



Dottorato in Biotecnologie Mediche XXIX ciclo
a.a. 2013-2016

*“Modulazione dell'espressione genica in cellule linfoidi ed
epitelioidi infettate con il Virus Erpetico Umano 8 (HHV8) ed
analisi dell'attività chemioterapica/antivirale della
Distamicina A (DA)”*

Dottorando

Tutor

Dott.ssa Barbara Matteoli

Prof. Luca Ceccherini-Nelli

ABSTRACT	4
RIASSUNTO	8
INTRODUZIONE	
HHV8, INFEZIONE PRIMARIA	12
HHV8, TROPISMO CELLULARE	12
HHV8, GENOMA	12
HHV8, GENI E PROTEINE VIRALI	13
HHV8, GENI CICLO LITICO	13
HHV8, GENI DELLA LATENZA	14
HHV8, GENI DELLA RIATTIVAZIONE	14
HHV8, IMMUNOEVASIONE	15
HHV8, VARIABILITA' VIRALE	17
HHV8 CEPPI A1 E C3, CARATTERISTICHE MOLECOLARI E TROPISMO CELLULARE	17
IL SARCOMA DI KAPOSÌ	18
TRATTAMENTO	21
I FARMACI ANTIVIRALI	22
STORIA FARMACOLOGICA DEGLI ANTIERPETICI	22
I FARMACI ANTIERPETICI	22
LA DISTAMICINA A	25
SCOPO DELLA TESI	27
MATERIALI E METODI	
RIATTIVAZIONE DELLA REPLICAZIONE VIRALE	28
ESTRAZIONE DEL DNA	28
QUANTIFICAZIONE DEL DNA ESTRATTO	28
TIPIZZAZIONE VIRALE	28
QUANTIFICAZIONE DELLA CARICA VIRALE	29
INFEZIONE DELLE LINEE CELLULARI E VALUTAZIONE DEL TASSO DI INFEZIONE	30
ESPERIMENTI DI ANALISI DI MODULAZIONE GENICA	30
ESTRAZIONE DELL' RNA	31
RETROTRASCRIZIONE E MARCATURA	32
IBRIDAZIONE, COLORAZIONE SILVERQUANT, ANALISI	32
PREPARAZIONE DELLA DISTAMICINA LIPOSOMIALE	32
SAGGI DI CITOTOSSICITA'	33
SAGGI DI PERMEAZIONE IN VITRO E IN VIVO	33
SAGGIO DI RIDUZIONE DEL NUMERO DI CELLULE IMMUNOFLUORESCENTI	34

RISULTATI	35
DISCUSSIONE	49
CONCLUSIONI	53
BIBLIOGRAFIA	54

In order to clarify the modulation of cellular gene by Human Herpes virus 8 (HHV8) infection and to understand the potential antiviral effect of DA (an oligopeptidic antibiotic derived from the *Streptomyces distallicus* and nowadays obtained by synthesis) against HHV8, **purposes of this PhD study have been:**

1. the analysis of the pattern of expression of cellular genes involved in the antiviral response (inflammation and apoptosis) in lymphoid and epithelial cell lines infected with subtypes A1 and C3 of HHV8;
2. the *in vitro* tropism of HHV8 for Rabbits corneal epithelial cell line (RCE) (Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Bruno Ubertini), used to study the delivery of antiviral drugs *in vivo* in epithelial tissues sensible to HH8 infection;.
3. the analysis of the citotoxicity and of the efficacy of permeation of a liposomal formulation of DA;
4. the *in vitro* analysis of the antiviral activity of the liposomal formulation of DA against HHV8 in epithelial and lymphoid cytotypes.

The pattern of expression of cellular genes involved in inflammation and apoptotic processes have been investigated in HEK293 and PBMCs infected with A1 and C3 strains derived from BCBL1 and BC3 latently infected cell lines and at time 24 and 48 hr after infection with DualChip® Microarray, containing probes representative of 297 human genes involved in 65 pathways associated with inflammation and apoptosis. A robust increase in the expression was found in genes involved in inflammation (i.e., AGT, CCR8, CXCR4, IL-6, IL-9, IL10RA, IL-17, IL-23A), signal transduction (i.e., FGF5, FGF7, MAP3K1, MAPK9m, TGFBR1, TRAF2), cycle cellular (IGFBP1), immune response (i.e., IL-16, TLR4), apoptosis (TNFSF4, TNFSF11), and others genes belonging to different categories (i.e., BMP4, BMPR2, EPHA3, HGFBP1, RUNX1, RUNX2, SP1). With a >2-fold threshold filter gene modulation as significant, a high numbers of genes resulted significantly modulated both in HEK293 cell line and PBMCs infected both with the A1 (169 and 104 genes, respectively) and C3 subtypes (131 and 93 genes, respectively). Next, to increase the significance, only those genes with >4-fold changes in their expression were considered. A total of 24 genes resulted strongly induced especially by infection with HHV8 A1 subtype. Comparison of transcriptional profiling between both viral subtypes was subsequently done: only 4 genes resulted strongly induced by different viral subtypes (i.e., BMP4, BMPR2, RUNX2 and TNFSF11).

To understand the *in vitro* cell tropism of HHV8 A1 and C3 strains Human Embryonic Kidney (HEK293, Istituto Zooprofilattico Bruno Ubertini, Brescia) and Primary Human Lymphoblasts (PBMC, from HHV8 negative donors; informed consent was obtained) and Rabbits corneal epithelial cell line (RCE) were infected with A1 and C3 HHV8 subtypes. RCE cells were chosen because they could be used for permeability test *in vivo*. The viral load was greater than 10³ copies/ml and increased only in the HEK293 and RCE epithelial cells that were infected with HHV-8 subtype A1.

A liposomal formulation containing Distamycin hydrochloride (DA-Lipo) was prepared and the encapsulation efficiency and in vitro release kinetics were evaluated. The amount of DA in liposomes was determined by HPLC after lysis of liposomes with absolute ethanol. The encapsulation efficiency calculated on the final unimodal liposomal dispersion was 34.53% (E%) and permitted the production of a aqueous liposomal dispersion containing 1.38 ± 0.260 mg/ml of DA. The analysis of drug release properties of the liposomal formulation by using the dialysis membrane demonstrated a fast diffusion of DA from reference solution (DA-sol) while a more controlled release was obtained from Lipo-Da vesicles.

Cytotoxicity tests on RCE, HEK 293 and PBMC cells were carried out on DA reference solution (DA- Sol) on RCE, HEK 293 and PBMC cell lines, clearly showed the negligible toxicity of DA aqueous solution at all the concentrations tested. In fact, cell viability remains higher than 50% up to DA concentration corresponding to 0.01% w/w while toxic effect completely disappeared for the liposomal formulation. After treatment of RCE, HEK 293 and PBMC cell lines with liposomal DA dispersion cell viability maintained at over 90% irrespective of the tested concentration. These results confirm the lack of cytotoxicity of the liposomal formulation and consequently allow to establish the higher concentration of DA to use in the biological tests.

Permeation of DA through was evaluated on reconstituted Rabbits Corneal Epithelial membranes obtained from RCE cells seeded onto the Snapwell® membranes. The epithelial pharmacokinetic profile of topically applied drugs is influenced by many factors and the instillation of formulations potentially irritating could favor in the eye the precorneal clearance and reduce the intraocular absorption of drugs. For these reasons becomes obvious to establish the biocompatibility of the formulation choosing the drug concentration able to avoid any toxic effects. The results on cytotoxicity tests performed on RCE known for their sensibility towards irritating agents and widely used for the evaluation of ophthalmic adjuvant, confirm the good biocompatibility of DA solutions and the lack of toxic effects for DA encapsulated liposomes.

DA concentration in biological tissue was evaluated in vivo in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animal in Ophthalmic and Vision Research, following a protocol approved by the Ethical-Scientific Committee of the University of Pisa and under veterinary supervision. Male, New Zealand albino rabbits weighing 2.8-3.5 kg, from Pampaloni Rabbitry (Fauglia, Italy) were used. As expected, after instillation into rabbit eye, the formulations were well tolerated and in no case symptoms of ocular inflammation and irritation were evidenced from DA concentration vs time curves. Cynetics studies revealed high DA concentration in the tear fluid of rabbits immediately after instillation of both formulations and its rapid decrease 10 min after instillation up to DA concentration of 2.59 and 0.87 mg/mL for DA-Lipo and DA-Sol respectively after 30 minutes. In addition, the tear fluid DA concentration values were significantly higher at 3, 5 and 10 min ($p < 0.05$) for DA-Lipo formulations than for the reference. All values were indicative of a less rapid elimination of DA after instillation of the liposomal formulation. This behavior was confirmed by DA half-life in tear fluid, whose values were 1.82 and 2.75 min for DA-Sol and DA-Lipo, respectively. The AUC values were clearly indicative of the greater DA

bioavailability produced in tear fluid by DA-Lipo formulation (about 1.73-fold) with respect to DA-Sol even if statistically significant differences were not observed. The HPLC analysis on the DA content in the aqueous humor samples carried out at 15, 30, 60 min after instillation of both formulations allowed to assure the lack of trace of drug in this ocular fluid (LOQ and LOD values of analytical method 21.2 ng/mL and 9.23 ng/mL, respectively). Conversely, a significant amount of DA corresponding to 1.579 ± 0.087 and 2.028 ± 0.063 ng/mg were detected in the corneal tissues 30 min after administration of DA-Sol and DA-Lipo formulations, respectively ($p < 0.05$).

The antiviral activity of DA, liposomal and free formulation, on HHV8 de novo infection of HEK 293 cells and PBMC and RCE cells was evaluated by Immunofluorescence Reduction Assay (IFA).

Antiviral activity of concentrations ranging from 0.0772 to 772 μ M of DA (DA-Sol1) and liposomal DA formulation (DA-Lipo) was evaluated and IC₅₀ calculation was obtained with Graphpad Prism 2.0 software (GraphPad Software, USA) in three experimental replica. DA IC₅₀ against HHV8 A1 and C3 could be calculated only in HEK293 and RCE cells, because it resulted ineffective against the same HHV8 subtype infecting the PBMCs. DA IC₅₀ against HHV8 A1 in HEK293 and RCE cells was 0.01343 μ g/ml and 0.06257 μ g/ml respectively and DA IC₅₀ against HHV8 C3 in HEK293 and RCE cells was 0.127 μ g/ml and 0.1187 μ g/ml respectively. IC₅₀ of the DALipo formulation against HHV8 A1 in HEK293 and RCE cells was 0.08096 μ g/ml and 0.009351 μ g/ml respectively and against HHV8 C3 it was 0.1132 μ g/ml and 0.1567 μ g/ml in HEK293 and RCE cells. Interestingly DALipo exploited its antiviral activity also in PBMC cells infected with A1 and C3 subtypes and the IC₅₀ was 2.575 and 3.107 μ g/ml respectively.

This study describes a comprehensive picture of global gene changes soon after HHV-8 active infection of two susceptible cell types. We found that host cell expression changes after only 24 hours of infection, and it is quite different from previous gene induction studies that were carried out at later time points of virus infection. In fact, Poole et al. have used a different primary effusion lymphoma cell line (JSC1) to produce the virus that was used to infect primary endothelial cells for a period of 3–5 weeks, and gene array experiments were done when almost all of the cells changed from typical cobblestone to spindle-shaped morphology and were positive for LANA. Several features were apparent from these analysis: a) there was virtually non-overlapping list of genes in all of two viral subtypes analyzed; b) HHV-8-induced transcriptional profiles in the epithelial and PBMC were closely different. This is probably because the criteria of > 4-fold gene induction as significant is a threshold filter very tight. Nevertheless, the genes that emerge from such comparison will be of greater interest for studying their role in the unique biology of HHV-8. Furthermore, the replicative capacity of the two different strains in the two cell types and the modulation of cell involved in the inflammatory process would seem to indicate that the genotypic difference could be translated into a different virus-host relationship, also attributable to a different pathogenetic mechanism. In addition to identifying specific host response genes within each functional pathway that are already known to be important for HHV-8 infection, our findings identify novel candidate genes that are not yet known in HHV-8 biology. For example, up-regulated genes involved in inflammation

(AGT, CCR8, CXCR4, IL-6, IL-9, IL10RA, IL-17, IL-23A), signal transduction (FGF5, FGF7, MAP3K1, MAPK9, TGFBR1, TRAF2), cycle cellular (IGFBP1), immune response (IL-16, TLR4), Apoptosis (TNFSF4, TNFSF11). The roles of these molecules in HHV-8 infection and KS development remain to be studied.

Obtained results show a lack of cytotoxicity of DALipo on cultured HEK293, RCE and PBMC cells. It might be noted that the CC_{50} value found in the present study falls at the low extreme of the range of CC_{50} values reported in the literature. In fact, available data show CC_{50} values ranging from 35 μ M in a Hep-2 cell line to 154 μ M in a HeLa cell line and 385 μ M in rabbit primary kidney cells. It has been reported that DA inhibits the activity of all DNA polymerases. This mechanism of action could explain its antiviral activity. Because of the lack of information concerning the relevant genetic definition of HHV8 A1 and C3 subtypes from BCBL1 and BC3 cell lines, whether the observed behavior be the result of the expression of specific mutated genes or a non specific consequence of viral strain virulence has to be established. Clearly, further studies are needed to explain the different degree of sensitivity of HHV8 subtypes to DA and DALipo. The significant antiviral activity of DALipo and the lack of cytotoxicity in epithelial and lymphoid cell lines shown in the present study indicates the compound as an antiherpetic drug potentially useful in both topic and systemic treatments. It could be used either alone or in association with other antiviral treatment, the latter to be employed at lower dosages and for shorter periods of time, thus limiting side effects. The antiviral activity of DALipo formulation also in lymphoid cell lines may be due to the hydrophobic or amphiphilic drug penetration efficacy increased through inclusion of the drug in liposomes. DALipo showed, when compared with the free drug, higher antiviral activity against HHV8 A1 and C3 subtypes in PBMCs and might therefore represent a promising DA formulation that could be used also for systemic treatments.

Al fine di chiarire il processo di trasformazione neoplastica indotto dal Virus Erpetico Umano 8 (HHV8) e per comprendere il potenziale effetto antivirale contro HHV8 della Distamicina (un antibiotico oligopeptidico derivato dallo *Streptomyces distallicus*, oggi ottenuto per sintesi) , **nel presente lavoro di dottorato sono state eseguite:**

1. l'analisi del pattern di espressione di geni cellulari coinvolti nella risposta antivirale (infiammazione e apoptosi) in linee cellulari di origine epiteliale Human Embryonic Kidney (HEK293) e linfociti da sangue periferico (PBMC) infettate con i sottotipi A1 e C3 di HHV8;
2. l'analisi *in vitro* del tropismo di HHV8 per cellule epiteliali derivate corneale di coniglio (RCE), scelte per il loro successivo utilizzo per studiare la permeabilità del farmaco in vivo; .
3. l'analisi della citotossicità e dell'efficacia di permeazione di una formulazione liposomiale della DA;
4. l'analisi in vitro l'attività antivirale della formulazione liposomiale di DA contro HHV8 in citotipi epiteliali e linfociti.

Il pattern di espressione di geni cellulari coinvolti nei processi infiammatori e apoptotici sono stati analizzati nelle linee cellulari HEK293 e PBMC infettate con ceppi di A1 e C3 derivati dalle linee BCBL1 e BC3 latentemente infette a 24 e 48 ore dopo l'infezione mediante DualChip® microarray (Eppendorf, Germania); il microarray contiene sonde rappresentative di 297 geni umani coinvolti in 65 vie di trasmissione del segnale genico associate ai processi infiammatori ed apoptotici. I risultati hanno rilevato un significativo aumento nell'espressione dei geni coinvolti nel processo infiammatorio (vale a dire, AGT, CCR8, CXCR4, IL-6, IL-9, IL10RA, IL-17, IL-23A), trasduzione del segnale (ad esempio, FGF5, FGF7, MAP3K1, MAPK9, TGFBR1, TRAF2), ciclo cellulare (IGFBP1), risposta immunitaria (vale a dire, IL-16, TLR4), apoptosi (TNFSF4, TNFSF11), e altri geni appartenenti a diverse categorie (ad esempio, BMP4, BMPR2, EPHA3, HGFBP1, RUNX1, RUNX2, SP1). Fissando una soglia di modulazione genica > 2 volte, un elevato numero di geni sono risultati significativamente modulati sia in cellule HEK293 che nei PBMC infettate sia con il sottotipo A1 (169 e 104 geni, rispettivamente) e il sottotipo C3 (131 e 93 geni, rispettivamente). Per aumentare la significatività, la soglia di modulazione significativa è stata alzata a > 4 volte della espressione basale. Un totale di 24 geni risultata fortemente indotta soprattutto da infezione con HHV8 sottotipo A1. Il confronto tra i profili di espressione nelle linee infettate con i due sottotipi ha evidenziato che solo 4 geni sono fortemente modulati comunemente dai differenti sottotipi virali (cioè, BMP4, BMPR2, Runx2 e TNFSF11).

Per lo studio in vitro del tropismo cellulare dei ceppi A1 e C3 di HHV8 le particelle virali infettanti ottenute dalle linee cellulari BC3 e BCBL1 sono state utilizzate per infettare le linee cellulari HEK293, PBMC e RCE. cellule RCE. a 24 e 48 h dall'infezione il DNA è stato estratto dal surnatante e dalle cellule separatamente ed amplificato mediante Real time PCR quantitativa; separatamente le cellule sono state analizzate mediante IFA indiretta utilizzando sieri di pazienti HHV8 positivi per anticorpi anti K8.1. I risultati

dimostrano una carica virale superiore a 10^3 copie / ml solo nelle colture di cellule epiteliali HEK293 e RCE che infettate con HHV-8 sottotipo A1.

E' stata preparata una formulazione liposomiale contenente distamicina cloridrato (DA-Lipo) l'efficienza di incapsulamento e le cinetiche di rilascio sono stati valutati. La quantità di DA incapsulata nei liposomi è stata determinata mediante HPLC dopo lisi dei liposomi con etanolo assoluto. L'efficienza di incapsulamento calcolata sulla dispersione liposomiale unimodale finale era 34.53% (E%) e la produzione di una dispersione liposomiale acquosa contenente $1,38 \pm 0,260$ mg / ml di DA. L'analisi delle proprietà di rilascio del farmaco della formulazione liposomiale utilizzando la membrana di dialisi hanno dimostrato una rapida diffusione di DA dalla soluzione di riferimento (DA-sol) mentre un rilascio più controllato è stato ottenuto da Lipo-Da.

I test di citotossicità su RCE, HEK 293 e cellule PBMC effettuate sulla soluzione di riferimento DA (DA-Sol) ha mostrato chiaramente una tossicità trascurabile della soluzione acquosa di DA a tutte le concentrazioni testate. Infatti, la vitalità cellulare rimane superiore al 50% fino a una concentrazione di DA corrispondente al 0,01% w / w mentre l'effetto tossico scompare completamente per la formulazione liposomiale. Dopo il trattamento di RCE, HEK 293 e PBMC linee cellulari con DA liposomiale la vitalità cellulare si mantiene oltre il 90% a prescindere dalla concentrazione testata. Questi risultati confermano la mancanza di citotossicità della formulazione liposomiale e quindi consentono di stabilire la maggiore concentrazione di DA da utilizzare nei test biologici.

La permeazione della DA attraverso è stata valutata su membrane epiteliali corneali ricostituite ottenute da cellule RCE seminate su membrane Snapwell®. Il profilo farmacocinetico epiteliale di farmaci per uso topico è influenzato da molti fattori e l'instillazione di formulazioni potenzialmente irritanti potrebbe ridurre l'assorbimento intraoculare dei farmaci. Per questi motivi diventa evidente per stabilire la biocompatibilità della formulazione scelta individuare la concentrazione del farmaco in grado di evitare effetti tossici. I risultati in test di citotossicità eseguiti su RCE note per la loro sensibilità verso agenti irritanti e ampiamente utilizzati per la valutazione di adiuvanti oftalmici, confermano la buona biocompatibilità di soluzioni di DA e la mancanza di effetti tossici per la DA incapsulata nei liposomi.

La concentrazione di DA nel tessuto biologico è stata valutata *in vivo* in accordo con la dichiarazione ARVO per l'uso di animali in oftalmica e Vision Research, secondo un protocollo approvato dal Comitato Etico-Scientifico dell'Università di Pisa e sotto controllo veterinario. Sono stati utilizzati Maschi, conigli albini del peso di 2.8-3.5 kg, da Pampaloni Rabbitry Nuova Zelanda (Fauglia, Italia). Come atteso dopo l'instillazione le formulazioni di DA sono state ben tollerate e non si sono riscontrati casi di infiammazione/irritazione. Gli studi cinetici hanno rilevato un aumento della concentrazione subito dopo l'instillazione e un decremento dopo 30 min a 2.59 e 0.87 mg/mL per DA-Lipo e DA-Sol rispettivamente. Inoltre la concentrazione della formulazione liposomiale a 3-5 e 10 minuti dall'instillazione è risultata significativamente maggiore rispetto alla forma libera ($p < 0.05$). Tutti i dati hanno inoltre rilevato una velocità di eliminazione minore della forma liposomiale, comportamento confermato emivita della DA nel liquido lacrimale (1.82 e 2.75 min per DA-Sol e DA-Lipo, rispettivamente). I valori di AUC sono indicativi

della maggiore biodisponibilità nel fluido lacrimale della formulazione liposomiale (circa 1,73 volte) rispetto alla forma libera. L'analisi della concentrazione di DA nell'umor acqueo a 15-30 e 60 minuti dall'instillazione di entrambe le formulazioni hanno rilevato l'assenza del farmaco (valori LOQ e LOD di analitica metodo 21,2 ng / mL e 9,23 ng / mL, rispettivamente). Al contrario, una notevole quantità di DA corrispondente a 1.579 0.087 e 2.028 0,063 ng / mg sono stati rilevati nei tessuti corneali 30 minuti dopo la somministrazione di DA-Sol e DA-Lipo formulazioni, rispettivamente ($p < 0.05$). L'analisi HPLC del contenuto DA nei campioni nell'umore acqueo effettuati a 15, 30, 60 minuti dopo l'instillazione di entrambe le formulazioni consentiti per assicurare l'assenza di tracce di farmaco in questo fluido oculare .

L'attività antivirale della DA, liposomiale e della formulazione libera, su infezione de novo con HHV8 di cellule HEK 293 e le cellule PBMC e RCE è stata valutata mediante saggio di riduzione di immunofluorescenza (IFA). L'attività antivirale di concentrazioni variabili (0772-772 mM) di DA (DA-Sol1) e della formulazione liposomiale DA (DA-Lipo) è stata valutata e la concentrazione inibente al 50% (IC50) è stata ottenuta con il software GraphPad Prism 2.0 in tre repliche sperimentali. E' stato possibile calcolare la IC50 solo solo nelle colture di HEK293 e RCE infettate con il ceppo A1 in quanto la DA in forma libera è risultata inefficace nella linea PBMC. La IC50 della DA libera contro il ceppo A1 nelle cellule HEK293 e RCE è stata di 0,01,343 ug / mL e di 0,06,257 ug / mL e per il ceppo C3 di 0,127 ug / mL e di 0,1187 ug / mL, rispettivamente. La IC50 della formulazione liposomiale DALipo contro il ceppo A1 nelle cellule HEK293 e RCE è stata di 0,08,096 ug / mL e di 0,009,351 ug / mL e contro il ceppo C3 di 0,1132 ug / mL e di 0.1567 ug / mL in. È interessante notare che la DALipo ha esplicato la sua attività antivirale anche nelle cellule PBMC infettate con sottotipi A1 e C3 e le IC50 sono state di 2.575 e 3.107 ug / mL.

Questo studio descrive un quadro completo della modulazione genica cellulare durante la fase litica dell'infezione con il virus HHV8 attiva in due citotipi sensibili HEK 293 e PBMC. Abbiamo scoperto che l'espressione della cellula ospite cambia dopo solo 24 ore dall'infezione, ed è molto diversa dagli studi genici di induzione precedenti che sono stati effettuati in momenti successivi dell'infezione. Infatti, Poole et al. che hanno utilizzato una diversa la linea cellulare JSC1 per produrre il virus utilizzato per infettare cellule endoteliali primarie hanno eseguito gli studi di modulazione genica dopo 3-5 settimane dall'infezione quando ormai le cellule erano state trasformate in "spindle cells" risultavano positive agli antigeni LANA. Dall'analisi eseguita: a) non si rileva sovrapposizione di geni modulati da parte dei sottotipi virali analizzati; b) il profilo trascrizionale indotto dall'infezione nella linea epiteliale e linfoide era strettamente diverso. Questo è probabilmente perché il criterio fissato di un aumento di almeno 4 volte come significativo per la modulazione genica è un filtro di soglia molto stretto. Tuttavia, i geni che emergono da tale confronto sarà di maggior interesse per lo studio del loro ruolo nella biologia unica di HHV-8. Inoltre, la capacità replicativa dei due ceppi nei due tipi di cellule e la modulazione dei geni coinvolti nel processo infiammatorio sembrerebbe indicare che la differenza genotipica potrebbe essere tradotta in un diverso rapporto virus-ospite, imputabile anche a un differente meccanismo patogenetico.

Oltre a identificare i geni di risposta host-specifico all'interno di ciascun percorso funzionale che sono già noti per essere importante per HHV-8, i nostri risultati identificano nuovi geni candidati che non sono ancora noti nella biologia di HHV8. Ad esempio, una up-regolazione di geni coinvolti nel processo infiammatorio (AGT, CCR8, CXCR4, IL-6, IL-9, IL10RA, IL-17, IL-23A), nella trasduzione del segnale (FGF5, FGF7, MAP3K1, MAPK9, TGFBR1, TRAF2), nel ciclo cellulare (IGFBP1), la risposta immunitaria (IL-16, TLR4), nell'apoptosi (TNFSF4, TNFSF11). I ruoli di queste molecole nell'instaurarsi dell'infezione di HHV8 e lo sviluppo del KS rimangono da studiare. I risultati dei saggi farmacologici mostrano una mancanza di citotossicità della DALipo su tutte le linee analizzate. Da notare che i valori di CC50 rilevati nel presente cadono nell'estremo inferiore del range di valori di CC50 per la DA riportati in letteratura. Infatti, i valori CC50 dati disponibili vanno da 35 μ M nella linea cellulare Hep-2 a 154 μ M nella linea HeLa e 385 μ M nelle cellule primarie di rene di coniglio. La DA sembra inibire tutte le DNA polimerasi, il che potrebbe spiegare l'origine della sua attività antivirale. A causa della mancanza di informazioni riguardo la genetica dei sottotipi A1 e C3 derivati dalle linee cellulari latentemente infette, non è possibile capire fino in fondo se l'attività antivirale rilevata sia dovuta a mutazioni geniche specifiche o alla virulenza dei ceppi. Sicuramente sono necessari ulteriori studi per capire il meccanismo antivirale della DA in entrambe le formulazioni contro il virus HHV8. La marcata attività antivirale e la mancanza di tossicità della formulazione liposomiale rilevata nel presente studio indicano la possibilità di utilizzare la DA come un farmaco antierpetico per trattamenti sia sistemici che topici. Potrebbe essere utilizzata da sola o in associazione ad altri agenti antivirali per accorciare i tempi di trattamento e minimizzare gli effetti collaterali. La attività antivirale della formulazione liposomiale anche nella linea PBMC potrebbe essere dovuta all'aumento dell'efficacia di penetrazione grazie all'inclusione nei liposomi. E' proprio la DALipo che ha dimostrato attività antivirale anche nella linea linfoide e bassissima citotossicità potrebbe essere utilizzata anche per trattamenti sistemici.

HHV8, INFEZIONE PRIMARIA

HHV8 penetra nella cellula ospite grazie all'interazione tra un motivo arginina-glicina-aspartato (RGD) della glicoproteina dell'envelope gB, e un'integrina presente sulla membrana cellulare (Akula S.M. et al., 2002; Wang F.Z. et al., 2003). L'infezione primaria è caratterizzata da un ciclo virale litico e il 95% dei soggetti immunocompetenti che vengono in contatto col virus non presentano mai sintomi. E' stato dimostrato in bambini immunocompetenti che le prime manifestazioni cliniche dovute all'infezione sono caratterizzate da un rash maculopapulare cranio-caudale della durata 3-8 giorni, febbre per 2-14 giorni in alcuni casi maggiore di 39°C e sintomi delle alte e delle basse vie respiratorie di bassa entità. Nei soggetti in studio si è inoltre riscontrata la presenza del genoma di HHV8 nella saliva in seguito all' infezione primaria in alcuni casi concomitante con viremia. Il genoma di HHV8 è stato inoltre rilevato nel 10% dei sieri prelevati da omosessuali maschi infetti sia prima che dopo la sieroconversione caratterizzata da febbre alta e prolungata, artralgie, linfadenopatia cervicale (Goudsmit J. et al., 2000). In uno studio condotto nel 2001 è inoltre emersa la presenza del virus nelle cellule mononucleate del sangue di soggetti omosessuali HIV negativi dimostrando la replicazione virale nei tessuti linfoidei durante l'infezione primaria (Wang Q.J. et al., 2001). Dopo la fase litica il virus va incontro a latenza nei linfociti B19 durante la quale esprime la maggior parte dei geni virali coinvolti nella trasformazione cellulare (Fields et al., 2007). Nei soggetti immunocompromessi in seguito a trattamento con chemioterapici, trapianto d'organo, senilità o infezione con HIV si assiste ad una riattivazione della replicazione virale che precede lo sviluppo del PEL, del KS e del MCD (Carbone A. et al., 2007).

HHV8, TROPISMO CELLULARE

Il DNA di HHV8 è stato ritrovato nelle lesioni KS (100%) e in percentuale minore anche nei linfociti B CD19+ circolanti (46%), che rappresentano il sito principale di latenza del virus, ma anche nelle cellule epiteliali di rivestimento della cavità orale (37%), nelle biopsie cutanee non neoplastiche (23%), nel plasma (7%) e in piccola percentuale anche nelle cellule epiteliali prostatiche (1%). HHV8 sembra quindi avere ampio spettro d'ospite cellulare caratterizzato da un'efficienza di infezione e di replicazione variabile (Laduca J.R. et al., 1998). Nelle cellule delle lesioni KS il DNA di HHV8 si ritrova principalmente nelle spindle cells (cellule fusiformi), cellule tumorali di origine endoteliale che esprimono sulla loro superficie sia antigeni endoteliali che macrofagici (Pyakurel P. et al., 2007; Seybold U. et al., 2008). Tali cellule sono solitamente latentemente infette, ma in alcuni casi è stata rilevata l'espressione di geni virali litici oltre che la produzione di progenie virale (Staskus K.A., 1997).

