figura 37.** Esempio di analisi temporale dei dati di espressione genica, a 8h, 24h e 72 ore dall’infezione, mediante analisi di cluster “self-organizing maps” (SOM).

### 7.6.1 Analisi temporale del profilo di espressione genica di cellule SW-13 dopo infezione da HCMV AD169

L'analisi temporale del profilo di espressione genica delle cellule SW-13 infettate da HCMV AD169 mostrava un aumento dei geni modulati dall'infezione durante il time-course dell'esperimento (Figura 38).



**Figura 38.** Box plot dei rapporti di espressione genica di cellule SW13 infettate da AD169 HCMV. Il numero di geni modulati dall'infezione virale aumenta durante il time-course dell'esperimento.

La seguenti tabelle riportano i geni con repliche concordi nei rispettivi istanti temporali, suddivisi tra sovraespressi e sottoespressi con una soglia di  $\pm 0.99$  (CV).

**Tabella 5.** Geni sovraespressi alle 8 ore

Gene ID	8h pairMean (locBGC) difference
023J17_Homo sapiens PRO1716 mRNA, complete cds	5,1799
041J06_GalNAc-4-sulfotransferase 2	4,9268
043A13_Histamine receptor H2	3,2669
044M13_Homo sapiens cDNA FLJ25251 fis, clone STM03603	3,1880
037K11_Fructosamine-3-kinase	3,1862
039E11_ESTs, Weakly similar to ATHU actin alpha 1, skeletal muscle [H.sapiens]	3,1438
036I22_Homo sapiens cDNA FLJ30722 fis, clone FCBBF4000268	3,0283
040A22_Homo sapiens cDNA FLJ13446 fis, clone PLACE1002968	2,7941
056E19_Homo sapiens cDNA FLJ30217 fis, clone BRACE2001709, highly similar to Homo sapiens anaphase-promotin	2,6169
022K01_Cytochrome P450, subfamily IIIA, polypeptide 7	2,6002
008D17_Hypothetical protein FLJ00012	2,5758
023J18_KIAA1276 protein	2,5469
021B23_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586B0220 (from clone DKFZp586B0220)	2,5304
041B11_Homo sapiens chromosome 21 open reading frame 42 (C21orf42), mRNA	2,4567
012M22_Agouti signaling protein, nonagouti homolog (mouse)	2,4365

002F20_Egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like sequence 1	2,4183
049E21_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564H0616 (from clone DKFZp564H0616)	2,3707
017A22_Amiloride binding protein 1 (amine oxidase (copper-containing))	2,3270
011D06_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434O1311 (from clone DKFZp434O1311)	2,2602
023J09_Homo sapiens PAC clone RP4-771P4 from 7q11.21-q11.23	2,2507
056N18_Homo sapiens cDNA FLJ25012 fis, clone CBL01290	2,2303
025J16_Homo sapiens cDNA FLJ11778 fis, clone HEMBA1005911	2,2146
018A20_Fc fragment of IgG, low affinity Ila, receptor for (CD32)	2,1805
047B10_Hypothetical protein PRO1438	2,1723
049N02_Homo sapiens cDNA: FLJ21198 fis, clone COL00220	2,1346
049H09_Homo sapiens cDNA: FLJ21520 fis, clone COL05874	2,1270
035O18_Homo sapiens, Similar to thymus expressed gene 3, clone MGC:15476 IMAGE:2967514, mRNA, complete cds	2,1160
054I21_Homo sapiens, clone MGC:2908 IMAGE:3029644, mRNA, complete cds	2,1098
004P05_Hypothetical protein FLJ10081	2,0992
041F08_Homo sapiens cDNA FLJ32572 fis, clone SPLEN2000205	2,0948
054F04_Homo sapiens, Similar to hypothetical protein FLJ10702, clone MGC:21954 IMAGE:4391821, mRNA, complet	2,0806
040H24_Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 7	2,0771
053D13_Disabled homolog 1 (Drosophila)	2,0562
036D15_Insulin-like 6	2,0423
012K13_Homo sapiens mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 191017	2,0377
030E24_KIAA1193 protein	2,0228
043O13_Olfactory receptor, family 10, subfamily H, member 1	2,0188
052N10_Phytanoyl-CoA hydroxylase interacting protein	2,0016
033M15_Hypothetical protein FLJ21415	1,9971
047F12_CC chemokine CCL28	1,9948
054E09_NG23 protein	1,9850
025A23_Hypothetical protein FLJ22404	1,9835
057A21_Homo sapiens, clone IMAGE:4800052, mRNA, partial cds	1,9728
008H23_TRAF interacting protein	1,9429
054J15_Homo sapiens cDNA FLJ31322 fis, clone LIVER2000033, weakly similar to TUMOR NECROSIS FACTOR, ALPHA-I	1,9180
051O16_Putative microtubule-binding protein	1,9153
026F08_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434L2430 (from clone DKFZp434L2430)	1,9102
019B17_Homo sapiens cDNA FLJ13656 fis, clone PLACE1011520	1,8981
034J14_Homo sapiens cDNA FLJ12305 fis, clone MAMMA1001890	1,8854
056D23_Homo sapiens cDNA FLJ32759 fis, clone TESTI2001793, moderately similar to Human B219/OB receptor isoform	1,8805

**Tabella 6. Geni sottoespressi alle 8 ore**

Gene ID	8h pairMean (locBGC) difference
032I21_Synaptonemal complex protein 1	-3,8180
004M16_Ras homolog gene family, member E	-3,0302
011H03_Hypothetical protein FLJ11082	-3,0076
028O19_Adenosine monophosphate deaminase 1 (isoform M)	-2,9942
050D14_Homo sapiens cDNA FLJ30162 fis, clone BRACE2000565	-2,9048
040B08_Homo sapiens cDNA FLJ14056 fis, clone HEMBB1000335	-2,8673
002H17_Macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)	-2,8579
003H18_Hypothetical protein MGC10433	-2,8342
040N12_Hypothetical protein FLJ10989	-2,8148
034L12_Homo sapiens cDNA FLJ30580 fis, clone BRAWH2006996	-2,7935

030D04_Cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 6	-2,7403
044O16_Hypothetical protein FLJ20320	-2,6757
055J09_Homo sapiens cDNA FLJ31010 fis, clone HLUNG2000174	-2,6651
026N05_Prefoldin 2	-2,6035
009L07_Hypothetical protein FLJ11106	-2,5412
050L14_Interleukin 24	-2,5163
018P07_Mitochondrial ribosomal protein S21	-2,5048
019J15_Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	-2,4788
011A04_ATPase, Class VI, type 11A	-2,4770
004O05_Synapsin II	-2,3875
022O19_Neuralized-like (Drosophila)	-2,2649
004F05_COBW-like protein	-2,2271
035F24_Homo sapiens cDNA FLJ32717 fis, clone TESTI2000819	-2,2127
052D12_Homo sapiens cDNA FLJ14422 fis, clone HEMBA1005680	-2,2093
047L19_BarH-like 1 (Drosophila)	-2,1753
024C24_T-cell activation protein	-2,1660
010I11_Hypothetical protein P15-2	-2,1438
003C04_CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) phosphatase, subunit 1	-2,1163
005N09_Solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 4	-2,1142
032C16_Melanoma antigen, family B, 2	-2,1092
004B06_Homo sapiens clone 23809 mRNA sequence	-2,1001
017O14_EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	-1,9408
040P10_Interleukin-1 homolog 1	-1,9368
055E13_Homo sapiens cDNA FLJ11666 fis, clone HEMBA1004672	-1,8879
058B01_H2B histone family, member Q	-1,8826
055J02_Seven transmembrane domain orphan receptor	-1,8550
025H22_Homo sapiens cDNA: FLJ23508 fis, clone LNG03158	-1,8313
053I15_KRAB zinc finger protein KR19	-1,8296
040E10_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564G103 (from clone DKFZp564G103)	-1,8269

**Tabella 7. Geni sovraespressi alle 24 ore**

Gene ID	24h Mean (locBGC) difference
020N04_Myosin IXB	3,381374885
042H03_Homo sapiens PAC clone RP4-751H13 from 7q35-qter	3,013525306
005L08_Homo sapiens cDNA FLJ31238 fis, clone KIDNE2004864	2,925448843
043J18_Sodium channel, voltage-gated, type X, alpha polypeptide	2,827965652
044K08_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761G18121 (from clone DKFZp761G18121); complete cds	2,780922005
007B24_Homo sapiens, clone IMAGE:2959994, mRNA	2,734078159
014L13_Phenylalanine-tRNA synthetase	2,717506679
004I06_Hypothetical protein DKFZp564O1664	2,58032268
050M16_Homo sapiens cDNA FLJ25214 fis, clone REC08615	2,537707034
006B05_DKFZP434J214 protein	2,522011403
044M20_Homo sapiens cDNA FLJ25438 fis, clone TST08327	2,515921415
004G06_Vacuolar protein sorting 45A (yeast)	2,507575242
041B11_Homo sapiens chromosome 21 open reading frame 42 (C21orf42), mRNA	2,507338685
009O01_KIAA0774 protein	2,444969514
033E07_KIAA1285 protein	2,384391959
049N02_Homo sapiens cDNA: FLJ21198 fis, clone COL00220	2,375177148
024L09_Homo sapiens cDNA FLJ14261 fis, clone PLACE1001545	2,346269892

004A07_Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 4	2,323225388
038G10_Homo sapiens cDNA FLJ12163 fis, clone MAMMA1000594	2,321323085
023F05_Interferon stimulated gene (20kD)	2,304625825
002P01_Cas-Br-M (murine) ectropic retroviral transforming sequence b	2,293434247
012A17_Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide	2,214134277
052J21_Homo sapiens cDNA FLJ14956 fis, clone PLACE3000388	2,205282922
003N05_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586C0224 (from clone DKFZp586C0224)	2,184860905
005E22_Hypothetical protein DKFZp761M0423	2,184637287
048A19_Protocadherin gamma subfamily B, 6	2,181046386
054I17_Homo sapiens cDNA FLJ14930 fis, clone PLACE1009335	2,153016764
008P13_Human DNA sequence from clone GS1-115M3 on chromosome Xq27.1-28 Contains a gene for a novel protein,	2,14883705
027I10_Homo sapiens cDNA FLJ12053 fis, clone HEMBB1002043	2,147455385
004C08_Fibroblast growth factor 13	2,141841941
047M08_Hypothetical protein PRO2130	2,140118709

**Tabella 8. Geni sottoespressi alle 24 ore**

Gene ID	24h Mean (locBGC) difference
008K07_Homo sapiens cDNA FLJ11385 fis, clone HEMBA1000520	-3,995324582
011L17_KIAA0356 gene product	-3,51011617
014B06_Sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain, (semaphorin) 6C	-3,262463548
020N10_Homo sapiens cDNA FLJ32330 fis, clone PROST2004742	-3,189339845
047O24_Hypothetical protein PRO1617	-3,138260089
024B11_Homo sapiens cDNA FLJ12996 fis, clone NT2RP3000235	-2,934723308
006D06_Hypothetical protein FLJ14566	-2,789029866
015A13_Catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	-2,780477339
011P06_Homo sapiens clone 23832 mRNA sequence	-2,679818239
048P19_Caspase recruitment domain protein 14	-2,674436176
026K07_Cortactin binding protein 2	-2,617391902
014N15_Highly expressed in cancer, rich in leucine heptad repeats	-2,498149073
046J04_A disintegrin and metalloproteinase domain 19 (meltrin beta)	-2,468685388
015K23_Hypothetical protein MGC11314	-2,460763888
015P06_CD38 antigen (p45)	-2,410013537
030D19_KIAA1324 protein	-2,407281741
016N14_KIAA0275 gene product	-2,357384337
023K19_Hypothetical protein FLJ23506	-2,355840642
046F19_Hypothetical protein FLJ10921	-2,328766151
004D05_MAGE-E1 protein	-2,313230626
010I05_Hypothetical protein MGC10471	-2,309207749
041E08_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586C2020 (from clone DKFZp586C2020)	-2,277967275
040H02_Homo sapiens mRNA for FLJ00092 protein, partial cds	-2,273411991
010K14_V-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	-2,243442947
035J21_Olfactory receptor, family 7, subfamily C, member 1	-2,206916047
029D11_Hypothetical protein FLJ20689	-2,190416863
040C08_Homo sapiens clone N11 NTera2D1 teratocarcinoma mRNA	-2,169175573
005L06_Hypothetical protein FLJ10055	-2,159176199
040P14_Homo sapiens cDNA FLJ30671 fis, clone FCBBF1000687, moderately similar to Mus musculus Rap2 interact	-2,153747565
056C12_Homo sapiens S100Z protein mRNA, complete cds	-2,146071509
014C03_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp547E107 (from clone DKFZp547E107)	-2,125009587
017G10_CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	-2,101573213

024C12_Homo sapiens, Similar to AE-binding protein 2, clone MGC:23151 IMAGE:4843866, mRNA, complete cds	-2,089243887
030B24_ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 3	-2,068637199
011H03_Hypothetical protein FLJ11082	-2,066090056
004N12_G protein pathway suppressor 2	-2,059388455
014K06_Cardiac-specific homeo box	-2,045602073
036G20_Cat eye syndrome chromosome region, candidate 8	-2,038548318
004J05_Dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 1	-2,024986725
003H18_Hypothetical protein MGC10433	-2,013216907
002J20_Lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain-containing leukocyte protein of 76kD)	-1,977445595
001H20_Charot-Leyden crystal protein	-1,977306897
009M03_Cytochrome b5 reductase b5R.2	-1,962320515
033F14_Hypothetical protein FLJ23017	-1,933721181
045G11_Homo sapiens cDNA: FLJ22751 fis, clone KAIA0483, highly similar to AF016692 Homo sapiens small intes	-1,926682833
010N04_Fatty acid binding protein 7, brain	-1,897991546
033N12_DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 7 (RNA helicase, 52kD)	-1,859202625
005E01_DKFZP434B027 protein	-1,833757848
011C23_ARG99 protein	-1,826391861
046L16_Apoptosis related protein	-1,824553112

**Tabella 9. Geni sovraespressi alle 72 ore**

Gene ID	72h pairMean (locBGC) diff
017I07_Teratocarcinoma-derived growth factor 1	5,915864
043J03_Gastric inhibitory polypeptide receptor	5,673691
021B23_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586B0220 (from clone DKFZp586B0220)	5,286231
004O11_PRO0659 protein	5,257502
055E11_Homo sapiens cDNA FLJ11517 fis, clone HEMBA1002337	4,856718
017C19_Fibrinogen, gamma polypeptide	4,84106
026F12_Ceruloplasmin (ferroxidase)	4,734198
050B17_Homo sapiens cDNA: FLJ22499 fis, clone HRC11250, highly similar to HSCATHH Human mRNA for cathepsin	4,64715
056C23_Homo sapiens cDNA FLJ30317 fis, clone BRACE2003594	4,517851
016E03_Deleted in azoospermia	4,470671
001O11_TAR (HIV) RNA binding protein 2	4,351651
041C20_Tomosyn	4,299885
054I17_Homo sapiens cDNA FLJ14930 fis, clone PLACE1009335	4,256312
048N24_Hypothetical protein	4,215486
029F08_Human BRCA2 region, mRNA sequence CG029	4,157488
044K08_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp761G18121 (from clone DKFZp761G18121);	4,143573
003D11_Solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4	4,124452
026L02_Homo sapiens cDNA FLJ11990 fis, clone HEMBB1001410	3,94915
052C23_Homo sapiens, clone IMAGE:4290737, mRNA, partial cds	3,926441
012E11_Receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	3,677465
007K24_Chromosome 14 open reading frame 1	3,600923
012J21_Growth differentiation factor 8	3,578423
005H23_Nitrogen fixation cluster-like	3,453205
052N09_Homo sapiens, clone MGC:17501 IMAGE:3454038, mRNA, complete cds	3,396677
024E22_Spinocerebellar ataxia 8	3,39245
036M24_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434N074 (from clone DKFZp434N074)	3,355017
046N18_PRO1600 protein	3,324011
055F19_Homo sapiens cDNA FLJ31239 fis, clone KIDNE2004879	3,317323
005O08_Serine hydroxymethyltransferase 1 (soluble)	3,303544

001P21_Gastric inhibitory polypeptide	3,247066
022D11_KIAA0914 gene product	3,205246
017G05_Small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20	3,199261
019B19_Latent transforming growth factor beta binding protein 4	3,002959
040D24_Hypothetical protein FLJ21162	2,998375
006A08_C-fos induced growth factor (vascular endothelial growth factor D)	2,947626
024A04_Homo sapiens cDNA FLJ14364 fis, clone HEMBA1000918	2,891047
049J11_Homo sapiens cDNA: FLJ21618 fis, clone COL07487	2,886386
002A19_Histidine-rich glycoprotein	2,867957
018J01_Sialoporphin (gpL115, leukosialin, CD43)	2,805231
044G06_ATPase, (Na+)/K+ transporting, beta 4 polypeptide	2,791938
015B22_Homo sapiens, clone IMAGE:3621749, mRNA, partial cds	2,767368
006O10_Tumor endothelial marker 6	2,766822
028P24_Protein kinase, lysine deficient 3	2,748718
003D22_KIAA0456 protein	2,746611
010K12_DKFZP564D206 protein	2,741738
055E10_Homo sapiens cDNA FLJ33121 fis, clone TRACH2001416	2,72612
010E10_Chromodomain helicase DNA binding protein 3	2,68517
039K15_Nephrosis 2, idiopathic, steroid-resistant (podocin)	2,675721
053L18_Human autonomous replicating sequence H1 (ARSH1)	2,673517
049A07_Homo sapiens clone R2 ErbB-3 R2 (c-erbB-3) mRNA, partial cds	2,629535
036C24_Homo sapiens cDNA FLJ31159 fis, clone KIDNE1000012	2,626361
036K08_Cerebral protein-4	2,60108
034N12_Casein kinase 1, gamma 3	2,586561
038I03_Thymic stromal co-transporter	2,573826
010N12_TAF5-like RNA polymerase II, p300/CBP-associated factor (PCAF)-associated factor	2,536696
002B22_Endothelin 1	2,490006
023H24_POU domain, class 3, transcription factor 2	2,441458
048M12_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564C163 (from clone DKFZp564C163)	2,431683
050E14_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667M085 (from clone DKFZp667M085)	2,388689
011A04_ATPase, Class VI, type 11A	2,387738

**Tabella 10. Geni sottoespressi alle 72 ore**

Gene ID	72h pairMean (locBGC) difference
031M06_Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2 (UBC4/5 homolog, yeast)	-3,4797
022E08_Amphiphysin (Stiff-Mann syndrome with breast cancer 128kD autoantigen)	-3,32172
012O01_Chromosome 20 open reading frame 59	-3,0885
012B24_Transcription factor similar to D. melanogaster homeodomain protein lady bird late	-2,96164
011H03_Hypothetical protein FLJ11082	-2,89332
048O05_Homo sapiens cDNA FLJ11465 fis, clone HEMBA1001636	-2,84383
008C03_Phosphatidylserine-specific phospholipase A1alpha	-2,73782
014N04_Brain-derived neurotrophic factor	-2,72967
011M22_Coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	-2,68014
011J23_Homo sapiens cDNA FLJ30257 fis, clone BRACE2002467	-2,67137
004P02_Hypothetical protein FLJ22316	-2,64339
020L08_Zinc finger protein 135 (clone pHZ-17)	-2,53319
034F04_RAD54, S. cerevisiae, homolog of, B	-2,52432
056D13_KIAA1255 protein	-2,52176
024J05_Homo sapiens cDNA FLJ14019 fis, clone HEMBA1002503	-2,50773
009L04_Kruppel-like factor 12	-2,50193
035A13_Homo sapiens cDNA FLJ30885 fis, clone FEBRA2004987	-2,50018

006K16_Calsyntenin-2	-2,4692
009L03_Multiple endocrine neoplasia I	-2,4142
026E18_GAJ protein	-2,34809
008F05_Hypothetical protein FLJ13646	-2,33896
009O09_Homo sapiens clone IMAGE:32106, mRNA sequence	-2,32705
048M14_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564D123 (from clone DKFZp564D123)	-2,32575
056O09_Homo sapiens cDNA FLJ32291 fis, clone PROST2000572	-2,30195
012J03_Chromosome 21 open reading frame 7	-2,29339
004N20_KIAA0614 protein	-2,26826
028C21_Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 3	-2,26543
004A06_HSPC142 protein	-2,25482
023L01_Homo sapiens clone case06H1 immunoglobulin heavy chain variable region gene, partial cds	-2,24265
040N05_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586N2224 (from clone DKFZp586N2224)	-2,22073
016G13_Transcription factor (SMIF gene)	-2,17162
006K04_STE20-like kinase	-2,16211
043H13_Mab-21-like 2 (C. elegans)	-2,15057

**Tabella 11.** Elenco dei geni significativamente sovra- e sottoespressi in tutti gli istanti temporali dell'esperimento.

Gene ID	1-8h pairMean (locBGC) difference	2-24h pairMean (locBGC) difference	3-72h pairMean (locBGC) difference
029A19_Leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 2	1,177653	1,913838	1,046939
030D12_Homo sapiens cDNA FLJ25471 fis, clone TST09553	1,080001	1,012625	1,014084
042F06_Diacylglycerol kinase, iota	1,189188	1,390767	1,23608
048L15_Homo sapiens cDNA FLJ25090 fis, clone CBL08887	1,176113	1,542734	1,983445
049F09_Homo sapiens cDNA: FLJ21436 fis, clone COL04279	1,073779	1,58439	1,72675
050H17_Homo sapiens, clone IMAGE:3856736, mRNA	1,036317	1,075861	1,606251
050J05_Homo sapiens PRO1412 mRNA, complete cds	1,584364	1,474318	1,355461
019I21_E74-like factor 2 (ets domain transcription factor)	1,108666	1,106253	1,546207
021B23_Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586B0220	1,399603	1,279668	3,186612
021H15_Tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	1,317365	1,633113	1,164527
026F12_Ceruloplasmin (ferroxidase)	1,058329	2,371267	4,260957
039G10_Zinc finger protein 230	1,132004	1,126265	1,012714
046N18_PRO1600 protein	1,015433	1,019503	2,426784
048N24_Hypothetical protein	1,110506	1,318737	4,218218

Gene ID	1-8h pairMean (locBGC) difference	2-24h pairMean (locBGC) difference	3-72h pairMean (locBGC) difference
011M22_Coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	-1,1072	-1,84693	-1,49458



## 7.6.2 Analisi temporale del profilo di espressione genica di cellule NCI-H295R dopo infezione da HCMV AD169

La Tabella 12 riassume il numero di geni sovra- e sottoespressi, mentre le tabelle 13-18 contengono la lista di geni con repliche concordi nei rispettivi istanti temporali, suddivisi tra sovraespressi e sottoespressi con una soglia di  $\pm 0.95$ .

**Tabella 12.** Numero di geni significativamente sovra- e sottoespressi nei vari istanti temporali.

Istante	Sovraespressi	Sottoespressi	Totale concordi
8 ore	40	425	7965
24 ore	100	57	7935
72 ore	49	61	10125

**Tabella 13.** Geni sovraespressi alle 8 ore

Gene	Function	GB_accession	8 h	24 h	72 h
Human glucocorticoid receptor alpha mRNA	Nuclear steroid hormone receptor (transcription factor)	U25029	<b>1,193</b>	<b>1,415</b>	-0,674
Twist homolog (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome)	Basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors, which enhances tumor cell invasion and chromosomal instability	NM_000474	<b>0,963</b>	<b>1,253</b>	0,780
Hypothetical protein FLJ20125	unknown	NM_017676	<b>0,968</b>	0,608	0,597
Chromosome 18 open reading frame 2	unknown	NM_031416	<b>0,973</b>	0,410	0,186
RAB11A	It belongs to the small GTPase superfamily, Rab family. It is associated with both constitutive and regulated secretory pathways, and may be involved in protein transport.	NM_004663	<b>1,0896</b>	0,351	-0,204
Endomucin-2	EMCN is a mucin-like sialoglycoprotein that interferes with the assembly of focal adhesion complexes and inhibits interaction between cells and the extracellular matrix	NM_016242	<b>0,975</b>	0,535	-0,251

I geni sovraespressi sono evidenziati in grassetto.

**Tabella 14.** Geni sottoespressi alle 8 ore

Gene	Function	GB_accession	8 h	24 h	72 h
Chloride channel 4	Voltage-dependent chloride channel	NM_001830	<b>-0,971</b>	0,587	0,583
Homo sapiens, Similar to zinc finger protein 254, clone MGC:10544 IM	DNA binding	BC006408	<b>-1,364</b>	0,545	-0,355
Epimorphin	Targeting and fusion of intracellular transport vesicles. Regulation of epithelial-mesenchymal interactions and epithelial cell morphogenesis and activation	NM_001980	<b>-1,249</b>	-0,392	-0,309
Homo sapiens cDNA FLJ32541 fis	unknown	AK057103	<b>-0,961</b>	-0,270	-0,092
Homo sapiens, Similar to RIKEN cDNA 0610020I02 gene	unknown	BC015649	<b>-0,963</b>	-0,442	0,313

Homo sapiens cDNA FLJ12273 fis MORF-related gene 15	unknown	AK022335	<b>-1,023</b>	-0,247	0,164
Homo sapiens, clone IMAGE:4096427	Regulation of cell growth, transcription, chromatin modification	NM_006791	<b>-0,974</b>	0,843	0,333
Transcription factor A	unknown	BC016820	<b>-1,037</b>	0,300	-0,107
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586L111 (from clone DKFZp586L111)	Transcription factor, anti- apoptosis, cell proliferation	NM_003201	<b>-1,624</b>	0,433	0,490
Translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast)	unknown	AL080233	<b>-1,178</b>	-0,564	0,184
KIAA0189 gene product	Intracellular protein transport, protein targeting to mitochondrion	NM_006327	<b>-1,384</b>	0,553	-0,506
Surfeit 1	GTPase activator activity, signal transduction	NM_014725	<b>-1,163</b>	0,752	-0,258
Stromal antigen 2	Inner mitochondrial membrane protein involved in the biogenesis of the cytochrome c oxidase complex	NM_003172	<b>-0,978</b>	0,019	-0,067
Isoleucine-tRNA synthetase	Cell cycle and cell division	NM_006603	<b>-1,037</b>	0,397	-0,239
Protein tyrosine phosphatase	Protein biosynthesis	NM_013417	<b>-1,098</b>	-0,167	-0,154
C3HC4-like zinc finger protein	Receptor activity, cell communication	AB020704	<b>-1,665</b>	0,226	-0,566
NSL1, MIND kinetochore complex component	Testis specific transcription factor during spermatogenesis	NM_016422	<b>-1,213</b>	-0,298	-0,076
Family with sequence similarity 38, member A	Protein with two coiled-coil domains that localizes to kinetochores, which are chromosome-associated structures that attach to microtubules and mediate chromosome movements during cell division.	NM_015471	<b>-1,118</b>	0,757	0,561
Zinc finger protein 289	Membrane protein	NM_014745	<b>-1,211</b>	0,751	0,533
ARMCX5, armadillo repeat containing, X-linked 5	Gene regulation	NM_032389	<b>-1,270</b>	0,254	-0,899
Homo sapiens cDNA FLJ32494 fis	Binding	NM_022838	<b>-1,265</b>	0,478	0,227
Homo sapiens cDNA FLJ12338 fis	Unknown	AK057056	<b>-1,039</b>	-0,123	0,347
Homo sapiens cDNA FLJ11487 fis	Unknown	AK022400	<b>-1,099</b>	-0,570	-0,049
Homo sapiens cDNA: FLJ20910 fis	Unknown	AK021549	<b>-2,697</b>	<b>1,167</b>	0,480
Heat shock 70kD protein 8	Unknown	AK024563	<b>-1,006</b>	0,076	0,068
Hypothetical protein MGC5469	Hsc70 associates with unliganded steroid hormone receptors, and thereby deters receptors from recruiting transcriptional coregulators, presumably as a component of chaperone complexes.	NM_006597	<b>-1,354</b>	-0,332	-0,077
Secretory pathway component Sec31B-1	RNA binding, processing and transport	NM_032361	<b>-1,161</b>	-0,318	-0,261
Phosphoinositol 4-phosphate adaptor protein-2	Unknown	NM_015490	<b>-1,149</b>	<b>1,012</b>	0,326
Homo sapiens cDNA FLJ30228 fis mannosidase, endo-alpha-like	It controls generation of constitutive post-Golgi carriers	NM_032639	<b>-1,043</b>	-0,070	0,082
Procollagen-proline	Unknown	AK054790	<b>-1,348</b>	-0,568	-0,351
Kelch motif containing protein	Enzyme	AK055996	<b>-1,068</b>	0,459	-0,233
Homo sapiens cDNA FLJ11681 fis	Electron carrier activity	NM_000918	<b>-1,175</b>	-0,286	-0,077
RAN binding protein 10	Cytoskeleton organization and biogenesis	NM_014458	<b>-1,036</b>	0,167	-0,209
Dual specificity phosphatase 8	Unknown	AK021743	<b>-1,665</b>	-0,419	0,316
	Member RAS oncogene family	AB040897	<b>-2,081</b>	0,838	-0,107
	Inactivation of MAPK activity. Member of the dual specificity protein phosphatase subfamily, that inactivate their target kinases by dephosphorylating both the phosphoserine/threonine and phosphotyrosine residues. They negatively regulate members of the	NM_004420	<b>-1,115</b>	<b>-1,028</b>	<b>-1,005</b>

mitogen-activated protein (MAP) kinase superfamily (MAPK/ERK, SAPK/JNK, p38), which is associated with cellular proliferation and differentiation. Different members of the family of dual specificity phosphatases show distinct substrate specificities for various MAP kinases, different tissue distribution and subcellular localization, and different modes of inducibility of their expression by extracellular stimuli. This gene product inactivates SAPK/JNK and p38, is expressed predominantly in the adult brain, heart, and skeletal muscle, is localized in the cytoplasm, and is induced by nerve growth factor and insulin. An intronless pseudogene for DUSP8 is present on chromosome 10q11.2.

I geni sottoespressi (o sovraespressi) sono evidenziati in grassetto.

**Tabella 15. Geni sovraespressi alle 24 ore**

Gene	Function	GB_accession	8 h	24 h	72 h
Defensin, beta 121	Positive regulation of biosynthesis of antibacterial peptides active against anti-Gram-positive bacteria	AI476463	0,669	<b>0,995</b>	-0,441
Homo sapiens clone 23637 mRNA sequence	Unknown	AF035297	-0,293	<b>1,065</b>	0,169
KIAA0232 gene product	ATP binding	D86985	0,606	<b>1,269</b>	-0,373
Hypothetical protein FLJ22404	Unknown	NM_025043	0,352	<b>1,789</b>	<b>0,990</b>
Human glucocorticoid receptor alpha mRNA	Nuclear steroid hormone receptor (transcription factor)	U25029	<b>1,193</b>	<b>1,415</b>	-0,674
Transmembrane protein 113	Unknown	NM_025222	-0,502	<b>1,024</b>	0,377
Elastase 2	Elastase 2 hydrolyzes proteins within specialized neutrophil lysosomes, called azurophil granules, as well as proteins of the extracellular matrix following the protein's release from activated neutrophils. Elastase 2 may play a role in degenerative and inflammatory diseases by its proteolysis of collagen-IV and elastin of the extracellular matrix.	NM_001972	0,396	<b>0,978</b>	0,494
Twist homolog (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (Drosophila)	Basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors, which enhances tumor cell invasion and chromosomal instability	NM_000474	<b>0,963</b>	<b>1,253</b>	0,780
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564P116 (from clone DKFZp564P116)	Unknown	AL049338	-0,796	<b>1,006</b>	0,578
Homo sapiens cDNA: FLJ23149 fis	Unknown	AK026802	0,334	<b>1,063</b>	0,803
Nucleolar autoantigen (55kD) similar to rat synaptonemal complex protein	During mitosis it is associated with chromosomes.	NM_006455	0,492	<b>1,322</b>	0,226
H.sapiens mRNA for IgG lambda light chain V-J-C region (clone Tg19)	Unknown	BG398014	0,423	<b>1,166</b>	0,366
Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter)	Hydrogen/sugar symporter activity	NM_012434	0,687	<b>0,952</b>	-0,173
Hypothetical protein FLJ21625	Unknown	NM_025039	0,290	<b>1,222</b>	0,448
Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586M0723 (from clone DKFZp586M0723)	Unknown	AL050227	0,118	<b>1,051</b>	-0,127
Homo sapiens, clone IMAGE:4153246	Unknown	BC008134	0,419	<b>1,518</b>	0,404
Glutamate receptor interacting protein 1	Nuclear receptor interaction	AJ133439	0,585	<b>1,079</b>	-0,085

BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 3-like	Member of the BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein (BNIP) family. It interacts with the E1B 19 kDa protein which is responsible for the protection of virally-induced cell death, as well as E1B 19 kDa-like sequences of BCL2, also an apoptotic protector. Functional homolog of BNIP3, a proapoptotic protein, which may function simultaneously with BNIP3 and may play a role in tumor suppression.	AL132665	0,251	<b>1,074</b>	0,490
Homo sapiens cDNA: FLJ21271 fis	Unknown	AK024924	-0,469	<b>1,020</b>	-0,505
TAF6-like RNA polymerase II	Initiation of transcription by RNA polymerase II. Component of TFIID. TAFs may participate in basal transcription, serve as coactivators, function in promoter recognition or modify general transcription factors to facilitate complex assembly and transcription initiation. This protein is a component of the PCAF histone acetylase complex and structurally similar to one of the histone-like TAFs, TAF6. The PCAF histone acetylase complex, which is composed of more than 20 polypeptides some of which are TAFs, is required for myogenic transcription and differentiation.	NM_006473	-0,352	<b>0,989</b>	0,489
Homo sapiens cDNA FLJ31085 fis	Unknown	AK055647	-0,497	<b>1,251</b>	0,284
Transaldolase 1	Transaldolase 1 is a key enzyme of the nonoxidative pentose phosphate pathway providing ribose-5-phosphate for nucleic acid synthesis and NADPH for lipid biosynthesis. This pathway can also maintain glutathione at a reduced state and thus protect sulfhydryl groups and cellular integrity from oxygen radicals. This gene is thought to be involved in multiple sclerosis	NM_006755	0,912	<b>1,650</b>	0,242
Homo sapiens cDNA: FLJ21198 fis	Unknown	AK024851	0,466	<b>0,991</b>	-0,827
Homo sapiens cDNA FLJ11487 fis	Unknown	AK021549	<b>-2,697</b>	<b>1,167</b>	0,480
Glucokinase (hexokinase 4) regulatory protein	Protein belonging to the GCKR subfamily of the SIS (Sugar ISomerase) family of proteins. Regulatory protein that inhibits glucokinase in liver and pancreatic islet cells by binding non-covalently to form an inactive complex with the enzyme. This gene is considered a susceptibility gene candidate for a form of maturity-onset diabetes of the young (MODY).	NM_001486	0,711	<b>1,243</b>	0,343
Secretory pathway component Sec31B-1	Mediates vesicular traffic from the endoplasmic reticulum.	NM_015490	<b>-1,149</b>	<b>1,012</b>	0,326
hypothetical gene supported by BC010426	Unknown	BC010426	0,793	<b>1,490</b>	0,555
Ribosomal protein S6 kinase	Cell proliferation	NM_004755	0,483	<b>1,138</b>	0,397
Chromosome 20 open reading frame 129	Unknown	AK055793	0,767	<b>1,064</b>	0,460
DC11 protein	Gluconeogenesis	NM_020186	0,616	<b>1,044</b>	0,542
Signal sequence receptor (SSR)	Glycosylated endoplasmic reticulum (ER) membrane receptor associated with protein	NM_007107	0,599	<b>1,119</b>	0,495

translocation across the ER membrane. Cotranslational protein targeting to membrane.

I geni sovraespressi (o sottoespressi) sono evidenziati in grassetto.

**Tabella 16. Geni sottoespressi alle 24 ore.**

Gene	Function	GB_accession	8 h	24 h	72 h
Solute carrier family 20 (phosphate transporter)	Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	NM_005415	-0,235	<b>-1,175</b>	-0,298
Homo sapiens, clone IMAGE:3915000	Unknown	BC016973	0,170	<b>-1,077</b>	-0,528
Phosphatidic acid phosphatase type 2A	Negative regulation of cell proliferation. Member of the phosphatidic acid phosphatase family, that convert phosphatidic acid to diacylglycerol, and function in <i>de novo</i> synthesis of glycerolipids as well as in receptor-activated signal transduction mediated by phospholipase D. Integral membrane glycoprotein with an active role in the hydrolysis and uptake of lipids from extracellular space. The expression of this gene is found to be regulated by androgen in a prostatic adenocarcinoma cell line.	NM_003711	-0,409	<b>-1,292</b>	-0,181
KIAA0222 gene product	Unknown	NM_014643	-0,388	<b>-1,077</b>	0,040
Hypothetical protein FLJ00028	Unknown	AK024438	-0,290	<b>-0,951</b>	0,608
E2F transcription factor 7	Essential role in the regulation of cell cycle progression	BC016658	-0,233	<b>-0,991</b>	0,391
Homo sapiens cDNA FLJ20350 fis	Unknown	AK000357	-0,587	<b>-1,028</b>	-0,040
Staufen	Member of the family of dsRNA-binding proteins involved in the transport and/or localization of mRNAs to different subcellular compartments and/or organelles. It is present in the cytoplasm in association with the rough endoplasmic reticulum (RER), implicating this protein in the transport of mRNA via the microtubule network to the RER, the site of translation.	NM_017453	-0,318	<b>-1,009</b>	-0,164
Integrin, alpha 7	ITGA7 encodes integrin alpha chain 7. Integrins are heterodimeric integral membrane proteins composed of an alpha chain and a beta chain. Alpha chain 7 undergoes post-translational cleavage within the extracellular domain to yield disulfide-linked light and heavy chains that join with beta 1 to form an integrin that binds to the extracellular matrix protein laminin-1. Alpha 7 beta 1 is the major integrin complex expressed in differentiated muscle cells.	NM_002206	-0,626	<b>-1,090</b>	-0,511
CGI-100 protein	ER-Golgi intermediate compartment, transport	BC016556	-0,361	<b>-1,089</b>	0,761 416
activating transcription factor 7 interacting protein	Transcription factor	AK025060	-0,199	<b>-0,963</b>	-0,391
Homo sapiens cDNA FLJ14370 fis	Unknown	AK027276	-0,139	<b>-1,086</b>	0,487
Dual specificity phosphatase 8	Inactivation of MAPK activity.	NM_004420	<b>-1,115</b>	<b>-1,028</b>	<b>-1,005</b>

I geni sottoespressi sono evidenziati in grassetto.

**Tabella 17. Geni sovraespressi alle 72 ore**

Gene	Function	GB_accession	8 h	24 h	72 h
ProSAPiP1 protein	Proline rich synapse associated protein interacting protein 1	NM_014731	-0,264	0,325	<b>0,968</b>
Hypothetical protein FLJ22404	Unknown	NM_025043	0,352	<b>1,789</b>	<b>0,990</b>
Putative tumor suppressor	Cytochrome b-561 domain containing 2	NM_007022	0,162	0,747	<b>1,073</b>
CLLL7 protein	Regulator of chromosome condensation (RCC1) and BTB (POZ) domain containing protein 1. This gene encodes a protein with an N-terminal RCC1 domain and a C-terminal BTB (broad complex, tramtrack and bric-a-brac) domain. In rat, over-expression of this gene in vascular smooth muscle cells induced cellular hypertrophy. In rat, the C-terminus of RCBTB1 interacts with the angiotensin II receptor-1A. In humans, this gene maps to a region of chromosome 13q that is frequently deleted in B-cell chronic lymphocytic leukemia and other lymphoid malignancies.	AF334406	-0,275	-0,586	<b>1,554</b>

I geni sovraespressi sono evidenziati in grassetto.

