

# UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PISA

Dipartimento di Patologia Sperimentale, Biotecnologie Mediche,  
Infettivologia ed Epidemiologia  
Sezione Virologia



**Dottorato di ricerca in:**  
***“Virologia fondamentale e clinica”***

Ciclo XXII 2007-2009

Settore scientifico disciplinare: MED/07

## ***Studio delle modalità e delle conseguenze dell'interazione fra TTV e recettori dell'immunità innata***

Presidente del Dottorato

***Prof. Luca Ceccherini-Nelli***

Dottoranda

***Dr.ssa Valentina Ricci***

# INDICE

<b>INDICE</b>	1
<b>ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI</b>	3
<b>RIASSUNTO</b>	5
<b>ABSTRACT</b>	9
<b><i>SEZIONE I:</i></b> <b><i>INTRODUZIONE</i></b>	12
<b><i>Gli anellovirus</i></b>	13
<b>Il virione:</b> <b>genoma, replicazione, eterogeneità genetica, epidemiologia</b>	19
<b>Interazione fra TTV e l'ospite</b>	31
<b>Associazione con la malattia</b>	35
<b><i>I recettori Toll-like</i></b>	38
<b><i>Il Recettore TLR9</i></b>	45
<b><i>SEZIONE II:</i></b> <b><i>MATERIALI E METODI</i></b>	48
<b>Modello sperimentale</b>	49
<b>Preparazione del DNA virale dell'isolato ViPiSal</b>	50
<b>Amplificazione dell'isolato ViPiSal</b>	51
<b>Sequenziamento dell'isolato ViPiSal</b>	52
<b>Clonaggio dell'isolato ViPiSal</b>	53
<b>Estrazione plasmidica endotoxin-free</b>	57
<b>Digestione plasmidica dell'isolato ViPiSal</b>	58
<b>Accumulo del DNA di differenti isolati di TTV</b>	58

<b>Preparazione dei complessi DNA-lipofectina</b>	59
<b>Estrazione dell'RNA totale</b>	60
<b>Real-time PCR</b>	60
<b>Analisi dell'espressione genica delle citochine</b>	63
<b>Dosaggio delle citochine mediante Bio-plex System</b>	64
<b>Silenziamento genico del recettore TLR9</b>	67
<b>Analisi statistica</b>	68
<b><i>SEZIONE III: RISULTATI</i></b>	69
<b>Messa a punto di un modello sperimentale "in vitro" e analisi dell'espressione genica delle citochine</b>	70
<b>Dosaggio delle citochine prodotte dall'isolato ViPiSal</b>	73
<b>Dimostrazione dell'interazione fra il DNA di TTV e recettore TLR9</b>	76
<b>Sinergismo fra TTV- DNA e ODN</b>	80
<b>Studio dell'effetto di isolati diversi di TTV sul sistema immunitario dell'ospite</b>	81
<b>Studio dell'effetto del genoma di TTV su una linea cellulare di origine respiratoria</b>	82
<b><i>SEZIONE IV: DISCUSSIONE</i></b>	87
<b>RINGRAZIAMENTI</b>	95
<b><i>SEZIONE V: RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI</i></b>	97

## **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.

iNOS inducibile nitric oxide synthase

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.

MRA Malattie Respiratorie Acute

NO nitric oxide

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.

SD standard deviation. Deviazioni standard

TLMV TTV-Like-Mini-Virus.

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

TTMDV Torqueteno-Midi-Virus

TTMV TorqueTeno-Mini-Virus.

TTV TorqueTeno virus.

UTR Untraslated region, regione non tradotta.

## **Riassunto**

La recente dimostrazione che i Toll-like receptors (TLR) rivestono un ruolo essenziale in molti processi cellulari ha reso di fondamentale importanza studi su queste molecole. Ad oggi sono stati identificati nell'uomo 11 TLRs e sembra che ogni recettore sia in grado di riconoscere solo un pannello molto ristretto di componenti o di molecole prodotte da batteri, virus, funghi e protozoi. In particolare, è noto come l'attivazione del TLR9, localizzato nel reticolo endoplasmatico, avviene in risposta al legame di sequenze di DNA virale o batterico non metilate con motivi CpG. Tale legame porta all'innescamento di una cascata di eventi che culmina con l'induzione di citochine pro-infiammatorie (IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12) (Hemmi et al., 2000). È stato visto che i motivi CpG, sequenze ricche in guanina e citosina, particolarmente abbondanti in alcuni virus, possono interagire con TLR9 attivando o inibendo i processi cellulari regolati da questo recettore influenzando di conseguenza la bio-fisiologia cellulare. La definizione di questi motivi e la loro caratterizzazione anche nel genoma di virus persistenti ha portato ad indagare e studiare la relazione che si instaura tra il Torquetenovirus (TTV) e il recettore TLR9. TTV, prototipo della famiglia Anelloviridae, è un virus di piccole dimensioni con un genoma a DNA di 3,8 Kb costituito da un singolo filamento circolare a polarità negativa. Caratteristica principale di questo virus sono: la sua elevata prevalenza nella popolazione sana e la sua ubiquitarità nell'ospite infettato. Una volta acquisito il virus sembra persistere per anni nel sangue della maggior parte dei soggetti infetti, suggerendo quindi che la cronicizzazione dell'infezione è l'evenienza più comune. Inoltre, il genoma di TTV è stato amplificato in numerosi fluidi biologici ed è stato rilevato in molti tessuti evidenziando come il virus sia capace di replicarsi nei tessuti che infetta. Studi precedenti, condotti nel laboratorio dove ho svolto la mia attività di ricerca, hanno dimostrato che TTV infetta produttivamente cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) attivate, mentre non replica in cellule linfoidi che si trovano in fase stazionaria (Maggi et al., 2001). Inoltre, in bambini affetti da patologie respiratorie di varia gravità, i titoli di TTV hanno mostrato una correlazione inversa con le percentuali di linfociti T circolanti (in particolare CD3+ e CD4+) e una correlazione diretta con i linfociti B (Maggi et al., 2003). Tali evidenze hanno suggerito la possibilità che TTV possa avere un ruolo nel modulare la risposta immunitaria e sistemica, e nell'agire come cofattore nelle

patologie osservate. Date le caratteristiche di questo virus, il mio progetto di ricerca si è basato sullo studio di meccanismi con cui gli *Anellovirus* interagiscono con i recettori Toll-like, essenziali per la clearance dei patogeni nell'immunità innata e le conseguenze che questa interazione ha sul sistema immunitario e sulla capacità patogenetica di questi virus. Allo scopo di raggiungere l'obiettivo finale di questo studio sono state allestite due linee di ricerca. La prima linea ha avuto come obiettivo lo studio degli effetti dell'interazione tra il DNA di TTV e cellule di milza di topo. Per far ciò è stato necessario avere a disposizione genomi virali interi appartenenti a diversi genogruppi di TTV, in quanto è noto come TTV mostri una straordinaria eterogeneità genetica. E' plausibile che una tale eterogeneità genetica possa riflettersi in una differente capacità di interazione dei diversi isolati con il sistema immunitario dell'ospite. Abbiamo così utilizzato 5 cloni di genomi virali interi appartenenti a 4 diversi genogruppi. Per realizzare l'obiettivo della prima linea di ricerca 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. Il DNA di TTV utilizzato inizialmente è stato quello di un isolato di genogruppo 4 (DNA-TTV4). 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 fa ipotizzare, nell'infezione naturale, un ruolo fondamentale della carica virale. Per confermare i risultati ottenuti sono state dosate le citochine prodotte nel sovrnatante 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. Il passo successivo è stato quello di studiare il coinvolgimento del recettore TLR9, nell'attivazione delle citochine indotte dal DNA-TTV4, in due modi diversi. In un primo momento è stata utilizzata la cloroquina, che opera un blocco selettivo del recettore, e successivamente un metodo più specifico che utilizza la strategia degli RNA-interference (siRNA). I risultati degli esperimenti

hanno mostrato come le cellule di milza di topo, stimulate con il DNA-TTV4 sempre in associazione con la lipofectina o con ODN, in seguito a pre-trattamento con cloroquina riducono quasi totalmente l'espressione dell'IFN- $\gamma$  e che tali livelli di espressione sono significativamente ridotti (più dell'80%) dopo il trattamento con gli specifici siRNA. Al contrario l'uso sia della cloroquina che degli siRNA specifici per il TLR9 non ha mostrato alcun significativo effetto sull'espressione delle citochine prodotte dalla ConA, indicando chiaramente come la produzione di citochine da parte del DNA di TTV sia mediato dal recettore TLR9. Successivamente è stato allestito un esperimento in cui sono state dosate le citochine prodotte nel sovrantante delle cellule di milza di topo, dopo 16 ore dalla stimolazione con il DNA di TTV dei diversi isolati per vedere l'effetto della risposta immunitaria locale e sistemica dell'ospite. La lettura dei risultati, effettuata dopo 16 ore dalla stimolazione, evidenzia come l'isolato DNA-TTV4 appartenente al genogruppo 4, abbia una differente capacità di interazione con il sistema immunitario dell'ospite.

La seconda linea di ricerca ha avuto come obiettivo lo studio dell'effetto del genoma di TTV su una linea cellulare umana di origine respiratoria, le A549. La scelta di utilizzare tale linea cellulare deriva sia da studi presenti in letteratura (Jiang et al., 2009) sia dalla dimostrazione in precedenti studi, che il tratto respiratorio è sede di infezione primaria e continua replicazione di TTV (Maggi et al., 2003) e che i titoli del virus, trovati a livello del tratto respiratorio, sono correlati ad un aumentato livello di ossido nitrico (NO) nell'aria espirata. A tal fine è stata valutata la produzione di NO, mediante il reagente di Greiss, l'espressione del recettore TLR9 e l'attivazione dell'enzima inducibile iNOS, mediante Real-Time PCR. Uno studio preliminare, utilizzando come stimolo l'ODN 2216 ci ha permesso di determinare che la stimolazione con ODN 2216 induce la massima produzione di NO dopo 40 ore dalla stimolazione. Sulla base di questo risultato è stato condotto l'esperimento incubando le cellule A549 con il DNA di TTV per 40 ore. Come stimoli positivi in questo esperimento sono stati utilizzati l'ODN 2216 da solo e in associazione con il DNA di TTV ed è stato utilizzato anche un DNA genomico di controllo, che contiene all'interno della sua sequenza motivi CpG metilati e quindi non in grado di attivare il TLR9. Inoltre, è stata valutata l'espressione del recettore TLR9 e l'attivazione dell'enzima inducibile iNOS mediante Real-Time PCR. I risultati hanno mostrato una attivazione pressoché identica del recettore TLR9 da parte di tutti gli stimoli

utilizzati nell'esperimento, mentre l'enzima inducibile iNOS, è stato fortemente attivato dal DNA di TTV. Tutto ciò va a rafforzare quanto già dimostrato, ovvero il DNA di TTV attiva il recettore TLR9 che porta alla traslocazione nel nucleo del fattore di trascrizione Nf-Kb, il quale è coinvolto sia nell'espressione dei geni specifici per le citochine pro-infiammatorie quali IFN- $\gamma$  , IL-6 sia nell'attivare l'enzima inducibile iNOS deputato alla produzione di NO.

## ***Abstract***

Functional characterization of Toll-like receptors (TLRs) has established that innate immunity is a skillful system that detects invasion of microbial pathogens. Recognition of microbial components by TLRs initiates signal transduction pathways, which triggers expression of genes. These gene products control innate immune responses and further instruct development of antigen-specific acquired immunity. Particularly, TLR9 recognizes unmethylated CpG sequences in DNA molecules. CpG sites are relatively rare (~1%) on vertebrate genomes in comparison to bacterial genomes or viral DNA. TLR9 is expressed by numerous cells of the immune system such as dendritic cells, B lymphocytes and natural killer (NK) cells. TLR9 is expressed intracellularly, within the endosomal compartments and functions to alert the immune system of viral and bacterial infections by binding to DNA rich in CpG motifs. TLR9 signals leads to activation of the cells initiating pro-inflammatory reactions that result in the production of cytokines such as type-I inteferon and IL-12 (Hemmi et al., 2000). Starting from previous observations that certain DNA viruses have the potential to stimulate immune cells to produce IFN $\gamma$  and other proinflammatory cytokines through the unmethylated CpG motifs present in their genomes , we investigated whether such a property is shared by TTV. Torquetenovirus (TTV), the prototype of the anelloviruses, is characterized by a roughly spherical non-enveloped 30- to 32-nm capsid and a small, circular negative-sense single stranded (ss) DNA genome. Different TTV isolates are heterogeneous both in genome size (~3.5 to ~3.9 kb) and in genome sequence (nucleotide [nt] diversity up to over 50%), which has led to their classification into 5 widely diverse genogroups. The attempts to causally link TTV to a variety of human diseases have so far been unsuccessful, having at most found moderate associations between specific diseases and increased prevalence rates of the virus, leading to suggestions that TTV is completely apathogenic or even beneficial to the host. Failure to detect a direct causal relationship with clinical disease does not, however, exclude that TTV may harm the host in more subtle ways, for example by aggravating the course of diseases due to independent noxae. Indeed, studies have revealed interesting positive correlations between infection with specific TTV genogroups or especially active TTV replication and severity of certain diseases, including neoplasia, asthma and rheumatoid arthritis (Maggi et al., 2001 and 2003)). Since inflammation is a

particularly important component in at least some of these diseases, we considered it of interest to determine whether the DNA of TTV may represent a stimulus for the production of proinflammatory cytokines. In fact, recent studies have shown that, unlike that of mammals but similar to that of bacteria, the DNA of some viruses directly or indirectly activates a variety of cell types involved in immunity, including dendritic cells, macrophages and selected lymphocyte subpopulations, and drives the production of proinflammatory cytokines, including interferon (IFN) $\gamma$ , interleukin (IL)6, and IL12. The effect is mainly if not solely due to unmethylated cytidyl guanosyl dinucleotides (CpG), which are relatively frequent in bacterial and viral DNA but uncommon in vertebrate genomes.; this motifs are recognized by TLR9. In this project we investigated whether such a property is shared by TTV. Spleen cells of BALB/c mice incubated with TTV-Lipo (DNA of ViPiSAL (TTV-DNA4, a genogroup TTV isolate, complexed with lipofectin) expressed increased levels of IFN $\gamma$ , IL6, and IL10 RNAs, while the levels of IL4 and IL12 RNAs remained unchanged. In contrast, TTV DNA alone or lipofectin alone exerted no detectable effects. Lipofectin is known to spontaneously incorporate DNA, protecting it against nucleases and efficiently delivering it into a variety of cell types, including spleen cells (8, 53). It was thus concluded that the TTV DNA used can effectively activate proinflammatory gene transcription in immune cells, provided that it is associated with a substance capable of protecting and delivering it into the cells, that is of substituting for the viral capsid. Consistent with these findings, the stimulatory effect of TTV-Lipo on spleen cells was dependent on the dose of viral DNA incorporated in the liposomes and was reflected by increased concentrations of IFN $\gamma$  and IL6, but not IL4 in the supernatant of the cultures relative to what observed with sister cultures exposed to lipofectin alone. We subsequently performed two inhibition experiments to assess whether the above activity of TTV DNA4 was mediated by TLR9. Chloroquine, known to inhibit TLR9 activation due to its ability to block endosomal acidification, which is a prerequisite for TLR9-mediated recognition of unmethylated DNA and signaling (23, 41), completely blocked the activation of IFN $\gamma$ , IL6, and IL10 gene expression by TTV-Lipo, and the effect was confirmed by measuring the concentration of IFN $\gamma$  released in the culture supernatants. Also, a mixture of TLR9-specific siRNAs inhibited TTV-Lipo induced activation of IFN $\gamma$  RNA transcription by approximately 80%. Thus, collectively these findings clearly indicated that DNA-

TTV4 activity is mediated mainly, if not exclusively through TLR9. This endocytic receptor, that is expressed in a variety of cell types and triggers signal cascades that culminate in proinflammatory cytokines secretion, was originally identified as a bacterial DNA receptor but was later shown to be involved in innate sensing of some complex DNA viruses as well. Furthermore, TLR9 is known to intervene in the induction of Th1 adaptive immune responses and in B cell proliferation. After, to obtain an indication of how extensively the genetic diversity of TTV might reflect on the ability of its DNA to modulate proinflammatory cytokine production, we made an experiment with other 4 different isolates of TTV. The assay of the cytokine production, 16 hours after stimulation, showed a significant difference between TTV-DNA4 and the other isolates examined.

The aim, of the second part this research project, was the study of the genome viral effect on human alveolar basal epithelial cells, A549. We assessed the nitric oxide production, using the Griess Reagent, the TLR9 expression and the activation of iNOS enzyme, using Real-Time PCR. A preliminary study allowed us to determine that the stimulation with ODN 2216 induces the high nitric oxide production after 40 hours stimulation. On bases these results we made an experiment incubated the A549 cells with TTV-DNA for 40 hours. The results showed by all the stimuli used, an almost identical activation of TLR9, while the iNOS was strongly activated by TTV-DNA4. These results confirmed what has already showed, that is: TTV-DNA activate the TLR9, it induces the nuclear translocation of Nf-Kb which is involved in the expression of pro-inflammatory cytokine such as IFN- $\gamma$ , IL-6 and in the production of nitric oxide by inducible nitric oxide synthase.