HHV8, GENOMA

Il DNA di HHV8 presenta un segmento centrale di circa 140 kb a basso contenuto di GC (L DNA) fiancheggiato da sequenze terminali ripetute invece ricche di GC (H DNA). Il segmento di L DNA di HHV8

ha molte “open reading frames” (ORF) con significativa omologia di sequenza con geni umani (Hengge U.R. et al., 2002b). Il genoma è circolare durante la fase latente dell'infezione e lineare invece durante il ciclo litico.

HHV8, GENI E PROTEINE VIRALI

Il Genoma di HHV8 comprende 95 geni, 25 dei quali codificano per proteine uniche virali. Numerosi sono geni omologhi a geni cellulari, di cui si pensa HHV8 si sia arricchito nel corso dell'evoluzione, espressi dal virus in diverse fasi del proprio ciclo biologico (Hengge U.R. et al., 2002 b). Le proteine codificate dai geni omologhi cellulari si ritiene possano essere coinvolte nei processi di trasformazione virale codificando per proteine in grado di interferire con il metabolismo cellulare (Moore P.S. et al., 1996).

HHV8, GENI CICLO LITICO

Molti dei geni virali espressi durante il ciclo litico codificano per proteine immunoregulatorie o in grado di consentire alle cellule infette di evitare o inibire il sistema immunitario dell'ospite (Sarid R. et al., 1998; Sun R. et al., 1999; Jacobson L.P. et al., 2000; Jenner R. et al., 2001; Paulose-Murphy M. et al., 2001; Fakhari F.D. et al., 2002; Coscoy L. 2007). Il gene virale K2/vIL-6 presenta un'analogia di sequenza e di funzionalità con l'interleuchina 6 (IL6) umana: è in grado di stimolare la proliferazione cellulare tramite l'ausilio del corecettore gp130 indipendentemente dalla presenza del recettore proprio dell'IL6 (gp80). Il prodotto di K2/vIL-6 IL6 può simulare l'attività dell'IL6 umana tramite l'attivazione di una cascata di segnali (JAK1, STAT1/3, STAT5) che determinano tra l'altro per esempio la neoangiogenesi (Osborne J., 1999; Nicholas J., 1997). La proteina codificata dall'ORF 74 (vGPCR), è una proteina transmembrana omologa al recettore umano dell'interleuchina 8 (IL-8). Le cellule che esprimono vGPCR secernono elevate quantità di fattori di crescita e citochine sia autocrine che paracrine (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, granulociti, macrofagi, VEGF, bFGF, e MCP-1) con possibilità quindi di indurre la neoangiogenesi mediante un meccanismo paracrina (Bais C., 1998). Le proteine vMIP, vMIP-II, e vMIP-III virali, codificate rispettivamente dall'ORF K6, K4 e K4.1 sono omologhe di chemochine umane ed hanno un ruolo proinfiammatorio e immunomodulatore (Fields et al., 2007). Il prodotto dell'ORF 16, v-BCL-2, ha un'elevata omologia di sequenza con la BCL-2 umana nei domini BH1 e BH2 mentre risulta differente nel dominio BH3 (Sarid R. et al., 1997; Cheng E. et al., 1997). A differenza della controparte cellulare BCL-2 virale svolge un'azione antiapoptotica (Albrecht J.C. et al., 1992; Neipel et al., 1997; Sun R. et al., 1999). A livello dell' envelope virale, codificata dalla ORF45 una proteina, che è espressa molto precocemente nell'infezione virale litica, è in grado di bloccare la risposta immunitaria innata interagendo con la proteina cellulare *Interferon Regulator Factor 7* (IRF7) e reprimendo così la trascrizione dei geni dell'interferone α e β (IFN α e β) (Zhu F.X. et al., 2002). Studi recenti hanno dimostrato che questa proteina di origine virale gioca un ruolo critico sia nell'infezione *ex novo*, che nel rilascio della progenie virale dalla cellula infettata (Zhu F.X. et al., 2006). L' envelope comprende le glicoproteine gB (ORF8), gH (ORF22), gL (ORF47), gM (ORF39) e gN (ORF53), che sono molto conservate nella famiglia degli Herpesviridae, ed i prodotti della

ORFK8.1, ORF68 ed ORF28. La proteina codificata dalla ORFK8.1 favorisce l'adesione del virus alla superficie della cellula ospite attraverso un legame all'eparan-solfato, ed *in vivo* stimola la produzione di anticorpi neutralizzanti (Wang F.Z. et al., 2001). Anche gB contiene un sito di riconoscimento per l'eparan-solfato e possiede il motivo aminoacidico Arg-Gly-Asp (RGD) nel suo dominio extracellulare mediante il quale risulta interagire specificatamente con l'integrina $\alpha 3 \beta 1$ utilizzata dal virus come recettore per la penetrazione nella cellula ospite (Wang F.Z. et al., 2003). Come per gli altri herpesvirus, gH e gL formano un eterodimero (gH/gL); gL è richiesta per il "*folding*" ed il trasporto intracellulare di gH. Le glicoproteine gB, gH e gL sono essenziali per la penetrazione del virus nella cellula ed, inoltre, quando vengono espresse in cellule suscettibili all'infezione da parte di HHV8 inducono la formazione di policariociti (Pertel P.E., 2002). Nel gemoma di HHV8 recentemente sono state ritrovate sequenze codificanti proteine cellulari, la β -actina e la catena pesante di tipo A della miosina di classe II, suggerendo un coinvolgimento del citoscheletro nel trasporto intracellulare dei capsidi virali, nell'assemblaggio e nella fuoriuscita dei virioni maturi (Zhu F.X. et al., 2005).

HHV8, GENI DELLA LATENZA

I geni espressi da HHV8 in fase di latenza sono stati studiati in colture primarie derivanti da PEL, è quindi possibile che il pattern di espressione virale in tali istotipi non rappresenti quello presente in altri tipi di cellule latentemente infette. Alcuni studi hanno infatti rilevato che la proteina v-IRF3 espressa nelle cellule derivanti da PEL non è rilevabile nei KS (Rivas C. et al., 2001). Nei PEL la maggior parte dei trascritti in fase di latenza deriva da una regione genomica virale localizzata tra l'ORF12 e l'ORF74. In questa regione sono presenti almeno due principali promotori che dirigono la sintesi di due principali famiglie di proteine espresse in fase di latenza: 1- il promotore LANA, 2- il promotore per le Kaposine (Fields et al., 2007). Il promotore LANA influenza l'espressione di tre principali geni, l'ORF73, l'ORF72 e l'ORF71. L'ORF73 codifica per LANA, una proteina multifunzionale che si ritrova nel nucleo di tutte le cellule latentemente infette da HHV8 (Ballestas M.E. et al., 1999; Cotter M.A. et al., 1999), che ha funzione principale di stabilizzare e mantenere il DNA virale in forma episomiale (Fields et al., 2007). Studi recenti, hanno dimostrato che LANA sarebbe in grado di trasformare cellule di roditore interagendo con l'oncogene H-ras (Radkov S.A. et al., 2000). E' noto che oltre a contribuire a mantenere il genoma virale allo stato episomico LANA è in grado di transattivare il proprio promotore, che controlla l'espressione anche di altri geni sia virali e che cellulari (Renne R. et al., 2001). Una regione che si estende fino a 1299 pb a monte del sito di inizio della trascrizione conferisce al promotore LANA specificità di tessuto rendendolo endotelio dipendente nel modello animale, sia a livello embrionale che adulto (Jeong J. et al., 2001). LANA è un antigene altamente immunogeno, quindi numerose tecniche sierologiche utilizzate per l'analisi della sieroprevalenza di HHV8 sono basate sulla ricerca di anticorpi anti LANA (Gao S.J. et al., 1996 a/b). Il promotore LANA modula ad esempio la sintesi della v-ciclina omologa alla ciclina D cellulare e della v-FLIP omologa invece alla proteina cellulare inibitoria FLIP. La v-ciclina codificata dall'ORF72, come la ciclina D cellulare, attiva le chinasi che fosforilano vanno ad inattivare pRB cellulare che determina il

passaggio delle cellule in fase S (Li M. et al., 1997). La una famiglia di proteine virali, v-FLIPs (viral FADD-Like ICE Inhibitory Proteins), contengono due domini DEDs attraverso cui competono con le procaspasi per il legame a FADD, inibendo l'apoptosi nella via mediata da recettori di morte. Tali proteine sono codificate a partire dall'ORF71 (Fields et al., 2007). Cellule transfettate con FLIP diventano resistenti all'apoptosi dipendente da questa via. L'omologo di v-Flip, cFlip, è una proteina che si può trovare in due forme di splicing: la più corta si comporta come vFlip, mentre la più lunga possiede un dominio C-terminale simile a quello di caspasi-8 (C8). Un'altra attività essenziale di v-Flip sembra essere collegata alla regolazione della risposta infiammatoria tramite l'induzione del fattore di trascrizione pro-infiammatorio NF-KB (Fields et al., 2007). Il promotore per le Kaposine regola l'espressione dell'ORFK12 che codifica per tre principali proteine, Kaposina A, B e C. La Kaposina A è una proteina ritrovata sia sulla superficie cellulare che sulle membrane intracellulari (Tomkiewicz B. et al., 2002) ed è stato dimostrato che una sovraespressione di tale proteina provoca in vitro trasformazioni morfologiche in fibroblasti immortalizzati (Rat-1) producendo i classici fibrosarcomi nei topi nudi (Moore P.S. et al., 1996a). L'espressione di tale proteine inoltre determina nelle cellule l'amplificazione della produzione delle chinasi serina/treonina (Muralidhar S., 2000). La Kaposina B ha dimensioni più piccole rispetto alla C, con cui condivide delle sequenze amminoacidiche fiancheggiate da ogni lato da sequenze invece uniche per ogni proteina. La principale attività di queste proteine, sembra correlata all'azione di v-Flip, nello stimolare quindi la risposta infiammatoria (Fields et al., 2007).

HHV8, GENI DELLA RIATTIVAZIONE

HHV8 durante la latenza può andare incontro a riattivazione sfuggendo al sistema immunitario dell'ospite divenuto deficitario in seguito a trapianto d'organo, infezione con HIV, senilità (Chen J. et al., 2001, Cattani P. et al., 2003). Numerosi studi molecolari supportano l'ipotesi che la riattivazione contribuisce direttamente alla sviluppo di KS attraverso l'espressione di numerose proteine codificate dal virus durante la fase litica, infatti la comparsa delle lesioni è preceduta da un aumento della viremia (Cesarman E. et al., 2000; Bowser B.S. et al., 2002). Recenti studi hanno dimostrato che tra numerosi geni coinvolti nella riattivazione, ORF50 è fondamentale per attivare la replicazione litica del virus in cellule PEL (Sun R. et al., 1998; Lukac D.M. et al., 1998; Lukac D.M. et al., 1999; Gradoville L. et al., 2000). Il prodotto dell'ORF50, è un polipeptide nucleare di 691 amminoacidi che in seguito a maturazione è detto proteina Rta. Questa, se pur non sufficiente a riattivare la replicazione virale, è in grado di transattivare direttamente e selettivamente diversi promotori virali espressi con tarda cinetica durante la riattivazione (Chen J. et al., 2000; Jeong J. et al., 2001; Wang S. et al., 2001a/b; Chang P. et al., 2002). I dati presenti in letteratura suggeriscono che tale prodotto genico attiva i promotori di importanti proteine coinvolte nella patogenesi di HHV8 come K12/kaposine, vIL-6, vMIP-I, vIRF-1, vGPCR e K1 che hanno il compito di alterare i normali meccanismi di controllo del ciclo cellulare, creando l'ambiente idoneo alla replicazione virale (Jeong J. et al., 2001; Wang S. et al., 2001 b; Deng H. et al., 2002; Ueda K. et al., 2002).

HHV8, IMMUNOEVASIONE

L'instaurarsi di un'infezione latente, assolutamente necessaria per la patogenesi sia del KS che del PEL e dell'MCD, viene favorito dalla capacità di HHV8 di contrastare in modo efficiente il sistema immunitario dell'ospite. La latenza rappresenta una strategia virale passiva di immunoevasione, durante la quale solo pochi geni virali vengono espressi, riducendo così il numero di antigeni che possono essere presentati al sistema immunitario ed evocare una risposta specifica contro le cellule infettate con HHV8 (Rezaee S.A. et al., 2006). L'infezione litica con produzione e rilascio di nuovi virioni è necessaria per la diffusione del virus nell'ospite, pertanto HHV8 deve necessariamente evadere attivamente le difese immunitarie dell'ospite. Per attuare l'infezione litica numerose proteine virali interferiscono direttamente sia con l'immunità innata che con l'instaurarsi dell'immunità adattativa specifica (Coscoy L., 2007). Nell'ambito delle risposte immunitarie innate, HHV8:

- ♣ inibisce l'attivazione del sistema del complemento, preposto alla lisi diretta delle cellule infettate e delle particelle virali o a promuoverne la fagocitosi e l'eliminazione da parte dei macrofagi, grazie alla proteina KCP (KSHV complement-control protein, ORF 4) (Spiller O.B. et al., 2003);

- ♣ inibisce l'espressione dei geni dell'IFN α e β e/o interferisce con il loro meccanismo d'azione antivirale, grazie alla proteina del tegumento codificata dall'ORF45 ed ai numerosi omologhi virali degli IRF quali: IRF1 (ORF K9), IRF2 (ORF K11.1/K11), IRF3 (ORF K10.6/K10.5) ed IRF4 (ORF K10.1/K10).

L'apoptosi delle cellule infettate rappresenta un meccanismo di difesa innato che serve a limitare la replicazione virale e la diffusione dell'infezione ma è anche il sistema effettore delle risposte immunitarie adattative (Rezaee S.A. et al., 2006). HHV8 codifica tre proteine antiapoptotiche che interferiscono direttamente con il processo apoptotico. Tra queste vFLIP, le proteine vIAP (ORF K7) e vBcl-2 (ORF 16) che favoriscono la sopravvivenza delle cellule infettate da HHV8 grazie alla loro capacità di bloccare l'apoptosi, l'una inibendo direttamente le caspasi e l'altra modulando negativamente l'attività ed il rilascio di molecole proapoptotiche; in questo modo, viene favorito il completamento del ciclo replicativo virale con rilascio di nuova progenie e diffusione dell'infezione virale (Dourmishev L.A. et al., 2003). Nell'ambito dell'immunità adattativa, la presentazione degli antigeni virali da parte delle proteine del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (HLA-A, B, C) sulla superficie delle cellule infettate ed il successivo riconoscimento da parte dei linfociti T CD8+ citotossici è fondamentale per lo sviluppo di un'efficiente risposta immunitaria specifica. HHV8 codifica due proteine, MIR1 e MIR2, che interferiscono con l'espressione degli HLA di classe I sulla superficie delle cellule infettate, promuovendone l'internalizzazione per endocitosi e la degradazione nei lisosomi, e che, quindi, inibiscono la presentazione degli antigeni virali al sistema immunitario dell'ospite (Coscoy L. et al., 2000). MIR1 e MIR2 riducono inoltre, l'espressione anche di altre proteine di superficie, come il CD86 (B7-2) e la molecola d'adesione ICAM-1, che funzionano da segnali di co-stimolazione per le cellule T; la ridotta espressione di queste proteine sulle cellule preposte a presentare l'antigene (APC), cellule dendritiche, macrofagi e cellule B infettate da HHV8, interferisce ulteriormente con la genesi delle risposte immunitarie adattative specifiche (Coscoy L. et al., 2001). Le chemochine vMIP-I (ORF K6), vMIP-II (ORF K4) e vMIP-III (ORF K4.1)

codificate da HHV8 attivano recettori prevalentemente distribuiti sulle cellule Th2 CD4+, indirizzando così le difese immunitarie dell'ospite verso una risposta di tipo umorale anticorpale a scapito di quella cellulo-mediata citotossica, in cui giocano un ruolo chiave le cellule T CD8+ e le cellule Th1 CD4+ che è deputata al controllo ed all'eliminazione dell'infezione virale (Stine J.T. et al., 2000; Holst P.J. et al., 2003). Inoltre, è stato osservato che vMIP-II può anche funzionare da antagonista di molteplici chemochine endogene, tipo RANTES o MIP-1 α , su diverse cellule del sistema immunitario (T CD8+, Th1 CD4+, B, macrofagi, NK) compromettendo quindi le risposte infiammatorie ed immunitarie di tipo Th1. In generale, attraverso la loro attività immunomodulatrice, le chemochine mimiche virali creano un microambiente favorevole per la sopravvivenza delle cellule infettate da loro stesso infettate e promuovendo la diffusione dell'infezione virale contribuendo indirettamente alla patogenesi (Jensen K.K. et al., 2004). Altre proteine di HHV8 possono esercitare funzioni immunomodulatrici ed interferire con il sistema immunitario dell'ospite. Fra queste:

- ⤴ la proteina RTA, che promuove la degradazione dell'IRF7 ed agisce in sinergia con il prodotto dell'ORF 45 inibendo l'espressione dei geni dell'IFN α e β (Yu Y. et al., 2005);
- ⤴ la proteina vIL-6 (ORF K2), che promuove la proliferazione delle cellule B ed il loro differenziamento a plasmacellule, inibisce l'apoptosi indotta da una varietà di stimoli differenti ed agisce in sinergia con le chemochine virali favorendo le risposte anticorpali di tipo Th2 ed inibendo quelle citotossiche di tipo Th1 (Dourmishev L.A. et al., 2003; Coscoy L. et al., 2007);
- ⤴ la glicoproteina vOX2 (ORF K14), omologa alla glicoproteina cellulare OX2 (Rezaee S.A. et al., 2006; Coscoy L. et al., 2007).

HHV8, VARIABILITA' VIRALE

L'analisi delle sequenze dei diversi di HHV8 in diverse aree geografiche ha permesso di chiarire che, sebbene parte del genoma virale sia conservato, esistono delle regioni con elevata variabilità, tra le principali: ORFK1 e ORFK15 (Zong J.C. et al., 1999). La variabilità dell'ORFK15 è limitata in quanto presenta due soli alleli: M e P quasi completamente conservati (Nicholas J. et al., 1998). Al contrario la variabilità dell'ORFK1 è molto elevata. Questa regione genica, che si estende dal codone 1 al 289, codifica per una proteina transmembrana con un dominio extracellulare di interazione con le immunoglobuline ed uno intracellulare di interazione con proteine chinasiche (Nicholas J. et al., 1998). E' quindi possibile che tale proteina possa prendere parte al complesso meccanismo di trasduzione dei segnali cellulari. In base all'analisi della sequenza dell'ORFK1 è stato possibile suddividere gli isolati di HHV8 in 5 maggiori tipi: A, B, C, D ed E che presentano il 15-30% di variabilità a livello amminoacidico (Zong J.C. et al., 1999). La regione ORFK1 è suddividibile in due regioni ipervariabile: VR1 e VR2 che si estendono rispettivamente dal codone 54 al 93 e dal 191 al 228, all'interno delle quali i diversi ceppi isolati risultano divergenti fino al 60% (Zong J.C. et al., 1999). L'analisi filogenetica condotta su una regione di 289 amminoacidi di 63 isolati di HHV8, prelevati da 63 KS, ha permesso di individuare un'ulteriore variabilità nella sequenza amminoacidica (circa il 5%) dei principali 5 ceppi, che ha permesso la

descrizione 13 varianti virali denominate da A1 ad A5, da C1 a C5 e D1 e D2 (Zong J.C. et al., 1999). E' importante sottolineare che tali isolati sono stabili nell'ospite, come dimostrato da numerosi esperimenti di clonaggio di stipiti virali isolati dallo stesso KS a tempi diversi (Zong J.C. et al., 1999). Ad oggi i ceppi virali sono stati associati solo ad una diversa distribuzione geografica: ceppi A e C più diffusi in Europa, U.S.A, Medio Oriente e Asia, ceppo B nell' Africa sub-Sahariana, ceppo D principalmente in individui provenienti dalle isole del Pacifico e dall'Australia, ceppo E in Sud-Americani (Zong J.C. et al., 1999, Biggar R.J., 2000). L'odierna distribuzione geografica dei ceppi di HHV8 è il risultato del cosiddetto "effetto fondatore" associato a fenomeni migratori dell'uomo moderno dall'Africa e all'isolamento di alcune comunità in particolari aree geografiche negli ultimi 10.000 anni. Questi risultati suggeriscono che sebbene HHV8 sia un virus di recente scoperta, è in realtà un agente infettivo antico che si pensa abbia convissuto con l'Homo sapiens fin dalla sua origine (Rose T.M. et al., 1997; Lacoste V. et al., 2000).

CARATTERISTICHE MOLECOLARI E TROPISMO CELLULARE DEI SOTTOTIPI A1 E C3 DI HHV8

Un recente studio condotto nel nostro laboratorio ha analizzato l'incidenza sieropidemiologica e molecolare dell'infezione da HHV8 su 30 pazienti affetti da KS classico tutti residenti nell'area di Sassari (Matteoli B. et al., 2008). Il DNA virale è stato rilevato rispettivamente nel 16.7%, 66.7%, 66.3%, 100% dei campioni di siero, sangue, saliva e biopsie dei 30 pazienti KS. La tipizzazione, eseguita con successo in 23 KS, ha rilevato che 10 pazienti erano infetti con il sottotipo A1, 4 con il sottotipo A3, 1 con il sottotipo A4, 7 con il sottotipo C2 ed 1 con il sottotipo C3. L'analisi statistica non ha rilevato alcuna correlazione tra la carica virale nella saliva e nel sangue dei 30 KS ($R=0.239$, correlazione di Spearman), anche se la carica nella saliva risultava significativamente maggiore (68.0678 vs 736 copie/ml) ($p=0.02$, test di Wilcoxon per coppie di campioni), inoltre la carica virale in saliva è risultata significativamente maggiore ($p=0.004$, test di Wilcoxon) solo nei pazienti affetti dal ceppo A, che presentavano anche una carica virale significativamente maggiore nella saliva rispetto al sangue ($p=0.029$, test Mann-Whitney). Fissando un riferimento a 1000 copie/ml, l'80% dei KS infettati dal ceppo A e solo il 14.3% di quelli affetti dal ceppo C presentano cariche virali in saliva significativamente superiori ($p=0.007$, test di Fisher). La stessa analisi condotta sulle cariche virali in sangue non ha dato risultati statisticamente significativi. In 2 pazienti KS è stata analizzata separatamente la sieropositività per anticorpi anti-LANA ed anti K8.1, la carica virale in sangue e saliva ed il genotipo infettante su campioni seriali prelevati in concomitanza di trattamento farmacologico. I risultati hanno dimostrato che solo l'andamento degli anticorpi anti-LANA correla con l'andamento clinico della malattia, che l'andamento della carica virale in saliva è inversamente proporzionale a quella nel sangue e nel siero e che un aumento della replicazione virale nel cavo orale è associata ad un miglioramento delle condizioni cliniche del paziente. La genotipizzazione eseguita su tutti i fluidi biologici a disposizione ha dimostrato che entrambe i KS erano affetti dal ceppo A1. Lo studio filogenetico e della quantificazione della carica virale confermano, che la saliva è il fluido dove il DNA virale è maggiormente rilevabile, la presenza nell'area del Mediterraneo di entrambe i ceppi virali A e C, la mancanza di superinfezioni prima o durante il follow-up, concludendo che il ceppo virale rimane costante

nel tempo e nei vari fluidi dello stesso paziente. Nonostante il basso numero di isolati testati, i dati sieroepidemiologici e molecolari ottenuti in questo studio indicano l'esistenza di un più elevato tropismo dei ceppi A verso le cellule epiteliali, come quelle che rivestono il cavo orale. Considerando inoltre i dati riportati da uno studio epidemiologico recente che ha rilevato una maggiore progressione della forma classica del KS in pazienti infetti con il sottotipo A (Mancuso R. et al., 2008), di la differenza genotipica si potrebbe tradurre in un diverso rapporto virus-ospite riconducibile anche ad un diverso meccanismo di trasformazione.

IL SARCOMA DI KAPOSI

KS è un tumore di origine mesenchimale caratterizzato dalla comparsa simultanea di lesioni multiple sulla cute e nelle forme più aggressive all'interno dei visceri (Hengge U.R. et al., 2002a). Considerando l'influenza delle citochine infiammatorie sul ciclo di replicazione virale è stato anche proposto che il KS inizi come iperplasia policlonale infiammatoria e successivamente si selezioni un clone cellulare con caratteristiche neoplastiche (Judde J.G. et al., 2000). Esistono 4 quattro forme clinico-epidemiologiche del KS: classica, endemica o africana, epidemica o associata all'AIDS, iatrogena; caratterizzate da: tipica grandezza della regione anatomica interessata dalle lesioni, aggressività, letalità, origine etnogeografica, oltre ad incidenza in diverse fasce di età e nel genere maschile e femminile (Stallone G. et al., 2000). Tutte le forme di KS sono associate all'infezione con HHV8, che è quindi il fattore necessario, ma non sufficiente per lo sviluppo della malattia (Stallone G. et al., 2000). Le differenze riscontrate nelle varie forme della malattia suggeriscono che nella patogenesi intervengano alcuni cofattori, alcuni noti, come la coinfezione con HIV che caratterizza la forma epidemica (Seybold U. et al., 2008). La variante classica, più conosciuta, colpisce principalmente adulti di sesso maschile residenti in Europa orientale, Grecia, Turchia ed Israele ed in genere ha una tasso di sopravvivenza a lungo termine alto (Iscoovich J. 2000; Schwartz R.A., 1996). L'incidenza della forma classica è circa 10 volte superiore nel Mediterraneo rispetto agli Stati Uniti (Stallone G. et al., 2000). Il KS classico colpisce più frequentemente gli individui di sesso maschile, con un rapporto uomo: donna di 15:1 (Stallone G. et al., 2000), le lesioni tendono a rimanere confinate alle estremità degli arti (Stallone G. et al., 2000) ed i pazienti possono convivere con la malattia per anni (Hengge U.R. 2002a). In Italia il tasso d'incidenza del KS classico aumenta con l'età e in particolare si manifesta principalmente nei maschi che sopra i cinquant'anni (Santarelli R. et al., 2001). Le lesioni del KS classico vanno da macchie multiple rosso-bluestre a placche brunastre a noduli, che compaiono inizialmente su mani e piedi e successivamente interessano braccia e gambe con eventuale interessamento viscerale e delle mucose in circa il 10% dei pazienti (Stallone G. et al., 2000). Le lesioni non trattate evolvono verso la formazione di placche e successivamente interessano i linfonodi, e diventano confluenti (Hengge U.R. et al., 2002a). Un linfoedema può precedere o seguire l'insorgenza delle lesioni visibili (Hengge U.R. et al., 2002a). I tipici quadri istologici sono caratterizzati da cellule tumorali disposte a spina di pesce che circondano una parete vascolare iperemica, spesso in associazione con eritrociti stravasati, emosiderina, e fibrosi (Stallone G. et al., 2000). Nel 1950 fu descritta

una forma di KS comune in una regione circoscritta dell'Africa, che rappresentava il 3-9% dei casi di tumore riscontrati in Uganda nel 1971 (Taylor J.F. et al., 1971). Nel 1983, Bayley osservò un notevole incremento, in Zambia, dell'incidenza della variante atipica, molto aggressiva, che non rispondeva alla terapia convenzionale (Bayley A.C., 1984). Il KS è attualmente il tumore più frequente nell'Africa centrale, sia nei pazienti HIV positivi che negativi, raggiungendo il 50% dei tumori riportati negli adulti maschi di questi paesi (Wabinga H.R. et al., 1993). La forma epidemica o associata ad AIDS è la più aggressiva e spesso fatale ed interessa linfonodi, organi interni, mucose e cute (Friedman-Kien A.E. et al., 1981). Sebbene l'incidenza di questa forma negli adulti maschi americani affetti da AIDS sia diminuita dal 40% del 1981 al 20% del 1992, grazie all'introduzione della terapia HAART, che permettendo in parte la ricostituzione del sistema immunitario favorisce il contenimento della replicazione di HHV8, rimane la più comune forma di tumore AIDS-associato negli Stati Uniti d' America (Biggar R.J. et al., 1996). La forma iatrogena colpisce pazienti sottoposti a trapianto d'organo o immunosoppressi per altre patologie (Qunibi W. et al., 1988; Shepherd F.A. et al., 1997). L'incidenza del KS iatrogeno in seguito a trapianto renale varia notevolmente nelle diverse aree geografiche ed etnie: maggiore nel bacino del Mediterraneo, nella razza nera africana e caraibica (Di Benedetto F. et al., 2008). Molti studi confermano che in Italia il rischio di sviluppare KS è 224 volte maggiore nella popolazione trapiantata rispetto alla popolazione generale (Montagnino G. et al., 1996). La percentuale di individui di sesso maschile che sviluppa la malattia va dal 65 all' 80%, con un rapporto tra maschi e femmine di 2:1; 4:1, suggerendo che gli ormoni sessuali rivestono un ruolo protettivo per le donne (Shepherd F.A. et al., 1997; Montagnino G. et al., 1996; Lesnoni L. et al., 1997). Approssimativamente, il 6% dei trapiantati nel Nord America sviluppa una neoplasia maligna dopo diversi anni dal trapianto; il 3.5% di queste neoplasie è rappresentato dal KS (Penn I., 1988). La forma definita iatrogena si osserva più frequentemente tra i portatori di trapianto renale ed è invece rara fra i pazienti con trapianto di polmone, cuore, fegato (Stallone G. et al., 2000); tende ad essere aggressiva e coinvolge linfonodi, mucose ed organi interni in circa la metà dei pazienti, a volte in assenza di lesioni cutanee (McGeoch D.J. et al., 1998). Ad oggi non è stata identificata nessuna predisposizione genetica allo sviluppo della malattia; la possibile associazione con il fenotipo HLA-DR5 inizialmente riscontrata in alcune forme sporadiche del KS non è stata confermata in studi successivi (Brunson M.E. et al., 1990). L'intervallo di tempo che intercorre tra il trapianto e l'insorgenza della malattia si riduce a circa 12 mesi nei trapiantati trattati con ciclosporina (CsA) (Penn I. et al., 1988) che inibisce i normali meccanismi di immunosorveglianza T-suppressor-dipendenti, più efficacemente dei farmaci precedentemente usati (Starzl T.E., 1989). Ciò suggerisce anche che l'associazione della CsA con il KS nei pazienti trapiantati possa riflettere uno stato di eccessiva immunosoppressione (Starzl T.E., 1989; Swinnen L.J. et al., 1990), piuttosto che uno specifico effetto della molecola. Il KS non è più considerato una malattia rara nei portatori di trapianto d'organo, nei quali può avere un decorso molto aggressivo con una percentuale di mortalità pari al 34% entro 32 mesi dalla diagnosi (Farge D., 1993). In circa il 60% dei pazienti trapiantati il KS si manifesta con lesioni nodulari limitate alla pelle o all'orofaringe, ma il 40% circa mostra lesioni maligne più invasive, multiple rosso-bluastre o confluenti in placche brunastre con