**Tabella 18. Geni sottoespressi alle 72 ore.**

Gene	Function	GB_accession	8 h	24 h	72 h
H-l(3)mbl-like protein	Transcription corepressor activity	NM_031488	-0,055	-0,071	<b>-1,106</b>
NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3	One of at least forty-one subunits that make up the NADH-ubiquinone oxidoreductase complex. This complex is part of the mitochondrial respiratory chain and serves to catalyze the rotenone-sensitive oxidation of NADH and the reduction of ubiquinone. The encoded protein is one of three proteins found in the flavoprotein fraction of the complex.	NM_021075	0,434	0,293	<b>-1,110</b>
Paraoxonase 2	Member of the paraoxonase gene family. Ubiquitously expressed in human tissues, membrane-bound, and it may act as a cellular antioxidant, protecting cells from oxidative stress. Hydrolytic activity against acylhomoserine lactones, important bacterial quorum-sensing mediators, suggests the encoded protein may also play a role in defense responses to pathogenic bacteria.	NM_000305	-0,118	-0,777	<b>-1,213</b>
Bactericidal/permeability-increasing protein	Lipopolysaccharide binding protein	NM_001725	-0,570	0,488	<b>-1,040</b>
Solute carrier family 41, member 2	Cation transporter activity	NM_032148	-0,163	-0,398	<b>-1,234</b>
Homo sapiens cDNA: FLJ23601 fis	Unknown	AK027254	0,152	-0,188	<b>-1,176</b>
Homo sapiens clone 24626 mRNA sequence	Unknown	AF052141	-0,168	-0,305	<b>-1,173</b>
Vasohibin 1	Angiogenesis inhibitor	NM_014909	0,344	-0,835	<b>-1,218</b>
Homo sapiens cDNA FLJ20794 fis	Unknown	AK000801	0,476	0,578	<b>-1,196</b>
Dual specificity phosphatase 8	Inactivation of MAPK activity.	NM_004420	<b>-1,115</b>	<b>-1,028</b>	<b>-1,005</b>

I geni sottoespressi sono evidenziati in grassetto.

Un totale di 242 geni aveva un valore di espressione positivo in tutti gli istanti temporali ed in tutte le repliche, mentre 269 geni avevano un valore di espressione negativo in tutti gli istanti temporali ed in tutte le repliche. Da questi geni, sono stati estratti i geni sovraespressi e sottoespressi con soglia - 0.95 (Tabelle 19-24).

**Tabella 19. Geni sovraespressi alle 8 ore**

Gene	GB_accession	8 h	24 h	72 h
Twist homolog (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) ( <i>Drosophila</i> )	NM_000474	<b>0,963</b>	<b>1,253</b>	0,780
Hypothetical protein FLJ20125	NM_017676	<b>0,969</b>	0,608	0,597
Chromosome 18 open reading frame 2	NM_031416	<b>0,974</b>	0,410	0,187

I geni sovraespressi sono evidenziati in grassetto.

**Tabella 20. Geni sovraespressi alle 24 ore**

Gene	GB_accession	8 h	24 h	72 h
Hypothetical protein FLJ22404	NM_025043	0,352	<b>1,789</b>	<b>0,990</b>
Elastase 2	NM_001972	0,396	<b>0,979</b>	0,495
Twist homolog (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome)	NM_000474	<b>0,963</b>	<b>1,254</b>	0,781
Homo sapiens cDNA: FLJ23149 fis	AK026802	0,335	<b>1,064</b>	0,803
Nucleolar autoantigen (55kD) similar to rat synaptonemal complex protein	NM_006455	0,493	<b>1,322</b>	0,226
H.sapiens mRNA for IgG lambda light chain V-J-C region	BG398014	0,424	<b>1,166</b>	0,366
Hypothetical protein FLJ21625	NM_025039	0,290	<b>1,222</b>	0,448
Homo sapiens, clone IMAGE:4153246	BC008134	0,419	<b>1,519</b>	0,404
BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 3-like	AL132665	0,252	<b>1,074</b>	0,490
Transaldolase 1	NM_006755	0,912	<b>1,650</b>	0,243
Glucokinase (hexokinase 4) regulatory protein	NM_001486	0,712	<b>1,244</b>	0,343
Homo sapiens, clone MGC:15478 IMAGE:2967661	BC010426	0,793	<b>1,490</b>	0,555
Ribosomal protein S6 kinase	NM_004755	0,483	<b>1,139</b>	0,397
Chromosome 20 open reading frame 129	AK055793	0,767	<b>1,064</b>	0,460
DC11 protein	NM_020186	0,616	<b>1,045</b>	0,542
Signal sequence receptor	NM_007107	0,599	<b>1,119</b>	0,495

I geni sovraespressi sono evidenziati in grassetto.

**Tabella 21. Geni sovraespressi alle 72 ore**

Gene	GB_accession	8 h	24 h	72 h
Hypothetical protein FLJ22404	NM_025043	0,352	<b>1,789</b>	<b>0,990</b>
Putative tumor suppressor	NM_007022	0,162	0,747	<b>1,073</b>

I geni sovraespressi sono evidenziati in grassetto.

**Tabella 22. Geni sottoespressi alle 8 ore**

Gene	GB_accession	8 h	24 h	72 h
Epimorphin	NM_001980	<b>-1,249</b>	-0,391	-0,308
Homo sapiens cDNA FLJ32541 fis	AK057103	<b>-0,962</b>	-0,269	-0,091
Isoleucine-tRNA synthetase	NM_013417	<b>-1,098</b>	-0,166	-0,154
C3HC4-like zinc finger protein	NM_016422	<b>-1,213</b>	-0,298	-0,076

Homo sapiens cDNA FLJ12338 fis	AK022400	<b>-1,099</b>	-0,570	-0,049
Heat shock 70kD protein 8	NM_006597	<b>-1,354</b>	-0,332	-0,078
Hypothetical protein MGC5469	NM_032361	<b>-1,161</b>	-0,318	-0,261
Homo sapiens cDNA FLJ30228 fis	AK054790	<b>-1,348</b>	-0,568	-0,351
Procollagen-proline	NM_000918	<b>-1,175</b>	-0,287	-0,078
Dual specificity phosphatase 8	NM_004420	<b>-1,116</b>	<b>-1,028</b>	<b>-1,005</b>

I geni sottoespressi sono evidenziati in grassetto.

**Tabella 23. Geni sottoespressi alle 24 ore**

Gene	GB_accession	8 h	24 h	72 h
Solute carrier family 20 (phosphate transporter)	NM_005415	-0,235	<b>-1,175</b>	-0,298
Phosphatidic acid phosphatase type 2A	NM_003711	-0,409	<b>-1,292</b>	-0,182
Homo sapiens cDNA FLJ20350 fis	AK000357	-0,587	<b>-1,029</b>	-0,040
Staufen	NM_017453	-0,318	<b>-1,009</b>	-0,164
Integrin	NM_002206	-0,626	<b>-1,090</b>	-0,511
Hypothetical protein FLJ10688	AK025060	-0,199	<b>-0,964</b>	-0,392
Dual specificity phosphatase 8	NM_004420	<b>-1,115</b>	<b>-1,028</b>	<b>-1,005</b>

I geni sottoespressi sono evidenziati in grassetto.

**Tabella 24. Geni sottoespressi alle 72 ore**

Gene	GB_accession	8 h	24 h	72 h
H-1(3)mbt-like protein	NM_031488	-0,056	-0,072	<b>-1,107</b>
Paraoxonase 2	NM_000305	-0,118	-0,777	<b>-1,213</b>
Hypothetical protein DKFZp434K0427	NM_032148	-0,163	-0,398	<b>-1,234</b>
Homo sapiens clone 24626 mRNA sequence	AF052141	-0,168	-0,306	<b>-1,174</b>
Dual specificity phosphatase 8	NM_004420	<b>-1,116</b>	<b>-1,028</b>	<b>-1,005</b>

I geni sottoespressi sono evidenziati in grassetto.

Per trovare i geni differenzialmente espressi è stato applicato il pacchetto timecourse di R, sui 1411 geni concordi. Nella Tabella 25 è presente una lista dei primi 50 geni ordinati secondo la statistica utilizzata.

**Tabella 25. Elenco dei geni significativamente modulati, secondo l'analisi temporale dei dati.**

GB_accession	Name	8 h	24 h	72 h
NM_014725	KIAA0189 gene product	<b>-1,163</b>	0,752	-0,258
BC006408	Homo sapiens, Similar to zinc finger protein 254, clone MGC:10544 IM	<b>-1,364</b>	0,545	-0,354
AK024924	Homo sapiens cDNA: FLJ21271 fis	-0,469	<b>1,020</b>	-0,505
AL049338	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564P116 (from clone DKFZp564P116)	-0,796	<b>1,007</b>	0,578
NM_006791	MORF-related gene 15	<b>-0,975</b>	0,843	0,333
NM_021075	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3 (10kD)	0,435	0,293	<b>-1,110</b>
BC016556	CGI-100 protein	-0,362	<b>-1,089</b>	0,761
AK024438	Hypothetical protein FLJ00028	-0,291	<b>-0,952</b>	0,608
U25029	Human glucocorticoid receptor alpha mRNA	<b>1,193</b>	<b>1,415</b>	-0,674
AK024951	Complement component 1	-0,907	0,786	0,313
BC001077	Hypothetical protein BC004360	-0,151	-0,682	0,803
NM_032389	Zinc finger protein 289	<b>-1,271</b>	0,254	-0,810

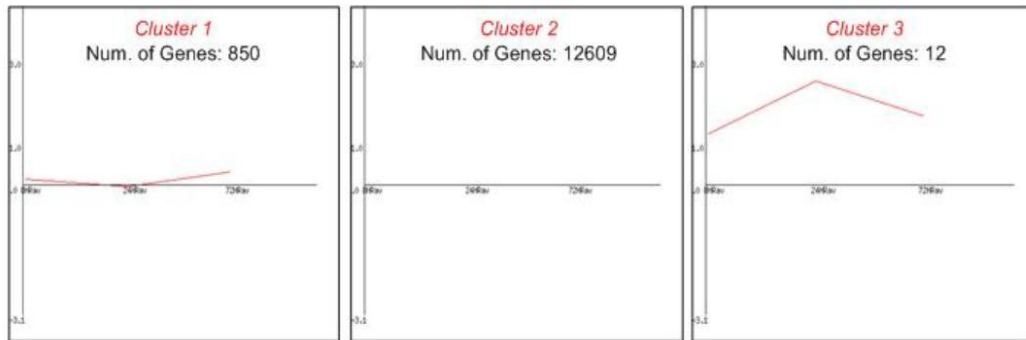


AK024851	Homo sapiens cDNA: FLJ21198 fis	0,466	<b>0,992</b>	-0,827
AI476463	Defensin, beta 121	0,669	<b>0,995</b>	-0,442
AK055996	Homo sapiens, Similar to hypothetical protein FLJ12838	<b>-1,069</b>	0,460	-0,234
AK022209	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex	-0,689	-0,411	0,702
BC016658	E2F transcription factor 7	-0,234	<b>-0,992</b>	0,392
D38435	Postmeiotic segregation increased 2-like 1	-0,221	-0,412	0,895
NM_000166	Gap junction protein	-0,320	-0,879	0,532
NM_004192	Acetylserotonin O-methyltransferase-like	-0,848	0,634	-0,072
BC014374	Homo sapiens, clone MGC:24308 IMAGE:3996998	-0,269	-0,645	0,656
AK021549	Homo sapiens cDNA FLJ11487 fis	<b>-2,697</b>	<b>1,168</b>	0,480
NM_052948	Sorting nexin 26	-0,101	-0,772	0,693
NM_021795	ELK4	0,214	0,742	-0,503
AL049342	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp566A193 (from clone DKFZp566A193)	0,235	0,626	-0,606
AL110223	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434M063 (from clone DKFZp434M063)	-0,947	0,492	0,172
NM_025235	Tankyrase	-0,589	-0,763	0,586
AL050227	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp586M0723 (from clone DKFZp586M0723)	0,118	<b>1,052</b>	-0,127
NM_006755	Transaldolase 1	0,913	<b>1,650</b>	0,243
NM_015490	Secretory pathway component Sec31B-1	<b>-1,150</b>	<b>1,012</b>	0,326
NM_024630	Hypothetical protein FLJ20984	0,424	0,710	-0,474
NM_020367	Chromosome 12 open reading frame 6	-0,472	0,501	-0,584
AK057650	Homo sapiens cDNA FLJ33088 fis	-0,728	0,582	0,230
NM_014315	Host cell factor homolog	0,322	0,203	-0,812
NM_004467	Fibrinogen-like 1	-0,433	-0,430	0,671
NM_024945	Hypothetical protein FLJ12888	-0,655	0,601	-0,194
AF334406	CLLL7 protein	-0,275	-0,587	<b>1,554</b>
AK000801	Homo sapiens cDNA FLJ20794 fis	0,476	0,579	<b>-1,197</b>
NM_025043	Hypothetical protein FLJ22404	0,352	<b>1,789</b>	<b>0,990</b>
NM_012123	CGI-02 protein	-0,301	-0,782	0,366
NM_012434	Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter)	0,688	<b>0,952</b>	-0,174
NM_025222	Hypothetical protein PRO2730	-0,503	<b>1,024</b>	0,378
NM_007209	Ribosomal protein L35	0,454	0,661	-0,512
NM_006327	Translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast)	<b>-1,385</b>	0,553	-0,506
NM_006603	Stromal antigen 2	<b>-1,037</b>	0,397	-0,239
NM_002224	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3	0,233	0,716	-0,625
AB020704	Protein tyrosine phosphatase	<b>-1,666</b>	0,226	-0,566
NM_002274	Keratin 13	0,432	0,506	-0,894
AK055647	Homo sapiens cDNA FLJ31085 fis	-0,497	<b>1,251</b>	0,285
NM_020196	HCNP protein; XPA-binding protein 2	0,579	0,276	-0,605

I geni sovraespressi e sottoespressi sono evidenziati in grassetto.

## 7.7 Effetto di HCMV sul profilo di espressione genica di cellule corticosurrenaliche: Analisi Bayesiana

I dati ottenuti dall'analisi statistica degli esperimenti con microarray sono stati confermati mediante real-time RT-PCR e sottoposti ad ulteriore analisi statistica. Tramite un'analisi di *clustering*, si sono ottenuti tre clusters di geni (Figura 39). Il cluster 3 risulta interessante perchè composto da 12 geni particolarmente up-regolati durante le prime ore d'infezione (Tabella 26).



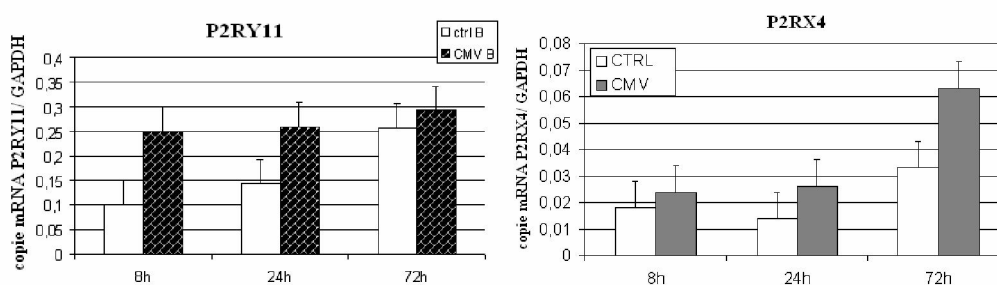
**Figura 39.** Grafici dei tre gruppi di geni ottenuti tramite analisi di clusters. Il cluster numero 3 è risultato interessante poiché costituito da geni particolarmente indotti durante le prime ore di infezione del time-course.

**Tabella 26.** Elenco dei geni appartenenti al cluster 3 particolarmente indotti durante le prime ore d'infezione.

Gene	Description	GB_accession
<b>P2RY11:</b> purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 11.	The product of this gene belongs to the family of G-protein coupled receptors. This family has several receptor subtypes with different pharmacological selectivity, which overlaps in some cases, for various adenosine and uridine nucleotides. This receptor is coupled to the stimulation of the phosphoinositide and adenylyl cyclase pathways and behaves as a selective purinoceptor.	BC009877
<b>P2RX4:</b> purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 4.	The product of this gene belongs to the family of purinoceptors for ATP. This receptor functions as a ligand-gated ion channel with high calcium permeability.	NM_002560
<b>CAMK1D:</b> calcium/calmodulin-dependent protein kinase ID.	This gene encodes a member of the Ca <sup>2+</sup> /calmodulin-dependent protein kinase 1 subfamily of serine/threonine kinases. The encoded protein may be involved in the regulation of granulocyte function through the chemokine signal transduction pathway.	NM_020397
<b>TACCI:</b> transforming, acidic coiled-coil containing protein 1.	The function of this gene has not yet been determined; however, it is speculated that it may represent a breast cancer candidate gene. It is located close to FGFR1 on a region of chromosome 8 that is amplified in some breast cancers.	NM_006283
<b>E2F1:</b> E2F transcription factor 1	The protein encoded by this gene is a member of the E2F family of transcription factors. The E2F family plays a crucial role in the control of cell cycle and action of tumor suppressor proteins and is also a target of the transforming proteins of small DNA tumor viruses. This protein binds preferentially to retinoblastoma protein pRB in a cell-cycle	NM_005225

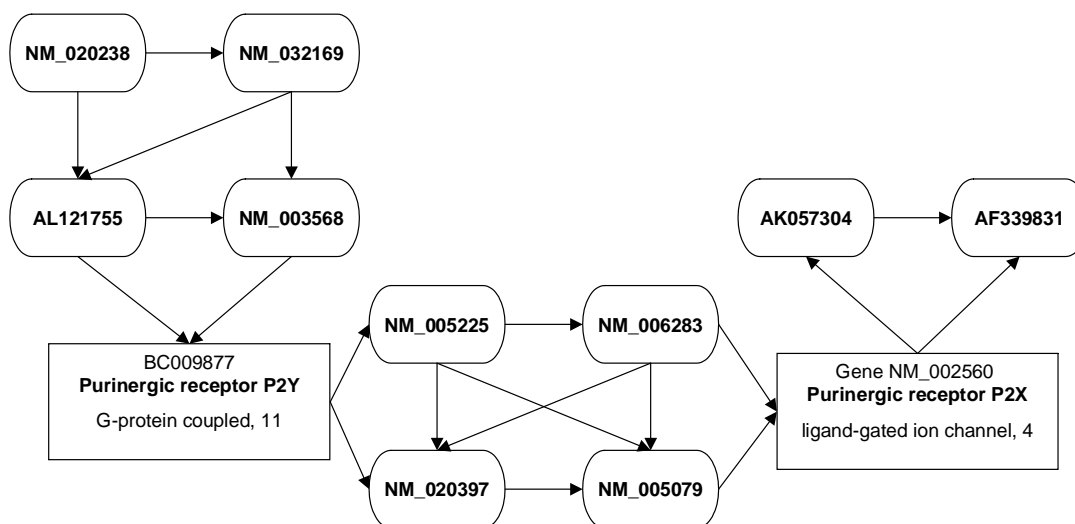
<b>ANXA9:</b> annexin A9	dependent manner. It can mediate both cell proliferation and p53-dependent/independent apoptosis. The annexins are a family of calcium-dependent phospholipid-binding proteins. Members of the annexin family contain 4 internal repeat domains, each of which includes a type II calcium-binding site. The calcium-binding sites are required for annexins to aggregate and cooperatively bind anionic phospholipids and extracellular matrix proteins.	NM_003568
<b>INCENP:</b> inner centromere protein antigens 135/155kDa	The inner centromere proteins (INCENPs), display a broad localization along chromosomes in the early stages of mitosis but gradually become concentrated at centromeres as the cell cycle progresses into mid-metaphase. During telophase, the proteins are located within the midbody in the intercellular bridge, where they are discarded after cytokinesis.	NM_020238
<b>PROKR2:</b> prokineticin receptor 2	Prokineticins are secreted proteins that can promote angiogenesis and induce strong gastrointestinal smooth muscle contraction. The protein encoded by this gene is an integral membrane protein and G protein-coupled receptor for prokineticins. The encoded protein is similar in sequence to GPR73, another G protein-coupled receptor for prokineticins.	AL121755
<b>TPD52:</b> tumor protein D52	Postate-specific and androgen-responsive gene of the tumor protein D52 family. TPD52 is the only known gene in this locus with prostate specificity. Tumor protein D52 represents a novel molecular marker in ovarian cancer, which is broadly expressed across the different histologic subtypes. TPD52 is bound to annexin VI in a Ca(2+)-dependent manner suggesting that these molecules may act in concert to regulate secretory processes in plasma cells.	NM_005079
<b>ACAD11:</b> acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 11; Also known as FLJ12592.	Catalysis of the reaction: acyl-CoA + acceptor = 2,3-dehydroacyl-CoA + reduced acceptor.	NM_032169
<b>FLJ32742:</b> hypothetical locus FLJ32742	Gene type unknown	AK057304
Clone IMAGE: 609924	Gene type unknown	AF339831

Per poter confermare l'andamento dei geni appartenenti a questo clusters, sono state effettuate delle validazioni in real-time PCR di alcuni di questi (esempi in Figura 40).



**Figura 40.** Grafici illustranti l'espressione dei trascritti dei geni P2Y11 e P2X4 misurata mediante real-time RT-PCR quantitativa in cellule NCI-H295R infettate con HCMV AD169 MOI 2 (HCMV) o non infettate (CTRL).

Per capire meglio il meccanismo di questo cluster e per saperne di più circa la struttura di dipendenza tra questi geni, è stata costruita una rete gaussiana Bayesiana (Figura 41).



**Figura 41.** Rete Bayesiana dei geni appartenenti al cluster 3, particolarmente up-regolati durante le prime ore d'infezione: i due geni rappresentati nei rettangoli corrispondono ai geni che fungono da "diga" nella modulazione di tutti gli altri geni.

## 8 DISCUSSIONE

I risultati di questo studio dimostrano che il surrene è una sede di infezione da parte di HCMV e che HCMV può essere presente in forma attiva nei tumori surrenalici, soprattutto in quelli funzionanti. I risultati di questo studio dimostrano inoltre, per la prima volta, che HCMV infetta e replica in cellule corticosurrenaliche umane *in vitro*. L'infezione di tali cellule da parte di HCMV stimola la produzione di cortisolo ed estradiolo, effetto mediato dalla replicazione virale e/o dall'espressione dei geni virali piuttosto che dalla mera interazione del virione con la cellula ospite. Il risultato dell'infezione virale a livello della produzione di cortisolo ed estradiolo, inoltre, sembra essere mediato da una significativa e persistente induzione dell'espressione di alcuni enzimi della steroidogenesi surrenalica, soprattutto *CYP11B1*, responsabile dell'ultima reazione di sintesi del cortisolo. Questa induzione potrebbe essere il risultato di un'azione diretta del virus sull'espressione degli enzimi della steroidogenesi o essere mediato dall'induzione dell'espressione di fattori trascrizionali (recettori nucleari orfani come SHP e DAX-1), di fattori che inducono la sintesi di cortisolo, come i recettori purinergici, o di citochine, come IL-6, i cui livelli nelle cellule corticosurrenaliche risultavano essere aumentati dall'infezione virale. Il trattamento con idrocortisone a dosi fisiologiche aumenta lievemente la replicazione di HCMV in fibroblasti e sembra aumentare il rilascio di particelle virali dalle cellule corticosurrenaliche infettate. L'infezione virale provoca, nelle cellule corticosurrenaliche, un effetto citopatico caratterizzato dalla presenza di cellule apoptotiche vacuolizzate. Meno evidente è l'effetto dell'infezione virale sul ciclo cellulare e sulla proliferazione cellulare. Infine, l'analisi temporale del profilo di espressione genica globale delle cellule corticosurrenaliche dopo infezione da HCMV dimostra l'induzione di geni coinvolti nelle vie di proliferazione cellulare, di invasione tumorale e di risposta immunitaria innata e reprime geni oncosoppressori, pro-apoptotici e codificanti chemochine.

Nella prima parte di questo studio si è voluto chiarire il ruolo dell'infezione da HCMV nella patologia surrenalica. Le sequenze genomiche del virus sono state ricercate in una casistica comprendente 127 tessuti surrenalici sia tumorali che sani. Risultano più coinvolti gli adenomi ipersecernenti corticosteroidi, nei quali elevati livelli di cortisolo potrebbero inibire localmente la risposta immunitaria, agevolando quindi la riattivazione virale. È interessante sottolineare inoltre come più del 40% dei campioni risultati positivi per il virus avesse una carica virale superiore a 160 copie genomiche di HCMV/10<sup>6</sup> cellule, tra cui un caso di adenoma secernente cortisolo con 12810 copie genomiche di HCMV/10<sup>6</sup>, associato ad un

forma grave di sindrome di Cushing, caratterizzata da livelli estremamente elevati di cortisolo plasmatico e refrattaria alla terapia medica. Si potrebbe ipotizzare quindi che il surrene rappresenti una riserva per HCMV e che la iper-secrezione di ormoni steroidei, come il cortisolo, possa riattivare il virus dalla latenza.

I risultati ottenuti da questa prima parte di studio *in vivo* ci hanno spinto ad affrontare la seconda parte di questo lavoro, ovvero lo studio degli effetti dell'infezione da HCMV sulle due linee di carcinoma corticosurrenalico SW13 e NCI-H295R. La dimostrazione che HCMV è in grado di replicare con una discreta efficienza in linee cellulari corticosurrenaliche umane e di infettare cellule corticosurrenaliche umane di colture primarie *in vitro* è rilevante, in quanto, l'efficiente propagazione di HCMV *in vitro* si è potuta fin'ora ottenere, qualche eccezione a parte, solo nei fibroblasti umani. Già nel 1979, però, Shanley e collaboratori avevano riscontrato che la linea cellulare Y-1, derivata da un adenocarcinoma surrenalico murino, è altamente permissiva all'infezione da HCMV (142); ma, per quanto riguarda la controparte umana, non è stato pubblicato fin'ora alcuno studio in letteratura.

Dopo infezione sia con isolati clinici che con il ceppo di laboratorio AD169, le cellule NCI-H295R, le SW13 e le colture primarie derivate da ACC si sono dimostrate permissive all'infezione virale, delineando un'infezione di tipo produttivo, come dimostrato dall'espressione di proteine sia precoci che tardive e dall'aumento nel tempo del numero di cellule infettate. Nelle cellule surrenaliche la cinetica di replicazione virale ha un andamento esponenziale, come si osserva nei fibroblasti MRC-5 e HFF, ma, a differenza dei fibroblasti, queste cellule mostravano una minor produzione virale ed una diminuzione del titolo virale dopo il quinto-settimo giorno di infezione.

Il dato più interessante, rilevato nello studio delle alterazioni fisiologiche associate all'infezione di HCMV, è l'incremento della secrezione di cortisolo e di  $17\beta$ -estradiolo, mentre la secrezione di aldosterone non risulta significativamente modificata rispetto al controllo e la produzione di DHEA-S risulta solo lievemente inibita. Tale effetto si è dimostrato essere dovuto alla replicazione virale o comunque alla espressione di geni virali, visto che il virus inattivato agli UV, e quindi non replicante, ha dimostrato di non avere lo stesso effetto sulla secrezione ormonale, e si è comportato esattamente come l'esperimento di controllo in cui il virus era assente. L'induzione della secrezione di cortisolo e di  $17\beta$ -estradiolo si accompagna ad una significativa modulazione dell'espressione dei geni codificanti gli enzimi della steroidogenesi. In particolare, si osserva l'induzione marcata e precoce dell'espressione del gene codificante StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*), che regola la tappa limitante della steroidogenesi, ossia il trasporto del colesterolo dalla membrana esterna alla membrana interna mitocondriale, dove viene convertito in pregnenolone dall'enzima CYP11A. La

stimolazione della produzione di ormoni steroidei da tropine è in genere mediata dalla via cAMP-dipendente ed è accompagnata da un rapido aumento della trascrizione del gene *StAR* (145). Il promotore del gene *StAR*, analogamente alle sequenze promoter di altri geni codificanti enzimi steroidogenetici, è privo di *cAMP-responsive elements* (CRE). La risposta cAMP-dipendente di *StAR* dipende invece da SF-1, di cui sono stati dimostrati tre siti di legame nel promotore di *StAR*, così come in quelli di altri geni codificanti enzimi della steroidogenesi. Il promotore di *StAR* contiene inoltre a monte di SF-1 elementi in *cis* responsivi alla CAAT/enhancer binding protein  $\beta$  (stimola l'espressione di *StAR*), diverse sequenze consensus per Sp1 (attivazione cAMP-dipendente), siti di legame per SREBP1a (attiva l'espressione di *StAR*) e un sito di legame per ying yang 1 (YY1), il quale può agire sia da attivatore che da repressore trascrizionale, a seconda del contesto fisiologico cellulare. DAX-1 è invece un repressore dell'espressione di *StAR*, probabilmente legando SF-1. Altri fattori autocrini e paracrini sono stati dimostrati influenzare l'espressione di *StAR*, come gli IGF, che ne stimolano l'espressione, o TGF $\beta$  e TNF $\alpha$ , che la inibiscono.

Oltre al significativo aumento dell'espressione di trascritti di *StAR*, le cellule corticosurrenaliche infettate da HCMV dimostravano un netto e precoce aumento dell'espressione dei geni *CYP11B1* e *CYP11B2*, responsabili delle ultime reazioni per la sintesi di cortisolo e di aldosterone, rispettivamente, e di *CYP19*, codificante l'aromatasi, che catalizza l'aromatizzazione del testosterone in 17 $\beta$ -estradiolo. A fronte dell'induzione di enzimi responsabili delle ultime fasi della steroidogenesi e a localizzazione mitocondriale, si osservava la netta inibizione dell'espressione di *CYP11A*, *HSD3B2*, *CYP17* e *CYP21*, responsabili di tappe intermedie della steroidogenesi, localizzati nel reticolo endoplasmatico, e più coinvolti nella via di produzione degli androgeni surrenalici, come il DHEA-S. Anche questi dati di espressione genica sono quindi in accordo i risultati dei dosaggi ormonali.

Per quanto per quanto riguarda i geni codificanti recettori nucleari orfani implicati nella regolazione dell'espressione degli enzimi della steroidogenesi, l'espressione di *DAX-1* e di *SF-1* era inibita da HCMV, mentre l'espressione dell'inibitore SHP era notevolmente aumentata. I livelli di mRNA di *LRH-1* erano molto bassi e difficilmente valutabili. L'interpretazione dell'insieme di questi dati non è semplice, anche perché non è ancora ben chiaro come tutti i vari fattori di trascrizione intervengano, e cooperino tra loro, nella regolazione dell'espressione di *StAR* e dei vari geni coinvolti nella steroidogenesi. E' noto, per esempio, che SF-1 induce l'espressione di *CYP19* e di *CYP17* e che DAX-1 inibisce l'espressione di *CYP11A*, *CYP17*, *CYP19*, e *CYP11B2*. L'effetto netto potrebbe comunque essere quanto osservato con l'analisi dei livelli di trascritti e la misurazione della produzione ormonale. L'infezione da HCMV potrebbe inoltre

modulare l'espressione di altri fattori regolatori degli enzimi della steroidogenesi, come COUP-TF I e II, WT-1, p53, ecc., e non ancora esaminati in questo studio. A questo proposito, l'analisi del profilo di espressione genica globale con microarray delle cellule corticosurrenaliche infettate da HCMV ha consentito di evidenziare il significativo e costante aumento dell'espressione del trascritto codificante la subunità  $\alpha$  (attiva) del recettore dei glucocorticoidi. I glucocorticoidi esercitano un *feedback* negativo sulla loro stessa produzione, indirettamente, inibendo il rilascio di ACTH dall'ipofisi. Hanno però anche un effetto diretto sul surrene. L'inibizione della steroidogenesi mediante aminoglutetimide è stata dimostrata portare alla diminuzione dell'espressione del recettore dell'ACTH, evento che è impedito dal trattamento con l'agonista dei glucocorticoidi desametasone (146). È stato inoltre dimostrato che il trattamento di cellule corticosurrenaliche ovine con desametasone aumenta l'induzione della produzione di glucocorticoidi da parte di ACTH, forskolina e cAMP (147). Questi dati indicano che i glucocorticoidi stimolano direttamente la steroidogenesi aumentando l'azione dell'ACTH.

È possibile ipotizzare che l'induzione della steroidogenesi nelle cellule corticosurrenaliche infettate da HCMV sia il risultato di un effetto diretto del virus sulla trascrizione di geni cellulari chiave per la steroidogenesi. Poiché tale effetto si osserva assai precocemente dopo l'infezione, potrebbe essere mediato dai geni IE di HCMV, ed in particolare IE2-86, che è in grado di transattivare, oltre i geni virali, anche geni cellulari, interagendo con vari fattori di trascrizione, tra cui Sp1, coinvolto nella regolazione di molti geni codificanti enzimi e fattori della steroidogenesi.

Da un punto di vista finalistico, potremmo speculare che l'induzione della produzione di cortisolo da parte di HCMV sia finalizzata a facilitare e/o aumentare la sua replicazione nelle cellule corticosurrenaliche così come a livello sistemico. Ciò sarebbe in accordo con i dati riportati in letteratura di maggior rischio di riattivazione virale e malattia da HCMV nei pazienti sottoposti a trapianto ed in trattamento con corticosteroidi. Inoltre, come abbiamo già fatto notare, diversi studi in letteratura dimostrano la capacità dei glucocorticoidi di aumentare la replicazione di HCMV e la permissività delle cellule *in vitro* all'infezione da HCMV (135,136,148) così come da altri virus erpetici, come EBV (149-151) e HSV (152,153). Il meccanismo d'azione dei glucocorticoidi sulla replicazione di EBV è stato dimostrato dipendere da un *glucocorticoid responsive element* (GRE) localizzato nel promotore della latenza C del genoma di EBV, dal quale dipende l'espressione dei geni della latenza di tipo III (154,155). Non è stato invece ancora identificato alcun GRE nel genoma di HCMV e degli altri virus erpetici. È possibile comunque che i glucocorticoidi e gli altri steroidi surrenalici attivino indirettamente la replicazione virale attraverso



l'induzione dell'espressione di altri fattori di trascrizione e co-attivatori in grado di legare sequenze enhancer/promoter virali e mediare in questo modo la risposta ai glucocorticoidi.

Anche nella nostra esperienza i glucocorticoidi (idrocortisone 10  $\mu$ M) aumentano la produzione virale da parte di fibroblasti infettati da HCMV AD169. Non abbiamo dimostrato analogo effetto nelle cellule corticosurrenaliche infettate con AD169. In particolare, nelle cellule steroideo-secerenti NCI-H295R il trattamento con idrocortisone sembra addirittura diminuire il titolo virale all'interno delle cellule, mentre nelle cellule non secerenti SW-13 il trattamento con idrocortisone induce dei picchi di rilascio virale, come si può dedurre dall'aumento del virus nel mezzo di coltura. Abbiamo quindi valutato l'effetto dell'enantiomero L dell'aminoglutetimide sulle cellule corticosurrenaliche infettate da HCMV. I due enantiomeri L e D dell'aminoglutetimide hanno diversa affinità per gli enzimi P-450-dipendenti. Studi *in vitro* hanno dimostrato che l'enantiomero D è 38 volte più potente nel sopprimere l'aromatizzazione dell'androstenedione in estrone rispetto all'enantiomero L (156), ma ha 2.5 volte l'attività inibente dell'enzima CYP11A rispetto alla forma L (157). La scelta dell'enantiomero L era dunque motivata dal fatto che si voleva inibire a monte la steroidogenesi, evitando un effetto potente e selettivo sull'aromatasi. Il trattamento con L-aminoglutetimide 300  $\mu$ M non ha modificato significativamente il titolo virale intracellulare sia nelle NCI-H295R sia nelle SW-13, mentre ha indotto picchi di rilascio del virus nel mezzo di coltura. Nelle cellule SW-13, il trattamento con L-aminoglutetimide in combinazione con idrocortisone ha ridotto il titolo virale nel mezzo di coltura. L'insieme di questi risultati suggerisce che gli ormoni steroidei possano modulare la produzione di progenie virale nelle cellule surrenaliche infettate da HCMV, anche se non è ancora chiaro quale/i ormone/i steroideo/i sia implicato in questo processo. Saranno effettuati altri esperimenti con altri inibitori della steroidogenesi e/o secretagoghi, così come l'inibitore del recettore dei glucocorticoidi RU489, al fine di chiarire questo aspetto.

L'effetto dell'infezione da HCMV sulla steroidogenesi surrenalica potrebbe essere mediata anche da citochine. Citochine come IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 e IL-6 sono indotte durante la sepsi da batteri gram-negativi o in risposta alla somministrazione di endotossina (158) e la sintomatologia dello shock è dovuta agli effetti sistemici di queste citochine. D'altra parte, questa cascata di citochine porta all'attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene con stimolazione della produzione di glucocorticoidi da parte del surrene. I glucocorticoidi possono sopprimere molte funzioni del sistema immunitario, comprese la produzione di citochine e la risposta cellulare T. Pertanto, il sistema immunitario ed il sistema neuroendocrino possono comunicare e fornire meccanismi di feedback per

limitare la risposta immunitaria. Come riportato nell'introduzione, è noto che l'infezione da HCMV stimola la produzione di molteplici citochine e chemochine, tra cui IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$ , ecc. Analogo effetto si osserva *in vivo* nel modello sperimentale di infezione di topi da parte di MCMV. Nelle prime fasi dell'infezione da MCMV, aumentano i livelli sistemici di IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF, IL-1 e IL-6 e contemporaneamente aumentano i livelli di glucocorticoidi (corticosterone). In questo modello murino, l'aumento del corticosterone è dimostrato a 36 h dall'infezione da MCMV, mentre negli stessi animali si osserva un aumento dei livelli di ACTH a circa 28-32 h dall'infezione. Utilizzando anticorpi neutralizzanti specifici contro le citochine, l'IL-6 è stata dimostrata essere il mediatore chiave dell'induzione dei glucocorticoidi, mentre l'IL-1 agirebbe stimolando la produzione di IL-6 (159). È stato quindi ipotizzato che cellule monocito-macrofagiche, infettate da HCMV, producano citochine, tra cui IL-1 ed IL-6, le quali stimolerebbero a livello ipotalamico-ipofisario la produzione di CRH ed ACTH, che porterebbero all'aumento dei glucocorticoidi. I nostri dati indicano però una stimolazione diretta della produzione di cortisolo nel surrene da parte dell'infezione da HCMV. Dal momento che le cellule corticosurrenaliche producono molte citochine, tra cui IL-1 ed IL-6 (160,161), e che queste sono in grado di stimolare direttamente la steroidogenesi, non è escluso che l'aumento della produzione di cortisolo sia il risultato di un *loop* autocrino. Abbiamo per questo studiato l'espressione dell'mRNA di *IL-6* mediante real-time RT-PCR quantitativa e la produzione di IL-6 nel medium di coltura mediante ELISA. Abbiamo dimostrato che l'infezione da HCMV delle cellule NCI-H295R determina un netto aumento della trascrizione di *IL-6*, soprattutto a 8 h e 24 h dall'infezione, mentre i livelli di proteina nel mezzo di coltura erano indosabili. È da notare però che i livelli di *IL-6* mRNA basali erano molto bassi per cui il saggio ELISA da noi usato potrebbe non essere stato sufficientemente sensibile per determinate piccole quantità di proteina. In alternativa, i bassi livelli della proteina IL-6 rispetto all'induzione di trascritti potrebbero essere dovuti ad un meccanismo di soppressione post-trascrizionale. L'infezione di fibroblasti con HCMV o con HCMV inattivato con UV induce elevati livelli di *IL-6* mRNA. Nel caso del virus inattivato, si osserva una notevole induzione di IL-6 anche a livello proteico, fenomeno che non avviene nel caso di infezione litica da HCMV (162). Durante l'infezione litica da HCMV, l'espressione dei geni virali porta quindi a due effetti apparentemente in antagonismo: l'attivazione trascrizionale di *IL-6*, mediata in parte da IE2-UL86, e la soppressione posttrascrizionale dovuta a destabilizzazione dei trascritti di IL-6. L'effetto netto è la riduzione della produzione di IL-6 rispetto alle cellule trattate col virus inattivato (162).

