

VIRUS DI EPSTEIN BARR (EBV)

L'EBV è un grosso herpes virus di 180 kb panendemico che è associato con una varietà di patologie benigne o maligne. L'infezione primaria può essere dimostrata in più del 90% della popolazione mondiale.

Forme benigne: forme subcliniche o modeste di mononucleosi infettiva. Più raramente provoca forme severe, questi pazienti hanno un rischio di sviluppare leucemie o linfomi moltiplicato per 10.

FORME MALIGNI: L'EBV

- 1) è direttamente implicato nello sviluppo del carcinoma nasofaringeo (Clna)
 - 2) è un cofattore nello sviluppo del linfoma di Burkitt (centroafrica)
 - 3) è implicato nel 50 dei linfomi di Hodgkin.
 - 4) è responsabile dei linfomi oligo o policlonali che si sviluppano ,in soggetti immunodepressi.
- In vitro e in vivo l'EBV può immortalizzare linfociti B umani in cui persiste allo stato latente come episoma endonucleare.

RECETTORI CELLULARI E VIRALI

Il virus si lega attraverso la glicoproteina virale GP/220 alla molecola CD21 che è il recettore per il fattore C3d del complemento.

Per la penetrazione del virus è necessaria una proteina fusogena la GP 85 il cui contorecettore è ancora sconosciuto.

IL CD21 è espresso dai linfociti B da certi linfociti t e da cellule epiteliali (nasofaringe, e vie genitali) che sono i bersagli principali del virus. Le cellule epiteliali esprimono IL CD21 in funzione della fase di differenziazione e potrebbero essere il serbatoio naturale del virus che si replica soltanto in un piccolo numero di cellule.

Nonostante tutte le cellule B o pre-B posseggano il recettore solo una minoranza di esse è competente per l'azione trasformante del virus. Esistono quindi fattori cellulari che determinano strettamente la sensibilità al virus.

Cellule B o pre-B fetali del midollo osseo sono sensibili al 60%

Cellule adulte B normali meno del 10% (0,1-10%) sono sensibili.

Cellule B o pre-B adulte del midollo osseo sono resistenti. Queste cellule rispondono alla infezione virale con un numero limitato di repliche cellulari (5) e con produzione di immunoglobuline.

FASI DELLA TRASFORMAZIONE VIRALE

La quantità di CD21 alla superficie non è correlata colla efficienza di trasformazione. Dopo la penetrazione del virus si osserva 1) un lento aumento del Ca^{++} in un'unica onda, 2) traslocazione e attivazione della PKC, con 3) rapida alcalinizzazione del citosol, 4) fosforilazione specifica e rapida di due proteine di 130-140 e 55-60 kd. Queste tappe metaboliche precoci sono bloccate trattando le cellule infettate con EGTA (blocco del flusso del Ca^{++}) o con amiloride (inibitore della pompa Na^{+}/K^{+}). Questo blocco della trasformazione non interferisce colla entrata del virus o con la lettura di geni virali precoci a 18 ore dall'inizio della infezione (EBNA-1 ,BKRF-1) . Solo la reintroduzione di Ca^{++} o di Na^{+} può rilanciare il processo di trasformazione.

Nel 10% delle cellule si assiste quindi a trascrizione di geni virali precoci (EBNA, LMP, BKRF1 a partire dalla decima ora), sintesi di DNA cellulare (40h) e produzione e secrezione di immunoglobuline.

Nello 1% delle cellule può verificarsi immortalizzazione. Nelle cellule trasformate il virus entra in una fase di infezione latente con replica episomiale che è sotto il controllo di un programma virale specifico. Raramente in meno dell'1% delle cellule si ha ciclo litico con espressione di geni virali tardivi tra cui l'IL-10 virale che ha un'azione immunodepressiva.

HERPES VIRUS MECCANISMI DI LATENZA E IMMUNOSOPPRESSIONE

CITOMEGALOVIRUS

I virus isolati da urine di pazienti non sono riconosciuti da sieri iperimmuni o da Moabs prodotti contro ceppi di citomegalovirus propagati serialmente in vitro.

Ciò è dovuto al fatto che i CMV integrano nel loro tegumento la $\beta 2$ microglobulina a partire dai fluidi organici.