ulcerazioni cutanee, linfadenopatie e/o coinvolgimento d'organo (Penn I., 1995), la cui localizzazione è un marker di severità di malattia. I fattori che influiscono, in maniera determinante, nell'insorgenza delle diverse forme cliniche del sarcoma di Kaposi sono: predisposizione genetica, esposizione a cofattori ambientali, alterazioni immunitarie (Ascoli V. et al., 2002). Gli studi finalizzati alla ricerca di una componente genetica predisponente allo sviluppo di KS hanno fornito risultati contraddittori. Non è mai stata dimostrata un'associazione significativa tra antigeni HLA e KS in Africa centrale (Melbye M. et al., 1987) e in Israele (Strichman-Almashanu et al., 1995) a differenza di quanto osservato in pazienti Sardi (Contu L. et al., 1984) e Greci (Kaloterakis A. et al., 1995), ma la sieroprevalenza per HHV8 è più elevata in comunità geneticamente isolate (Biggar R.J. et al., 2000). In condizioni favorevoli all'endogamia, il pool genetico è meno polimorfo, quindi HHV8 potrebbe essere più facilmente e rapidamente trasmesso data la somiglianza genetica tra donatore del virus e ricevente (Ascoli V. et al., 2002). Alcune popolazioni italiane dove il KS classico è più frequente sono relativamente isolate geneticamente (es. popolazione sarda) e/o presentano malattie genetiche selezionate dalla malaria, come deficienza di glucosio-6-fosfato-deidrogenasi e talassemia (Sardegna, Ferrara) (Ninfali P. et al., 1993). E' possibile che la pressione esercitata dalla malaria endemica abbia selezionato geni che aumentano la suscettibilità all'infezione HHV8 (Ascoli V. et al., 2002). Come esposto precedentemente un cofattore che era stato proposto nella patogenesi del KS era malaria, ma due studi caso-controllo condotti rispettivamente in Sardegna e in Uganda hanno dimostrato che la storia pregressa di malaria non aumenta il rischio di KS (McHardy J. et al., 1984 ; Cottoni F. et al., 1997). Inoltre, l'associazione tra HHV8 e malaria non sembra essere valida in Africa. Nella Gambia, dove la malaria è iperendemica, la forma di KS non HIV-correlata è rara. In altre aree africane si osserva la situazione opposta, soprattutto lungo la Rift Valley e in Uganda, caratterizzate da bassa endemia per malaria ed elevata incidenza di KS (Schmauz R. et al., 1990; Cook-Mozaffari et al., 1998). Potrebbero essere fattori associati alla malaria, come l'alta densità di artropodi ematofagi, a favorire l'insorgenza del KS. All'inizio degli anni '90, l'elevata incidenza di KS africano in zone caratterizzate da suolo vulcanico ed endemia per podoconiosi (elefantiasi endemica), indusse a correlare la presenza di suolo vulcanico con l'insorgenza del KS (Ziegler J.L., 1993). Estesa alle regioni mediterranee dove il KS è più frequente, l'ipotesi non è stata però confermata in Sardegna (Montesu M.A. et al., 1995) mentre è stata considerata valida per le aree vulcaniche del Vesuvio, in Campania (Montella M. et al., 1996), caratterizzate anche da un'elevata sieroprevalenza di HHV8 (Montella M. et al., 2000). Uno studio caso-controllo sull'incidenza del KS classico in Campania è emerso un rischio di circa due volte più alto nei nati e/o residenti in aree vulcaniche lungo le pendici del Vesuvio (Montella M. et al., 1997), dove esistono focolai di leishmaniosi canina (Maroli M. et al., 2001) ed umana (Ascione R. et al., 1996), cioè alta densità di flebotomi, di sviluppare la neoplasia. Recentemente tale teoria è stata confermata da uno studio che documenta la maggiore sieroprevalenza di HHV8 tra i soggetti nati/residenti in area con suoli vulcanici rispetto a soggetti nati in aree non vulcaniche (Montella M. et al., 2000). Il cofattore fondamentale della forma epidemica di KS è la coinfezione con HIV: KS è molto più frequente ed aggressivo nei pazienti in AIDS (Beral V., 1991). Numerosi studi suggeriscono che sarebbe la proteina Tat

prodotta da HIV ad influenzare la patogenesi del KS epidemico (Ensoli B. et al., 1994; Corallini et al., 1993; Barillari G. et al., 1992). L'associazione tra HIV e KS epidemico è stata dimostrata sperimentalmente: colture primarie da lesioni KS epidemico crescono in vitro solo in presenza del supernatante di colture cellulari di linfociti TCD4+ HIV positivi (Dianzani F. et al., 1998). Il prodotto del gene Tat di HIV è un fattore di trascrizione che agisce regolando l'espressione del genoma virale integrato in quello dell'ospite e, a differenza di molti altri fattori di trascrizione, può essere secreta (Dianzani F. et al., 1998). Viene prodotta nelle prime fasi dell'infezione per attivare la trascrizione degli mRNA virali (Arya S.K. et al., 1985). E' stato dimostrato che Tat induce nelle cellule KS ed endoteliali sane, adesione e migrazione, espressione della collagenasi IV, invasione della matrice extracellulare e proliferazione (Ensoli E. et al., 1990; Barillari G. et al., 1992; Barillari G. et al., 1993; Ensoli E. et al., 1993; Albini A. et al., 1995). Tat ha inoltre effetti angiogenici in combinazione con l'azione di fattori che stimolano l'espressione dei recettori di Tat, rappresentati da una famiglia di integrine, presenti sulle cellule endoteliali (Ensoli E. et al., 1994a). Le integrine sono proteine cellulari coinvolte normalmente nell'adesione cellulare alla matrice extracellulare il legame con la sequenza RGD di Tat mima l'effetto di adesione (Barillari G. et al., 1993). La regione basica di Tat lega inoltre l'eparina e i complessi eparinici presenti nella matrice extracellulare e sulla superfici cellulari e inducendo il rilascio del fattore di crescita bFGF ad essi associato (Chang Y. et al., 1997; Barillari G. et al., 1997). In seguito al suo rilascio il bFGF prodotto sia dalle cellule KS che dalle cellule endoteliali legate a Tat, induce la proliferazione cellulare (Ensoli E. et al., 1994a). Quindi mentre bFGF fornisce il segnale di attivazione della crescita e induce l'espressione delle integrine, Tat extracellulare fornisce alle cellule il segnale integrinico e induce il rilascio di bFGF solubile. Nei modelli animali è stato verificato il sinergismo tra Tat e bFGF induce la formazione di lesioni angiogeniche simili al KS (Ensoli E. et al., 1994a; Barillari G. et al., 1997). Il ruolo maggiore della coinfezione con HIV nella patogenesi del KS epidemico rimane l'immunodepressione che induce nell'ospite un assetto citochinico particolare il quale, favorisce da una parte l'azione di Tat, inducendo una sovraespressione di integrine, dall'altra crea l'ambiente ideale per la replicazione di un virus superinfettante (Dianzani F. et al., 1998).

TRATTAMENTO

Ad oggi non esiste un trattamento specifico per il KS né per l'infezione da HHV8. Non Molte ORF di HHV8 codificano per proteine interagenti con farmaci antivirali: la timidina chinasi (vTK) virale fosforila attivandolo l'aciclovir (ACV), analogo guanidinico antierpetico (Cannon J.S. et al., 1999); la fosfotransferasi (vPT) virale fosforila gli inibitori non guanidinici della trascrittasi inversa di HIV come la stavudina e la zidovudina (Lock M.J. et al., 2002). La somministrazione di ganciclovir o foscarnet, ma non di ACV diminuisce il rischio di sviluppare KS rispettivamente del 43-93% e del 60-72% (Glesby M.J. et al., 1996; Martin J.N. et al., 1999), mentre il trattamento con cidofovir o valganciclovir non induce miglioramenti in pazienti KS (Humphrey R.W. et al., 1996). Gli inibitori della sintesi di DNA sembrano bloccare la replicazione di HHV8 probabilmente agendo non sui geni virali "immediate early" (IE), processati da proteine virali (Paulose-Murphy et al., 2001), ma sui geni coinvolti nella latenza e nella

trasformazione: LANA-1 (ORF73), cicline virali (ORF72), "viral Fas-associated death domain like interleukin 1 γ -converting enzyme inhibitory protein" (vFLIP, ORF-71) e "viral interferon regulatory factor 1" (vIRF3, ORF10.5) o LANA2 (Dourmishev L.A. et al., 2003). La terapia HAART, utilizzata contro le infezioni da HIV sembra efficace nel prevenire il KS, ma lo stesso tumore persistente è capace di persistere nonostante il trattamento (Casper C. et al., 2007). La MCD ed i PEL vengono trattate con polichemioterapie del tipo CHOP (ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina e prednisone), interferone α , da solo o in associazione con la vinblastina o l'etoposide, apporta sensibili benefici; l'MRA, anticorpo antirecettore dell'IL6, può essere utilizzato come terapia adiuvante (Casper C. et al., 2007).

I FARMACI ANTIVIRALI

I virus non hanno sistemi metabolici propri, di conseguenza sfruttano i sistemi della cellula che hanno invaso per potersi replicare. I farmaci antivirali, perché siano efficaci e non tossici, dovrebbero limitare la loro azione bloccante e inibitrice sui processi virali e non cellulari. In molte infezioni virali la replicazione del virus raggiunge alti livelli anche prima della comparsa dei sintomi pertanto la strategia clinica più efficace si basa generalmente sul rapido inizio della terapia o sulla prevenzione dell'infezione. La replicazione virale avviene in fasi successive e gli agenti antivirali possono potenzialmente interferire con ciascuna di queste fasi soprattutto inibendo l'azione degli enzimi coinvolti. La maggior parte dei farmaci antivirali attualmente disponibili agiscono sulla sintesi di purine e pirimidine ostacolando la sintesi di DNA o RNA virale. Per i retrovirus esistono anche degli inibitori che bloccano la trascrittasi inversa impedendo così la trascrizione di RNA genomico. Un'altra classe di farmaci antivirali sono gli inibitori delle proteasi che agiscono sulla sintesi delle proteine strutturali e sull'assemblaggio della particella virale. La ricerca di molecole in grado di inibire specifiche funzioni virali è attualmente una delle più attive aree di ricerca in farmacologia.

STORIA FARMACOLOGICA DEGLI ANTIERPETICI

La ricerca nel campo della chemioterapia antivirale nacque all'inizio del 1950 quando, in seguito agli studi intrapresi per il trattamento del cancro, si produssero molti nuovi composti in grado di inibire la sintesi del DNA virale. L'attenzione venne principalmente focalizzata sugli analoghi dei nucleosidici pirimidinici e purinici con l'obiettivo di identificare agenti con sempre maggiore selettività, stabilità in vivo ed assenza di tossicità. La VIDARABINA, il primo farmaco contro l'herpesvirus somministrato per via sistemica avente efficacia terapeutica dimostrata, fu approvato nel 1977. Tuttavia la sua tossicità ha limitato il suo impiego clinico a quelle infezioni provocate da HSV e da varicella-zoster virus (VZV) considerate pericolose per la vita del paziente. La scoperta e lo sviluppo dell'ACICLOVIR (ACV) alla fine degli anni '70 (Kleymann G et al, 2002), ha fornito uno strumento terapeutico efficace per il trattamento di pazienti colpiti da infezioni meno gravi da HSV e da VZV. Studi successivi hanno dimostrato che l'ACV, iniettato per via endovenosa, ha una efficacia superiore rispetto alla VIDARABINA nelle encefaliti causate da HSV e nelle infezioni da VZV in pazienti immunodepressi (Kleymann G). L'ACV è stato il primo farmaco antivirale specifico e

selettivo ad essere scoperto e dopo di questo altri farmaci chimicamente correlati all'ACV come PENCICLOVIR, e FAMCYCLOVIR, sono stati introdotti come antierpetici, a partire dalla metà degli anni '90 (15. Bunzli D,2004). Negli ultimi anni, con l'aumento di soggetti resistenti alle terapie antierpetiche più utilizzate, la ricerca farmacologia si è orientata verso lo studio di nuove molecole che agissero su targets virali diversi; gli enzimi risultanti dalla trascrizione dei geni beta sono quelli principalmente studiati per lo sviluppo di farmaci antierpetici che hanno un meccanismo di azione selettivo.

I FARMACI ANTIERPETICI

I farmaci antierpetici, ad oggi disponibili, sono principalmente analoghi nucleosidi e, comunque, molecole che vanno principalmente ad interferire sulla replicazione virale. Possono essere suddivisi in due classi: gli analoghi della guanosina, la cui attività dipende dall'attivazione da parte della timidino-kinasi virale (come ACV, VALACICLOVIR, PENCICLOVIR, FAMCICLOVIR e GANCICLOVIR) e le molecole che agiscono direttamente sull'attività della DNA polimerasi virale indipendentemente dal funzionamento della timidino-kinasi (come CIDOFOVIR, FOSCARNET).

A. FARMACI ATTIVATI DALLA TIMIDINA CHINASI. ACICLOVIR:(9-[(2-idrossietossi)metil-9H-guanina) è un derivato aciclico della guanosina privo del gruppo idrossile in posizione 3' della catena laterale con attività verso HSV1 e 2 e VZV. MECCANISMO D'AZIONE: E' un agente antierpetico altamente selettivo perché è attivato specificatamente da parte di un enzima virale (la timidino-kinasi) nelle cellule infette (Kuo, Y.C.,2001). uesto farmaco infatti richiede tre fasi di fosforilazione; dapprima viene convertito dalla timidina-kinasi virus-specifica in un derivato monofosfato, e successivamente in di- e tri-fosfato dal corrispettivo enzima cellulare (20). L'affinità dell'ACV per la timidino chinasi virale è circa 200 volte maggiore rispetto all'affinità per l'enzima presente nelle cellule di mammifero. Il derivato trifosfato, che si ritrova in concentrazione da 40 a 100 volte più elevata nelle cellule infettate da HSV rispetto alle cellule non infette, inibisce la sintesi del DNA virale per mezzo di due meccanismi: 1.inibizione competitiva, con la deossiguanosina (dGTP) endogena, della DNA polimerasi virale, ed in misura minore anche della DNA polimerasi cellulare; 2.n rminazione di catena successivamente alla sua incorporazione; ACV trifosfato viene incorporato nel DNA virale, dove provoca l'arresto del processo di allungamento della catena a causa della mancanza del gruppo idrossile in posizione 3'. Per mezzo di un meccanismo definito in attivazione suicida, lo stampo di DNA i interrotto si lega alla DNA polimerasi inattivandola in modo irreversibile (Chibo D,2004). Le cellule non infettate dal virus non fosforilano il farmaco o solo in minima misura pertanto l'ACV viene attivato selettivamente solo all'interno delle cellule infettate da herpesvirus che codificano per la specifica timidina chinasi (Chiang SY, 1996).Lo spettro antivirale clinicamente utile dell'ACV è limitato agli herpesvirus. In vitro è più attivo contro HSV1 circa due volte meno contro HSV2, 10 volte meno contro VZV o del virus di Epstein-Barr (EBV), l'attività più bassa è contro citomegalovirus (CMV) o contro herpes virus 6.L'ACV rappresenta il farmaco di prima scelta nella terapia antierpetica, anche se sono state saggiate altre molecole con uno spettro d'azione molto simile. VALACICLOVIR: è un profarmaco ed è l' L-valin estere dell'ACV.Dopo somministrazione per via orale esso è rapidamente

trasformato ad ACV, raggiungendo livelli sierici tre o cinque volte maggiori di quelli raggiunti con la somministrazione orale di ACV. A parte la minor frequenza di dosaggio non sembra offrire alcun vantaggio rispetto all'ACV. Negli Stati Uniti è utilizzato per il trattamento di pazienti con herpes genitale ricorrente o infezioni da Herpes zoster. Il meccanismo di azione e le caratteristiche farmacologiche sono identiche a quelle dell'ACV (Weiss H, 2004).

FAMCICLOVIR e PENCICLOVIR: Il FAMCICLOVIR è l'estere diacetilico profarmaco del 6-deossi penciclovir (9-[4-idrossi-3-idrossimetilbut-1-il]guanossina), un analogo aciclico della guanossina. Dopo ingestione il FAMCICLOVIR è rapidamente convertito a PENCICLOVIR per mezzo del metabolismo epatico di primo passaggio. Il PENCICLOVIR che è la forma attiva del farmaco, condivide possiede uno spettro d'azione e una potenza simili a quelle osservate per l'ACICLOVIR nei confronti di HSV e VZV.

MECCANISMO D'AZIONE: Il PENCICLOVIR per essere attivato richiede, come l'ACICLOVIR, una fosforilazione iniziale a carico di una timidina chinasi virale. Anche il penciclovir trifosfato agisce come un inibitore competitivo della DNA polimerasi virale ma a differenza dell'aciclovir non causa una terminazione di catena. Il penciclovir trifosfato ha minore affinità per la DNA polimerasi virale dell'ACICLOVIR trifosfato (è circa 100 volte meno attivo) ma è presente in concentrazioni molto maggiori e per periodi più lunghi nelle cellule infette. Il FAMCICLOVIR è principalmente utilizzato per il trattamento di pazienti con herpes genitale ricorrente e infezioni da herpes zoster. Nei pazienti immunocompetenti non sono state evidenziate differenze con l'ACICLOVIR per il tempo di guarigione, mentre è stata registrata una più rapida risoluzione del dolore associata a zoster nei pazienti trattati con FAMCICLOVIR. È stata inoltre registrata un'attività anche verso EBV e l'epatite B (HBV).

GANCICLOVIR: (9-[1,3-diidrossi-2-propossimetil]guanina) è un analogo nucleosidico aciclico della guanina, avente una struttura simile all'ACICLOVIR ad eccezione della presenza di un gruppo idrossimetile nella catena laterale aciclica. Questo farmaco inibisce tutti gli herpesvirus però la sua attività peculiare è diretta contro il CMV.

ECCANISMO D'AZIONE: Il GANCICLOVIR inibisce la sintesi del DNA virale e richiede lo stesso meccanismo di fosforilazione dell'ACICLOVIR per essere attivato; la fosforilazione è catalizzata da una timidina chinasi virale durante l'infezione da HSV e da una fosfotransferasi virale durante l'infezione da CMV. Le forme di- e trifosfato si ottengono per l'intervento di enzimi cellulari. Il composto dopo attivazione agisce come inibitore competitivo dell'incorporazione dei dGTP, bloccando in modo preferenziale la DNA polimerasi virale rispetto a quella cellulare. L'incorporazione nel DNA virale può causare l'arresto dell'allungamento della catena del DNA. Il GANCICLOVIR è attivo verso HSV, VZV, CMV ed HBV; le concentrazioni inibitorie verso HSV e VZV sono simili a quelle riportate per l'ACV mentre la sua attività nei confronti di CMV risulta 100 volte maggiore.

FARMACI INDIPENDENTI DALL'ATTIVAZIONE DA PARTE DELLA TK, quali CIDOFOVIR: è un analogo del nucleotide citosina, attivo in vitro contro HSV1-2, VZV, CMV, EBV, HHV6, adenovirus e papillomavirus umano.

MECCANISMO D'AZIONE: Per ottenere la forma attiva difosfato del CIDOFOVIR sono necessarie solo due fosforilazioni entrambi a carico di chinasi cellulari, e quindi indipendenti dall'infezione virale. Il cidofovir è un inibitore della sintesi del DNA virale (Fields, Medical virology, 2007).

FOSCARNET: (fosfonoformiato trisodico) è un derivato del pirofosfato inorganico in grado di bloccare tutti gli herpesvirus e l'HIV.

MECCANISMO D'AZIONE: Il FOSCARNET

inibisce direttamente la DNA polimerasi, la RNA polimerasi virale e la trascrittasi inversa di HIV e non richiede di essere fosforilato per essere attivato. Questo farmaco viene lentamente incorporato nelle cellule e non subisce un metabolismo intracellulare significativo. Il Foscarnet blocca reversibilmente e in modo non competitivo il sito di legame del pirofosfato presente nella polimerasi virale, di conseguenza è in grado di impedire la liberazione del pirofosfato dal deossinucleotide trifosfato. La sua capacità inibitoria è 100 volte maggiore nei confronti della DNA polimerasi dell'herpesvirus rispetto a quella cellulare. (Fields, Medical virology, 2007; Morfin F et al. 2001). NUOVI ANTIERPETICI quali gli analoghi nucleosidici come ACV, VALACICLOVIR, FAMCICLOVIR e PENCICLOVIR sono stati approvati come farmaci di prima scelta per il trattamento delle infezioni da HSV perché risultano efficaci per il trattamento delle infezioni primarie e di quelle ricorrenti; ma dal momento che terapie prolungate hanno portato a una diminuzione dell'efficienza di questi farmaci oltre che alla insorgenza di forme di resistenza, è stato opportuno ricercare nuove molecole farmacologicamente distinte dagli antierpetici ad oggi in uso. Esistono, per esempio, studi recenti (Crute et al., 2002) che hanno focalizzato la loro attenzione sull'elicasi-primasi, enzima formato da diverse subunità ognuna che agisce a diversi livelli durante la replicazione virale: DNA elicasi, RNA polimerasi (primase) e ATPase. Hanno identificato una classe di molecole che hanno un'azione inibitrice su tale enzima: molecole che contengono residui amidici tiazolati che sono in grado di legare contemporaneamente la subunità-DNA elicase e quella con attività di primase. (Crute J.J., 2002). L'oggetto del nostro studio è la DISTAMICINA CLORIDATO (DA), sostanza naturale che è in grado di legarsi al DNA virale in modo selettivo interferendo così con il processo replicativo della particella infettante.

LA DISTAMICINA A

La DISTAMICINA A o DISTAMICINA CLORIDATO (STALLIMICINA denominazione attribuita dall'OMS) fu scoperta ed identificata nei primi anni '60. Questa molecola appartiene alla famiglia delle LEXITROPSINE, sostanze caratterizzate da residui di ACIDO 1-METIL-4-AMMINOPIRROLO-2-CARBOSSILICO uniti da legami peptidici, che sono in grado di legarsi al solco minore del DNA (Casazza et al. 1996). La DA è un antibiotico basico di natura oligopeptidica isolato da *Streptomyces distallicus*, del quale è un prodotto della fermentazione. La DA e i suoi derivati sono oggi ottenibili anche per diverse vie di sintesi; secondo il metodo di Lown e Krowicki a partire dall'acido carbossilico N-metilpirrolico (Chandra et al. 1971) è possibile ottenere con una nitratura e con una successiva cloridazione una molecola acilante che reagendo con il composto pirrolico precedentemente ottenuto dalla condensazione tra un'aldeide nitromalone e la glicina metilestere, origina un composto bis-pirrolico (Broyles et al. 2004). L'amide tris-pirrolica viene sintetizzata con la stessa metodica e successivamente, attraverso opportune sostituzioni delle catene laterali della molecola, è possibile ottenere la DA e i corrispettivi analoghi (Ebrahim et al. 2005). La DA è un prodotto di interesse clinico per la sua attività contro virus a DNA; Herpesvirus (HSV, VZV), Virus Vaccino, Adenovirus e virus a RNA (Murine Sarcoma Virus) la cui replicazione dipende dalla sintesi di DNA (Ding et al. 1994). La DA infatti, interagendo con il DNA virale, inibisce la replicazione del

virus a livello intracellulare anche se non mostra alcun effetto sulla viabilità extracellulare del virus e sul suo adsorbimento da parte delle cellule (Toma et al., 2008). Il nome "LEXITROPSINE" deriva dalla loro capacità di riconoscere specifiche sequenze sul DNA e questo fatto ha un interesse particolare anche per la terapia antitumorale. Negli ultimi anni sono stati sintetizzati e saggiati diversi composti in grado di legarsi al DNA, con lo scopo di trovare dei possibili farmaci che, interagendo con determinate sequenze nucleotidiche, siano in grado di controllare e quindi inibire lo sviluppo di cellule tumorali (Chetoni et al., 2007). Infatti è stato dimostrato che la comparsa di cellule trasformate è principalmente a carico di mutazioni in alcuni geni particolari, detti oncogeni, e quindi l'inibizione dell'espressione di tali geni può essere una buona strategia nella terapia antitumorale (Green et al., 1994). La DISTAMICINA A (DA) è formata da tre anelli pirrolici uniti da legami peptidici e da due catene laterali con struttura lineare; una è un gruppo formilico(A) e l'altra una propionammina(B) (Chandra P et al., 1972). Arcamone et al. hanno sintetizzato diverse strutture analoghe alla DA attraverso la sostituzione delle due catene laterali e attraverso la variazione del numero di residui pirrolici. È stato osservato (Chandra et al., 1971) che l'attività antivirale della DA e la sua interferenza sulle reazioni di stampo del DNA, dipende dal numero di anelli pirrolici presenti nella molecola; i derivati della DA con 5 anelli pirrolici mostrano un'attività antivirale 10 volte maggiore rispetto alla DA (con 3 anelli pirrolici) e una inibizione più efficiente sulla reazione della RNA polimerasi. La DA non è un agente intercalante ma piuttosto agisce formando con il DNA a doppia elica un complesso estremamente stabile tramite legami non-covalenti; legami ad idrogeno, forze di van der Waals, interazioni idrofobiche ed elettrostatiche (Dolenc j, et al 2005). La DA subisce un trasferimento idrofobico dalla soluzione alla sequenza nucleotidica del DNA e il legame tra la DA e il DNA avviene a livello del solco minore in particolare in regioni con almeno quattro sequenze di AT consecutive (Dolenc j, et al 2005). Sono tre i fattori che si pensa contribuiscano alla stabilità tra le sequenze AT e la DA: 1. i legami ad idrogeno tra l'ammide NH del farmaco e gli atomi O-2 della timina e N-3 della adenina 2. l'esistenza di un'alta complementarità tra la DA e il DNA dovuta alle forze di van der Waals, 3. le interazioni polielettrostatiche tra il DNA polianionico e l'agente cationico. Il complesso così formato DNA-DA presenta una ridotta attività di stampo per il DNA, RNA polimerasi e per la trascrittasi inversa e ciò inibisce la replicazione del virus all'interno della cellula (Broyles SS, 2004). È stato dimostrato, infatti, che la DA impedisce l'associazione di tutti quei fattori di trascrizione, TBF, con le regioni ricche di AT e questo causa il blocco del processo replicativo (Leary et al., 2002). Esistono studi recenti (Cocco et al., 2003) che dimostrano che la DA possiede un'altra strategia per interferire sulla replicazione del DNA; questo agente può inibire l'interazione di alcune proteine con la struttura "G-quadruplex" o G4, un arrangiamento di DNA stabile formato da quattro eliche in cui la unità ripetuta è una sequenza di quattro G. Infatti, singole eliche di DNA o RNA contenenti sequenze consecutive di residui guanosinici, se vicine le une alle altre, possono associarsi spontaneamente mediante legami ad idrogeno; ciò permette di formare anelli planari. Gli enzimi che agiscono a livello della doppia elica di DNA non sono in grado di interagire con la "G-quadruplex" e quindi sono necessarie proteine specifiche, capaci di rimuovere la struttura quaternaria ed evitare che questa interferisca con la trascrizione e con la replicazione del DNA. La DA sembra inibire proprio

l'interazione tra queste proteine enzimatiche e la struttura G4. In questo caso la DA si comporta come intercalante, cioè l'antibiotico si inserisce fra coppie di basi adiacenti del DNA. Ciò è in contrasto a quanto osservato a proposito dell' interazione tra la DA e il solco minore del DNA, in cui è fondamentale la formazione di una rete di legame ad idrogeno (Bunzli D et al., 2004).

SCOPO DELLA TESI

Al fine di chiarire il processo di trasformazione neoplastica indotta dal Virus Erpetico 8 (HHV8) e per comprendere il potenziale effetto antivirale contro HHV8 della Distamicina (un antibiotico oligopeptidico derivato dallo *Streptomyces distallicus* e oggi ottenuto per sintesi) , **nel presente lavoro di dottorato sono state eseguite:**

1. l'analisi del pattern di espressione di geni cellulari coinvolti nella risposta antivirale (infiammazione e apoptosi) in linee cellulari di origine epiteliale Human Embryonic Kidney (HEK293) e linfociti da sangue periferico (PBMC) infettate con i sottotipi A1 e C3 di HHV8;
2. l'analisi *in vitro* del tropismo di HHV8 per cellule epiteliali derivate corneale di coniglio (RCE), scelte per il loro successivo utilizzo per studiare la permeabilità del farmaco in vivo; .
3. l'analisi della citotossicità e dell'efficacia di permeazione di una formulazione liposomiale di DA;
4. l'analisi *in vitro* l'attività antivirale della formulazione liposomiale di DA contro HHV8 in citotipi epiteliali e linfociti.

RIATTIVAZIONE DELLA REPLICAZIONE VIRALE

La replicazione virale è stata riattivata mediante trattamento con forbolo estere (TPA, Sigma aldrich, Germania), in due linee cellulari "Body Cavity Based Lymphoma" (BCBL1) e "Body Cavity Lymphoma" (BC3) latentemente infette rispettivamente con il sottotipo A1 e C3 di HHV8 (Yimin Y. et al., 1999). Il virus rilasciato nel surnatante, concentrato e purificato è stato utilizzato per infettare le linee cellulari: cellule epiteliali embrionali umane (Human Embryonic Kidney, HEK293) e Rabbits corneal epithelial cell line (RCE) (Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Bruno Ubertini), Retinoide linfoblasti umani periferici (Peripheral Blood Mononuclear Cells, PBMC) ottenuta da sangue intero di un donatrice di età inferiore a 30 anni, HHV8 negativa, sana e non fumatrice.. Le linee HEK293 e PBMC sono state utilizzate per l'analisi della modulazione genica dopo l'infezione con HHV8, i saggi di citotossicità e di attività antivirale della DA in forma libera e liposomiale, la linea RCE è stata utilizzata per i saggi di infezione con HHV8, di citotossicità della DA in forma libera e liposomiale e della sua capacità di permeazione e attività antivirale contro i ceppi A1 e C3 di HHV8. Sono state scelte queste linee cellulari perché sono tra le poche competenti per l'infezione con HHV8 e permissive di un ciclo virale litico (Bechtel et al., 2003). Il surnatante delle colture prelevato dopo 48 ore di trattamento, è stato privato della componente cellulare mediante centrifugazioni seriali e ultrafiltrazione (0.2 µm) e concentrato mediante ultracentrifugazione (Renne et al., 1996) a 20.000 giri per 1 ora a 4°C. I ceppi virali sono stati successivamente tipizzati, per la verifica del ceppo virale infettante e il DNA virale è stato quantificato mediante REAL-TIME PCR (CMV-HHV6- HHV7- HHV8 Real time, Agene, Francia) secondo le istruzioni.