# **Sezione I**

## ***Introduzione***

## **Anellovirus**

### **Cenni storici:**

Il progressivo miglioramento delle tecniche di indagine diagnostica e di biologia molecolare negli ultimi decenni, ha permesso di caratterizzare, dal punto di vista eziologico, gran parte delle epatopatie di origine sconosciuta. Ciò ha stimolato molte ricerche, condotte al fine di determinare la possibile esistenza di nuovi agenti patogeni implicati nel danno epatico. Uno di questi studi risale al 1997, data in cui Nishizawa e collaboratori (Nishizawa et al., 1997) identificarono nel siero di un paziente con epatite post-trasfusionale non-A non-G una sequenza di 500 nucleotidi, che ben presto fu riconosciuta appartenere ad un nuovo agente virale: dalle iniziali del paziente il virus fu chiamato TT (TTV). La tecnica che rese possibile l'identificazione del nuovo virus fu l'analisi di rappresentazione differenziale (RDA), tecnica sviluppata da Lisitsyn nel 1993 (Lisitsyn et Wigler, 1993). Tale tecnica permette l'identificazione di sequenze di DNA selettivamente espresse nei tessuti patologici quando confrontate con sequenze derivanti dai tessuti sani degli stessi soggetti. Le analisi che condussero all'identificazione di TTV, vennero svolte su campioni di siero prelevato nel momento in cui il paziente mostrava un picco nei livelli di transaminasi (ALT). Da questo siero venne estratto il DNA che successivamente fu confrontato con il DNA dello stesso individuo prelevato nel momento in cui i livelli di ALT risultavano normali. Le sequenze esclusive, riferite al momento del picco, furono successivamente confrontate con quelle disponibili in banca dati. Si arrivò in questo modo all'isolamento di un clone di circa 500 nucleotidi, denominato N22, il quale non presentava omologia con nessuna sequenza fino ad allora nota. Tale sequenza fu considerata il prototipo di un nuovo virus a DNA monocatenario lineare. In seguito Okamoto e collaboratori (Okamoto et al., 1998b) caratterizzarono, mediante metodiche quali clonaggio e sequenziamento, un genoma virale, apparentemente completo, di 3.739 nucleotidi (nt), denominato TA278. In realtà era stato sequenziato il 90% del genoma totale. Le ridotte dimensioni del virione, alcune caratteristiche della sequenza nucleotidica e la mancanza di envelope, indussero gli studiosi ad inserire provvisoriamente il virus nella famiglia Parvoviridae. Nel 1999, Miyata e collaboratori, evidenziando l'assenza nell'isolato TA278, delle strutture

palindromiche terminali caratteristiche dei parvovirus, identificarono una nuova regione di circa 113 nucleotidi ricca in guanina e citosina (GC) e, mediante metodica di PCR inversa, riuscirono a dimostrare la natura circolare del genoma virale. Questa scoperta, insieme ad alcune proprietà strutturali e molecolari che il virus mostrava condividere con i membri della famiglia *Circoviridae*, in particolare con il virus dell'anemia del pollo (CAV), spinsero a considerare TTV come il primo circovirus umano (Miyata et al., 1999). In seguito, sono state isolate numerose specie virali con caratteristiche strutturali ed elementi genomici simili a TTV, ma con variabilità genetica elevata: tra questi gli isolati PMV (Hallet et al., 2000), SANBAN (Hijikata et al., 1999) e YONBAN (Yakahashi et al., 2000a) aventi meno del 50% di omologia con il prototipo TA278. Questo quadro di specie virali altamente eterogenee dal punto di vista genetico divenne ancora più complesso con la scoperta di un altro gruppo di virus con genoma a singolo filamento di DNA circolare con proprietà intermedie tra TTV e CAV (Takahashi et al., 2000b), denominato inizialmente TLMV (TTV-Like-Mini-Virus), a sottolineare le dimensioni più piccole del genoma che risultava 2,9 Kb, contro le 3,8 Kb tipiche di TTV. Dalla scoperta di TTV ad oggi, sono stati effettuati molti studi per definire le sue proprietà molecolari e per determinare il suo reale ruolo patogeno. L'iniziale isolamento di TTV nel siero di un paziente con epatite criptogenetica fece supporre che questo virus avesse un ruolo nel causare malattie del fegato, ma successivi studi volti a verificare questa ipotesi hanno spesso fornito risultati discordanti. Molti altri studi hanno preso in esame la possibilità che TTV potesse essere coinvolto in patologie extraepatiche, tuttavia in nessun caso è stato possibile arrivare ad una conclusione certa. L'elevata prevalenza di TTV nella popolazione generale ha perfino suggerito che il virus potesse essere un semplice commensale apotogeno dell'uomo (Griffiths, 1999; Mushahwar, 2000). Tuttavia, non essendo stato associato ad alcuna patologia, TTV è tutt'oggi considerato un virus "orfano".

L'assenza dell'involucro pericapsidico e il possesso di un genoma lineare monocatenario a DNA, indussero inizialmente alla classificazione di TTV nella famiglia *Parvoviridae* (Okamoto et al., 1998b). Successivamente la scoperta di una regione ricca in GC che circolarizzava il genoma virale (Miyata et al., 1999), indusse ad una nuova classificazione di TTV il quale venne riconosciuto come appartenente alla famiglia *Circoviridae* (Hijikata et al., 1999). Tale famiglia è

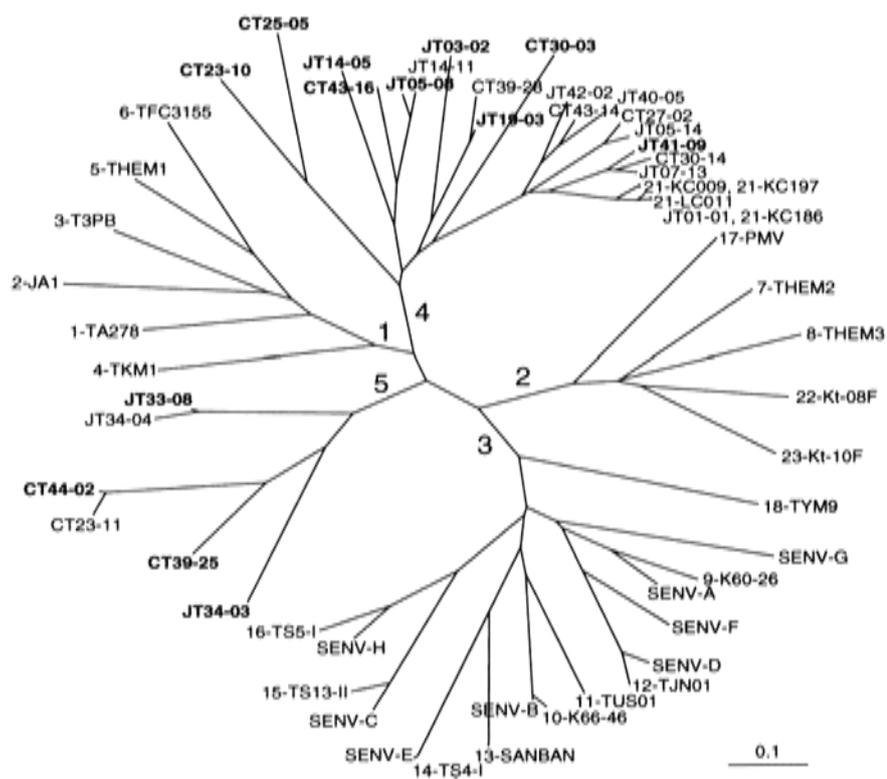
composta da virus privi di pericapside, il cui genoma è rappresentato da un singolo filamento circolare di DNA racchiuso in un capsidico icosaedrico composto da un'unica proteina strutturale (Todd et al., 1990). I principali circovirus animali sono tre: il circovirus porcino (PCV), il virus della malattia del becco e delle penne dei pappagalli (BFDV), ed il virus dell'anemia del pollo (CAV). Studiando in maniera più approfondita TTV, sono state evidenziate rilevanti differenze, soprattutto per quanto concerne la sequenza nucleotidica, tra i circovirus animali e TTV. Nonostante ciò, sono state riscontrate alcune analogie fra CAV e TTV, infatti entrambi posseggono un genoma circolare a singolo filamento a polarità negativa, le cui dimensioni sono di 3231 (CAV) e 3853 (TTV) nucleotidi. Inoltre presentano ambedue una regione genomica codificante ORF suddivisa in frammenti sovrapposti (Iwata et al., 1998), ed una regione non tradotta UTR ricca in GC con notevole omologia (Miyata et al., 1999). Sebbene TTV condivida alcune caratteristiche con CAV, molte delle sue peculiarità rimangono uniche, tanto che fu proposto di considerare il virus come il solo rappresentante di una nuova famiglia per la quale fu suggerito il nome *Circinoviridae* (Mushahwar et al., 1999). In seguito alla scoperta del TT-like mini virus (TLMV), il quale presentava caratteristiche intermedie tra TTV e CAV, fu suggerito di classificare i tre virus in una nuova famiglia detta *Paracircoviridae* (Takahashi et al., 2000b). Successivamente al fine di stabilire una definitiva classificazione, il Comitato Internazionale per la Tassonomia dei Virus (CITV) ha nominato un gruppo di studio, il quale ha proprio recentemente approvato la tassonomia di TTV. Oggi TTV e i virus relati sono stati classificati nella nuova famiglia delle *Anelloviridae* (dal latino "anello"). Inoltre è stato suggerito di cambiare il significato degli acronimi; TTV oggi è definito come TorqueTeno Virus (dal latino "catena sottile") e di conseguenza i due virus ad esso associato TorqueTeno Mini Virus (TTMV) e Torqueteno Midi Virus (TTMDV)(Hino, 2002; Todd et al., 2002).

Sequenze appartenenti a TTMDV furono isolate e individuate da Jones e collaboratori che identificarono, nel plasma di due pazienti con sindromi d'infezione acuta ad eziologia sconosciuta, due nuove sequenze virali. Dal confronto in banca dati emerse una somiglianza con i virus del gruppo TT seppur con divergenze genetiche elevate. Le nuove sequenze virali presentavano dimensioni rispettivamente di 2.249 nt e di 2.635 nt, collocandosi perciò tra TTV

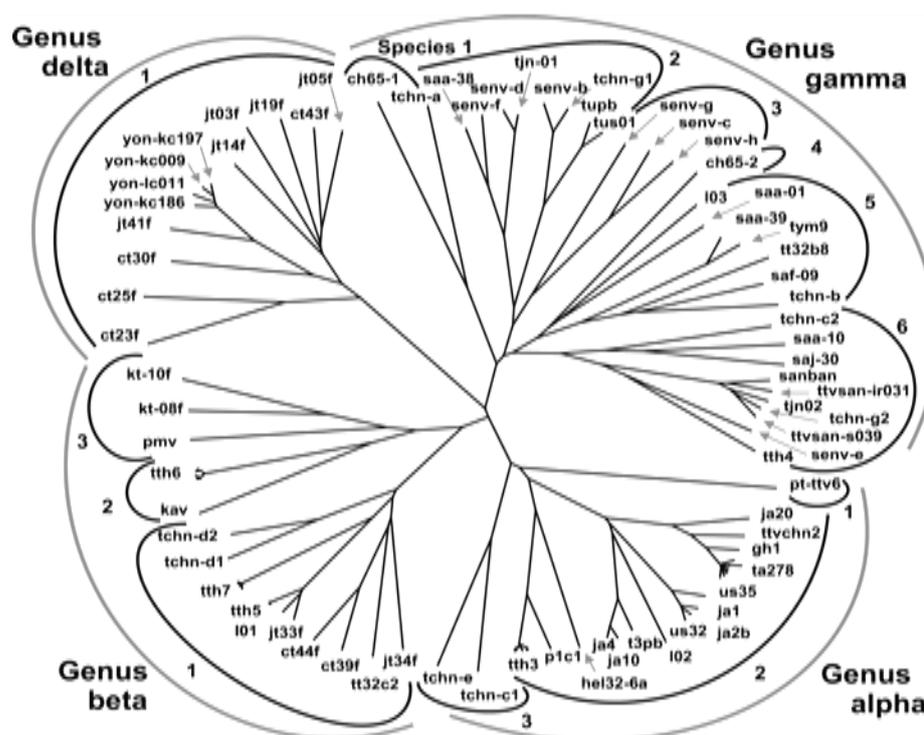
e TTMV. I due nuovi virus furono, quindi, considerati *Anellovirus* in quanto avevano un genoma circolare a singolo filamento con polarità negativa e, come TTV e TTMV, presentavano una regione genomica codificante suddivisa in più ORF parzialmente sovrapposte e una regione non tradotta UTR. I nomi assegnati a tali virus furono inizialmente Small Anellovirus 1 (SAV1) e Small Anellovirus 2 (SAV2). I due SAV mostravano tra loro un'omologia del 54% e con TTV e TTMV rispettivamente del 32% e 35%. A causa delle loro dimensioni, della loro organizzazione genomica e della distanza filogenetica dagli altri *Anellovirus*, fu proposto che SAV1 e SAV2 rappresentassero un terzo distinto gruppo di *Anellovirus* (Jones et al., 2005). Nel 2007 Ninomiya e collaboratori hanno identificato nel plasma di pazienti affetti da emofilia tre nuove sequenze virali denominate MD1-032, MD1-073 e MD2-013 le quali presentavano una uniformità genomica con gli amplificati SAV tra il 76% e il 99%. I tre isolati completi hanno mostrato tra loro un'omologia compresa tra il 90% e il 72%, inoltre segregavano nello stesso cluster e erano filogeneticamente distinti da tutti gli isolati di TTV e TTMV. Tali risultati hanno indotto a riconsiderare gli isolati SAV come dei mutanti deleti di un nuovo virus con lunghezza intermedia tra TTV e TTMV che è stato definito TTMDV (Ninomiya et al., 2007).

I primi studi sulle relazioni filogenetiche degli isolati di TTV sono stati condotti utilizzando come target d'amplificazione la regione N22 dell'ORF1: tali analisi hanno permesso l'identificazione di 23 genotipi riuniti poi in quattro gruppi filogenetici (Okamoto et al., 1999; Biagini et al., 1999). Ciò nonostante la breve regione N22 si è rivelata poco adatta per lo studio delle relazioni filogenetiche e per individuare l'intera varietà di specie di TTV esistenti. Altri studi sono stati condotti sulla regione non tradotta (Untranslated Region, UTR) e sull'intero genoma, questi hanno permesso l'identificazione di più di 40 genotipi e 70 sottotipi. Peng e collaboratori, nel 2002, hanno ideato un nuovo metodo per la classificazione secondo il quale gli isolati fino al momento identificati (72) dovevano essere raggruppati in 5 principali genogruppi, identificati con i numeri da 1 a 5, sulla base di divergenze nucleotidiche maggiori del 50% (Peng et al., 2002, Figura I.A). Tale criterio di classificazione prevedeva la distinzione in genotipi, contraddistinti da numeri arabi, con divergenze nucleotidiche maggiori del 30% e in sottotipi, identificati da lettere minuscole, per amplificati con divergenza compresa tra il 15% e il 29%. Secondo tale classificazione TA278, il

ceppo prototipo della famiglia, è stato inserito con i genotipi dal 2 al 6 nel genogruppo 1. Il genogruppo 2 include gli isolati di TTV di genotipo 7, 8, 22, 23 e 17. Il genogruppo 3, la cui classificazione risulta particolarmente complessa per la numerosità di isolati che comprende, è composto dai genotipi dal 9 al 16, nonché 18, 19 e 20. Il genogruppo 4 è composto da 9 genotipi mentre il genogruppo 5 ne include 4 (Peng et al., 2002). TTMV presenta un grado notevole di eterogeneità genetica, addirittura superiore a quella mostrata da TTV, ed è distinto in 4 genogruppi separati da distanze genetiche superiori al 40% (Biagini et al., 2001b; Gallian et al., 2002). Nel 2004, sulla base di un'analisi filogenetica nella quale sono state confrontate le sequenze di 24 nuovi isolati con quelle di 79 isolati già presenti in banca dati, Jelcic e collaboratori hanno proposto di inserire i ceppi di TTV in una nuova famiglia denominata Anelloviridae (Jelcic et al., 2004). Sulla base di questa proposta l'ITCV ha approvato proprio recentemente, (2009) la famiglia Anelloviridae, secondo cui è distinta in generi definiti da lettere dell'alfabeto greco. Al genere  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  appartengono gli isolati di *anellovirus* umani (Figura 1.B). Il genere  $\alpha$  in particolare comprende 29 specie di TTV, il genere  $\beta$  9 specie di TTMV e il genere  $\gamma$  2 specie di TTMDV (Biagini., 2009).



**A**



**B**

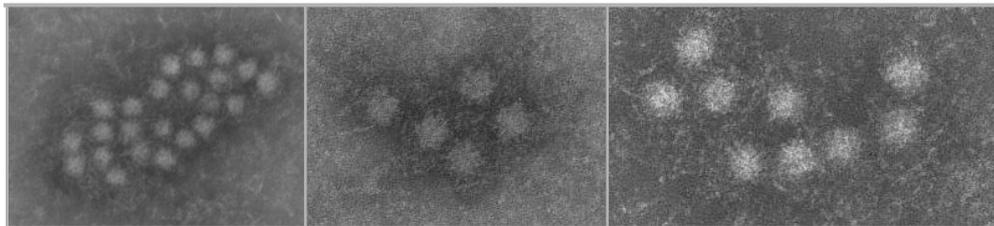
**Figura I:** Relazioni filogenetiche tra i vari isolati di TTV. In (A) i gruppi definiti da Peng e collaboratori (2002); in (B) i generi definiti da Jelcic e collaboratori (2004).

## ***Il virione: genoma, replicazione, eterogeneità genetica, epidemiologia***

Le informazioni circa le proprietà chimico-fisiche e le caratteristiche morfologiche della particella virale sono riferite al genotipo 1 di TTV, poichè è stato il primo ad essere individuato e di conseguenza ad essere studiato più approfonditamente. Le attuali conoscenze sul virus hanno indotto ad escludere differenze morfologiche significative tra i vari genotipi.