In questo studio sono state anche valutate conseguenze dell'infezione virale in termini di effetto citopatico, apoptosi, ciclo cellulare e proliferazione cellulare

per poter meglio comprendere gli effetti dell'impatto dell'infezione da HCMV a livello del macchinario cellulare della linea di carcinoma corticosurrenalico ormono-secerne NCI-H295R. L'infezione da HCMV *in vitro* provoca usualmente nei fibroblasti umani un effetto citopatico tipico caratterizzato da ingrossamento e arrotondamento delle cellule con inclusioni sia intra- che perinucleari (citomegalia, da cui prende il nome il virus). Solo i ceppi di laboratorio, come l'AD169 e il Towne, sono in grado di produrre un effetto citopatico più generalizzato, caratterizzato dalla lisi completa dell'intero monostrato cellulare e il rilascio di alti titoli di virioni a partire dal quarto giorno p.i. Dopo 3 settimane dall'infezione da HCMV con una MOI pari a 2, le cellule NCI-H295R dimostrano un effetto citopatico caratterizzato dalla presenza di cellule vacuolizzate apoptotiche, che, dopo ulteriori passaggi, vanno incontro a lisi, con completa distruzione del monostrato cellulare. Si può speculare che il ritardo nella comparsa di effetto citopatico nella linea cellulare NCI-H295R rispetto ai fibroblasti umani possa essere dovuto al fatto che in questa linea cellulare il ciclo replicativo di HCMV sembra essere ritardato.

Uno degli effetti dell'infezione da HCMV a livello cellulare sembra essere l'inibizione dell'apoptosi, che porta alla promozione della sopravvivenza delle cellule tumorali. HCMV è in grado di interferire sia con le vie di apoptosi cellulare estrinseche che intrinseche; promuove infatti i segnali di sopravvivenza cellulare influenzando l'oncosoppressore p53 e l'analogo p73 e stimola inoltre le vie di segnale anti-apoptotiche Ras/Raf/MEK/Erk e PI-3K (163). Nonostante HCMV sia in grado di codificare diverse proteine precocissime anti-apoptotiche (IE1, IE2, vMIA and vICA), è stato dimostrato che US28, un recettore per le chemochine codificato dal virus (IE), sia in grado di indurre costitutivamente l'apoptosi in diversi tipi di cellule (164). Inoltre HCMV si è dimostrato in grado di indurre apoptosi anche nei precursori delle cellule neurali (165), nelle cellule aortiche endoteliali (HAECs) e in una linea endoteliale derivata dai vasi ombelicali umani (ECV304) (166- 167). Dopo 24 ore dall'infezione della linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R con HCMV MOI 2, il virus causa solo una lieve induzione di apoptosi (3%), e la percentuale di cellule apoptotiche raddoppia a 72 ore p.i.. Come conseguenza dell'effetto diretto dell'infezione virale risultano invece aumentare di più le cellule in necrosi. Interessante notare come l'infezione con HCMV MOI 2 combinata al trattamento con etoposide 100  $\mu$ M risulti in un effetto sinergico che porta il numero di cellule apoptotiche a superare il controllo del 29% a sole 24 p.i. e di un valore pari a più del doppio dopo 72 ore p.i. (di questo, quasi la metà delle cellule rispetto al controllo risulta essere in stato di necrosi post-apoptotica, stadio successivo all'entrata delle cellule stesse in apoptosi). L'effetto del trattamento contemporaneo con etoposide e HCMV si può ipotizzare sia dovuto al fatto che l'infezione da HCMV, come

riportato in letteratura, è in grado di provocare nelle cellule infettate una iperespressione delle topoisomerasi II, il bersaglio del farmaco stesso (168,169). Nonostante sia riportato in letteratura che HCMV sia in grado di indurre la sintesi di DNA cellulare in cellule sincronizzate, tramite privazione di siero, in fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (43,170), alcuni risultati suggeriscono che l'infezione da HCMV non porti in maniera concomitante alla divisione cellulare. Al contrario, l'infezione da HCMV è in grado di inibire o ritardare la proliferazione cellulare, inibendo la progressione del ciclo cellulare nella cellula ospite (43). Negli esperimenti di valutazione della proliferazione cellulare in seguito ad infezione con HCMV AD169 infatti, si ottiene una piccola riduzione della proliferazione cellulare solo a 72 ore p.i., mentre a 24 ore dall'infezione non vi è alcuna modulazione significativa. Anche per quanto riguarda la valutazione del ciclo cellulare dopo infezione con HCMV AD169, non risulta una risposta significativa, in quanto vi è solo un lieve aumento del 3% delle cellule in fase S rispetto al controllo. Presi tutti insieme, questi dati suggeriscono che l'infezione di HCMV, almeno durante le prime fasi di infezione, non sia in grado di modificare significativamente il macchinario cellulare della linea di carcinoma corticosurrenalico NCI-H295R. Questo risultato potrebbe essere spiegato con il fatto che, come già riportato sopra, gli effetti dell'infezione da HCMV su questa linea cellulare siano più ritardati rispetto a quanto avviene nei fibroblasti. Vi è quindi la necessità di approfondire in futuro gli effetti dell'infezione sul macchinario cellulare in tempi più lunghi rispetto a quelli utilizzati.

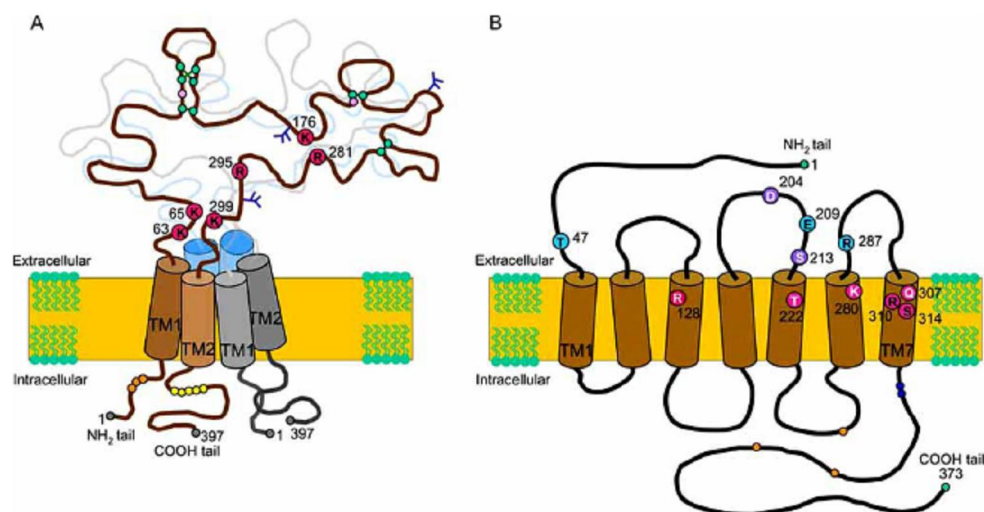
E' stato infine valutato il profilo di espressione genica globale delle linee cellulari corticosurrenaliche infettate da HCMV AD169 al fine di identificare vie metaboliche alterate dall'infezione. Per questo scopo è stato eseguito un esperimento di *time-course*, in cui l'espressione genica è stata analizzata a 8 ore, 24 ore e 72 ore dall'infezione. Nei fibroblasti, in genere, il tempo 8 ore corrisponde all'espressione dei geni precocissimi e precoci virali, a 24-36 ore dall'infezione inizia la replicazione del DNA virale, mentre a 72 ore circa si conclude il ciclo replicativo virale. Verosimilmente, il ciclo replicativo virale è più ritardato nelle linee cellulari corticosurrenaliche rispetto ai fibroblasti e tutti gli istanti temporali presi in considerazione potrebbero rappresentare fasi relativamente precoci del ciclo replicativo virale.

Nelle cellule secernenti steroidi NCI-H295R, a 8 ore dall'infezione con HCMV a MOI 2, si osserva un significativo aumento dell'espressione della subunità  $\alpha$  del recettore dei glucocorticoidi, come riportato sopra, effetto che si mantiene almeno fino a 24 ore dall'infezione. In uno studio con microarray condotto su fibroblasti, invece, è stata osservata l'inibizione, a 8 e 24 h dall'infezione, della subunità  $\beta$  del recettore dei glucocorticoidi (14). La subunità  $\alpha$  del recettore è la forma attiva, mentre la subunità  $\beta$  potrebbe inibire l'attività

della subunità  $\alpha$ . Nelle cellule surrenaliche infettate, a 8 h, si osserva inoltre l'induzione di geni responsabili di instabilità cromosomica e invasività tumorale e di fattori coinvolti nel trasporto e secrezione di proteine. A 8 ore è invece inibita l'espressione di geni codificanti fattori di trascrizione, geni implicati nella morfogenesi e differenziamento cellulare, geni implicati nel metabolismo mitocondriale. E' interessante notare l'inibizione del gene codificante la heat shock 70kD protein 8, la quale è coinvolta nella regolazione dell'attività dei recettori per gli ormoni steroidei (in particolare il recettore degli estrogeni di tipo  $\alpha$ ). In assenza del ligando, i recettori degli ormoni steroidei, definiti aporecettori, sono inattivi e sono localizzati nel citoplasma o nel nucleo in complessi con altre proteine, tra cui le heat shock protein 90, 70 e 56. Quando il ligando (ormone) entra nella cellula, la heat shock protein si dissocia, il recettore cambia conformazione, dimerizza e diventa attivo. Il significato dell'inibizione dell'espressione di heat shock 70kD protein 8 rimane da chiarire, ma non è escluso un ruolo nella steroidogenesi e/o nella replicazione virale. Nei fibroblasti, invece, è stata riportata un'induzione significativa di heat shock protein 70 a 24 h dall'infezione (14). A 24 ore dall'infezione risultano indotti geni codificanti fattori coinvolti nella risposta anti-microbica, fattori ad attività anti-apoptica, geni implicati nella trascrizione, nella sintesi degli acidi nucleici e nella proliferazione cellulare, mentre sono inibiti geni ad attività anti-proliferativa o attivatori della cascata NF- $\kappa$ B. A 72 ore sono indotti geni implicati nel rimodellamento cromatinico, mentre sono inibiti repressori trascrizionali, inibitori dell'angiogenesi e geni implicati nella risposta allo stress ossidativo. Il gene codificante la *dual specific phosphatase 8 (DUSP8)* è l'unico ad essere significativamente inibito durante tutto il *time-course* di infezione. Questo gene, definito anche "human homologue of vaccinia virus H1 phosphatase gene clone 5" (*hVH-5*), codifica una fosfatasi duplice specifica, in grado di defosforilare fosfotirosine regolatrici e residui di fosfotreonina delle cosiddette *mitogen-activated protein kinases* (MAPK). Le MAPK sono regolatori chiave di molte funzioni cellulari e sono strettamente controllate dall'azione concertata di diverse fosfatasi. L'attività appropriata delle *dual specific phosphatase*, definite anche MAPK fosfatasi (MKP), è essenziale per la corretta attività di segnalazione delle MAPK e quindi per diversi aspetti della fisiologia della cellula, come l'infiammazione e la morte cellulare (171). In particolare, la fosfatasi hVH-5 ha attività preferenziale nei confronti di due particolari classi di MAPK, le c-Jun N-terminal kinases (JNK) e le p38 kinases (172). Entrambi questi gruppi di MAPK svolgono un ruolo importante nella trasformazione cellulare, nella progressione neoplastica e nel processo metastatico. E' stato ipotizzato che le MKP abbiano un'attività di oncosoppressori. Infatti, i geni di diverse MKP mappano in regioni cromosomiche il cui frequente riarrangiamento genetico è associato all'insorgenza

di tumori. Questo è particolarmente vero per *hVH-5*, che mappa nel locus 11p15.5, regione soggetta ad imprinting genetico e che dimostra perdita di eterozigosi e squilibrio allelico in diversi tipi di tumori, tra cui il carcinoma corticosurrenalico (173). L'inibizione di *hVH-5* potrebbe svolgere un ruolo importante nella modulazione della biologia della cellula tumorale, essendo le MAPK, e JNK in particolare, importanti attori nel processo di oncomodulazione da HCMV. Una inibizione significativa dell'espressione di un'altra dual-specificity phosphatase, ossia la DUSP10, è stata dimostrata in fibroblasti infettati sia da HCMV che da virus inattivato con UV (15), per cui l'inattivazione dell'espressione delle MKP potrebbe essere innescata dal legame ed ingresso nella cellula di HCMV. In questo stesso studio è stato inoltre dimostrato che l'espressione di molti altri geni cellulari ad attività antivirale è modulata da queste prime fasi dell'infezione virale, mentre proteine virali sintetizzate successivamente bloccherebbero questa risposta cellulare antivirale (15).

Oltre all'analisi già discussa, è stata effettuata sui dati ottenuti con microarray anche un'analisi di *clustering*, dalla quale si sono ottenuti tre clusters di geni. Uno di questi, il cluster 3, è risultato interessante perchè composto da 12 geni particolarmente indotti durante le prime ore d'infezione. Interessante sottolineare la presenza in questo cluster di due geni che codificano per i recettori purinergici P2Y11 e P2X4 che sono recettori di superficie che mediano gli effetti dell'adenosina-5'-trifosfato (ATP). L'ATP, oltre al suo ruolo di fonte intracellulare di energia, modula un'ampia varietà di processi fisiologici extracellulari quali la regolazione della contrazione della muscolatura liscia cardiaca, vascolare e viscerale, la neurotrasmissione, lo sviluppo embrionale, la crescita, la proliferazione e la differenziazione, la neurotrasmissione e la secrezione endocrina, inclusa anche la secrezione di ormoni corticosteroidi (174-178). Le azioni mediate dall'ATP si attuano per mezzo del legame a recettori specifici chiamati recettori purinergici. Quest'ultimi vengono suddivisi in due famiglie principali, i P2X e i P2Y le quali sono ulteriormente suddivise in sottogruppi in base alla loro sensibilità all'ATP e ad altri nucleotidi (179,180). I P2X sono recettori ionotropici non selettivi per i cationi, e contengono pori intrinseci che cambiano la loro conformazione in seguito al legame con l'ATP, permettendo quindi agli ioni di passare. I recettori P2Y sono invece metabotropici e si accoppiano a sistemi di secondi messaggeri intracellulari attraverso proteine G eterodimeriche (Figura 42) (181-183). Ad oggi sono stati clonati e caratterizzati 7 sottotipi di recettori P2X, e circa 9 sottotipi della famiglia dei recettori P2Y (180,182).



**Figura 42.** Rappresentazione schematica delle caratteristiche generali dei recettori P2X (A) e P2Y (B). I sette recettori P2X clonati (P2X1-7) sono canali ionici che si legano all'ATP formando dei pori permeabili ai cationi con una rapida cinetica di attivazione. Ciascuna delle tre subunità, che forma un complesso omo- o eterodimerico, comprende due regioni idrofobiche transmembrana (TM1 e TM2), un grande loop extracellulare di circa 270 amminoacidi e due code terminali localizzate intracellularmente. Residui amminoacidici caricati positivamente nel loop extracellulare contribuiscono al legame con l'ATP e all'attivazione del recettore. Le code amino- e carbossi-terminali intracellulari sono associate rispettivamente a delle protein chinasi C conservate e a dei trafficking motifs. Dall'altra parte, i recettori P2Y sono costituiti da sette segmenti transmembrana (TM1-TM7) collegati attraverso tre loop extracellulari e tre intracellulari. La porzione ammino-terminale è situata fuori dalla cellula, mentre la porzione carbossi-terminale è situata nel citoplasma, e possiede un consensus binding motif per le protein chinasi. La diversità strutturale dei loop intracellulari e della porzione carbossi-terminale determina il diverso accoppiamento dei sottotipi P2Y con le proteine G. (Da Fischer et al., *Curr Med Chem*;14:2429-55,2007.)

La distribuzione dei recettori purinergici a livello surrenalico è ampia ed è stata studiata in diverse specie. Uno studio di Vulchanova (184) ha rilevato la presenza dei recettori P2X a livello delle cellule cromaffini del ratto, nel porcellino d'India invece la distribuzione di questi recettori risulta diversa, come riscontrato in un lavoro successivo di Afework e Burnstock (185). Nel ratto infatti, tutti i sette sottotipi di recettori P2X sono stati riscontrati con la seguente distribuzione: i P2X<sub>1</sub> nelle fibre nervose che innervano le cellule cromaffini e i vasi sanguigni della midollare, i P2X<sub>2</sub> nei neuroni intrinseci e nei nei miociti lisci dei vasi sanguigni della capsula e subcapsula, i P2X<sub>3</sub> nei neuroni intrinseci, i P2X<sub>4-7</sub> nelle cellule corticosurrenaliche, e infine i P2X<sub>5</sub> e P2X<sub>7</sub> anche in un numero limitato di cellule cromaffini. Nello studio effettuato da Afework sul porcellino d'India invece la distribuzione appare diversa: i P2X<sub>1</sub> sono stati riscontrati nella regione più interna della zona reticularis della corticale, i P2X<sub>2</sub> sono stati rilevati tra i gruppi di cellule corticali della zona reticularis. È stata inoltre riscontrata immunoreattività per i P2X<sub>5</sub> nelle terminazioni delle fibre nervose e nei neuroni intrinseci e per i P2X<sub>6</sub> nelle cellule cromaffini. Non è stata riscontrata invece immunoreattività per i

recettori P2X<sub>3</sub>, P2X<sub>4</sub>, P2X<sub>7</sub>. La distribuzione dei recettori P2Y a livello surrenalico risulta estesa (come dimostrato da diversi lavori in cui vengono studiati gli effetti di agonisti e antagonisti nella modulazione della steroidogenesi (186-188) ma meno chiara. Ad ogni modo, l'ampia e specifica distribuzione dei sottotipi di recettori P2X e dei P2Y nelle ghiandola surrenalica suggerisce un ruolo importante del segnale purinergico nella fisiologia di questo organo. Nella ghiandola surrenalica infatti, l'ATP viene immagazzinato e rilasciato con le catecolamine dalle cellule cromaffini (189). È stato inoltre dimostrato che l'ATP viene rilasciato dalle cellule della zona glomerulosa e della zona fascicolata della ghiandola stimolando la steroidogenesi (190,191). Il significato fisiologico dell'ATP extracellulare o di altri nucleotidi nella regolazione della secrezione del cortisolo, ad ogni modo, non è ancora stata ben chiarita. Nelle cellule surrenaliche bovine della zona fascicolata, è stato dimostrato che l'ATP stimola la secrezione di cortisolo attraverso un meccanismo di attivazione dei recettori purinergici P2Y, Ca<sup>2+</sup> dipendente, che viene quindi mediato dall'aumento intracellulare di calcio. Questo meccanismo sembra essere regolato dall'entrata del Ca<sup>2+</sup> in base alla depolarizzazione della membrana plasmatica (192,193), e sembra coinvolgere l'attivazione di un adenilato ciclasi e della protein chinasi A (PKA) (194). I recettori P2Y<sub>11</sub> sono gli unici tipi di recettori P2Y in grado di accoppiarsi con le Gs e causare l'attivazione della PKA (195). Il recettore P2Y<sub>11</sub> sembra quindi avere un ruolo diretto nella stimolazione dell'attività dell'adenilato ciclasi e quindi potenzialmente nel contribuire alla regolazione autocrina-paracrina da parte dei nucleotidi quali l'ATP (196). Tra i geni appartenenti al cluster 3, ve ne sono altri due che agiscono tramite meccanismi Ca<sup>2+</sup> dipendenti, ovvero *CAMK1D* e *TPD52*. *CAMK1D* o *calcium/calmodulin-dependent protein Kinase ID*, codifica per una sottofamiglia di chinasi serina/treonina, che sembra avere un ruolo critico nel modulare le risposte funzionali nei granulociti in termini di migrazione ed adesione (197) ed attua i suoi effetti attraverso un meccanismo Ca<sup>2+</sup> dipendente. Nel topo questa proteina risulta coinvolta nei processi apoptotici (198). *TPD52*, o *tumor protein D52*, codifica per una proteina che sembra agire come un proto-oncogene e rappresenta un marcatore del cancro prostatico (199) e ovarico (200). *TPD52* si lega all'anessina VI in modo Ca<sup>2+</sup> dipendente e sembra regolare i processi secretori nelle plasmacellule (201). Tra i geni particolarmente indotti durante le timo corse d'infezione, appartenenti al cluster 3, ce ne sono alcuni come *TACCI* ed *E2F1* che sono coinvolti nella trasformazione oncogena e nell'angiogenesi. *TACCI*, o *Transforming acidic coiled coil 1*, la cui funzione non è stata ancora del tutto chiarita, sembra agire come un oncogene putativo il cui ruolo è quello di regolare positivamente le vie *Ras* e *PI3K*, promuovendo la



trasformazione *Ras*-mediata, e prevenendo l'apoptosi indotta dall'inibizione da *PI3K*. In letteratura è riportato che *TACCI* svolge un importante ruolo oncogeno nella formazione del tumore della ghiandola mammaria murina (202). Interessante risulta essere anche l'induzione durante le prime fasi d'infezione di *E2F1*. La proteina codificata da questo gene appartiene alla famiglia dei fattori di trascrizione E2F, la quale, come già riportato, svolge un ruolo cruciale nel controllo del ciclo cellulare ed è inoltre un target delle proteine trasformanti dei piccoli virus oncogeni a DNA. *E2F1* si lega preferenzialmente alla proteina pRb del retinoblastoma in modo ciclo-cellulare-dipendente e può mediare sia la proliferazione cellulare che l'apoptosi p53 dipendente/indipendente (203). In letteratura è presente un lavoro di Song effettuato su fibroblasti umani infettati con HCMV in cui viene riportato che l'induzione di *E2F1* viene mediata dall'espressione della proteina virale IE86 (22). Anche *PROKR2 prokineticin receptor 2* risulta particolarmente indotto dall'infezione delle cellule NCI-H295R con HCMV; questo è un recettore delle prokineticine, le quali sono delle proteine anche note come *endocrine gland-derived vascular endothelial growth factors* che agiscono come fattori di crescita promuoventi l'angiogenesi e risultano implicati in diversi processi fisiologici, che vanno dallo sviluppo alla fisiologia adulta (204). Da sottolineare infine l'induzione di INCEP, *inner centromere protein antigens*, che svolge un ruolo importante nella stabilizzazione del *chromosomal passenger complex* (CPC). Questo complesso coordina gli eventi della mitosi a livello cromosomico e di citoscheletro, legandosi alla survivina (205).

Per capire meglio il meccanismo di questo cluster e per saperne di più circa la struttura di dipendenza tra questi geni, è stata costruita una rete gaussiana Bayesiana. La rete Bayesiana permette di rappresentare le relazioni tra i geni in termini della loro dipendenza probabilistica (206). In questo caso due geni sono statisticamente dipendenti se l'attivazione di un gene è influenzata dall'attivazione dell'altro gene. Da questa rete si è ottenuto un risultato molto interessante poiché i due recettori purinergici P2X<sub>4</sub> e P2Y<sub>11</sub> sembrano agire come geni "diga", in grado di modulare l'espressione di tutti gli altri geni del network stesso. Questo dato ci potrebbe far speculare che HCMV sfrutti questa via di segnale dipendente dall'ATP per influenzare la produzione di cortisolo e, in definitiva, aumentare la propria replicazione. I recettori purinergici potrebbero quindi giocare un ruolo fisiologico importante nel modulare gli effetti dell'infezione da HCMV nella ghiandola surrenalica. Alla luce di questi risultati si sta ricercando il ruolo di questi due recettori purinergici negli effetti dell'infezione da HCMV sulla funzione surrenalica.



## 9 CONCLUSIONI

I risultati di questo studio dimostrano, per la prima volta, che HCMV infetta e replica in cellule corticosurrenaliche umane *in vivo* e *in vitro*. L'infezione da HCMV stimola la produzione di cortisolo e 17 $\beta$ -estradiolo, mentre il trattamento con idrocortisone a dosi fisiologiche aumenta la replicazione di HCMV nei fibroblasti ed il rilascio di particelle virali da cellule corticosurrenaliche infettate. L'effetto dell'infezione da HCMV sulla produzione di ormoni steroidei sembra mediato da una significativa e persistente induzione dell'espressione di alcuni enzimi della steroidogenesi surrenalica, soprattutto *CYP11B1*, responsabile dell'ultima reazione di sintesi del cortisolo. Questa induzione potrebbe essere il risultato di un'azione diretta del virus sull'espressione degli enzimi della steroidogenesi, o essere mediato da fattori trascrizionali o di citochine coinvolti nella regolazione della steroidogenesi e modulati in corso di infezione da HCMV. L'analisi con DNA microarray ha evidenziato che l'infezione da HCMV determina una precoce e marcata induzione dei geni codificanti per due recettori purinergici, noti per mediare gli effetti dell'ATP sull'aumento della produzione di cortisolo. E' ipotizzabile che il virus utilizzi questo pathway per influenzare la steroidogenesi nelle cellule corticosurrenaliche. L'effetto dell'infezione da HCMV non sembra avere invece un impatto significativo sul macchinario cellulare, almeno durante le prime fasi d'infezione, mentre provoca un marcato ed evidente effetto citopatico dopo circa tre settimane.



## 10 BIBLIOGRAFIA

1. Mocarski ES, Courcelle CT. Cytomegalovirus and their replication. In D. Knipe, & P. Howley Eds., *Fields Virology*, Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins. pp. 2629– 2673, 2007.
2. Lu M, Shenk T. Human cytomegalovirus UL69 protein induces cells to accumulate in G1 phase of the cell cycle. *J Virol* 73: 676–683, 1999.
3. Baldick CJ, Marchini A, Patterson CE, Shenk T. Human cytomegalovirus tegument protein pp71 (ppUL82) enhances the infectivity of viral DNA and accelerates the infectious cycle. *J Virol* 71: 4400– 4408, 1997.
4. Bresnahan WA, Shenk T. UL82 virion protein activates expression of immediate early viral genes in human cytomegalovirus-infected cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14506– 14511, 2000.
5. Bresnahan WA, Shenk T. A subset of viral transcripts packaged within human cytomegalovirus particles. *Science* 288: 2373– 2376, 2000.
6. Novotny J, Rigoutsos I, Coleman D, Shenk T. In silico structural and functional analysis of the human cytomegalovirus (HHV5) genome. *J Mol Biol* 310: 1151–1166, 2001.
7. Cha TA, Tom E, Kemble GW, Duke GM, Mocarski ES, Spaete RR. Human cytomegalovirus clinical isolates carry at least 19 genes not found in laboratory strains. *J Virol* 70: 78–83, 1996.
8. Karlin S, Mocarski ES, Schachtel GA. Molecular evolution of herpesviruses: genomic and protein sequence comparisons. *J Virol* 68: 1886– 1902, 1994.
9. Bissinger AL, Singzer C, Kaiserling E, Jahn G. Human cytomegalovirus as a direct pathogen: correlation of multiorgan involvement and cell distribution with clinical and pathological findings in a case of congenital inclusion disease. *J Med Virol* 67: 200–206, 2002.
10. Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91: 119– 126, 1997.
11. Sinzger C, Grefte A, Plachter B, Gouw AS, The TH, Jahn G. Fibroblasts, epithelial cells, endothelial cells and smooth muscle cells are major targets of human cytomegalovirus infection in lung and gastrointestinal tissues. *J Gen Virol* 76: 741–750, 1995.
12. Plachter B, Sinzger C, Jahn G. Cell types involved in replication and distribution of human cytomegalovirus. *Adv Virus Res* 46: 195– 261, 1996.
13. Zhu H, Cong JP, Shenk T. Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs: induction of the interferon-responsive RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 13985– 13990, 1997.
14. Zhu H, Cong JP, Mamtora G, Gingeras T, Shenk T. Cellular gene expression altered by human cytomegalovirus: global monitoring with oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 14470– 14475, 1998.

15. Browne EP, Wing B, Coleman D, Shenk T. Altered cellular mRNA levels in human cytomegalovirus infected fibroblasts: viral block to the accumulation of antiviral mRNAs. *J Virol* 75, 12319–12330, 2001.
16. Boyle KA, Pietropaolo RL, Compton T. Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol Cell Biol* 19: 3607–3613, 1999
17. Simmen KA, Singh J, Luukkonen BGM, Lopper M, Bittner A, Miller NE, Jackson MR, Compton T, Fruh K. Global modulation of cellular transcription by human cytomegalovirus is initiated by viral glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7140–7145, 2001.
18. Yurochko AD, Kowalik TF, Huong SM, Huang E-S. Human cytomegalovirus upregulates NF- $\kappa$ B activity by transactivating the NF- $\kappa$ B p105/p50 and p65 promoter. *J Virol* 69: 5391–5400, 1995.
19. Fortunato EA, Spector DH. Regulation of human cytomegalovirus gene expression. *Adv Virus Res* 54: 61–128, 1999.
20. Meier JL, Stinski MF. Effect of a modulator deletion on transcription of the human cytomegalovirus major immediate-early genes in infected undifferentiated and differentiated cells. *J Virol* 71: 1246–1255, 1997.
21. Margolis MJ, Pajovic S, Wong EL, Wade M, Jupp R, Nelson JA, Clifford Azizkhan J. Interaction of the 72-kilodalton human cytomegalovirus IE1 gene product with E2F1 coincides with E2F-dependent activation of dihydrofolate reductase transcription. *J Virol* 69: 7759–7767, 1995.
22. Song Y, Stinski MF. Effect of the human cytomegalovirus IE86 protein on expression of E2F-responsive genes: a DNA microarray analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 2836–2841, 2002.
23. Fortunato EA, McElroy AK, Sanchez V, Spector DH. Exploitation of cellular signalling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol* 8: 111–119, 2000.
24. Kalejta RF, Shenk T. Manipulation of the cell cycle by human cytomegalovirus. *Front Biosci* 7: 295–306, 2002.
25. Murphy EA, Streblow DN, Nelson JA, Stinski MF. The human cytomegalovirus IE86 protein can block cell cycle progression after inducing transition into the S phase of permissive cells. *J Virol* 74: 7108–7118, 2000.
26. Stasiak PC, Mocarski ES. Transactivation of the human cytomegalovirus ICP36 gene promoter requires the a gene product TRS1 in addition to the IE1 and IE2. *J Virol* 66: 1050–1058, 1992.
27. Jones TR, Wiertz EJ, Sun L, Fish KN, Nelson JA, Ploegh HL. Human cytomegalovirus US3 impairs transport and maturation of major histocompatibility complex class I heavy chains. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11327–11333, 1996.
28. Skaletskaya A, Bartle LM, Chittenden T, McCormick AL, Mocarski ES, Goldmacher VS. A cytomegalovirus-encoded inhibitor of apoptosis that suppresses caspase-8 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 7829–7834, 2001.
29. Chambers J, Angulo A, Amaratunga D, Guo H, Jiang Y, Wan JS, Bittner A, Fruh K, Jackson MR, Peterson PA, Erlander MG, Ghazal P. DNA microarrays of the complex human cytomegalovirus genome: profiling

- kinetic class with drug sensitivity of viral gene expression. *J Virol* 73: 5757–5766, 1999.
30. Sarisky RT, Hayward GS. Evidence that the UL84 gene product of human cytomegalovirus is essential for promoting oriLytdpendent DNA replication and formation of replication compartments in cotransfection assays. *J Virol* 70: 7398–7413, 1996.
  31. Cullen BR. Viruses and microRNAs. *Nat Genet (Suppl)* 38: S25-S30, 2006.
  32. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2: 269–276, 2005.
  33. Grey F, Antoniewicz A, Allen E, Saugstad J, McShea A, Carrington JC, Nelson J. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J Virol* 79: 12095–12099, 2005.
  34. Mettenleiter TC. Herpesvirus assembly and egress. *J Virol* 76: 1537–1547, 2002.
  35. Sanchez V, Sztul E, Britt W. Accumulation of virion tegument and envelope proteins in a stable cytoplasmic compartment during human cytomegalovirus replication: characterization of a potential site of virus assembly. *J Virol* 74: 975–986, 2000.
  36. McElroy AK, Dwarakanath RS, Spector DH. Dysregulation of cyclin E gene expression in human cytomegalovirus-infected cells requires viral early gene expression and is associated with changes in the Rb-related protein p130. *J Virol* 74: 4192-206, 2000.
  37. Sanchez V, McElroy AK, Spector DH. Mechanisms governing maintenance of Cdk1/cyclin B1 kinase activity in cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol* 77:13214-24, 2003.
  38. Bresnahan WA, Boldogh I, Thompson EA, Albrecht T. Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrests productively infected cells in late G1. *Virology* 224:150-60, 1996.
  39. Lu M, Shenk T. Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G1 to S. *J Virol* 70: 8850-7, 1996.
  40. Salvant BS, Fortunato EA, Spector DH. Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J Virol* 72: 3729-41, 1998.
  41. Wiebusch L, Hagemeyer C. Human cytomegalovirus 86-kilodalton IE2 protein blocks cell cycle progression in G(1). *J Virol* 73: 9274-83, 1999.
  42. Dittmer D, Mocarski ES. Human cytomegalovirus infection inhibits G1/S transition. *J Virol* 71: 1629-34, 1997.
  43. Jault FM, Jault JM, Ruchti F, Fortunato EA, Clark C, Corbeil J, Richman DD, Spector DH. Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol* 69: 6697-6704, 1995.
  44. Fortunato EA, Spector DH. p53 and RPA are sequestered in viral replication centers in the nuclei of cells infected with human cytomegalovirus. *J Virol* 72: 2033-9, 1998.
  45. Boldogh I, AbuBakar S, Deng CZ, Albrecht T. Transcriptional activation of cellular oncogenes fos, jun, and myc by human cytomegalovirus. *J Virol* 65: 1568-71, 1991.

46. Isom HC. Stimulation of ornithine decarboxylase by human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 42: 265-78, 1979.
47. Winkler M, Rice SA, Stamminger T. UL69 of human cytomegalovirus, an open reading frame with homology to ICP27 of herpes simplex virus, encodes a transactivator of gene expression. *J Virol* 68: 3943-54, 1994.
48. Hayashi ML, Blankenship C, Shenk T. Human cytomegalovirus UL69 protein is required for efficient accumulation of infected cells in the G1 phase of the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2692-6, 2000.
49. Dunn W, Chou C, Li H, Hai R, Patterson D, Stolc V, Zhu H, Liu F. Functional profiling of a human cytomegalovirus genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 14223-8, 2003.
50. Kalejta RF, Bechtel JT, Shenk T. Human cytomegalovirus pp71 stimulates cell cycle progression by inducing the proteasome-dependent degradation of the retinoblastoma family of tumor suppressors. *Mol Cell Biol* 23: 1885-95, 2003.
51. Kalejta RF, Shenk T. Proteasome-dependent, ubiquitin-independent degradation of the Rb family of tumor suppressors by the human cytomegalovirus pp71 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 3263-8, 2003.
52. Castillo JP, Yurochko AD, Kowalik TF. Role of human cytomegalovirus immediate-early proteins in cell growth control. *J Virol* 74: 8028-37, 2000.
53. Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801, 2000.
54. Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* 96: 245-54, 1999.
55. Ameisen JC, Estaquier J, Idziorek T. From AIDS to parasite infection: pathogen-mediated subversion of programmed cell death as a mechanism for immune dysregulation. *Immunol Rev* 142: 9-51, 1994.
56. Roulston A, Marcellus RC, Branton PE. Viruses and apoptosis. *Annu Rev Microbiol* 53: 577-628, 1999.
57. Buggage RR, Chan CC, Matteson DM, Reed GF, Whitcup SM. Apoptosis in cytomegalovirus retinitis associated with AIDS. *Curr Eye Res* 21: 721-9, 2000.
58. Fleck M, Kern ER, Zhou T, Podlech J, Wintersberger W, Edwards CK 3rd, Mountz JD. Apoptosis mediated by Fas but not tumor necrosis factor receptor 1 prevents chronic disease in mice infected with murine cytomegalovirus. *J Clin Invest* 102: 1431-43, 1998.
59. Hansen PR, Holm AM, Svendsen UG, Olsen PS, Andersen CB. Apoptosis in acute pulmonary allograft rejection and cytomegalovirus infection. *APMIS* 107: 529-33, 1999.
60. Krogerus L, Soots A, Loginov R, Bruggeman C, Ahonen J, Lautenschlager I. CMV accelerates tubular apoptosis in a model of chronic renal allograft rejection. *Transplant Proc* 33: 254, 2001.
61. Goldmacher VS, Bartle LM, Skaletskaya A, Dionne CA, Kedersha NL, Vater CA, Han JW, Lutz RJ, Watanabe S, Cahir McFarland ED, Kieff ED, Mocarski ES, Chittenden T. A cytomegalovirus-encoded mitochondria-localized inhibitor of apoptosis structurally unrelated to Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 12536-41, 1999.



62. Zhu H, Shen Y, Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis. *J Virol* 69: 7960–70, 1995.
63. Tanaka K, Zou JP, Takeda K, Ferrans VJ, Sandford GR, Johnson TM, Finkel T, Epstein SE. Effects of human cytomegalovirus immediate-early proteins on p53-mediated apoptosis in coronary artery smooth muscle cells. *Circulation* 99: 1656-9, 1999.
64. Slee EA, O'Connor DJ, Lu X. To die or not to die: how does p53 decide? *Oncogene* 23: 2809-18, 2004. Review.
65. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2: 594-604, 2002.
66. Rowan S, Ludwig RL, Haupt Y, Bates S, Lu X, Oren M, Vousden KH. Specific loss of apoptotic but not cell-cycle arrest function in a human tumor derived p53 mutant. *EMBO J* 15: 827-38, 1996.
67. Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell* 11: 577-90, 2003.
68. Chen Z, Knutson E, Kurosky A, Albrecht T. Degradation of p21cip1 in cells productively infected with human cytomegalovirus. *J Virol* 75: 3613-25, 2001.
69. Muganda P, Mendoza O, Hernandez J, Qian Q. Human cytomegalovirus elevates levels of the cellular protein p53 in infected fibroblasts. *J Virol* 68: 8028-34, 1994.
70. Bonin LR, McDougall JK. Human cytomegalovirus IE2 86-kilodalton protein binds p53 but does not abrogate G1 checkpoint function. *J Virol* 71: 5861-70, 1997.
71. Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, Epstein SE. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 265: 391-4, 1994.
72. Hsu CH, Chang MD, Tai KY, Yang YT, Wang PS, Chen CJ, Wang YH, Lee SC, Wu CW, Juan LJ. HCMV IE2-mediated inhibition of HAT activity downregulates p53 function. *EMBO J* 23: 2269-80, 2004.
73. Muganda P, Carrasco R, Qian Q. The human cytomegalovirus IE2 86 kDa protein elevates p53 levels and transactivates the p53 promoter in human fibroblasts. *Cell Mol Biol* 44: 321-31, 1998.
74. Kouzarides T, Bankier AT, Satchwell SC, Preddy E, Barrell BG. An immediate early gene of human cytomegalovirus encodes a potential membrane glycoprotein. *Virology* Jul;165(1):151-64, 1988.
75. Tenney DJ, Colberg-Poley AM. Expression of the human cytomegalovirus UL36-38 immediate early region during permissive infection. *Virology* 182: 199-210, 1991.
76. Tenney DJ, Colberg-Poley AM. Human cytomegalovirus UL36-38 and US3 immediate-early genes: temporally regulated expression of nuclear, cytoplasmic, and polysome-associated transcripts during infection. *J Virol* 65: 6724-34, 1991.
77. Colberg-Poley AM, Santomenna LD, Harlow PP, Benfield PA, Tenney DJ. Human cytomegalovirus US3 and UL36-38 immediate-early proteins regulate gene expression. *J Virol* 66: 95-105, 1992.