- 1) La $\beta 2$ permette al CMV di infettare le cellule che esprimono gli HLA classe I con conseguente internalizzazione
- 2) La $\beta 2$ protegge il virus dal riconoscimento degli anticorpi circolanti.
- 3) non essendo antigenica (fa parte degli HLA classe I come struttura stabile) nel passaggio da un individuo a un altro (trapianti) non è riconosciuta come antigene estraneo, e perciò protegge il virus.
- 4) Nella fase di maturazione virale la proteina UL19 (il recettore per la $\beta 2$) complessa in sede intracitoplasmatica gli HLA classe I e ne impedisce il trasporto alla superficie cellulare.
- 5) il virus si lega alla $\beta 2$ perché codifica una proteina virale tipo HLA classe I che esprime un epitopo (un'ansa di 6 A.A.) che conserva la capacità di legarsi alla $\beta 2$.

HERPES SIMPLEX

- 1) neurotropismo
- 2) neurolatenza
- 3) Durante le reinfezioni non danneggia la cellula nervosa
- 4) non è riconosciuto dal sistema immunitario in modo efficace.

NEUROTROPISMO

L'HSV1 integra nel proprio tegumento una citochina, il FGFb (fattore di crescita per fibroblasti, cellule endoteliali e cellule nervose). Lo acquisisce al momento dell'infezione litica di cellule mucose epiteliali che lo esprimono in forma submembranaria. HSV1 induce un segnale di attivazione biologica specifico dello FGFb nel momento in cui entra in contatto col recettore della citochina e attraverso questo meccanismo il parassitaggio delle attività biosintetiche della cellula infettata inizia già nella fase di adesione.

NEUROLATENZA

Questo fenomeno è condizionato da fattori virali e da fattori cellulari. Dato che le cellule nervose sono cellule postmitotiche esse sono sprovviste del fattore trascrizionale OCT-1 che si lega alla proteina virale VP16 e forma un complesso di attivazione che si lega a sequenze octa-

meriche che sono a monte dei promotori dei geni precocissimi (α). In assenza della trascrizione dei geni α , il genoma virale entra in fase di latenza sotto forma di molecole circolari episomali, di struttura cromatinica endonucleari. Vi è assenza totale di sintesi di proteine virali, e la sola espressione stabile del genoma virale è costituita dalla presenza di due RNA non poliadrenilati e non protetti (LAT), che non sono trascritti e restano allo stato primario.

Le sequenze LAT e le sequenze IPCO situate sui siti opposti delle catene di DNA, sono parzialmente complementari: le sequenze LAT potrebbero perciò complessare ed inattivare le sequenze IPCO e favorire la latenza. Infine il promotore della unità di trascrizione LAT è più attivo nei neuroni.

Un fattore cellulare che potrebbe condizionare la fase di latenza è il NGF. In vitro infatti è possibile ottenere la cultura di neuroni dei gangli simpatici. L'infezione in vitro di queste cellule con HSV1 provoca il ciclo litico. Se però l'infezione avviene in presenza di NGF non si avrà infezione litica e assenza totale, stabile nel tempo, di produzione virale. si toglie dal terreno di cultura il NGF o se lo si blocca con MoAb specifici si osserva di nuovo produzione virale e ciclo litico.

REINFEZIONE

in vivo in caso di recidiva il virus che dalle cellule nervose arriva alla mucosa labiale e da origine un nuovo episodio infettivo, non provoca la lisi dei neuroni che lo ospitano contrariamente a quanto avviene in vitro. In vivo sembra che il virus migri lungo le vie nervose fino alla placca neuromucosa sotto forma di acido nucleinico infettante sprovvisto di proteine del tegumento.

INSENSIBILITÀ AL SISTEMA IMMUNITARIO

Cellule citolitiche (NK e lak) che siano messe in contatto con cellule infettate con HSV1 a partire dalla sedicesima ora sono paralizzate nella loro citolisi non solo verso le cellule infettate ma anche verso cellule tumorali sprovviste di HLA. E' necessario il contatto tra NK e cellule infettate per indurre l'anergia. il fenomeno è inibito trattando le cellule infettate con la tunicamicina (un inibitore della glicosilazione). Ciò suggerisce che l'anergia è prodotta da una glicoproteina virale.

RHINOVIRUS

Appartengono ai picornavirus e ne esistono due classi di sierotipi che comprendono più di 100 sottotipi. la classe più numerosa (il 90% di tutti i sierotipi) riconosce come recettore la proteina ICAM-1 .

La ICAM-1 è una proteina di adesione intercellulare il cui contorecettore è l'integrina LFA-1, che è espressa da cellule linfoidi attivate e da cellule citolitiche.