Non essendo ancora noto un sistema di coltura cellulare che supporti la replicazione di TTV, tutte le informazioni sulle caratteristiche strutturali del virus derivano principalmente da studi condotti su particelle virali purificate da plasma o da feci. La particella virale è stata osservata al microscopio elettronico, dopo l'incubazione del sovrinatante fecale, contenente TTV di genotipo 1, con le  $\gamma$ -globuline purificate da plasma umano (Itoh et al., 2000; figura II). In seguito a tale analisi, TTV è risultato di forma sferica con capsidi a simmetria icosaedrica e privo di involucro (Figura II). Il diametro del virus è risultato compreso tra 30-32 nm, tale valore è stato determinato mediante l'uso di filtri di policarbonato a porosità decrescente (Mushahwar et al., 1999). Il virione è risultato resistente a detergenti come il Tween 80 (Okamoto et al., 1998a), a solventi e al calore secco (62°C per 96 h); tali osservazioni hanno confermato l'assenza di un involucro lipidico esterno. Ciò è stato poi confermato dall'amplificazione di sequenze di TTV in campioni derivanti dalla bile di soggetti infetti (Ukita et al., 1999), in tale distretto corporeo infatti, per la presenza degli acidi biliari, si possono rilevare soltanto virus privi di envelope. TTV, dunque, risulta essere molto stabile e resistente come i membri della famiglia Circoviridae (Simmonds et al., 1998; Takayama et al., 1999a; Yokozaki et al., 1999b).

Le proteine di TTV non sono state ancora ben caratterizzate tuttavia, data l'analogia con CAV, si ritiene che il capsidico icosaedrico sia un polimero costituito da più unità di un'unica proteina strutturale; inoltre, non sono stati identificati né carboidrati né lipidi virali.



**Figura II:** Visualizzazione al microscopio elettronico di TTV, dopo incubazione con  $\gamma$ -globuline umane specifiche per il genotipo 1a (Itoh et al., 2000).

### *Genoma:*

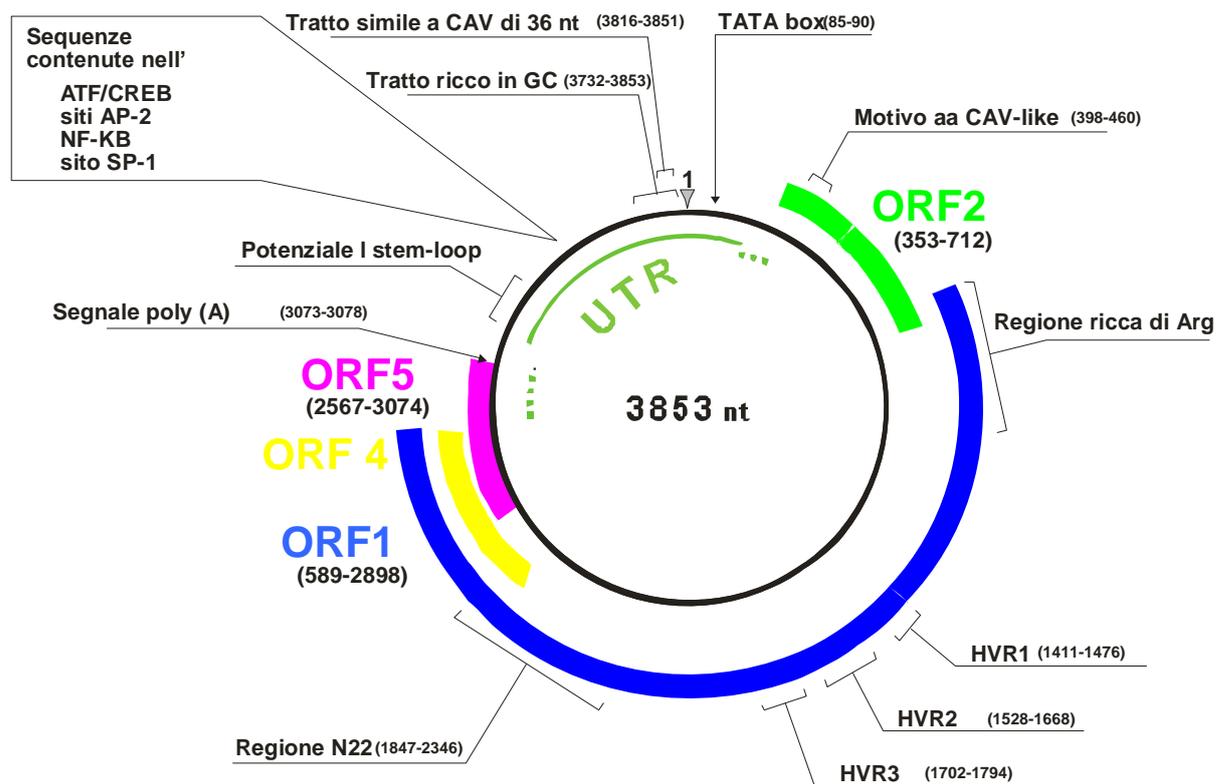
La caratterizzazione del genoma di TTV è stata ottenuta sottoponendo il DNA, estratto da plasma, all'azione di svariati enzimi; è risultato sensibile alla DNasi I ed alla nucleasi Mung-bean ed invece resistente alla RNasi A ed all'enzima di restrizione NdeI, tali esiti hanno dimostrato la natura a singolo filamento del DNA di TTV (Okamoto et al., 1998b; Mushahwar et al., 1999). Esperimenti di ibridazione con molecole di RNA a polarità positiva e successiva digestione hanno inoltre dimostrato che il DNA virale presenta una polarità negativa (Mushahwar et al., 1999). Ulteriori informazioni circa l'organizzazione genomica derivano dall'analisi delle sequenze. L'amplificazione della molecola nella sua lunghezza totale, circa 3,8 Kb, è stata ottenuta mediante tecniche di clonaggio e PCR inversa condotta a partire dalla regione N22 (Mushahwar et al., 1999). Il sequenziamento del 90% del genoma inizialmente ha indotto all'ipotesi che il DNA del virus fosse lineare (Okamoto et al., 1998b), supposizione poi smentita in seguito all'identificazione di una regione di circa 100 nucleotidi ricca in GC (Miyata et al., 1999): il genoma di TTV è quindi un singolo filamento di DNA circolare. L'analisi filogenetiche di tutte le sequenze complete (o quasi) di TTV, TTMV e TTMDV hanno rilevato una notevole somiglianza tra i tre gruppi di virus nell'organizzazione genomica anche se l'ampiezza della loro sequenza

nucleotidica differisce di più di 1 o 2 Kb. Le differenze nelle dimensioni del genoma fra i virus del gruppo TTV sono risultate invece più modeste (Kamahora et al., 2000; Okamoto et al., 2000; Muljono et al., 2001). Le informazioni riguardanti la struttura del genoma di TTV si basano essenzialmente sull'analisi delle sequenze dei diversi isolati e sul relativo confronto con i virus meglio caratterizzati della famiglia Circoviridae.

Il genoma è costituito per due terzi da una regione codificante ORF e per un terzo da una regione UTR non tradotta ma ricca di elementi regolatori (Kamada et al., 2004; Suzuki et al., 2004; figura III). Sul filamento complementare al genoma, la regione espressa comprende da due a sei ORF parzialmente sovrapposte, potenzialmente codificanti con cornici di lettura differenti. Il gene ORF1 di TTV, localizzato tra i nucleotidi 589 e 2.898 sul ceppo TA278, codifica per un prodotto proteico di circa 770 aminoacidi, (675 in TTMV), ritenuto l'equivalente della proteina capsidica di CAV denominata VP-1. La proteina tradotta dall'ORF1 di TTV oltre a svolgere probabili funzioni strutturali, potrebbe essere coinvolta nel meccanismo replicativo: in queste proteine è stato identificato infatti un tratto di circa 100 aminoacidi molto ricco in arginina il quale, per la sua natura idrofila, potrebbe avere un ruolo nel mediare l'interazione con il DNA (Shoya et al., 1998; Vihinene-Ranta et al., 1997); tale dominio si ritrova anche nella regione aminotermine di VP1 di CAV (Okamoto et al., 1998b).

Inoltre, all'estremità C-terminale del gene ORF1, sono stati individuati due motivi aminoacidici tipici delle proteine Rep replicasi utilizzate da virus a DNA che utilizzano il meccanismo a cerchio rotante. Queste proteine sono caratterizzate dalla presenza di almeno quattro motivi aminoacidici che risultano essere molto conservati tra i circovirus animali e vegetali. Inoltre, nella porzione centrale dell'ORF1, TTV presenta tre regioni ipervariabili dette HVR-1, HVR-2 e HVR-3 (High variable region) e potenziali siti di glicosilazione che, variabili in numero e in localizzazione nei differenti isolati, potrebbero modificare le proprietà biologiche ed antigeniche della proteina (Hijikata et al., 1999). Il gene ORF2, compreso tra i nucleotidi 353 e 712 del ceppo TA278, sembra codificare per una proteina strutturale di circa 120 aminoacidi in TTV (100 in TTMV), probabilmente implicata nella replicazione virale. A tal proposito è stata dimostrata un'omologia di sequenza fra questa proteina, in particolare quella codificata dall'isolato SANBAN, e la proteina VP-2 di CAV che ha una doppia funzione di fosfatasi,

tirosin- e serin/treonina fosfatasi ed è implicata nei meccanismi di trasmissione intracellulare dei segnali durante la replicazione del virus (Peters et al., 2002). Dall'analisi della sequenza di molti isolati di TTV, il gene ORF-2 risulta spesso costituito da due piccole ORF, denominate a e b, la prima delle quali appare molto conservata fra i diversi genotipi e le cui capacità codificanti non sono ancora note ( Tanaka et al., 2000b; Kakkola et al., 2002).



**Figura III:** Organizzazione genomica di TTV. Le posizioni si riferiscono all'isolato TA278.

Esperimenti di trasfezione di cellule con vettori contenenti un costrutto del genoma linearizzato di TTV (genotipo 1), hanno dimostrato la presenza di altre ORF e permesso l'identificazione di tre distinti mRNA di 3,0, 1,2 e 1,0 Kb (Kamahora et al., 2000); i tre mRNA, che presentano polarità antigenomica ed hanno il sito di poliadenilazione al 3' e il sito cap al 5', sono stati ritrovati anche in cellule del midollo osseo infettate da TTV (Okamoto et al., 2000d; 2001). Il

meccanismo di splicing ipotizzato prevede l'utilizzo di diversi schemi di lettura e agirebbe sia sulle regioni ORF conosciute che su ORF minori di nuova identificazione, dette ORF4 e ORF5, localizzate in prossimità della porzione C-terminale dell'ORF1 e ad essa sovrapposte. Dall'analisi dei potenziali siti di splicing, è emerso che il messaggero più lungo conterrebbe per intero il gene ORF1, mentre i due mRNA più corti risulterebbero dalla combinazione dell'ORF2 con l'ORF4 e l'ORF5. I prodotti proteici derivanti dall'ORF3 (o ORF2-4) e dalla ORF2-5 potrebbero essere coinvolti nella replicazione del virus o nei meccanismi di controllo e di regolazione della trascrizione virale. In particolare l'ORF-3 sembra codificare per due proteine (p38 e p41) dotate di un differente grado di fosforilazione simili alla proteina NS5A del virus dell'epatite C (HCV; Asabe et al., 2001). Inoltre, in uno studio basato sulla considerazione che alcune sequenze nucleotidiche di TTV presentavano similitudini con il gene dell'apoptina di CAV, è stato dimostrato che l'ORF3 codifica anche per una proteina di 105 aa che induce l'apoptosi di linee cellulari derivate da carcinoma epatocellulare umano (Kooistra et al., 2004). Esperimenti di trasfezione in cui sono stati introdotti costrutti del genotipo 6 di TTV in cellule di rene umano immortalizzate, hanno evidenziato, mediante Western blotting, l'espressione di almeno 6 proteine derivate da 3 distinti mRNA, la cui traduzione avverrebbe a partire da 2 diversi codoni d'inizio, O1AUG (nt 581) e O2AUG (nt 354). Questi ultimi, ottenuti mediante splicing alternativi, assumevano dimensioni pressoché identiche (2,8, 1,2, e 1,0 kb) agli mRNA precedentemente identificati in vitro. E' stato inoltre possibile, mediante sistemi di marcatura, stabilire la localizzazione sub-cellulare delle 6 proteine: sono stati identificati tre patterns di espressione secondo cui due proteine derivanti dall'ORF1 e dall'ORF2 avrebbero una localizzazione principalmente citoplasmatica, due proteine (ORF2/2 ed ORF 2/3) si troverebbero esclusivamente nel nucleo, mentre altre due (ORF1/1 ed ORF1/2) presenterebbero una localizzazione intermedia tra citoplasma e nucleo. Le proteine ORF1 ed ORF2, in base a questo studio, sarebbero tradotte dall'mRNA di 2,8 kb partendo, rispettivamente, dalle triplette d'inizio O1AUG e O2AUG; le proteine ORF2/2 ed ORF2/3 deriverebbero invece dallo splicing degli mRNA rispettivamente di 1,2 e 1,0 kb partendo da O2AUG; anche ORF1/1 ed ORF1/2 derivano dagli stessi mRNA di 1,2 e 1,0 kb ma utilizzano O1AUG come codone d'inizio delle traduzioni (Qiu et al., 2005). La regione non codificante UTR, lunga

circa 1,2 Kb, comprende un tratto di circa un centinaio di nucleotidi, con il 90% di basi nucleotidiche costituito da guanina e citosina. Al suo interno è presente anche una sequenza di 36 nucleotidi, caratterizzata da un alto grado di omologia con la stessa regione di CAV (Miyata et al., 1999). Alcuni tratti della UTR risultano estremamente conservati tra tutti i ceppi di TTV al punto di essere un bersaglio delle metodiche di amplificazione per l'individuazione di diversi genotipi del virus; tali regioni così conservate svolgono probabilmente funzioni di grande importanza per la vitalità virale. A questo proposito è stato dimostrato che in tutta la regione UTR, e soprattutto nel tratto ricco in GC, è possibile la formazione di complesse strutture secondarie caratterizzate da tipici motivi ad ansa associati a funzioni regolatrici (Hijikata et al., 1999; Miyata et al., 1999; Mushahwar et al., 1999). Attraverso saggi di espressione in vitro (Noteborn et al., 1994), nella regione UTR di CAV sono state evidenziate, oltre al sito di poliadenilazione a valle di VP-1 e al sito di trascrizione TATA BOX a monte di VP-2, una serie di sequenze ripetute invertite che costituiscono elementi di attivazione della trascrizione, ed altre regioni di legame per specifici fattori di trascrizione capaci di stimolare la proliferazione cellulare (SP-1, NF-Kb, AP-2). Questi motivi sono stati ritrovati anche nell'UTR di TTV, compresa una regione palindromica, posizionata a valle del sito di poliadenilazione, altamente conservata tra i diversi isolati del virus (fino al 90%).

Esperimenti di mutagenesi hanno messo in evidenza la presenza di alcuni elementi regolatori negativi e positivi con probabile attività cellulo-specifica (Suzuki et al., 2004). Altri studi hanno permesso la localizzazione del sito di inizio trascrizione dei 3 mRNA osservati, tale sito si trova 113 nt a valle rispetto al promotore basale, costituito dalla TATA BOX (Kamada et al., 2004).

### *Replicazione:*

La modalità di replicazione del genoma impiegata dagli *Anellovirus* è ancora da chiarire; perciò è possibile solo formulare ipotesi sulla base di analogie ai virus con cui condividono alcune caratteristiche strutturali come alcuni membri della famiglia *Circoviridae* ed in particolare con CAV e il circovirus porcino di tipo 2 (PCV-2). Il genoma dei circovirus animali non codifica per DNA polimerasi o per retrotrascrittasi, ciò suggerisce che la loro replicazione sia strettamente

dipendente dagli enzimi della cellula infettata. Inoltre, l'assenza di sequenze in grado di alterare il ciclo cellulare dell'ospite (Todd et al., 2001) e la capacità dei circovirus di propagarsi in cellule linfoidi attivate, hanno indotto a supporre che il loro meccanismo replicativo dipenda dallo stato di attivazione della cellula, in particolare dalle proteine prodotte durante la fase S del ciclo cellulare (Fields et al., 1996). Anche per TTV, affinché avvenga la replicazione, le cellule infettate devono essere in uno stato di attiva divisione come quelle del fegato, del midollo osseo, (Okamoto et al., 2000d; Okamoto e Mayumi, 2001) e del sistema linfoide stimolate (Maggi et al., 2001; Mariscal et al., 2001); ciò ha indotto ad ipotizzare, per il processo replicativo, la necessità di una localizzazione nucleare; le modalità di assemblaggio del virione invece, non sono al momento conosciute. Vista la notevole eterogeneità genetica caratteristica dei virus del gruppo TT (Umemura et al., 2001b), è probabile che la funzione di replicasi sia compiuta da polimerasi con scarsa attività di "correzione di bozze". Resta ancora da chiarire anche la modalità con cui TTV viene rilasciato dalla cellula ospite anche se la mancanza di un involucro lipoproteico porta ad ipotizzare che la liberazione dei virioni maturi avvenga per lisi cellulare.

Viste le similarità con i circovirus ed in analogia con i virus vegetali e batterici a DNA monocatenario circolare è stato proposto, per la replicazione di TTV, un meccanismo a cerchio rotante che porterebbe alla formazione di un intermedio replicativo a doppio filamento circolare. L'ipotesi è rafforzata dall'esistenza di alcuni motivi aminoacidici, tipici delle proteine Rep, individuati nella regione ORF1 del virus. Tali proteine vengono utilizzate dai virus a DNA che si replicano mediante il meccanismo a cerchio rotante (Erker et al., 1999); tale ipotesi è stata rafforzata in seguito all'identificazione, nelle cellule del fegato e del midollo osseo, dell'intermedio replicativo di TTV a doppio filamento di DNA (Okamoto et al., 2000d). Sfortunatamente l'assenza della sequenza nonanucleotidica indispensabile per le iniziali interazioni durante la replicazione a cerchio rotante, ha fatto dubitare circa il reale utilizzo di TTV di questo modello replicativo (Erker et al., 1999). Tali dubbi hanno indotto ad indagare un'eventuale capacità di TTV di replicarsi attraverso un intermedio ad RNA (come si verifica per il virus dell'epatite B, HBV); non avendo trovato nel suo genoma alcun motivo codificante per una retrotrascrittasi virale, si ritiene che tale possibilità sia improbabile (Nishizawa et al., 1999).