ESTRAZIONE DEL DNA

Il DNA virale è stato estratto utilizzando il kit commerciale "QIAamp DNA Mini kit" (QIAgen, Chatsworth, CA), che consente di purificare il DNA totale (genomico, mitocondriale e virale) direttamente da sangue intero, plasma, siero, fluidi corporei, linfociti, colture cellulari e tessuti.

QUANTIFICAZIONE DEL DNA ESTRATTO

La quantità del DNA ottenuto è stata valutata mediante analisi spettrofotometrica (Eppendorf) e la qualità mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio (Euroclone).

TIPIZZAZIONE VIRALE

Il DNA virale è stato amplificato mediante PCR NESTED. La reazione polimerasica a catena, ideata nel 1983 da Kary B. Mullis (Mullis 1990), è una tecnica di biologia molecolare che permette di replicare in vitro una regione di DNA a doppio filamento utilizzando gli elementi di base del naturale processo di replicazione. La NESTED PCR consiste nel realizzare due PCR successive utilizzando coppie di primers differenti, con la seconda che inquadra una sequenza inclusa in quella amplificata dalla prima coppia, che

permette di aumentare la specificità ed il tasso di amplificazione. Mediante NESTED PCR è stata amplificata la regione virale VR2 interna all'ORFK1 (Zong W et al., 1999). 10 µL del prodotto di amplificazione del secondo round della PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su un gel al 2% di agarosio (EuroClone) trattato con Etidio Bromuro (Roche) al 0,002%, per 30 minuti a 90mV. Successivamente è stata effettuata la lettura ai raggi ultravioletti mediante l'analizzatore di immagine Syngene. I campioni che presentavano l'amplificato all'altezza attesa di 520 bp, sono stati considerati positivi. I prodotti dell'amplificazione della VR2 sono stati purificati (Wizard SV Gel PCR Clean-UP System, Promega), quantificati mediante corsa su gel di agarosio e sottoposti a reazione di sequenziamento con il metodo di Sanger a terminazione di catena (BigDye Terminator vs.1.1, Abbott). La reazione di sequenziamento a terminazione di catena esegue una reazione di PCR utilizzando uno solo dei 2 primer del 2° ciclo di amplificazione, deossinucleotidi e dideossinucleotidi, questi ultimi marcati con 4 fluorocromi diversi che sono terminatori di catena. Il prodotto viene sottoposto ad elettroforesi capillare in sequenziatori automatici completi di un software di analisi che elabora l'elettroferogramma. Le sequenze ottenute con Genetic Analyzer 3100 ABI PRISM (Applied Biosystems), sono state analizzate con il software ChromasLite ed allineate utilizzando il software MEGA vs3.0 con i seguenti riferimenti presenti in Genbank: AF130288 e AF133038 per il sottotipo A1; U75698 per il sottotipo A2; AF130287 e AF278829 per il sottotipo A3; AF130285 e AF133039 per il sottotipo A4; AF130289 per il sottotipo A5; AF130292, AF130293, AF133040, AF133036, AF130262 e AF130263 per il sottotipo B; AF130267 e AF130273 per il sottotipo C1; AF130304 per il sottotipo C2; AF130298 per il sottotipo C3; AF133044 per il sottotipo D2; AY329026, AY329024, AY329025, AY329027, AY329028 per il sottotipo E. Utilizzando il metodo neighbour joining (N-J), test di bootstrap, 1000 repliche che utilizza un particolare algoritmo di confronto tra le sequenze nucleotidiche e proteiche immesse e ne rileva la similarità, è stato costruito l'albero filogenetico ed i ceppi infettanti sono stati tipizzati. Poiché l'analisi della sola sequenza nucleotidica consente solo l'identificazione dei ceppi principali (Zong W. et al., 1999).

QUANTIFICAZIONE DELLA CARICA VIRALE

La Real Time PCR o PCR quantitativa in tempo reale (rtq-PCR), permette il monitoraggio della reazione di amplificazione mentre durante il suo svolgimento ed i dati che si ottengono a fine ciclo possono essere utilizzati per effettuare una quantificazione relativa del frammento amplificato, questo è possibile tramite l'impiego di marcatori fluorescenti il cui accumulo segue la stessa cinetica della reazione di PCR. La curva di amplificazione che deriva da una PCR è solo teoricamente di tipo esponenziale; in realtà, dopo la prima fase esponenziale in cui nessuno dei componenti della reazione è limitante, tende ad assumere un andamento di tipo lineare e dopo un certo numero di cicli, raggiunge un plateau, per questo motivo la misurazione della reazione in fase finale non risulta direttamente connessa con l'ammontare iniziale di DNA target mentre al momento del ciclo soglia (Ct), tutti i campioni, indipendentemente dalla quantità di DNA di partenza, sono amplificati con la stessa efficienza. La fluorescenza emessa in seguito ad uno specifico irraggiamento da parte della sorgente luminosa del termociclatore viene quindi misurata in tempo

reale da una telecamera CCD (charge-coupled device). Tutte le operazioni relative alle misurazioni avvengono sotto il controllo di un software gestito da computer. La Real Time PCR si può realizzare mediante l'impiego di coloranti intercalanti oppure con sonde ad ibridazione specifiche, marcate con molecole fluorescenti. La sonda di tipo TaqMan è un oligonucleotide che come i primer della PCR, viene disegnata per essere complementare alla sequenza bersaglio del gene da amplificare. E' stato utilizzato il Kit CMV, HHV6-, HHV7- HHV-8, Argene, Frnacia seguendo le istruzioni del produttore.

INFEZIONE DELLE LINEE CELLULARI E VALUTAZIONE DEL TASSO DI INFEZIONE

I surnatanti delle linee BC3 e BCBL1 sono stati diluiti in modo da avere la stessa concentrazione di particelle virali e utilizzati per infettare la linea cellulare RCE, HEK293 e PBMC. L. Dopo il prelievo il sangue è stato diluito in rapporto 1:1 con lymphoprep (Gibco) in grado di stratificare tramite la formazione di un gradiente, i linfociti che sono stati poi lavati in PBS e risospeso in terreno RPMI 1640 (Gibco) al 10% di siero fetale bovino (FBS, Sigma), 2mM L-glutammina (Roche), 100 U di penicillina e 100 U di streptomycin (Gibco). Al terreno viene ulteriormente l'1,5% di fitoemoagglutina (PHA, Roche) una mucoproteina in soluzione acquosa estratta dal *Phaseolus vulgaris*, in grado di indurre la proliferazione dei linfociti T. L'aggiunta della PHA è fondamentale in quanto solo una piccola parte di linfociti, una volta messi in coltura, comincerebbe a dividersi spontaneamente entro pochi giorni. Dopo tre giorni di coltura o comunque al cambio del terreno, viene aggiunta al mezzo di coltura interleuchina 2 (IL-2, Roche) alla concentrazione di 20U/ml. Il virus purificato e diluito in terreno (Minimum Essential Medium, MEM, Gibco) lasciato a contatto 12 ore con le colture confluenti al 70%, e sostituito con terreno fresco al 2% di siero fetale bovino. Dopo 24 e 48, 72 e 96 ore il surnatante delle colture infettate è stato separato dalla parte cellulare, che è stata sottoposta a 3 lavaggi con PBS. Il DNA è stato estratto dal surnatante (DNA mini kit, QIAGEN, GERMANIA) e dalle cellule separatamente e sottoposto a REAL-TIME PCR (Argene, Francia) per la quantificazione della carica virale adsorbita dalle cellule e rilasciata nel surnatante. Per analizzare anche l'espressione antigenica virale, la linea RCE, HEK293 sono state fatte crescere su dei dischi di vetro sterili prima dell'infezione. Dopo 24 e 48 ore dall'infezione i linfociti e le cellule epiteliali infettate sono state fissate mediante trattamento con acetone ed etanolo (1:1) a -20°C per 15 minuti e trattate con il siero di un paziente KS risultato positivo per anticorpi anti K8.1. Le cellule sono state lavate con PBS e trattate con un anticorpo secondario anti immunoglobuline umane (Diasorin) e analizzate al microscopio a fluorescenza (Nikon). Dopo 72 e 96 ore alle colture cellulari sono state aggiunte nuove cellule e dopo 24 e 48 ore il surnatante è stato separato dalla parte cellulare, che è stata sottoposta a 3 lavaggi con PBS. Il DNA è stato estratto dal surnatante e dalle cellule separatamente e sottoposto a REAL-TIME PCR (Argene Francia) per la quantificazione della carica virale adsorbita dalle cellule e rilasciata nel surnatante.

ESPERIMENTI DI ANALISI DI MODULAZIONE GENICA

Successivamente all'infezione con HHV8 delle linee cellulari HEK293 e PBMC prese in esame è stato valutato il pattern di espressione dei geni cellulari coinvolti nel processo infiammatorio e apoptotico. Il

cDNA delle colture cellulari, ottenuto dall'mRNA tramite RT-PCR con random esameri e nucleotidi biotinilati, è stato ibridato su DualChip® Microarray, Eppendorf contenenti una serie di sonde rappresentative di 297 geni umani coinvolti nel processo infiammatorio. Il DNA microarray comunemente conosciuto come gene chip, DNA chip, o biochip è costituito da una collezione di sonde di DNA legate ad una superficie solida formanti un array, o chip silconici. I microarrays sono utilizzati per esaminare il profilo d'espressione genica o per identificare la presenza di un gene o di una breve sequenza in miscela di acidi nucleici. Questa tecnica applicata per la prima volta da Ed Southern nel 1975, ha aperto di fatto la strada alla possibilità di analizzare i profili di espressione genica di un intero organismo. Tuttavia, l'applicazione su larga scala di questa metodologia si è avuta solo di recente grazie all'utilizzo di supporti solidi non porosi, come il vetro, e alla messa a punto di tecniche fotolitografiche per la sintesi di frammenti oligonucleotidici ad alta densità spaziale. In particolare, i protocolli sviluppati dal gruppo di Pat Brown a Stanford, hanno permesso di ancorare automaticamente migliaia di catene di cDNA su vetrini da microscopio e, grazie alla loro ibridazione con campioni di mRNA marcati selettivamente con molecole fluorescenti, permettendo lo studio dei profili di espressione con le colture cellulari in stati fisiologici diversi (Brown P.O., Botstein D., 1999). Parallelamente, sono state messe a punto tecniche di mascheramento fotolitografico, normalmente utilizzate nell'industria dei semiconduttori, per la produzione di microarray capaci di costruire fino a 400.000 sonde oligonucleotidiche su una superficie di un pollice quadrato (Lipshutz R.J. et al., 1999). Durante la fase di ibridazione fra la sonda presente sulla matrice e il cDNA target, quest'ultimo rimarrà legato alla sonda complementare e potrà essere identificato quando il Microarray viene passato attraverso uno scanner per la misura dei segnali fluorescenti. L'intensità dei pixel di ciascuna immagine è proporzionale al numero di molecole di tracciante presenti sullo spot e quindi al numero di "probes" che hanno ibridato le sonde ancorate al supporto. Il segnale rilevato dallo scanner viene poi sottoposto ad algoritmi di filtrazione e di pulizia del segnale e convertito in valori numerici. In generale, quindi, un esperimento di analisi dei profili di espressione fornisce come risultato una matrice di dati, in cui le righe rappresentano i geni monitorati e le colonne corrispondono alle diverse condizioni sperimentali, quali punti temporali, condizioni fisiologiche, tessuti. Ogni elemento della matrice rappresenta quindi il livello di espressione di un particolare gene in uno specifico stato fisiologico. Ciascuna colonna è data da un vettore che ha tante dimensioni quanti sono i geni o le sequenze immobilizzate sull'microarrays. Questo numero può raggiungere valori notevoli che variano in funzione del genoma dei vari organismi complessi (Draghici S., 2003). La gestione e l'interpretazione dell'enorme quantità di dati generata dalle matrici ad alta densità rappresentano un aspetto fondamentale di questa tecnologia. Infatti, la loro applicazione nello studio dei profili dell'espressione genica produce volumi di informazioni tali da limitare l'applicazione delle tecniche modellistiche classiche. Tali tecniche non sono generalmente applicabili in maniera soddisfacente in presenza di sistemi poco caratterizzati e descritti da quantità grandissime di dati. È necessario, quindi, avere a disposizione tutta una serie di tecniche computazionali capaci di gestire ed interpretare questi enormi database nonché di interfacciarsi con gli strumenti bioinformatici per l'analisi funzionale, data mining. Si definiscono tecniche di data mining tutta una serie di strumenti informatici per

l'esplorazione e l'analisi di grandi quantità di dati al fine di estrarre motivi caratteristici e persistenti (patterns) e regole. Gli algoritmi che costituiscono il data mining sfruttano le informazioni ricavate direttamente dai dati per creare dei modelli empirici in grado di descrivere il comportamento di un sistema complesso (Draghici S., 2003).

ESTRAZIONE DELL' RNA

L'RNA totale è stato estratto dalle linee cellulari HEK293 e PBMC infettate con i ceppi A1 e C3 di HHV8 e dalle colture non, utilizzando "RNeasy Mini Kit, Qiagen, Germania". I residui di DNA genomico eventualmente presenti sono stati eliminati trattando l'RNA estratto con DNasi e RNasi free Kit, (Roche, Germania) in presenza di MgCl₂ 7 mM, quindi è stata effettuata un'incubazione a 94°C per 10 minuti per inattivare la DNasi seguita da 2 minuti in ghiaccio. L'RNA totale, dopo essere stato quantificato mediante lettura della densità ottica allo spettrofotometro (Eppendorf, Germania) e valutato qualitativamente per essere certi che non fosse stato degradato nella fase di estrazione, è stato conservato a -80°C. L'estrazione del RNA è stata eseguita in doppio per ogni linea cellulare infetta con un sottotipo virale, ed ogni estrazione è stata successivamente valutata 3 repliche.

RETROTRASCRIZIONE E MARCATURA

L'utilizzo dell'Eppendorf DualChip differenziale microarrays per l'analisi dell'espressione genica è una metodica che garantisce risultati di alta qualità con un elevato livello di riproducibilità (link web: www.eppendorf-biochip.com). L'ibridazione su microarrays necessita di uno step di retrotrascrizione al fine di ottenere un cDNA rappresentativo dell'espressione genica e opportunamente marcato per la rivelazione. L'enzima utilizzato per la reazione è la trascrittasi inversa SuperScript™ II Reverse Transcriptase, Invitrogen. Alla miscela di reazione è stata aggiunta RNase H (2 U/μl), Invitrogen, ribonucleasi che taglia l'RNA in un eteroduplex DNA/RNA per produrre "single stranded DNA" (ssDNA). Il cDNA così ottenuto è stato conservato a -20° C fino alla reazione di quantificazione.

IBRIDAZIONE, COLORAZIONE SILVERQUANT, ANALISI

La metodica silverquant (Eppendorf Microarrays Silverquant®) si avvale di una strategia di rivelazione e quantificazione del cDNA utilizzando un anticorpo anti-biotina marcato particelle d'oro. Il cDNA con biotinilato preparati con una miscela di ibridazione specifica, vengono dispensati sul vetrino. L'ibridazione avviene utilizzando l'ibridatore automatico Thermoblock, Eppendorf, effettuando un'incubazione overnight (12 - 16 ore) a 60 ° C con una frequenza: 1400 giri / min. Dopo l'ibridazione i Dualchip sono stati lavati, per eliminare il cDNA non ibridato, stabilizzati e analizzati. L'analisi del Dualchip è stata effettuata tramite scansione del microarray con Silverquant Scanner, Eppendorf che utilizza uno specifico programma di lettura Silverquant Image Viewer, Eppendorf. I dati numerici sono stati generati e successivamente analizzati con il Silverquant Analysis Software, Eppendorf. Il software prende in esame il valore di assorbanza del background e lo sottrae a quello letto a livello di ciascuno spot; successivamente esegue

una linearizzazione e una normalizzazione dei dati. I risultati relativi al campione/controllo sono espressi come: invariato, gene per il quale i rapporti di assorbanza cadono all'interno del 0,95 intervallo di fiducia non può essere considerato statisticamente diverso da 1; significativo, gene per il quale i rapporti di assorbanza sono al di fuori del 0,95 intervallo di confidenza, altamente significativo, gene per il quale i rapporti di assorbanza sono al di fuori del 0,99 intervallo di confidenza.

PREPARAZIONE DELLA DISTAMICINA LIPOSOMIALE

Una formulazione liposomiale contenente distamicina cloridrato (DA-Lipo) è stata preparata con L-alfa-fosfatidilcolina e colesterolo e sono stati valutati DA (lotto 1793-td, Lexipharm, Italia): l'efficienza di incapsulamento, di diametro, velocità di rilascio *in vitro*, dispersione vescicolare. La formulazione liposomiale contenente DA è stata preparata con la tecnica dell'evaporazione fase inversa parzialmente modificato (REV). Fosfolipidi idrogenati di soia con il 70% fosfatidilcolina sono stati usati per preparare una dispersione liposomiale contenente 1,38 mg / ml di incapsulato DA utilizzando il noto metodo di evaporazione a fase inversa (REV). Dal momento che le dispersioni liposomiali immediatamente dopo la preparazione erano eterogenee in termini di dimensioni, con differenze significative tra i vari lotti, come evidenziato dalla deviazione standard del diametro medio di $707,41 \pm 121,20$ nm, la sonicazione è stata utilizzata per renderli più piccoli e più omogenei in termini di dimensioni. Dopo sonicazione, diametro medio per la Lipo-Da è stato $358,41 \pm 48,01$ milioni e polidispersity cambiato da 0,579, che era indicativo della distribuzione eterogenea di vescicole di molti diametri diversi, a 0,311. L'efficienza di incapsulamento calcolata sulla dispersione liposomiale unimodale finale era 34,53% (E%) e consentiva la produzione di una dispersione liposomiale acquosa contenente $1,38 \pm 0,260$ mg / ml di DA. L'efficienza incapsulamento e la cinetica di rilascio *in vitro* sono stati valutati. La quantità di DA all'interno dei liposomi è stata determinata mediante HPLC dopo lisi dei liposomi con etanolo assoluto. La dispersione liposomiale è stato mescolato con etanolo 1:10; dopo centrifugazione a 13000 rpm per 5 minuti, il surnatante è stato diluito e analizzato. Ogni analisi è stata effettuata in triplicato. L'efficienza percentuale di incapsulamento (E%) è stata calcolata usando la formula: $E\% = ED / TD \times 100$ dove ED rappresenta la quantità di incapsulato DA, e Td la quantità totale di farmaco inizialmente aggiunto alla soluzione. La quantità rilasciata di ciascuna aliquota DA è stata rilevata mediante HPLC, tenendo conto del fattore di diluizione. La percentuale rilasciata nel bulk è stata calcolata in funzione del tempo di incubazione. Esperimenti di controllo sono stati fatti prendendo la stessa quantità di soluzione acquosa isotonica di riferimento (DA-Sol, 1,38 mg / ml) nel sacchetto di dialisi contro medie rilascio identici in identiche condizioni sperimentali. Gli esperimenti sono stati ripetuti per almeno tre volte. L'analisi delle proprietà di rilascio del farmaco della formulazione liposomiale utilizzando la membrana di dialisi dimostrato una rapida diffusione di DA dalla soluzione di riferimento (DA-sol) mentre un rilascio più controllato è stato ottenuto da Lipo-Da vescicole. Dopo 5,0 ore, più del 50% del contenuto DA stato rilasciato nella fase di ricezione dalla soluzione acquosa, mentre la quantità di DA rilasciato dalla dispersione liposomiale era inferiore a 5,0%. Il meccanismo di rilascio del farmaco può essere analizzato da una relazione proposta

da Ritger e Peppas (1978), dove M_t / M è la frazione di farmaco rilasciato al tempo t , k_a cinetica costante rispetto alle proprietà della matrice e il farmaco (strutturale e caratteristiche geometriche) e l'esponente n diffusionale, che dipende dal meccanismo di rilascio e dalla forma delle particelle.

SAGGI DI CITOTOSSICITA'

Per eseguire il test di citotossicità, soluzione acquosa DA (DA-Sol) e liposomiale DA (DA-Lipo) sono stati opportunamente diluiti con mezzo di coltura a concentrazioni di DA comprese tra 0,0346-346 μ M. Test di citotossicità sono stati eseguiti su linee RCE, cellule HEK293 e PBMC (500.000 in una piastra a 24 pozzetti (Corning, UK) mediante saggio Uptake del rosso Neutro. EC50, concentrazioni decrescenti la vitalità cellulare del 50%, sono state determinate mediante GraphPad software Prism (GraphPad software, USA) utilizzando un'analisi di regressione non lineare.

SAGGI DI PERMEAZIONE IN VITRO E IN VIVO

Il tasso di permeazione della DA è stato valutato su membrane epiteliali corneali ricostituite ottenuti da cellule RCE seminate su membrane Snapwell® ad una concentrazione di 8×10^4 cellule / cm^2 (Snapwell®, Superficie 1,0 cm^2 e dimensione dei pori 0,4 μm Costar Italia) e sono state coltivate in condizioni standard a 37 ° C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO_2 , con terreno di crescita sia nel vano apicale e basolaterale, per 15 giorni finché le cellule erano diventate confluenti ed erano stratificate e avevano ricostituito un epitelio corneale che presentava caratteristiche di barriera e permeabilità paracellulare simili a quelli della cornea di coniglio nativo. I dispositivi Snapwell® erano montati su camere di diffusione costituiti da sei singole camere, termostatata a 37 ° C (Harvard Apparatus, USA) con una fase donatore (lato superiore, 0,65 mL) contenevano 0,002% w / v di DA (corrispondenti a 1,00 mg / mL), come soluzione di riferimento o intrappolato in liposomi ottenuti diluendo dA-Sol e archivi formulazioni dA-Lipo con cella media cresciuta. La quantità di penetrazione della DA in fase di ricezione nel tessuto ricostituito è stata determinata mediante HPLC. Dopo deproteinizzazione concentrazione di DA nel supernatante è stato determinato mediante HPLC. Sono stati eseguiti sei esperimenti replica. La concentrazione della DA è stata valutata in vivo. Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in conformità con la Dichiarazione ARVO per l'uso di animali in oftalmia e Vision Research, secondo un protocollo approvato dalla Comitato Etico-Scientifico della Università di Pisa e sotto controllo veterinario. Sono stati utilizzati conigli albinici maschi Nuova Zelanda del peso di 2.8-3.5 kg, Pampaloni Rabbitry (Fauglia, Italia). Essi sono stati alloggiati in gabbie standard in una stanza di luce-controllata (10 hr ciclo luce buio / 14 hr) a 19 ± 1 ° C e $50 \pm 5\%$ di umidità relativa è stata data una dieta pellet e acqua ad libitum standard. Durante gli esperimenti i conigli sono stati collocati in scatole di ritenuta per cui erano stati abituati in una stanza con scarsa illuminazione e sono stati autorizzati a muovere la testa e gli occhi liberamente. Diversi gruppi di conigli, ciascuna delle sei animali sono stati usati per analizzare 1) tempo di ritenzione della DA nel fluido lacrimale 2) studi intraoculare penetrazione della DA e 3) uptake corneale della DA. Una dose singola (50 μ l) entrambi opportunamente diluita di Lipo-DA o Sol-DA è stata instillata nel sacco congiuntivale

inferiore di un occhio di ogni coniglio immediatamente dopo la loro preparazione. La quantità di somministrata di DA era 0.05. Per lo studio di ritenzione precorneale DA 1,0 μ L di liquido lacrimale sono stati raccolti in capillari di vetro monouso (Drummond "Microcaps" Fisher Scientific, USA) a intervalli di tempo adeguati (1, 3, 5, 10, 20 e 30 minuti) dopo la somministrazione delle formulazioni, e dopo opportuna diluizione con fase mobile HPLC (1: 100 ratio) i campioni sono stati sottoposti ad analisi HPLC. I livelli di DA nell'umore acqueo sono stati monitorati a 30 e 60 minuti dopo l'instillazione delle formulazioni sperimentali, ritirando circa 50-60 μ L di umore acqueo dalla camera anteriore di animali anestetizzati utilizzando una siringa da insulina (1,0 mL) con ago 29-gauge (BD, Micro-fine U-100 di insulina, Beckton Dickinson, Irlanda). Gli occhi del coniglio sono stati anestetizzati con 50 μ L di ossibuprocaina cloridrato (Novesina 0,5%, Novartis Farma S.p.A., Italia). I campioni di umore acqueo sono stati congelati immediatamente e conservati a -18 ° C (Stella et al., 2012). Per l'analisi dei campioni scongelati sono stati mescolati con un volume uguale di fase mobile HPLC e centrifugati per 5 minuti a 13.000 rpm (IEC Micro CL 17, Thermo Electron Corporation, Germania) e 20 μ L di campione sono stati sottoposti ad analisi HPLC. L'analisi della concentrazione di AD nel tessuto corneale è stata effettuata 30 minuti dopo l'instillazione delle formulazioni. Gli animali sono stati sacrificati mediante somministrazione endovenosa di una dose eccessiva di soluzione di sodio pentobarbital (sodium® Pentothal, Gellini Farmaceutici, Italia) nella vena marginale dell'orecchio, gli occhi sono stati enucleati e risciacquati con soluzione salina normale. Poi le cornee sono state immediatamente congelate e conservate a -20 ° C. Per l'analisi, le cornee pre-ponderate sono state trasferite in un tubo di vetro, addizionate con 1,0 mL di etanolo e in agitazione per 5 minuti per favorire l'estrazione di DA. Poi, i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 13.000 rpm (IEC Micro CL 17, Thermo Electron Corporation, Germany). Le soluzioni alcoliche concentrate sono state messe sotto vuoto fino a completa essiccazione a 30 ° C e poi 30 μ L di etanolo sono stati aggiunti a campioni secchi per effettuare analisi HPLC.

SAGGIO DI RIDUZIONE DEL NUMERO DI CELLULE IMMUNOFLUORESCENTI

Poiché l'isolato virale può indurre effetto citopatico anche dopo 7 gg dall'infezione durante i quali le cellule potrebbero morire per mancanza di nutrienti ed alcune potrebbero fondersi inficiando la conta finale si è deciso di eseguire una quantificazione del virus mediante IFA e di allestire un saggio di riduzione di immunofluorescenza per saggiare la sensibilità dei ceppi A1 e C3 alla DISTAMICINA (lotto N°120/02 P.M.517.961, fornita da LEXIPHARM) (DA) e DISTAMICINA LIPOSOMIALE (lotto N°120/02 P.M.517.961 pH7.4, fornita da LEXIPHARM) (DA LIPO). Il saggio di riduzione di immunofluorescenza consiste nel trattare i tappeti cellulari con una quantità fissa di isolato virale che produce una quantità nota di cellule positive, precedentemente determinata mediante titolazione, e quantità scalari di farmaco e valutare la riduzione del numero di cellule positive dopo 48 h. Il farmaco da testare viene miscelato nella soluzione di agarosio a bassa temperatura di fusione, terreno (MEM in Earle's salts) e 5% di FBS socomplementato che viene utilizzata per ricoprire le cellule dopo l'infezione. Per l'infezione sono state utilizzate particelle virali infettanti ottenute da colture cellulari BC3 e BCBL1 come descritto precedentemente titolate mediante Real

Time e plaque reduction assay (PRA50) e ne sono state utilizzate 200,000 e la concentrazione inibente al 50% è stat calcolata con il sotware Graphpad Prism 2.0 software (GraphPad Software, USA).

RISULTATI

L'analisi filogenetica della sequenza nucleotidica della regione ha confermato che linee cellulari BC3 e BCBL1 utilizzate per analizzare il tropismo dei ceppi A e C sono risultate realmente infette rispettivamente con i sottotipi virali C3 e A1 di HHV8.

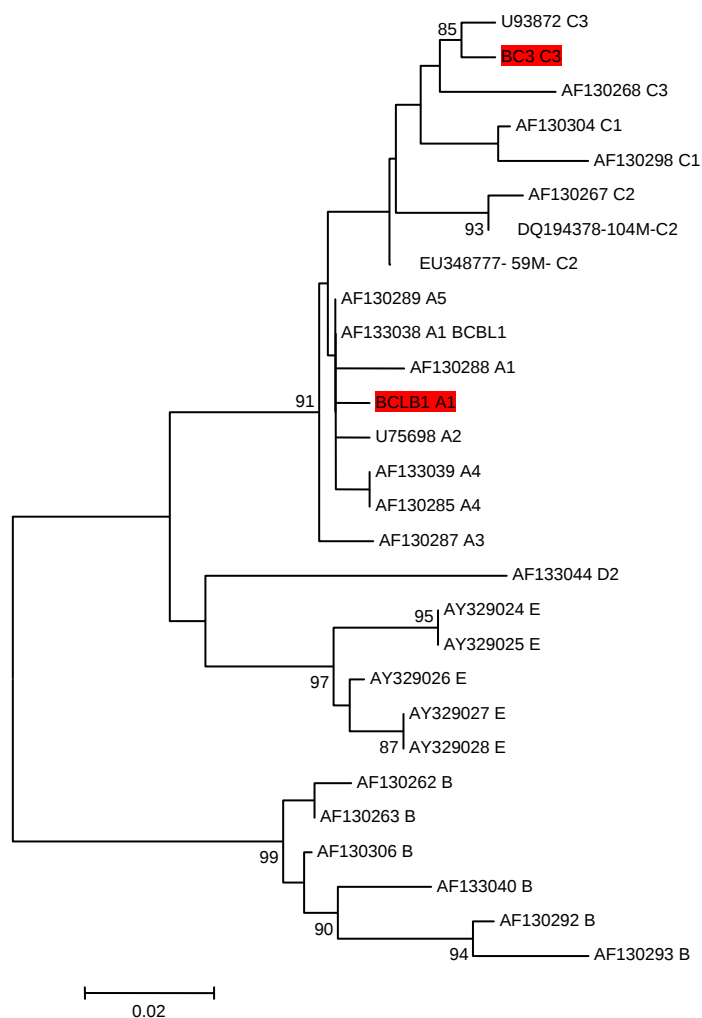


Figura n. 1 Albero filogenetico della sequenza nucleotidica della regione VR2, le scritte evidenziate in rosso rappresentano gli isolati della colture BC3 e BCBL1.