78. Iskenderian AC, Huang L, Reilly A, Stenberg RM, Anders DG. Four of eleven loci required for transient complementation of human cytomegalovirus DNA replication cooperate to activate expression of replication genes. *J Virol* 70: 383-92, 1996.
79. Pari GS, Anders DG. Eleven loci encoding trans-acting factors are required for transient complementation of human cytomegalovirus oriLyt-dependent DNA replication. *J Virol* 67: 6979-88, 1993.
80. Mavinakere MS, Colberg-Poley AM. Dual targeting of the human cytomegalovirus UL37 exon 1 protein during permissive infection. *J Gen Virol* 85: 323-9, 2004.
81. Arnoult D, Bartle LM, Skaletskaya A, Poncet D, Zamzami N, Park PU, Sharpe J, Youle RJ, Goldmacher VS. Cytomegalovirus cell death suppressor vMIA blocks Bax- but not Bak-mediated apoptosis by binding and sequestering Bax at mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 7988-93, 2004.
82. Reboredo M, Greaves RF, Hahn G. Human cytomegalovirus proteins encoded by UL37 exon 1 protect infected fibroblasts against virus-induced apoptosis and are required for efficient virus replication. *J Gen Virol* 85: 3555-3567, 2004.
83. Cooray S. The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *J Gen Virol* 85: 1065-76, 2004.
84. Johnson RA, Wang X, Ma XL, Huong SM, Huang ES. Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits viral replication and virus-induced signaling. *J Virol* 75: 6022-32, 2001.
85. Yu Y, Alwine JC. Human cytomegalovirus major immediate-early proteins and simian virus 40 large T antigen can inhibit apoptosis through activation of the phosphatidylinositide 3'-OH kinase pathway and the cellular kinase Akt. *J Virol* 76: 3731-8, 2002.
86. Soderberg-Naucler C. Does cytomegalovirus play a causative role in the development of various inflammatory diseases and cancer? *J intern Med* 259: 219-246, 2006.
87. Harkins L, Volk AL, Samanta M, Mikolaenko I, Britt WJ, bland KI, Cobbs CS. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *Lancet* 360: 1557-63, 2002.
88. Samanta M, Harkins L, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS. High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma. *J Urol* 170: 998-1002, 2003.
89. Cobbs CS, Harkins L, Samanta M, et al. Human cytomegalovirus infection and expression in human malignant glioma. *Cancer Res* 62: 3347-50, 2002.
90. Ibanez CE, Schrier R, Ghazal P, Wiley C, Nelson JA. Human cytomegalovirus productively infects primary differentiated macrophages. *J Virol* 65: 6581-8, 1991.
91. Jarvis MA, Nelson JA. Human cytomegalovirus persistence and latency in endothelial cells and macrophages. *Curr Opin Microbiol* 5: 403-7, 2002.
92. Taylor-Wiedeman J, Sissons P, Sinclair J. Induction of endogenous human cytomegalovirus gene expression after differentiation of monocytes from healthy carriers. *J Virol* 68: 1597-604, 1994.

93. Soderberg-Naucler C, Fish KN, Nelson JA. Interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha specifically induce formation of cytomegalovirus-permissive monocyte-derived macrophages that are refractory to the antiviral activity of these cytokines. *J Clin Invest* 100: 3154–63, 1997.
94. Docke WD, Prosch S, Fietze E, et al. Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor. *Lancet* 343: 268–9, 1994.
95. Prosch S, Heine AK, Volk HD, Kruger DH. CCAAT/enhancer-binding proteins alpha and beta negatively influence the capacity of tumor necrosis factor alpha to up-regulate the human cytomegalovirus IE1/2 enhancer/promoter by nuclear factor kappaB during monocyte differentiation. *J Biol Chem* 276: 40712–20, 2001.
96. Docke WD, Kiessling C, Worm M, et al. Subclinical activation of latent cytomegalovirus (CMV) infection and anti-CMV immune response in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol* 148: 954–63, 2003.
97. Kutza AS, Muhl E, Hackstein H, Kirchner H, Bein G. High incidence of active cytomegalovirus infection among septic patients. *Clin Infect Dis* 26: 1076–82, 1998.
98. Meijer E, Boland GJ, Verdonck LF. Prevention of cytomegalovirus disease in recipients of allogeneic stem cell transplants. *Clin Microbiol Rev* 16: 647–57, 2003.
99. Looney RJ, Falsey A, Campbell D et al. Role of cytomegalovirus in the T cell changes seen in elderly individuals. *Clin Immunol* 90: 213–9, 1999.
100. Reyburn HT, Mandelboim O, Vales-Gomez M, Davis DM, Pazmany L, Strominger JL. The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells. *Nature* 386: 514–7, 1997.
101. Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, Tabi Z. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 99: 2913–21, 2002.
102. Spencer JV, Lockridge KM, Barry PA, et al. Potent immunosuppressive activities of cytomegalovirus-encoded interleukin-10. *J Virol* 76: 1285–92, 2002.
103. Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* 383: 720–2, 1996.
104. Tomazin R, Boname J, Hegde NR, et al. Cytomegalovirus US2 destroys two components of the MHC class II pathway, preventing recognition by CD4+ T cells. *Nat Med* 5: 1039–43, 1999.
105. Schrier RD, Rice GP, Oldstone MB. Suppression of natural killer cell activity and T cell proliferation by fresh isolates of human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 153: 1084–91, 1986.
106. Furukawa T, Hornberger E, Sakuma S, Plotkin SA. Demonstration of immunoglobulin G receptors induced by human cytomegalovirus. *J Clin Microbiol* 2: 332–6, 1975.
107. Lilley BN, Ploegh HL, Tirabassi RS. Human cytomegalovirus open reading frame TRIL11/IRL11 encodes an immunoglobulin G Fc-binding protein. *J Virol* 75: 11218–21, 2001.

108. Atalay R, Zimmermann A, Wagner M, et al. Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fc-gamma receptor homologs. *J Virol* 76: 8596–608, 2002.
109. Spiller OB, Morgan BP, Tufaro F, Devine DV. Altered expression of host encoded complement regulators on human cytomegalovirus infected cells. *Eur J Immunol* 26: 1532–8, 1996.
110. Moses AV, Garnett HM. The effect of human cytomegalovirus on the production and biologic action of interleukin-1. *J Infect Dis* 162: 381–8, 1990
111. Almeida GD, Porada CD, St Jeor S, Ascensao JL. Human cytomegalovirus alters interleukin-6 production by endothelial cells. *Blood* 83: 370–6, 1994.
112. Smith PD, Saini SS, Raffeld M, Manischewitz JF, Wahl SM. Cytomegalovirus induction of tumor necrosis factor-alpha by human monocytes and mucosal macrophages. *J Clin Invest* 90: 1642–8, 1992.
113. Compton T, Kurt-Jones EA, Boehme KW et al. Human cytomegalovirus activates inflammatory cytokine responses via CD14 and Toll-like receptor 2. *J Virol* 77: 4588–96, 2003.
114. Penfold ME, Dairaghi DJ, Duke GM et al. Cytomegalovirus encodes a potent alpha chemokine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9839–44, 1999.
115. Margulies BJ, Browne H, Gibson W. Identification of the human cytomegalovirus G protein-coupled receptor homologue encoded by UL33 in infected cells and enveloped virus particles. *J Virol* 225: 111–25, 1996.
116. Gao JL, Murphy PM. Human cytomegalovirus open reading frame US28 encodes a functional beta chemokine receptor. *J Biol Chem* 269: 28539–42, 1994.
117. Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis* 185: 273–82, 2002.
118. Huang G, Yan Q, Wang Z et al. Human cytomegalovirus in neoplastic cells of Epstein-Barr virus negative Hodgkin's disease. *Int J Oncol* 21: 31–6, 2002.
119. Pacsa AS, Kummerlander L, Pejtsik B, Pali K. Herpesvirus antibodies and antigens in patients with cervical anaplasia and in controls. *J Natl Cancer Inst* 55: 775–81, 1975.
120. Cinatl J, Scholz M, Kotchetkov R, Vogel JU, Doerr HW. Molecular mechanisms of the modulatory effects of HCMV infection in tumor cell biology. *Trends Mol Med* 10:19–23, 2004.
121. Cinatl J, Jr, Vogel JU, Kotchetkov R, Wilhelm Doerr H. Oncomodulatory signals by regulatory proteins encoded by human cytomegalovirus: a novel role for viral infection in tumor progression. *FEMS Microbiol Rev* 28: 59–77, 2004.
122. Cinatl J, Jr, Scholz M, Doerr HW. Role of tumor cell immune escape mechanisms in cytomegalovirus-mediated oncomodulation. *Med Res Rev* 25: 167–85, 2005.

123. Cinatl J, Jr, Scholz M, Doerr HW. Role of tumor cell immune escape mechanisms in cytomegalovirus-mediated oncomodulation. *Med Res Rev* 25: 167–85, 2005.
124. Murphy JC, Fischle W, Verdin E, Sinclair JH. Control of cytomegalovirus lytic gene expression by histone acetylation. *EMBO J* 21: 1112–20, 2002.
125. Nevels M, Paulus C, Shenk T. Human cytomegalovirus immediate-early 1 protein facilitates viral replication by antagonizing histone deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17234–9, 2004.
126. Spiller OB, Borysiewicz LK, Morgan BP. Development of a model for cytomegalovirus infection of oligodendrocytes. *J Gen Virol* 78: 3349–56, 1997.
127. Scholz M, Blaheta RA, Wittig B, et al. Cytomegalovirus-infected neuroblastoma cells exhibit augmented invasiveness mediated by beta1alpha5 integrin (VLA-5). *Tissue Antigens* 55: 412–21, 2000.
128. Blaheta RA, Beecken WD, Engl T, et al. Human cytomegalovirus infection of tumor cells downregulates NCAM (CD56): a novel mechanism for virus-induced tumor invasiveness. *Neoplasia* 6: 323–31, 2004.
129. Cinatl J, Jr, Cinatl J, Vogel JU, et al. Persistent human cytomegalovirus infection induces drug resistance and alteration of programmed cell death in human neuroblastoma cells. *Cancer Res* 58: 367–72, 1998.
130. Martelius TJ, Wolff H, Bruggeman CA, Hockerstedt KA, Lautenschlager IT. Induction of cyclo-oxygenase-2 by acute liver allograft rejection and cytomegalovirus infection in the rat. *Transpl Int* 15: 610–4, 2002.
131. Rue CA, Jarvis MA, Knoche AJ, et al. A cyclooxygenase-2 homologue encoded by rhesus cytomegalovirus is a determinant for endothelial cell tropism. *J Virol* 78: 12529–36, 2004.
132. Pulakhandam U, Dincsoy HP. Cytomegaloviral adrenalitis and adrenal insufficiency in AIDS. *Am J Clin Pathol* 93: 651–656, 1990.
133. Razzaq F, Dunbar EM, Bonington A. The development of cytomegalovirus-induced adrenal failure in a patient with AIDS while receiving corticosteroid therapy. *HIV Med* 3: 212–214, 2002.
134. Hoshino Y, Nagata Y, Gatanaga H, Hosono O, Morimoto C, Tachikawa N et al. Cytomegalovirus (CMV) retinitis and CMV antigenemia as a clue to impaired adrenocortical function in patientd with AIDS. *AIDS* 11: 1719–1724, 1997.
135. Lathey JL, Spector SA. Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages. *J Virol* 65: 6371–5, 1991.
136. Tanaka J, Ogura T, Kamiya S, Sato H, Yoshie T, Ogura H, Hatano M. Enhanced replication of human cytomegalovirus in human fibroblasts treated with dexamethasone. *J Gen Virol* 65: 1759–1757, 1984.
137. Koment RW. Restriction to human cytomegalovirus replication *in vitro* removed by physiological levels of cortisol. *J Med Virol* 27: 44–7, 1989.
138. Pomara G, Cappello F, Barzon L, Morelli G, Rappa F, Benvenga L, Giannarini G, Palù G, Selli C. Cytomegalovirus and BK-virus co-infection of a clinically non-functioning adrenal adenoma: innocent bystanders or new pathogenetic agents? *Eur J Histochem* 50: 131–132, 2006.

139. Leibovitz A, McCombs WM, Johnston D, McCoy CE, Stinson JC. New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex. *J Natl Cancer Inst* 51: 691-7, 1973.
140. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MFM, Stein CA, La Rocca RV. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 50: 5488-96, 1990.
141. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP. Characterization of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227: 168-170, 1970.
142. Shanley JD, Lutwick LI, Donta ST. Replication of murine cytomegalovirus in Y-1 cells. *J Med Virol* 4: 261-8, 1979.
143. Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature* 390: 311-5, 1997.
144. Ito M, Yu R, Jameson JL. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol* 17: 1476-83, 1997.
145. Christenson LK, Strass III JF. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. *Biochim Biophys Acta* 1529: 175-187, 2000.
146. Fassnacht M, Beuschlein F, Vay S, Mora P, Allolio B, Reincke M. Aminoglutethimide suppresses adrenocorticotropin receptor expression in the NCI-H295 adrenocortical tumor cell line. *J Endocrinol* 159: 35-42, 1998.
147. Darbeida H, Durand P. Glucocorticoid enhancement of glucocorticoid production by cultured ovine adrenocortical cells. *Biochim Biophys Acta* 972: 200-8, 1988.
148. Tanaka J, Ogura T, Kamiya S, Yoshie T, Yabuki Y, Hatano M. Dexamethsone enhances human cytomegalovirus replication in human epithelial cell cultures. *Virology* 136: 448-452, 1984.
149. Glaser R, Kutz LA, MacCallum RC, Malarkey WB. Hormonal modulation of Epstein-barr virus replication. *Neuroendocrinol* 62: 356-361, 1995.
150. Bauer G. Induction of Epstein-Barr virus early antigens by corticosteroids: inhibition by TPA and retinoic acid. *Int J Cancer* 31: 291-295, 1983.
151. Schuster CS, Chasserot-Golaz S, Beck G. Activation of Epstein-Barr virus promoters by a growth-factors and a glucocorticoid. *FEBS Lett* 284: 82-86, 1991.
152. Notter MFD, Docherty JJ. Steroid hormone alteration of Herpes simplex virus type 1 replication. *J Med Virol* 2: 247-252, 1978.
153. Amstey MS. Effect of pregnancy hormones on herpesvirus and other deoxyribonucleic acid virus. *Am J Obstet Gynecol* 15: 159-163, 1977.
154. Kupfer SR, Summer WC. Identification of a glucocorticoid-responsive element in Epstein-Barr virus. *J Virol* 64: 1984-1990, 1990.
155. Schuster CS, Chasserot-Golaz S, Urier G, Beck G, Sergeant A. Evidence for a functional glucocorticoid responsive element in the Epstein-Barr virus genome. *Mol Endocrinol* 5: 267-272, 1991.

156. Graves PE, Salhanick HA. Stereoselective inhibition of aromatase by enantiomers of aminoglutethimide. *Endocrinology* 105: 52-57, 1979.
157. Uzgiris VI, Whipple CA, Salhanick HA. Stereoselective inhibition of cholesterol side chain cleavage by enantiomers of aminoglutethimide. *Endocrinology* 101: 89-92, 1977.
158. Ozmen L, Pericin M, Hakimi J, Chizzonite RA, Wysocka M, Trinchieri G, Gately M, Garotta G. Interleukin 12, interferon  $\gamma$ , and tumor necrosis factor  $\alpha$  are the key cytokines of the generalized Shwartzman reaction. *J Exp Med* 180: 907-915, 1994.
159. Ruzek MC, Miller AH, Opal SM, Pearce BD, Biron CA. Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection. *J Exp Med* 185: 1185-1192, 1997.
160. Path G, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. Interleukin-6 and interleukin-6 receptor in the human adrenal gland: Expression and effects on steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2343-2349, 1997.
161. Bornstein SR, Rutkowski H, Vrezas I. Cytokines and steroidogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 215: 135-141, 2004.
162. Gealy C, Denson M, Humphreys C, McSharry B, Wilkinson G, Caswell R. Posttranscriptional suppression of interleukin-6 production by human cytomegalovirus. *J Virol* 79: 472-485, 2006.
163. Michaelis M, Kotchetkov R, Vogel JU, Doerr HW, Cinatl J Jr. Cytomegalovirus infection blocks apoptosis in cancer cells. *Cell Mol Life Sci* 61: 1307-16, 2004.
164. Odeberg J, Wolmer N, Falci S, Westgren M, Seiger A, Söderberg-Nauclér C. Human cytomegalovirus inhibits neuronal differentiation and induces apoptosis in human neural precursor cells. *J Virol* 80: 8929-39, 2006.
165. Shen YH, Utama B, Wang J, Raveendran M, Senthil D, Waldman WJ, Belcher JD, Vercellotti G, Martin D, Mitchell BM, Wang XL. Human cytomegalovirus causes endothelial injury through the ataxia telangiectasia mutant and p53 DNA damage signaling pathways. *Circ Res* 94: 1310-7, 2004.
166. Huang ES, Benson JD, Huang SM, Wilson B, van der Horst C. Irreversible inhibition of human cytomegalovirus replication by topoisomerase II inhibitor, etoposide: a new strategy for the treatment of human cytomegalovirus infection. *Antiviral Res* 17: 17-32, 1992.
167. Zhang YL, Ma WL, Mo XY, Zhao HQ, Ke CW, Zheng HY, Zheng WL. Human cytomegalovirus induces apoptosis of ECV304 endothelial-like cells. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 26: 316-20, 2006.
168. Benson JD, Huang ES. Two specific topoisomerase II inhibitors prevent replication of human cytomegalovirus DNA: an implied role in replication of the viral genome. *J Virol* 62: 4797-800, 1988.
169. AbuBakar S, Au WW, Legator MS, Albrecht T. Induction of chromosome aberrations and mitotic arrest by cytomegalovirus in human cells. *Environ Mol Mutagen* 12: 409-20, 1988.
170. Kamiya S, Tanaka J, Ogura T, Ogura H, Sato H, Hatano M. Rabbit kidney cells abortively infected with human cytomegalovirus are arrested in mitotic phase. *Arch Virol* 89: 131-44, 1986.

171. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410: 37-40, 2001.
172. Johnson TR, Biggs JR, Winburn SE, Kraft AS. Regulation of dual-specificity phosphatases M3/6 and hVH-5 by phorbol esters. *J Biol Chem* 275: 31755-62, 2000.
173. Nesbit MA, Hodges MD, Campbell L, de Meulermester TM, Alders M, Rodrigues NR, Talbot K, Theodosiou AM, Mannens MA, Nakamura S, Little PFR, Davies KE. Genomic organization and chromosomal localization of a member of the MAP kinase phosphatase gene family to human chromosome 11p15.5 and a pseudogene 11q11.2. *Genomics* 42: 284-94, 1997.
174. Dubyak GR, el-Moatassim C. Signal transduction via P2-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J Physiol* 265: C577-606, 1993.
175. Burnstock G. Overview. Purinergic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 603: 1-17, 1990.
176. Harden TK, Boyer JL, Nicholas RA. P2-purinergic receptors: subtype-associated signaling responses and structure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 541-79, 1995.
177. Ralevic V, Burnstock G. Roles of P2-purinoceptors in the cardiovascular system. *Circulation* 84: 1-14, 1991.
178. Hoey ED, Nicol M, Williams BC, Walker SW. Primary cultures of bovine inner zone adrenocortical cells secrete cortisol in response to adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, and uridine triphosphate via a nucleotide receptor which may be coupled to two signal generation systems. *Endocrinology* 135: 1553-60, 1994.
179. Dalziel HH, Westfall DP. Receptors for adenine nucleotides and nucleosides: subclassification, distribution, and molecular characterization. *Pharmacol Rev* 46: 449-66, 1994.
180. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M. Nomenclature and classification of purinoceptors. *Pharmacol Rev* 46: 143-56, 1994.
181. Bean BP. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends Pharmacol Sci* 13: 87-90, 1992.
182. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinoceptors: are there families of P2X and P2Y purinoceptors? *Pharmacol Ther* 64: 445-75, 1994.
183. Barnard EA, Burnstock G, Webb TE. G protein-coupled receptors for ATP and other nucleotides: a new receptor family. *Trends Pharmacol Sci* 15: 67-70, 1994.
184. Vulchanova L, Arvidsson U, Riedl M, Wang J, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R. Differential distribution of two ATP-gated ion channels (P2X receptors) determined by immunocytochemistry. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8063-8067, 1996.
185. Afework M, Burnstock G. Localization of P2X receptors in the Guinea Pig Adrenal Gland. *Cell Tissues Organs* 167: 297-302, 2000.
186. Tomè AR, Castro E, Santos RM, Rosario LM. Selective stimulation of catecholamine release from bovine adrenal chromaffin cells by an



- ionotropic purinergic receptor sensitive to 2-methylthio ATP. *BMC Neurosci* 8: 41, 2007.
187. Nishi H, Hori S, Niitsu A, Kawamura M. Adenosine 5'-(gamma-thio)triphosphate(ATP $\gamma$ S) stimulates both P2Y receptors linked to inositol phosphates production and cAMP accumulation in bovine adrenocortical fasciculata cells. *Life Sci* 74: 1181-1190, 2004.
  188. Nishi H. Two different P2Y receptors linked to steroidogenesis in bovine adrenocortical cells. *Jpn J Pharmacol*, 81: 194-199, 1999.- Mateo J, Miras-Portugal MT, Castro E. Co-existence of P2Y-and PPADS-insensitive P2U-purinoceptors in endothelial cells from adrenal medulla. *Br J Pharmacol* 119: 1223-1232, 1996.
  189. Winkler H, Westhead E. The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* 5: 1803-1823, 1980.
  190. Juranyi Z, Orsò E, Janssy K, Szaly A, Sperlagh B, Windisch K, Vinson GP, Vizi ES. ATP and [3H]Noradrenaline release and the presence of ecto-Ca<sup>2+</sup>-ATPases in the capsule-glomerulosa fraction of rat adrenal gland. *J Endocrinol* 153: 105-114, 1997.
  191. Kawamura M, Matsui T, Niitsu A, Kondo T, Ohno Y, Nakamichi N. Extracellular ATP stimulates steroidogenesis in bovine adrenocortical fasciculata cells via P2 purinoceptors. *Jpn Pharmacol* 56: 543-545, 1991.
  192. Niitsu A. Calcium is essential for ATP-induced steroidogenesis in bovine adrenal fasciculata cells. *Jpn J Pharmacol* 60: 269-274, 1992.
  193. Xu L, Enyeart J. Purine and Pyrimidine nucleotide inhibit a noninactivating K<sup>+</sup> current and depolarize adrenal cortical cells through a G protein-coupled receptor. *Mol Pharmacol* 55: 364-376, 1999.
  194. Nishi H, Kato F, Masaki , Kawamura M. ADP-sensitive purinoceptors induce steroidogenesis via adenylyl cyclase activation in bovine adrenocortical fasciculata cells. *Br J of Pharmacol* 137: 177-184, 2002.
  195. Burnstock G. The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology* 36: 1127-1139, 1997.
  196. Torres B, Zambon A, Insel P. P2Y<sub>11</sub> receptors activate adenylyl cyclase and contribute to nucleotide-promoted cAMP formation in MDCK-D1 cells. *J Biol Chem* 277: 7761-7765, 2002.
  197. Verploegen S, Ulfman L, van Deutekom HW, van Aalst C, Honing H, Lammers JW, Koenderman L, Coffey PJ. Characterization of the role of CAMKI-like kinase (CKLiK) in human granulocyte function. *Blood* 106: 1076-83, 2005.
  198. Yamada T, Suzuki M, Satoh H, Kihara-Negishi F, Nakano H, Oikawa T. Effects of PU.1-induced mouse calcium-calmodulin-dependent kinase I-like kinase (CKLiK) on apoptosis of murine erythroleukemia cells. *Exp Cell Res* 294: 39-50, 2004.
  199. Wang R, Xu J, Mabjeesh N, Zhu G, Zhou J, Amin M, He D, Marshall FF, Zhau HE, Chung LW. PrLZ is expressed in normal prostate development and in human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 13: 6040-8, 2007.
  200. Byrne JA, Balleine RL, Schoenberg Fejzo M, Mercieca J, Chiew YE, Livnat Y, St Heaps L, Peters GB, Byth K, Karlan BY, Slamon DJ, Harnett P,

- Defazio A. Tumor protein D52 (TPD52) is overexpressed and a gene amplification target in ovarian cancer. *Int J Cancer* 117: 1049-54, 2005.
201. Tiacci E, Orvietani PL, Bigerna B, Pucciarini A, Corthals GL, Pettirossi V, Martelli MP, Liso A, Benedetti R, Pacini R, Bolli N, Pileri S, Pulford K, Gambacorta M, Carbone A, Pasquarello C, Scherl A, Robertson H, Sciarpi MT, Alunni-Bistocchi G, Binaglia L, Byrne JA, Falini B. Tumor protein D52 (TPD52): a novel B-cell/plasma-cell molecule with unique expression pattern and Ca(2+)-dependent association with annexin VI. *Blood* 105: 2812-20, 2005.
  202. Cully M, Shiu J, Piekorz RP, Muller WJ, Done SJ, Mak TW. Transforming acidic coiled coil 1 promotes transformation and mammary tumorigenesis. *Cancer Res* 65: 10363-70, 2005.
  203. Crosby ME, Almasan A. Opposing roles of E2Fs in cell proliferation and death. *Cancer Biol Ther* 3: 1208-11, 2004.
  204. Battersby S, Critchley HO, Morgan K, Millar RP, Jabbour HN. Expression and regulation of the prokineticins (endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor and Bv8) and their receptors in the human endometrium across the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 2463-9, 2004.
  205. Vader G, Kaw JJ, Medema RH, Lens. Survivin mediates targeting of the chromosomal passenger complex to the centromere and midbody. *EMBO Rep* 7: 85-92, 2006.
  206. Bottecher S.G., Dethlefsen C. Deal: a Package for learning Bayesian Networks. *Journal of statistical software* 8(20) 2003.

## 11 RINGRAZIAMENTI

Desidero innanzitutto ringraziare il Prof. Giorgio Palù per avermi dato l'opportunità di svolgere questa esperienza di dottorato nel suo laboratorio e per aver costantemente coordinato questo progetto e la Dott.ssa Luisa Barzon, per il supporto scientifico, la supervisione e la discussione critica dei dati. Desidero inoltre ringraziare il Dottor Riccardo Cusinato e la Prof.ssa Arianna Loregian per la gentile concessione di materiali e protocolli. Per la parte di analisi statistica, vorrei ringraziare la Prof.ssa Irene Poli, dell'European Center for Living Technology di Venezia e le dottoresse Debora Slanzi e Laura Villanova del Dipartimento di scienze statistiche, rispettivamente, dell'Università Cà Foscari (Venezia) e di Padova. Infine, un grazie di cuore alle mie colleghe, in particolar modo alla Dottoressa Giulia Masi, per la collaborazione in fase di avvio del progetto, ma anche alle Dottoresse Monia Pacenti, Urska Matkovic, Valentina Militello, e ai colleghi, i Dottori Enrico Lavezzo ed Alessandro Sinigaglia, per la collaborazione ed il sostegno durante questi tre lunghi anni.



---

## 12 ALLEGATI

Vengono allegati qui di seguito i lavori pubblicati su riviste Internazionali durante i 3 anni di dottorato, dai titoli:

1. Barzon L, Masi G, Pacenti M, Trevisan M, Fallo F, Remo A, Martignoni G, Montanaro D, Pezzi V, Palù G. Expression of aromatase and estrogen receptors in human adrenocortical tumors. *Virchows Arch*, 2007.
2. Barzon L, Maffei P, Sonino N, Pilon C, Baldazzi L, Balsamo A, Del Maschio O, Masi G, Trevisan M, Pacenti M, Fallo F. The role of 21-hydroxylase in the pathogenesis of adrenal masses: review of the literature and focus on our own experience. *J Endocrinol Invest* 30: 615-23, 2007.
3. Barzon L, Trevisan M, Masi G, Pacenti M, Sinigaglia A, Macchi V, Porzionato A, De Caro R, Favia G, Iacobone M, Palù G. Detection of polyomaviruses and herpesviruses in human adrenal tumors. *Oncogene*, 2007.
4. Barzon L, Gnatta E, Castagliuolo I, Trevisan M, Moretti F, Pontecorvi A, Boscaro M, Palù G. Modulation of retrovirally driven therapeutic genes by mutant TP53 in anaplastic thyroid carcinoma. *Cancer Gene Ther* 12: 381-8, 2005. Erratum in: *Cancer Gene Ther* 12: 723, 2005.



## Expression of aromatase and estrogen receptors in human adrenocortical tumors

Luisa Barzon · Giulia Masi · Monia Pacenti ·  
Marta Trevisan · Francesco Fallo · Andrea Remo ·  
Guido Martignoni · Daniela Montanaro ·  
Vincenzo Pezzi · Giorgio Palù

Received: 30 July 2007 / Revised: 8 October 2007 / Accepted: 30 October 2007  
© Springer-Verlag 2007

**Abstract** We recently demonstrated that adrenocortical carcinoma cells express aromatase and estrogen receptors (ERs) and that  $17\beta$ -estradiol enhances adrenocortical cell proliferation. To provide a clue to the role of estrogens in adrenal tumorigenesis, we investigated the expression profile of genes involved in sex steroid hormone production and activity in a large series of normal and neoplastic human adrenocortical tissues. Quantitative reverse transcriptase–polymerase chain reaction, Western blotting, and immunohistochemistry showed that ER $\alpha$  and ER $\beta$ , androgen receptor (AR), and aromatase were expressed in the adrenal cortex and in adrenocortical tumors. ER $\beta$  was the predominant ER subtype and was mainly expressed in the zona glomerulosa and fasciculata. Western blot analysis revealed the presence of a truncated form of AR in adrenocortical tissues. With respect to the normal

adrenal cortex and adrenocortical adenomas, carcinomas were characterized by significantly lower ER $\beta$  levels, ER $\alpha$  upregulation, and aromatase overexpression. ER expression correlated with expression of nuclear hormone receptors, suggesting they could be involved in ER modulation. In agreement with our *in vitro* findings, the results of this study suggest that estrogens, locally produced by aromatase, could enhance adrenocortical cell proliferation through autocrine/paracrine mechanisms. This study opens new perspectives on the potential use of antiestrogens and aromatase inhibitors as therapeutic agents against ACC.

**Keywords** Estrogen receptors · Androgen receptor · Adrenocortical tumors · Aromatase

L. Barzon (✉) · G. Masi · M. Pacenti · M. Trevisan · G. Palù  
Department of Histology,  
Microbiology and Medical Biotechnologies,  
University of Padova,  
Via A. Gabelli 63,  
35121 Padova, Italy  
e-mail: luisa.barzon@unipd.it

F. Fallo  
Department of Medical and Surgical Sciences,  
University of Padova,  
Padova, Italy

A. Remo · G. Martignoni  
Department of Pathology, University of Verona,  
Verona, Italy

D. Montanaro · V. Pezzi  
Department of Pharmaco-biology, University of Calabria,  
Arcavacata di Rende,  
Cosenza, Italy

### Introduction

Estrogens and androgens have been demonstrated to play a critical role in the etiology and progression of several endocrine-related malignancies, such as breast, ovarian, and prostate cancers. Some epidemiological and experimental studies suggest that sex steroid hormones could also be involved in adrenocortical tumorigenesis. In fact, adrenocortical tumors are more frequent in women than in men, especially in those exposed to estro-progestins [5, 12]. Moreover, we recently demonstrated that  $17\beta$ -estradiol enhances proliferation of the human adrenocortical carcinoma (ACC) cell line NCI-H295R, whereas antiestrogens inhibit ACC cell growth [19]. At variance, androgens have been shown to inhibit NCI-H295R cell proliferation, an effect that is reverted by antiandrogens [27, 36].

To date, only a few studies have investigated expression of estrogen receptors (ERs), androgen receptor

(AR), and aromatase—the enzyme responsible for estrogen biosynthesis—in the human adrenal cortex and in adrenocortical tumors.

The effects of estrogens are mediated by two ER subtypes, ER $\alpha$  and ER $\beta$ . While estrogens induce cancer cell proliferation through ER $\alpha$ , ER $\beta$  seems to exert a protective effect [4]. ER expression has been studied in the human fetal adrenal cortex, where ER $\beta$  is expressed at markedly higher levels than ER $\alpha$  [6, 34], and in pubertal human adrenal tissues, where ER $\beta$  is detectable in the zona reticularis, whereas ER $\alpha$  is undetectable [3]. Only anecdotal reports of ER expression in adrenal tumors are available in the literature [9, 22, 28]. Likewise, data on AR expression in the adrenal gland are limited to a few reports, which demonstrated the presence of AR messenger ribonucleic acid (mRNA) in normal and neoplastic human adrenocortical tissues [27]. The presence of aromatase has been recently demonstrated in the fetal adrenal gland [24], in the zona glomerulosa and medulla of the normal adrenal gland [3], in feminizing human adrenocortical tumors [25], and in NCI-H295R cells [19].

Expression and activity of ERs and AR are inhibited by the orphan nuclear hormone receptors DAX-1 (dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1) and SHP (small heterodimer partner) [11, 13, 37], which are also negative regulators of steroidogenic factor 1 (SF-1) and liver receptor homolog 1 (LRH-1) [33]. At variance, SF-1 and LRH-1 stimulate the expression of several steroidogenic enzymes and nuclear hormone receptors. In breast adipose stromal cells, LRH-1 enhances aromatase expression, thus contributing to the growth of estrogen-positive breast tumors [7, 38].

Following our experimental studies on the effects of estrogens and antiestrogens on ACC cells and on the basis of the above evidence from the literature, in the present study, we investigated expression of genes involved in sex steroid hormone production and activity in normal and neoplastic human adrenocortical tissues to provide a clue to the role of estrogens in adrenal tumorigenesis.

## Materials and methods

### Adrenocortical samples

We investigated archived fresh-frozen or paraffin-embedded samples of adrenocortical tumors removed at surgery, normal adrenal cortex macroscopically dissected from adrenal glands of kidney donors, and fetal adrenal glands obtained at autopsy (Table 1). Tissue samples were obtained with the approval of local ethics committees and consent from patients, in accordance with the Declaration of Helsinki guidelines.

**Table 1** Characteristics of the study population ( $n=68$ )

Characteristics	Value
Normal adrenal cortex	$N=14$
Female/male	9/5
Median age (range)	45 (24–62)
Fetal adrenal gland	$N=5$
Gestation weeks	13, 16, 19, 20, 25
Adrenocortical adenomas	$N=33$
Female/male	24/9
Median age (range)	42 (19–70)
Cortisol-producing	4
Aldosterone-producing	13
Androgen-producing	1
Nonfunctioning	15
Adrenocortical carcinomas	$N=16$
Female/male	11/5
Median age (range)	46 (27–69)
Cortisol-producing	4
Aldosterone-producing	1
Cortisol and androgen-producing	5
Nonfunctioning	6

Diagnosis of malignancy was performed according to the histopathologic criteria proposed by Weiss et al. [35], with modification proposed by Aubert et al. [2]. Briefly, an adrenocortical neoplasm was defined as malignant in the presence of three or more of the following criteria: (1) high nuclear grade, according to the Fuhrman criteria [10], (2) greater than five mitoses per 50 high-power fields, (3) atypical mitotic figures, (4) less than 25% of tumor cells are clear cells, (5) diffuse architecture (>33% of tumor), (6) necrosis, (7) venous invasion, (8) sinusoidal invasion, and (9) capsular invasion.

### Immunohistochemistry

Immunohistochemical evaluation of ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR protein expression was performed in a group of archive adrenocortical samples, including 16 ACCs, 5 normal adult adrenal glands, and 5 fetal normal adrenal glands. Specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin. Immunohistochemical analysis was performed on deparaffinized sections pretreated for 30 min in 10 mM citrate buffer in steam. Mouse anti-human monoclonal antibodies to ER $\alpha$  (clone SP1, dilution 1:400, Lab-Vision, Neomarkers, Fremont, CA), ER $\beta$ 1 (clone PPG5/10, dilution 1:50, Serotec, Oxford, UK), and AR (clone AR441, dilution 1:20, Dako Italia S.p.A, Milan, Italy) were tested with a polymeric-labeling two-step method (Super sensitive<sup>TM</sup> IHC detection system, Biogenex, San Ramon) in an automated staining system (GenoMx i6000, Biogenex). For ER $\beta$ , an overnight incubation was done. Three carcinomas of the breast and three



adenocarcinomas of the prostate were used as external controls. Neoplastic cells were considered positive when they showed nuclear immunoreactivity, which was scored as follows: 0, undetectable or equivocal individual single cells positivity; 1+, weak intensity; 2+, strong intensity. For each case, the percentage (%) of positive neoplastic cells was reported. Cytoplasmatic immunoreactivity, which was present in all cases of human adrenal glands, adrenal carcinomas, and in four of five fetal adrenal glands, was ignored.

#### Quantitative RT-PCR

Fifty-six adrenal tumor tissues, including 15 nonfunctioning adrenocortical adenomas (NFAs), 4 cortisol-producing adenomas (CPAs), 13 aldosterone-producing adenomas (APAs), 1 androgen-producing adenoma, and 9 ACCs (six functioning, three nonfunctioning), and 14 normal adrenal cortex samples were studied. Reference RNA from human adrenal cortex (Human Adrenal Total RNA, Ambion, Austin, TX) was also employed as control. Total RNA was isolated using the RNeasy kit (Qiagen S.p.A. Milan, Italy), reverse transcribed, and subjected to quantitative real-time reverse transcriptase–polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis of *ER $\alpha$* , *ER $\beta$* , *AR*, *PGR* (i.e., the progesterone receptor gene), *CYP19* (i.e., the aromatase gene), *SF-1*, *DAX-1*, *LRH-1*, and *SHP* mRNA levels by using the oligonucleotide primer sequences reported in Table 2 and SYBR green reagents (Applied Biosystems, Foster City, CA). Absolute quantification was performed against a standard curve obtained by amplification of correspondent complementary deoxyribonucleic acids (DNAs) subcloned into the pCR2.1 vector (Invitrogen Life Technologies S.p.A, San Giuliano Milanese, Italy), as reported [8]. mRNA values are reported as copies per microgram total RNA, after standardization against the

housekeeping gene *RPLP0*, which was also quantified by real-time RT-PCR.