TTV possiede una spiccata capacità di infettare una vasta gamma di tipi cellulari, infatti il suo genoma viene amplificato in diversi campioni, ciò induce ad ipotizzare che i recettori utilizzati da TTV durante la fase di riconoscimento cellulare siano rappresentati da molecole localizzate a livello di diversi tipi di tessuti, nonostante non sia escluso l'uso di specifici corecettori da parte dei differenti genogruppi e/o genotipi virali. In questa prospettiva è importante sottolineare la presenza di porzioni di genoma ipervaribili (HVR) distribuite nella parte centrale della regione codificante ORF1, porzioni che potrebbero indirizzare il tropismo cellulare di TTV (Takahashi et al., 2002).

### *Eterogeneità genetica:*

TTV, TTMV e TTMDV mostrano una straordinaria eterogeneità genetica, peraltro evento molto inconsueto fra i virus a DNA; l'identificazione delle numerose specie virali altamente divergenti ma correlate a TTV e la rapidità con cui ultimamente vengono isolati nuovi ceppi virali del gruppo TT ne rappresentano una chiara testimonianza. Tale variabilità genetica riguarda principalmente la regione genomica codificante di TTV, ed è massima nella zona centrale della ORF1 (si osserva soltanto il 32% di omologia fra l'isolato SANBAN e il prototipo TA278) dove sono stati identificati almeno tre segmenti ipervariabili. Queste regioni, denominate HVR-1, 2 e 3 codificanti rispettivamente per 22, 47 e 31 aminoacidi nel caso del genotipo 1, presentano codoni multipli di inserzione o delezione ed una diversità genetica a livello aminoacidico superiore al 70% (Erker et al., 1999; Hijikata et al., 1999; Takahashi et al., 1998b). In uno studio condotto da Nishizawa e collaboratori nel quale è stata analizzata, in un periodo compreso tra tre e otto anni, la sequenza dei prodotti di PCR dedotti dall'ORF1 di due soggetti, è stato osservato che le regioni HVR presentano un grado maggiore di variabilità in soggetti con infezione cronica e che tale variabilità diviene particolarmente pronunciata durante la fase acuta dell'infezione, suggerendo un probabile coinvolgimento di queste regioni nei meccanismi utilizzati dal virus per sfuggire alla risposta immunitaria. Si ritiene inoltre che le HVR siano implicate nella formazione della quasispecie di TTV, come del resto si verifica con l'HVR di HCV e la V3 di HIV (Nishizawa et al., 1999). Tuttavia, la stessa variabilità all'interno delle HVR, non è stata riscontrata per tutti gli isolati di TTV: in un periodo di

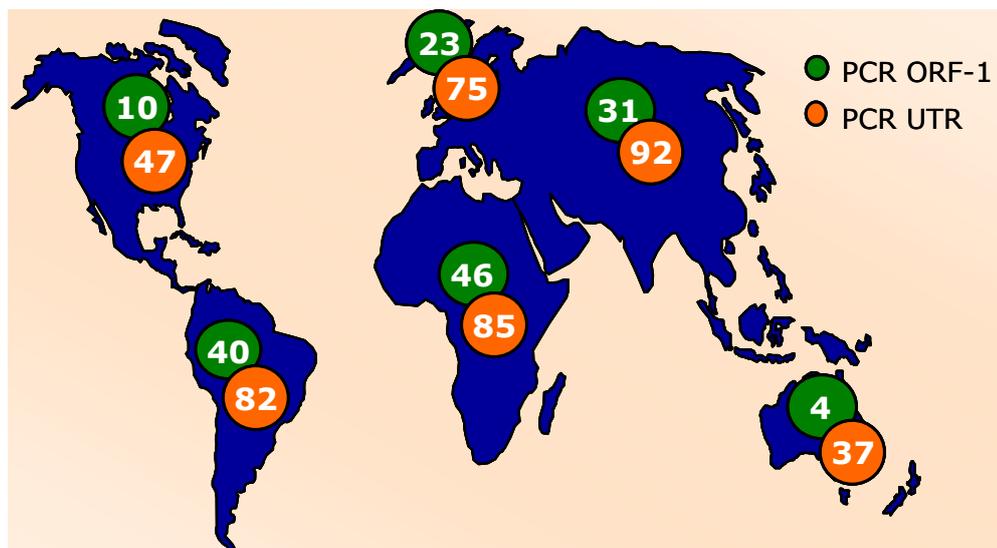
osservazione compreso tra tre e otto anni le sequenze degli isolati di genotipi 12 e 13 non hanno mostrato particolari variazioni (Ukita et al., 2000). Un ulteriore meccanismo ipotizzato per spiegare l'elevata eterogeneità di TTV è rappresentato dall'utilizzo preferenziale, da parte del virus, di polimerasi cellulari con scarsa capacità di "correzione di bozze" durante la replicazione. Sebbene tale processo non sia stato ancora dimostrato, è avvalorato dal fatto che la frequenza con cui avvengono le sostituzioni nucleotidiche in alcune regioni del genoma ( $7,3 \times 10^{-4}$  per sito per anno nelle HVRs di SENV) risulta simile a quella di virus ad RNA, cioè circa 10 volte maggiore di quella di altri virus a DNA, come ad esempio, il virus dell'epatite B (HBV; Umemura et al., 2001b). Un'altra ipotesi avanzata per spiegare l'alto grado di eterogeneità genetica è la possibilità che tra isolati diversi o addirittura all'interno di uno stesso ceppo virale, si verifichino eventi multipli di ricombinazione (Worobey, 2000; Biagini et al., 2001b; Manni et al., 2002). Sono stati identificati, infatti, 19 siti di ricombinazione omologa, di cui 13 appartenenti alla regione UTR (Worobey, 2000; Biagini et al., 2001b); tale regione quindi potrebbe avere un ruolo importante nell'amplificazione dell'eterogeneità genetica (Erker et al., 1999; Hijikata et al., 1999). La ricombinazione, oltre che dalle caratteristiche del genoma, potrebbe essere facilitata dalla presenza di diversi isolati virali di TTV che spesso circolano contemporaneamente nel sangue o infettano lo stesso distretto corporeo dell'ospite (Worobey, 2000; Niel et al., 2000; White et al., 2000). Anche per TTMV è stata dimostrata la contemporanea presenza di ben 15 differenti isolati nel sangue di un soggetto immunocompromesso (Vasconcelos et al., 2002). Tuttavia c'è da sottolineare, come emerso in uno studio, che non vi è ancora concordanza di opinioni circa l'ipotesi della ricombinazione come causa primaria della elevata eterogeneità genetica di TTV e TTMV (Jelcic et al., 2004). Infine anche la considerazione che TTV sia un virus antico, che circola nella popolazione umana da migliaia di anni, può giustificare il grado di variabilità genetica che potrebbe essersi accumulata nel corso di lunghi periodi (Hijikata et al., 1999; Prescott et al., 1999).

## *Epidemiologia*

L'aspetto sicuramente più interessante dell'epidemiologia di TTV è la sua elevata distribuzione in tutte le popolazioni del mondo indipendentemente dall'area geografica, dall'origine etnica e dallo sviluppo socio-economico.

I primi studi di prevalenza, in cui come bersaglio di amplificazione nelle reazioni di PCR era stata utilizzata la regione ORF1, avevano segnalato una discreta diffusione del virus, anche se con differenti percentuali di positività per TTV a seconda dell'area geografica considerata (Niel et al., 1999). Nei paesi industrializzati, Stati Uniti e Nord Europa, la frequenza di TTV risultava molto bassa. Al contrario, nelle popolazioni africane e sud americane si evidenziarono percentuali di positività assai elevate, mentre in Asia il virus era mediamente prevalente. Furono, inoltre, rilevati livelli di viremia particolarmente elevati in popolazioni isolate, ovvero limitatamente in contatto con le restanti regioni del mondo (Prescott e Simmonds, 1998). In tutti questi studi non fu osservata alcuna associazione della prevalenza di TTV con lo status clinico dei soggetti, né con altre caratteristiche della popolazione analizzata.

Con l'introduzione della PCR universale è stata dimostrata una diffusione del virus ancora più sorprendente di quanto ritenuto in precedenza; TTV è stato infatti ritrovato in circa 2/3 della popolazione mondiale, con variazioni non significative fra le differenti aree geografiche (Biagini et al., 2000; Biagini et al., 2001a; Mastubara et al., 2001; Niel e Lampe, 2001). In base a questi studi TTV è risultato particolarmente diffuso in Asia con una prevalenza superiore al 90%, al contrario è risultato essere meno diffuso (circa 40%) in Nord America e in Oceania (figura IV).



**Figura V:** Prevalenza di TTV nella popolazione mondiale. Le percentuali indicate si riferiscono ai dati ottenuti amplificando regioni dell'ORF1 (verde) e dell'UTR (rosso), (Bendinelli et al., 2001).

I dati ottenuti per TTMV sono simili a quelli ottenuti per TTV (Biagini et al., 2000; 2001a). La distribuzione di entrambi i gruppi di virus non è sembrata influenzata dal sesso dei soggetti esaminati. Già nella prima infanzia è stata evidenziata un'ampia diffusione del virus (Davidson et al., 1999; Hsieh et al., 1999; Vasconcelos et al., 2002; Maggi et al., 2003a), i livelli di prevalenza tendono ad aumentare nel tempo raggiungendo l'apice nell'età adulta (Chen et al., 1999; Davidson et al., 1999; Hsieh et al., 1999; Maggi et al., 1999).

L'alta prevalenza di TTV e TTMV e probabilmente anche di TTMDV nella popolazione mondiale presuppone che si diffondano attraverso svariate vie di trasmissione. L'elevata percentuale di positività osservata in numerosi studi fra i soggetti esposti a sangue o a emoderivati (emofiliaci, emodializzati, politransfusi, talassemici e tossicodipendenti) ha dimostrato quanto TTV possa essere facilmente trasmesso attraverso la via parenterale. Il ritrovamento di sequenze virali in campioni di feci di soggetti viremici ha inoltre suggerito che possa essere trasmesso anche per via oro-fecale. L'identificazione del genoma di TTV in neonati ha fatto supporre l'esistenza di una via di trasmissione del virus dalla madre al feto; tale ipotesi, inizialmente messa in discussione (Okamura et al.,

1999; Hsieh et al., 1999; Yokazaki et al., 1999a), ha trovato riscontro in seguito al ritrovamento di TTV in oltre il 50% dei campioni di sangue cordale esaminati. Tale evidenza ha peraltro suggerito che madri infette possano trasmettere l'infezione al figlio attraverso la placenta (Morrica et al., 2000). Il genoma virale è stato inoltre ritrovato in campioni di latte materno: ciò spiega l'esistenza di neonati positivi con madri negative e di bambini che presentano isolati virali differenti da quelli identificati nel sangue materno (Davidson et al., 1999). La trasmissione del virus per via sessuale non è stata ancora chiarita ma, in alcuni studi, TTV e TTMV sono stati amplificati dalle secrezioni vaginali, dal fluido spermatico e dalla saliva di alcuni soggetti (Gerner et al., 2000; Kazi et al., 2000; Inami et al., 2000; Liu et al., 2000; Martinez et al., 2000; Matsubara et al., 2000; Matsubara et al., 2001; Schroter et al., 2000; Stark et al., 2000; Biagini et al., 2001a; Chan et al., 2001; Fornai et al., 2001; Krekulova et al., 2001; Pirovano et al., 2002a). I risultati di uno studio condotto su bambini di età inferiore ai due anni affetti da malattie respiratorie acute hanno indotto ad ipotizzare per il tratto respiratorio, la probabile sede di replicazione di TTV e proposto la via aerea come un'ulteriore via di trasmissione del virus. I titoli virali determinati nelle secrezioni e nelle cellule nasali dei bambini esaminati risultavano infatti significativamente più alti se posti a confronto con i livelli osservati nei corrispondenti campioni di plasma (Maggi et al., 2003a). In precedenza erano già state identificate sequenze di TTV a livello dell'epitelio respiratorio, nei polmoni, nelle tonsille e nelle adenoidi, a sostegno dell'ipotesi dell'esistenza di una via di trasmissione aerea del virus (Pollicino et al., 2002).

Studi di prevalenza dei diversi genotipi di TTV e TTMV hanno evidenziato una maggiore diffusione di alcuni genotipi rispetto ad altri, come si evince da un lavoro in cui è dimostrato che i genotipi 1 e 3 sono stati ritrovati con maggior frequenza nella popolazione generale rispetto al 4 e 5, mentre il genogruppo 2 sembra essere quello più raro (Maggi et al., 2005). Da altri lavori è invece emerso un certo grado di variabilità nella distribuzione geografica dei vari isolati (Gallian et al., 2000; Mikuni et al., 2002) ad esempio, il genotipo 1 ed alcuni genotipi di SENV sono risultati più diffusi in Asia piuttosto che nei paesi occidentali con il 10% dei donatori giapponesi positivi per SENV-D e SENV-H rispetto al 2-3% dei donatori positivi statunitensi e italiani (Shibata et al., 2001; Umemura et al., 2001a). È stata anche dimostrata una differente prevalenza di alcuni genotipi di

TTV fra paesi dello stesso continente: l'infezione con i genotipi 22 e 23 è risultata frequente in Indonesia, ma praticamente assente in Giappone (Muljono et al., 2001). Rimane ancora da chiarire se i diversi genotipi vengano trasmessi con diversa efficienza; a tal proposito, in un lavoro sono stati identificati genotipi di TTV appartenenti al genogruppo 2 in soggetti HIV e HBV positivi, ma non in donatori di sangue (Devalle e Niel 2004); inoltre studi condotti da Pirovano e collaboratori hanno evidenziato una maggiore prevalenza di SENV-A e SENV-B in soggetti tossicodipendenti piuttosto che in individui infettati per via sessuale (Pirovano et al., 2002b).

### ***Interazione fra TTV e l'ospite***

Una volta acquisita l'infezione il virus persiste per anni nel sangue della maggior parte dei soggetti infetti, (per almeno 22 anni in uno studio; Matsumoto et al., 1999) ciò suggerisce che la cronicizzazione del virus sia l'evenienza più comune. Diversi lavori in letteratura hanno infatti evidenziato che più dell'80% degli individui infettati diviene portatore cronico del virus (Takayama et al., 1999b; Ali et al., 2002; Lefrère et al., 1999; Matsumoto et al., 1999). I meccanismi tramite cui il virus genera la persistenza sono sconosciuti, tuttavia pare che non rimanga latente nella cellula ospite in forma episomiale o integrata, fenomeno invece possibile per altri virus a DNA (Tanaka et al., 2000a; Yu et al., 2002). Nella capacità di persistenza di TTV potrebbe essere implicata la mancata capacità del sistema immunitario dell'ospite di controllare l'infezione. Durante l'infezione virale infatti, vengono prodotti anticorpi anti-TTV ma nella maggior parte dei casi, non sembrano capaci né di eradicare l'infezione né di prevenire eventuali superinfezioni. Infezioni miste con isolati eterologhi di TTV sono risultate frequenti, con percentuali del 65% rilevate nei bambini di età inferiore ai sette anni, e addirittura del 90% in soggetti adulti sani (Ukita et al., 2000; Saback et al., 2002; Maggi et al., 2005). La risposta umorale è caratterizzata dalla rapida comparsa (dopo circa 10-12 settimane dall'infezione), di IgM rilevabili nel sangue solo per 5-11 settimane, seguita da una più lenta produzione di IgG (intorno alla 15°-17° settimana) che persistono per anni (Tsuda et al., 2001). La capacità di

questi anticorpi di neutralizzare il virus non è stata ancora dimostrata. Sono stati ottenuti dati contrastanti per quanto riguarda la produzione di immunoglobuline in seguito all'infezione da TTV. Tali dati mostrano che in alcuni casi la presenza di IgG correla con la scomparsa o l'assenza della viremia plasmatica mentre, in altri casi, tali immunoglobuline non hanno prodotto alcun effetto sulla persistenza del virus. Tsuda e collaboratori hanno infatti evidenziato come la comparsa di immunocomplessi TTV-IgG sia seguita da una riduzione del titolo virale (Tsuda et al., 1999). Nishizawa e collaboratori invece, hanno dimostrato come, in pazienti cronicamente infetti, TTV circola complessato proprio ad IgG (Nishizawa et al., 1999). L'importanza della risposta cellulo-mediata nel controllo dell'infezione da TTV è ancora da chiarire; si ritiene però che le cellule del sistema immunitario assumano un ruolo essenziale sia nella persistenza che nella disseminazione di TTV ai vari tessuti. Successivamente all'infezione il virus è amplificato da campioni ematologici. I livelli plasmatici del virus dopo la cronicizzazione sono paragonabili a quelli di altri virus persistenti, come HCV, HBV e HIV e subiscono un'oscillazione tra  $10^3$  e  $10^8$  copie per ml di plasma (Pistello et al., 2001) mostrando, nella maggior parte dei casi, ampie fluttuazioni nel tempo, in altri casi invece, una relativa stabilità (Ball et al., 1999; Matsumoto et al., 1999).

La cinetica del virus è stata studiata in un gruppo di pazienti HCV positivi cronicamente infettati da TTV misurando gli effetti dell'interferone (IFN) sulla viremia (Maggi et al., 2001c). Applicando un modello matematico simile a quello utilizzato per gli studi su HIV e HCV, è stato stimato che l'emivita di TTV nel plasma è di circa 6 ore, che ogni giorno vengono prodotti almeno  $10^{10}$  virioni e che più del 90% del virus plasmatico subisce un turnover giornaliero (Maggi et al., 2001c; tabella I).