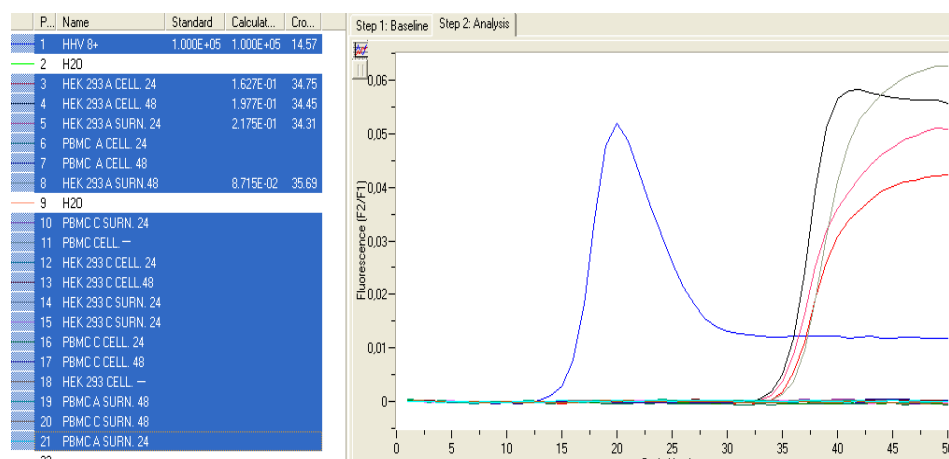


Figura n. 2: Cinetica di amplificazione delle colture HEK293 e PBMC infettate con i sottotipi A1 e C3 a 24 e 48 ore dall'infezione.

Come evidenziato dai dati riportati nella tabella sottostante, l'analisi molecolare della carica virale mediante real-time PCR, Light cycler, Roche ha rilevato una carica maggiore di 10^3 solo nelle cellule e nel surnatante delle colture di HEK293 e RCE, epiteliali, infettate con il ceppo A1. Tutte le linee utilizzate per l'infezione in vitro erano HHV8 negative. Inoltre l'indagine dell'espressione antigenica virale nelle due linee cellulari eseguita dopo 24 e 48 ore dall'infezione ha rilevato che la linea di origine epiteliale infettata con il sottotipo A1 presenta un'espressione di gran lunga maggiore ad entrambe i tempi analizzati (Tabella 1).

HHV-8 subtype		HEK293			PBMC			RCE		
		T0	T1 (24 h)	T2 (48 h)	T0	T1 (24 h)	T2 (48 h)	T0	T1 (24 h)	T2 (48 h)
A1	Viral Load in Cells (copies/mg)	0	$7.9 \cdot 10^4$	$4.2 \cdot 10^5$	0	$1.0 \cdot 10^2$	$9.0 \cdot 10^2$	0	$6.4 \cdot 10^4$	$3.7 \cdot 10^5$
	Viral Load in supernatant (copies/ml)	0	$1.6 \cdot 10^3$	$8.1 \cdot 10^4$	0	<10	<10	0	$3 \cdot 10^3$	$9.1 \cdot 10^5$
	IFA	-	++	++++	-	-/+	+	-	+++	++++
C3	Viral Load in Cells (copies/mg)	0	<10	$7.0 \cdot 10^2$	0	<10	$7.0 \cdot 10^2$	0	<10	$7.0 \cdot 10^2$
	Viral Load in supernatant (copies/ml)	0	<10	$1.3 \cdot 10^2$	0	<10	$5.0 \cdot 10^2$	0	<10	$2.4 \cdot 10^2$
	IFA	-	-	-	-	-	-	-	-	-

RISULTATI ESPERIMENTI MICROARRAY

Con la metodica Micorarray Dualchip, Eppendorf sono stati analizzati un totale di 297 geni implicati in 65 pathway dell'infiammazione, di cui 14 sono stati risulati significativamente modulati.

Pathway	Tot Geni	PBMCA	PBMCC	HEK293 A	HEK293 C
B cell receptor signaling pathway	6	2	3	4	2
T cell receptor signaling pathway	20	4	6	10	10
Inflammatory response	12	6	5	6	4
Immune response	11	5	4	3	6
Cell cycle	8	2	2	6	1
Calcium signaling pathway	8	1	1	7	4
Toll-like receptor signaling pathway	22	10	11	11	12
MAPK signaling pathway	53	20	17	34	18
Jak-STAT signaling pathway	42	16	16	23	27
Cytokine-cytokine receptor interaction	94	40	34	55	54
Apoptosis	24	8	13	12	9
Cell adhesion molecules (CAMs)	19	5	5	6	7
Natural killer cell mediated cytotoxicity	19	7	8	6	10
Regulation of actin cytoskeleton	22	7	7	17	8

Tabella n. 2: In tabella sono riportati i 14 Pathway analizzati, il numero totale di geni analizzati per ciascun pathway, il numero di geni modulati nei PBMC infettati con il ceppo A, nei PBMC infettati con il ceppo C, nelle HEK293 infettati con il ceppo A e nelle HEK293 infettati con il ceppo C.

L'analisi è stata condotta mediante il software Silverquant Analysis (Eppendorf) che prevede la linearizzazione e la normalizzazione del valore di assorbanza rilevato dallo scanner (Eppendorf) a livello di ciascuno spot e il calcolo del rapporto tra il valore campione/controllo.

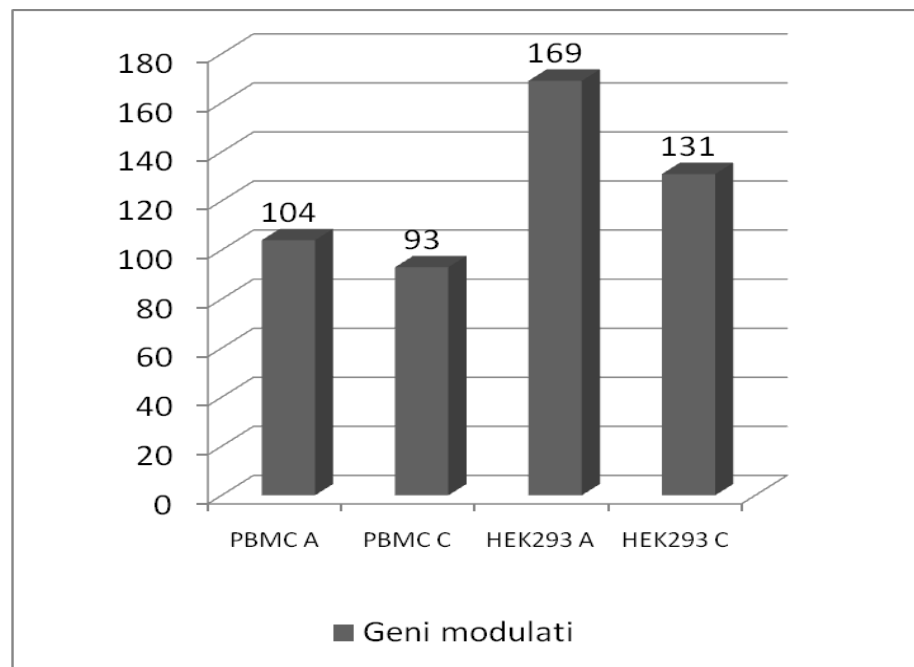


Figura n. 3: Rappresentazione dei geni modulati nelle linee PBMC ed HEK293 infettate con i ceppi A e C di HHV8.

I dati ottenuti mostrano che nella linea cellulare PBMC infettata con il ceppo A, sono modulati in modo statisticamente significativo un totale di 104 geni di cui (2 coinvolti nel pathway della “via di segnalazione recettoriale delle cellule B”, 4 nel pathway della “via di segnalazione recettoriale delle cellule T”, 6 nel pathway della “risposta infiammatoria”, 5 nel pathway della “risposta immune”, 2 nel pathway del “ciclo cellulare”, 1 nel pathway della “segnalazione del calcio”, 10 nel pathway della “via di segnalazione dei recettori del Toll-like”, 20 nel pathway dei “segnalazione delle MAPK”, 16 nel pathway di “segnalazione Jak-STAT”, 40 nel pathway dell’ “Interazione recettore citochine-citochine”, 8 nel pathway dell’ “apoptosi”, 5 nel pathway delle “molecole di adesione cellulare (CAMs)”, 7 nel pathway della “citotossicità mediata da Natural Killer”, 7 nel pathway di “regolazione dell’ actina citoscheletrica”). Nella linea cellulare PBMC infettata con il ceppo C, sono modulati in modo statisticamente significativo un totale di 93 geni di cui (3 coinvolti nel pathway del “via di segnalazione recettori delle cellule B”, 6 nel pathway della “via di segnalazione dei recettori delle cellule T”, 5 nel pathway della “risposta infiammatoria”, 4 nel pathway della “risposta immune”, 2 nel pathway del “ciclo cellulare”, 1 nel pathway della “segnalazione del calcio”, 11 nel pathway del “via di segnalazione dei recettori Toll-like”, 17 nel pathway di “segnalazione MAPK”, 16 nel pathway di “segnalazione Jak-STAT”, 34 nel pathway dell’ “Interazione dei recettore citochine-citochine”, 13 nel pathway del “apoptosi”, 5 nel pathway delle “molecole adesione cellulare (CAMs)”, 8 nel pathway della “citotossicità mediato da cellule Natural Killer”, 7 nel pathway della “regolazione del actina citoscheletrica”).

Nella linea cellulare HEK293 infettata con il ceppo A, sono modulati in modo statisticamente significativo un totale di 169 geni di cui (4 coinvolti nel pathway della “via di segnalazione dei recettori delle cellule B”, 10 nel pathway della “via di segnalazione dei recettori delle cellule T”, 6 nel pathway della “risposta infiammatoria”, 3 nel pathway della “risposta immune”, 6 nel pathway del “ciclo cellulare”, 7 nel pathway della “segnalazione del calcio”, 11 nel pathway della “via di segnalazione dei recettori Toll-like”, 34 nel pathway di “segnalazione MAPK”, 23 nel pathway di “segnalazione Jak-STAT”, 55 nel pathway dell’ “interazione recettore citochine-citochine”, 12 nel pathway dell’ “apoptosi”, 6 nel pathway delle “molecole di adesione cellulare (CAMs)”, 6 nel pathway della “citotossicità mediato da cellule Natural Killer”, 17 nel pathway della “regolazione dell’ actina citoscheletrica”). Nella linea cellulare HEK293 infettata con il ceppo C, sono modulati in modo statisticamente significativo un totale di 131 geni di cui (2 coinvolti nel pathway della “via di segnalazione dei recettori delle cellule B”, 10 nel pathway della “via di segnalazione dei recettori delle cellule T”, 4 nel pathway della “risposta infiammatoria”, 6 nel pathway della “risposta immune”, 1 nel pathway del “ciclo cellulare”, 4 nel pathway della “segnalazione del calcio”, 12 nel pathway della “via di segnalazione dei recettori Toll-like”, 18 nel pathway di “segnalazione MAPK”, 27 nel pathway di “segnalazione Jak-STAT”, 54 nel pathway di “Interazione recettore citochine-citochine”, 9 nel pathway dell’ “apoptosi”, 7 nel pathway delle “molecole adesione cellulare (CAMs)”, 10 nel pathway della “citotossicità mediata da cellule Natural Killer”, 8 nel pathway della “regolazione del actina citoscheletrica”). Analizzando il totale dei geni modulati nelle due linee cellulari prese in esame infettate con entrambe i ceppi, emergono 11 geni sono risultati comunemente modulati.

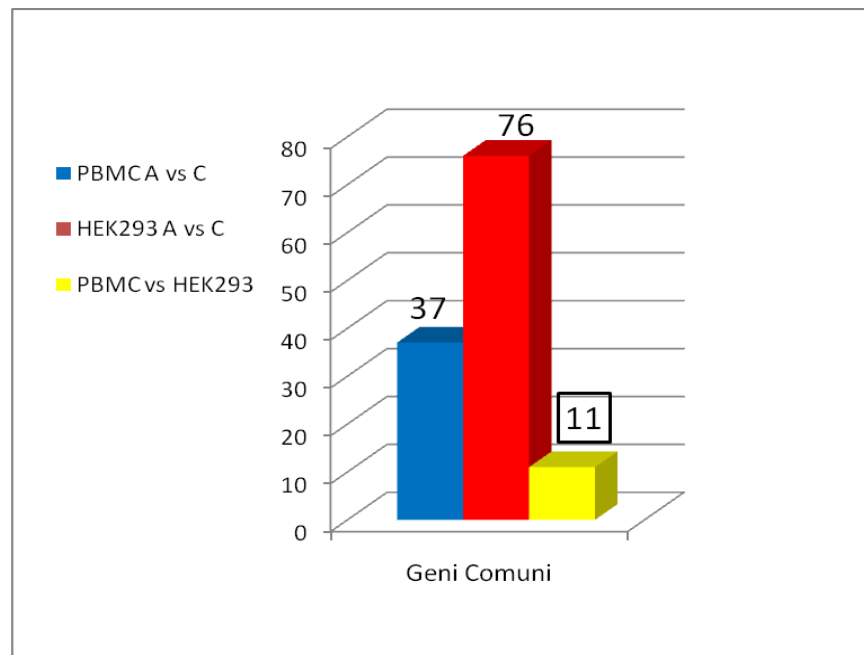


Figura n. 6: Rappresentazione grafica di geni comunemente modulati. In blu geni comuni nei PBMC infettati con i ceppi A e C. In Rosso geni modulati comuni nelle HEK293 infettate con i ceppi A e C. In giallo geni comunemente modulati nei PBMC e nelle HEK293 infettate con entrambe i ceppi. Gli 11 geni modulati in entrambe le linee infettate con i ceppi A1 e C3 di HHV8 sono: gene C5 "Complement component 5" coinvolto nel "pathway del complemento e cascata della coagulazione"; CCL1 "Chemokine (C-C motif) ligand 1" coinvolto nel "pathway di interazione recettore citochine-citochine"; IL15 "Interleukin 15" coinvolto nel "pathway di interazione recettore citochine-citochine", "pathway della segnalazione Jak-STAT"; IL3 "Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)" coinvolto nel "pathway dell'interazione recettore citochine-citochine", "Apoptosi", "pathway della segnalazione Jak-STAT", nella "linea delle cellule ematopoietiche", nel "pathway Fc epsilon RI signaling"; IL7 "Interleukin 7" coinvolto nel "pathway interazione recettore citochine-citochine", "pathway della segnalazione Jak-STAT", coinvolto nel lineage delle cellule ematopoietiche; IRF2 "Interferon regulatory factor 2" appartenente alla famiglia dei Transcription factor activity; NFATC1 "Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1" coinvolto nel "pathway della segnalazione di Wnt", "axon guidance", "citotossicità mediata da cellule Natural killer", "pathway della via di segnalazione dei recettori delle cellule T" e nel "pathway della via di segnalazione dei recettori delle cellule B"; STAT1 "Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa" coinvolto nel "pathway dei recettori Toll-like" e "pathway della segnalazione Jak-STAT"; TGFBI "Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa" coinvolto nel "pathway del adesione cellulare"; TLR4 "Toll-like receptor 4" coinvolto nel "pathway della via di segnalazione dei recettori Toll-like"; TNFSF11 "Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11" coinvolto nel "pathway dell'interazione dei recettore citochine-citochine".

C5 Complement component 5	NM_001735.2	Complement and coagulation cascades
CCL1 Chemokine (C-C motif) ligand 1	NM_002981.1	Cytokine-cytokine receptor interaction
IL15 Interleukin 15	NM_000585.1	Cytokine-cytokine receptor interaction / Jak-STAT signaling pathway
IL3 Interleukin 3 (colony-stimulating factor, multiple)	M20137.1	Cytokine-cytokine receptor interaction / Apoptosis / Jak-STAT signaling pathway / Hematopoietic cell lineage / Fc epsilon RI signaling pathway
IL7 Interleukin 7	NM_000880.2	Cytokine-cytokine receptor interaction / Jak-STAT signaling pathway / Hematopoietic cell lineage
IRF2 Interferon regulatory factor 2	NM_002199.2	Transcription factor activity
NFATC1 Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	U80917.1	Wnt signaling pathway / Axon guidance / Natural killer cell mediated cytotoxicity / T cell receptor signaling pathway / B cell receptor signaling pathway
STAT1 Signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	NM_007315.2	Toll-like receptor signaling pathway / Jak-STAT signaling pathway
TGFBI Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	NM_000358.1	Cell adhesion
TLR4 Toll-like receptor 4	U88880.1	Toll-like receptor signaling pathway
TNFSF11 Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	NM_003701.2	Cytokine-cytokine receptor interaction

Tabella n. 3: 11 geni comunemente modulati nei PBMC e nelle HEK293 infettate con i ceppi A1 e C3, pathway coinvolto e numero di accesso in banca dati (Eppendorf DualChip® Human Inflammatory).

Ripetendo l'analisi statistica fissando come significativa una variazione di espressione genica superiore a 2 i risultati hanno rilevato un significativo aumento nell'espressione dei geni coinvolti nel processo infiammatorio (vale a dire, AGT, CCR8, CXCR4, IL-6, IL-9, IL10RA, IL-17, IL-23A), trasduzione del segnale (ad esempio, FGF5, FGF7, MAP3K1, MAPK9m TGFBR1, TRAF2), ciclo cellulare (IGFBP1), risposta immunitaria (vale a dire, IL-16, TLR4), apoptosi (TNFSF4, TNFSF11), e altri geni appartenenti a diverse categorie (ad esempio, BMP4, BMPR2, EPHA3, HGFBP1, RUNX1, RUNX2, SP1).

Fissando una soglia di modulazione genica > 2 volte, un elevato numero di geni sono risultati significativamente modulati sia in cellule HEK293 che nei PBMC infettate sia con il sottotipo A1 (169 e 104 geni, rispettivamente) e il sottotipo C3 (131 e 93 geni, rispettivamente). Per aumentare la significatività, la soglia di modulazione significativa è stata alzata a > 4 volte della espressione basale. Un totale di 24 geni risultata fortemente indotta soprattutto da infezione con HHV8 sottotipo A1. Il confronto tra i profili di espressione nelle linee infettate con i due sottotipi ha evidenziato che solo 4 geni sono fortemente modulati comunemente dai differenti sottotipi virali (cioè, BMP4, BMPR2, Runx2 e TNFSF11).

	PBMCs	HEK293	Total
HHV-8 A1 subtype	11 [†]	13	24
HHV-8 C3 subtype	2 [†]	2	4
Total	13	15	28

[†]Two genes were induced by HHV-8 A1 and C3 subtypes in PBMCs.
HHV-8: Human herpesvirus 8; PBMC: Peripheral blood mononuclear cell.

Tabella n.3 Geni comunemente modulati con cut off fissato a >4

La quantità di DA incapsulata nei liposomi è stata determinata mediante HPLC dopo lisi dei liposomi con etanolo assoluto. L'efficienza di incapsulamento calcolata sulla dispersione liposomiale unimodale finale era 34.53% (E%) e la produzione di una dispersione liposomiale acquosa contenente $1,38 \pm 0,260$ mg / ml di DA. L'analisi delle proprietà di rilascio del farmaco della formulazione liposomiale utilizzando la membrana di dialisi hanno dimostrato una rapida diffusione di DA dalla soluzione di riferimento (DA-sol) mentre un rilascio più controllato è stato ottenuto da Lipo-DA.

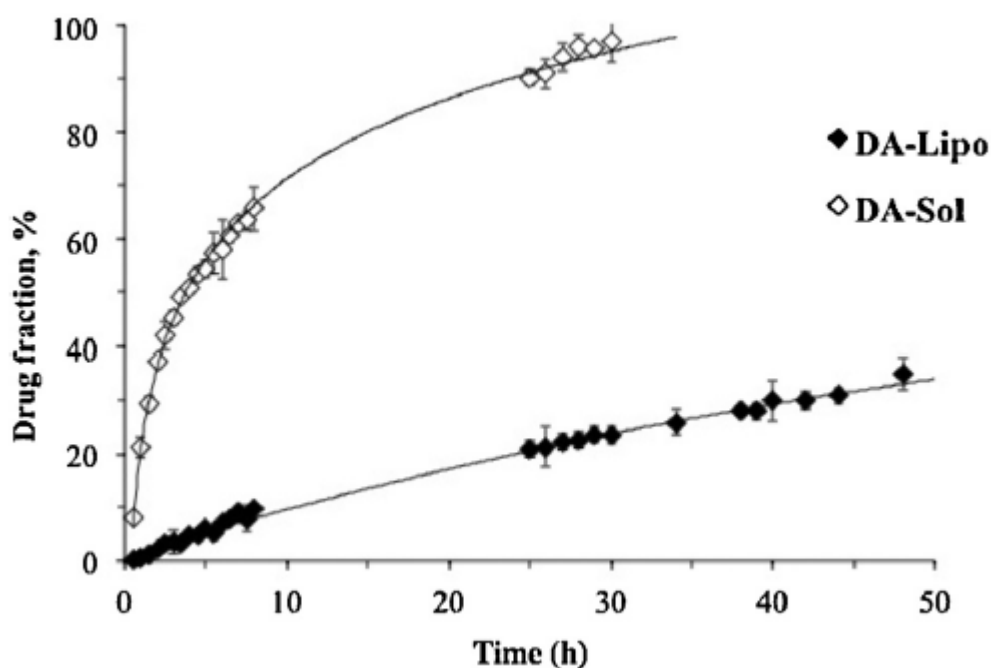


Fig. n. 4 Frazione di rilascio della DA e DA-lipo

I test di citotossicità su RCE, HEK 293 e cellule PBMC effettuate sulla soluzione di riferimento DA (DA-Sol) ha mostrato chiaramente una tossicità trascurabile della soluzione acquosa di DA a tutte le concentrazioni testate. Infatti, la vitalità cellulare rimane superiore al 50% fino a una concentrazione di DA corrispondente al 0,01% w / w mentre l'effetto tossico scompare completamente per la formulazione liposomiale. Dopo il trattamento di RCE, HEK 293 e PBMC linee cellulari con DA liposomiale la vitalità cellulare si mantiene oltre il 90% a prescindere dalla concentrazione testata. Questi risultati confermano la mancanza di citotossicità della formulazione liposomiale e quindi consentono di stabilire la maggiore concentrazione di DA da utilizzare nei test biologici.

La permeazione della DA attraverso è stata valutata su membrane epiteliali corneali ricostituite ottenute da cellule RCE seminate su membrane Snapwell®. Il profilo farmacocinetico epiteliale di farmaci per uso topico è influenzato da molti fattori e l'instillazione di formulazioni potenzialmente irritanti potrebbe ridurre l'assorbimento intraoculare dei farmaci. Per questi motivi diventa evidente per stabilire la biocompatibilità della formulazione scelta individuare la concentrazione del farmaco in grado di evitare effetti tossici. I risultati in test di citotossicità eseguiti su RCE note per la loro sensibilità verso agenti irritanti e

ampiamente utilizzati per la valutazione di adiuvanti oftalmici, confermano la buona biocompatibilità di soluzioni di DA e la mancanza di effetti tossici per la DA incapsulata nei liposomi.

Gli studi cinetici hanno rilevato un aumento della concentrazione subito dopo l'istillazione e un decremento dopo 30 min a 2.59 e 0.87 mg/mL per DA-Lipo e DA-Sol rispettivamente. Inoltre la concentrazione della formulazione liposomiale a 3-5 e 10 minuti dall'istillazione è risultata significativamente maggiore rispetto alla forma libera ($p < 0.05$). Tutti i dati hanno inoltre rilevato una velocità di eliminazione minore della forma liposomiale, comportamento confermato emivita della DA nel liquido lacrimale (1.82 e 2.75 min per DA-Sol e DA-Lipo, rispettivamente). I valori di AUC sono indicativi della maggiore biodisponibilità nel fluido lacrimale della formulazione liposomiale (circa 1,73 volte) rispetto alla forma libera. L'analisi della concentrazione di DA nell'umor acqueo a 15-30 e 60 minuti dall'istillazione di entrambe le formulazioni hanno rilevato l'assenza del farmaco (valori LOQ e LOD di analitica metodo 21,2 ng / mL e 9,23 ng / mL, rispettivamente). Al contrario, una notevole quantità di DA corrispondente a 1.579 0,087 e 2.028 0,063 ng / mg sono stati rilevati nei tessuti corneali 30 minuti dopo la somministrazione di DA-Sol e DA-Lipo formulazioni, rispettivamente ($p < 0.05$). L'analisi HPLC del contenuto DA nei campioni nell'umore acqueo effettuati a 15, 30, 60 minuti dopo l'istillazione di entrambe le formulazioni consentiti per assicurare l'assenza di tracce di farmaco in questo fluido oculare .

Formulations	C_{1min} (mg/mL $\pm$ S.E.)	K_{tr} ($10^2 \text{ min}^{-1} \pm$ S.E)	$t_{1/2}$ (min)	AUC (min mg mL ⁻¹ $\pm$ S.E.)
DA-Sol	0.321 $\pm$ 0.038	38.16 $\pm$ 0.022	1.82	1.04 $\pm$ 0.72
DA-Lipo	0.364 $\pm$ 0.018	25.23 $\pm$ 0.016	2.75	1.80 $\pm$ 0.58

Tabella n. 5 Farmacocinetica nei fluidi oculari

L'attività antivirale della DALipo della Da formulazione libera (0.0772-772 mM) , sulle cellule HEK 293 e le cellule PBMC e RCE infettate con 200.000 particelle di HHV8 HHV8 a 24 e 48 ore dopo l'infezione ha evidenziato IC50 ottenute con il software GraphPad Prism 2.0 (GraphPad Software, USA) in tre replica sperimentale riportate nella tabella 4 e 5 e nei grafici prism sottostanti. E' stato possibile calcolare IC50 della DA contro HHV8 A1 e C3 solo nelle cellule HEK293 e RCE, perché è risultata inefficace contro lo stesso sottotipo HHV8 infettante i PBMC. La DA IC50 contro il ceppo A1 di HHV8 nelle cellule HEK293 e RCE è stat 0,01,343 ug / ml e 0,06,257 ug / ml e la DA IC50 contro il ceppo HHV8 C3 nelle cellule HEK293 e RCE è stata 0,127 ug / ml e 0,1187 ug / ml, rispettivamente. Le IC50 della formulazione DALipo contro HHV8 A1 nelle cellule HEK293 e RCE è stata 0,08,096 ug / ml e 0,009,351 ug / ml e contro HHV8 C3 era 0,1132 ug / ml e 0.1567 ug / ml nelle HEK293 e nelle cellule RCE. È interessante notare che DALipo ha esplicato la sua attività antivirale anche nelle cellule PBMC infettate con sottotipi A1 e C3 e la IC50 era 2.575 e 3.107 ug / ml I risultati sono riassunti nella tabella che segue e nelle rappresentazioni grafiche.