Il legame LFA-1/ICAM-1 è il meccanismo di adesione che stabilizza il contatto tra cellula citolitica e cellula bersaglio.

1) L'occupazione del sito icam-1 da parte del virus genera una competizione di legame con le cellule citolitiche, il che porta a una protezione delle cellule infettate.

2) Il sito recettoriale virale è situato nel canyon la cui larghezza massima è di 25 armstrong, da cui impossibilità di accesso per le immunoglobuline anche allo stato di frammenti FabI.

3) La zona che circonda il canyon è una struttura antigenica ipervariabile che muta sotto la

pressione selettiva immunitaria.

4) Durante il raffreddore si ha flogosi della mucosa nasale con liberazione locale di citochine infiammatorie che provocano un aumento di espressione di icam-1 sulle cellule epiteliali. il che porta a una ancor più efficiente diffusione locale del virus.

PAPILLOMAVIRUS

Sono piccoli virus a DNA (55 nm) sprovvisti di peploni, e perciò molto resistenti nell'ambiente esterno. Sono forniti di un DNA bicitenario circolare (8000 pb).

Hanno uno spiccato tropismo per gli epitelii malpighiani e provocano selettivamente patologie neoplastiche (benigne e/o maligne).

La replica virale è possibile solo nelle cellule allo stadio di differenziazione terminale.

La loro classificazione può essere fatta solo in genotipi e non in sierotipi in quanto esiste un antigene comune a tutti i papillomavirus umani o animali.

Fino ad oggi sono stati identificati più di 50 genotipi: si parla di un nuovo genotipo quando l'isolato virale presenta meno del 50% di omologia di sequenza con i genotipi già repertoriati. I papillomavirus provocano soprattutto patologie cutanee (verruche), o patologie dei tessuti della sfera anogenitale (condilomi, displasie epiteliali, carcinomi).

I ceppi responsabili di patologie cutanee non sono coinvolti nello sviluppo delle patologie anogenitali. Queste ultime devono perciò essere considerate e trattate come malattie sessualmente trasmissibili.

I genotipi 6 e 11 (HPV6 e HPV11) sono isolati nel 90% dei condilomi acuminati e nel 30% dei papillomi orali.

I genotipi HPV16, HPV18 sono isolati rispettivamente nel 50% e nel 20% dei carcinomi anogenitali, mentre i genotipi HPV33, HPV31 e HPV11 sono isolati in un ulteriore 10% di questi carcinomi. L'HPV16 è stato anche isolato in rari casi di carcinomi orali, faringei o del polmone.

L'HPV16 E11 provocano una lesione istopatologica caratteristica definita koilocitosi che corrisponde all'accumulo endocellulare del prodotto del gene E4.

L'HPV16 e 18 provocano invece una lesione istopatologica definita di tipo bowenoide caratterizzata da marcata atipia nucleare ed immagini di carcinoma in situ. In tutte le linee cellulari derivate da questo tipo di tumori si isolano i genotipi HPV 16 e 18. In vivo i ceppi HPV 6 e 11 sono sempre in forma episomiale.

Nelle lesioni precoci di tipo bowenoide e nei carcinomi in situ, l'HPV 16 e 18 sono presenti come forme episomiali mentre nei tumori primari la presenza di forme integrate è la regola.

Nelle linee cellulari i papillomavirus sono sempre in forma integrata.

L'HPV 6 e 11 in vivo sono sempre in fase di attiva replica virale e sono perciò facilmente trasmissibili per via sessuale.

Mentre l'HPV 16 e 18 dato che spesso provocano il blocco della differenziazione sono raramente in fase di attiva replica virale, ciò nonostante la possibilità di contagio sessuale esiste, in quanto sono stati effettuati ripetuti isolamenti di uno stesso clonotipo sul pene di partner sessuali.

MECCANISMI MOLECOLARI DI TRASFORMAZIONE

La prima tappa è quella del passaggio da forma episomiale a forma integrata. Per integrarsi il

genoma deve linearizzarsi e il punto di rottura è nel gene E2 che regola l'espressione dei geni E6 e E7.

Nelle forme integrate quindi si osserva trascrizione incontrollata e continua produzione nel tempo dei prodotti dei geni E6 e E7.

Il genoma dei papillomavirus contiene tre geni a potenziale azione trasformante: E5, E6, E7. Schematizzando si può dire che:

E5 stimola la proliferazione cellulare

E6 blocca la differenziazione

E7 immortalizza

I prodotti dei geni E6 e E7 si complessano ai prodotti di due anti oncogeni (P53 e RB). Si associano cioè a delle proteine cellulari che normalmente regolano funzioni cellulari, quali la proliferazione e la differenziazione e ne bloccano l'azione.