<b>VIRUS</b>	<b>EMIVITA DEL VIRIONE</b>	<b>N° MINIMO DI VIRIONI PRODOTTI AL GIORNO</b>	<b>REFERENZA</b>
<b>HBV</b>	1,2 giorni	$>1,7 \times 10^{13}$	Whalley et al. 2001
<b>HCV</b>	2,7 ore	$>1,3 \times 10^{12}$	Neumann et al. 1998
<b>HIV</b>	<1 ora	$>9,8 \times 10^9$	Ramratnam et al. 1999
<b>TTV</b>	6,5 ore	$>3,8 \times 10^{10}$	Maggi et al. 2001c

**Tabella I:** Confronto della viremia plasmatica di TTV con quelle di altri virus persistenti.

La cronicizzazione dell'infezione da TTV è l'evento più probabile, ciononostante in letteratura non mancano casi in cui l'infezione sembra risolversi spontaneamente, talvolta dopo mesi o anche anni dal contagio (Lefrère et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Yuki et al., 1999). In ogni caso la scomparsa della viremia osservata in questi casi, non dimostra la completa eradicazione del virus: sono state isolate sequenze di TTV in diversi tessuti anche in assenza di viremia (Maggi et al., 2001c; Pollicino et al., 2002). Da ciò è nata l'ipotesi che l'apparente risoluzione dell'infezione possa dipendere da una ridotta immissione in circolo del virus in seguito a fasi di latenza. È stato anche ipotizzato che ad opera di modificazioni delle sequenze virali, non sia più possibile la rilevazione del DNA. L'andamento dell'infezione da TTV potrebbe inoltre differire a seconda del genotipo infettante: in uno studio condotto da Otho e collaboratori è stata osservata la risoluzione spontanea dell'infezione in circa il 20% dei bambini infettati da TTV, tale risoluzione comunque si è verificata con diverse percentuali a seconda del genotipo virale coinvolto nell'infezione (Otho et al., 2002). Un altro studio ha evidenziato la scomparsa della viremia nel 77% di soggetti tossicodipendenti infettati con l'isolato SENV (Wilson et al., 2001).

Il genoma di TTV è stato identificato in numerosi fluidi biologici tra cui bile, saliva, lacrime, seme, secrezioni vaginali, fluido duodenale, liquido sinoviale e fluido cerebrospinale (Deng et al., 2000; Biagini et al., 2001a; Tapiri et al., 2001; Maggi et al., 2001a; Fornai et al., 2001; Nakagawa et al., 2000; Inmai et al., 2000), ad indicare che il virus è disseminato in tutto l'organismo. Inoltre, sono stati ritrovati intermedi replicativi e trascritti virali in molti tessuti (polmone, milza, pancreas, rene, linfonodi, muscolo scheletrico e tiroide; Okamoto et al., 2001) a dimostrazione della capacità del virus di replicarsi in molti tessuti infettati (Okamoto et al., 2001) e non solo nelle cellule epatiche o in quelle del midollo osseo, come si pensava precedentemente (Okamoto et al., 1998b; Okamoto et al., 2000b; Okamoto et al., 2000d; Kikuchi et al., 2000; Lopez-Alcorocho et al., 2000; Rodriguez-Inigo et al., 2000; Comar et al., 2002). Questi risultati hanno fornito importanti indicazioni, ma la mancanza di sistemi di coltivazione idonei per TTV, non ha ancora permesso l'identificazione di tipi cellulari in grado di supportarne la replicazione. Tuttavia, recenti studi in vitro hanno dimostrato che TTV è in grado di infettare i linfo-monociti, ma la sua replicazione avviene solo quando questi ultimi sono opportunamente stimolati. Ciò suggerisce che la capacità di replicazione di TTV dipenda dallo stato di attivazione della cellula ospite, come del resto accade per molti altri virus a DNA (Maggi et al., 2001b; Mariscal et al., 2002). Non è ancora chiaro se esista una sottopopolazione linfocitaria nella quale il virus preferenzialmente si replichi e/o persista, ma in alcuni lavori sono stati osservati quantità di virus maggiori a livello dei granulociti e dei linfociti CD19+ (Lopez-Alcorocho et al., 2000; Takahashi et al., 2002; Yu et al., 2002; Zhong et al., 2002). Anche in questo caso è ipotizzabile che diversi genotipi di TTV abbiano un tropismo cellulare preferenziale, come suggerito dalla discordanza tra le sequenze individuate nei tessuti di un singolo paziente e quelle presenti in circolo (Okamoto et al., 2000c). Al contrario il recente ritrovamento di ben 24 isolati del virus nella milza di un paziente affetto da tumore sembra smentire le precedenti ipotesi (Jelcic et al., 2004). Moen e collaboratori hanno infine indagato la possibilità che TTV e TTMV abbiano un ruolo come agenti immunomodulanti, similmente a quanto dimostrato per i circovirus animali. Per far luce su tale ipotesi sono stati arruolati gruppi di pazienti sottoposti a trattamenti immunosoppressivi diversi: i risultati hanno evidenziato cambiamenti nei titoli di TTV in base all'entità delle variazioni

delle risposte di difesa fisiologiche dell'ospite (Moen et al., 2002b). In altri lavori, a conferma di quanto emerso negli studi condotti da Moen, è stata osservata una diminuzione della viremia basale in seguito a trapianti di midollo osseo o a trattamenti mielosoppressivi (Kanda et al., 1999b).

## ***Associazione con la malattia***

Dalla scoperta di TTV ad oggi sono stati svolti numerosissimi studi allo scopo di far luce sulla reale capacità patogenetica del virus. Sebbene i risultati di molti lavori lascino aperta la possibilità che l'infezione da TTV possa assumere un qualche significato clinico, non si è ancora giunti ad una conclusione certa (Naoumov, 2000). Sulla base dell'alta prevalenza di TTV nella popolazione sana, della sua ubiquitarietà nell'ospite infettato e dell'esistenza di diverse vie di trasmissione, alcuni autori si sono affrettati a ritenerlo un semplice commensale apatogeno dell'uomo (Griffiths, 1999; Mushahwar, 2000). TTV è stato inizialmente amplificato a partire da campioni di pazienti affetti da forme di epatite non-A non-E (Nishizawa et al., 1997), per tale motivo è stato presunto che potesse rappresentare la causa di epatiti croniche o acute ad eziologia sconosciuta. Studi successivi hanno sollevato dubbi circa tale potenzialità patogenetica di TTV, in quanto la sua presenza è stata riscontrata sia in pazienti con epatiti criptogenetiche che in soggetti senza alterazioni epatiche o addirittura in individui sani (Berg et al., 1999; Colombatto et al., 1999; He et al., 1999; Kanda et al., 1999; Nakano et al., 1999; Toniutto et al., 1999; Viazov et al., 1998). Inoltre non è stata dimostrata alcuna correlazione tra l'infezione da TTV e la progressione dell'epatite e/o l'entità del danno epatico in studi condotti su pazienti trasfusi o coinfectati con HBV o HCV (Giménez-Barcons et al., 1999; Irving et al., 1999; Lefrère et al., 1999; Matsumoto et al., 1999; Oguchi et al., 1999; Berg et al., 1999; Gad et al., 2000; Kao et al., 2000). I risultati emersi da tali studi hanno di fatto confutato un ruolo primario del virus nella patologia epatica (Matsumoto et al., 1999; Kao et al., 2000; Shang et al., 2000; Ali et al., 2002). Tuttavia in letteratura sono descritti casi in cui è stata rilevata una possibile associazione tra danno epatico e TTV, come dimostrato dalle sporadiche correlazioni fra viremia ed andamento delle transaminasi in alcuni soggetti

(Cleavinger et al., 2000; Forns et al., 1999; Fujiwara et al., 1998; Ikeda et al., 1999; Itoh et al., 1999a; Jiang et al., 1999; Kanda et al., 1999b; Lefrère et al., 1999; Luo et al., 1999; Naoumov et al., 1998). Data la presenza e la capacità replicativa di TTV in molti tessuti differenti da quello epatico, è stata analizzata la possibilità di associare il virus con altri tipi di patologia. A tal proposito è emersa un'interessante relazione tra l'infezione da TTMV e gravi patologie dell'apparato renale (Gallian et al., 2002); è stato inoltre evidenziato, in un esperimento condotto in vitro, un possibile ruolo di TTV nell'induzione di alterazioni a carico di cellule renali simili a quelle osservate nella sindrome nefrosica (Yokoyama et al., 2002). Topi transgenici per più porzioni dell'ORF1 presentavano segni patologici solo a livello del rene; tali manifestazioni patologiche risultavano essere tanto più gravi quanto maggiore era l'espressione del transgene, a conferma che il danno renale era indotto dalla proteina codificata. Uno studio condotto su un gruppo di pazienti sottoposti a trapianto renale, ha sottolineato la persistenza di isolati del genogruppo 1 in questo organo (Szladek et al., 2003). Parziali correlazioni sono state riscontrate in pazienti affetti da diabete, fibrosi polmonare idiomatica, artrite reumatoide ed in emodializzati con bassi livelli di emoglobina e scarsa risposta al trattamento con eritropoietina (Gallian et al., 1999; Bando et al., 2001; Boysen et al., 2003; Hirata et al., 1998). Inoltre, sono stati evidenziati alti titoli di TTV in bambini con broncopolmonite (BP) piuttosto che in quelli affetti da forme meno gravi di malattie respiratorie acute (MRA), suggerendo un possibile ruolo di TTV come cofattore nella patologia di alcune affezioni a livello di vie aeree (Maggi et al., 2003a). Non è stata rilevata alcuna relazione tra TTV ed anemia aplastica, crioglobulinemia, lupus eritematoso, psoriasi (Kikuchi et al., 2000; Cacoub et al., 2003; Maggi et al., 1999) e neppure con la presenza di infezione da *Helicobacter pylori* (Toyoda et al., 2000). Vista l'omologia che TTV mostra con alcuni circovirus animali, è stata presa in esame l'ipotesi che il virus interagisca con il sistema immunitario dell'organismo ospite (Bendinelli et al., 2001; Simmonds, 2002). Dagli studi messi in atto, sono emerse interessanti correlazioni tra TTV e patologie del sistema linfoide: studi condotti da Shibayama e collaboratori hanno evidenziato livelli notevolmente elevati del virus in pazienti immunocompromessi (affetti da AIDS o da altre sindromi intercorrenti), ciò ha suggerito un possibile ruolo del sistema immunitario nel controllo della replicazione di TTV: i titoli del virus, aumenterebbero in risposta ad un

progressivo indebolimento della risposta immunitaria (Shibayama et al., 2002; Simmonds, 2002). Quanto appena esposto, è stato anche confermato dall'incremento della viremia di TTV in pazienti sottoposti a trapianto epatico o a terapia con farmaci immunosoppressivi (Shang et al., 2000), oltre che da una inversa correlazione fra i livelli quantitativi del virus ed il numero dei linfociti CD4+ in pazienti HIV positivi (Christensen et al., 2000; Shibayama et al., 2001; Touinssi et al., 2001). Ciò nonostante, non è stato osservato un aumento dei livelli di TTV in pazienti HIV positivi, ciò induce ad ipotizzare che, in seguito alla deplezione HIV-indotta dei linfociti CD4+, vengano occasionalmente prodotti fattori necessari per l'incremento del titolo di TTV (Moen et al., 2002a). L'effettivo contributo di TTV nella progressione dell'HIV rimane da chiarire. Una relazione tra TTV ed alterazioni del sistema immunitario è emersa da uno studio condotto su bambini affetti da MRA, in cui è stata osservata una correlazione tra i titoli del virus ed i livelli di alcune sottopopolazioni linfocitarie circolanti (in particolare con i linfociti T CD3+ e CD4+ e con i linfociti B CD19+; Maggi et al., 2003b). L'alta variabilità genetica che caratterizza gli Anellovirus, ha fatto considerare anche la possibilità che i diversi genotipi assumano un differente ruolo in relazione a determinate patologie, come accade per alcuni membri della famiglia Circoviridae: il circovirus porcino (PCV), ad esempio, provoca una grave sindrome da deperimento con immunodepressione nel maiale, ma tale potenzialità patogenetica è attribuibile solo al PCV di tipo 2. Studi condotti al fine di chiarire questo aspetto hanno fornito interessanti risultati, difatti è stata rilevata una correlazione tra il genotipo 1 di TTV e i livelli di transaminasi in soggetti con patologie epatiche; inoltre tale genotipo risultava particolarmente frequente in pazienti con epatite fulminante o con aggravamento delle condizioni cliniche (Okamura et al., 2000; Shibata et al., 2000; Moriyama et al., 2001; Tokita et al., 2001a; 2001b; 2001c; Tokita et al., 2002). Uno studio condotto da Umemura e collaboratori, ha risaltato come due genotipi di SENV (SENV-D e SENV-H) fossero maggiormente presenti nel siero di pazienti affetti da epatite post-transfusionale non-A non-G piuttosto che in soggetti sani (Umemura et al., 2001a). Tuttavia, studi successivi hanno riportato risultati contrastanti (Kao et al., 2002; Mikuni et al., 2002; Yoshida et al., 2002).

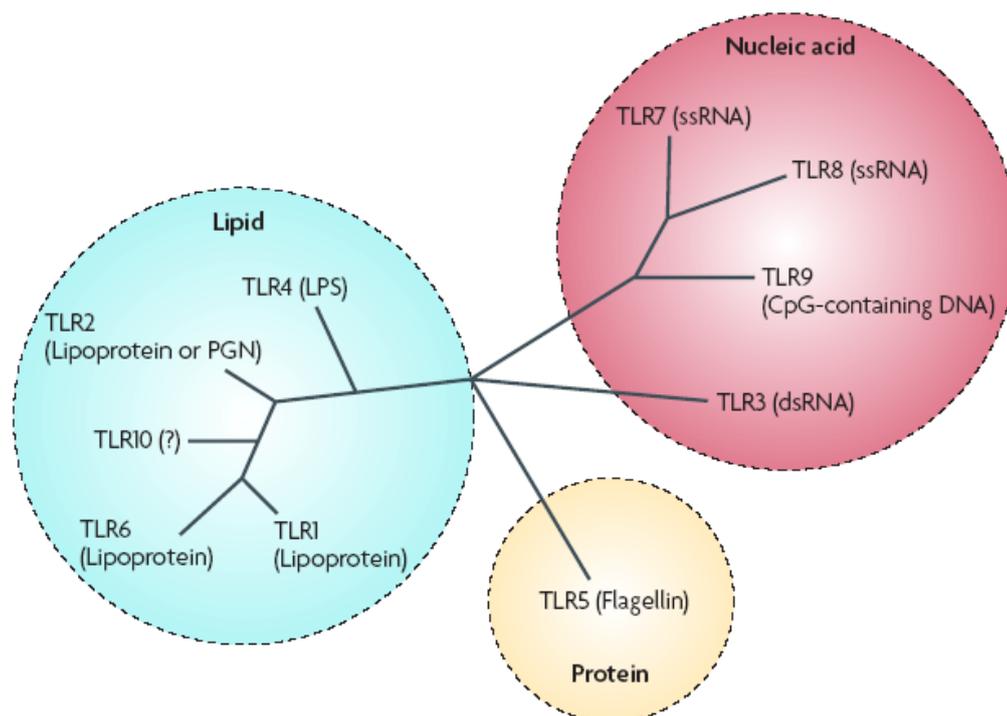
## ***I Recettori Toll-Like***

Negli esseri umani esistono due sistemi che contribuiscono all'immunità:

- Il sistema innato (non specifico, non adattativo)
- Il sistema adattativo (acquisito, specifico)

Ambedue sono essenziali per la sopravvivenza degli individui. Le principali cellule dell'immunità innata sono: i macrofagi, i neutrofilo, e le popolazioni linfocitarie delle cellule natural killer (NK), le cellule dendritiche (DC). Molte di queste cellule, proprio per le funzioni di primo intervento che svolgono, esprimono delle proteine che funzionano come veri e propri recettori sensoriali (PRRs, da "Pattern Recognition Receptors") in grado di riconoscere ed interagire con l'antigene batterico e conseguentemente innescare delle vie di segnale intracellulare che determinano a loro volta, come risultato finale, l'instaurarsi dell'infiammazione. I profili molecolari microbici altamente conservati con cui si interfacciano i PRRs, sono definiti PAMPs (da:"Pathogen-Associated Molecular Patterns") e sono ad esempio lipopolisaccaridi, peptidoglicani, sequenze di DNA non comuni all'ospite, lipoproteine, RNA virale. I due gruppi maggiori di PRRs umani attualmente conosciuti sono i recettori Toll-like (TLRs, da "Toll-Like Receptors) e le proteine NODs (Nucleotide Oligomerization Domain).

I recettori Toll-like sono importanti per la clearance dei patogeni e sono tra i PRRs quelli maggiormente caratterizzati e studiati. Tali recettori sono espressi sia sulla superficie cellulare (TLR 1, 2, 4, 5, 6) che nel compartimento endosomiale (TLR 3, 7, 8, 9) (Figura VI).