#### Western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described [9, 19] in a subset of the above adrenocortical tissue samples, including two normal adrenal tissues, two CPAs, one APA, three NFAs, and four ACCs. Briefly, total protein extracts were separated on sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide 11% gel and then electroblotted onto a nitrocellulose membrane. Blots were incubated overnight at 4°C with anti-ER $\beta$  antibody against the C-terminal region of ER $\beta$  (1:500; Serotec), anti-ER $\alpha$  (F-10) against the C-terminal region of ER $\alpha$  (1:1,000; Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA), mouse anti-human aromatase (1:1,000; Serotec); anti-SF-1 (1:2,000; Prof. Ken-ichirou Morohashi, National Institute for Basic Biology, Okazaki, Japan), anti-DAX-1 (2F4; 1:1,000) raised against amino acids 135–166 of human DAX-1 (Prof. Paolo Sassone-Corsi, School of Medicine University of California, Irvine, CA), and anti-AR (441; 1:1,000; Santa Cruz Biotech). Membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Santa Cruz Biotech), and immunoreactive bands were visualized with ECL Plus Western blotting detection system (Amersham Pharmacia Biotech, UK) and quantified with Scion Image software (Frederich, MD). As control loading, membranes were stripped and re probed with actin antiserum.

#### Statistical analysis

Data are presented as mean $\pm$ SD or median and range. Comparisons were performed by Mann–Whitney *U* test and Spearman Rank *R* correlation, setting the significance level to  $p < 0.05$  (Statistica 7.1, StatSoft Italia srl, Italy).

**Table 2** Sequences of the oligonucleotide primers employed for real-time RT-PCR analysis

Gene	Forward primer	Reverse primer	Amplicon length (bp)	Annealing temperature (°C)
ER- $\alpha$	CCACCAAACCCAGTGCACCATT	GGTCTTTTCGTATCCCACCTTC	108	64
ER- $\beta$	AGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAG	GACAGCGCAGAAGTGAGCATC	143	68
AR	CCTGGCTTCCGCAACTTACAC	GGACTTGTGCATGCCGTTACTCA	168	64
PGR	CGCGCTTACCCTGCACTC	TGAATCCGGCCTCAGGTAGTT	121	66
CYP19	TCACTGGCCTTTTCTCTTGGT	GGGTCCAATTCCTATGCA	83	60
SF-1	GGAGTTTGTCTGCCTCAAGTTCA	CGTCTTTCACCAGGATGTGGTT	80	60
DAX-1	CCAAGGAGTACGCCTACCTCAA	ACTGGAGTCCCTGAATGTTACTTCC	90	60
LRH-1	TACCGACAAGTGGTACATGGAA	CGGCTTGTGATGCTATTATGGA	89	60
SHP	CCTCAATGCTGTCTGGAGTCTT	CTGCAGGTGCCCAATGTG	132	60
RPLP0	GGCGACCTGGAAGTCCAACCT	CCATCAGCACCAAGCCTTC	149	68

## Results

### Expression of sex steroid hormone receptors

**Normal fetal and adult adrenal gland** Immunohistochemical analysis of adult adrenal glands demonstrated heterogeneous expression of ER $\beta$  (Fig. 1a–c) with nuclear positivity in the zona glomerulosa and fasciculata (score 1) but no expression in the zona reticularis and medulla. Fetal adrenal glands were negative for ER $\beta$  expression, with the exception of a case with nuclear immunoreactivity (score 2) in all adrenal zones (Fig. 1d–f). Both adult and fetal normal adrenal glands were negative for AR and ER $\alpha$  immunostaining. The adenocarcinomas of the prostate used as controls were positive for AR and the carcinomas of the breast immunoreacted for both ER $\alpha$  and ER $\beta$ 1 (data not shown).

In agreement with immunohistochemical results, Western blot analysis of two normal adrenal cortex samples demonstrated strong ER $\beta$  expression and relatively low ER $\alpha$  levels (Fig. 2). As observed in MCF-7 control cells, ER $\alpha$  appeared as an immunopositive band corresponding to the full-length 66-kDa protein and a faint smaller band of 46 kDa, which could possibly represent the N-terminally deleted isoform of ER $\alpha$  with antagonist activity on ER $\alpha$  66-kDa function [23]. In addition, ER $\beta$  appeared as two bands, i.e., a faint band corresponding to a 55 kDa-protein variant and a more intense band corresponding to the expected full-length 59-kDa isoform of ER $\beta$ 1 [21]. At variance with immunohistochemistry, Western blot analysis of normal adrenocortical tissues allowed to detect the AR protein, which appeared as a double band with the highest of 75 kDa, whereas the full-length AR form of 110 kDa was absent. The apparent discrepancy between immunohistochemical and Western blot results could be explained by the relatively low levels of ER $\alpha$  and AR expression in the adrenal gland, which could be detected by Western blot but not by immunohistochemistry.

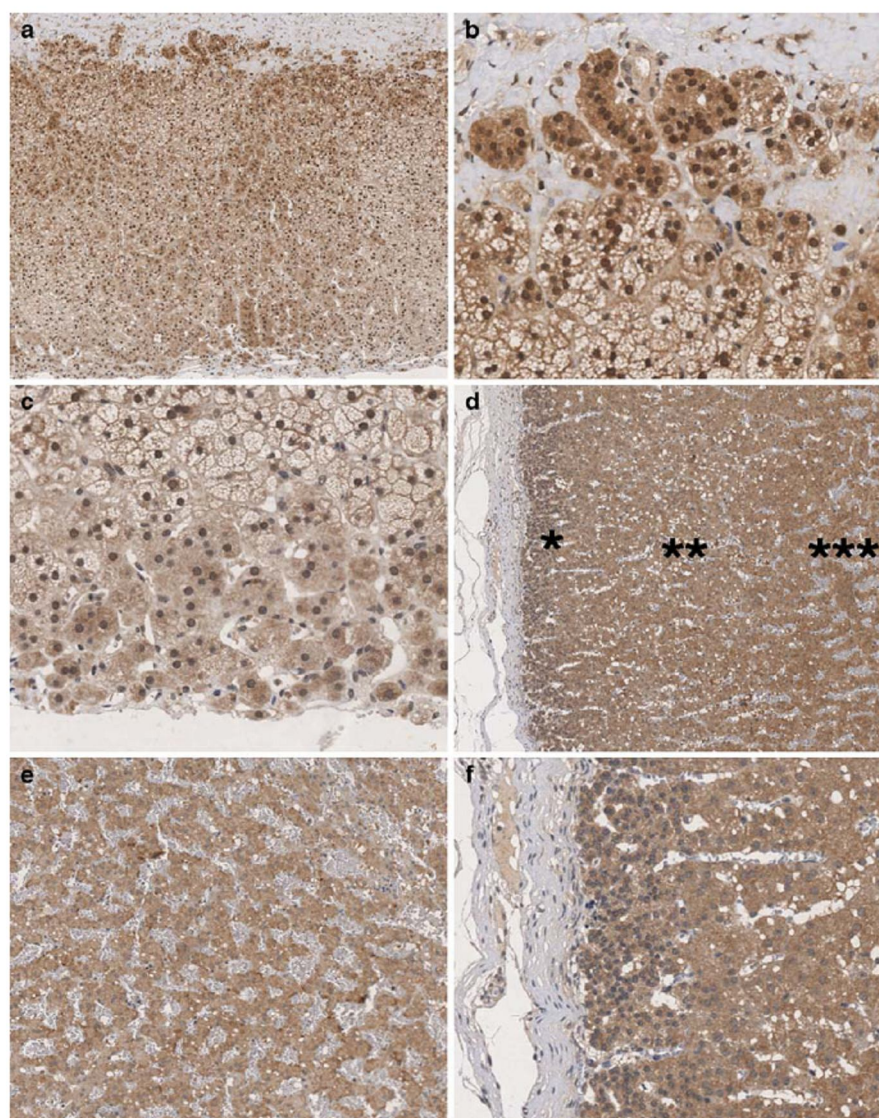
Quantitative RT-PCR analysis of sex steroid hormone receptors was performed in 14 normal adrenal cortex samples. It demonstrated variable levels of *ERs*, *PGR*, and *AR* mRNA (Fig. 3). In particular, mean *ER $\alpha$*  mRNA was 25,000 $\pm$ 17,650 copies per  $\mu$ g total RNA; *ER $\beta$*  mRNA levels were about twofold higher than *ER $\alpha$*  mRNA levels, in agreement with protein expression data, and there was a positive association between the amount of *ER $\beta$*  mRNA and *ER $\alpha$*  mRNA levels (Spearman Rank *R* correlation,  $p < 0.05$ ). *AR* mRNA was 17,700 $\pm$ 8,300 copies per  $\mu$ g total RNA; *PGR* mRNA was 300,000 $\pm$ 290,000 copies per  $\mu$ g total RNA.

**Adrenocortical tumors** Immunohistochemical analysis of sex steroid hormone receptors expression in ACCs demon-

strated that all ACCs were negative for ER $\alpha$ , with the exception of one case of ACC, which showed rare positive cells (Table 3). Western blot and RT-PCR analyses demonstrated higher levels of ER $\alpha$  protein and transcripts in ACCs than in the normal adrenal cortex (Figs. 2 and 3). At variance, quantitative real-time RT-PCR did not demonstrate any significant difference in ER $\alpha$  mRNA levels between normal adrenal cortex and adrenocortical adenomas, either functioning or nonfunctioning. No significant variation in the proportion of ER $\alpha$  protein isoforms was observed in the different tumor types at Western blot analysis.

Immunohistochemical staining demonstrated that 12 out of 16 (65%) ACCs were immunoreactive for ER $\beta$ , including six ACCs composed by large, eosinophilic and pleomorphic score 2 cells and six ACCs composed of smaller cells that were frequently scored 1 (Table 3, Fig. 4a–d). A single tumor showing both types of cells showed both scores of intensity. The results of immunohistochemistry were concordant with Western blot and RT-PCR analyses, which showed variable ER $\beta$  expression among adrenocortical tumors. In fact, ER $\beta$  levels were relatively low in several cases of ACCs and NFAs as compared to control normal adrenal tissues but increased in other cases. Statistical analysis demonstrated that, overall, *ER $\beta$*  mRNA levels were significantly lower in ACCs than in the normal adrenal cortex (mean, 11,200 $\pm$ 2,550 vs 44,580 $\pm$ 8,050 copies per  $\mu$ g total RNA,  $p < 0.01$ ). Moreover, in ACCs, the ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio was significantly higher in ACCs than in the normal adrenal cortex (ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio, 21.5 $\pm$ 35.4 vs 0.51 $\pm$ 0.29,  $p < 0.05$ ; Fig. 3), and ER $\beta$  mRNA expression tended to be inversely related to ER $\alpha$  expression, although the correlation was not statistically significant. *PGR* mRNA levels in ACCs were about fourfold higher (1,250,00 $\pm$ 1,600,000 copies per  $\mu$ g total RNA) than in control normal adrenocortical tissues and correlated with that of ER $\alpha$ .

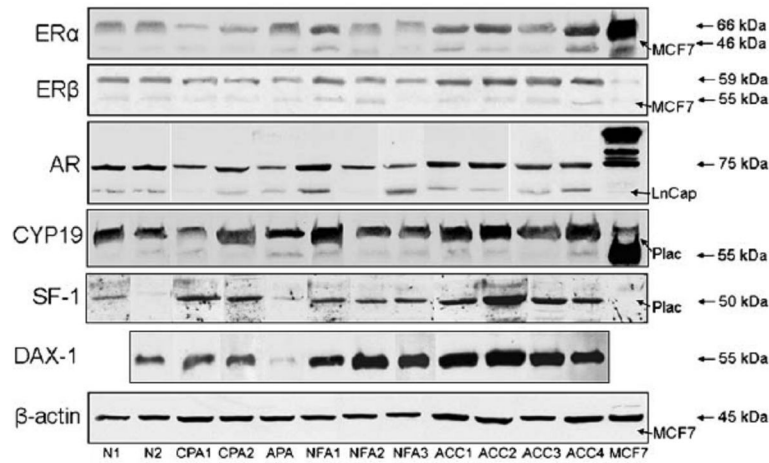
Six out of the 16 ACCs (38%) were positive for AR at immunohistochemical analysis and also displayed higher AR protein and mRNA levels than AR-negative ACCs at Western blot and quantitative RT-PCR analyses (Table 3). Among AR-positive ACCs, two displayed rare positive cells, whereas the other four cases were scored 2 with a percentage of positive cells ranging from 5 to 100%. (Table 3; Fig. 4e and f). AR expression was unrelated to any morphological features (e.g., mitotic rate, necrosis, vascular invasion, capsular invasion) present in ACCs. In benign adrenocortical tumor samples, Western blot and real-time RT-PCR analyses showed a wide variability of AR expression, with undetectable AR levels in four cases of NFAs and in the androgen-producing adenoma and high levels in four APAs (Figs. 2 and 3). Statistical analysis



**Fig. 1** Immunohistochemical evaluation of ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR in normal adult and fetal adrenal cortex. **a** Adrenal cortex with a heterogeneous ER $\beta$  expression into three different areas. **b** The normal cells of the zona glomerulosa and zona fasciculata show nuclear and cytoplasmic expression of ER $\beta$ . **c** The normal cells of the zona reticularis display a strong cytoplasmic ER $\beta$  expression, but their nuclei are prevalently negative. **d** Fetal adrenal with

cytoplasmic ER $\beta$  expression without nuclear staining (*asterisk*, subcapsular definitive zone; *double asterisk*, transitional zone; *triple asterisk*, fetal zone). **e** Fetal zone: the cells show cytoplasmic immunostaining. **f** Definitive and transitional zone: like the fetal zone, cells show cytoplasmic immunostaining, but their nuclei are negative

**Fig. 2** Western blots of ER $\alpha$ , ER $\beta$ , AR, CYP19, SF-1, and DAX-1 on normal and pathological (CPA, APA, NFA, ACC) adrenocortical tissue extracts (50  $\mu$ g).  $\beta$ -Actin was used as loading control. Results are representative of three independent experiments



demonstrated that, overall, *AR* mRNA levels were significantly lower in NFAs (6,700±9,010 copies per  $\mu$ g total RNA) than in the normal adrenal cortex ( $p < 0.01$ ).

**Expression of aromatase**

Aromatase protein was expressed in normal adrenocortical tissues, although at lower levels than in human placenta, and was visualized at Western blot as a double band of 55 and 60 kDa. The small variation in molecular mass could be due to the level of glycosylation; however, glycosylation does not seem to have an impact on the enzymatic activity [20, 30]. Increased expression of aromatase protein and *CYP19* mRNA was observed in ACCs, especially in cortisol- and androgen-secreting ACCs, than in the normal adrenal gland (16,090±9,140 vs 2,500±1,280 copies per  $\mu$ g total RNA; Figs. 2 and 3). *CYP19* mRNA levels showed a positive association with ER $\alpha$  mRNA expression (Spearman Rank *R* correlation,  $p < 0.05$ ) but not with ER $\beta$  expression.

**Expression of orphan nuclear hormone receptors**

In the normal adrenal cortex, SF-1 and DAX-1 were highly expressed, whereas *LRH-1* and *SHP* mRNA levels were about tenfold lower (Fig. 3). Expression of *SF-1*, *DAX-1*, and *LRH-1* was variable, with no significant differences between normal and neoplastic adrenal tissues, whereas *SHP* mRNA expression in APAs and NFAs was lower than in the normal adrenal cortex (Figs. 2 and 3). In the normal and neoplastic adrenal cortex, *SF-1* and *DAX-1* mRNA levels showed a positive correlation with *LRH-1* mRNA but a negative correlation with *SHP* mRNA ( $p < 0.05$ ). As for sex steroid hormone receptors, ER $\beta$  and ER $\alpha$  mRNAs

showed a positive association with *LRH-1* expression but a negative correlation with *SHP*.

**Discussion**

This study represents the first investigation on expression of ERs and aromatase in the normal adrenal cortex and tumors derived thereof. It demonstrates that (1) ERs, AR, and aromatase are expressed in the human adrenal cortex and in adrenocortical tumors, (2) ER $\beta$  is the predominant ER subtype in the adrenal cortex, (3) ACCs are characterized by low ER $\beta$  levels and/or increased amount of ER $\alpha$  and abnormal AR expression, (4) aromatase is expressed in the adrenal cortex and adrenocortical tumors and it is overexpressed in ACCs, and (5) expression of ERs correlates with nuclear hormone receptor expression.

By immunohistochemistry, Western blot, and real-time RT-PCR analyses, we demonstrated that both ERs are expressed in the normal adrenal cortex but that the amount of ER $\beta$  is about twofold that of ER $\alpha$ . In adult normal adrenal cortex, we could localize ER $\beta$  expression in the zona glomerulosa and fasciculata, at variance with findings in the prepubertal adrenal gland, where ER $\beta$  was detectable in the zona reticularis [3]. ER $\beta$  expression seems to be variable also during fetal adrenal development, as ER $\beta$  has been detected in the definitive zone but not in the fetal zone of 20- and 38-gestational week fetuses [6], whereas, in neonates, ER $\beta$  is expressed in the fetal zone but not in other zones [3]. In our experience, ER $\beta$  was generally undetectable in fetal adrenal glands. Thus, the expression pattern of ERs in the adrenal cortex seems to change during adrenal development, suggesting a role for estrogens in this process.

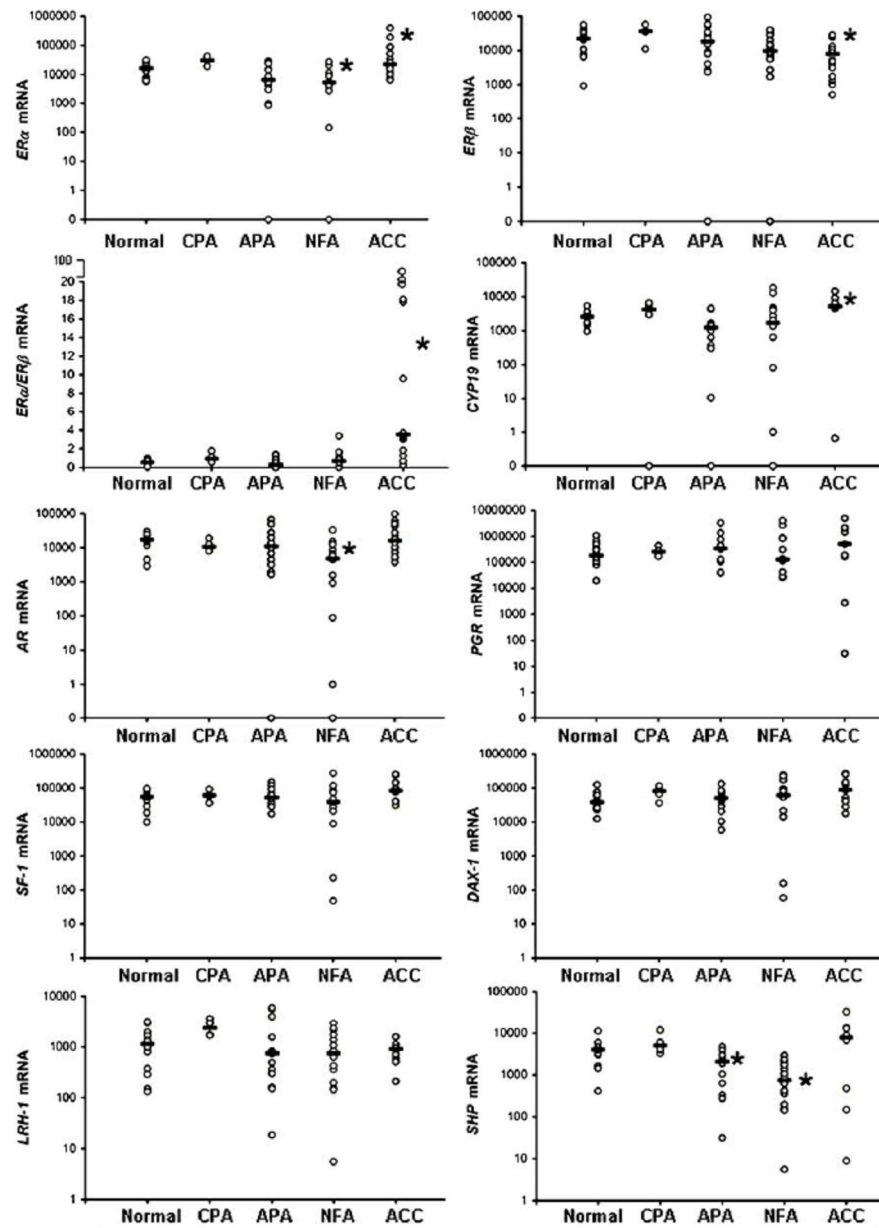


Fig. 3 Expression of transcripts of sex steroid hormone receptors, aromatase (CYP19), and orphan nuclear receptors as determined by quantitative real-time RT-PCR in normal and neoplastic adrenal glands. Individual values and medians (horizontal bars) are shown.

Normal Normal adrenal cortex, CPA cortisol-producing adenoma, APA aldosterone-producing adenoma, NFA nonfunctioning adenoma, ACC adrenocortical carcinoma; asterisk, values significantly different from those of the normal adrenal cortex (Mann-Whitney *U* test,  $p < 0.05$ )

**Table 3** Analysis of ER $\alpha$ , ER $\beta$ , and AR expression in ACCs

ACC no.	Immunohistochemical analysis <sup>a</sup>			Real-time RT-PCR analysis <sup>b</sup>		
	ER $\alpha$ score	ER $\beta$ 1 score	AR score	ER $\alpha$ mRNA	ER $\beta$ mRNA	AR mRNA
1	0	2 (70%)	0	7,640	27,900	22,280
2	0	1 (90%)	2 (80%)	16,940	13,280	9,370
3	0	1 (40%)	0	34,240	9,920	4,900
4	0	0	0	25,770	7,190	17,430
5	0	2 (100%)	0	12,300	12,800	7,410
6	0	1 (70%)	2 (5%)	39,320	4,020	42,830
7	0	2 (100%)	0	16,570	24,150	10,690
8	0	2 (100%)	2 (10%)	18,420	10,760	61,080
9	0	2 (100%)	0 (rare cells)	86,560	4,780	14,460
10	0 (rare positive cells)	0	0 (rare cells)	91,800	1,200	28,000
11	0	0	2 (5%)	51,860	508	50,440
12	0	1 (90%)	2 (100%)	84,500	27,890	98,000
13	0	1 (70%)	0	10,100	3,120	3,760
14	0	2 (10%)	0	15,750	8,620	6,890
15	0	0	2 (10%)	6,460	1,750	5,340
16	0	1 (70%)	0	91,150	997	15,070

<sup>a</sup>Neoplastic cells were considered positive when they showed nuclear immunoreactivity, which was scored as follows: 0 undetectable or equivocal individual single cells positivity, 1+ weak intensity, and 2+ strong intensity. The percentage (%) of reactive neoplastic cells is reported within parenthesis. Cytoplasmatic immunoreactivity was ignored.

<sup>b</sup>mRNA values are expressed as copies per  $\mu$ g total RNA.

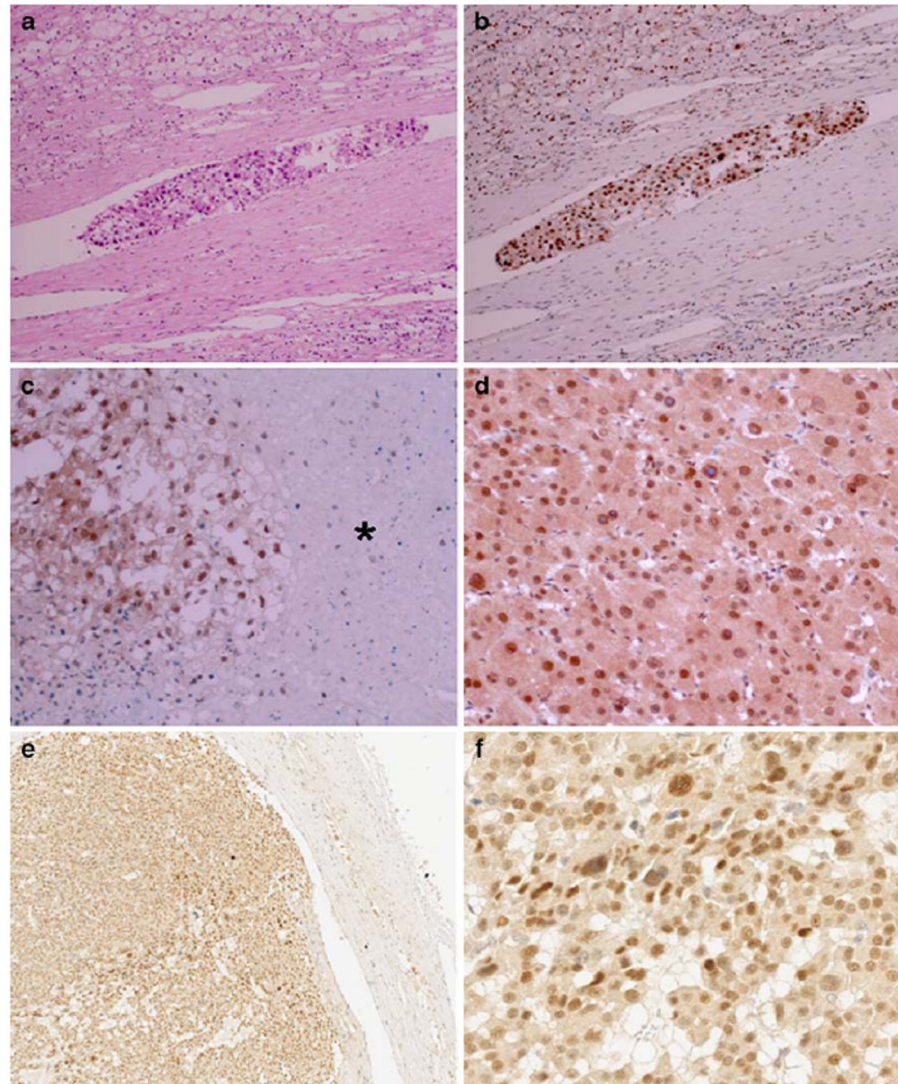
Adrenocortical tumors were characterized by variable levels of ERs. Remarkably, several cases of ACCs showed lower ER $\beta$  expression and/or higher ER $\alpha$  levels, resulting in increased ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio, than the normal adrenal cortex. These results are in agreement with findings in other estrogen-dependent cancers, such as breast, ovary, colon, and prostate cancer, which show ER $\alpha$  overexpression and/or reduced ER $\beta$  levels [4]. It is interesting to note that aromatase was also expressed at relatively high levels in the normal adrenal cortex and its expression markedly increased in ACCs. Based of these observations, we hypothesize that estrogens could contribute to adrenal tumorigenesis through an autocrine/paracrine loop. Estrogens could be produced locally in ACC cells by aromatase and exert their proliferative effect through ER $\alpha$ , while the counteracting antiproliferative activity of ER $\beta$  would be lost in cancer cells.

In this regard, we have recently demonstrated that H295R ACC cells express high levels of aromatase and are able to convert androgens to estrogens, which, through a short autocrine loop mediated by ER $\alpha$ , enhance H295R cell proliferation [19]. Treatment with the antiestrogens ICI 182,780 and 4-hydroxytamoxifen upregulated ER $\beta$  expression and inhibited basal and 17 $\beta$ -estradiol-induced H295R cell proliferation. In particular, ICI 182,780 determined cell growth arrest, whereas treatment with 4-hydroxytamoxifen activated the Fas/FasL pathway, which in turn induced apoptosis. This effect could be due to 4-hydroxytamoxifen interaction with ER $\beta$  and binding to the AP-1 site on the FasL promoter in H295R cells. A dose-dependent inhibi-

tion of H295R cell proliferation was also observed after treatment with the aromatase inhibitor Letrozole, thus further confirming the role of estrogens in H295R cell proliferation [19].

Androgens have been shown to inhibit H295R cell proliferation through their receptor [27]. This study demonstrates that AR was overexpressed in a subset of ACCs, whereas it was undetectable in some cases of NFA. It is interesting to note that at Western blot analysis, the full-length AR form of 110 kDa was absent, and AR appeared as a 75-kDa protein. The 75-kDa form has been also identified in prostate carcinoma and represents a truncated form of AR, generated by proteolytic cleavage [18]. This truncated AR has constitutive transcriptional activity, as it lacks a ligand binding domain, but it can bind androgen-responsive elements through its DNA-binding domain. We hypothesize that in adrenocortical cells, this truncated AR with androgen-independent activity could compete with the androgen-dependent negative regulation of adrenocortical cell growth. An imbalance toward the androgen-independent pathway could contribute to unrestrained cell proliferation in ACCs. This hypothesis is being investigated with experiments that are ongoing.

Finally, we investigated expression of orphan nuclear receptors to find clues on the regulation of sex steroid hormone receptors and aromatase expression in adrenocortical cells. We demonstrated variable expression of SF-1, DAX-1, LRH-1, and SHP in the adrenal cortex and its tumors, with increased DAX-1 and SF-1 levels in ACCs



**Fig. 4** Immunohistochemical evaluation of ER $\beta$  and AR expression in ACCs. **a–b** Vascular invasion by neoplastic emboli in an ACC. In **b**, the nuclei of neoplastic cells exhibit ER $\beta$  expression. **c** ACC cells

around a focus of necrosis (*asterisk*) showing nuclear ER $\beta$  staining. **d** Large eosinophilic ACC cells displaying a ER $\beta$  positivity. **e–f** Diffuse immunostaining of AR in pleomorphic neoplastic cells of an ACC

and decreased SHP levels in APAs and NFAs. Variable SF-1 and DAX-1 expression in adrenocortical tumors has been reported also in the literature [17, 26, 29, 31, 32], whereas no data are available on LRH-1 and SHP expression. The positive correlation between *LRH-1* expression and *ERs* mRNA levels, as well as the negative association between *SHP* and *ERs*, suggest that *LRH-1* and *SHP* might be transcriptional targets of ERs, as shown in other cell types

[1, 16]. On the other hand, increased *LRH-1* expression and decreased *SHP* expression in ER-positive adrenal tumors could enhance estrogen-mediated effects on cell proliferation, as LRH-1 has been shown to induce aromatase expression [7, 38], whereas SHP has been demonstrated to repress ER $\alpha$  and ER $\beta$  transcriptional activity [14, 15].

In conclusion, our results demonstrate that ACCs are characterized by an imbalance between ER $\alpha$  and ER $\beta$

levels and increased aromatase expression. Abnormal expression of AR and orphan nuclear hormone receptors could also contribute to the effects of estrogens in adrenocortical tumorigenesis. Because estrogens have a proliferative effect on ACC cells, the results of this study suggest that estrogens could contribute to adrenocortical tumorigenesis through autocrine/paracrine effects. This study opens new perspectives on the potential use of antiestrogens and aromatase inhibitors as therapeutic agents against ACC.

**Acknowledgments** Giulia Masi is a recipient of a fellowship from IRCCS-IOV (Istituto Oncologico Veneto). This work was supported by AIRC funds to Giorgio Palù.

## References

- Annicotte JS, Chavey C, Servant N, Teyssier J, Bardin A, Licznar A, Badia E, Pujol P, Vignon F, Maudelonde T, Lazennec G, Cavailles V, Fajas L (2005) The nuclear receptor liver receptor homolog-1 is an estrogen receptor target gene. *Oncogene* 24:8167–8175
- Aubert S, Waerenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, Wemeau JL, Lecomte-Houcke M, Leturtre E (2002) Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* 26:1612–1619
- Baquedano MS, Saraco N, Berenshtein E, Pepe C, Bianchini M, Levy E, Goni J, Rivarola MA, Belgorosky A (2007) Identification and developmental changes of aromatase and estrogen receptor expression in prepubertal and pubertal human adrenal tissues. *J Clin Endocrinol Metab* 92:2215–2222
- Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P (2004) Loss of ER $\beta$  expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr-Relat Cancer* 11:537–551
- Barzon L, Sonino N, Fallo F, Palù G, Boscaro M (2003) Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 149:273–285
- Brandenberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V, Jaffe RB (1997) Tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER- $\beta$ ) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 82:3509–3512
- Clyne CD, Speed CJ, Zhou J, Simpson ER (2002) Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. *J Biol Chem* 277:20591–20597
- Fallo F, Pezzi V, Barzon L, Mulatero P, Veglio F, Sonino N, Mathis JM (2002) Quantitative assessment of *CYP11B1* and *CYP11B2* expression in aldosterone-producing adenomas. *Eur J Endocrinol* 147:795–802
- Fallo F, Pezzi V, Sonino N, Altavilla G, Barzon L (2005) Adrenal incidentaloma in pregnancy. A case report. *J Endocrinol Investig* 28:459–463
- Greene LF, Page DL, Fritz A, Batch M, Haller DG, Morrow M (2002) American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer staging manual, 6th edn. Springer, New York
- Holter E, Kotaja N, Makela S, Strauss L, Kietz S, Janne OA, Gustafsson JA, Palvimo JJ, Treuter E (2002) Inhibition of androgen receptor (AR) function by the reproductive orphan nuclear receptor DAX-1. *Mol Endocrinol* 16:515–528
- Hsing AW, Nam JM, Co Chien HT, McLaughlin JK, Fraumeni JF Jr (1996) Risk factors for adrenal cancer: an exploratory study. *Int J Cancer* 65:432–436
- Iyer AK, Zhang YH, McCabe ER (2006) Dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1 (DAX1) (NR0B1) and small heterodimer partner (SHP) (NR0B2) form homodimers individually, as well as DAX1-SHP heterodimers. *Mol Endocrinol* 20:2326–2342
- Johansson L, Thomsen JS, Damdimopoulos AE, Spyrou G, Gustafsson JA, Treuter E (1999) The orphan nuclear receptor SHP inhibits agonist-dependent transcriptional activity of estrogen receptors ER $\alpha$  and ER $\beta$ . *J Biol Chem* 274:345–353
- Klinge CM, Jernigan SC, Risinger KE (2002) The agonist activity of tamoxifen is inhibited by the short heterodimer partner orphan nuclear receptor in human endometrial cancer cells. *Endocrinology* 143:853–867
- Lai K, Hamish DC, Evans MJ (2003) Estrogen receptor alpha regulates expression of the orphan receptor small heterodimer partner. *J Biol Chem* 278:36418–36429
- Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Toumaire C, Gallo-Payet N, Hyndman D, Veyssiere G, Bertagna X, Jean C, Martinez A (2004) Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated adose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89:3010–3019
- Libertini SJ, Tepper CG, Rodriguez V, Asmuth DM, Kung HJ, Mudryj M (2007) Evidence for calpain-mediated androgen receptor cleavage as a mechanism for androgen independence. *Cancer Res* 67:9001–9005
- Montanaro D, Maggolini M, Recchia AG, Barzon L, Fallo F, Andò S, Pezzi V (2005) Antiestrogens upregulate ER $\beta$  expression and inhibit human adrenocortical cell proliferation. *J Mol Endocrinol* 35:245–256
- Moslemi S, Vibet A, Papadopoulos V, Camoin L, Silberzahn P, Gaillard JL (1997) Purification and characterization of equine testicular cytochrome P-450 aromatase: comparison with the human enzyme. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 118:217–227
- Murphy LC, Watson PH (2006) Is oestrogen receptor- $\beta$  a predictor of endocrine therapy responsiveness in human breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 13:327–334
- Nakao M, Sato B, Koga M, Noma K, Kishimoto S, Matsuda M, Sonoda T, Matsumoto K (1986) Biochemical and immunological characterization of estrogen binding components in human neoplastic adrenocortical tissues. *J Steroid Biochem* 25:1–9
- Penot G, Le Peron C, Merot Y, Grimaud-Fanouillere E, Ferriere F, Boujrad N, Kah O, Saligaut C, Ducouret B, Metivier R, Flouriot G (2005) The human estrogen receptor- $\alpha$  isoform hER $\alpha$ 46 antagonizes the proliferative influence of hER $\alpha$ 66 in MCF7 breast cancer cells. *Endocrinology* 146:5474–5484
- Pezzi V, Mathis JM, Rainey WE, Carr BR (2003) Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 87:181–189
- Phornphutkul C, Okubo T, Wu K, Harel Z, Tracy TF, Pinar H, Chen S, Gruppuso PA, Goodwin G (2001) Aromatase P450 expression in feminizing adrenal adenoma presenting as isosexual precocious puberty. *J Clin Endocrinol Metab* 86:649–652
- Reincke M, Beuschlein F, Lalli E, Arlt W, Vay S, Sassone-Corsi P, Allolio B (1998) DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 83:2597–2600
- Rossi R, Zatelli MC, Valentini A, Cavazzini P, Fallo F, del Senno L, degli Uberti EC (1998) Evidence for androgen receptor gene expression and growth inhibitory effect of dihydrotestosterone on human adrenocortical cells. *J Endocrinol* 159:373–380



28. Sanfilippo JS, Wittliff JL (1984) Steroid hormone receptors in adrenal cortical carcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 150:326–327
29. Sasano H, Shizawa S, Suzuki T, Takayama K, Fukaya T, Morohashi K, Nagura H (1995) Ad4BP in the human adrenal cortex and its disorders. *J Clin Endocrinol Metab* 80:2378–2380
30. Sethumadhavan K, Bellino FL, Thotakura NR (1991) Estrogen synthetase (aromatase). The cytochrome P-450 component of the human placental enzyme is a glycoprotein. *Mol Cell Endocrinol* 78:25–32
31. Shibata H, Ando T, Suzuki T, Kurihara I, Hayashi K, Hayashi M, Saito I, Murai M, Saruta T (1998) COUP-TFI expression in human adrenocortical adenomas: possible role in steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 83:4520–4523
32. Shibata H, Ikeda Y, Mukai T, Morohashi K, Kurihara I, Ando T, Suzuki T, Kobayashi S, Murai M, Saito I, Saruta T (2001) Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. *Mol Genet Metab* 74:206–216
33. Sirianni R, Seely JB, Attia G, Stocco DM, Carr BR, Pezzi V, Rainey WE (2002) Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J Endocrinol* 174:R13–R17
34. Takeyama J, Suzuki T, Inoue S, Kaneko C, Nagura H, Harada N, Sasano H (2001) Expression and cellular localization of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the human fetus. *J Clin Endocrinol Metab* 86:2258–2262
35. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL Jr (1989) Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol* 13:202–206
36. Zatelli MC, Rossi R, degli Uberti EC (2000) Androgen influences transforming growth factor- $\beta$ 1 gene expression in human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 85:847–852
37. Zhang H, Thomsen JS, Johansson L, Gustafsson JA, Treuter E (2000) DAX-1 functions as an LXXLL-containing corepressor for activated estrogen receptors. *J Biol Chem* 275:39855–39859
38. Zhou J, Suzuki T, Kovacic A, Saito R, Miki Y, Ishida T, Moriya T, Simpson ER, Sasano H, Clyne CD (2005) Interactions between prostaglandin E2, liver receptor homologue-1, and aromatase in breast cancer. *Cancer Res* 65:657–663



## REVIEW ARTICLE

## The role of 21-hydroxylase in the pathogenesis of adrenal masses: Review of the literature and focus on our own experience

L. Barzon<sup>1</sup>, P. Maffei<sup>2</sup>, N. Sonino<sup>3</sup>, C. Pilon<sup>2</sup>, L. Baldazzi<sup>4</sup>, A. Balsamo<sup>4</sup>, O. Del Maschio<sup>5</sup>, G. Masi<sup>1</sup>, M. Trevisan<sup>1</sup>, M. Pacenti<sup>1</sup>, and F. Fallo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology, Microbiology and Medical Biotechnologies; <sup>2</sup>Department of Medical and Surgical Sciences; <sup>3</sup>Department of Statistical Sciences, University of Padua; <sup>4</sup>Department of Pediatrics, University of Bologna; <sup>5</sup>Anatomical Pathology Unit, City Hospital of Mestre, Mestre, Italy

**ABSTRACT.** An exaggerated response of 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) to exogenous ACTH stimulation has been found in 30 to 70% of patients with incidentally discovered adrenal tumors, supporting the concept that congenital 21-hydroxylase deficiency may be a predisposing factor for adrenocortical tumorigenesis. Decreased expression of 21-hydroxylase gene has been observed in sporadic non-functioning adrenocortical adenomas and adrenocortical carcinomas, in agreement with the reduced steroidogenic activity found in these types of tumors. Screening studies for the presence of mutations in CYP21A2 gene, encoding 21-hydroxylase, in patients with

sporadic adrenocortical tumors yielded discordant results. Overall, a higher frequency of germline 21-hydroxylase mutation carriers has been found among patients with adrenal tumors, including incidentalomas, than in the general population. However, the presence of mutations did not correlate with endocrine test results and tumor mass features, suggesting that 21-hydroxylase deficiency does not represent a relevant mechanism in adrenal tumorigenesis. Mechanisms leading to reduced 21-hydroxylase expression and activity are still unknown.