DA HHV8 A1 HEK293	DA HHV8 A1 RCE	DA HHV8 A1 PMC
<u>0.01343 µg/ml</u>	<u>0.06257 µg/ml</u>	NC
DA HHV8 C3 HEK293	DA HHV8 C3 RCE	DA HHV8 PMC
<u>0.1027 µg/ml</u>	<u>0.1187 µg/ml</u>	NC

Tabella 6 Attività antivirale della DA

Figura n. 5 HHV8 DA HEK293 IC50 0.01343 µg/ml

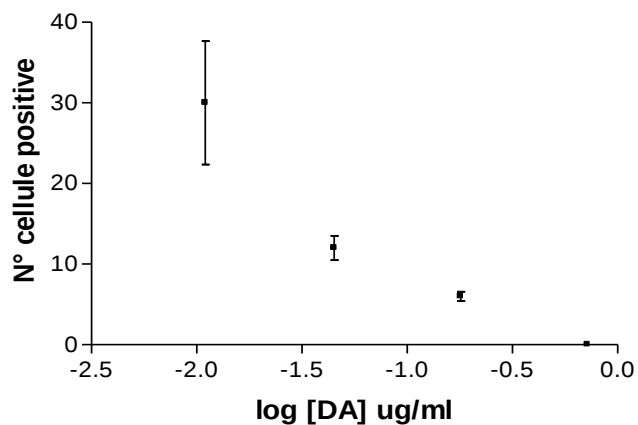


Figura n. 6 HHV8 A1 DA RCE IC50 0.06257 µg/ml

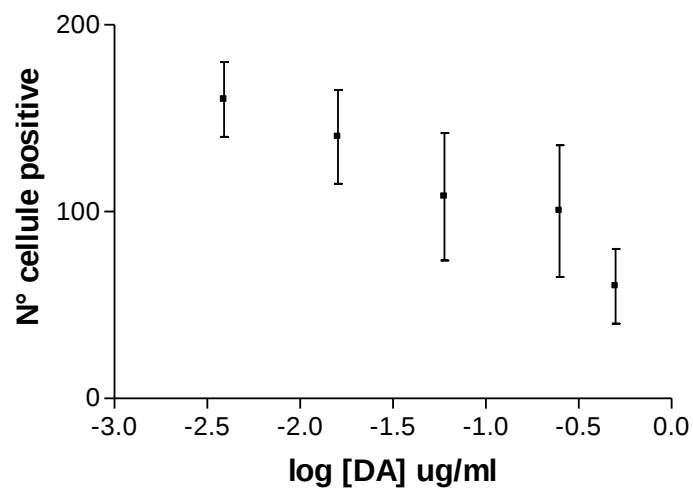


Figura n. 7 HHV8 A1 DA PBMC IC50 NON CALCOLABILE

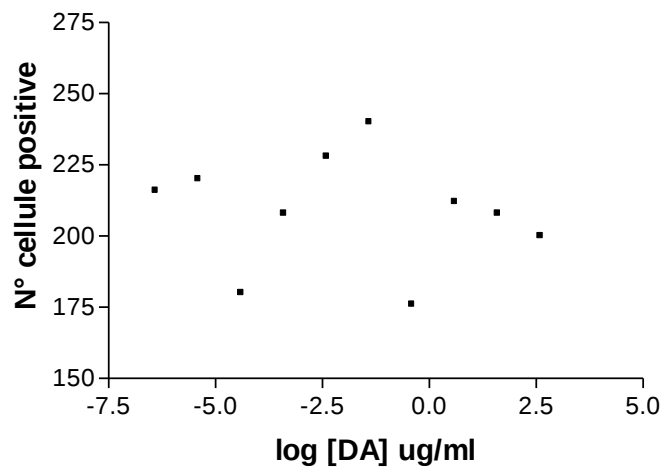


Figura n. 8 HHV8 C3 DA HEK293 IC50 0.1027 $\mu\text{g/ml}$

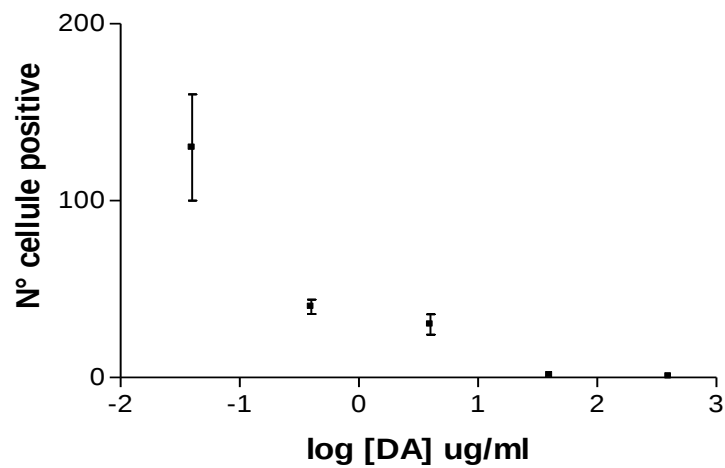


Figura n. 9 HHV8 C3 DA IC50 0.1187 $\mu\text{g/ml}$

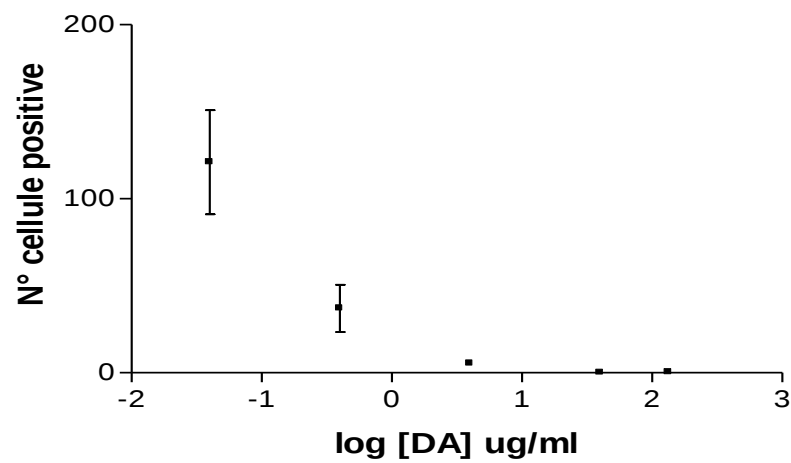
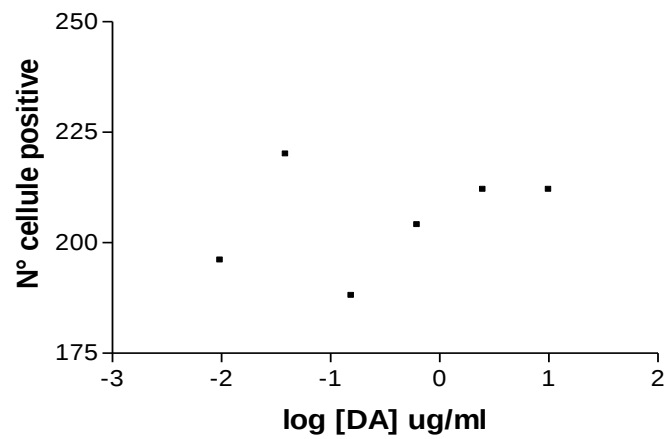


Figura n. 10 HHV8 C3 DA PBMC IC50 NON CALCOLABILE



DA Li HHV8 A1 HEK293	DALi HHV8 A1 RCE	DALi HHV8 A1 PMC
<u>0.08096 µg/ml</u>	<u>0.09351 µg/ml</u>	<u>2.575 µg/ml</u>
DA HHV8 C3 HEK293	DA HHV8 C3 RCE	DA HHV8 PMC
<u>0.1132 µg/ml</u>	<u>0.1567 µg/ml</u>	<u>3.107 µg/ml</u>

Tabella n.7 Attività antivirale della DALipo

Figura n. 11 HHV8 A1 DALIPO HEK293 IC50 0.08096 µg/ml

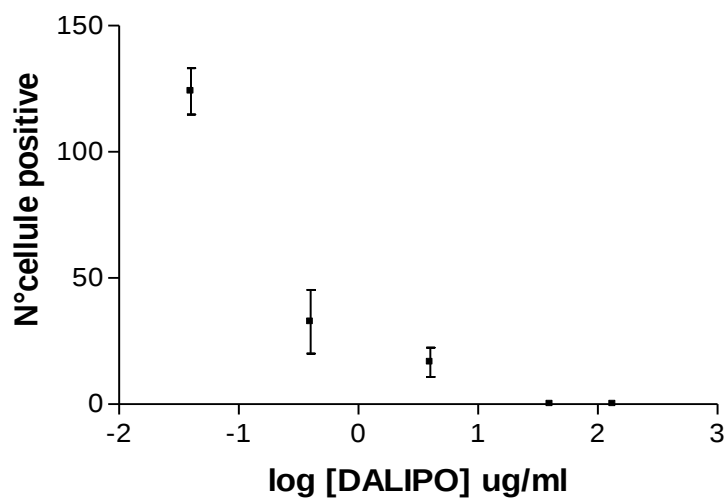


Figura n. 12 HHV8 A1 DALIPO RCE IC50 0.09351 µg/ml

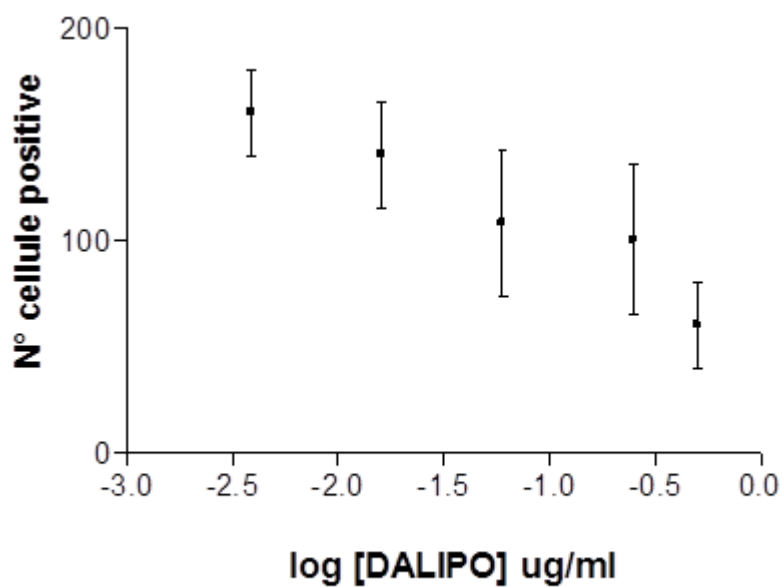


Figura n. 13 HHV8 A1 DALIPO PBMC IC50 2.575 $\mu\text{g/ml}$

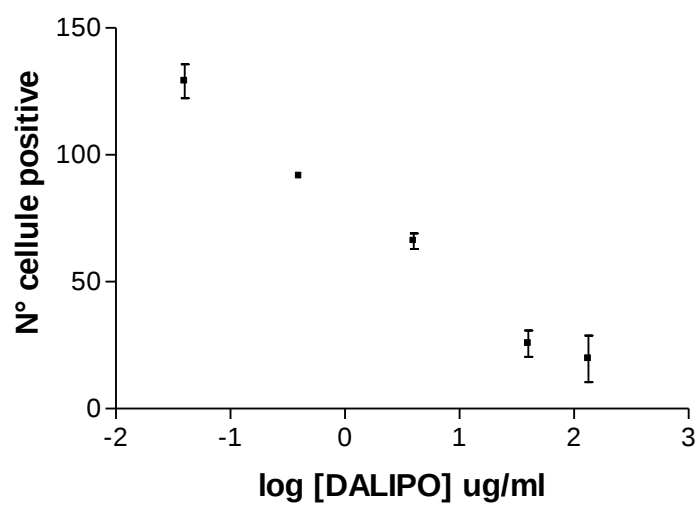


Figura n. 14 HHV8 A1 DALIPO RCE CELLS IC50 0.1132 $\mu\text{g/ml}$

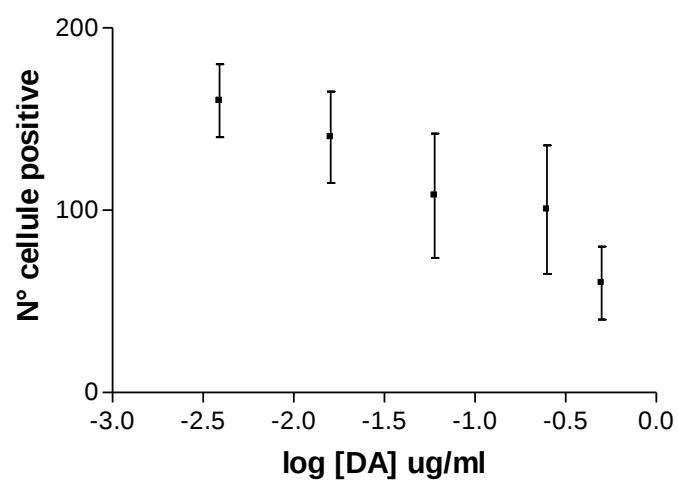


Figura n. 15 HHV8 C3 DALIPO RCE IC50 0.1567 $\mu\text{g/ml}$

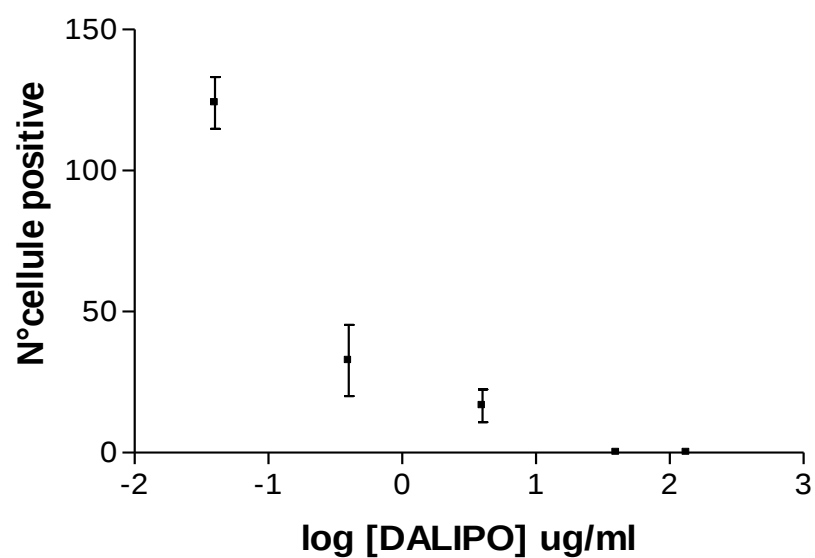
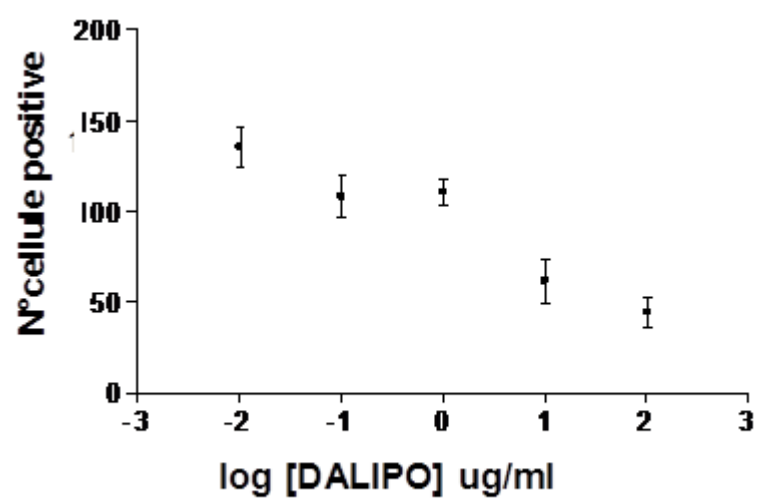


Figura n. 16 HHV8 C3 DALIPO PBMC IC50 3,107 μ g/ml



In base all'analisi della sequenza dell'ORFK1 gli isolati di HHV8 sono classificabili in 5 maggiori tipi: A, B, C, D ed E (Zong J.C. et al., 1999) mentre l'analisi filogenetica della sequenza amminoacidica permette la descrizione di 13 varianti virali denominate da A1 ad A5, da C1 a C5 e D1 e D2 (Zong J.C. et al., 1999). Ad oggi i ceppi virali sono associati solo ad una diversa distribuzione geografica: ceppi A e C più diffusi in Europa, USA, Medio Oriente e Asia, ceppo B nell' Africa sub-Sahariana, ceppo D principalmente in individui provenienti dalle isole del Pacifico e dall'Australia, ceppo E in Sud-Americani (Zong J.C. et al., 1999; Biggar R.J. et al., 2000). HHV8 è stato isolato da colture cellulari derivate da PEL ed è noto che il virus rimane latente nelle colture cellulari derivate da linfomi cavitari (BL) come le BC3 e BCBL1 (Renne et al., 1996). L'analisi filogenetica della sequenza nucleotidica della regione ORFK1 ha confermato che le linee cellulari BC3 e BCBL1 utilizzate per produrre le particelle virali utilizzate per l'analisi del tropismo dei ceppi A e C sono risultate realmente infette rispettivamente con i sottotipi virali C3 e A1 di HHV8. L'azione patogenetica di HHV8 si svolge principalmente durante il ciclo latente, ma anche durante le riattivazioni a cui il virus può andare incontro in seguito a diminuzione delle difese immunitarie dell'ospite a causa di trattamento con chemioterapici, trapianto d'organo o senilità (Chen et al., 2001, Cattani et al., 2003). Ad oggi esistono poche informazioni relative ai siti di replicazione durante l'infezione primaria e le riattivazioni. E' stato dimostrato in bambini immunocompetenti che le prime manifestazioni cliniche dovute all'infezione sono associate a presenza del genoma di HHV8 nella saliva e concomitante viremia (Andreoni M. et al., 2002), inoltre il genoma virale è stato rilevato nel 10% dei sieri prelevati da omosessuali maschi infetti sia prima che dopo la sieroconversione (Goudsmit J. et al., 2000). E' stata riscontrata la presenza del virus anche nelle cellule mononucleate del sangue di soggetti omosessuali HIV negativi dimostrando la replicazione virale nei tessuti linfoidei durante l'infezione primaria (Wang Q.G. et al., 2001). Un recente studio, Matteoli et al., 2008, condotto su campioni di sangue e saliva appartenenti a 30 pazienti affetti da KS classico tutti residenti nell'area di Sassari ha rilevato che la carica virale nella saliva e nel sangue non sono correlate, anche se la carica nella saliva risulta significativamente maggiore solo nei pazienti infetti con il ceppo A, inoltre la carica virale nel sangue è paragonabile per i due ceppi. Solo l'andamento degli anticorpi anti-LANA sembra correlare con l'andamento clinico della malattia e l'andamento della carica virale nella saliva è inversamente proporzionale a quella nel sangue e nel siero, inoltre un aumento della replicazione virale nel cavo orale è associata ad un miglioramento delle condizioni cliniche del paziente. La carica virale nella saliva in pazienti affetti dal ceppo A raggiunge picchi con valori maggiori di 10^6 copie/ml, mentre nel sangue il valore massimo rilevato è di 10^3 copie/ml (Matteoli B. et al., 2008). La saliva sembra quindi il fluido dove si riscontra la più alta carica virale nei pazienti infetti con il ceppo A; è quindi possibile che i ceppi A abbiano un più elevato tropismo verso le cellule epiteliali, come quelle che rivestono il cavo orale. Considerando inoltre i dati riportati da uno studio epidemiologico recente che ha rilevato una maggiore progressione della forma classica del KS in pazienti infetti con il sottotipo A (Mancuso R. et al., 2008), la differenza genotipica si potrebbe tradurre in un diverso rapporto virus-ospite

riconducibile anche ad un diverso meccanismo di trasformazione. La maggiore carica virale ed espressione antigenica riscontrata nel surnatante e all'interno delle cellule di origine epiteliale, HEK293, infettate con il sottotipo A1, indicherebbe una maggiore infettività e capacità replicativa di questo sottotipo nel citotipo epiteliale almeno durante la fase acuta dell'infezione. Ad oggi non esistono molte informazioni riguardo l'effetto esercitato dalla infezione di HHV8 durante l'infezione litica o latente nei diversi citotipi competenti che è sicuramente alla base della patogenesi del KS e del tropismo cellulare. Nel genoma di HHV8 sono presenti numerosi omologhi di geni cellulari. Alcuni di questi codificano per proteine che intervengono nella regolazione del ciclo cellulare promuovendo la proliferazione e/o inibendo la morte per apoptosi, altri invece, sono implicati nell'evasione delle difese immunitarie sia innate che adattative dell'ospite (Fields et al., 2007). Insieme, contribuiscono alla patogenesi del KS direttamente o indirettamente favorendo la persistenza del virus nelle lesioni del sarcoma (Boshoff C. et al., 2001; Moore P.S. et al., 2003). Per attuare l'infezione litica numerose proteine virali interferiscono direttamente sia con l'immunità innata che con l'instaurarsi dell'immunità adattativa specifica (Coscoy L., 2007). Diversi studi attribuiscono alla proteina virale vGPCRs il ruolo principale nella eziologia virale a causa della sua capacità di indurre l'espressione non solo di geni coinvolti nella proliferazione cellulare e nel blocco dell'apoptosi ma anche di numerose citochine infiammatorie, di fattori di crescita e di fattori angiogenici critici per lo sviluppo del KS (Sodhi A. et al., 2004). I risultati dello studio dell'espressione genica utilizzando DualChip per geni infiammazione umana condotto sulle linee cellulari HEK293 e PBMC infettate con i ceppi A1 e C3 confermano che esiste una modulazione dell'espressione genica associata all'agente eziologico. Si è infatti osservato che geni implicati nei pathway nell'infiammazione e nell'immunità innata, ma anche nella trasduzione del segnale e nella proliferazione cellulare presentano un cambio di espressione nelle linee cellulari infettate con due sottotipi virali, rispetto alle linee cellulari di controllo non infette. Dai dati ottenuti la linea HEK293 infettata con i diversi sottotipi mostra un più alto numero di geni modulati rispetto alla linea PBMC. Confermando i dati ottenuti con modelli sperimentali di diverso approccio in cui si evidenzia un più alto tropismo di HHV8 per citotipo epiteliale (Matteoli B. et al., 2008). Nella linea epiteliale il sottotipo A1 ha dimostrato di modulare un numero maggiore di geni modulati, rispetto al sottotipo C3, ed in particolare il più alto numero di geni modulati sono coinvolti nel pathway delle MAPK, del ciclo cellulare e nella regolazione dell'actina citoscheletrica. La modulazione del gene dell'actina citoscheletrica potrebbe essere associata alle sequenze presenti nel genoma virale codificanti per proteine cellulari, come la β -actina e potrebbe essere dovuto al coinvolgimento del citoscheletro nel trasporto intracellulare dei capsidi virali, nell'assemblaggio e nella fuoriuscita dei virioni maturi, indispensabile durante il ciclo litico (Zhu F.X. et al., 2005). Tra i geni che sono risultati differentemente modulati nelle due linee si trova il gene IL-6, in grado di stimolare la proliferazione cellulare (Osborne J., 1999). Risultano inoltre differentemente modulati i geni JAK1, STAT1/3, STAT5, che si trovano sotto il controllo del gene IL6 e i cui prodotti determinano tra l'altro per esempio la neoangiogenesi (Osborne J., 1999; Nicholas J., 1997). I geni IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8, VEGF, bFGF, MCP-1 che sono risultati differentemente modulati sono bersaglio della proteina virale codificata dall'ORF 74 (vGPCR), una

proteina transmembrana omologa del recettore umano dell' IL-8. Le cellule che esprimono vGPCR secernono elevate quantità di fattori di crescita e citochine sia autocrine con possibilità quindi di indurre la neoangiogenesi mediante un meccanismo paracrina (Bais C., 1998). 11 geni sono risultati comunemente modulati in entrambe le linee cellulari infette con i due sottotipi virali: C5, CCL1, IL15, IL3, IL7, IRF2, NFATC1, STAT1, TGFBI, TLR4 e TNFSF11 che sono implicati nell'interazione virus-cellula e potrebbero essere coinvolti in meccanismi chiave dell'eziologia virale. HHV8 infatti codifica per proteine che deregolano checkpoint dei pathways che disciplinano la proliferazione cellulare, contribuendo potenzialmente come virus oncogeno. Queste proteine virali funzionano come fattori di crescita ligando/recettore, proteine di trasduzione del segnale, mediando la trascrizione di fattori e regolatori del ciclo cellulare (Direkze S. et al., 2000). I geni CCL1, IL15, IL3, IL7, TNFSF11, ad esempio, implicati nei pathway delle interazioni citochine-citochine, che potenzialmente potrebbero essere associati ad una modulazione determinata dalle interazioni virus-cellula. Recentemente è stato individuato una modulazione genica supportata dal gene virale vGPCR, il quale influisce sull'espressione delle citochine, stimolando principali fattori di trascrizione, tra i quali quelli nucleari fattori KB (NF-KB), proteina attivatore-1 (AP-1), e fattore nucleare di attivazione delle cellule T (NFAT), attraverso l'attivazione delle proteine G Rac1. L'inibizione di Rac1 bloccato da vGPCR induce la trascrizione e la secrezione di citochine KS, tra cui l'interleuchina-6 (IL-6), IL-8, e il fattore di crescita associato all'oncogene α (GRO α) (Montaner S. et al., 2009). La modulazione dell'espressione genica di STAT1 riscontrata, potrebbe essere associata a una modulazione indotta da geni virali considerando che il gene Tat di HIV riattiva la replicazione litica KSHV in parte alterando proprio l'espressione genica del pathway JAK/STATs (Zeng Y. et al., 2007). STAT1 è coinvolto della cascata del segnale di vie fondamentali nel pathway infiammatori, interagendo con la cascata del segnale dell'interazione citochina-citochina, INF α / β , INF γ , fattori di crescita e GPCR, contribuendo all'espressione a sua volta di geni cellulari (Chatterjee M. et al., 2002). Da tempo, il gene vIL-6 di HHV8 si è dimostrato implicato nel blocco della segnalazione del INF α , influenzando sulla formazione del complesso STAT1/STAT2/IRF9, inducendo proliferazione cellulare ed immunoevasione dall'attività antivirale dell'interferone α (Chatterjee M. et al., 2002). Il gene TLR4 che è risultato altamente modulato è bersaglio di HHV8, il quale attua un meccanismo di immunoevasione contro TLR4 mediatore della risposta immunitaria. Esperimenti *in vitro*, in cui è stato silenziato TLR4 le cellule si sono dimostrate più sensibili alla infezione con HHV8, mentre l'attivazione di TLR4 protegge le cellule dall' infezione (Lagos D. et al., 2008). L'attivazione di ERK attuata da proteine codificate da HHV8 come vGPCR giocano un ruolo chiave nella downregolazione di TLR4, in cui vIRF di KSHV contribuisce all'effetto inibitorio (Lagos D. et al., 2008). La modulazione di IRF2 e TGFBI riscontrata è confermata dai dati presenti in letteratura che riportano l'identificazione di 4 proteine codificate da HHV8 che interagiscono la risposta antivirale della cellula ospite e che risultano omologhe del fattore regolatorio del interferone (IRF). E' stato dimostrato che almeno tre geni virali vIRFs (vIRF 1, 2, 3) inducono alterazioni alle risposte cellulari legate ai geni IRFs e interferoni (IFNs). Non sono ancora noti invece i cambiamenti funzionali causati da vIRF-4 (Offermann M.K., 2007). La modulazione del gene TGF-beta rilevata potrebbe essere dovuta all'interazione dei geni

vIRFs importanti proteine cellulari con funzione regolatrice, comprese le risposte al fattore di crescita trasformante beta (TGF-beta) e la proteina p53 soppressore tumorale (Offermann M.K., 2007). Risulta inoltre essere alterato nell'espressione il gene C5. Il sistema del complemento è una componente importante per fornire immunità innata per la protezione immediata contro i patogeni senza la necessità di esposizione precedente, così come l'innescò della risposta immunitaria adattativa attraverso opsonizzazione, reclutamento dei leucociti per migliorare la risposta immune umorale. Recenti studi dimostrano l'interazione di proteine di HHV8 con complesso del complemento, dimostrate dalle infezioni fulminanti ricorrenti in individui con carenze dei componenti del complemento, ma anche attraverso molte strategie di evasione scoperte in una vasta gamma di agenti infettivi, compresa l'acquisizione di complemento inibitorio endogeno dell'ospite e dell'espressione dei propri geni omologhi inibitori (Mark L. et al., 2006). I risultati ottenuti sembrano quindi confermare i dati presenti in letteratura che evidenziano da parte di HHV8 l'espressione di un gruppo di geni implicati nei meccanismi di evasione delle risposte immunitarie per il loro effetto anti-infiammatorio ed immunosoppressivo determinato potenzialmente da una forte modulazione genica (Fields et al., 2007). Nonostante il basso numero di isolati testati, la diversa capacità replicativa dei due ceppi nei due citotipi e la modulazione dell'espressione cellulari coinvolti nel processo infiammatorio sembrerebbero indicare che la differenza genotipica si potrebbe tradurre in un diverso rapporto virus-ospite riconducibile anche ad un diverso meccanismo patogenetico. Inoltre il rilevamento di geni comunemente modulati nei due citotipi infettati con entrambe i ceppi analizzati potrebbe porre le basi per la comprensione a livello molecolare di meccanismi patogenetici di HHV8 di interesse per lo sviluppo di vaccini e nuove strategie terapeutiche. Questo studio descrive un quadro completo della modulazione genica cellulare durante la fase litica dell'infezione con il virus HHV8 attiva in due citotipi sensibili HEK 293 e PBMC. Abbiamo scoperto che l'espressione della cellula ospite cambia dopo solo 24 ore dall'infezione, ed è molto diversa dagli studi genici di induzione precedenti che sono stati effettuati in momenti successivi dell'infezione. Infatti, Poole et al. che hanno utilizzato una diversa la linea cellulare JSC1 per produrre il virus utilizzato per infettare cellule endoteliali primarie hanno eseguito gli studi di modulazione genica dopo 3-5 settimane dall'infezione quando ormai le cellule erano state trasformate in "spindle cells" risultavano positive agli antigeni LANA. Dall'analisi eseguita: a) non si rileva sovrapposizione di geni modulati da parte dei sottotipi virali analizzati; b) il profilo trascrizionale indotto dall'infezione nella linea epiteliale e linfoide era strettamente diverso. Questo è probabilmente perché il criterio fissato di un aumento di almeno 4 volte come significativo per la modulazione genica è un filtro di soglia molto stretto. Tuttavia, i geni che emergono da tale confronto sarà di maggior interesse per lo studio del loro ruolo nella biologia unica di HHV-8. Inoltre, la capacità replicativa dei due ceppi nei due tipi di cellule e la modulazione dei geni coinvolti nel processo infiammatorio sembrerebbe indicare che la differenza genotipica potrebbe essere tradotta in un diverso rapporto virus-ospite, imputabile anche a un differente meccanismo patogenetico. Oltre a identificare i geni di risposta host-specifico all'interno di ciascun percorso funzionale che sono già noti per essere importante per HHV-8, i nostri risultati identificano nuovi geni candidati che non sono ancora noti nella biologia di HHV8. Ad esempio, una up-

regolazione di geni coinvolti nel processo infiammatorio (AGT, CCR8, CXCR4, IL-6, IL-9, IL10RA, IL-17, IL-23A), nella trasduzione del segnale (FGF5, FGF7, MAP3K1, MAPK9, TGFBR1, TRAF2), nel ciclo cellulare (IGFBP1), la risposta immunitaria (IL-16, TLR4), nell'apoptosi (TNFSF4, TNFSF11). I ruoli di queste molecole nell'instaurarsi dell'infezione di HHV8 e lo sviluppo del KS rimangono da studiare. I risultati dei saggi farmacologici mostrano una mancanza di citotossicità della DAipo su tutte le linee analizzate. Da notare che i valori di CC50 rilevati nel presente cadono nell'estremo inferiore del range di valori di CC50 per la DA riportati in letteratura. Infatti, i valori CC50 dati disponibili vanno da 35 uM nella linea cellulare Hep-2 a 154 uM nella linea HeLa e 385 uM nelle cellule primarie di rene di coniglio. La DA sembra inibire tutte le DNA polimerasi, il che potrebbe spiegare l'origine della sua attività antivirale. A causa della mancanza di informazioni riguardo la genetica dei sottotipi A1 e C3 derivati dalle linee cellulari latentemente infette, non è possibile capire fino in fondo se l'attività antivirale rilevata sia dovuta a mutazioni geniche specifiche o alla virulenza dei ceppi. Sicuramente sono necessari ulteriori studi per capire il meccanismo antivirale della DA in entrambe le formulazioni contro il virus HHV8. La marcata attività antivirale e la mancanza di tossicità della formulazione liposomiale rilevata nel presente studio indicano la possibilità di utilizzare la DA come un farmaco antierpetico per trattamenti sia sistemici che topici. Potrebbe essere utilizzata da sola o in associazione ad altri agenti antivirali per accorciare i tempi di trattamento e minimizzare gli effetti collaterali. La attività antivirale della formulazione liposomiale anche nella linea PBMC potrebbe essere dovuta all'aumento dell'efficacia di penetrazione grazie all'inclusione nei liposomi. E' proprio la DAipo che ha dimostrato attività antivirale anche nella linea linfoide e bassissima citotossicità potrebbe essere utilizzata anche per trattamenti sistemici.

Dall'analisi dei dati ottenuti nel presente lavoro di tesi è possibile concludere che:

- ✧ il sottotipo virale A1 del virus HHV8 ha un maggiore tropismo per le cellule di origine epiteliale rispetto al sottotipo C3;
- ✧ in seguito all'infezione con i sottotipi A1 e C3 di HHV8, almeno durante il ciclo litico, è evidenziabile una modulazione dei geni cellulari coinvolti nel processo infiammatorio e apoptotico;
- ✧ in seguito all'infezione con i sottotipi A1 e C3 di HHV8, almeno durante il ciclo litico, esistono geni cellulari comunemente modulati nelle linee epitelioidee e linfoidi;
- ✧ la DA in formulazione liposomiale presenta ridottissima citotossicità;
- ✧ la DA ha attività antivirale contro il virus HHV8, già nella fase litica dell'infezione, nelle cellule epitelioidee;
- ✧ la formulazione liposomiale della DA ha attività antivirale contro il virus HHV8 nella fase litica dell'infezione sia nelle cellule epitelioidee che linfoidi;
- ✧ la formulazione liposomiale della DA potrebbe essere utilizzata anche per trattamenti sistemici contro l'infezione da HHV8 e quindi nella prevenzione/cura del KS.