**Figura VI:** Visione generale della famiglia dei TLRs umani

I TLRs localizzati sulla superficie cellulare riconoscono principalmente componenti strutturali dei patogeni (proteine, lipoproteine, polisaccaridi), quelli che si trovano sulla membrana endosomiale invece, sono implicati nel riconoscimento di polinucleotidi (RNA, DNA). Alcune sequenze nucleotidiche presentano modificazioni che fanno sì che il sistema immunitario le identifichi come non-self. I TLRs endosomiali sono responsabili del riconoscimento di quei patogeni che sono stati fagocitati o che hanno infettato le cellule (Akira and Hemmi, 2003; Wagner, 2004). Uno studio recente ha inoltre dimostrato che esiste un meccanismo in grado di facilitare il riconoscimento degli acidi nucleici non-self ai recettori Toll-like. Tale meccanismo è svolto da un gruppo di proteine altamente mobili HMGB 1,2,3 che svolgono la funzione di sentinelle universali degli acidi nucleici. HMGBs sono proteine altamente espresse nel nucleo, dove regolano la struttura della cromatina e la trascrizione, ma sono anche presenti in percentuali minori nel citosol e nei fluidi extracellulari. I risultati di questo studio dimostrano come il legame degli acidi nucleici alle proteine HMGBs è una pre-condizione per un più efficiente riconoscimento e attivazione dei recettori TLR. Rimane ancora da chiarire, però, dove esattamente avviene il legame tra l'acido

nucleico e le HMGBs e come tali complessi (HMGBs-acido nucleico) attivano la cascata di trasduzione dei loro rispettivi recettori (Hydeyuk et al., 2009). In particolare, il recettore TLR9 riconosce dinucleotidi CpG inclusi in sequenze nucleotidiche conservate. Le sequenze CpG sono più abbondanti a livello del genoma dei procarioti rispetto a quello degli eucarioti. Inoltre il DNA eucariote presenta il dinucleotide in forma metilata sulla citosina, mentre in quello procariote tali metilazioni sono rare. Il motivo CpG non metilato rappresenta infatti lo stimolo per la risposta immune. Il TLR9 è attivato non solo da DNA naturale derivante da virus e batteri, ma anche da corte sequenze oligonucleotidiche sintetiche (20 pb), dette ODN, contenenti motivi CpG non metilati. Vista la facilità con cui tali molecole possono essere prodotte e dal momento che mimano l'effetto dei PAMPs, gli ODN-CpG sono diventati il più promettente mezzo per lo studio dell'effetto immunostimolante dei motivi CpG non metilati (Dalpke et al., 2001, 2002b, c) e stanno trovando sempre più ampio spazio nelle applicazioni terapeutiche per la loro capacità di promuovere una migliore risposta umorale e cellulo-mediata. Oltre all'effetto adiuvante, i motivi CpG sintetici esercitano anche un importante ruolo nel prevenire le reazioni di ipersensibilità di tipo I (anafilassi) e nella terapia antitumorale (Buhè et al., 2009). La capacità, infatti, di indurre principalmente citochine di tipo Th-1, riduce lo sviluppo di una risposta umorale Th-2, prevenendo il rilascio di citochine come IL-4 e IL-5 e la conseguente produzione di anticorpi quali le IgE, riducendo così la suscettibilità allo sviluppo delle allergie (Sur S. et al., 1999; Kline JN., 1998; Horner AA. et al., 2001). Per quanto riguarda l'attività antitumorale risulta, invece, fondamentale la sua capacità di attivare i linfociti T citotossici e le cellule NK.

## *I motivi CpG nel DNA batterico e virale*

Per molto tempo il DNA è stato ritenuto una componente immunologicamente inerte, ma gli studi di Tokunaga e collaboratori, nel 1984, hanno cambiato questa visione. Tali autori, con i loro studi, dimostrarono che una frazione estratta dal *Micobacterium bovis*, ceppo di Calmette e Guerin (BCG), stimolava gli immunociti di topo a produrre interferon (IFN) ed inibiva la crescita di vari tumori singenici dell'uomo e del topo (Tokunaga et al., 1984). Tali osservazioni aprirono la strada ad una serie di studi per la comprensione ed l'individuazione di quale fosse la componente del BCG responsabile di tali effetti. Tramite la caratterizzazione chimico-fisica della frazione del BCG, denominata MY-1, si evidenziò che essa era costituita da acidi nucleici e conteneva tracce di zuccheri e proteine. Il suo profilo di eluizione mediante HPLC (high performance liquid chromatography) mostrava patterns di più pesi molecolari. Successivamente la frazione MY-1, ad alto peso molecolare, fu digerita enzimaticamente con DNasi e/o con RNasi. I prodotti purificati di tali digestioni furono valutati per la loro attività immunologica. Solo la frazione digerita con RNAasi manteneva la stessa capacità della frazione non digerita nel produrre IFN; i prodotti purificati dopo digestione con DNasi perdevano invece tale capacità. Tali esperimenti dimostrarono dunque che la molecola, presente nella frazione MY-1, in grado di indurre la stimolazione delle cellule del sistema immunitario era il DNA. L'attività immunologica dimostrata per il DNA batterico, spinse i ricercatori a indagare se tale proprietà fosse associabile anche al genoma di altre specie. Messina e collaboratori dimostrarono che solo il DNA batterico stimolava direttamente la proliferazione in vitro di linfociti di topo, mentre la stimolazione con DNA proveniente da mammiferi non aveva effetto mitogeno (Messina et al., 1991). Questi studi stabilirono che, nonostante le notevoli somiglianze biochimiche esistenti tra il DNA dei batteri e quello dei mammiferi, le due molecole differivano per la presenza di particolari strutture che nei batteri funzionano come determinanti antigenici capaci di stimolare una risposta immunitaria o come segnali mitogeni. I motivi che mediano tale immunostimolazione furono successivamente identificati in *Escherichia coli* (*E.coli*) e risultarono essere dinucleotidi CpG non metilati fiancheggiati da specifiche basi (Krieg et al., 1995). Il DNA dei batteri si distingue da quello dei vertebrati sia per il contenuto in tali

dinucleotidi, che per il grado della loro metilazione. Infatti nel genoma dei vertebrati i dinucleotidi CpG sono presenti solo con una frequenza pari al 25% del valore atteso e questo fenomeno viene comunemente indicato come “soppressione dei motivi CpG” (Bird et al., 1987). Inoltre, tali motivi sono solitamente metilati sulla citosina e fiancheggiati da basi che determinano un effetto neutralizzante sul sistema immunitario piuttosto che immunostimolatorio. Al contrario il DNA batterico è caratterizzato da un’alta frequenza di motivi CpG che risultano generalmente non metilati. Queste differenze strutturali, rendono il DNA batterico capace di attivare direttamente le cellule del sistema immunitario. In particolare i motivi CpG non metilati agiscono sulle cellule presentanti l’antigene (APC), come le cellule dendritiche, i macrofagi e i linfociti B. Tali cellule, quando attivate, producono diverse citochine immunomodulatorie come l’interleuchina (IL) 6, che contribuisce ad attivare le cellule B e T, l’interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), che aumenta la capacità dei macrofagi di eliminare patogeni intra ed extracellulari, ed infine l’IL-12 che regola la produzione di IFN-  $\gamma$  e contribuisce all’attivazione delle cellule natural killer (NK). Inoltre i motivi CpG regolano l’espressione del complesso di istocompatibilità di classe II e di molecole costimolatorie come le molecole B7-1 e B7-2 (Krieg, 1999), mentre al contrario non sembrano attivare direttamente le cellule T (Krieg, 2002). La presenza dei dinucleotidi CpG non metilati fu individuata anche nei genomi dei virus a DNA ma a differenza del genoma batterico, in cui si ha un alto numero di tali dinucleotidi, i genomi virali mostravano differenti prevalenze in base alla loro lunghezza. Infatti si osservava una significativa riduzione del dinucleotide CpG nei genomi di lunghezza inferiore a 30 kb e un contenuto medio più alto in quelli con lunghezza superiore a 30 kb (Karlin et al., 1994). Fin dai primi studi condotti da Tokunaga era emerso che il dinucleotide CpG, per poter attivare la risposta immunitaria, dovesse essere fiancheggiato da basi specifiche (Tokunaga et al., 1992). Successivi studi condotti da Krieg e collaboratori confermarono tale ipotesi dimostrando che la massima attivazione immunitaria si osservava quando il dinucleotide CpG era preferibilmente fiancheggiato al 5’ da due purine (GpA) e al 3’ da due pirimidine (TpC o TpT) (Krieg et al., 1999). L’importanza delle basi che fiancheggiano il dinucleotide CpG fu rafforzata dall’evidenza che non tutti i motivi CpG non metilati portavano ad una immunostimolazione: Krieg nel 1998 scoprì che il DNA degli adenovirus di tipo 2 e 5 non aveva un effetto stimolatorio ma

piuttosto immunoneutralizzante, induceva il blocco della produzione di citochine da parte del DNA batterico (Krieg et al., 1998). Sequenze CpG neutralizzanti sono anche presenti nel DNA dei vertebrati, i quali presentano infatti motivi non metilati che non inducono nessuna stimolazione del sistema immunitario. Tali motivi sono detti neutralizzanti perché, al contrario dei motivi stimolatori, non solo non inducono la produzione di citochine ma antagonizzano l'effetto dei motivi stimolatori. I motivi neutralizzanti sono caratterizzati dalla ripetizione del dinucleotide CpG preceduto da una C e/o seguito da una G (CGGCGGGCGGCGCCGCCC) (Krieg et al., 1998). Il potenziale immunostimolante caratteristico del DNA batterico e virale risalta come il sistema immunitario dei vertebrati abbia evoluto meccanismi che permettono di discriminare differenze strutturali tra il DNA degli agenti infettanti e quello dei mammiferi (Wagner et al., 1999 Krieg et al., 2002;). Il sistema immunitario potrebbe infatti aver acquisito dei meccanismi di difesa basati sul riconoscimento dei dinucleotidi CpG non metilati i quali segnalerebbero perciò la presenza di un DNA estraneo.

### *Oligonucleotidi sintetici*

Gli oligonucleotidi sintetici (ODN) sono delle molecole che mimano l'azione stimolatoria del CpG DNA sulle cellule del sistema immunitario (Yamamoto et al. 1992); la quali sono direttamente o indirettamente attivate da ODN di tipo stimolatorio (ODN-S). Le cellule B sono indotte a proliferare, differenziarsi e a secernere diverse citochine immunoregatorie (Liang et al., 1996). I monociti e i macrofagi sono indotti a secernere una ampia gamma di citochine proinfiammatorie alcune delle quali attivano le cellule NK a produrre IFN- $\gamma$  ed incrementano la loro attività litica verso le cellule tumorali (Chance et al., 1997). Inoltre, anche le cellule dendritiche, che sono estremamente importanti nel regolare e coordinare le risposte del sistema immunitario, sono direttamente attivate da ODN-S (Jakob et al., 1998). Attualmente sono stati caratterizzate tre classi di ODN: la classe A o D, la classe B o K e la classe C. Gli ODN di classe A attivano preferenzialmente le cellule dendritiche e portano alla produzione di IFN- $\alpha$ ; dal punto di vista strutturale sono caratterizzati da un motivo palindromico CpG centrale e all'estremità 3' hanno una "coda" di guanine che ne incrementa

l'attività. Sono, inoltre, caratterizzati dalla presenza di legami in cui uno degli atomi di ossigeno implicato nel legame fosfordiestere è sostituito da un atomo di zolfo, tale manipolazione rende il legame resistente alle nucleasi cellulari. Gli ODN-S di classe B stimolano preferenzialmente le cellule NK, e contengono nella loro sequenza motivi CpG multipli preferenzialmente localizzati all'estremità 5' terminale ed anch'essi hanno legami fosforotioati. Infine gli ODN-S di classe C hanno caratteristiche in comune con le altre due classi. Sono, infatti, in grado di indurre l'attivazione delle cellule B o delle NK e portano alla produzione di IFN- $\alpha$  (Tabella III) . A differenza degli ODN-S di classe A quelli di classe C sono interamente fosforotioati e non hanno una coda di poli guanine ma hanno sequenze palindromiche combinate con sequenze stimolatorie (Vollmer et al. 2004).

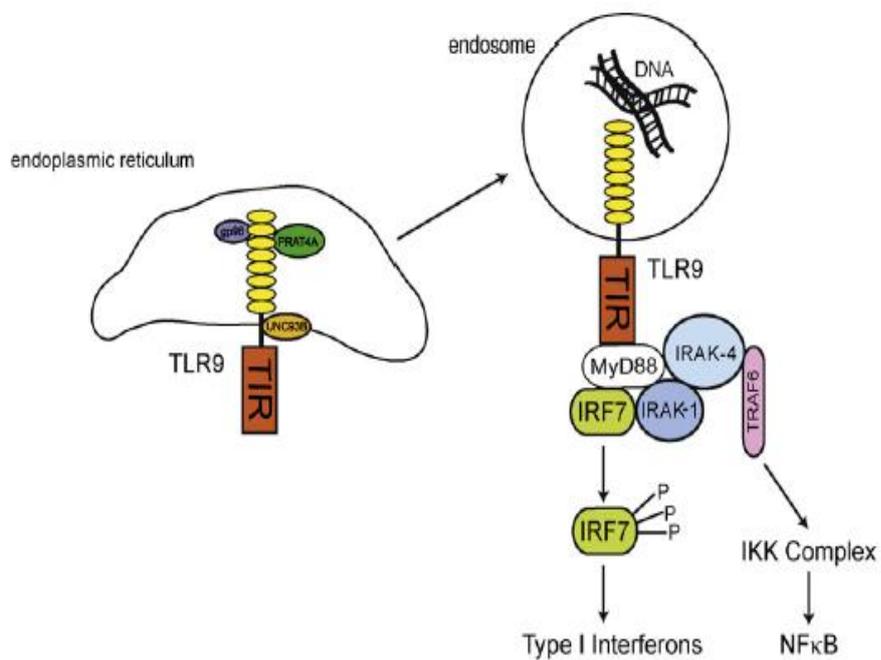
<b>CLASSE DI ODN-S</b>	<b>ODN-S DI RIFERIMENTO</b>	<b>SEQUENZA</b>
A	ODN 2216	ggGGGacgaTCGTCggggggg
B	ODN 2006	tcgtcgttttgcgttttgcgtt
C	ODN M362	tcgtcgct <u>cgttcgaacgagttgat</u>

**Tabella III:** Esempi delle tre classi di ODN-S. La lettera minuscola corrisponde al legame fosforotioato, la lettera maiuscola al legame fosfodiestere; la sottolineatura indica sequenze palindromiche.

## ***Il recettore TLR9***

Il meccanismo attraverso il quale il sistema immunitario capta e risponde alla stimolazione da parte del DNA batterico e degli ODN-S è stato studiato per molto tempo. In particolare numerose ricerche sono state compiute per capire quale recettore fosse coinvolto nella trasduzione del segnale. Una svolta importante per comprendere quale fosse tale recettore, coinvolto nel riconoscimento di motivi CpG non metilati, si ebbe nel 2000 quando Hemmi e collaboratori scoprirono che il recettore Toll-like 9 (TLR9) svolgeva un ruolo fondamentale nell'interazione con tali motivi. Tali autori dimostrarono che cellule del sistema immunitario provenienti da topi deficienti per i recettori TLR2 e TLR4 rispondevano al CpG-DNA con la produzione di molecole effettrici; al contrario, topi deficienti per il recettore TLR9 non mostravano nessuna risposta (Hemmi et al., 2000). Ad oggi, sono stati identificati nell'uomo 13 recettori Toll-like localizzati sia sulla superficie cellulare sia in compartimenti intracellulari, ognuno dei quali è deputato al riconoscimento di molecole associate a patogeni (PAMPs) tra cui: i mannani componenti della parete cellulare dei lieviti, i lipopolisaccaridi (LPS) caratteristici della parete dei batteri gram-negativi, le lipoproteine, i peptidoglicani e il DNA contenente motivi CpG non metilati. Dal punto di vista strutturale, i TLRs, sono proteine transmembrana di tipo I e presentano un'organizzazione comune. I TLRs contengono nell'ectodominio, all'estremità amminotermine, un dominio ricco di leucine ed uno di cisteine; l'estremità carbossiterminale invece, localizzata nella porzione intracellulare, presenta un dominio denominato TIR (Toll/IL-1 recettore) che ha omologia strutturale con il recettore dell'IL-1 (Akira et al., 2003). Ma a differenza di altri TLR, il TLR9 non è espresso sulla superficie cellulare delle cellule del sistema immunitario ma si trova localizzato nel reticolo endoplasmatico. Infatti, Leifer e collaboratori (2004) dimostrano che il TLR9, transfettato in cellule B e colorato con anticorpi fluorescenti, si localizzava nel compartimento reticolare e colocalizzava con markers specifici del reticolo endoplasmatico. Dal momento che il DNA viene internalizzato e digerito a livello di vescicole endosomiali rimaneva da chiarire come possa avvenire l'interazione con il TLR9 che si trova localizzato nel reticolo

endoplasmatico. Alcuni studi hanno chiarito quest'aspetto dimostrando che, sebbene il TLR9 sia inizialmente localizzato nel reticolo endoplasmatico, quando il CpG-DNA è internalizzato attraverso l'endocitosi di vescicole rivestite da clatrina si assiste ad una rapida redistribuzione del recettore verso il compartimento cellulare in cui si verifica l'accumulo di CpG DNA (Lats et al., 2004). Il riconoscimento tra il recettore e le sequenze CpG procede in direzione 5'→3' e i motivi caratterizzati da sequenze inibitorie sono generalmente dominanti sui motivi stimolatori (Yamada et al., 2002). La cascata di trasduzione del segnale innescata dal legame del motivo CpG con il TLR9 è stata ampiamente analizzata ed attualmente si conoscono in dettaglio tutte le tappe. Il legame del ligando al recettore provoca la dimerizzazione del recettore stesso, con reclutamento della molecola adattatrice MyD88 (myeloid differentiation factor 88) tramite il dominio intracitoplasmatico. Ciò facilita l'associazione con la chinasi IRAK (Il-1R-associated kinase). La successiva autofosforilazione di IRAK permette la sua dissociazione dal complesso recettoriale e ne consente l'interazione con la molecola TRAF6 (TNF-receptor associated factor 6), un membro della famiglia delle proteine adattatrici. La cascata di traduzione del segnale prosegue con l'attivazione della chinasi TAK-1 (TGF-S activated kinase) da parte di TRAF6, la quale porta alla fosforilazione e attivazione delle chinasi MAP (mitogen activated protein) sia all'attivazione di enzimi I $\kappa$ B chinasi che fosforilano I $\kappa$ B. Quest'ultimo fattore fosforilato lega residui di ubiquitina che lo indirizzano verso il proteasoma dove viene degradato e quindi libera il fattore di trascrizione NF- $\kappa$ B, il quale può traslocare nel nucleo e legarsi a molti geni implicati nelle risposte infiammatorie ed immunitarie (Figura VII) (Kandimalla et al., 2003; Gilliet et al., 2008).