(J. Endocrinol. Invest. 30: 615-623, 2007)

©2007, Editrice Kurtis

### INTRODUCTION

Adrenal masses are common findings in clinical practice, affecting 1-4% of the population (1). The prevalence of such masses increases with the patients' age, being 0.2% in young subjects as compared with 6.9% in subjects older than 70 yr of age (2). Most are benign non-functioning adrenocortical adenomas and, less frequently, pheochromocytomas, whereas adrenocortical carcinomas and malignant pheochromocytomas are rare. The pathogenesis of sporadic adrenal tumors is poorly understood, whereas progress has been made in the identification of the molecular basis of inherited syndromes associated with the risk of development of

adrenal masses, such as congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to impaired activity of steroid 21-hydroxylase enzyme (3, 4). In this syndrome, decreased production of cortisol leads to increased ACTH secretion, resulting in overproduction of adrenal androgens and adrenal hyperplasia. The mildest forms of 21-hydroxylase deficiency are probably underdiagnosed due to inconspicuous symptoms and the first clinical manifestation may be the incidental discovery of adrenal enlargement (5-7). On the other hand, an exaggerated response of 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) to exogenous ACTH stimulation (the hallmark of 21-hydroxylase deficiency) is frequently found in patients with incidentally discovered adrenal tumors (1), supporting the concept that congenital 21-hydroxylase deficiency may be a predisposing factor for adrenocortical tumorigenesis. However, the impact of 21-hydroxylase deficiency in the pathogenesis of adrenal masses is a field not fully understood. The aim of this review article is to discuss this issue on the basis of the published literature and our own experience.

*Key-words:* Adrenal tumours, 21-hydroxylase, dexamethasone.

*Correspondence:* F. Fallo, MD, Department of Medical and Surgical Sciences, University of Padua, Via Ospedale 105, 35128 Padova, Italy.

*E-mail:* francesco.fallo@unipd.it

Accepted January 10, 2007.

L. Barzon, P. Maffei, N. Sonino, et al.

#### MOLECULAR GENETICS OF 21-HYDROXYLASE

Steroid 21-hydroxylase is a microsomal cytochrome P450 enzyme involved in the conversion of 17-OHP to 11-deoxycortisol and of progesterone to deoxycorticosterone (DOC) (8). It is encoded by the CYP21A2 gene, which is located in the HLA major histocompatibility complex on chromosome 6p21.3, approximately 30 kb apart from its inactive pseudogene CYP21A1P. The nucleotide sequences of CYP21A2 and CYP21A1P are 98% identical in exons and approximately 96% identical in introns.

The 21-hydroxylase gene is exclusively expressed in the adrenal cortex and, within the adrenal cortex, in all three zones. At lower levels than in the fetal adrenal gland, CYP21A2 is present in other fetal tissues, such as placenta, ovary, testis, aorta, liver, thymus, and brain (9). Expression of 21-hydroxylase in the zona fasciculata is mainly regulated by ACTH, which induces its transcription (10). In the H295R human adrenocortical carcinoma cell line and in primary cultures of human adrenocortical cells, CYP21A2 expression is also induced by cAMP (the second messenger for ACTH), angiotensin II, insulin, and IGF-I (11, 12). The promoter region of the CYP21A2 gene contains binding sites for several transcription regulators, such as the nuclear factor-granulocyte macrophage b NF-GMb complex (13), which is involved in cell proliferation and differentiation, and steroidogenic factor-1 (SF-1) (14), an "orphan" nuclear hormone receptor that is required for expression of most steroidogenic enzymes. Adrenal-specific expression of 21-hydroxylase is hypothesized to be mediated by an enhancer sequence that is able to influence expression of several adjacent genes within the human leukocyte antigen (HLA) major histocompatibility complex locus (15). Liver receptor homologue-1 (LRH-1), an orphan nuclear hormone receptor that is closely related to SF-1 and is expressed in most steroidogenic tissues (16), has been demonstrated to regulate expression of several steroid-metabolizing enzymes, even though no data are available for CYP21A2. It is however conceivable that orphan nuclear receptors, such as the general activator LRH-1 and the repressors DAX-1, small heterodimer partner (SHP), and testicular receptor 4 (TR4), modulate CYP21A2 expression through interaction with other coactivators or corepressors, such as SF-1 (16-18). Expression of steroidogenic enzymes is also regulated by DNA methylation and, in particular, inhibition of DNA methylation has been demonstrated to reduce basal and cAMP-induced expression of steroidogenic acute regulatory (StAR) protein and of most steroidogenic enzymes, including CYP21A2 (19).

#### EXPRESSION AND ACTIVITY OF 21-HYDROXYLASE IN NORMAL ADRENAL CORTEX AND IN SPORADIC ADRENOCORTICAL TUMORS

In the fetal adrenal cortex, expression of CYP21A2 is detectable by histochemical analysis in the fetal zone and transitional zone between 14 weeks and term and in the definitive zone starting at 24 weeks and continuing to term (20, 21). Expression of CYP21A2 during human fetal development differs from the expression observed in the adult adrenal gland, where intense expression was observed in the zona glomerulosa and zona fasciculata, with little or no expression in the zona reticularis (20).

Expression of 21-hydroxylase transcripts and protein as well as 21-hydroxylase activity have been investigated by several studies. Decreased expression of CYP21A2 mRNA and 21-hydroxylase activity have been documented in sporadic adrenocortical carcinomas (22, 23). Low CYP21A2 mRNA levels have been demonstrated also in non-functioning adrenocortical adenomas, as compared with the normal adrenal cortex (24, 25). These adenomas also showed normal aldosterone and cortisol levels, but significantly increased 17-OHP content. At variance, functioning tumors showed normal levels of CYP21A2 mRNA (24, 25).

Gene expression profiling by microarray analysis and real-time quantitative RT-PCR and serial analysis of gene expression have been employed to investigate expression of steroidogenic enzymes in aldosterone-producing adenomas and in cortisol-producing adenomas. Microarray analysis demonstrated that aldosterone-producing adenomas produced higher levels of CYP21A2 mRNA, together with increased HSD3B2 and CYP11B2 (aldosterone synthase) mRNA compared with normal adrenal, whereas cortisol-producing adenomas had higher levels of CYP11A (cholesterol side-chain cleavage), CYP17 (17 $\alpha$ -hydroxylase/17-20 lyase), HSD3B2, and CYP11B1 (11 $\beta$ -hydroxylase) mRNA (26). Overexpression of CYP21A2 and CYP11B2 mRNA in aldosterone-producing adenomas has also been shown by serial analysis of gene expression (27). In our series of adrenocortical tumors, CYP21A2 mRNA expression, as measured by quantitative real-time RT-PCR, was significantly higher in aldosterone-producing adenomas than in the normal adrenal cortex, but significantly lower in non-functioning adrenocortical adenomas, thus confirming the results reported in the literature (Fig. 1).

#### 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY: CLINICAL ASPECTS

Congenital adrenal hyperplasia is a group of autosomal recessive disorders characterized by impaired

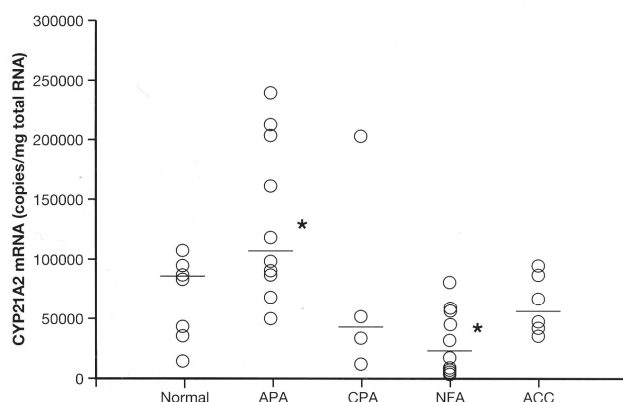


Fig. 1 - Expression of CYP21A2 mRNA, as determined by quantitative real-time RT-PCR, in normal and neoplastic adrenal gland. Individual values and medians (horizontal bars) are shown. Normal: normal adrenal cortex; APA: aldosterone-producing adenoma; CPA: cortisol-producing adenoma; NFA: non-functioning adenoma; ACC: adrenocortical carcinoma; \*: values significantly different from those of normal adrenal cortex (Student's t test,  $p < 0.05$ ).

cortisol secretion from the adrenal gland. More than 95% of CAH cases are caused by 21-hydroxylase enzyme deficiency. Biochemically, this inherited disorder is characterized by adrenal overproduction of sex hormone precursors, that do not require 21-hydroxylation for their synthesis. Clinical expression of the syndrome is related to the degree of deficiency of 21-hydroxylase activity, varying from conditions with inadequate aldosterone production to maintain sodium balance and risk of life-threatening hyponatremic dehydration ("salt wasters"), to those with isolated prenatal virilization of girls and rapid somatic growth with early epiphyseal fusion in both sexes ("simple virilizers"), to a mild "non-classic form" of the disorder in which affected females have little or no virilization at birth. Most mutations causing 21-hydroxylase deficiency are the result of recombinations between CYP21A2 and the CYP21A1P pseudogene. Two mechanisms of recombination have been described: unequal crossing over during meiosis, resulting in a net deletion of CYP21A2, or gene conversion that transfers deleterious mutations normally present in CYP21A1P to CYP21A2 (4). Thus, a limited number of mutations are responsible for the majority of cases of 21-hydroxylase deficiency. A good agreement between clinical presentation and type of mutations has been observed (4, 28).

#### ADRENAL TUMORS IN CONGENITAL ADRENAL HYPERPLASIA DUE TO 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY

In a prospective study, Jaresch et al. (29) reported a high prevalence of adrenal masses, nearly 82% in homozygous and 45% in heterozygous patients with

CAH, including deficiencies of 21-hydroxylase, 11 $\beta$ -hydroxylase, and 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. The risk of developing adrenal masses seems to be higher in patients who take inadequate glucocorticoid therapy (30, 31). Histological types of adrenal tumor include adenoma, myelolipoma, and hemangioma (32-34). Steroid-responsive hyperplastic adrenal nodules can present in previously undiagnosed patients late in life and can potentially be confused with virilizing adrenal adenomas (35-37). Rarely, virilizing adrenal carcinoma has been found in 21-hydroxylase deficiency patients (38, 39), but most adrenal masses in children with 21-hydroxylase deficiency are benign (40). We reported one case of congenital 21-hydroxylase deficiency out of a series of 202 patients with adrenal incidentaloma (7). The case was a male patient, bearing bilateral adrenal hyperplasia with a monolateral 1.5 cm-macronodule. He had markedly elevated plasma 17-OHP levels both before and after ACTH stimulation, and increased ACTH and DHEAS levels. Classic virilizing 21-hydroxylase deficiency was diagnosed by genetic testing. The mass remained unchanged at follow-up.

The presence of undiagnosed mild CAH due to 21-hydroxylase deficiency has been investigated in patients with incidentally discovered adrenal masses (incidentalomas). Indeed, 30-60% of patients with adrenal incidentalomas have been reported to have an exaggerated 17-OHP response to ACTH stimulation and the frequency of abnormal responses is even higher in patients with bilateral adrenal masses (1, 41-44), thus supporting the concept that congenital 21-hydroxylase deficiency may be a predisposing factor for adrenocortical tumorigenesis.

L. Barzon, P. Maffei, N. Sonino, et al.

Discordant findings have been reported by studies investigating the presence of CYP21A2 mutations in patients with adrenocortical tumors. Results from these reports are summarized in Table 1. Methodological aspects could account for the different prevalence of mutations among studies. In fact, analysis of point mutations in the CYP21A2 gene by sequencing or allele-specific PCR may miss large gene conversions and deletions, which can be detected by Southern blot analysis. Search for germline and somatic CYP21A2 mutations by sequence analysis in a group of sporadic adrenocortical tumors, including 6 aldosterone-producing adenomas, 7 cortisol-producing adenomas, 2 non-functioning adenomas, and 4 adrenocortical carcinomas demonstrated the presence of heterozygous germline mutations (V281L) in 2 patients, one with

a cortisol-producing adenoma and the other with an androgen-secreting adrenocortical carcinoma, and a somatic, heterozygous microdeletion in exon 3 of one aldosterone-producing adenoma (45) (Table 1). In another study (44), allele-specific PCR analysis of 4 aldosterone-producing adenomas, 4 cortisol-producing adenomas, 6 non-functioning adenomas, and 13 adrenocortical carcinomas, including both non-functioning and functioning cancers, demonstrated CYP21A2 mutations only in a virilizing adrenocortical carcinoma, which carried two somatic heterozygous mutations (Table 1). Patocs et al. performed mutation screening of the 9 most frequent pseudogene-derived point mutations by allele-specific PCR analysis in a series of 50 adrenal incidentalomas, including 19 bilateral and 31 unilateral masses (46) (Table 1). They demonstrated that

Table 1 - Prevalence of CYP21A2 mutations in adrenocortical tumors.

Reference	Method of mutation screening	CYP21A2 mutations in adrenal tumors			
		Aldosterone-producing adenoma	Cortisol-producing adenoma/hyperplasia	Non-functioning adenoma	Adrenocortical carcinoma
Beuschlein et al., 1998 (25)	PCR-sequencing	1/6 (somatic microdeletion in exon 3)	1/7 (heterozygous V281L)	0/2	1/4 (heterozygous V281L)
Kjellman et al., 1999 (45)	allele-specific PCR	0/4	0/4	0/6	1/13 (somatic heterozygous V281L and L307insT)
Patocs et al., 2002 (46)	allele-specific PCR	-	-	5/31 unilateral masses (3 heterozygous I172N; 2 heterozygous V281L); 4/19 bilateral masses (1 homozygous V281L; 2 heterozygous V281L; 1 heterozygous R356W)	-
Baumgartner-Parzer et al., 2002 (47)	PCR-sequencing and Southern-blotting	-	-	9/48 unilateral masses (1 compound heterozygous deletion and gene conversion; 5 heterozygous large gene conversions; 2 heterozygous Q318X; 1 heterozygous int2 mutation); 0/2 bilateral masses	-

one patient (2% of cases) with bilateral incidentaloma had the non-classical form of 21-hydroxylase deficiency due to germline homozygous V281L mutation and that a relatively high proportion of patients carried germline heterozygous mutations. The frequency of mutations was similar in patients with bilateral and unilateral adrenal incidentalomas (21.1% and 16.1%, respectively). No further mutations were identified in tumor samples. Endocrine evaluation demonstrated a considerable degree of divergence between the mutational spectrum of the CYP21A2 gene and ACTH-stimulated plasma 17-OHP levels, which varied greatly both in patients with mutations and in those without mutations.

Screening for germline CYP21A2 mutations in a group of 50 patients with adrenal incidentalomas was also performed by Baumgartner-Parzer et al. (47) who, at variance, employed both PCR-sequencing and Southern-blot analysis, a method which allows the identification of large gene deletion/conversion events. They diagnosed 21-hydroxylase deficiency in one (2%) 70-yr-old patient who had a combination of a large gene deletion and a conversion event in the other allele consistent with a severe impairment of 21-hydroxylase enzymatic activity. Eight other patients (16%) had classic 21-hydroxylase mutations (5 had heterozygous large gene conversions and 3 had heterozygous single base substitutions). No significant differences in clinical signs, tumor size, or presence of bilateral masses was observed between patients with mutations and those without mutations. Overall, in this study too there was a higher frequency of classic 21-hydroxylase mutation carriers (2% homozygous and 16% heterozygous) among patients with adrenal incidentalomas than in the general population (carrier prevalence for classic 21-hydroxylase deficiency: 1-2%; disease frequency: one in 15,000 live births) (4).

The prevalence of 17-OHP hyper-response to ACTH stimulation in patients with non-functioning adrenal adenomas is higher than the prevalence of CYP21A2 mutations. Moreover, such patients often show hyperresponse of 11-deoxycortisol and DOC, in addition to 17-OHP, to ACTH stimulation (48, 49), thus suggesting the presence of a general impairment of steroidogenesis in non-functioning adrenal adenomas. Moreover, the finding of a relationship between tumor size and 17-OHP-stimulated secretion reported in patients with adrenal incidentalomas not associated with 21-hydroxylase deficiency (50-52) indicates that such endocrine abnormalities may simply parallel the increased volume of adrenal tissue or intratumoral functional impairment of enzyme activity, rather than a true enzymatic defect.

#### MECHANISM OF ADRENAL TUMORIGENESIS IN 21-HYDROXYLASE DEFICIENCY

##### ACTH

In patients with 21-hydroxylase deficiency the decreased production of cortisol leads to persistent or intermittent ACTH hypersecretion, which has been suggested to have a main role in the formation of tumors within the hyperplastic adrenal cortex. The effect of ACTH is mediated by binding to its cognate receptor [melanocortin 2 receptor (MC2-R)], followed by activation of several intracellular pathways, which have been implicated not only in the regulation of steroidogenesis, but also in the regulation of adrenocortical growth, differentiation and tumorigenesis. MC2-R has been suggested to have a tumor suppressor function, since loss of heterozygosity of the MC2-R gene, resulting in reduced expression of MC2-R mRNA, has been found in advanced tumor stages (53). *In vitro* studies in human primary cell cultures have demonstrated that ACTH has an antiproliferative effect (54), although ACTH treatment increases DNA synthesis and cell growth and induces expression of potent mitogens, such as jun, fos, and myc (55). In an *in vivo* model, physiological doses of ACTH, acting through the MC2-R, have been demonstrated to have antiproliferative effects and to inhibit adrenal tumor growth (56). The observation is apparently in disagreement with that observed in patients with isolated familial glucocorticoid deficiency due to inactivating mutations of the MC2-R gene, who show ACTH insensitivity and adrenal hypoplasia (57). Other proopiomelanocortin-derived peptides have been shown to have effects on adrenocortical growth, such as fragments of melanocyte-stimulating hormone (MSH) (58).

##### CRH

Increased production of CRH might contribute to adrenal enlargement. In fact, CRH exerts a direct activity on the adrenal cortex through its type 1 and type 2 receptors, which have been found to be up-regulated in adrenocortical tumors (59). CRH directly stimulates DHEA secretion by adrenocortical cell *in vitro* (59) and, *in vivo*, in hypophysectomized rats, high doses of CRH have been demonstrated to reduce adrenocortical atrophy (60).

##### Adrenal sex steroid hormones

Patients with homozygous and heterozygous 21-hydroxylase deficiency carriers have increased adrenal androgens and testosterone concentrations compared to healthy individuals (61). It cannot be excluded that the mechanism leading to adrenal enlargement is a result of estrogens and/or androgens stimulation. We recently demonstrated that estro-

L. Barzon, P. Maffei, N. Sonino, et al.

gen receptors (ER), androgen receptors (AR), as well as aromatase are expressed in the human adrenal cortex and in adrenocortical tumors and that adrenocortical carcinomas are characterized by increased ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio, variable AR expression, and overexpression of aromatase (unpublished observations). Thus, adrenal androgens could be aromatized to estrogens within the adrenal gland and stimulate cell proliferation in an autocrine/paracrine loop, as we demonstrated with the human adrenocortical carcinoma cell line H295R (62).

**GLUCOCORTICOID THERAPY FOR ADRENAL INCIDENTALOMAS WITH HIGH 17-OHP LEVELS: A PUZZLING CASE**

It is unclear whether glucocorticoid treatment of patients with 21-hydroxylase deficiency reduces the risk of developing adrenal masses. It is also unknown whether ACTH suppression by glucocorticoids could reduce tumor mass size in patients with adrenal incidentalomas and 17-OHP hypersecretion. We recently used a very low dose of dexamethasone to treat a 58-yr-old woman with an incidentally discovered non-functioning mass of 5 cm in size at the right adrenal, discovered 18 yr after left adrenalectomy for a 1.5-cm adrenal incidentaloma (micronodular adrenocortical hyperplasia at histological analysis) (Fig. 2A). On admission, the patient was obese [body mass index (BMI) 32 kg/m<sup>2</sup>], without hirsutism or cushingoid features; her blood pressure was normal with the anti-hypertensive therapy and endocrine evalua-

tion demonstrated normal adrenal function, with the exception of high 17-OHP levels (4.8 nmol/l, normal range in menopausal condition 0.3-1.5 nmol/l). At ACTH stimulation test (Synacthen 0.250 mg iv bolus) with plasma cortisol and 17-OHP measurements at 0 and 60 min, cortisol rose from 386 (normal values at 08:00 h, 198-695 nmol/l) to 534 nmol/l and 17-OHP from 3.3 to 7.2 mmol/l. The ACTH-stimulated 17-OHP level was compatible with 21-hydroxylase deficiency heterozygous condition carrier. An abdominal computed tomography (CT) scan confirmed the presence of a 5.2x4 cm inhomogeneous mass with clear margins, characterized by the presence of a cystic area with liquid content. The unenhanced attenuation value was less than 10 Hounsfield Units (Fig. 2B). Radioiodine (<sup>131</sup>I)-metaiodobenzylguanidine (MIBG) scintigraphy showed no abnormal uptake by the mass and a positron emission tomography with <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose, to exclude malignancy, detected no abnormal metabolic activity at adrenal level or at other sites. Treatment with low-dose dexamethasone (0.25 mg/day) was started, while awaiting the results of germline molecular analysis of CYP21A2 (28), which revealed no gene mutations. After 6 months of dexamethasone treatment, 17-OHP and cortisol levels were suppressed. At control CT, the adrenal mass showed a slight modification due to an increase of liquid content but no change in size and in attenuation value (Fig. 2C). Since there was no change in size of the adrenal mass, dexamethasone therapy was continued at a lower dose (0.125 mg/day), scheduling adrenal hormone measurements and CT scan after

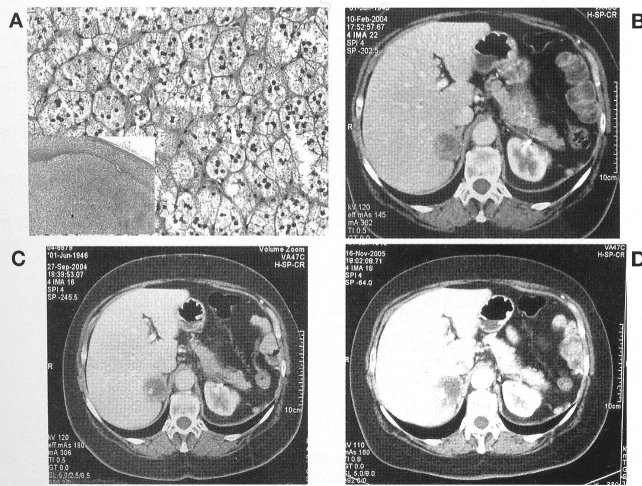


Fig. 2 - A) Histology (hematoxylin & eosin) section of left adrenal mass. Low magnification, i.e., x40 (left lower corner window): micronodules in the outer zona fasciculata, with no true capsule and merging with the cells of the normal gland; high magnification, i.e., x400: overall nodular pattern growth of lipid-laden zona-fasciculata like cells without evidence of pleomorphism or mitotic activity. B) Baseline, C) 6 months follow-up, D) 20 months follow-up of abdominal computed tomography scan showing an inhomogeneous right adrenal mass.



1 yr. Intermediate (at 3 months interval) abdominal ultrasound scans were also performed to check adrenal morphology. At 20 months of dexamethasone treatment, the endocrine profile was unchanged and the adrenal mass showed only a minimal increase in size (Fig. 2D). Dexamethasone was maintained at the same daily dose of 0.125 mg. The mechanism of tumorigenesis in this case of bilateral incidentaloma is unknown. Germline CYP21A2 gene mutations were excluded by sequence analysis, and adrenal tissue was not available to exclude somatic CYP21A2 mutations. A paracrine ACTH-dependent mechanism of adrenal cell growth stimulation, as recently documented in bilateral macronodular adrenal hyperplasia (63), could be hypothesized, although circulating ACTH was normal (6.2 pmol/l, normal range 2.2-11 pmol/l) in our patient. During long-term treatment by low-dose dexamethasone, which led to inhibition of the pituitary-adrenal axis, there was a change in adrenal tumor content from solid to liquid with only a minimal increment in mass size. Up to now, close observation with endocrine work-up and ultrasound/CT scan has allowed delaying the decision about surgery on the solitary mass. However, as recommended for all patients bearing large adrenal tumors, a cautionary approach will be maintained. The risk of the appearance of a mass in the contralateral gland is in fact not negligible in patients with adrenal incidentalomas, i.e., 3% in our series experience (64), and could be higher after unilateral adrenalectomy, as in our patient.

#### CONCLUSIONS

An exaggerated response of 17-OHP to exogenous ACTH stimulation has been found in 30 to 70% of patients with incidentally discovered adrenal tumors, supporting the concept that congenital 21-hydroxylase deficiency may be a predisposing factor for adrenocortical tumorigenesis. Decreased expression of 21-hydroxylase gene has been observed in sporadic non-functioning adrenocortical adenomas and adrenocortical carcinomas, in agreement with the reduced steroidogenic activity found in these types of tumors. In spite of a higher prevalence of germline 21-hydroxylase mutation carriers among patients with adrenocortical tumors, including incidentalomas, this condition does not seem to represent a relevant mechanism in adrenal tumorigenesis. Mechanisms leading to reduced 21-hydroxylase expression and activity are still unknown.

#### ACKNOWLEDGMENTS

G. Masi is a recipient of a fellowship from IRCCS-IOV (Istituto Oncologico Veneto-Padova, Italy).

#### REFERENCES

1. Barzon L, Sonino N, Fallo F, Palù G, Boscaro M. Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 2003, 149: 273-85.
2. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev* 1995, 16: 460-84.
3. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005, 365: 2125-36.
4. White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev* 2000, 21: 245-91.
5. Ravichandran R, Lafferty F, McGinniss MJ, Taylor HC. Congenital adrenal hyperplasia presenting as massive adrenal incidentalomas in the sixth decade of life: report of two patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 1776-9.
6. Nagasaka S, Kubota K, Motegi T, et al. A case of silent 21-hydroxylase deficiency with persistent adrenal insufficiency after removal of an adrenal incidentaloma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996, 44: 111-6.
7. Barzon L, Scaroni C, Sonino N, et al. Incidentally discovered adrenal tumors: endocrine and scintigraphic correlates. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 55-62.
8. Paine AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 2004, 25: 947-70.
9. Pezzi V, Mathis JM, Rainey WE, Carr BR. Profiling transcript levels for steroidogenic enzymes in fetal tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003, 87: 181-9.
10. John ME, John MC, Boggaram V, Simpson ER, Waterman MR. Transcriptional regulation of steroid hydroxylase genes by corticotropin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, 83: 4715-9.
11. Bird IM, Mason JI, Rainey WE. Protein kinase A, protein kinase C, and Ca<sup>2+</sup>-regulated expression of 21-hydroxylase cytochrome P450 in H295R human adrenocortical cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 1592-7.
12. Endoh A, Yang L, Hornsby PJ. CYP21 pseudogene transcripts are much less abundant than those from the active gene in normal human adrenocortical cells under various conditions in culture. *Mol Cell Endocrinol* 1998, 137: 13-9.
13. Shannon MF, Pell LM, Lenardo MJ, et al. A novel tumor necrosis factor-responsive transcription factor which recognizes a regulatory element in hemopoietic growth factor genes. *Mol Cell Biol* 1990, 10: 2950-9.
14. Wijesuriya SD, Zhang G, Dardis A, Miller WL. Transcriptional regulatory elements of the human gene for cytochrome P450c21 (steroid 21-hydroxylase) lie within intron 35 of the linked C4B gene. *J Biol Chem* 1999, 274: 38097-106.
15. Tee MK, Babalola GO, Aza-Blanc P, Speek M, Gitelman SE, Miller WL. A promoter within intron 35 of the human C4A gene initiates abundant adrenal-specific transcription of a 1 kb RNA: location of a cryptic CYP21 promoter element? *Hum Mol Genet* 1995, 4: 2109-16.
16. Sirianni R, Seely JB, Attia G, et al. Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. *J Endocrinol* 2002, 174: R13-7.

L. Barzon, P. Maffei, N. Sonino, et al.

17. Bavner A, Sanyal S, Gustafsson JA, Treuter E. Transcriptional corepression by SHP: molecular mechanisms and physiological consequences. *Trends Endocrinol Metab* 2005, 16: 478-88.
18. Lee HJ, Lee YF, Chang C. TR4 orphan receptor represses the human steroid 21-hydroxylase gene expression through the monomeric AGGTCA motif. *Biochem Biophys Res Comm* 2001, 285: 1361-8.
19. Liu J, Li XD, Vaheri A, Voutilainen R. DNA methylation affects cell proliferation, cortisol secretion and steroidogenic gene expression in human adrenocortical NCI-H295R cells. *J Mol Endocrinol* 2004, 33: 651-62.
20. Coulter CL, Jaffe RB. Functional maturation of the primate fetal adrenal in vivo: 3. Specific zonal localization and developmental regulation of CYP21A2 (P450c21) and CYP11B1/CYP11B2 (P450c11/aldosterone synthase) lead to integrated concept of zonal and temporal steroid biosynthesis. *Endocrinology* 1998, 139: 5144-50.
21. Narasaka T, Suzuki T, Moriya T, Sasano H. Temporal and spatial distribution of corticosteroidogenic enzymes immunoreactivity in developing human adrenal. *Mol Cell Endocrinol* 2001, 174: 111-20.
22. Sasano H, Suzuki T, Nagura H, Nishikawa T. Steroidogenesis in human adrenocortical carcinoma: biochemical activities, immunohistochemistry, and in situ hybridization of steroidogenic enzymes and histopathologic study in nine cases. *Hum Pathol* 1993, 24: 397-404.
23. Ogo A, Haji M, Yanase T, Kato K, Nawata H. The modification and expression of 21-hydroxylase gene in normal human adrenal gland and adrenal cancer. *J Endocrinol Invest* 1991, 14: 831-7.
24. Rácz K, Pinet F, Marton T, Szende B, Gláz E, Corvol P. Expression of steroidogenic enzyme messenger ribonucleic acids and corticosteroid production in aldosterone-producing and "nonfunctioning" adrenal adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77: 677-82.
25. Beuschlein F, Schulze E, Mora P, et al. Steroid 21-hydroxylase mutations and 21-hydroxylase messenger ribonucleic acid expression in human adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 2585-8.
26. Bassett MH, Mayhew B, Rehman K, et al. Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90: 5446-55.
27. Assié G, Auzan C, Gasc JM, et al. Steroidogenesis in aldosterone-producing adenoma revisited by transcriptome analysis. *J Clin Endocrinol Metab* 2005, 90: 6638-49.
28. Balsamo A, Cacciari E, Baldazzi L, et al. CYP21 analysis and phenotype/genotype relationship in the screened population of the Italian Emilia-Romagna region. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000, 53: 117-25.
29. Jaresch S, Kornely E, Kley HK, Schlaghecke R. Adrenal incidentaloma and patients with homozygous or heterozygous congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1992, 74: 685-9.
30. Wang J, Bissada MA, Williamson HO, Yakout H, Bissada NK. Adrenal tumors associated with inadequately treated congenital adrenal hyperplasia. *Can J Urol* 2002, 9: 1563-4.
31. Kurtoglu S, Atabek ME, Keskin M, Patiroglu TE. Adrenocortical adenoma associated with inadequately treated congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2003, 16: 1311-4.
32. Ravichandran R, Lafferty F, McGinniss MJ, Taylor HC. Congenital adrenal hyperplasia presenting as massive adrenal incidentalomas in the sixth decade of life: report of two patients with 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 1776-9.
33. Umpierrez MB, Fackler S, Umpierrez GE, Rubin J. Adrenal myelolipoma associated with endocrine dysfunction: review of the literature. *Am J Med Sci* 1997, 314: 338-41.
34. Pignatelli D, Vendeira P, Cabral AC. Adrenal incidentalomas: adrenal hemangioma in a patient with congenital adrenal hyperplasia. *South Med J* 1998, 91: 775-9.
35. Mokshagundam S, Surks MI. Congenital adrenal hyperplasia diagnosed in a man during workup for bilateral adrenal masses. *Arch Intern Med* 1993, 153: 1389-91.
36. Norris AM, O'Driscoll JB, Mamtara H. Macronodular congenital adrenal hyperplasia in an adult with female pseudohermaphroditism. *Eur Radiol* 1996, 6: 470-2.
37. Falhammar H, Thoren M. An 88-year-old woman with adrenal tumor and congenital adrenal hyperplasia: connection or coincidence? *J Endocrinol Invest* 2005, 28: 449-53.
38. Dubey GK, Dotiwalla HH, Choubey BS, Kher A. A case report of virilising adrenal cortical carcinoma. *J Assoc Physicians India* 1981, 29: 491-3.
39. Bauman A, Bauman CG. Virilizing adrenocortical carcinoma. Development in a patient with salt-losing congenital adrenal hyperplasia. *JAMA* 1982, 248: 3140-1.
40. Lightner ES, Levine LS. The adrenal incidentaloma. A pediatric perspective. *Am J Dis Child* 1993, 147: 1274-6.
41. Seppel T, Schlaghecke R. Augmented 17 alpha-hydroxyprogesterone response to ACTH stimulation as evidence of decreased 21-hydroxylase activity in patients with incidentally discovered adrenal tumours ('incidentalomas'). *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994, 41: 445-51.
42. Ambrosi B, Peverelli S, Passini E, et al. Abnormalities of endocrine function in patients with clinically "silent" adrenal masses. *Eur J Endocrinol* 1995, 132: 422-8.
43. Terzolo M, Osella G, Ali A, et al. Different patterns of steroid secretion in patients with adrenal incidentaloma. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81: 740-4.
44. Bernini GP, Brogi G, Vivaldi MS, et al. 17-Hydroxyprogesterone response to ACTH in bilateral and monolateral adrenal incidentalomas. *J Endocrinol Invest* 1996, 19: 745-52.
45. Kjellman M, Holst M, Backdahl M, Larsson C, Farnebo LO, Wedell A. No overrepresentation of congenital adrenal hyperplasia in patients with adrenocortical tumours. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999, 50: 343-6.
46. Patócs A, Tóth M, Barta C, et al. Hormonal evaluation and mutation screening for steroid 21-hydroxylase deficiency in patients with unilateral and bilateral adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 2002, 147: 349-55.
47. Baumgartner-Parzer SM, Pauschenwein S, Waldhäusl W, Pölzler K, Nowotny P, Vierhapper H. Increased prevalence of het-

- erozygous 21-OH germline mutations in patients with adrenal incidentalomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2002, 56: 811-6.
48. Barzon L, Boscaro M. Diagnosis and management of adrenal incidentalomas. *J Urol* 2000, 163: 398-407.
  49. Reincke M, Peter M, Sippell WG, Allolio B. Impairment of 11 $\beta$ -hydroxylase but not 21-hydroxylase in adrenal 'incidentalomas'. *Eur J Endocrinol* 1997, 136: 196-200.
  50. Dall'Asta C, Barbetta L, Libe R, Passini E, Ambrosi B. Coexistence of 21-hydroxylase and 11 beta-hydroxylase deficiency in adrenal incidentalomas and in subclinical Cushing's syndrome. *Horm Res* 2002, 57: 192-6.
  51. Toth M, Racz K, Adleff V, et al. Comparative analysis of plasma 17-hydroxyprogesterone and cortisol responses to ACTH in patients with various adrenal tumors before and after unilateral adrenalectomy. *J Endocrinol Invest* 2000, 23: 287-94.
  52. Sadoul JL, Kézachian B, Altare S, Hadjali Y, Canivet B. Apparent activities of 21-hydroxylase, 17 $\alpha$ -hydroxylase and 17,20-lyase are impaired in adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* 1999, 141: 238-45.
  53. Reincke M, Mora P, Beuschlein F, Arlt W, Chrousos GP, Allolio B. Deletion of the adrenocorticotropic receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82: 3054-8.
  54. Simonian MII, Gill GN. Regulation of the fetal human adrenal cortex: effects of adrenocorticotropic on growth and function of monolayer cultures of fetal and definitive zone cells. *Endocrinology* 1981, 108: 1769-79.
  55. Kimura E, Sonobe MH, Armelin MC, Armelin HA. Induction of FOS and JUN proteins by adrenocorticotropic and phorbol ester but not by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate derivatives. *Mol Endocrinol* 1993, 7: 1463-71.
  56. Zwermann O, Schulte DM, Reincke M, Beuschlein F. ACTH 1-24 inhibits proliferation of adrenocortical tumors in vivo. *Eur J Endocrinol* 2005, 153: 435-44.
  57. Clark AJ, Weber A. Adrenocorticotropic insensitivity syndromes. *Endocr Rev* 1998, 19: 828-43.
  58. Lowry PJ, Silas L, McLean C, Linton EA, Estivariz FE. Pro-gammamelanocyte-stimulating hormone cleavage in adrenal gland undergoing compensatory growth. *Nature* 1983, 306: 70-3.
  59. Willenberg HS, Haase M, Papewalis C, Schott M, Scherbaum WA, Bornstein SR. Corticotropin-releasing hormone receptor expression on normal and tumorous human adrenocortical cells. *Neuroendocrinology* 2005, 82: 274-81.
  60. Bornstein SR, Ehrhart M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF. Adrenocortical atrophy of hypophysectomized rats can be reduced by corticotropin-releasing hormone (CRH). *Cell Tissue Res* 1990, 260: 161-6.
  61. Knochenhauer ES, Cortet-Rudelli C, Cunningham RD, Conway-Myers BA, Dewailly D, Azziz R. Carriers of 21-hydroxylase deficiency are not at increased risk for hyperandrogenism. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82: 479-85.
  62. Montanaro D, Maggiolini M, Recchia AG, et al. Antiestrogens upregulate estrogen receptor  $\beta$  expression and inhibit human adrenocortical cell proliferation. *J Mol Endocrinol* 2005, 35: 245-56.
  63. Lefebvre H, Duparc C, Chartrel N, et al. Intraadrenal adrenocorticotropic production in a case of bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88: 3035-42.
  64. Barzon L, Scaroni C, Sonino N, Fallo F, Paoletta A, Boscaro M. Risk factors and long-term follow-up of adrenal incidentalomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84: 520-6.