- Abebe M., Ribeiro J.M., Cupp M.S., Cupp E.W. Novel anticoagulant from salivary glands of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) inhibits activity of coagulation factor. *V. J. Med. Entomol.* 1996, 33: 173-176.
- Agarwal, R., Iezhitsa, I., Agarwal, P., Abdul Nasir, N.A., Razali, N., Alyautdin, R., Ismail, N.M., 2014. Liposomes in topical ophthalmic drug delivery: an update. *Drug Deliv.* 12, 1–17.
- Akula S.M., Pramod N.P., Wang F.Z., Chandran B. Integrin $\alpha 3\beta 1$ (CD 49c/29) is a cellular receptor for Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV8) entry into the target cells. *Cell.* 2002, 108: 407-19.
- Albin A., Barillari G., Benelli R. et al. Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type1 Tat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92: 4838-4842.
- Albin A., Barillari G., Benelli R., Gallo R.C., Ensoli B. Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92 (11): 4838-42.
- Albrecht J.C., Nicholas J., Biller D. et al. Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. *J. Virol.* 1992, 66: 5047–58.
- Albrecht J.C., Nicholas J., Biller D. et al. Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. *J. Virol.* 1992, 66: 5047–58.
- Al-Dujaili, L.J., Clerkin, P.P., Clement, C., McFerrin, H.E., Bhattacharjee, P.S., Varnell, E. D., Kaufman, H.E., Hill, J.M., 2011. Ocular herpes simplex virus: how are latency, reactivation, recurrent disease and therapy interrelated? *Future Microbiol.* 6, 877–890.
- Amerio P., Carmenini S., De Mori F., Epifani B., Pollice N. Kaposi's disease in Abruzzo. *G. Ital. Dermatol. Venereol.* 1988, 123: 337-339.
- Andersson L., Heyden G., Krekmanov L. Insect bite associated Kaposi's sarcoma with oral lesions. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 1998, 17: 76-77.
- Andreoni M., El-Sawaf G., Rezza G. et al. High seroprevalence of antibodies to human herpesvirus-8 in Egyptian children: evidence of nonsexual transmission. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999, 91: 465–469.
- Angeloni A., Heston L., Uccini S., Sirianni M.C., Cottoni F., Masala M.V., Cerimele D., Lin S.F., Sun R., Rigsby M., Faggioni A., Miller G. High prevalence of antibodies to human herpesvirus 8 in relatives of patients with classic Kaposi's sarcoma from Sardinia. *J. Infect. Dis.* 1998, 17: 1715-1718.
- Araújo, J., Gonzalez, E., Egea, M.A., Garcia Eliana, M.L., Souto, B., 2009. Nanomedicines for ocular NSAIDs: safety on drug delivery. *Nanomedicine* 5, 394–401.
- Arya S.K., Guo C., Josephs S.F., Wong-Staal F. Transactivator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science.* 1985, 229: 69-73.

- Ascione R., Gradoni L., Maroli M. Eco-epidemiological study of *Phlebotomus perniciosus* in foci of visceral leishmaniasis in Campania. *Parassitologia*. 1996, 38: 495-500.
- Ascoli V., Manno D., Guzzinati S., Tognazzo S., Zambon P., Arcà B., Costantini C. e Coluzzi M. La puntura di artropodi ematofagi quale possibile cofattore nella trasmissione di HHV8 (Human Herpes Virus 8) e nell'espressione del sarcoma di Kaposi. *Rend. Fis. Acc. Lincei*. 2002, 9, 13: 71-88.
- Bais C., Santomaso B., Coso O. et al. G-proteincoupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator. *Nature*. 1998, 391: 86–89.
- Ballestas M.E., Chatis P.A., Kaye K.M. Efficient persistence of extrachromosomal KSHV DNA mediated by latency-associated nuclear antigen. *Science*. 1999, 284: 641-4.
- Barillari G., Buonaguro L., Fiorelli V. et al. Effects of cytokines from activated immune cells on vascular cell growth and HIV-1 gene expression: implications for AIDS-Kaposi's sarcoma pathogenesis. *J. Immunol*. 1992, 149: 3727-3734.
- Barillari G., Fiorelli V., Gendelman R. et al. HIV-1 tat protein enhances angiogenesis and Kaposi's sarcoma (KS) development triggered by inflammatory cytokines (IC) or bFGF by engaging the avb3 integrin. *J. Acq. Immun. Def. Synd. Hum. Retrov*. 1997, 14: 33.
- Barillari G., Gendelman R., Gallo R.C., Ensoli B. The Tat protein of human immunodeficiency virus type 1, a growth factor for AIDS Kaposi sarcoma and cytokine-activated vascular cells, induces adhesion of the same cell types by using integrin receptors recognizing the RGD amino acid sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993, 90: 7941-7945.
- Bayley A.C. Aggressive Kaposi's sarcoma in Zambia. 1983. *Lancet*. 1984, 1: 1318-20.
- Bechtel J.T., Liang Y., Hvidding J., Ganem D. Host range of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in cultured cells. *J. Virol*. 2003, 77: 6474-81.
- Bécuwe C., Euvrard S., Bosshard S., Pouteil-Noble C., Garnier J.L., Lefrançois N., Boillot O., Kanitakis J., Touraine J.L., Claudy A. Kaposi's sarcoma and organ transplantation: 22 cases. *Ann. Dermatol. Venereol*. 2005, 132: 839-43.
- Belkaid Y., Valenzuela J.G., Kamhawi S., Rowton E., Sacks D.L., Ribeiro J.M. Delayed-type hypersensitivity to *Phlebotomus papatasi* sand fly bite: an adaptive response induced by the fly? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000, 97: 6704-6709.
- Beral V. Epidemiology of Kaposi's sarcoma. *Cancer Surv*. 1991, 10: 5–22.
- Beral V., Peterman T.A., Berkelman R.L., Jaffe H.W. Kaposi's sarcoma among persons with AIDS: a sexually transmitted infection? *Lancet*. 1990, 20: 123-8.
- Biggar R.J. Cancer in acquired immunodeficiency syndrome: an epidemiological assessment. *Semin. Oncol*. 1990, 17: 251–60.
- Biggar R.J., Rabkin C.S. The epidemiology of AIDS-related neoplasms. *Hematol. Oncol. Clin. North Am*. 1996, 10: 997-1010.
- Biggar R.J., Whitby D., Marshall V., Linhares A.C., Black F. Human herpesvirus 8 in Brazilian

Amerindians: a hyperendemic population with a new subtype. *J. Infect. Dis.* 2000, 181: 1562-1568.

- Boivin G., Côté S., Cloutier N., Abed Y., Maguigad M., Routy J.P. Quantification of human herpesvirus 8 by real-time PCR in blood fractions of AIDS patients with Kaposi's sarcoma and multicentric Castleman's disease. *J. Med. Virol.* 2002, 68: 399-403.
- Bourbouli D., Whitby D., Boshoff C. et al. Serologic evidence for mother-to-child transmission of Kaposi's sarcoma – associated herpesvirus infection. *JAMA.* 1998, 280: 31–32.
- Bowser B.S., DeWire S. M. and Damania B. Transcriptional regulation of the K1 gene product of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 2002, 76: 12574–12583.
- Broccolo F, Lusso P, Malnati M. Calibration technologies for correct determination of Epstein–Barr virus, human herpesvirus 6 (HHV-6), and HHV-8 antiviral drug susceptibilities by use of real-time-PCR-based assays. *J. Clin. Microbiol.* 51(6), 2013 (2013).
- Broccolo F, Tassan Din C, Viganò MG et al. HHV-8 DNA replication correlates with the clinical status in AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Virol.* 78, 47–52 (2016).
- Brown PO, Botstein D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet.* 1999, 21: 33-7.
- Broyles, S.S., Kremer, M., Knutson, B.A., 2004. Antiviral activity of distamycin A against vaccinia virus is the result of inhibition of postreplicative mRNA synthesis. *J. Virol.* 78, 2137–2141.
- Brunson M.E., Balakrishnan K., Penn I. HLA and Kaposi's sarcoma in solid organs transplantation. *Hum. Immunol.* 1990, 29: 56-63.
- Burgalassi, S., Chetoni, P., Monti, D., Saettone, M.F., 2001. Cytotoxicity of potential ocular permeation enhancers evaluated on rabbit and human corneal epithelial cell lines. *Toxicol. Lett.* 122, 1–8.
- Calabro M.L., Sheldon J., Favero A. et al. Seroprevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8 in several regions of Italy. *J. Hum. Virol.* 1998, 1: 207–213.
- Cannon J.S., Hamzeh F., Moore S., Nicholas J., Ambinder R.F. Human herpesvirus 8-encoded thymidine kinase and phosphotransferase homologues confer sensitivity to ganciclovir. *J. Virol.* 1999, 73: 4786-93.
- Carbone A., Gaidano G., Gloghini A., Ferlito A. and Stein H. AIDS-related plasmablastic lymphomas of the oral cavity and jaws: a diagnostic dilemma. *The Annals of Otolaryngology and Laryngology.* 1999, 108: 95–99.
- Carbone A., Gloghini A. KSHV/HHV8-associated lymphomas. *Br. J. Haematol.* 2008, 140: 13-24.
- Casazza, A.M., Fioretti, A., Ghione, M., Soldati, M., Verini, M.A., 1966. Distamycin A, a new antiviral antibiotic. *Antimicrob. Agents Chemother.* 5, 593–598.
- Casper C., Wald A. The use of antiviral drugs in the prevention and treatment of Kaposi sarcoma, multicentric Castleman disease and primary effusion lymphoma. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007, 312: 289-307.

- Castleman B. Hyperplasia of mediastinal lymphnodes. *N. Engl. J. Med.* 1954, 250: 26-30.
- Castleman B., Iverson L., Mendendez V.P. Localised mediastinal lymph node hyperplasia resembling thymoma. *Cancer.* 1956, 9: 822-830.
- Cathomas G., McGandy C.E., Terracciano L.M., Itin P.H., DeRosa G., Gudat F. Detection of herpesvirus-like DNA by nested polymerase chain reaction in archival skin biopsies of various forms of Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Pathol.* 1996, 49: 631-633.
- Cattani P., Cerimele F., Porta D., Graffeo R., Ranno S., Marchetti S., Ricci R., Capodicasa N., Fuga L., Amico R., Cherchi G., Gazzilli M., Zanetti S., Fadda G. Age-specific seroprevalence of Human Herpesvirus 8 in Mediterranean regions. *Clin. Microbiol. Infect.* 2003, 9: 274-9.
- Ceffa S., Buonomo E., Altan A.M., Erba F., Germano P., Guidotti G., Liotta G., Magnano San Lio M., Scarcella P., Palombi L., Marazzi M.C. Seroprevalence of HHV8 in a cohort of HIV-negative and HIV-positive patients in Mozambique. *Ann. Ig.* 2007, 19: 519-23.
- Cesarman E. and Knowles D.M. The role of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV8) in lymphoproliferative diseases. *Seminars in Cancer Biology.* 1999, 9: 165-174.
- Cesarman E. and Mesri E. Viral G protein-coupled receptor and Kaposi's sarcoma: a model of paracrine neoplasia? *J. Exp. Med.* 2000, 191: 417-422.
- Cesarman E., Chang Y., Moore P.S., Said J.W. and Knowles D.M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences are present in AIDS-related body cavity-based lymphoma. *New England Journal of Medicine.* 1995, 332: 1186-1191.
- Chandra, P., Goetz, A., Wacker, A., Verini, M.A., Casazza, A.M., Ghione, M., 1971. Some structural requirements for the antibiotic action of distamycins. *FEBS Lett.* 16,249-252.
- Chang H.C., Samaniego F., Nair B.C., Buonaguro L., Ensoli B. Tat protein exits from cells via leaderless secretory pathway and binds to extracellular matrix-associated heparan sulphate proteoglycans through its basic region. *AIDS.* 1997, 11: 1421-1531.
- Chang P.J., Shedd D., Gradoville L., Cho M.S., Chen L.W., Chang J. and Miller G. Open reading frame 50 protein of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus directly activates the viral PAN and K12 genes by binding to related response elements. *J. Virol.* 2002, 76: 3168-3178.
- Chang Y., Cesarman E., Pessin M.S., Lee F., Culpepper J., Knowles D.M., Moore P.S. Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science.* 1994, 266: 1865-1869.
- Chang Y., Moore P.S., Talbot S.J., Boshoff C.H., Zarkowska T., Godden-Kent, Paterson H., Weiss R.A. and Mitnacht S. Cyclin encoded by KS herpesvirus. *Nature.* 1996, 382: 410-411.
- Chatterjee M., Osborne J., Bestetti G., Chang Y., Moore P.S. Viral IL-6-induced cell proliferation and immune evasion of interferon activity. *Science.* 2002, 298: 1432-1435.
- Chen J., Ueda K., Sakakibara S., Okuno T., Parravicini C., Corbellino M., Yamanishi K. Activation of latent Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by demethylation of the promoter of the lytic

transactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001, 27: 4119-24.

- Chen J., Ueka K., Sakakibara S., Okuno T. and Yamanishi K. Transcriptional regulation of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor gene. *J. Virol.* 2000, 74: 8623–8634.
- Cheng E.H., Nicholas J., Bellows D.S., Hayward G.S., Guo H.G., Reitz M.S. and Hardwick J.M. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997, 94: 690–694.
- Chetoni, P., Burgalassi, S., Monti, D., Najarro, M., Boldrini, E., 2007. Liposomeencapsulated mitomycin C for the reduction of corneal healing rate and ocular toxicity. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 17, 43–48.
- Chetoni, P., Rossi, S., Burgalassi, S., Monti, D., Mariotti, S., Saettone, M.F., 2004. Comparison of liposome-encapsulated acyclovir with acyclovir ointment: ocular pharmacokinetics in rabbits. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 20, 169–177.
- Coluzzi M., Manno D., Guzzinati S., Tognazzo S., Zambon P., Arcà B., Costantini C., Ascoli V. The bloodsucking arthropod bite as possible cofactor in the transmission of human herpesvirus-8 infection and in the expression of Kaposi's sarcoma disease. *Parassitologia*. 2002, 44: 123-9.
- Contu L., Cerimele D., Pintus A., Cottoni F., La Nasa G. HLA and Kaposi's sarcoma in Sardinia. *Tissue Antigens*. 1994, 23: 240-245.
- Cook-Mozaffari P., Newton R., Beral V., Burkitt D.P. The geographical distribution of Kaposi's sarcoma and of lymphomas in Africa before the AIDS epidemic. *Br. J. Cancer*. 1998, 78: 1521-1528.
- Corallini A., Altavilla G., Pozzi L. et al. Systemic expression of HIV-1 Tat gene in transgenic mice induces endothelial proliferation and tumors of different histotypes. *Cancer Res*. 1993, 53: 5569-5575.
- Cortesi, R., Esposito, E., 2010. Distamycins: strategies for possible enhancement of activity and specificity. *Mini Rev. Med. Chem.* 10, 217–230. Cortesi, R., Romagnoli, R., Menegatti, E., Esposito, E., Cervellati, F., Nastruzzi, C., 2004. Liposomes containing distamycins: preparation, characterization and antiproliferative activity. *Drug Deliv.* 11, 83–88.
- Cortesi, R., Romagnoli, R., Drechsler, M., Menegatti, E., Zaid, A.N., Ravani, L., Esposito, E., 2010. Liposomes- and ethosomes-associated distamycins: a comparative study. *J. Liposome Res.* 20, 277–285.
- Coscoy L. and Ganem D. A viral protein that selectively downregulates ICAM-1 and B7-2 and modulates T cell costimulation. *J. Clin. Invest.* 2001, 107: 1599-1606.
- Coscoy L. and Ganem D. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes two proteins that block cell surface display of MHC class I chains by enhancing their endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000, 97: 8051-8056.
- Coscoy L. Immune evasion by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Nat. Rev. Immunol.* 2007, 7: 391-401.

- Cotter M.A. 2nd, Robertson E.S. The latency-associated nuclear antigen tethers the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome to host chromosomes in body cavity-based lymphoma cells. *Virology*. 1999, 264: 254-64.
- Cottoni F., Masala M.V., Budroni M., Rosella M., Satta R., Locatelli F., Montesu M.A., De Marco R. The role of occupation and a past history of malaria in the etiology of classic Kaposi's sarcoma: a case-control study in north-east Sardinia. *Br. J. Cancer*. 1997, 76: 1518-1520.
- Cupp M.S., Ribeiro J.M., Cupp E.W. Vasodilative activity in black fly salivary glands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994, 50: 241-246.
- Dairaghi DJ. HHV8-encoded vMIP-I selectively engages chemokine receptor CCR8. *J. Biol. Chem.* 274(31), 21569–21574 (1999).
- De Leeuw, J., De Vijlder, H.C., Bjerring, P., Neumann, H.A., 2009. Liposomes in dermatology today. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 23, 505–516.
- Dedicoat M., Newton R., Alkharsah K.R., Sheldon J., Szabados I., Ndlovu B., Page T., Casabonne D., Gilks C.F., Cassol S.A., Whitby D., Schulz T.F. Mother-to-child transmission of human herpesvirus-8 in South Africa. *J. Infect. Dis.* 2004, 190: 1068-75.
- Deng H., Liang Y. and Sun R., 2007. Regulation of KSHV lytic gene expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 312: 157-183.
- Deng H., Song M.J, Chu J.T. and Sun R. Transcriptional regulation of the interleukin-6 gene of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). *J. Virol.* 2002, 76: 8252–8264.
- Di Benedetto F., Di Sandro S., De Ruvo N., Berretta M., Masetti M., Montalti R., Ballarin R., Cocchi S., Potenza L., Luppi M., Gerunda G.E. Kaposi's sarcoma after liver transplantation. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2008, 134: 653-8.
- Dianzani F., Ippolito G., Moroni M. AIDS 1998: il contributo italiano. *PICCIN*. Padova, 1998.
- Direkze S. and Laman H. Regulation of growth signalling and cell cycle by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genes *Int. J. Exp. Path.* 2004, 85: 305–319.
- Dourmishev L.A., Dourmishev A.L., Palmeri D., Schwartz R.A. and Lukac D.M. Molecular Genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, 67: 175-212.
- Dourmishev L.A., Dourmishev A.L., Palmeri D., Schwartz R.A., Lukac D.M. Molecular genetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8) epidemiology and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003, 67: 175-212.
- Draghici S. Data Analysis Tools for DNA Microarrays. Eds. Chapman & Hall/CRC. 2003.
- Dukers N.H.T.M., Renwick N., Prins M. et al. Risk factors for HHV8 seropositivity and HHV8 seroconversion in a cohort of homosexual men. *Am. J. Epidemiol.* 1999, 151: 213–224.
- Dupin N., Grandadam M., Calvez V., Gorin I., Aubin J.T., Havard S., Lamy F., Leibowitch M., Huraux J.M., Escande J.P., Agut H. Herpesvirus-like DNA sequences in patients with Mediterranean

Kaposi's sarcoma. *Lancet*. 1995, 345: 761–762.

- Ebrahim, S., Peyman, G., Lee, P.J., 2005. Applications of liposomes in ophthalmology. *Surv. Ophthalmol.* 50, 167–182.
- Eisenbarth S.C., Colegio O.R., Iyer A., Cooper D., Bannykh S., Baehring J. Images in neuro-oncology: a case of POEMS (Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal protein and Skin changes) in a patient with multicentric Castleman's disease. *J. Neurooncol.* 2007, 81: 163-5.
- El Maghraby, G.M., Barry, B.W., Williams, A.C., 2008. Liposomes and skin: from drugdelivery to model membranes. *Eur. J. Pharm. Sci.* 34, 203–222.
- Endres MJ, Garlisi CG, Xiao H, Shan L, Hedrick JA. The Kaposi's sarcoma-related herpesvirus (KSHV)-encoded chemokine vMIP-I is a specific agonist for the CC chemokine receptor (CCR) 8. *J. Exp. Med.* 189, 1993–1998 (1999).
- Ensoli B., Barillari G., Salahuddin S.Z. et al. The Tat protein of HIV-1 stimulates growth of cells derived from Kaposi's sarcoma lesions of AIDS patients. *Nature*. 1990, 345: 84-86.
- Ensoli B., Buonaguro L., Barillari G. et al. Release, uptake and effects of extracellular HIV-1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J. Virol.* 1993, 67: 277-287.
- Ensoli B., Gallo R.C. Growth factors in AIDS-associated Kaposi's sarcoma: cytokines and HIV-1 Tat protein. In DeVita V. Jr., Hellman S., Rosenberg S.A. (eds): *AIDS Updates*, Philadelphia, J.B. Lippincott Co. 1994c, 7: 1-12.
- Ensoli B., Gendelman R., Markham P. et al. Synergy between basic fibroblast growth factor and human immunodeficiency virus type 1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature*. 1994a, 371: 674-680.
- Fakhari F.D. and Dittmer D.P. Charting latency transcripts in Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus by whole-genome real-time quantitative PCR. *J. Virol.* 2002, 76: 6213–6223.
- Farge D. Kaposi's sarcoma in organ transplant recipients: the collaborative transplantation research of Ile de France. *Eur. J. Med.* 1993, 2: 339-43.
- Fields D. et al. *Virology*. 5th eds. David M. Knipe. 2007.
- Fischer R.G., Falk L.A., Rytter R., Burton G.J., Luecke D.H., Deinhardt F. Herpesvirus saimiri: viability in four species of hematophagous insects and attempted insect transmission to marmosets. *J. Natl. Cancer Inst.* 1974, 52: 1477-1481.
- fluconazole: in-vitro studies. *Acta Ophthalmol.* 88, 901–904.
- Foglieni C, Scabini S, Belloni D et al. Productive infection of HUVEC by HHV-8 is associated with changes compatible with angiogenic transformations. *Eur. J. Histochem.* 49(3), 273–284 (2005).
- French P.D., Harris J.R., Mercey D.E. The Koebner phenomenon and AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Br. J. Dermatol.* 1994, 131: 746-747.
- Friedman-Kien A.E., Laubenstein L., Marmor M. et al. Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men-New York City and California. *Morb. Mortal Wkly Rep.* 1981, 30:

305-8.

- Friedman-Kien A.E., Saltzman B.R., Cao Y.Z., Nestor M.S., Mirabile M., Li J.J. et al. Kaposi's sarcoma in HIV-negative homosexual men. *Lancet*. 1990, 335: 168–9.
- Gaidano G. and Carbone A. Primary effusion lymphoma: a liquid phase lymphoma of fluid-filled body cavities. *Advances in Cancer Research*. 2001, 80: 115–146.
- Gao S.J., Alsina M., Deng J.H., Harrison C.R., Montalvo E.A., Leach C.T. et al. Antibodies to Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in patients with multiple myeloma. *J. Infect. Dis*. 1998, 178: 846–9.
- Gao S.J., Kingsley L., Hoover D.R., Spira T.J., Rinaldo C.R., Saah A., Phair J., Detels R., Parry P., Chang Y. and Moore P.S. Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma. *N. Engl. J. Med*. 1996a, 335: 233–241.
- Gao S.J., Kingsley L., Li M., Zheng W., Parravicini C., Ziegler J., Newton R., Rinaldo C.R., Saah A., Phair J., Detels R., Chang Y. and Moore P.S. KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma. *Nat. Med*. 1996b, 2: 925–92.
- Gaudana, R., Ananthula, H.K., Parenky, A., Mitra, A.K., 2010. Ocular drug delivery. *AAPS J.* 12, 348–360.
- Gaudana, R., Jwala, J., Boddu, S.H., Mitra, A.K., 2009. Recent perspectives in ocular drug delivery. *Pharm. Res.* 26, 1197–1216.
- Geddes M., Franceschi S., Balzi D., Arniani S., Gaf'a L., Zanetti R. Birthplace and classic Kaposi's sarcoma in Italy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1995, 87: 1015-1017.
- Geier S.A., Baumann S., Goebel F.D. Kaposi's sarcoma and volcanic soils. *Lancet*. 1994, 343: 231-232.
- Gessain A., Mauclore P., van Beveren M. et al. Human herpesvirus 8 primary infection occurs during childhood in Cameroon, Central Africa. *Int. J. Cancer*. 1999, 81: 189–192.
- Glesby M.J., Hoover D.R., Weng S., Graham N.M., Phair J.P., Detels R., Ho M., Saah A.J. Use of antiherpes drugs and the risk of Kaposi's sarcoma: data from the Multicenter AIDS Cohort Study. *J. Infect. Dis*. 1996, 173: 1477-80.
- Goudsmit J., Renwick N., Dukers N.H., Coutinho R.A., Heisterkamp S., Bakker M., Schulz T.F., Cornelissen M., Weverling G.J. Human herpesvirus 8 infections in the Amsterdam Cohort Studies (1984-1997): analysis of seroconversions to ORF65 and ORF73. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000, 97: 4838-43.
- Gradoville L., Gerlach J., Grogan E., Shedd D., Nikiforow S., Metroka C. and Miller G. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus open reading frame 50/Rta protein activates the entire lytic cycle in the HH-B2 primary effusion lymphoma cell line. *J. Virol*. 2000, 74: 6207–6212.
- Green, M.T., Dunkel, E.C., Courtney, R.J., 1984. Detection of herpes simplex virus induced

polypeptides in rabbit trigeminal ganglia. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 25, 1436–1440.

- Gregoriadis, G., Florence, A.T., 1993. Liposomes in drug delivery: clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs* 45, 15–28.
- Grulich A.E., Olsen S.J., Luo K. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus: a sexually transmissible infection? *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 1999, 20: 387–393.
- Guihot A., Couderc L.J., Agbalika F., Galicier L., Bossi P., Rivaud E., Scherrer A., Zucman D., Katlama C., Oksenhendler E. Pulmonary manifestations of multicentric Castleman's disease in HIV infection: a clinical, biological and radiological study. *Eur. Respir. J.* 2005, 26: 118-25.
- Habib, F.S., Fouad, E.A., Abdel-Rhaman, M.S., Fathalla, D., 2010. Liposomes as an ocular delivery system of
- Hengge U.R., Ruzicka T., Tying S.K., Stuschke M., Roggendorf M., Schwartz R.A., Seeber S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 1: epidemiology, environmental predispositions, clinical manifestations, and therapy. *Lancet Infect. Dis.* 2002a, 2: 281-92.
- Hengge U.R., Ruzicka T., Tying S.K., Stuschke M., Roggendorf M., Schwartz R.A., Seeber S. Update on Kaposi's sarcoma and other HHV8 associated diseases. Part 2: pathogenesis, Castleman's disease and pleural effusion lymphoma. *Lancet Infect. Dis.* 2002b, 2: 344-52.
- Herndier B., Ganem D. The biology of Kaposi's sarcoma. *Cancer Treat. Res.* 2001, 104: 89-126.
- herpesvirus (KSHV/HHV-8)-infected endothelial, fibroblast, and B cells: insights into modulation events early during infection. *Cancer Res.* 64(1), 72–84 (2004).
- Holst P.J., Luttichau H.R., Schwartz T.W. and Rosenkilde M.M. Virally encoded chemokines and chemokine receptors in the role of viral infections. *Contrib. Microbiol.* 2003, 10: 232-252.
- Holst P.J., Rosenkilde M.M., Manfra D., Chen S.C., Wiekowski M.T., Holst B., Cifire F., Lipp M., Schwartz T.W. and Lira S.A. Tumorigenesis induced by the HHV8-encoded chemokine receptor requires ligand modulation of high constitutive activity. *J. Clin. Invest.* 2001, 108: 1789-1796.
- Humphrey R.W., O'Brien T.R., Newcomb F.M., Nishihara H., Wyvill K.M., Ramos G.A., Saville M.W., Goedert J.J., Straus S.E., Yarchoan R. Kaposi's sarcoma (KS)-associated herpesvirus-like DNA sequences in peripheral blood mononuclear cells: association with KS and persistence in patients receiving anti-herpesvirus drugs. *Blood.* 1996, 1, 88: 297-301.
- infection. *J. Virol.* 82(11) 5440–5449 (2008).
- Iscovich J., Boffetta P., Franceschi S., Azizi E., Sarid R. Classic kaposi sarcoma: epidemiology and risk factors. *Cancer.* 2000, 88: 500-17.
- Jacobson L.P., Jenkins F.J., Springer G., Munoz A., Shah K.V., Phair J., Zhang Z. and Armenian H. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 and human herpesvirus type 8 infections on the incidence of Kaposi's sarcoma. *J. Infect. Dis.* 2000, 181: 1940–1949.
- Jenner R., Alba M., Boshoff C. and Kellam P. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus latent and

lytic gene expression as revealed by DNA arrays. *J. Virol.* 2001, 75: 891–902.