Il prodotto del gene E5 mima l'azione di fattore di crescita (è attivo soprattutto in fibropapillomi).

La proteina E6 si lega alla P53, ne accelera la degradazione e ne blocca l'attività di repressione che la P53 esercita sul promotore di geni inducibili (che contengono una TATA box).

La P53 è una fosfoproteina nucleare implicata nel controllo della proliferazione della differenziazione e dell'apoptosi. Forme mutate della P53 sono un reperto frequente in molti tumori solidi.

La P53 normale regola la crescita cellulare e blocca l'azione di molti oncogeni. Mentre le forme mutate stimolano queste funzioni.

Il complesso E6/P53 normale in vitro ha un'azione trasformante

Il prodotto del gene E7 si lega al prodotto del gene cellulare RB.

RB è un regolatore della proliferazione. In vivo la perdita, o l'inattivazione del gene RB, è legata alla insorgenza di retinoblastomi o di tumori renali (sono patologie neoplastiche trasmesse su base genetica).

In vitro E7 attiva il gene E2 della regione E1A degli adenovirus e può quindi aumentarne il potenziale trasformante.

Il gene E1A contiene due sequenze la 12S che collabora con RAS e la 13S che complessa RB. In vitro il complesso E7/RB regola la proliferazione e favorisce l'immortalizzazione senza causare il blocco della differenziazione.

Se si aggiunge per trasfezione alla cellule portatrici del transgene E7 un transgene E6 si osserva blocco della differenziazione e incremento dei tassi di proliferazione.

E5 codifica per una piccola proteina di 7kd associata alla membrana, che è sufficiente da sola in vitro a provocare stabili alterazioni della crescita e della morfologia cellulare. E5 è il più piccolo prodotto trasformante conosciuto, è portatore di due siti attivi: 1) un piccolo sito attivo di 7 amminoacidi e 2) una regione idrofobica con un singolo residuo idrofilico, che si lega a una proteina di membrana. Questo sito ha forti omologie di sequenza con il PDGF che è un potente fattore di crescita per fibroblasti e cellule epiteliali.

E5 interagisce con la catena β del recettore del PDGF e ne mima permanentemente il segnale di attivazione (tirosin fosforilazione del recettore) il che scatena uno stimolo continuo della proliferazione.

L'azione di E5, E6, ed E7 sono importanti nelle fasi iniziali della carcinogenesi in vivo, dato che

questi geni sono ugualmente attivati in linee cellulari a bassa malignità.

Altri fattori sono perciò importanti nella progressione tumorale in vivo: fattori ambientali, genetici, cellulari e interazioni con altri agenti infettivi (HSV2, HIV, EBV).

Esempi animali di progressione multifattoriale nelle patologie da HPV

conigli: 1) fattore genetico nella specie *sylvilagus* si ha 50% di regressione mentre nella specie *oryctolagus* solo il 10%.

2) fattore ambientale la malattia si manifesta solo negli stati bagnati dal missisipi.

carcinomi digestivi dei bovini: 1) fattore geografico Scozia e nord dell'Inghilterra.

2) fattore ambientale ingestione di una felce tossica che provoca una sindrome radiomimetica.

3) Fattore virale specifico solo il genotipo BPV4 provoca epiteliomi dell'intestino mentre i genotipi BPV 1 e 2 provocano tumori della vescica

Esempio umano evoluzione in carcinoma di papillomi cutanei (epidermodisplasia bollosa verruciforme).

1) fattore genetico, è una malattia a trasmissione autosomica recessiva

2) immunodepressione in quanto si verifica una papillomatosi multipla provocata cioè dalla infezione di più genotipi

3) fattore ambientale la progressione tumorale si manifesta nelle zone cutanee esposte alla luce solare.

4) fattore virale specifico l'evoluzione tumorale si manifesta solo nei papillomi provocati da HPV5 e HPV8 e dopo esposizione alla luce solare.

Questi appunti sono stati inviati da utenti alla redazione del portale www.universinet.it.

Se questi appunti sono tuoi e non vuoi più che siano pubblicati, oppure se hai riscontrato degli errori nei contenuti, contattaci all'indirizzo email: problemi@universinet.it.

Se anche tu vuoi condividere i tuoi appunti con la community del portale, inviaceli all'indirizzo: appunti@universinet.it