## SHORT COMMUNICATION

## Detection of polyomaviruses and herpesviruses in human adrenal tumors

L Barzon<sup>1</sup>, M Trevisan<sup>1</sup>, G Masi<sup>1</sup>, M Pacenti<sup>1</sup>, A Sinigaglia<sup>1</sup>, V Macchi<sup>2</sup>, A Porzionato<sup>2</sup>, R De Caro<sup>2</sup>, G Favia<sup>3</sup>, M Iacobone<sup>3</sup> and G Palù<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology, Microbiology and Medical Biotechnologies, University of Padova, Padova, Italy; <sup>2</sup>Department of Human Anatomy and Physiology, University of Padova, Padova, Italy and <sup>3</sup>Department of Surgical and Gastroenterological Sciences, University of Padova, Padova, Italy

The presence of polyomaviruses and herpesviruses in adrenal tumors and their role in adrenal tumorigenesis has never been investigated, even though the adrenal gland seems to be a preferential site of infection by these viruses and adrenal steroid hormones have been shown to activate their replication. We examined in a large series of normal adrenal gland tissues ( $n=20$ ) and adrenal tumors ( $n=107$ ) the presence of herpesviruses and polyomaviruses sequences and gene expression, which were detected in a high proportion of both normal and neoplastic adrenal samples (overall, viruses were found in 15% normal adrenals, 27.8% benign adrenal tumors and 35.3% malignant tumors). The polyomaviruses SV40 and BK virus were more frequently found in malignant adrenal tumors, whereas herpesviruses, especially Epstein–Barr virus and human cytomegalovirus, were more frequently detected in functioning benign adrenocortical tumors, often as coinfection. Moreover, tumors from patients with severe hypercortisolism frequently showed herpesvirus coinfections at high viral genome copy number. Our study suggests that the adrenal gland could be a reservoir of infection for these viruses and that hormone overproduction by the adrenal gland could represent a trigger for virus reactivation. On the other hand, these viruses could also contribute to adrenal cell proliferation and tumorigenesis.

*Oncogene* advance online publication, 6 August 2007; doi:10.1038/sj.onc.1210699

**Keywords:** adrenal gland neoplasms; herpesviruses; polyomaviruses; pheochromocytoma; adrenocortical carcinoma; hypercortisolism

Adrenal masses are common findings in clinical practice, affecting 1–4% of the population (Barzon *et al.*, 2003). Most are benign nonfunctioning adrenocortical adenomas (NFAs) and, less frequently, pheochromocytomas, whereas adrenocortical carcinomas (ACCs) and malignant pheochromocytomas are rare. Besides the dismal

prognosis of ACCs, both benign and malignant adrenal tumors may be associated with morbidity due to syndromes of hormone hypersecretion (hypercortisolism, aldosteronism, virilization, feminization or symptoms due to catecholamine excess). The pathogenesis of sporadic adrenal tumors is poorly understood, whereas progress has been made in the identification of the molecular basis of inherited adrenal tumor syndromes (Libè and Bertherat, 2005; Dahia, 2006). In particular, the role of viruses in adrenal tumorigenesis has never been investigated, even though the adrenal gland seems to be a preferential site of infection by several viruses. Selective adrenotropism has been demonstrated in experimental animal models of adenovirus, herpes simplex virus (HSV), varicella zoster virus (VZV), human cytomegalovirus (HCMV) and polyomavirus infection (Barzon *et al.*, 2004). Moreover, glucocorticoids and other adrenal steroid hormones have been shown to enhance replication and/or reactivation from latency of several viruses, such as the herpesviruses HSV-1 (Nishiyama and Rapp, 1979), HSV-2 (Amstey, 1977), HCMV (Tanaka *et al.*, 1984a,b; Lathey and Spector, 1991), Epstein–Barr virus (EBV) (Glaser *et al.*, 1995), and HHV8 (Zoetewij *et al.*, 2002) and polyomaviruses (Morhenn *et al.*, 1973), including BK virus (BKV) (Moens *et al.*, 1994).

Based on these observations, we hypothesize that some viruses, including oncogenic herpesviruses and polyomaviruses, could naturally infect the adrenal gland and even be reactivated in the case of hormone hypersecretion, thus contributing to cell proliferation and tumorigenesis.

Among herpesviruses, EBV and HHV8 have been clearly involved in human cancer, whereas HCMV and HHV6 have been hypothesized to be cofactors of tumorigenesis. The effect of herpesvirus infection on the adrenal gland has been poorly investigated. HCMV has been shown to infect a variety of organs and tissues, including the adrenal gland. In particular, HCMV infection of the adrenal gland and adrenal insufficiency has been reported in AIDS patients with HCMV disease (Pulakhandam and Dincsoy, 1990; Hoshino *et al.*, 1997; Razzaq *et al.*, 2002). Adrenal insufficiency with necrosis of the adrenal cortex has been also anecdotally reported in patients with acute HSV-1 infection (Podlech *et al.*, 1996; Aita *et al.*, 2001). The role of other herpesviruses in adrenal disease is unknown.

Correspondence: Dr L Barzon or Professor G Palù, Department of Histology, Microbiology and Medical Biotechnologies, University of Padova, Via A Gabelli 63, Padova I-35121, Italy.  
 E-mails: luisa.barzon@unipd.it or giorgio.palu@unipd.it  
 Received 12 February 2007; revised 25 May 2007; accepted 26 June 2007

The polyomaviruses identified in humans are SV40, JC virus (JCV) and BKV. They have been involved in the development of several human cancers and lymphomas, but their role in human adrenal tumors has never been investigated, although experimental evidences indicate that polyomaviruses can infect and transform cells of the adrenal cortex and the adrenal medulla (Small *et al.*, 1986; Ressetar *et al.*, 1993, 1997; Tischler *et al.*, 1993; Serenius *et al.*, 1994; Flaegstad *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 2000; Hornsby *et al.*, 2002). We have recently reported the case of a patient with a large NFA, which showed histological features consistent with HCMV infection, whose presence was confirmed by detection of HCMV DNA and proteins (Pomara *et al.*, 2006). The adrenal adenoma was also positive for BKV DNA sequences. Based on this occasional finding and on the above evidences from the literature, aim of this study was to investigate whether there is an association between viral infection and adrenal tumors by examination of a large series of normal and neoplastic adrenal tissues for the presence of herpesviruses and polyomaviruses DNA sequences and gene expression.

We investigated a total of 127 human adrenal tissue samples, including 20 normal adrenal glands, 36 NFAs, 16 cortisol-producing adenomas/hyperplasia (CPAs), 12 aldosterone-producing adenomas (APAs), 3 androgen-producing adenomas/hyperplasia, 16 ACCs (14 functioning and 2 nonfunctioning) and 24 adrenal medullary tumors (including 21 benign pheochromocytomas, 1 malignant pheochromocytoma and 2 ganglioneuromas) (Table 1). The presence of viral DNA sequences of the herpesviruses EBV (Biasolo *et al.*, 2003), HCMV (Mengoli *et al.*, 2004), HSV1, HSV2, VZV, HHV6, HHV7, and HHV8 (Watzinger *et al.*, 2004) and the polyomaviruses JCV, BKV and SV40 (McNees *et al.*, 2005) was investigated by sensitive real-time quantitative PCR assays on DNA extracted from frozen or formalin-fixed paraffin-embedded samples. The quantity and integrity of purified DNA was evaluated by real-time PCR amplification of the  $\beta$ -globin gene (Biasolo *et al.*, 2003). All nucleic acid purifications and PCR analyses were performed at least two times to confirm the results and three water-negative controls were run in each DNA purification session to check for contamination.

EBV DNA sequences were detected in two (16.7%) APAs, five (31.3%) CPAs, two (5.6%) NFAs and one (5%) normal adrenal tissue, but not in ACCs and pheochromocytomas. EBV DNA copy number was higher in CPA (median, 9500 EBV DNA copies/10<sup>6</sup> cells, range 10–40000), particularly in tumors of patients with severe hypercortisolism than in the other adrenal tumor types (range, 2–20 EBV DNA copies/10<sup>6</sup> cells). On positive samples, EBV genotyping by PCR amplification of the *EBNA-2* and *EBNA-3B* genes (Lee *et al.*, 2004) demonstrated the presence of EBV-1 in nine cases and EBV-2 in one CPA. Moreover, the 30 bp deletion of the *LMP-1* gene, which has been associated with a higher oncogenic potential (Knecht *et al.*, 1993), was revealed only in EBV DNA from a normal adrenal gland. This distribution of EBV genotypes and 30 bp

Table 1 Detection of herpesvirus and polyomavirus DNA in human adrenal tissues

Tumor type	No of cases	Herpesviruses*										Polyomaviruses*			All viruses	
		HSV1	HSV2	VZV	CMV	HHV6	HHV7	EBV	HHV8	All herpesviruses	BKV	JCV	SV40	All polyomaviruses		
Aldosterone-producing adenoma	12	1 (8.3)	0	0	2 (16.7)	0	0	2 (16.7)	0	0	3 (25.0)	1 (8.3)	0	1 (8.3)	1 (8.3)	3 (25.0)
Cortisol-producing adenoma/hyperplasia	16	0	0	4 (25)	2 (12.5)	0	5 (31.3)	1 (6.3)	1 (6.3)	6 (37.5)	1 (6.3)	0	1 (6.3)	1 (6.3)	6 (37.5)	
Androgen-producing adenoma/hyperplasia	3	0	0	0	0	0	0	1 (33.3)	0	1 (33.3)	0	0	0	0	1 (33.3)	
Nonfunctioning adrenocortical adenoma	36	4 (11.1)	0	0	5 (13.9)	1 (2.8)	0	2 (5.6)	1 (2.8)	9 (25.0)	1 (2.8)	0	1 (2.8)	2 (5.6)	10 (27.8)	
Adrenocortical carcinoma	16	1 (6.3)	0	0	0	0	0	0	0	3 (18.8)	2 (12.5)	0	1 (6.3)	4 (25.0)	5 (31.3)	
Benign pheochromocytoma/ganglioneuroma	23	1 (4.4)	0	0	3 (13.0)	2 (8.7)	0	0	0	5 (21.7)	0	0	0	0	5 (21.7)	
Malignant pheochromocytoma	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (100.0)	1 (100.0)	
Normal adrenal gland	20	0	0	0	1 (5.0)	3 (15.0)	0	1 (5.0)	1 (5.0)	3 (15.0)	0	0	0	0	3 (15.0)	

Abbreviations: CMV, cytomegalovirus; EBV, Epstein-Barr virus; HSV, herpes simplex virus; VZV, varicella zoster virus; \*Number of positive tissues (%).

deleted LMP-1 variant is similar to the prevalence observed in blood samples from EBV healthy carriers attending our Clinical Microbiology Laboratory in Padova (unpublished observations) and to the prevalence reported in other institutions (Gratama and Ernberg, 1995; Correa *et al.*, 2004). To assess whether EBV infection in adrenal tissues was latent or lytic, we analysed expression of transcripts of EBV latent genes (*EBER*, *EBNA-1*, *EBNA-2*, *EBNA-3C*, *LMP-1* and *LMP-2*) by reverse transcription (RT)-PCR, as reported (Isobe *et al.*, 2004), and expression of EBNA-1 protein and EBV early antigen-diffuse (EA-D), which is expressed during lytic activation, by immunohistochemistry. Lack of EBV latent gene expression together with diffuse EA-D-p52/50 cytoplasmic staining was consistent with lytic infection (Figure 1).

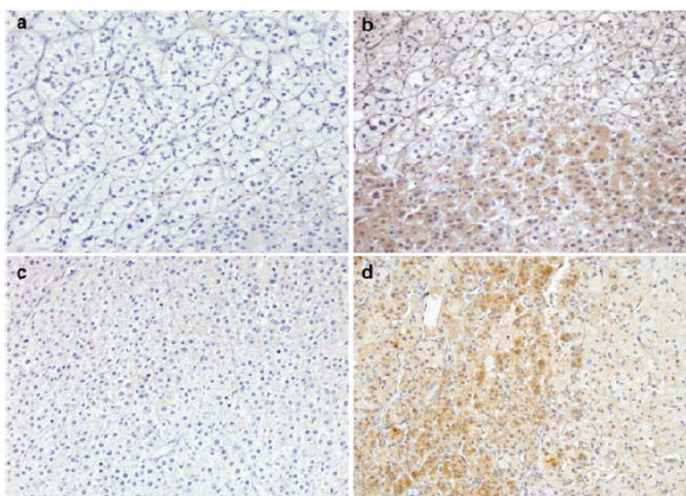
HCMV DNA sequences were detected in two (16.7%) APAs (one was also positive for EBV DNA), four (25%) CPAs (three EBV-positive), five (13.9%) NFAs (one EBV-positive), one (5%) normal adrenal tissue (also EBV-positive), three (13%) benign pheochromocytomas, but not in ACCs. HCMV DNA copy number varied from 10 to 13 000 DNA copies/ $10^6$  cells, with higher titers observed in CPAs associated with severe hypercortisolism. Immunohistochemistry revealed the expression of the structural protein pp65 (ppUL83), showing the lytic nature of the infection (Figure 1).

HHV6 DNA sequences were detected at low copy number (range, 5–35 copies/ $10^6$  cells) in two (12.5%) CPAs, one (2.8%) NFA, three (15%) normal adrenal tissues, two (8%) adrenal medullary tumors and in two (12.5%) ACCs.

HHV8 DNA sequences were detected in one case of bilateral adrenal hyperplasia due to a severe form of adrenocorticotropin-dependent Cushing's syndrome (the adrenal glands of this patient were also positive for EBV, HCMV and HHV6 at high copy number), in an NFA (which was also HCMV- and HSV-positive), in an androgen-producing adenoma, and in a normal adrenal gland tissue adjacent to a pheochromocytoma. Viral copy number was low, ranging from 5 to 30 copies/ $10^6$  cells.

HSV-1 DNA was demonstrated in one (8.3%) APA, four (11.1%) NFAs, one (6%) ACC and one (4.3%) pheochromocytoma. Viral copy number ranged from 10 to 80 copies/ $10^6$  cells. In three cases, HSV-1 and HCMV coinfection was observed. None of the adrenal tissues was positive for HSV-2 DNA. Moreover, neither VZV nor HHV7 DNA sequences was demonstrated in any adrenal sample.

In a subgroup of 26 consecutive patients with adrenal tumors (eight ACCs, four APAs, three CPAs, five NFAs and six pheochromocytomas) enrolled last year, serum and peripheral blood mononuclear cell DNA were



**Figure 1** Immunohistochemical stainings with anti-HCMV ppUL83 (Argene SA, Varilhes, France, CINApool) (a and b) and anti-EBV EA-D-p52/50 (Chemicon International, Temecula, CA, USA, MAB8186) (c and d) mouse monoclonal antibodies. Adrenal adenomas (b and d) positive to search of viral sequences by PCR showed also positive immunostaining (b: HCMV, nuclear and cytoplasmic staining; d: confirming the infections of the tumor cells. Negative control adenomas (a and c) did not immunostain. Tissues were formalin fixed, paraffin embedded and sliced into 4  $\mu$ m sections. Antigen retrieval for EA-D-p52/50 was carried out with 10mM sodium citrate buffer (pH 6.0) at 95°C for 10 min. Immunohistochemistry anti-HCMV ppUL83 did not required antigen retrieval. Primary antibodies were incubated for 1 h at room temperature. The HRP Envision Mouse System (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK) was used as a detection system for anti-EBV immunohistochemistry, while NovoLink Polymer (Novocastra) was used for anti-HCMV immunohistochemistry. Original magnification:  $\times 20$ .



available for antibody screening and viral DNA detection, respectively. All these patients were positive for immunoglobulin G (IgGs) anti-VZV, anti-HSV-1 (two also for anti-HSV-2) and anti-EBV EBNA and VCA (three patients had also positive immunoglobulin M (IgM) antibodies to VCA). All but one patient were positive for anti-HCMV IgGs; eight patients (31%) were negative for anti-HHV6 IgGs and only three patients had anti-HHV8 IgGs (two with latent and one with lytic antibodies). No herpesviral DNA sequences were detected in the peripheral blood of these patients. Out of these 26 patients, 3 had positive virological findings in their adrenal tumors: an NFA positive for HCMV, HSV and HHV8 DNA (the case with high HHV8 lytic antibody titer), a pheochromocytoma positive for HCMV and HSV DNA, and a CPA positive for EBV DNA (the patient had a slight elevation of anti-EBV IgMs). Thus, the presence of herpesviruses in the adrenal tumors seems to be associated with reactivation of lytic viral replication, as shown also by immunohistochemical detection of lytic viral antigens in tumor cells, such as EA-D-p52/50 and pp65 in EBV and HCMV infections, respectively (Figure 1).

Statistical analysis of possible associations between the presence of any herpesvirus and the nature or functional activity of the adrenal tumors demonstrated that EBV was more frequently found in benign functioning adrenocortical tumors than in ACCs, NFAs, pheochromocytomas or the normal adrenal gland ( $\chi^2$ -test,  $P < 0.01$ ). HCMV was also more frequently detected in benign functioning adrenocortical tumors, although the association was not statistically significant.

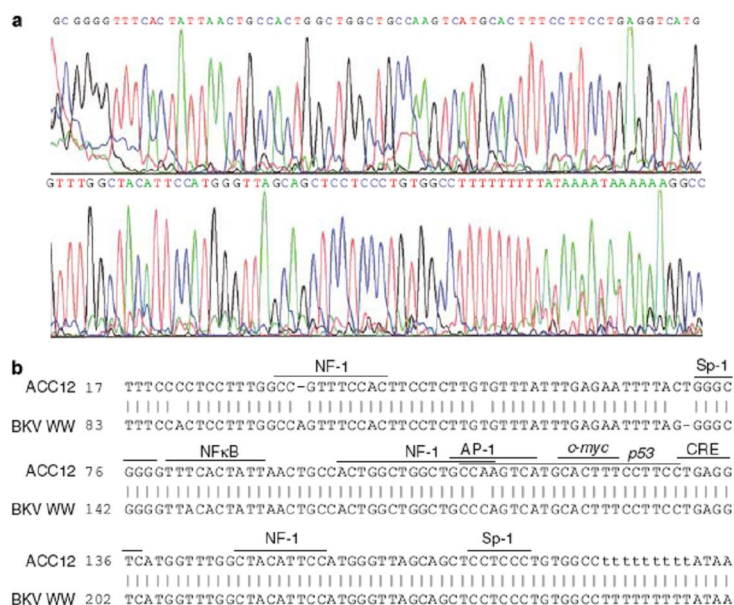
Glucocorticoids have been demonstrated to stimulate replication of herpesviruses, such as EBV (Bauer, 1983; Schuster *et al.*, 1991a; Glaser *et al.*, 1995), HCMV (Tanaka *et al.*, 1984a, b; Lathey and Spector, 1991) and HSV (Amstey, 1977; Nishiyama and Rapp, 1979). The mechanism of action of glucocorticoids on EBV replication has been demonstrated to rely on a functional glucocorticoid-responsive element (GRE) located in the latency C promoter of EBV genome, from which latency group III gene expression is controlled (Kupfer and Summers, 1990; Schuster *et al.*, 1991b). No GREs have been identified in the genome of HCMV and other herpesviruses. However, glucocorticoids and/or other adrenal steroid hormones could indirectly activate viral replication through induction of expression of other transcription factors and coactivators that bind viral-enhancer/promoter sequences and mediate glucocorticoid response. Herpesviruses have also been shown to reactivate in response to stress and adrenergic stimuli (Bloom *et al.*, 1997; Chang *et al.*, 2005). For example, physiological concentrations of catecholamines have been demonstrated to induce lytic replication of HHV8 in latently infected lymphoid cells via  $\beta$ -adrenergic activation of cellular protein kinase A signaling pathway (Chang *et al.*, 2005). These observations are in agreement with our findings of HHV8 DNA in a case of normal adrenal cortex adjacent to a pheochromocytoma and in two adrenocortical tumors,

which were also positive for other herpesviruses. Cortisol or catecholamine hypersecretion by adrenal tumors, together with stress due to disease and hospitalization, could represent important factors for viral reactivation. This is suggested also by the results of our study, which show that patients with severe and persistent hypercortisolism frequently had viral coinfections in their adrenal gland, at relatively high titer. It is possible that, in these adrenocortical tumors, herpesvirus replication and gene expression could act as cocarcinogens and interact with the genetic background and hormone stimuli to promote tumor cell proliferation and angiogenesis, and to suppress apoptosis. In this regard, we recently demonstrated that HCMV can infect ACC cells *in vitro* and that treatment with glucocorticoids of infected cells stimulates viral replication. Moreover, HCMV infection of adrenocortical cells led to a shift to more malignant phenotype (manuscript in preparation).

Besides herpesviruses, replication of polyomaviruses may also be regulated by hormones, such as in the case of SV40, whose late gene expression is regulated by members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily (Zuo and Mertz, 1995), or BKV, whose gene expression (especially late genes encoding structural proteins) and virus yield have been shown to be enhanced in the presence of glucocorticoids, progesterone or estrogens (Moens *et al.*, 1994). The effects of steroid hormones on BKV gene expression are mediated by a GRE-like motif and an estrogen-response element in the noncoding control region of BKV genome (Moens *et al.*, 1994) and are enhanced by BKV large T- and small t-antigens (Moens *et al.*, 1999). The adrenal gland and adrenocortical tumor cells could thus be permissive for BKV replication because of the production of sex steroid hormones and the expression of estrogen receptors at high levels (our unpublished data).

PCR screening for BKV DNA sequences in our series of adrenocortical tissues demonstrated the following positive cases: two relapses of a case of metastatic ACC (Barzon *et al.*, 2005), which were surgically removed at about 1-year interval, were both positive for BKV DNA, with about 300 genome copies/ $10^6$  cells; another functioning ACC; one case of APA and the previously described case of NFA, which was also positive for HCMV (Pomara *et al.*, 2006). Analysis of the presence and type of sequence variations in the noncoding control region of BKV genome by PCR and sequencing (Boldorini *et al.*, 2005) revealed un-rearranged archetypal BKV WW sequence in all cases, with the presence of single nucleotide mutations in putative bindings sites for the transcription factors AP-1 and NF-1 in the two recurrences of metastatic ACC (Figure 2). Immunohistochemical analysis of large T-antigen expression in polyomavirus-positive samples demonstrated the presence of focal nuclear immunostaining (Figure 3). Probably due to the low number of polyomavirus-positive cells, large T-antigen expression was not detected by western blot analysis of available frozen tissues.





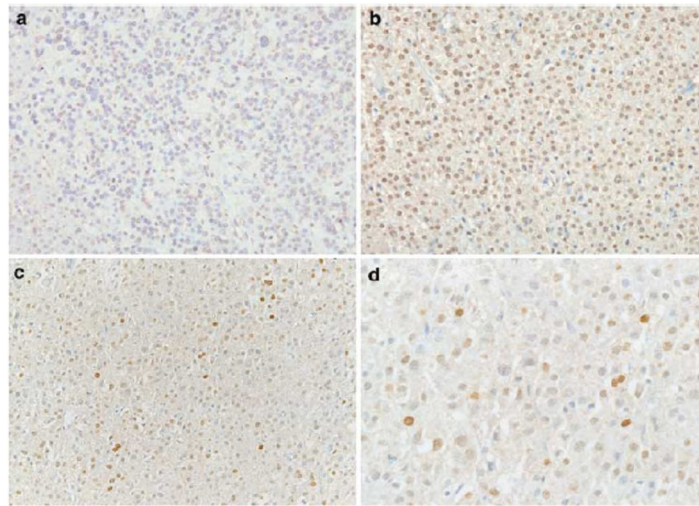
**Figure 2** Sequence analysis of the NCCR of BKV. (a) Electropherogram showing the NCCR sequence of BKV detected in an ACC (sample # ACC12) and (b) comparison with the sequence of the BKV archetype isolate WW, showing the presence of single-nucleotide mutations in the putative binding sites for AP-1 and NF-1.

No JCV DNA was detected in any adrenal sample. SV40 DNA was demonstrated at relatively low copy number (100–300 copies/10<sup>6</sup> cells) in one ACC (also positive for HHV6), one case of APA; one CPA, one NFA and at very high copy number (about one copy per cell) in the unique case of malignant pheochromocytoma. The risk of contamination of the PCR reactions with plasmid sequences was excluded by PCR analysis of positive samples by using oligonucleotide primers specific for engineered SV40 sequences which are present in plasmid DNA (Carbone *et al.*, 2005) and the oligonucleotide primers SV4279/SV2741, which are able to discriminate between engineered SV40 sequences in plasmid DNA and intact SV40 genome (Lopez-Rios *et al.*, 2004). Moreover, the presence of SV40 in positive samples was confirmed by DNA sequencing. Our finding of polyomaviruses in ACC and in malignant pheochromocytoma is intriguing, since these viruses have been associated with adrenal malignancy in experimental animal models, such as transgenic mice containing early regions of polyomaviruses, and in studies of human cancers. In particular, JCV- and SV40-containing mice have been shown to develop highly malignant adrenal neuroblastomas that metastasize to other tissues, whereas BKV-containing mice develop primary hepatocellular carcinomas and renal tumors (Small *et al.*, 1986; Feigenbaum *et al.*, 1992;

Ressetar *et al.*, 1993; Serenius *et al.*, 1994). In humans, BKV sequences and large T-antigen expression were demonstrated in 18 out of 18 neuroblastomas, but not in normal adrenal medulla (Flaegstad *et al.*, 1999). At variance, no SV40 sequences have been detected in human neuroblastomas (Bergsagel *et al.*, 1992; Flaegstad *et al.*, 1999).

In our series, polyomaviruses were demonstrated in 29.4% malignant adrenal tumors, 8.3% APAs, 6.3% CPAs or androgen-producing adenomas and 5.6% NFAs. The prevalence of polyomaviruses sequences in malignant adrenal tumors was significantly higher than in benign and normal adrenal tissues ( $\chi^2$ -test;  $P < 0.05$ ). Thus, our results, together with the data from the literature, seem to suggest a role for BKV and SV40 in adrenal malignant transformation. Since JCV DNA was not detected in adrenal tissues, whereas BKV and SV40 were detected, it is possible that human polyomaviruses have different tropism for the adrenal gland. In this regard, different tropism has been observed also for mesothelial cells, which are susceptible to SV40 and BKV infection, but not JCV infection (Carbone *et al.*, 2003). The tropism of polyomaviruses for adrenal cells and their effect on adrenocortical and adrenal medullary cell proliferation need further studies that are ongoing.

In conclusion, this study represents the first investigation of viral infection in human adrenal tumors. Overall,



**Figure 3** Immunohistochemical staining with anti-BKV T-antigen (Calbiochem, Merck Biosciences, Darmstadt, Germany, Anti-SV40 T Antigen Ab-2, Pab416) (a–d) mouse monoclonal antibody. Metastatic adrenal carcinoma (b–d) positive to search for viral sequences by PCR showed also positive nuclear immunostaining, confirming the infections of the tumor cells. Anti-BKV T-antigen immunostaining was mainly focal and involving only few cells (c and d), although fields with higher percentage of positive cells (b) were also present. Negative control adenoma (a) did not immunostain. Tissues were formalin fixed, paraffin embedded and sliced into 4  $\mu$ m sections. Antigen retrieval was carried out with 10 mM sodium citrate buffer (pH 6.0) at 95°C for 10 min. Primary antibodies were incubated for 1 h at room temperature. NovoLink Polymer (Novocastra) was used for anti-BKV immunohistochemistry. Original magnifications: (a–c)  $\times 20$ ; (d)  $\times 40$ .

considering both herpesviruses and polyomaviruses, viral sequences were detected in a high proportion of both normal and neoplastic adrenal samples: 15% normal adrenals, 27.8% benign adrenal tumors and 35.3% malignant tumors ( $P = NS$ ). The polyomaviruses SV40 and BKV were associated with ACC and malignant pheochromocytoma, whereas herpesviruses, especially EBV and HCMV, were more frequently detected in functioning adrenocortical tumors, often as coinfection. In particular, tumors from patients with severe hypercortisolism frequently showed herpesvirus coinfections at high viral copy number. Moreover, all malignant adrenal tumors showing viral infection (either herpesvirus or polyomavirus infection) were stage-IV functioning tumors.

Herpesviruses and polyomaviruses infection occurs early in childhood and, after primary infection, these viruses establish latent or persistent infections and may be reactivated by immunosuppression. Our study

suggests that the adrenal gland could be a reservoir of infection for these viruses and that hormone overproduction by the adrenal gland could represent a trigger for virus reactivation. On the other hand, these viruses, whose oncogenic potential has been extensively proven, could act as cocarcinogens and contribute to adrenal cell proliferation and tumorigenesis. The high prevalence of adrenal masses, especially in the aged population, should be explained by a widespread causative agent. Infection by widespread viruses, such as herpesviruses and polyomaviruses, could represent one of these causative agents.

#### Acknowledgements

Giulia Masi is recipient of a fellowship from IRCCS-IOV (Istituto Oncologico Veneto). This work was supported by AIRC grants to Giorgio Palù.

#### References

- Aita K, Irie H, Koyama AH, Fukuda A, Yoshida T, Shiga J. (2001). Acute adrenal infection by HSV-1: role of apoptosis in viral replication. *Arch Virol* **146**: 2009–2020.
- Amstey MS. (1977). Effect of pregnancy hormones on herpesvirus and other deoxyribonucleic acid viruses. *Am J Obstet Gynecol* **15**: 159–163.
- Barzon L, Boscaro M, Palù G. (2004). Endocrine aspects of cancer gene therapy. *Endocr Rev* **25**: 1–44.
- Barzon L, Masi G, Fincati K, Pacenti M, Pezzi V, Altavilla G *et al.* (2005). Shift from Conn's syndrome to Cushing's syndrome in a recurrent adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol* **153**: 629–636.

- Barzon L, Sonino N, Fallo F, Palù G, Boscaro M. (2003). Prevalence and natural history of adrenal incidentalomas. *Eur J Endocrinol* **149**: 273–285.
- Bauer G. (1983). Induction of Epstein–Barr virus early antigens by corticosteroids: inhibition by TPA and retinoic acid. *Int J Cancer* **31**: 291–295.
- Bergsagel DJ, Finegold MJ, Butel J, Kupsky WJ, Garsea RL. (1992). DNA sequences similar to those of simian virus 40 in ependymomas and choroid plexus tumors of childhood. *N Engl J Med* **326**: 988–993.
- Biasolo MA, Calistri A, Cesaro S, Gentile G, Mengoli C, Palù G. (2003). Case report: kinetics of Epstein–Barr virus load in a bone marrow transplant patient with no sign of lymphoproliferative disease. *J Med Virol* **69**: 220–224.
- Bloom DC, Stevens JG, Hill JM, Tran RK. (1997). Mutagenesis of a cAMP response element within the latency-associated transcript promoter of HSV-1 reduces adrenergic reactivation. *Virology* **236**: 202–207.
- Boldorini R, Veggiani C, Turello E, Barco D, Monga G. (2005). Are sequence variations in the BK virus control region essential for the development of polyomavirus nephropathy? *Am J Clin Pathol* **124**: 303–312.
- Carbone M, Burck C, Rdzanek M, Rudzinski J, Cutrone R, Bocchetta M. (2003). Different susceptibility of human mesothelial cells to polyomavirus infection and malignant transformation. *Cancer Res* **63**: 6125–6129.
- Carbone M, Rdzanek MA, Rudzinski J, De Marco M, Bocchetta M, Ramos-Nino M *et al*. (2005). SV40 detection in human tumor specimens. *Cancer Res* **65**: 10120–10121.
- Chang M, Brown HJ, Collado-Hidalgo A, Arevalo JM, Galic Z, Symensma TL *et al*. (2005). Beta-adrenoreceptors reactivate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication via PKA-dependent control of viral RTA. *J Virol* **79**: 13538–13547.
- Correa RM, Fellner MD, Alonio LV, Durand K, Teyssie AR, Picconi MA. (2004). Epstein–Barr virus (EBV) in healthy carriers: distribution of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. *J Med Virol* **73**: 583–588.
- Dahia PL. (2006). Evolving concepts in pheochromocytoma and paraganglioma. *Curr Opin Oncol* **18**: 1–8.
- Feigenbaum L, Hinrichs SH, Jay G. (1992). JC virus and simian virus 40 enhancers and transforming proteins: role in determining tissue specificity and pathogenicity in transgenic mice. *J Virol* **66**: 1176–1182.
- Flaegstad T, Andresen PA, Johnsen JI, Asomani SK, Jorgensen GE, Vignarajan S *et al*. (1999). A possible contributory role of BK virus infection in neuroblastoma development. *Cancer Res* **59**: 1160–1163.
- Glaser R, Kutz LA, MacCallum RC, Malarkey WB. (1995). Hormonal modulation of Epstein–Barr virus replication. *Neuroendocrinology* **62**: 356–361.
- Gratama JW, Ernberg I. (1995). Molecular epidemiology of Epstein–Barr virus infection. *Adv Cancer Res* **67**: 197–255.
- Hornsby PJ, Yang L, Thomas M. (2002). Adrenocortical cell proliferation in a cell transplantation model: the role of SV40T antigen. *Endocr Res* **28**: 777–783.
- Hoshino Y, Nagata Y, Gatanaga H, Hosono O, Morimoto C, Tachikawa N *et al*. (1997). Cytomegalovirus (CMV) retinitis and CMV antigenemia as a clue to impaired adrenocortical function in patients with AIDS. *AIDS* **11**: 1719–1724.
- Isobe Y, Sugimoto K, Yang L, Tamayose K, Egashira M, Kaneko T *et al*. (2004). Epstein–Barr virus infection of human natural killer cell lines and peripheral blood natural killer cells. *Cancer Res* **64**: 2167–2174.
- Knecht H, Bachmann E, Brousset P, Sandvej K, Nadal D, Bachmann F *et al*. (1993). Deletions within the LMPI oncogene of Epstein–Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* **82**: 2937–2942.
- Kupfer SR, Summers WC. (1990). Identification of a glucocorticoid-responsive element in Epstein–Barr virus. *J Virol* **64**: 1984–1990.
- Lathey JL, Spector SA. (1991). Unrestricted replication of human cytomegalovirus in hydrocortisone-treated macrophages. *J Virol* **65**: 6371–6375.
- Lee HS, Chang MS, Yang H-K, Lee BL, Kim WH. (2004). Epstein–Barr virus-positive gastric carcinoma has a distinct protein expression profile in comparison with Epstein–Barr virus-negative carcinoma. *Clin Cancer Res* **10**: 1698–1705.
- Libè R, Bertherat J. (2005). Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. *Eur J Endocrinol* **153**: 477–487.
- Lopez-Rios F, Illei PB, Rusch V, Ladanyi M. (2004). Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high risk of false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *Lancet* **364**: 1157–1166.
- McNees AL, White ZS, Zanwar P, Vilchez RA, Butel JS. (2005). Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR. *J Clin Virol* **34**: 52–62.
- Mengoli C, Cusinato R, Biasolo MA, Cesaro S, Parolin C, Palù G. (2004). Assessment of CMV load in solid organ transplant recipients by pp65 antigenemia and real-time quantitative DNA PCR assay: correlation with pp67 RNA detection. *J Med Virol* **74**: 78–84.
- Moens U, Subramaniam N, Johansen B, Johansen T, Traavik T. (1994). A steroid hormone response unit in the late leader of the noncoding control region of the human polyomavirus BK confers enhanced host cell permissivity. *J Virol* **68**: 2398–2408.
- Moens U, Van Ghelue M, Johansen B, Seternes OM. (1999). Concerted expression of BK virus large T- and small t-antigens strongly enhances oestrogen receptor-mediated transcription. *J Gen Virol* **80**: 585–594.
- Morhenn V, Rabinowitz Z, Tomkins GM. (1973). Effects of adrenal glucocorticoids on polyoma virus replication. *Proc Nat Acad Sci USA* **70**: 1088–1089.
- Nishiyama Y, Rapp F. (1979). Regulation of persistent infection with herpes simplex virus *in vitro* by hydrocortisone. *J Virol* **31**: 841–844.
- Podlech J, Hengerer F, Fleck M, Walev I, Falke D. (1996). Replication of herpes simplex virus type 1 and 2 in the medulla of the adrenal gland after vaginal infection of mice. *Arch Virol* **141**: 1999–2008.
- Pomara G, Cappello F, Barzon L, Morelli G, Rappa F, Benvenia L *et al*. (2006). Cytomegalovirus and BK-Virus co-infection of a clinically non-functioning adrenal adenoma: innocent bystanders or new pathogenetic agents? *Eur J Histochem* **50**: 131–132.
- Pulakhandam U, Dincsoy HP. (1990). Cytomegaloviral adrenalitis and adrenal insufficiency in AIDS. *Am J Clin Pathol* **93**: 651–656.
- Razzaq F, Dunbar EM, Bonington A. (2002). The development of cytomegalovirus-induced adrenal failure in a patient with AIDS while receiving corticosteroid therapy. *HIV Med* **3**: 212–214.
- Ressetar HG, Prakash O, Frisque RJ, Webster HD, Re RN, Stoner GL. (1993). Expression of viral T-antigen in



- pathological tissues from transgenic mice carrying JC-SV40 chimeric DNAs. *Mol Chem Neuropathol* **20**: 59–79.
- Ressetar HG, Webster H, Stoner GL. (1997). Persistence of neurotropic JC virus DNA in hamster tissues six months after intracerebral inoculation. *J Neurovirol* **3**: 66–70.
- Schuster C, Chasserot-Golaz S, Beck G. (1991a). Activation of Epstein–Barr virus promoters by a growth-factor and a glucocorticoid. *FEBS Lett* **284**: 82–86.
- Schuster C, Chasserot-Golaz S, Urier G, Beck G, Sergeant A. (1991b). Evidence for a functional glucocorticoid responsive element in the Epstein–Barr virus genome. *Mol Endocrinol* **5**: 267–272.
- Servenius B, Vernachio J, Price J, Andersson LC, Peterson PA. (1994). Metastasizing neuroblastomas in mice transgenic for simian virus 40 large T (SV40T) under the olfactory marker protein gene promoter. *Cancer Res* **54**: 5198–5205.
- Small JA, Khoury G, Jay G, Howley PM, Scangos GA. (1986). Early regions of JC virus and BK virus induce distinct and tissue-specific tumors in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**: 8288–8292.
- Tanaka J, Ogura T, Kamiya S, Sato H, Yoshie T, Ogura H et al. (1984a). Enhanced replication of human cytomegalovirus in human fibroblasts treated with dexamethasone. *J Gen Virol* **65**: 1757–1767.
- Tanaka J, Ogura T, Kamiya S, Yoshie T, Yabuki Y, Hatano M. (1984b). Dexamethasone enhances human cytomegalovirus replication in human epithelial cell cultures. *Virology* **136**: 448–452.
- Thomas M, Yang L, Hornsby PJ. (2000). Formation of functional tissue from transplanted adrenocortical cells expressing telomerase reverse transcriptase. *Nat Biotechnol* **18**: 39–42.
- Tischler AS, Freund R, Carroll J, Cahill AL, Perlman RL, Alroy J et al. (1993). Polyoma-induced neoplasms of the mouse adrenal medulla. Characterization of the tumors and establishment of cell lines. *Lab Invest* **68**: 541–549.
- Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L et al. (2004). Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol* **42**: 5189–5198.
- Zoetewij JP, Rinderknecht AS, Davis DA, Yarchoan R, Blauvelt A. (2002). Minimal reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by corticosteroids in latently infected B cell lines. *J Med Virol* **66**: 378–383.
- Zuo F, Mertz JE. (1995). Simian virus 40 late gene expression is regulated by members of the steroid/thyroid hormone receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 8586–8590.