- Jensen K.K. and Lira S. Chemokines and Kaposi's sarcoma. *Semin. Cancer Biol.* 2004, 14: 187-194.
- Jeong J., Papin J., Dittmer D. Differential regulation of the overlapping Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vGCR (orf74) and LANA (orf73) promoters. *J. Virol.* 2001, 75: 1798-807.
- Jessop S. HIV-associated Kaposi's Sarcoma. *Dermatol. Clin.* 2006, 3: 509–520.
- Joo C.H., Shin Y.C., Gack M., Wu L., Levy D. and Jung J.U. Inhibition of interferon regulatory factor 7 (IRF7)-mediated interferon signal transduction by the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral IRF homolog vIRF3. *J. Virol.* 2007, 81: 8282-8292.
- Judde J.G., Lacoste V., Brière J., Kassa-Kelembho E., Clyti E., Couppié P., Buchrieser C., Tulliez M., Morvan J., Gessain A. Monoclonality or oligoclonality of human herpesvirus 8 terminal repeat sequences in Kaposi's sarcoma and other diseases. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000, 92: 729-36.
- Kaloterakis A., Papasteriades C., Filiotou A., Economidou J., Hadjiyannis S., Stratigos J. HLA in familial and nonfamilial Mediterranean Kaposi's sarcoma in Greece. *Tissue Antigens.* 1995, 45: 117-119.
- Kaposi M. Idiopathisches multiples Pigmentsarkom der Haut. *Arch. f. Dermatol. Syph.* 1872, 3: 265–73.
- Kawa K., Okamura T., Yagi K., Takeuchi M., Nakayama M., Inoue M. Mosquito allergy and Epstein-Barr virus-associated T/natural killer-cell lymphoproliferative disease. *Blood.* 2001, 98: 3173-3174.
- Kedes D.H., Operskalski E., Busch M., Kohn R., Flood J., Ganem D. The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission. *Nat. Med.* 1996, 2: 918–24.
- Kimura H., Hoshino Y., Kanegane H., Tsuge I., Okamura T., Kawa K., Morishima T. Clinical and virologic characteristics of chronic active Epstein-Barr virus infection. *Blood.* 2001, 98: 280-286.
- Korting, H.C., Schäfer-Korting, M., 2010. Carriers in the topical treatment of skin disease. *Handb. Exp. Pharmacol.* 197, 435–468.
- La Placa M. et al. *Principi di Microbiologia Medica*. Eds. ESCULAPIO. 10 ristampa. 2008.
- Lacoste V., Maucière P., Dubreuil P., Lewis J., Georges-Courbot M.C., Gessain A. KSHV related viruses in chimpanzees and gorillas. *Nature.* 2000, 407: 151-2.
- LaDuca J.R., Love J.L., Abbott L.Z., Dube S., Freidman-Kien A.E., Poiesz B.J. Detection of human herpesvirus 8 DNA sequences in tissues and bodily fluids. *J. Infect. Dis.* 1998, 178: 1610-5.
- Lagos D, Var RJ, Gratrix F et al. Toll-like Receptor 4 mediates innate immunity to Kaposi sarcoma herpesvirus. *Cell Host*
- Lagos D., Vart R.J., Gratrix F., Westrop S.J., Emuss V., Wong P.P., Robey R., Imami N., Bower M., Gotch F. and Boshoff C. Toll-like Receptor 4 Mediates Innate Immunity to Kaposi's Sarcoma

Herpesvirus. *Cell Host Microbe*. 2008, 13: 470–483.

- Laney A.S., Peters J.S., Manzi S.M., Kingsley L.A., Chang Y., Moore P.S. Use of a multiantigen detection algorithm for diagnosis of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44: 3734-41.
- Laor Y., Schwartz R.A. Epidemiologic aspects of American Kaposi's sarcoma. *J. Surg. Oncol.* 1979, 12: 299–303.
- Leary, J.J., Wittrock, R., Starisky, R.T., Weinberg, A., Levin, M.J., 2002. Susceptibilities of herpes simplex viruses to penciclovir and acyclovir in eight cell lines. *Antimicrob. Agents Chemother.* 3, 762–768.
- Lee L.G., Connel C.R. and Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probs. *Nucleic Acids Research*. 1993, 21: 3761-3766.
- Lee, V.H.L., Takemoto, K.A.,imoto, D.S., 1984. Precorneal factors influencing the ocular distribution of topically applied liposomal inulin. *Curr. Eye Res.* 3, 585–591.
- Lesnoni L., La Parola I., Masini C. et al. Kaposi's sarcoma in renal transplant recipients: experience at the Catholic University in Rome, 1988-1996. *Dermatology*. 1997, 194: 229-33.
- Li M., Lee H., Yoon D.W. et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin. *J. Virol.* 1997, 71: 1984–91.
- Lipshutz R.J., Fodor S.P., Gingeras T.R., Lockhart D.J. High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet.* 1999, 21: 20-4.
- Lock M.J., Thorley N., Teo J., Emery V.C. Azidodeoxythymidine and didehydrodeoxythymidine as inhibitors and substrates of the human herpesvirus 8 thymidine kinase. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, 49: 359-66.
- Lukac D.M., Kirshner J.R. and Ganem D. Transcriptional activation by the product of the open reading frame 50 of Kaposi's-associated herpesvirus is required for lytic viral reactivation in B cells. *J. Virol.* 1999, 73: 9348–9361.
- Lukac D.M., Renne R., Kirshner J.R. and Ganem D. Reactivation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection from latency by expression of the ORF 50 transactivator, a homolog of the EBV R protein. *Virology*. 1998, 252: 304–312.
- Luppi M., Barozzi P., Guaraldi G., Ravazzini L., Rasini V., Spano C., Riva G., Vallerini D., Pinna A.D., Torelli G. Human herpesvirus 8-associated diseases in solid-organ transplantation: importance of viral transmission from the donor. *Clin. Infect. Dis.* 2003, 37: 606-7.
- Luppi M., Barozzi P., Maiorana A., Collina G., Ferrari M.G., Marasca R., Morselli M., Rossi E., Ceccherini-Nelli L., Torelli G. Frequency and distribution of herpesvirus-like DNA sequences (KSHV) in different stages of classic Kaposi's sarcoma and in normal tissues from an Italian population. *Int. J. Cancer*. 1996, 66: 427-31.
- Mark L., Spiller O.B., Villoutreix B.O., Blom A.M. Kaposi's sarcoma-associated herpes virus

complement control protein: KCP—complement inhibition and more. *Molecular Immunol.* 2007, 44: 11–22.

- Maroli M., Mizzon V., Siragusa C., D'Orazi A., Gradoni L. Evidence for an impact on the incidence+ of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med. Vet. Entomol.* 2001, 15: 358-363.
- Martin D.F., Kuppermann B.D., Wolitz R.A., Palestine A.G., Li H., Robinson C.A. Oral ganciclovir for patients with cytomegalovirus retinitis treated with a ganciclovir implant. Roche Ganciclovir Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1999, 340: 1063-70.
- Martin J.N., Ganem D.E., Osmond D.H., Page-Shafer K.A., Macrae D., Kedes D.H. Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection. *N. Engl. J. Med.* 1998, 338: 948–54.
- Martin, A., Clynes, M., 1993. Comparisons of five microplate colorimetric assays for in vitro cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology* 11, 49–58.
- Matteoli B., Parenti S., Broccolo F., Iuliano R., Vatteroni M.L., Pistello M., Ceccherini-Nelli L. HHV8 viral load and genotypes. Comunicazione orale. 8° Congresso Nazionale della Società Italiana di Virologia. Orvieto. 21-23/09/2008.
- Matteoli B., Parenti S., Broccolo F., Vatteroni M.L., Pistello M., Ceccherini-Nelli L. Correlazione tra genotipo e carica virale di HHV8. Comunicazione orale 37° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia. Roma. 12-15/10/2008.
- Matteoli, B., Bernardini, S., Iuliano, R., Parenti, S., Freer, G., Broccolo, F., Baggiani, A., Subissi, A., Arcamone, F., Ceccherini-Nelli, L., 2008. In vitro antiviral activity of distamycin A against clinical isolates of Herpes Simplex Virus 1 and 2 from transplanted patients. *Intervirology* 51, 166–172.
- McGeoch D.J., Davison A.J. The molecular evolutionary history of the herpesviruses. In Domingo E., Webster R., Holland J. (eds): *Origins and Evolution of Viruses*, London, Academic Press. 1998.
- McHardy J., Williams E.H., Geser A., De The G., Beth E., Giraldo G. Endemic Kaposi's sarcoma: incidence and risk factors in the West Nile District of Uganda. *Int. J. Cancer.* 1984, 33: 203-212.
- Melbye M., Cook P.M., Hjalgrim H. et al. Transmission of human herpes virus 8 (HHV8) among homosexual men follows the pattern of a 'Kaposi's sarcoma agent'. *Int. J. Cancer.* 1998, 77: 543–548.
- Melbye M., Kestens L., Biggar R.J., Schreuder G.M., Gigase P.L. HLA studies of endemic African Kaposi's sarcoma patients and matched controls: no association with HLA-DR5. *Int. J. Cancer.* 1987, 39: 182-184.
- Mentel, R., Matthes, E., Janta-Lipinski, M., Wegner, U., 1996. Fluorescent focus reduction assay for the screening of antiadenoviral agents. *J. Virol. Methods* 59, 99–104.
- *Microbe* 4(5), 470–483 (2008).
- Mikovits J, Ruscetti F, Zhu W, Bagni R, Dorjsuren D, Shoemaker R. Potential cellular signatures of viral infections in human hematopoietic cells. *Dis. Markers* 17, 173–178 (2001).

- Montagnino G., Lorca E., Tarantino A. et al. Cancer incidence in 854 kidney transplant recipients from a single institution: comparison with normal population. *Clin. Transplant.* 1996, 10: 461-9.
- Montaner S., Sodhi A., Servitja J.M., Ramsdell A.K., Barac A., Sawai E.T. and Gutkind J.S. The small GTPase Rac1 links the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus vGPCR to cytokine secretion and paracrine neoplasia. *Blood.* 2004, 104: 2903-2911.
- Montella M., Franceschi S., Geddes da Filicaia M., De Macro M., Arniani S., Balzi D., Delfino M., Iannuzzo M., Buonanno M., Satriano R.A. Classical Kaposi sarcoma and volcanic soil in southern Italy: a case-control study. *Epidemiol. Prev.* 1997, 21: 114-117.
- Montella M., Franceschi S., Geddes M., Arniani S., Cocchiarella G. Classic Kaposi's sarcoma and volcanic soil in southern Italy. *Lancet.* 1996, 347: 905.
- Montella M., Serraino D., Crispo A., Rezza G., Carbone S., Tamburini M. Is volcanic soil a cofactor for classic Kaposi's sarcoma? *Eur. J. Epidemiol.* 2000, 16: 1185-1186.
- Montesu M.A., De Marco R., Cottoni F. Soil silicates and Kaposi's sarcoma in Sardinia. *Lancet.* 1995, 346: 1436-1437.
- Monti, D., Herranz, U., Dal Bo, L., Subissi, A., 2013. Nail penetration and predicted mycological efficacy of an innovative hydrosoluble ciclopirox nail lacquer vs. a standard amorolfine lacquer in healthy subjects. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* 27, 153–158.
- Moore P.S. And Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immunoevasion and tumorigenesis: two sides of the same coin?. *Annu. Rev. Microbiol.* 2003, 57: 609-639.
- Moore P.S., Boshoff C., Weiss R.A., Chang Y. Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV. *Science.* 1996a, 274: 1739-44.
- Moore P.S., Gao S.J., Dominguez G., Cesarman E., Lungu O., Knowles D.M., Garber R., McGeoch D.J., Pellett P., Chang Y. Primary characterization of a herpesvirus-like agent associated with Kaposi's sarcoma. *J. Virol.* 1996, 70: 549–558.
- Moses AV, Jarvis MA, Raggio C et al. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-induced up-regulation of the c-kit protooncogene, as identified by gene expression profiling, is essential for the transformation of endothelial cells. *J. Virol.* 76, 8383–8399 (2002).
- Mullis K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 1990, 262: 56-61, 64-5.
- Muralidhar S., Veytsmann G., Chandran B., Ablashi D., Doniger J. and Rosenthal L.J. Characterization of the human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus) oncogene, kaposin (ORF K12). *J. Clin. Virol.* 2000, 16: 203–213.
- Nador R.G., Cesarman E., Chadburn A., Dawson D.B., Ansari M.Q., Sald J. and Knowles D.M. Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Blood.* 1996, 88: 645–656.
- Naranatt PP1, Krishnan HH, Svojanovsky SR, Bloomer C, Mathur S, Chandran B. Host gene induction and transcriptional reprogramming in Kaposi's sarcoma-associated

- Neipel F., Albrecht J.C., Fleckenstein B. Cellhomologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8 : determinants of its pathogenicity? *J. Virol.* 1997, 71: 4187–92.
- Nicholas J., Ruvolo V.R., Burns W.H. et al. Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6. *Nat. Med.* 1997, 3: 287–92.
- Nicholas J., Zong J.C., Alcendor D.J., Ciufo D.M., Poole L.J., Sarisky R.T., Chiou C.J., Zhang X., Wan X., Guo H.G., Reitz M.S., Hayward G.S. Novel organizational features, captured cellular genes, and strain variability within the genome of KSHV/HHV8. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1998, 23: 79-88.
- Ninfali P., Baronciani L., Ruzzo A., Fortini C., Amadori E., Dall'ara G., Magnani M., Beutler E. Molecular analysis of G6PD variants in northern Italy: a study on the population from the Ferrara district. *Hum. Genet.* 1993, 92: 139-142.
- Nounou, M.I., El-Khordagui, L.K., Khalafallah, N.A., Khalil, S.A., 2008. Liposomal formulation for dermal and transdermal drug delivery: past, present and future. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 2, 8–18.
- O'Brien T.R., Kedes D., Ganem D. et al. Evidence for concurrent epidemics of human herpesvirus 8 and human immunodeficiency virus type 1 in US homosexual men: rates, risk factors and relationship to Kaposi's sarcoma. *J. Inf. Dis.* 1999, 180: 1010–1017.
- Oettl'e A.G. Geographical and racial differences in the frequency of Kaposi's sarcoma as evidence of environmental or genetic causes. *Monograph n. 2, Acta Unio. Int. Contra Cancrum.* 1962, 18: 330-363.
- Offermann M.K. Kaposi sarcoma herpesvirus-encoded interferon regulator factors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2007, 312: 185-209.
- Omotosho, J.A., Whateley, T.L., Florence, A.T., 1989. Methotrexate transport from the internal phase of multiple W/O/W emulsions. *J. Microencapsul.* 6, 183–192.
- Osborne J., Moore P.S., Chang Y. KSHV-encoded viral interleukin 6 activates multiple human interleukin 6 signaling pathways. *Hum. Immunol.* 1999, 60: 921–27.
- Paulose-Murphy M., Ha N.K., Xiang C., Chen Y., Gillim L., Yarchoan R., Meltzer P., Bittner M., Trent J. and Zeichner S. Transcription program of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus). *J. Virol.* 2001, 75: 4843–4853.
- Penn I. Sarcomas in organ allograft recipients. *Transplantation.* 1995, 60: 1485-91.
- Penn I. Secondary neoplasms as a consequence of transplantation and cancer therapy. *Cancer Detect. Prev.* 1988, 26: 39-57.
- Penn I., Brunson M.E. Cancers after cyclosporin therapy. *Transplant. Proc.* 1988, 20: 885-92.
- Pepose, J.S., Keadle, T.L., Morrison, L.A., 2006. Ocular herpes simplex: changing epidemiology, emerging disease patterns, and the potential of vaccine prevention and therapy. *Am. J. Ophthalmol.*

141, 547–557.

- Pica F., Volpi A. Transmission of human herpesvirus 8: an update. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2007, 20: 152-6.
- Plancoulaine S., Abel L., van Beveren M., Tregouet D.A., Joubert M., Tortevoeye P., De The G., Gessain A. Human herpesvirus 8 transmission from mother to child and between siblings in an endemic population. *Lancet.* 2000, 356: 1062-1065.
- Poole LJ, Yu Y, Kim PS, Zheng QZ, Pevsner J, Hayward GS. Altered patterns of cellular gene expression in dermal microvascular endothelial cells infected with Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 76, 3395–3420 (2002).
- Potouridou I., Katsambas A., Pantazi V., Armenaka M., Varelzidis A., Stratigos J. Koebner phenomenon in classic Kaposi's sarcoma. *Acta Derm. Venereol.* 1997, 77: 481.
- Pyakurel P., Pak F., Mwakigonja A.R., Kaaya E., Biberfeld P. KSHV/HHV8 and HIV infection in Kaposi's sarcoma development. *Infect. Agent Cancer.* 2007, 2: 4.
- Qunibi W., Akhtar M., Sheth K. et al. Kaposi's sarcoma: the most common tumor after renal transplantation in Saudi Arabia. *Am. J. Med.* 1988, 84: 225-32.
- Raab M.S., Albrecht J.C., Birkmann A. The immunogenic glycoprotein gp35–37 of human herpesvirus 8 is encoded by open reading frame K8.1. *J. Virol.* 1998, 72: 6725–6731.
- Radkov S.A., Kellam P., Boshoff C. The latent nuclear antigen of Kaposi sarcoma-associated herpesvirus targets the retinoblastoma-E2F pathway and with the oncogene Hras transforms primary rat cells. *Nat. Med.* 2000, 6: 1121–27.
- Rawas-Qalaji, M., Williams, C.A., 2012. Advances in ocular drug delivery. *Curr. EyeRes.* 37, 345–356.
- Reichl, S., 2008. Cell culture models of the human cornea—a comparative evaluation of their usefulness to determine ocular drug absorption in-vitro. *J. Pharm.Pharmacol.* 60, 299–307.
- Renne R., Barry C., Dittmer D., Compitello N., Brown P.O., Ganem D. Modulation of cellular and viral gene expression by the latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 2001, 75: 458–68.
- Renne R., Lagunoff M., Zhong W., Ganem D. The size and conformation of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) DNA in infected cells and virions. *J. Virol.* 1996a, 70: 8151-4.
- Renne R., Zhong W., Herndier B., McGrath M., Abbey N., Kedes D., Ganem D. Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture. *Nat. Med.* 1996b, 2: 342-6.
- Rezaee S.A., Cunningham C., Davison A.J. and Blackbourn D.J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview. *J. Gen. Virol.* 2006, 87: 1781-1804.
- Rezaee S.A., Gracie J.A., McInnes I.B. and Blackbourn D.J. Inhibition of neutrophil function by the

Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus vOX2 protein. *AIDS*. 2005, 19: 1907-1910.

- Ribeiro J.M., Charlab R., Rowton E.D., Cupp E.W. *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) and *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) salivary gland hyaluronidase activity. *J. Med. Entomol.* 2000, 37: 743-747.
- Ritger, P., Peppas, N., 1987. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J. Control. Release* 5, 37-42.
- Rivas C., Thlick A.E., Parravicini C., Moore P.S., Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA2 is a B-cell-specific latent viral protein that inhibits p53. *J. Virol.* 2001, 75: 429-38.
- Romi R., Mancini L., Di Luca M., Rivosecchi L. Guida per il riconoscimento ed il controllo dei Simulidi che attaccano bestiame e uomo in Italia. *Rapporti ISTISAN*. 1998, 98/10, 75 pp.
- Rose T.M., Strand K.B., Schultz E.R. et al. Identification of two homologues of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (HHV8) in retroperitoneal fibromatosis of different macaque species. *J. Virol.* 1997, 71: 4138-4144.
- Ross R.K., Casagrande J.T., Dworsky R.L., Levine A., Mack T. Kaposi's sarcoma in Los Angeles, California. *J. Natl. Cancer Inst.* 1985, 75: 1011-5.
- Russo J.J., Bohenzky R.A., Chien M.C., Chien J., Yan M., Maddalena D., Parry J.P., Peruzzi D., Edelman I.S., Chang Y., Moore P.S. Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus 8. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998, 93: 14862-14867.
- Santarelli R., DeMarco R., Masala M., Angeloni A., Uccini S., Pacchiarotti R., Montesu M., Satta R., Cerimele D., Faggioni F. and Cottoni F. Direct correlation between human herpesvirus-8 seroprevalence and classic Kaposi's sarcoma incidence in Northern Sardinia. *J. Med. Virol.* 2001, 65: 368-372.
- Sarid R., Flore O., Bohenzky R.A., Chang Y. and Moore P.S. Transcription mapping of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) genome in a body cavity-based lymphoma cell line (BC-1). *J. Virol.* 1998, 72: 1005-1012.
- Sarid R., Sato T., Bohenzky R.A., Russo J.J. and Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue. *Nat. Med.* 1997, 3: 293-298.
- Schmauz R., Mugerwa J.W., Wright D.H. The distribution of non-Burkitt, non-Hodgkin's lymphomas in Uganda in relation to malarial endemicity. *Int. J. Cancer*. 1990, 45: 650-653.
- Schulz T.F. Epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. *Adv. Cancer Res.* 1999, 76: 121-160.
- Schwartz R.A. Kaposi's sarcoma: advances and perspectives. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996, 34: 804-814.
- Schwarz M. and Murphy P.M. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor constitutively activates NF- κ B and induces proinflammatory cytokine and chemokine production via a C-terminal signaling determinant. *J. Immunol.* 2001, 167: 505-513.

- Seybold U., Mayr D., Degenhart C., Bogner J.R. HIV-Associated Kaposi's Sarcoma. *Infection*. 2008, 36: 96-7.
- Shaw. G1, Morse S, Ararat M, Graham FL. Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells. *FASEB J*. 16(8), 869–871 (2002).
- Shepherd F.A., Maher E., Cardella C. et al. Treatment of Kaposi's sarcoma after solid organ transplantation. *J. Clin. Oncol*. 1997, 15: 2371-7.
- Si H., Robertson E.S. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded latency-associated nuclear antigen induces chromosomal instability through inhibition of p53 function. *J. Virol*. 2006, 80: 697-709.
- Siegel J.H., Janis R., Alper J.C., Schutte H., Robbins L., Blaufox M.D. Disseminated visceral Kaposi's sarcoma. Appearance after human renal homograft operation. *JAMA*. 1969, 207: 1493-6.
- Simpson G.R., Schulz T.F., Whitby D. et al. Prevalence of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection measured by antibodies to recombinant capsid protein and latent immunofluorescence antigen. *Lancet*. 1996, 348: 1133–1138.
- Sirianni M.C., Campagna M., Scaramuzzi D., Carbonari M., Toschi E., Bacigalupo I., Monini P., Ensoli B. Control of human herpes virus type 8-associated diseases by NK cells. *Ann. NY Acad. Sci*. 2007, 1096: 37-43.
- Sodhi A., Montaner S. and Gutkind J.S. Does dysregulated expression of a deregulated viral GPCR trigger Kaposi's sarcomagenesis? *FASEB J*. 2004, 18: 422-427.
- Stallone G., Di Paolo S., Schena A., Infante B., Schena F.P. Sarcoma di Kaposi. Ruolo dell'immunità e dell'infezione virale nel paziente trapiantato. *Giornale Italiano di Nefrologia*. 2000, Anno 17, n.5: 512-523.
- Starzl T.E. Contribution to organ transplantation to the biology of cancer. In: Fortner J.G., Rhoads J.E., eds. *Accomplishments in Cancer Research* ed. Philadelphia: JB Lippincott Company. 1989, 190-201.
- Staskus K.A., Zhong W., Gebhard K., Herndier B., Wang H., Renne R., Beneke J., Pudney J., Anderson D.J., Ganem D., Haase A.T. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells. *J. Virol*. 1997, 71: 715-9.
- Stebbing J., Pantanowitz L., Dayyani F., Sullivan R.J., Bower M., Dezube B.J. HIV-associated multicentric Castleman's disease. *Am. J. Hematol*. 2008, 83: 498-503.
- Stella, B., Arpicco, S., Rocco, F., Burgalassi, S., Nicosia, N., Tampucci, S., Chetoni, P., Cattel, L., 2012. Nonpolymeric nanoassemblies for ocular administration of acyclovir: pharmacokinetic evaluation in rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 80,39–45.
- Stratford, R.E.J., Yang, D.C., Redell, M.A., Lee, V.H.L., 1983. Ocular distribution of liposome encapsulated epinephrine and inulin in the albino rabbit. *Curr. Eye Res.* 2, 377–386.
- Strichman-Almashanu L., Weltfreund S., Gideoni O., Friedman-Birnbaum R., Pollack S. No

significant association between HLA antigens and classic Kaposi sarcoma: molecular analysis of 49 Jewish patients. *J. Clin. Immunol.* 1995, 15: 205-209.

- Sun R., Lin S.F., Gradoville L., Yuan Y., Zhu F. and Miller G. A viral gene that activates lytic cycle expression of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998, 95: 10866–10871.
- Sun R., Lin S.F., Staskus K., Gradoville L., Grogan E., Haase A. and Miller G. Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression. *J. Virol.* 1999, 73: 2232–2242.
- Swinnen L.J., Costanzo-Nordin M.R., Fisher S.G. et al. Increase incidence of lymphoproliferative disorder after immunosuppression with the monoclonal antibody OKT3 in cardiac transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 1990, 323: 1723-8.
- Szoka Jr., F., Papahadjopoulos, D., 1978. Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 75, 4194–4198.
- Taylor J.F., Templeton A.C., Vogel C.L. et al. Kaposi's sarcoma in Uganda: a clinico-pathological study. *Int. J. Cancer.* 1971, 8: 122-35.
- Toma, H.S., Murina, A.T., Areaux, R.G., Neumann, D.M., Bhattacharjee, P.S., Foster, T.P., Kaufman, H.E., Hill, J.M., 2008. Ocular HSV-1 latency, reactivation and recurrent disease. *Semin. Ophthalmol.* 23, 249–273.
- Tomkowicz B., Singh S.P., Cartas M., Srinivasan A. Human herpesvirus-8 encoded Kaposin: subcellular localization using immunofluorescence and biochemical approaches. *DNA Cell Biol.* 2002, 21: 151-62.
- Trus B.L., Heymann J.B., Nealon K., Cheng N., Newcomb W.W., Brown J.C., Kedes D.H., Steven A.C. Capsid structure of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus, a gammaherpesvirus, compared to those of an alphaherpesvirus, herpes simplex virus type 1 and betaherpesvirus, cytomegalovirus. *J. Virol.* 2001, 75: 2879-90.
- Ueda K., Ishikawa K., Nishimura K., Sakakibara S., Do E. and Yamanishi K. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) replication and transcription factor activates the K9 (vIRF) gene through two distinct cis elements by a non-DNA-binding mechanism. *J. Virol.* 2002, 76: 12044–12054.
- Verini, M.A., D'Amico, G., Sanfilippo, A., Arcamone, F., 1976. The effect of distamycin A on some biochemical functions of tissue cultures infected with herpes simplex virus. *Farmacol. Sci.* 31, 705–713.
- Vineis P., Terracini B., Ciccone G., Cignetti A., Colombo E., Donna A., Maffi L., Pisa R., Ricci P., Zanini E. et al. Phenoxy herbicides and soft-tissue sarcomas in female rice weeder. A population-based case-referent study. *Scand. J. Work Environ. Health.* 1987, 13: 9-17.
- Wabinga H.R., Parkin D.M., Wabwire-Mangen F., Mugerwa J.W. Cancer in Kampala, Uganda, in 1989-91: changes in incidence in the era of AIDS. *Int. J. Cancer.* 1993, 54: 26-36.

- Wang F.Z., Akula S.M., Sharma-Walia N., Zeng L., Chandran B. Human herpesvirus 8 envelope glycoprotein B mediates cell adhesion via its RGD sequence. *J. Virol.* 2003, 77: 3131-47.
- Wang Q.J., Jenkins F.J., Jacobson L.P., Kingsley L.A., Day R.D., Zhang Z.W., Meng Y.X., Pellett P.E., Kousoulas K.G., Baghian A., Rinaldo C.R. Jr. Primary human herpesvirus 8 infection generates a broadly specific CD8(+) T-cell response to viral lytic cycle proteins. *Blood.* 2001, 97: 2366-73.
- Wang S., Liu S., Wu M.H., Geng Y. and Wood C. Identification of a cellular protein that interacts and synergizes with the RTA (ORF50) protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in transcriptional activation. *J. Virol.* 2001b, 75: 11961–11973.
- Wang S., Liu S., Wu M.H., Geng Y. and Wood C. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus-8 ORF50 gene product contains a potent C-terminal activation domain which activates gene expression via a specific target sequence. *Arch. Virol.* 2001a, 146: 1415–1426.
- West J, Blossom D. Upregulation of the TLR3 pathway by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus during primary
- Whitby D., Luppi M., Barozzi P. et al. Human herpesvirus 8 seroprevalence in blood donors and lymphoma patients from different regions of Italy. *J. Natl. Cancer Inst.* 1998, 90: 395–397.
- Yates J.A., Zakai N.A., Griffith R.C., Wing E.J., Schiffman F.J. Multicentric Castleman disease, Kaposi sarcoma, hemophagocytic syndrome, and a novel HHV8-lymphoproliferative disorder. *AIDS Read.* 2007, 17: 596-8, 601.
- Yimin Y., Jodi B. Black, Cynthia S. Goldsmith, Philip J. Browning, Kapil, Bhalla, and Margaret K. Offerman. Induction of human herpesvirus-8 DNA replication and transcription by butyrate and TPA in BCBL-1 cells. *Journal of General Virology.* 1999, 80: 83–90.
- Yu Y., Wang S.E. and Hayward G.S. The KSHV immediate-early transcription factor RTA encodes ubiquitin E3 ligase activity that targets IRF7 for proteasome-mediated degradation. *Immunity.* 2005, 22: 59-70.
- Yu, S., Wang, Q.-M., Wang, X., Liu, D., Zhang, W., Ye, T., Yang, X., Pan, W., 2015. Liposome incorporated ion sensitive in situ gels for ophthalmic delivery of timolol maleate. *Int. J. Pharm.* 480, 128–136.126
- Zeng Y., Zhang X., Huang H., Cheng L., Yao S., Qin D., Chen X., Tang Q., Lv Z., Zhang L. and Lu C. Intracellular Tat of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activates Lytic Cycle Replication of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus: Role of JAK/STAT Signaling. *J. Virol.* 2007, 81: 2401–2417.
- Zhong W. and Ganem D. Characterization of ribonucleoprotein complexes containing an abundant polyadenylated nuclear RNA encoded by kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8). *J. Virol.* 1997, 71: 1207-1212.
- Zhu F.X., Chong J.M., Wu L. and Yuan Y. Virion proteins of kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. *J. Virol.* 2005, 79: 800-811.

- Zhu F.X., King S.M., Smith E.J., Levy D.E. and Yuan Y. A Kaposi's sarcoma-associated herpesviral protein inhibits virus-mediated induction of type I interferon by blocking IRF-7 phosphorylation and nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 16: 5573-5578.
- Zhu F.X., Li X., Zhou F., Gao S.J. and Yuan Y. Functional characterization of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus ORF45 by bacterial artificial chromosomebased mutagenesis. *J. Virol.* 2006, 80: 12187-12196.
- Ziegler J.L. Endemic Kaposi's sarcoma in Africa and local volcanic soils. *Lancet.* 1993, 342: 1348-1351.
- [Ziegler J.L., Katongole-Mbidde E.](#) Kaposi's sarcoma in childhood: an analysis of 100 cases from Uganda and relationship to HIV infection. *Int. J. Cancer.* 1996, 65: 200-3.
- Zong J.C., Ciufo D.M., Alcendor D.J., Wan X., Nicholas J., Browning P.J., Rady P.L., Tying S.K., Orenstein J.M., Rabkin C.S., Su I.J., Powell K.F., Croxson M., Foreman K.E., Nickoloff B.J., Alkan S., Hayward G.S. High-level variability in the ORF-K1 membrane protein gene at the left end of the Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus genome defines four major virus subtypes and multiple variants or clades in different human populations. *J. Virol.* 1999, 73: 4156-70.