**Figura VII:** Cascata di trasduzione del segnale indotta dall'attivazione del TLR9

## **Sezione II**

### ***Materiali e Metodi***

## **Modello Sperimentale**

Per realizzare questo studio è stato messo a punto un modello sperimentale “*in vitro*” che utilizza come substrato le cellule di milza di topo, conosciute essere particolarmente ricche di TLR9. Sono stati utilizzati topi sani adulti BALB/c allevati in ambienti asettici e apirogeni. Gli animali sono stati sacrificati per traslocazione cervicale e splenectomizzati. In pratica si effettua un’incisione profonda, con un bisturi chirurgico, nella loggia superiore dell’ipocondrio sinistro; è così possibile identificare e localizzare la milza per il suo caratteristico colore rosso scuro e per la sua forma semilunare, ed è possibile isolarla dai tessuti adiacenti mediante la rimozione del tessuto connettivo. L’organo, dopo essere stato asportato, viene posto su una piastra Petri sterile e le cellule della milza sono raccolte mediante spremitura della capsula fibrosa, anch’essa effettuata con un bisturi chirurgico. Le cellule quindi, sono lavate due volte mediante risospensione in 15ml di terreno RPMI e centrifugate a 600 g per 8 minuti per rimuovere ogni residuo della capsula fibrosa. Il pellet cellulare ottenuto è risospeso in 10 ml di terreno RPMI contenete 1% glutammina e 10% siero fetale bovino e un’aliquota di questa sospensione cellulare viene utilizzata per contare le cellule e determinare così il numero esatto da utilizzare nei vari esperimenti.

Gli esperimenti eseguiti utilizzando le cellule di milza di topo, sono stati realizzati secondo uno schema comune. Il primo passo è stato quello di porre le cellule in piastre da 24 pozzetti (  $3 \times 10^6$  cellule per pozzetto) e incubarle a 37°C al 5% di CO<sub>2</sub> in terreno RPMI ( 1% glutammina, 10% siero fetale bovino) assieme al controllo negativo e a differenti stimoli: concanavalina A (ConA) 5 µg/ml, ODN 6 µg, DNA di E. Coli 10 µg/ml, DNA di TTV appartenente ai diversi genogruppi (range 1-24 µg). La stimolazione delle cellule con il genoma virale e gli ODN è stata effettuata in presenza di una quantità standard di lipofectina (25 µg), reagente che facilita la trasfezione del DNA all’interno delle cellule. Gli splenociti stimolati e i rispettivi controlli non trattati, sono stati recuperati a differenti intervalli di tempo (4, 8, 12, 24 ore dalla stimolazione) ed analizzati per valutare l’espressione genica e la sintesi di diverse citochine. Inoltre un’aliquota di cellule

è stata utilizzata, dopo estrazione dell'RNA totale e quantificazione allo spettrofotometro, per valutare l'efficienza della Real-Time.

### ***Preparazione del DNA virale dell'isolato ViPiSal***

Uno dei genomi virali utilizzato appartiene ad un isolato classificato all'interno del genogruppo 4 di TTV, ottenuto dal plasma di una paziente affetta da artrite reumatoide. Il DNA virale è stato estratto e purificato utilizzando il QIAamp DNA Mini Kit (QIAgen, Chatsworth, CA) che fornisce una semplice e rapida metodica di purificazione del DNA totale da sangue intero, plasma, siero, fluidi corporei, linfociti, colture cellulari e tessuti.

A 200µl di plasma del campione (come previsto dal protocollo) vengono aggiunti 200µl del buffer di lisi AL e 20µl di proteinasi K (20 mg/ml). Per ottimizzare il funzionamento di tali reagenti è necessario vortexare la miscela prima di incubarla a 56°C per 10 minuti. Dopo si aggiungono 200µl di etanolo (96-100%) che consente la precipitazione del DNA. La miscela così ottenuta si trasferisce nell'apposita colonnina di estrazione (QIAamp spin column), e si centrifuga per 1 minuto a 6000 x g a temperatura ambiente. La colonnina fornita dal kit di estrazione contiene al suo interno una membrana di gel di silice che presenta elevata affinità per gli acidi nucleici. Il DNA infatti, grazie alle condizioni di pH e salinità del lisato garantite dai vari trattamenti, si legherà alla membrana della colonna, lasciando fluire nell'apposito tubino di scarico le proteine ed eventuali contaminanti che potrebbero interferire con i successivi passaggi di amplificazione. Dopo aver scaricato il filtrato, il DNA legato alla membrana viene sottoposto ad un primo lavaggio con 500µl di buffer AW1 (20 mM di NaCl, 2 mM di Tris-HCl, pH 7,5 e 57% etanolo) seguito da una centrifugazione a 6000 x g per 1 minuto. Successivamente si effettua un secondo lavaggio con 500µl di buffer AW2 che differisce dal precedente solo nel contenuto di alcool (etanolo 70%), e si centrifuga alla massima velocità (20000 x g) per 3 minuti, al fine di evitare che residui di tampone possano inibire le successive fasi di amplificazione. Questi lavaggi hanno lo scopo di rimuovere ogni tipo di contaminazione possibile. Infine la colonnina viene trasferita in una eppendorf pulita e si effettua l'ultimo passaggio, cioè l'eluizione con 50-55µl di buffer AE (19mM di Tris-Cl, 0,5 mM di

EDTA, pH 9,0). Il buffer aggiunto viene lasciato ad agire per un minuto a temperatura ambiente, dopo di che, si centrifuga a 6000 x g per 1 minuto. L'eluato ottenuto è il DNA virale che viene conservato a -80° fino al momento dell'utilizzo.

## ***Amplificazione dell'isolato ViPiSal***

Dopo l'estrazione dell'acido nucleico è stato possibile ottenere l'amplificazione del completo isolato virale, utilizzando metodiche di PCR appositamente studiate; in particolare i primers utilizzati sono stati progettati utilizzando il programma Primer Premier (Versione 5.00; Premier Biosoft International, Palo Alto, CA). In questo modo è stato possibile progettare una prima strategia di amplificazione che utilizzando una nested PCR con primers costruiti in una regione del genoma a cavallo tra l'UTR e l'ORF 2, ci ha consentito di ottenere un primo frammento di 3204 bp. Una seconda strategia di amplificazione, ha consentito, grazie allo studio di nuove coppie di primer e alla messa a punto di una nuova nested PCR, di completare l'intero isolato. Per entrambe le amplificazioni è stato utilizzato lo stesso protocollo: uniche differenze sono state le coppie di primer e la temperatura di annealing. Il profilo di reazione per il primo step prevede la preparazione di una miscela, del volume finale di 50 µl, così composta:

- tampone di reazione (10 nM Tris-HCl pH 8,2, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>);
- 60 pmoli di ciascun primer (senso e antisenso);
- 200 µM di ogni deossiribonucleotide trifosfato (dNTPs);
- 5 U di Taq polimerasi;
- 5 µl di DNA estratto;
- X µl di acqua deionizzata a volume.

Dopo aver preparato la miscela sono stati effettuati 35 cicli con il seguente profilo termico:

1. Fase di denaturazione: 94°C per 30 secondi
2. Fase di appaiamento: temperatura di annealing specifica per ogni coppia di primers per 30 secondi
3. Fase di estensione: 72° C per 45 secondi

Terminati i 35 cicli di amplificazione si esegue una fase a 72° C per 15 minuti per permettere alla Taq polimerasi di completare eventuali frammenti tronchi. Successivamente 5 µl del primo prodotto di amplificazione vengono trasferiti nella miscela del secondo step, nella quale viene utilizzata una coppia di primers più interna rispetto a quelli precedenti; i restanti componenti della miscela restano invariati a quelli già descritti per il primo step. Le reazioni sono state eseguite mediante l'uso di termociclatori automatici (Perkin/Elmer 9600, Cetus Corporation, Norwalk, CT, USA) e i prodotti di amplificazione sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio colorato con etidio bromuro.

## ***Sequenziamento dell'isolato ViPisal***

I due frammenti dell'isolato ViPisal, ottenuti mediante le reazioni di PCR, sono stati successivamente analizzati mediante la tecnica del sequenziamento. Al fine di questo studio è stato fondamentale determinare l'esatta sequenza nucleotidica con particolare attenzione al contenuto delle sequenze CpG poiché proprio queste ultime possono portare all'attivazione o inibizione di cascate del segnale che sono state analizzate. Le sequenze dell'isolato sono state ottenute utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 373 DNA Sequencer (PE, Biosystem) che pur rifacendosi al metodo di Sanger, prevede alcune varianti. Il metodo automatico richiede l'uso di dideossinucleotidi marcati con fluorocromi diversi che emettono fluorescenza diversa, ciò permette di effettuare le quattro reazioni in una provetta unica e il caricamento di un unico pozzetto. I campioni, dopo che è avvenuta la reazione, opportunamente purificati, vengono denaturati, inseriti nel sequenziatore e sottoposti ad elettroforesi capillare durante la quale un sensore ottico rileva il passaggio di ogni filamento di DNA ed identifica se termina con ddA, ddC, ddG o ddT. Per sequenziare il frammento lungo (3204 pb) è stato necessario utilizzare la tecnica del *chromosome walking* mentre per il frammento corto dell'isolato è stato sufficiente utilizzare la coppia di primer utilizzati per amplificare il secondo step.

## **Clonaggio dell'isolato ViPisal**

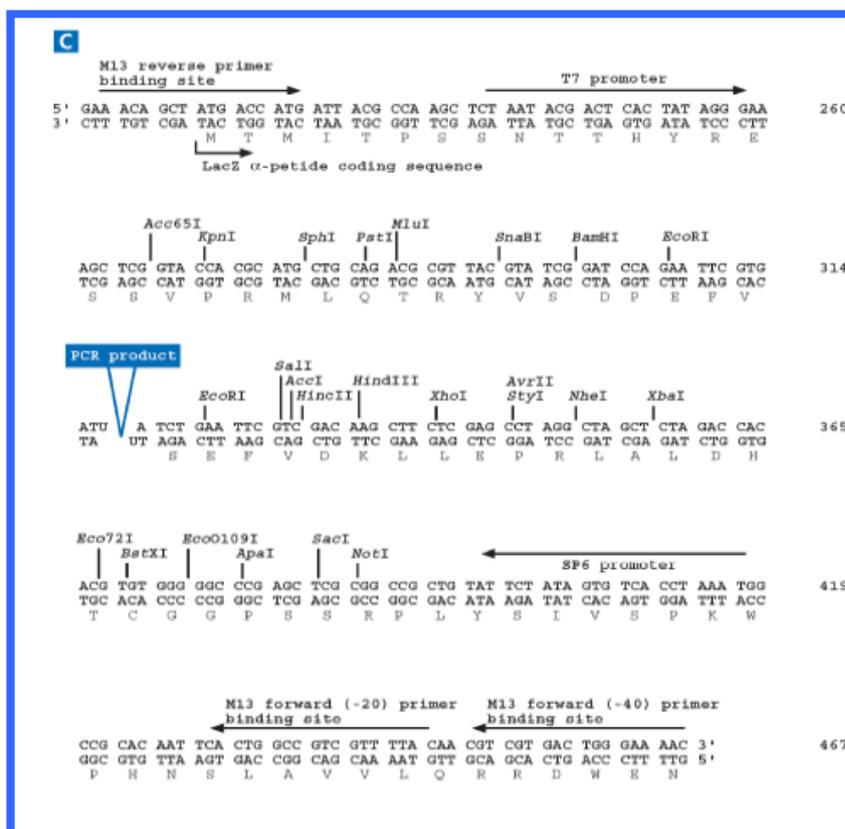
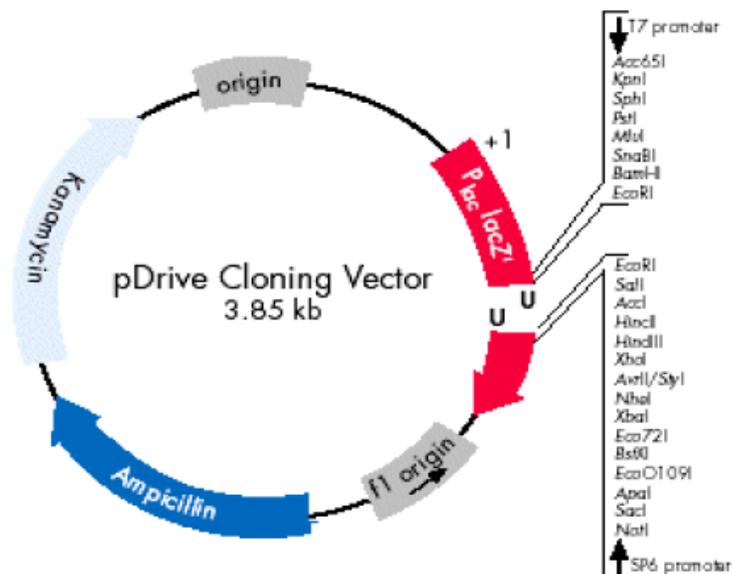
Entrambi i frammenti sono stati clonati in vettori per ottenere notevoli quantità del DNA dell'isolato. Il clonaggio del DNA è reso possibile grazie alla capacità che hanno i plasmidi batterici ed i fagi di mantenere il loro normale stile di vita anche dopo che sequenze addizionali di DNA sono state incorporate nei loro genomi. Una simile inserzione genera un plasmide o un fago ibrido costituito in parte dal DNA autentico del genoma originale ed in parte dalle addizionali sequenze "estranee". Questi elementi chimerici si replicano nei batteri esattamente come i plasmidi o fagi originali e possono essere isolati in grandi quantità. Inoltre essendo nota l'intera sequenza del plasmide, è possibile localizzare siti unici riconosciuti da diversi enzimi di restrizione. Molti vettori contengono, inoltre, marcatori di resistenza ad uno o più antibiotici che permettono una facile selezione delle cellule ospiti contenenti il plasmide. Una volta isolate le colonie d'interesse, si procede con l'estrazione del plasmide. Il clonaggio eseguito per questo lavoro è stato ottenuto utilizzando il kit commerciale QIAGEN PCR Cloning. Il kit è dotato di un vettore plasmidico pDrive Cloning Vector lineare della lunghezza di 3,85 kb, contenente al 3' una coda di poliT. Inoltre l'enzima topoisomerasi è legato covalentemente al vettore permettendo in questo modo la saldatura dell'inserito nel plasmide e la sua circolarizzazione (Figura VII). Infatti, in seguito alle caratteristiche di questo kit, è stato eseguito sull'amplificato da clonare un secondo step di PCR usando l'enzima Taq polimerasi. Esso aggiunge la coda di poliA necessaria per la complementarietà dell'inserimento del frammento nel plasmide. Successivamente l'amplificato è stato corso mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 1,5% ed è stata estratta la banda di interesse. Contemporaneamente è stato preparato il terreno di coltura. Il terreno usato per la coltura liquida è LB (Luria-Bertini) composto da: 10% di triptone, 0,5 % di estratto di lievito, 1% di NaCl pH 7,0; mentre per la coltura su piastra, si aggiunge l'agar all'LB e si autoclava a ciclo liquido per 20 minuti a 15 psi. Prima di colare il terreno nelle piastre si aggiunge l'antibiotico kanamicina ad una concentrazione finale di 50 µg/ml. Le piastre così preparate vengono conservate a 4°C. Il passo successivo è stato quello di inserire, all'interno del plasmide, il

frammento amplificato. Tale reazione prende il nome di “ligation” ed è costituita dalla seguente miscela di componenti :

- Prodotto di PCR 1-4  $\mu$ l
- Ligation Master Mix 2x 5  $\mu$ l
- Acqua sterile differenza
- Prive Cloning Vector (50 ng/ $\mu$ l) 1  $\mu$ l

Il volume finale di tale reazione deve essere 10  $\mu$ l e la quantità di prodotto di PCR varia in base all'intensità della banda osservata su gel di agarosio e in base alla lunghezza del frammento. La miscela così ottenuta viene incubata tutta la notte nel termocicizzatore alla temperatura di +8°C e poi conservata nel -20°C. Le cellule che sono state usate per il clonaggio sono un ceppo di E.coli denominato TOP10F'. Il plasmide ricombinante è stato inserito all'interno delle cellule competenti trasferendo 2  $\mu$ l delle “ligation” ad uno stock di cellule TOP10F' mescolando gentilmente e lasciando in ghiaccio per 30 minuti, tempo necessario per favorire l'entrata del plasmide all'interno delle cellule. Terminata l'incubazione, per riattivare il metabolismo cellulare, è stato necessario incubare le cellule per 30 secondi esatti a 42°C. A questo punto, si è proceduto con una precrescita rapida delle cellule in un terreno non selettivo e molto ricco, chiamato SOC (2% triptone, 0,5% estratto di lievito, NaCl 10mM, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub> e 20 mM di glucosio) per 30 minuti in termostato alla temperatura di 37°C. La crescita batterica è resa visibile dall'intorbidamento del terreno; quindi si procede alla coltura su piastra. Le cellule TOP10F' non sono in grado di metabolizzare il galattosio e non hanno il gene per la resistenza alla kanamicina, quindi per selezionare le cellule che contengono il plasmide ricombinante sono stati aggiunti alle piastre contenenti il terreno LB agarizzato e kanamicina, 100  $\mu$ l di coltura liquida, 40 $\mu$ l di isopropiltiogalattoside (IPTG) 100 mM e 40  $\mu$ l di X-GAL da uno stock 20 mg/ml. l'IPTG è necessario perché funziona da induttore non metabolizzabile della  $\beta$ -galattosidasi agendo sull'operone del galattosio; mentre l'X-GAL è un analogo del galattosio che contiene un gruppo cromogeno il quale permette di visualizzare se è avvenuta la sua metabolizzazione. Quindi nel terreno cresceranno solo le cellule che, grazie al plasmide, hanno acquistato la resistenza alla kanamicina. Per il nostro lavoro, però, è importante selezionare solo le cellule che hanno al loro interno il

plasmide. Ciò è reso possibile dal fatto che l'inserto di PCR si inserisce all'interno del plasmide andando ad interrompere il gene per la  $\beta$ -galattosidasi e impedendo quindi all'X-GAL di essere metabolizzato. Ciò provocherà, grazie alle proprietà cromogene del substrato, colonie di colore bianco. Al contrario, le cellule che conterranno il plasmide privo dell'inserto, potranno metabolizzare l'X-GAL e quindi svilupperanno colonie blu. Affinché avvenga la crescita delle colonie, le piastre vengono poste in termostato a 37°C per una notte. Il giorno seguente sulla piastra si possono osservare colonie bianche e colonie blu. A questo punto si vuole ottenere una colonia pure, così si selezionano alcune colonie bianche e si seminano in tubi contenenti 3 ml di terreno liquido LB con kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ed incubate nell'agitatore a 37°C per consentirne la crescita per una notte. Il giorno seguente la coltura liquida è stata nuovamente piastrata su LB agarizzato e le piastre sono state incubate per un'altra notte a 37°C, ottenendo in tal modo colonie pure le quali vengono stoccate in glicerolo e poste nel -80°C fino al loro utilizzo.



