



UNIVERSITÀ DI PISA

Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali  
Corso di Laurea in Scienze e Tecnologie  
Biomolecolari

---

TESI DI LAUREA

*Studio "in vitro" dell'interazione tra  
DNA di TTV e Toll-like  
receptor 9*

RELATORI

Prof. Luca Ceccherini-Nelli

Dr. Fabrizio Maggi

CANDIDATA

Martina Piras

---

Anno accademico 2008-2009

# INDICE

INDICE	1
ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI	4
RIASSUNTO	5
ABSTRACT	7
SEZIONE I: INTRODUZIONE	9
<i>Gli anello virus</i>	10
<b>Il virione: genoma, replicazione, eterogeneità genetica, epidemiologia</b>	18
<b>Interazione fra TTV e l'ospite: infezione e diagnostica di laboratorio</b>	38
<b>Associazione con la malattia</b>	45
<i>I recettori Toll-like</i>	50
<b>Recettore Toll-like 9</b>	57
<i>Scopo della tesi</i>	61
SEZIONE II: MATERIALI E METODI	62
<b>Modello sperimentale</b>	63
<b>Preparazione del DNA di TTV</b>	64

<b>Amplificazione del DNA di TTV</b>	<b>66</b>
<b>Sequenziamento</b>	<b>68</b>
<b>Clonaggio</b>	<b>69</b>
<b>Estrazione plasmidica endotoxin-free</b>	<b>73</b>
<b>Digestione plasmidica</b>	<b>74</b>
<b>Preparazione dei complessi DNA-lipofectina</b>	<b>75</b>
<b>Estrazione dell'RNA totale</b>	<b>75</b>
<b>Real-time PCR</b>	<b>76</b>
<b>Analisi dell'espressione genica delle citochine</b>	<b>79</b>
<b>Analisi della sintesi delle citochine</b>	<b>81</b>
<b>Analisi statistica</b>	<b>84</b>
<b>SEZIONE III: RISULTATI</b>	<b>85</b>
<b>Messa a punto di un sistema in vitro per determinare l'interazione DNA/TLR9</b>	<b>86</b>
<b>TTV e secrezione delle citochine</b>	<b>89</b>
<b>Espressione genica e sintesi dell'interleuchina-4</b>	<b>91</b>
<b>Dimostrazione dell'interazione fra il DNA di TTV e recettore TLR9</b>	<b>93</b>

SEZIONE IV: DISCUSSIONE	97
CONCLUSIONI	103
RINGRAZIAMENTI	104
SEZIONE V: RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	105

## Elenco abbreviazioni

aa aminoacido/i.

ALT Alanine aminotransferase, alanina aminotransferasi.

CAV Chicken anemia virus, virus dell'anemia del pollo.

CITV Comitato internazionale per la tassonomia dei virus

IL Interleuchina

INF Interferon, Interferone.

HBV Hepatitis B virus, virus dell'epatite B.

HCV Hepatitis C virus, virus dell'epatite C.

HIV Human immunodeficiency virus, virus dell'immunodeficienza umana.

HVR Hypervariable Region, regione ipervariabile.

LPS Lipopolisaccaride.

nt nucleotide/i.

ORF Open Reading Frame, cornice di lettura aperta.

PCR Polymerase chain reaction, reazione a catena della polimerasi.

PCV Porcine circovirus, circovirus porcino.

RDA Representational difference analysis, analisi di rappresentazione differenziale.

TLMV TTV-Like-Mini-Virus.

TLR9 Toll-like receptor 9, recettore Toll-like 9

TTMV TorqueTeno-Mini-Virus.

TTV TorqueTeno virus.

UTR Untranslated region, regione non tradotta.

## Riassunto

Nel 1997 nel siero di un paziente con epatite post-trasfusionale criptogenica fu scoperto un nuovo virus chiamato TorqueTenoVirus (TTV), prototipo del nuovo genere Anellovirus. Il virione di TTV risulta di piccole dimensioni, privo di involucro esterno, con un genoma a singolo filamento di DNA circolare a polarità negativa. Ad oggi TTV è ancora un virus orfano dato che gli studi sul suo ruolo patogeno sono stati inconcludenti anche perché resi particolarmente difficili dall'elevata prevalenza di TTV nella popolazione generale e dalla frequente cronicizzazione dell'infezione. Tuttavia, visto che TTV infetta cellule mononucleate del sangue periferico attivate e che, in bambini affetti da patologie respiratorie, i titoli del virus correlano inversamente con la percentuale di linfociti T circolanti e positivamente quella dei linfociti B, sembra plausibile che TTV sia in grado di modulare la risposta immune.