## Modulation of retrovirally driven therapeutic genes by mutant *TP53* in anaplastic thyroid carcinoma

Luisa Barzon,<sup>1</sup> Elisa Gnatta,<sup>1</sup> Ignazio Castagliuolo,<sup>1</sup> Marta Trevisan,<sup>1</sup> Fabiola Moretti,<sup>2</sup> Alfredo Pontecorvi,<sup>3</sup> Marco Boscaro,<sup>4</sup> and Giorgio Palù<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Histology, Microbiology, and Medical Biotechnologies, University of Padova, I-35121 Padova, Italy; <sup>2</sup>Molecular Oncogenesis Laboratory and Urology Division, Regina Elena Cancer Institute, Experimental Research Center, Rome, Italy; <sup>3</sup>Institute of Medical Pathology, Catholic University, Rome, Italy; and <sup>4</sup>Division of Endocrinology, University of Ancona, Ancona, Italy.

We previously demonstrated that restoration of *TP53* activity in anaplastic thyroid carcinoma inhibits cell growth and induces expression of thyroid differentiation markers. Here, we investigated whether *TP53* status may condition the expression of therapeutic genes driven by retroviral LTR or tissue-specific enhancer elements. The *TP53*-defective ARO anaplastic thyroid carcinoma cells were transfected with *TP53*<sup>Val135</sup>, which exhibits wild-type activity at 32°C, and transduced with retroviral vectors, in which therapeutic genes were driven either by wild-type LTR or by a reshuffled LTR containing thyroglobulin (*TG*) enhancer. Both at 37 and 32°C, expression of transgenes driven by *TG* enhancer was 10-fold lower than that obtained with wild-type LTR retroviral vector. *TP53*<sup>Val135</sup> transfer into ARO cells repressed transcription from wild-type LTR but increased expression of *TG*-driven therapeutic genes. This effect was markedly enhanced by cell culture at 32°C and by TSH treatment. Cytotoxic effects shown after ganciclovir treatment paralleled therapeutic gene expression levels. In conclusion, *TP53* status in the tumor cell can influence expression of therapeutic genes. When using retroviral-vector-based gene therapy, wild-type LTR vectors should be employed to target *TP53*-defective tumors, whereas thyroid-specific promoters should be used for transcriptional targeting of thyroid carcinomas carrying wild-type *TP53*.

*Cancer Gene Therapy* (2005) 12, 381–388. doi:10.1038/sj.cgt.7700789

Published online 14 January 2005

**Keywords:** anaplastic thyroid carcinoma; *TP53*; retroviral vector; long terminal repeat; thyroglobulin enhancer

Thyroid carcinomas represent the most common endocrine malignancy, accounting for about 1% of all human cancers. Differentiated thyroid cancers generally respond to conventional therapy and have a relatively good prognosis. At variance, undifferentiated and anaplastic thyroid carcinomas show an aggressive and highly malignant behavior, associated with a poor survival. Since no effective therapy is available for patients with anaplastic thyroid carcinoma, development of innovative therapeutic approaches, including gene therapy, is needed. Different gene therapy approaches have been pursued so far for anaplastic thyroid carcinomas, including *TP53* gene transfer, suicide gene therapy, immunotherapy, and viral oncolysis.<sup>1</sup> Evidence from preclinical and clinical studies indicates that interventions combining different therapeutic modalities may result in improved anticancer efficacy. We have recently demonstrated the efficiency of a combined gene therapy approach for this type of cancer, based on retroviral

vector-mediated delivery of a cytokine gene (human interleukin-2, *hIL-2*) together with a suicide gene (thymidine kinase of herpes simplex virus type 1, *HSV-TK*).<sup>2</sup> An important issue in cancer gene therapy is the need to target therapeutic gene expression in order to prevent side effects to the surrounding healthy tissues. To this aim, we developed a thyroid-specific retroviral vector, in which viral enhancer elements were replaced with human thyroglobulin (*TG*) enhancer sequences. This vector allowed selective expression of therapeutic genes in differentiated thyroid carcinoma cells, but not in anaplastic thyroid carcinomas and nonthyroid tumor cells, that typically do not express *TG*.<sup>3</sup> Strategies pursued so far to activate *TG*-driven therapeutic gene expression in anaplastic thyroid carcinoma cells have been the cotransduction of the thyroid transcription factor-1 (*TTF-1*) gene<sup>4</sup> or the use of histone deacetylase inhibitors and agents modulating the cAMP pathway<sup>5</sup> to induce *TG* expression. The approach we followed in this study is based on the induction of a more differentiated phenotype in anaplastic thyroid cells. In this regard, our previous studies demonstrated that recovery of wild-type *TP53* activity in ARO anaplastic thyroid carcinoma cells induced expression of thyroid-specific genes, including *TG*, upon TSH stimulation.<sup>6</sup> In an attempt to develop a targeted

Received October 3, 2004.

Address correspondence and reprint requests to: Professor Giorgio Palù, MD, Department of Histology, Microbiology, and Medical Biotechnologies, University of Padova, Via Gabelli 63, I-35121 Padova, Italy. E-mail: giorgio.palu@unipd.it



therapeutic approach, we investigated in the present study the effects of *TP53* restoration on *TG* enhancer-driven therapeutic genes in anaplastic thyroid carcinoma cells. Since most anaplastic thyroid carcinomas bear *TP53* mutations and this molecular defect is responsible for the highly aggressive behavior of this type of cancer,<sup>7</sup> *TP53* gene transfer could be *per se* an effective therapeutic intervention, to be combined with the antitumor activity of suicide and cytokine genes.

## Materials and methods

### Cell lines and culture conditions

The human anaplastic thyroid carcinoma cell line ARO (UCLA RO-81-A-1, CA) and ARO-derived ARO-Neo, ARO-1F, ARO-4F, ARO-5, and ARO-8 cell clones<sup>6</sup> were cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen S. r.l, San Giuliano Milanese, Italy) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen), 100 U/ml penicillin G and 100 mg/ml streptomycin. ARO cells are characterized by the deletion of one *TP53* allele and by the presence, on the other allele, of the Arg273His inactivating mutation. ARO-1F, ARO-4F, ARO-5, and ARO-8 clones were obtained by stable transfection of ARO cells with the pN53cG(Val<sup>135</sup>) plasmid, encoding for the temperature-sensitive murine *TP53*<sup>Val135</sup> mutant gene (tsp53), and the selectable marker neomycin phosphotransferase (*neo*), under the control of the RSV-LTR promoter. The P53<sup>Val135</sup> protein has a mutant conformation at 37°C while displays a wild-type-like activity at 32°C.<sup>8</sup> These ARO-tsp53 cell clones are characterized by high-level expression and activity of *TP53*<sup>Val135</sup>, as demonstrated by *CDKN1A* induction.<sup>6</sup> The plasmid pRSVneo, carrying only the selectable marker *neo* under the control of the RSV-LTR promoter, was used to transfect control cells (ARO-Neo). Transfected cell clones were maintained under selection with 1 mg/ml G418 (Invitrogen).

The FLYA13 packaging cell line, employed to produce recombinant retroviral vector particles, was maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics, as described.<sup>2</sup>

### Construction of recombinant retroviral vectors and retroviral transduction

Recombinant retroviral vectors were developed from the pMFGIL-2TKSN(TGenh) thyroid-targeted vector and pMFGIL-2TKSN control vector,<sup>3</sup> by substitution of the selectable marker gene *neo* with the hygromycin phosphotransferase gene. In particular, a 1100 bp DNA fragment encoding the hygromycin phosphotransferase gene was obtained from the pREP4 plasmid (Qiagen S.p.A, Milan, Italy) by *Bam*HI digestion and subcloned into the *Bam*HI site of the pcDNA3.1 plasmid (Invitrogen), downstream a CMV promoter. A DNA fragment containing the CMV promoter and the hygromycin phosphotransferase gene was subsequently excised and

ligated into the *Bam*HI site of pMFGIL-2TK(TGenh) and pMFGIL-2TK vectors. The resulting retroviral vectors were named pMFGIL-2TKCH(TGenh) and pMFGIL-2TKCH, respectively. Plasmid vectors were transfected into the FLYA13 packaging cell line by using the Calcium Phosphate Transfection System reagents (Invitrogen), as described.<sup>9</sup> Transfected cells were selected in a medium containing 200 µg/ml hygromycin (ICN, Biomedicals, Asse, Belgium) and single-cell-derived clones isolated and expanded to cell lines. Viral vector titration was performed as described previously.<sup>9</sup> Supernatants from packaging cell clones with higher viral titer were used to transduce ARO anaplastic thyroid carcinoma cell clones.

### RNA isolation and quantitative real-time RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from cells following a single-step acid guanidium phenol-chloroform extraction procedure employing RNazol™ (Biotech Laboratories, Inc., Houston, TX). Random primed cDNAs were generated from total RNA using MuLV reverse transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA). Real-time quantitative RT-PCR analysis of *hIL-2*, *HSV-TK*, *TG*, *TPO*, *NIS*, *TSHR*, and *TTF-1* was performed on the ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems), as reported.<sup>3</sup>

### ELISA assay of hIL-2

The quantity of hIL-2 secreted into the medium by the different ARO cell clones was measured by using commercial ELISA kits (BioSource, Europe S.A., Nivelles, Belgium) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were plated at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well in 24-well cell culture plates and grown at 32 or 37°C. After 24 hours, cells were washed twice with PBS and fresh medium was added. Supernatant for hIL-2 ELISA assay was harvested after 24 and 48 hours.

### HSV-TK immunofluorescence staining

Approximately  $2 \times 10^4$  ARO clone cells, grown either at 32 or 37°C, were seeded on glass coverslips into 35 mm Petri dishes. After 24 hours, cells were fixed in paraformaldehyde for 10 minutes at room temperature. After washing the slides with PBS and permeabilization, diluted donkey serum was applied for 20 minutes. Thereafter, the slides were incubated overnight (18 hours) at 4°C with a polyclonal rabbit antibody anti-HSV-TK at 1:50 dilution (the anti-HSV-TK antibody was kindly provided by Professor A Cavaggioni, Department of Human Anatomy and Physiology, University of Padova, Italy). Incubation with the primary antibody was followed by washing with PBS and by applying a diluted FITC-conjugated secondary antibody for 60 minutes. Localization and intensity of fluorescence were observed by confocal laser scanning microscopy.

### Cytotoxicity assay

For cytotoxicity analysis, cells were seeded at density of  $5 \times 10^3$  cells/well in 96-well microtiter plates. On the next day, the cells were treated with ganciclovir (GCV) (Sigma) concentrations ranging from 0.01 to 100  $\mu$ M in 100  $\mu$ l medium, either in the presence or absence of 10 IU/l TSH. Cell survival was quantified by the MTT assay after 6 days of culture at 37 or 32°C.<sup>9</sup> Survival ratios were expressed as percentages relative to untreated controls.

### Statistical analysis

Results are given as the mean  $\pm$  SD. Comparisons between variables were tested by one-way analysis of variance or Student's *t*-test, when appropriate.  $P < .05$  was considered statistically significant.

### Results

#### Effect of TP53<sup>Val135</sup> on expression of thyroid-specific genes in anaplastic thyroid carcinoma cells

Evaluation of expression of thyroid differentiation marker genes in ARO-Neo and in ARO-tsp53 cell clones was performed in order to confirm that ARO-tsp53 cells, at the permissive temperature for wild-type TP53 activity, exhibited a differentiated thyroid cancer phenotype.

Real-time quantitative RT-PCR analysis showed very low expression of thyroid-specific genes (i.e., *TG*, *TTF-1*, *TPO*, *TSHR*, and *NIS*) in ARO-Neo and ARO-tsp53 cell clones, either grown at 37 or at 32°C. However, ARO-tsp53 cell clones grown at 32°C showed higher levels of thyroid-differentiation marker genes than cells grown at 37°C. These results are in agreement with the more differentiated phenotype shown by ARO-tsp53 when grown at 32°C, as reported in our previous study.<sup>6</sup>

In order to assess whether TP53 status influenced ARO cell responsiveness to physiological stimuli, such as TSH, ARO and ARO-tsp53 cells were treated with 10 IU/l TSH. As shown in Table 1, at 37°C, stimulation with TSH increased, although not significantly, expression of thyroid-specific genes both in ARO-Neo and ARO-tsp53 cells. At 32°C, TSH treatment resulted in a significant enhancement of expression of these thyroid differentiation genes in ARO-tsp53 cells, but not ARO-Neo cells, thus showing that cells with wild-type TP53 activity responded to TSH stimulation (Table 1).

Taken together, these results demonstrate that ARO-tsp53 cells grown at 37°C behave like parental ARO-Neo anaplastic thyroid carcinoma cells, whereas the same cells, grown at 32°C, displayed a differentiated thyroid carcinoma phenotype. This model was employed to evaluate activity of wild-type LTR and transcriptionally targeted LTR in anaplastic and differentiated thyroid carcinoma cells, minimizing variables related to the use of different cell types.

**Table 1** Expression of thyroid-specific genes ARO cell clones, as assessed by quantitative real-time RT-PCR analysis<sup>a</sup>

Thyroid marker gene (copies/mg total RNA)	ARO-Neo		ARO-4F		ARO-8		ARO-5		ARO-1F	
	37°C	32°C	37°C	32°C	37°C	32°C	37°C	32°C	37°C	32°C
<i>TG</i> mRNA										
-TSH	62.2 $\pm$ 7.4	82.3 $\pm$ 2.1	54.6 $\pm$ 14.2	125.2 $\pm$ 23.6	75.0 $\pm$ 24.2	140.6 $\pm$ 39.4	45.9 $\pm$ 18.2	365.9 $\pm$ 49.7	52.9 $\pm$ 34.9	537.5 $\pm$ 99.0
+TSH (10 IU/l)	84.1 $\pm$ 15.2	99.8 $\pm$ 11.4	118.4 $\pm$ 22.1	286.4 $\pm$ 41.2	122.4 $\pm$ 28.7	421.3 $\pm$ 53.9	110.2 $\pm$ 18.9	446.4 $\pm$ 60.2	70.1 $\pm$ 27.3	2836.9 $\pm$ 457.4
<i>TPO</i> mRNA										
-TSH	6.8 $\pm$ 1.7	3.0 $\pm$ 1.2	4.5 $\pm$ 2.1	17.4 $\pm$ 4.5	12.0 $\pm$ 3.4	25.2 $\pm$ 8.4	10.1 $\pm$ 2.4	95.1 $\pm$ 13.4	5.7 $\pm$ 3.1	31.0 $\pm$ 12.5
+TSH (10 IU/l)	7.4 $\pm$ 2.2	4.9 $\pm$ 2.3	6.9 $\pm$ 4.3	47.1 $\pm$ 19.8	18.5 $\pm$ 5.3	66.4 $\pm$ 17.0	26.7 $\pm$ 6.3	127.9 $\pm$ 23.8	4.9 $\pm$ 4.7	55.9 $\pm$ 18.0
<i>TSHR</i> mRNA										
-TSH	4.1 $\pm$ 0.9	2.9 $\pm$ 1.1	5.2 $\pm$ 2.4	9.3 $\pm$ 7.1	4.4 $\pm$ 3.0	10.3 $\pm$ 6.1	3.8 $\pm$ 4.4	25.0 $\pm$ 12.4	6.1 $\pm$ 3.3	18.8 $\pm$ 4.9
+TSH (10 IU/l)	4.2 $\pm$ 1.1	1.5 $\pm$ 0.7	8.6 $\pm$ 4.2	35.2 $\pm$ 6.6	6.8 $\pm$ 3.5	39.8 $\pm$ 14.2	8.2 $\pm$ 5.0	24.7 $\pm$ 17.6	13.4 $\pm$ 7.2	22.7 $\pm$ 7.2
<i>NIS</i> mRNA										
-TSH	5.8 $\pm$ 0.8	31.0 $\pm$ 4.7	21.0 $\pm$ 6.7	49.4 $\pm$ 47.0	17.8 $\pm$ 8.0	59.7 $\pm$ 30.0	32.4 $\pm$ 5.9	251.9 $\pm$ 47.0	35.2 $\pm$ 6.6	54.8 $\pm$ 11.4
+TSH (10 IU/l)	25.3 $\pm$ 3.2	54.3 $\pm$ 6.3	29.4 $\pm$ 9.0	103.1 $\pm$ 24.4	26.8 $\pm$ 11.4	144.1 $\pm$ 29.6	44.5 $\pm$ 10.1	210.1 $\pm$ 18.4	20.1 $\pm$ 5.0	87.4 $\pm$ 22.6
<i>TTF1</i> mRNA										
-TSH	10.0 $\pm$ 1.2	11.2 $\pm$ 3.4	8.7 $\pm$ 2.5	34.5 $\pm$ 8.3	24.0 $\pm$ 6.2	30.8 $\pm$ 16.2	48.1 $\pm$ 6.1	59.0 $\pm$ 7.3	6.2 $\pm$ 0.8	72.6 $\pm$ 9.0
+TSH (10 IU/l)	21.2 $\pm$ 2.5	20.5 $\pm$ 5.7	11.4 $\pm$ 5.6	106.5 $\pm$ 23.4	52.7 $\pm$ 14.0	124.0 $\pm$ 32.0	32.4 $\pm$ 10.6	72.9 $\pm$ 12.4	8.0 $\pm$ 1.9	80.1 $\pm$ 11.4

<sup>a</sup>All experiments were performed in triplicate.



*Expression of hIL-2 and HSV-TK therapeutic genes in retroviral-vector transduced anaplastic thyroid carcinoma cells*

As expected, *hIL-2* and *HSV-TK* were not expressed in nontransduced ARO-Neo and ARO-tsp53 cell clones. When cell clones were transduced with retroviral vectors, expression of therapeutic genes, as assessed by quantitative real-time RT-PCR analysis, showed variable results according to vector type, *TP53* activity, and TSH treatment (Table 2). In particular, in ARO-Neo cells, grown either at 37 or 32°C, expression of therapeutic genes driven by *TG* enhancer was 10–35-fold lower than that obtained after infection with the control vector having wild-type LTR. TSH treatment, which was employed to activate expression of genes driven by the *TG* enhancer in the chimeric LTR, did not significantly modify transgene expression in ARO-Neo cells. In ARO-tsp53 cells grown at 37°C, although with wide variability due to experimental methods and the different cell clones employed, expression of therapeutic genes driven by wild-type LTR was about 5–8-fold lower than in ARO-Neo control cells, whereas expression of transgenes under the control of *TG* enhancer was unchanged or slightly increased. In ARO-tsp53 cells grown at 32°C and in the presence of TSH, the inhibitory effect of *TP53*<sup>Val135</sup> on retroviral LTR and the stimulating effect on human *TG* enhancer was more pronounced, so that therapeutic gene expression under the control of the transcriptionally targeted LTR was similar to that obtained with the wild-type LTR retroviral vector (Table 2).

The results on therapeutic gene expression obtained by real-time quantitative RT-PCR analysis were confirmed by evaluation of *hIL-2* protein secretion by transduced cells into the culture medium by ELISA assay (Table 3). Production of *IL-2* by the vector with wild-type LTR was higher in ARO cells with inactive *TP53* than in those in which *TP53* activity was restored. At variance, *IL-2* secretion driven by the vector with transcriptionally targeted LTR was very low in ARO-Neo cells, but significantly increased in ARO-tsp53 cells grown at 32°C.

Analysis of *HSV-TK* expression at the protein levels was performed by indirect immunofluorescence using polyclonal anti-*HSV-TK* antibody. Although the fluorescence signal of *HSV-TK*-positive cells was generally faint, intensity of *HSV-TK* expression by immunofluorescence seemed to parallel the level of *IL-2* production by the same cells. Representative results of *HSV-TK* expression by immunofluorescence are shown in Figure 1.

*GCV sensitivity of infected cells*

Sensitivity to GCV of parental and infected ARO cell clones was assessed by determining the IC<sub>50</sub> by the MTT assay (Fig 2). In ARO-Neo cells grown at 37°C, GCV was significantly more effective when cells were transduced with the MFGIL-2TKCH vector than with the thyroid targeted MFGIL-2TKCH (TG<sub>enh</sub>) vector, with IC<sub>50</sub> of 0.01–0.1 and 100–1,000 μM, respectively. At 32°C, GCV cytotoxicity decreased, probably because of a reduction of cell proliferation rate. In ARO-tsp53 clones transduced

Table 2 Expression of *hIL-2* mRNA and *HSV-TK* mRNA in transduced ARO cells, as assessed by quantitative real-time RT-PCR analysis<sup>a</sup>

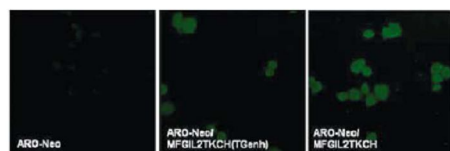
Cell clone	HSV-TK mRNA (copies/μg total RNA)						hIL-2 mRNA (copies/μg total RNA)					
	37°C			32°C			37°C			32°C		
	-TSH	+TSH	-TSH	+TSH	-TSH	+TSH	-TSH	+TSH	-TSH	+TSH	-TSH	+TSH
ARO-Neo	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARO-Neo/MFGIL2TKCH	24,170±4520	29,056±3892	49,063±3902	53,499±8015	19,135±4750	31,204±4762	51,240±4322	49,040±9879	0	0	0	0
ARO-Neo/MFGIL2TKCH (TG <sub>enh</sub> )	11,689±375	12,877±244	4,805±807	5,131±870	1,847±468	975±278	3,887±912	6,789±1,015	0	0	0	0
ARO-1F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARO-1F/MFGIL2TKCH	3034±427	6239±1210	7057±534	3170±290	3958±348	6794±964	6441±594	4807±378	0	0	0	0
ARO-1F/MFGIL2TKCH (TG <sub>enh</sub> )	1180±221	2532±634	3652±280	4216±468	1670±315	2660±704	4120±645	4780±524	0	0	0	0
ARO-5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARO-5/MFGIL2TKCH	5306±769	3865±403	4357±734	5120±615	4972±657	4103±379	4058±816	4670±518	0	0	0	0
ARO-5/MFGIL2TKCH (TG <sub>enh</sub> )	4201±278	1427±212	6831±1067	8851±1012	3976±321	1679±324	6057±1220	7906±1120	0	0	0	0
ARO-4F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARO-4F/MFGIL2TKCH	14,277±1280	10,340±910	16,422±4550	12,150±1340	13,850±1098	9803±1007	14,909±3710	12,403±2070	0	0	0	0
ARO-4F/MFGIL2TKCH (TG <sub>enh</sub> )	1310±290	1924±182	3681±573	4554±678	1409±210	2170±222	3788±480	5089±542	0	0	0	0
ARO-B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ARO-B/MFGIL2TKCH	6440±890	5227±623	6948±772	5840±721	5984±691	4780±531	6320±677	5600±647	0	0	0	0
ARO-B/MFGIL2TKCH (TG <sub>enh</sub> )	4950±452	3005±450	5031±970	6290±660	4120±524	2650±461	5287±1260	7231±628	0	0	0	0

<sup>a</sup>All experiments were performed in triplicate.



**Table 3** Production of *hIL-2* in the supernatant of transduced ARO cells, as measured by ELISA assay<sup>a</sup>

Cell clone	<i>hIL-2</i> (pg/ml)			
	24 hours		48 hours	
	37°C	32°C	37°C	32°C
ARO-Neo	0	0	0	0
ARO-Neo/MFGIL2TKCH	65.83 ± 18.11	25.33 ± 2.03	103.25 ± 7.34	51.67 ± 1.43
ARO-Neo/MFGIL2TKCH (TGenh)	0.50 ± 0.01	0.25 ± 0.03	2.15 ± 0.49	2.83 ± 0.10
ARO-1F	0	0	0	0
ARO-1F/MFGIL2TKCH	16.33 ± 1.96	7.00 ± 0.37	36.94 ± 0.50	16.16 ± 0.46
ARO-1F/MFGIL2TKCH (TGenh)	9.00 ± 0.70	6.00 ± 0.14	21.16 ± 1.09	14.98 ± 0.28
ARO-5	0	0	0	0
ARO-5/MFGIL2TKCH	30.00 ± 4.24	16.33 ± 0.69	66.16 ± 5.74	29.10 ± 2.71
ARO-5/MFGIL2TKCH (TGenh)	7.33 ± 0.56	14.00 ± 2.98	15.88 ± 1.23	20.47 ± 0.45
ARO-4F	0	0	0	0
ARO-4F/MFGIL2TKCH	35.40 ± 7.28	17.50 ± 4.58	64.16 ± 2.50	30.20 ± 3.60
ARO-4F/MFGIL2TKCH (TGenh)	6.08 ± 1.40	14.30 ± 2.44	15.90 ± 1.30	29.08 ± 2.82
ARO-8	0	0	0	0
ARO-8/MFGIL2TKCH	28.20 ± 1.26	12.46 ± 0.58	57.90 ± 2.64	25.30 ± 1.90
ARO-8/MFGIL2TKCH (TGenh)	4.80 ± 0.76	11.02 ± 2.30	9.46 ± 1.04	22.10 ± 0.65

<sup>a</sup>Experiments were performed in triplicate.**Figure 1** Evaluation of HSV-TK expression in parental and transduced ARO-Neo cells by indirect immunofluorescence with anti-HSV-TK polyclonal antibody.

with the MFGIL-2TKCH vector, GCV efficacy was lower than in the corresponding ARO-Neo cells, carrying mutant *TP53* ( $IC_{50}$  0.5–1.2  $\mu$ M vs. 0.01–0.1  $\mu$ M, respectively). At variance, GCV sensitivity of ARO-tsp53 cells infected with the MFGIL-2TKCH (TGenh) vector was higher than in corresponding ARO-Neo cells ( $IC_{50}$  0.3–10 vs. 100–1,000  $\mu$ M, respectively), and further enhanced at 32°C and in the presence of TSH. Results from representative experiments are shown in Figure 2.

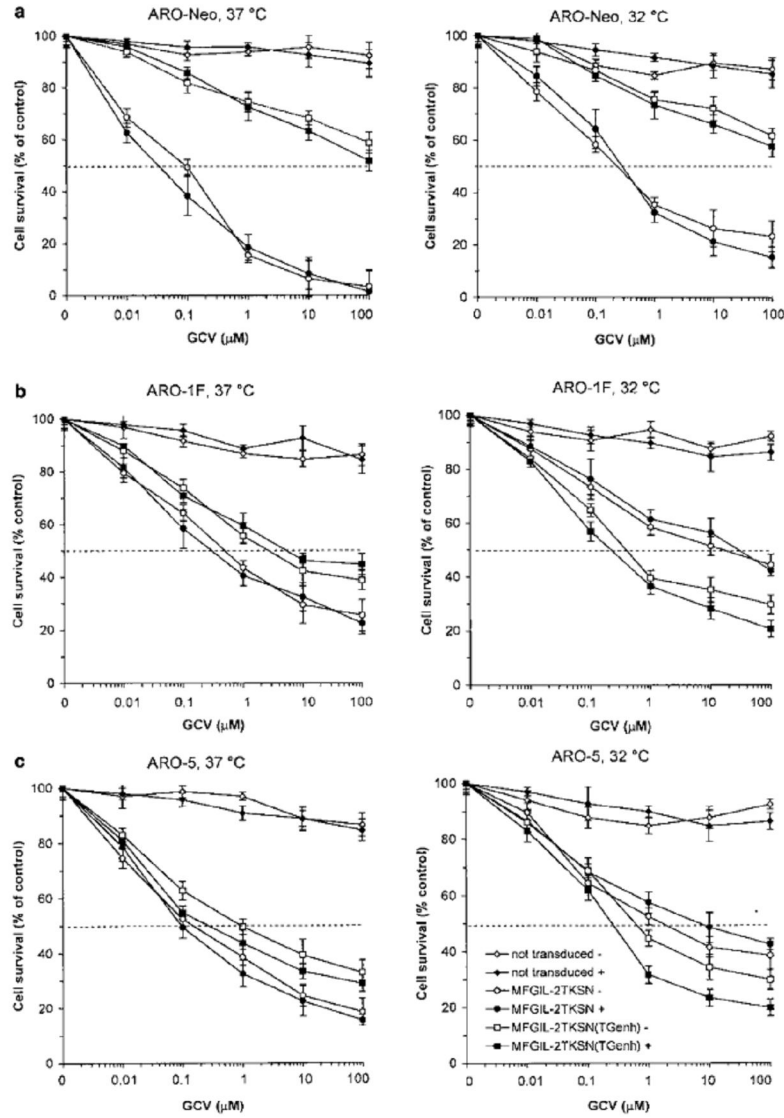
## Discussion

This study demonstrates that mutations in the *TP53* gene, which are generally found in undifferentiated and anaplastic thyroid carcinomas, not only play a critical role in loss of differentiated phenotype, but may also modulate expression of transgenes driven by retroviral vector LTR or cellular tissue-specific transcription control elements. These findings have relevance in the design of retroviral vector-based gene therapy strategies for cancer.

Our study springs from our previous observations and from data from the literature, showing that *TP53* mutations induce TSH-independent growth and inhibit expression of thyroid-specific genes,<sup>6,10,11</sup> and that these abnormalities can be reverted by re-expression of wild-type *TP53*.<sup>6,12–18</sup> We attempted here a gene therapy approach in which *TP53*-mediated tumor cell differentiation was combined with the delivery of suicide and cytokine genes under the control of *TG* enhancer.

To evaluate the efficacy of this strategy, we employed a temperature-sensitive mutant form of P53. In particular, in order to minimize the number of experimental variables, we transfected ARO human anaplastic thyroid carcinoma cells, which bear the hot-spot *TP53*<sup>His273</sup> mutation, with temperature-sensitive *TP53*<sup>Val135</sup>, which exhibits a nuclear-localized wild-type P53 conformation at 32°C, but a cytoplasmic-localized mutant conformation at 37°C.<sup>19</sup> Transduction of these cells with retroviral vectors carrying either wild-type LTR or transcriptionally targeted reshuffled LTR,<sup>3</sup> showed that *TP53*<sup>Val135</sup> transfer inhibited expression of LTR-driven transgenes but enhanced expression of transgenes under the control of human *TG* enhancer.

Repression of transcription from viral promoters, including retroviral LTR, by wild-type *TP53* has been already demonstrated in the literature,<sup>20,21</sup> whereas mutant *TP53* has been shown to directly activate several viral genes.<sup>20,22–24</sup> For example, P53<sup>His273</sup> has been shown to interact directly with cellular transcription factors, such as Sp1, and to transactivate HIV-LTR by binding target DNA sequences.<sup>24</sup> Moreover, expression of temperature sensitive P53<sup>Val135</sup> was able to block the transactivation activity of the endogenous mutant P53<sup>His273</sup> at both 37



**Figure 2** *In vitro* cytotoxicity of GCV in ARO-Neo (a) and ARO-tsp53 (b, c) cell clones either noninfected or transduced with MFGIL-2TKCH(TGent) or MFGIL-2TKCH vectors. Cells were grown at 37 or 32 °C and incubated with various concentrations of GCV for 6 days, followed by cell survival quantification by MTT assay. IC<sub>50</sub> was calculated as the concentration of drug which inhibits cell growth by 50%. Data are representative of at least three separate experiments performed in triplicate; each point represents the mean ± SD and is expressed as percentage relative to drug-free cells.

and 32°C.<sup>24</sup> It is conceivable that, at 37°C, P53<sup>Val135</sup> prevented nuclear localization of P53, whereas the inhibition shown at 32°C could be due to a direct effect of the wild-type conformation achieved by the protein.

Wild-type TP53 generally inhibits transcription from cellular promoters, whereas mutant TP53 can activate transcription of cellular genes involved in cell proliferation and tumorigenesis, even though effects may vary with type of mutation and cellular environment.<sup>20,21,25</sup>

As shown by our results in the TP53-defective ARO anaplastic thyroid carcinoma cell line, expression of TP53<sup>Val135</sup> inhibited cell proliferation and restored expression of thyroid differentiation marker genes, including TG, and TSH responsiveness. Since the chimaeric LTR containing a human TG enhancer sequence was also activated by TP53<sup>Val135</sup> transfer, it is conceivable that this sequence, which contains several TTF-1-binding sites and binding sites for CREB and a CREB-associated factor,<sup>26</sup> is involved in TP53-mediated transactivation.

The results of this study could be of interest for the design of retroviral vector-based gene therapy protocols for patients with thyroid cancer. As demonstrated by our pilot experience in two patients with anaplastic thyroid carcinoma, thyroid cancer is a suitable target for gene therapy protocols based on direct intratumor delivery of retroviral vectors or retroviral vector producing cells.<sup>1</sup> Reasons are twofold: the anatomical location of the tumor, which allows easy access, and the high proliferation rate of neoplastic cells, which can be selectively transduced by this type of vector.

In conclusion, our results demonstrate that P53 status in the tumor cell can influence expression of therapeutic genes in the context of gene therapy. Wild-type and mutant P53 may elicit either a stimulating or an inhibiting effect on transgene expression, according to the cellular or viral promoter that has been employed. As for thyroid cancer, wild-type P53 stimulates expression of thyroid-specific genes, including TG, but represses transcription from retroviral LTR. At variance, mutant P53 can transactivate retroviral LTR and down-regulate expression of thyroid-specific genes. Thus, when using retroviral vector-based gene therapy, wild-type LTR vectors should be used to target thyroid carcinomas carrying mutations in the TP53 gene, whereas thyroid-specific cellular promoters should be employed for a transcriptionally targeted approach in tumors carrying wild-type TP53. Our results also show that multimodality gene therapy approaches should be carefully evaluated, since they may not always have synergistic or additive effects, but may also act antagonistically.

#### Acknowledgments

This work was supported by Grants from MIUR (Ministero dell'Istruzione, dell'Università e della Ricerca) No. 2001061979 and 2002062741.

#### References

- Barzon L, Pacenti M, Boscaro M, Palù G. Gene therapy for thyroid cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;4:1225–1239.
- Barzon L, Bonaguro R, Castagliuolo I, et al. Gene therapy of thyroid cancer via retrovirally-driven combined expression of human interleukin-2 and herpes simplex virus thymidine kinase. *Eur J Endocrinol.* 2003;148:73–80.
- Barzon L, Bonaguro R, Castagliuolo I, et al. Transcriptionally targeted retroviral vector for combined suicide and immunomodulating gene therapy of thyroid cancer. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:5304–5311.
- Shimura H, Suzuki H, Miyazaki A, et al. Transcriptional activation of the thyroglobulin promoter directing suicide gene expression by Thyroid Transcription Factor-1 in thyroid cancer cells. *Cancer Res.* 2001;61:3640–3646.
- Kitazono M, Chuman Y, Aikou T, Fojo T. Adenovirus HSV-TK construct with thyroid-specific promoter: enhancement of activity and specificity with histone deacetylase inhibitors and agents modulating the camp pathway. *Int J Cancer.* 2002;99:453–459.
- Moretti F, Farsetti A, Soddu S, et al. p53 re-expression inhibits proliferation and restores differentiation of human thyroid anaplastic carcinoma cells. *Oncogene.* 1997;14:729–740.
- Fagin JA, Matsuo K, Karmakar A, Chen DL, Tang SH, Koeffler HP. High prevalence of mutations of the p53 gene in poorly differentiated human thyroid carcinomas. *J Clin Invest.* 1993;91:179–184.
- Ginsberg D, Michael-Michalovitz D, Ginsberg D, Oren M. Induction of growth arrest by a temperature-sensitive p53 mutant is correlated with increased nuclear localization and decreased stability of the protein. *Mol Cell Biol.* 1991;11:582–585.
- Palù G, Pizzato M, Bonaguro R, Colombo F. Gene therapy of glioblastoma multiforme with bicistronic retroviral vector expressing human IL-2 and HSV-TK. In: Walther W, Stein U, eds. *Methods in Molecular Medicine, Vol 35: Gene Therapy: Methods and Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press, Inc.; 2000: 505–516.
- Battista S, Martelli ML, Fedele M, et al. A mutated p53 gene alters thyroid cell differentiation. *Oncogene.* 1995;11:2029–2037.
- Casamassimi A, Miano MG, Porcellini A, et al. p53 genes mutated in the DNA binding site or at a specific COOH-terminal site exert divergent effects on thyroid cell growth and differentiation. *Cancer Res.* 1998;58:2888–2894.
- Fagin JA, Tang SH, Zeki K, Di Lauro R, Fusco A, Gonsky R. Reexpression of thyroid peroxidase in a derivative of an undifferentiated thyroid carcinoma cell line by introduction of wild-type p53. *Cancer Res.* 1996;56:765–771.
- Zeki K, Tanaka Y, Morimoto I, et al. Induction of expression of MHC-class-II antigen on human thyroid carcinoma by wild-type p53. *Int J Cancer.* 1998;75:391–395.
- Moretti F, Nanni S, Farsetti A, et al. Effects of exogenous p53 transduction in thyroid tumor cells with different p53 status. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85:302–308.
- Narimatsu M, Nagayama Y, Akino K, et al. Therapeutic usefulness of wild-type p53 gene introduction in a p53-null anaplastic thyroid carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:3668–3672.
- Imanishi R, Ohtsuru A, Iwamatsu M, et al. A histone deacetylase inhibitor enhances killing of undifferentiated thyroid carcinoma cells by p53 gene therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:4821–4824.



17. Kim SB, Ahn IM, Park HJ, et al. Growth inhibition and chemosensitivity of poorly differentiated human thyroid cancer cell line (NPA) transfected with p53 gene. *Head Neck*. 2001;23:223–229.
18. Nagayama Y, Yokoi H, Takeda K, et al. Adenovirus-mediated tumor suppressor p53 gene therapy for anaplastic thyroid carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85:4081–4086.
19. Martinez J, Georgoff I, Martinez J, Levine AJ. Cellular localization and cell cycle regulation by a temperature-sensitive p53 protein. *Genes Dev*. 1991;5:151–159.
20. Deb S, Jackson CT, Subler MA, Martin DW. Modulation of cellular and viral promoters by mutant human p53 proteins found in tumor cells. *J Virol*. 1992;66:6164–6170.
21. Subler MA, Martin DW, Deb S. Inhibition of viral and cellular promoters by human wild-type p53. *J Virol*. 1992;66:4757–4762.
22. Jackson P, Bos E, Braithwaite AW. Wild-type mouse p53 down-regulates transcription from different virus enhancer/promoters. *Oncogene*. 1993;8:589–597.
23. Subler MA, Martin DW, Deb S. Activation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat by transforming mutants of human p53. *J Virol*. 1994;68:103–110.
24. Chicas A, Molina P, Bargonetti J. Mutant p53 forms a complex with Spl on HIV-LTR DNA. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;279:383–390.
25. Ginsberg D, Mehta F, Yaniv M, Oren M. Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991;88:9979–9983.
26. Berg V, Vassart G, Christophe D. Identification of a thyroid-specific and cAMP-responsive enhancer in the upstream sequences of the human thyroglobulin promoter. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1307:35–38.