Lo scopo che la tesi si propone è quello di indagare le relazioni che TTV instaura con il sistema immunitario dell'ospite. A tal fine è stata studiata l'interazione tra il DNA di TTV e il Toll-like 9 (TLR9), membro della famiglia dei TLRs, recettori fondamentali per la clearance dei patogeni attraverso l'immunità innata e acquisita. In particolare, il TLR9 riconosce specifici motivi CpG non metilati fortemente presenti a livello dei genomi virali. Per questo studio è stato utilizzato un sistema "in vitro" che permette la determinazione dell'espressione genica e della produzione di citochine proinfiammatorie (IL-12, IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$ ) da parte di cellule di milza di topo, dopo stimolazione con il DNA di TTV.

Il substrato cellulare, scelto in quanto particolarmente ricco di TLR9, è stato stimolato, oltre che col DNA virale, anche con altri induttori fra cui ODN sintetici contenenti motivi CpG e concanavalina A.

I risultati hanno dimostrato come il DNA di TTV sia in grado di indurre incrementi statisticamente significativi di alcune citochine, in particolare di IL-6 e IFN- $\gamma$ . Da sottolineare come l'incremento d'espressione delle citochine sia dipendente dalle quantità di DNA virale utilizzato. Ciò ha fatto ipotizzare, nell'infezione naturale, un ruolo fondamentale della carica virale. Per confermare i risultati ottenuti sono state dosate le citochine prodotte nel sovrantante delle cellule (IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ ). Tale dosaggio ha mostrato un netto incremento di IFN- $\gamma$  e di IL-6 ma non di IL-4 a seguito della stimolazione con DNA di TTV e/o con ODN, dimostrando come ad un'aumentata espressione del gene corrisponda la produzione della proteina. È stato inoltre comprovato il coinvolgimento del recettore TLR9 nell'induzione alla produzione di citochine utilizzando la cloroquina che opera un blocco selettivo del recettore. I risultati di tale esperimento mostrano come le cellule di milza di topo, stimolate con il DNA di TTV e con ODN, in seguito a pre-trattamento con cloroquina, riducono quasi totalmente l'espressione dell'IFN- $\gamma$ . Tale effetto invece non è stato osservato quando le stesse cellule, in presenza di cloroquina, sono trattate con Con A. Il passo successivo è stato quello di confermare il dato con un metodo più specifico, ossia il silenziamento genico del TLR9, ottenuto mediante la strategia degli RNA-interference. I risultati confermano il dato precedente, indicando chiaramente come la produzione di citochine, sia mediata dall'interazione del DNA di TTV con il recettore Toll-like 9

# Abstract

In 1997, a new virus was discovered in the serum of a patient with post-transfusion cryptogenic hepatitis and called TorqueTenoVirus (TTV). TTV, now the prototype of the novel floating genus *Anellovirus*, has a small, unenveloped particle containing a single-stranded circular DNA genome. TTV is still an orphan virus: all the studies carried out for investigating its pathogenic role have been inconclusive, also because of the high prevalence of TTV in the general population and its remarkable ability to produce persistent, possibly life-long infections. However, it's currently known that TTV replicates in activated peripheral mononuclear cells and that its load, in children affected by respiratory diseases, correlate inversely with circulating T lymphocytes' percentage and positively with B lymphocytes. For the above properties, it's plausible that TTV has established a finely successful interaction with the infected host and that it could be able to modulate the immune response.

The aim of this study is to investigate the relationships that TTV establishes with the host immune system. To this purpose, we studied the interaction between the DNA of TTV and the Toll-like receptor 9 (TLR9), a member of the family of TLRs, receptors essential for the clearance of pathogens through the innate and acquired immunity. In particular, TLR9 recognizes specific unmethylated CpG motifs strongly present at the level of viral genomes. For the study we used mouse spleen cells and we determined the gene expression and production of pro-inflammatory cytokines (IL-12, IL-6, IL-10 and IFN- $\gamma$ ) after their stimulation with TTV DNA. The cells, selected since particularly rich in TLR9, were stimulated, as well as with viral DNA, with other inducers including synthetic ODN containing CpG motifs and Concanavalin A.

The results demonstrated that TTV DNA is able to induce statistically significant increases of some cytokines, particularly IL-6 and IFN- $\gamma$  and that such an increased expression of cytokines was dependent on the amount of viral DNA used. These findings demonstrate the capacity of TTV to modulate the immune system and show the essential role of viral load in natural infection. To confirm the above results, some cytokines (IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ ) were measured in cells supernatants. A marked increase of IFN- $\gamma$  and IL-6 but not of IL-4 was found following stimulation with TTV DNA, demonstrating how to an increased gene expression corresponds an increased protein production. The involvement of the TLR9 in cytokines induction was proved using chloroquine, which inhibits the early phases of receptor's activation. The results of this experiment shows that mouse spleen cells, pre-treated with chloroquine and stimulated with TTV DNA and ODN, reduce almost completely the expression of IFN- $\gamma$ . This effect was not observed when the same cells, treated with chloroquine, were stimulated with Concanavalin A. The same results were also obtained when we silenced the TLR9 gene by RNA-interference strategy, thus clearly demonstrating that the cytokines production is mediated by a direct interaction between TTV DNA and TLR9.