**Figura VII** : Mappa e siti di restrizione del plasmide prive Cloning Vector (Qiagen).

## ***Estrazione plasmidica endotoxin free***

L'endotossina, conosciuta anche con il termine di lipopolisaccaride o LPS, è spesso co-purificata insieme al DNA plasmidico. In questo studio è stato indispensabile eliminare ogni traccia di questo contaminante in quanto tutti gli esperimenti e le successive analisi potevano essere alterate dalla sua presenza. Per questo motivo, le colonie ricombinanti sono state estratte utilizzando il kit commerciale GenElute Endotoxin-free Plasmid Maxiprep (Sigma) che offre un rapido metodo per isolare fino a 1,2 mg di plasmide purificato dall'endotossina. Il protocollo prevede che le colture di E. Coli ricombinanti cresciute per una notte in terreno LB liquido (180 ml) contenente l'antibiotico vengono centrifugate a 3000 – 5000 g per 5 minuti e risospese in 4,8 ml di Resuspension Solution, mentre la lisi alcalina delle cellule batteriche è ottenuta aggiungendo 4,8 ml di Lysis Solution. Si procede con la precipitazione dei detriti cellulari aggiungendo 3,2 ml di Neutralization Solution alla soluzione lisata e il tutto viene centrifugato a 15000 g x 15 minuti a 2-8°C. A questo punto si procede alla fase di rimozione dell'endotossina che avviene aggiungendo 1,2 ml di Endotoxin Removal Solution al lisato cellulare e successiva incubazione in ghiaccio per 10 minuti. Terminata l'incubazione in ghiaccio il tubo viene trasferito in un bagnetto a 37°C per 10 minuti e poi centrifugato a 5000 g x 5 minuti. Si possono, così osservare, all'interno del tubo la formazione di due fasi di diverso colore. Il sovrantante di colore chiaro contiene il DNA plasmidico e la fase sottostante di colore blu contiene l'endotossina. Ciò permette di recuperare il sovrantante e di trasferirlo in colonne contenenti una matrice in grado di legare il DNA plasmidico; si procede ad una serie di lavaggi, con centrifugazioni a 3000-5000 g x 2 minuti, al fine di ottenere un'alta purificazione del plasmide. Infine si procede con la fase di eluizione che prevede l'aggiunta di 1 ml di Endotoxin Free Water alle colonne e successiva centrifugazione a 5000 g x 5 minuti. L'eluato così ottenuto, contenente il DNA plasmidico, è privo di ogni endotossina ed è pronto per le successive fasi sperimentali.

## ***Digestione plasmidica dell'isolato ViPiSal***

Per ottenere il DNA di TTV di questo isolato, necessario poi come stimolo nella fase sperimentale dello studio, il genoma virale è stato escisso dal vettore mediante digestioni enzimatiche. Per ottenere il frammento corto del genoma è stato sufficiente effettuare una singola digestione con l'enzima EcoRI (Fermentas), mentre per ottenere il frammento lungo di 3204 pb è stato necessario studiare e allestire una doppia digestione, rispettivamente con l'enzima PdmI (Fermentas) e con l'enzima EcoRI (Fermentas); in quanto una digestione con un solo enzima non era sufficiente a discriminare nettamente il vettore dall'inserto, a causa delle dimensioni. Il digerito, poi, è stato purificato e corso su un gel di agarosio all'1,5% e le bande di interesse estratte con il kit commerciale GenElute Gel Extraction (Sigma). Il DNA estratto è stato concentrato tramite appositi microconcentratori (Millipore) e risospeso in acqua apirogena. Un' aliquota di estratto è stata inoltre testata con LAL-Test (lisato di amebociti di *Limulus*) per verificare che non si abbia una contaminazione da endotossina superiore a 0,03 unità endotossiniche/ml.

## ***Accumulo di DNA di differenti isolati di TTV***

Essendo plausibile l'ipotesi che l'elevata eterogeneità genetica di TTV possa riflettersi in una differente capacità, dei diversi isolati, di interazione con il sistema immunitario dell'ospite; per studiare tale effetto è stato necessario accumulare il DNA di altri isolati di TTV. Data l'enorme quantità di tempo necessaria per clonare un intero genoma di TTV, grazie a collaborazioni internazionali abbiamo ottenuto 4 isolati di genoma completo di TTV appartenenti a genogruppi diversi. Anche in questo caso, per ottenere il DNA di TTV, è necessario tagliarlo dal vettore plasmidico in cui è stato clonato, mediante digestioni enzimatiche. Di seguito è riportata una tabella, con i vari isolati di TTV e gli enzimi di restrizione utilizzati per ottenere il frammento del genoma di nostro interesse.

<b>Isolati TTV *</b>	<b>Genogruppo</b>	<b>Enzimi restrizione</b>
TTH3	1	<i>Nde/BamHI/BglI</i>
TTH7	5	<i>SalI/PagI</i>
H2	3	<i>EcoRI/BglI</i>
pTTV	1	<i>Kpn2I/Nru</i>

\* I cloni molecolari ci sono stati inviati dalla Prof.ssa De Villiers (Heidelberg) e Prof. Niel (Rio de Janeiro).

Il digerito dei vari isolati, come nel caso dell'isolato ViPiSal, è stato purificato e corso su gel di agarosio all'1,5% e le bande di interesse estratte con il kit commerciale GenElute Gel Extraction (Sigma). Il DNA estratto è stato poi concentrato tramite appositi microconcentratori (Millipore), risospeso in acqua apirogena e quantificato mediante spettrofotometro, al fine di determinare quanti mg/ $\mu$ l di DNA abbiamo per le successive fasi sperimentali.

### ***Preparazione dei complessi DNA-lipofectina***

Allo scopo di indurre la formazione dei complessi la lipofectina (25  $\mu$ g) è stata diluita in terreno RPMI in assenza di siero e incubata a temperatura ambiente per 30-45 minuti. In seguito, la lipofectina è stata combinata con diverse quantità di DNA virale precedentemente reso a singolo filamento mediante denaturazione a 94°C e anch'essa diluito in terreno privo di siero. Affinchè avvenga la formazione dei complessi DNA-lipofectina è, infine, necessaria una incubazione della durata di 10-15 minuti a temperatura ambiente.

## ***Estrazione dell'RNA totale***

Il Kit utilizzato per l'estrazione dell'mRNA delle citochine dalle cellule di milza di topo è stato Rneasy Mini kit (Qiagen). Questo kit fornisce una rapida metodica per la purificazione dell'RNA da cellule animali; questa tecnologia combina le proprietà selettive di legame ad una membrana di silice con la velocità delle microcentrifugate. Trascorse 12 ore di incubazione, le cellule sono state centrifugate, e i pellet ottenuti sono stati lisati e omogeneizzati in presenza di un buffer denaturante contenente guanidina-tiocianato, in grado di inattivare immediatamente le RNasi che potrebbero degradare l'RNA. In seguito la precipitazione dell'RNA è stata ottenuta mediante l'aggiunta di un volume di etanolo al 70%. Il campione è stato quindi trasferito nelle Rneasy Mini spin column dove l'RNA totale rimane legato alla membrana delle colonne ed i contaminanti vengono eliminati attraverso lavaggi con vari buffer. Infine, l'RNA totale è stato eluito in 50 µl in acqua libera da RNasi. L'RNA totale è stato quindi quantificato, mediante lettura spettrofotometrica, e aliquotato in provette contenenti ciascuna 1 µg di RNA.

## ***Real-Time PCR***

L'RNA totale è stato retrotrascritto in cDNA utilizzando il Kit commerciale RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (Fermentas) e successivamente analizzato per poter quantificare l'espressione genica delle varie citochine prese in esame. Tutto ciò è stato fatto grazie all'utilizzo di una innovativa tecnica di Real-Time PCR che impiega il sistema MGB Eclipse Probe. Tale sistema impiega una particolare sonda che presenta al 5' il fluoro cromo reporter (6-carbossi-fluorescina, FAM o VIC) ed all'estremità 3' una molecola dark quencher in grado di mascherare la fluorescenza emessa dal reporter. Tale sonda contiene particolari gruppi MGB (Minor Groove Binder), che derivano dagli antibiotici e che hanno la proprietà di instaurare un legame stabile con il solco minore del DNA. Questo legame tra il DNA e la sonda MGB aumenta la temperatura di melting e permette

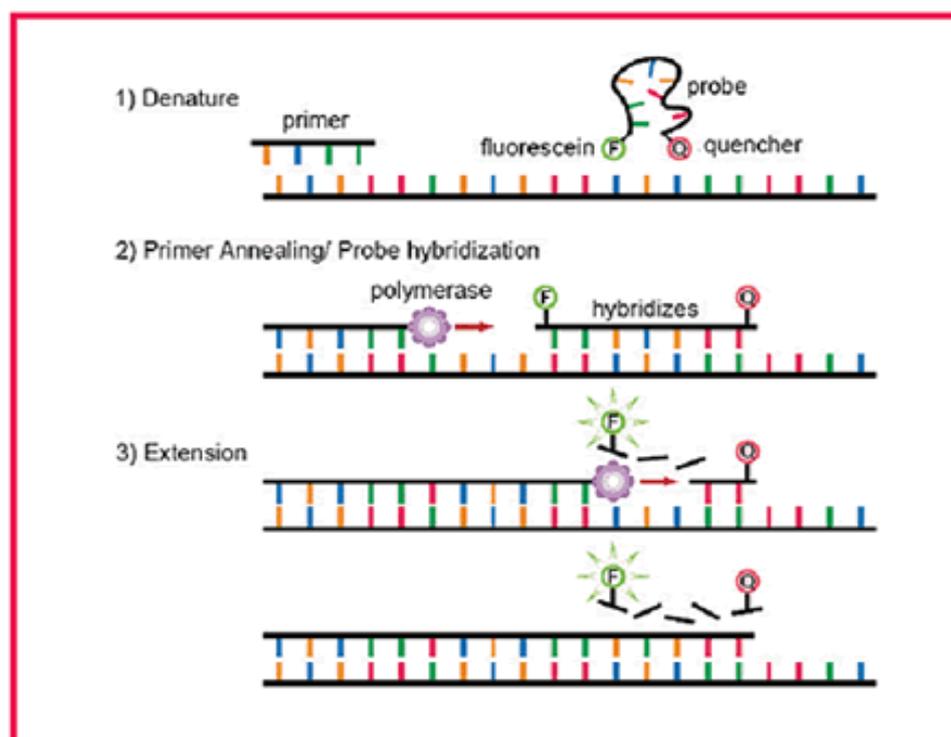
di utilizzare sonde a sequenza più breve, di conseguenza aumenta la specificità del test. Nella fase di denaturazione la sonda, grazie alla sua alta idrofobicità, assume una conformazione random in seguito alla quale il dark quencer si localizza in prossimità del reporter, mascherandone la fluorescenza emessa. Tale fluorescenza è invece emessa durante la successiva fase di annealing durante la quale la sonda legandosi alla sequenza target, allontana il dark quencer dal reporter (Figura VIII). Il legame formatosi è stabilizzato dalla molecola MGB che si colloca nel solco minore del DNA a doppio filamento. Durante la fase di estensione la sonda si stacca dalla sequenza target riassumendo la conformazione iniziale. La quantità di fluorescenza emessa, che dipende dai ripetuti cicli di PCR, risulta essere direttamente proporzionale alla quantità di DNA target presente nel campione in esame. Dal momento che la sonda presenta una specificità molto elevata è teoricamente impossibile ottenere delle reazioni con falsi positivi dovuti ad aspecifici segnali di fluorescenza. Il segnale di fluorescenza emesso è misurato ed interpretato dal sistema Applied Biosystems Prism 7700 costituito da un termocicizzatore, un laser che induce la fluorescenza, un rilevatore CCD (charge-coupled device) ed un software di elaborazione. Tale software calcola e normalizza il  $\Delta R_n$ , il parametro di fluorescenza che riflette i cambiamenti della fluorescenza stessa del reporter dopo aver sottratto il segnale ottenuto nei primi 3-15 cicli di amplificazione, quando ancora la sonda ibridata non è rilevabile. Il software, per normalizzare il  $\Delta R_n$  e correggere le inevitabili fluttuazioni della fluorescenza dovute alle variazioni di concentrazione o di volume dei campioni analizzati, deve tener conto del picco di segnale di un terzo colorante non coniugato (rodamina, ROX), che è inclusa a concentrazione costante nel tampone di reazione e il cui segnale sostanzialmente rimane costante durante l'amplificazione. Inoltre tale colorante non è sottoposto all'azione nucleasica della polimerasi. Il software calcola anche il ciclo soglia o  $C_t$ , che indica il primo ciclo in cui si ha un incremento statisticamente significativo del  $\Delta R_n$ , e che rappresenta il momento iniziale della crescita esponenziale dei prodotti di PCR. Tutti i campioni sono stati testati in triplo nella stessa seduta, e la valutazione della quantificazione ottenuta è stata considerata inattendibile ogni volta che risultavano coefficienti di variazione superiori al 50%. La polimerasi impiegata per la Real-Time è la AmpliTaq

Gold™, un'enzima termostabile estremamente sensibile anche verso sequenze bersaglio presenti a bassissimo numero di copie.

La miscela di amplificazione con un volume totale pari a 20 µl è costituita da:

- **Primer e probe:** sintetizzati da Applied Biosystem; ed ogni saggio di espressione genica è costituito da FAM™ dye-labeled TaqMan® MGB probe e di due set di primer formulati all'interno di un'unica miscela. Ogni saggio è stato ottimizzato per correre a condizioni termiche universali e con una concentrazione finale nella reazione, sia per la sonda che per ogni primer pari a 250 nM e 900 nM rispettivamente.
- **TaqMan Universal Master Mix** alla concentrazione finale 1X. Tale miscela, oltre alla polimerasi AmpliTaq Gold™, contiene: AmpErase uracil-N-glycosilase (UNG) che evita l'amplificazione dei prodotti di PCR contaminati; DNTPs con dUTP al posto di dTTP.
- 5 µl del **cDNA** estratto pari ad una concentrazione di 10-100 ng.
- x µl di acqua deionizzata a volume.

L'amplificazione è condotta dal sistema ABI 7700 con il seguente profilo ciclico: 1 ciclo a 50°C per 2 minuti affinché si attivi la UNG; 1 ciclo a 95°C per 10 minuti per permettere l'attivazione della AmpliTaq Gold polimerasi; 40 cicli alle seguenti condizioni: 95°C per 15 secondi (denaturazione) e 60°C per 1 minuto (ibridazione dei primers ed estensione).



**Figura VIII:** Principali tappe della PCR Real-Time

## ***Analisi dell'espressione genica delle citochine***

L'espressione genica delle citochine analizzate è stata calcolata mediante quantizzazione relativa dal "Relative expression software tool" (REST). Con questo metodo si compara il Ct della citochina di interesse con il Ct generato da un campione di riferimento: il "calibratore" (cellule di milza non stimolate). Il software normalizza l'espressione delle citochine di interesse rispetto all'espressione di un gene espresso costitutivamente (gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi GAPDH) mediante il valore dell'  $\Delta\text{Ct}$  ("Ct interleuchina" meno "Ct GAPDH"). Calcola quindi il  $\Delta\Delta\text{Ct}$  come differenza tra i valori di  $\Delta\text{Ct}$  delle cellule stimolate e i valori di  $\Delta\text{Ct}$  delle stesse cellule non stimolate. La differenza relativa di espressione (R) delle interleuchine tra gli splenociti stimolati e le stesse cellule non stimolate viene calcolata applicando la seguente formula:

$$R = (E_{target})^{\Delta Ct_{target}} / (E_{ref})^{\Delta Ct_{ref}}$$

*(media controllo - media campione) / (media controllo - media campione)*

In tale formula, E rappresenta l'efficienza della reazione di PCR. Tale efficienza è stata calcolata mediante la real-time PCR analizzando diluizioni scalari di un pool di cDNA derivante da cellule della milza le quali non sono state né trattate né messe in coltura. I Ct calcolati per ogni citochina e per il gene endogeno rispetto ai nanogrammi di cDNA sono stati utilizzati per tracciare una retta dalla cui pendenza si ricava il valore dell'efficienza applicando la seguente formula:

$$E = 10^{-1/pendenza}$$

Il test è in grado di stabilire se il gene analizzato è sovraespresso o sottoespresso ed inoltre elabora i dati inseriti attraverso il test di randomizzazione che fornisce un valore statistico di significatività rispetto al controllo non trattato.

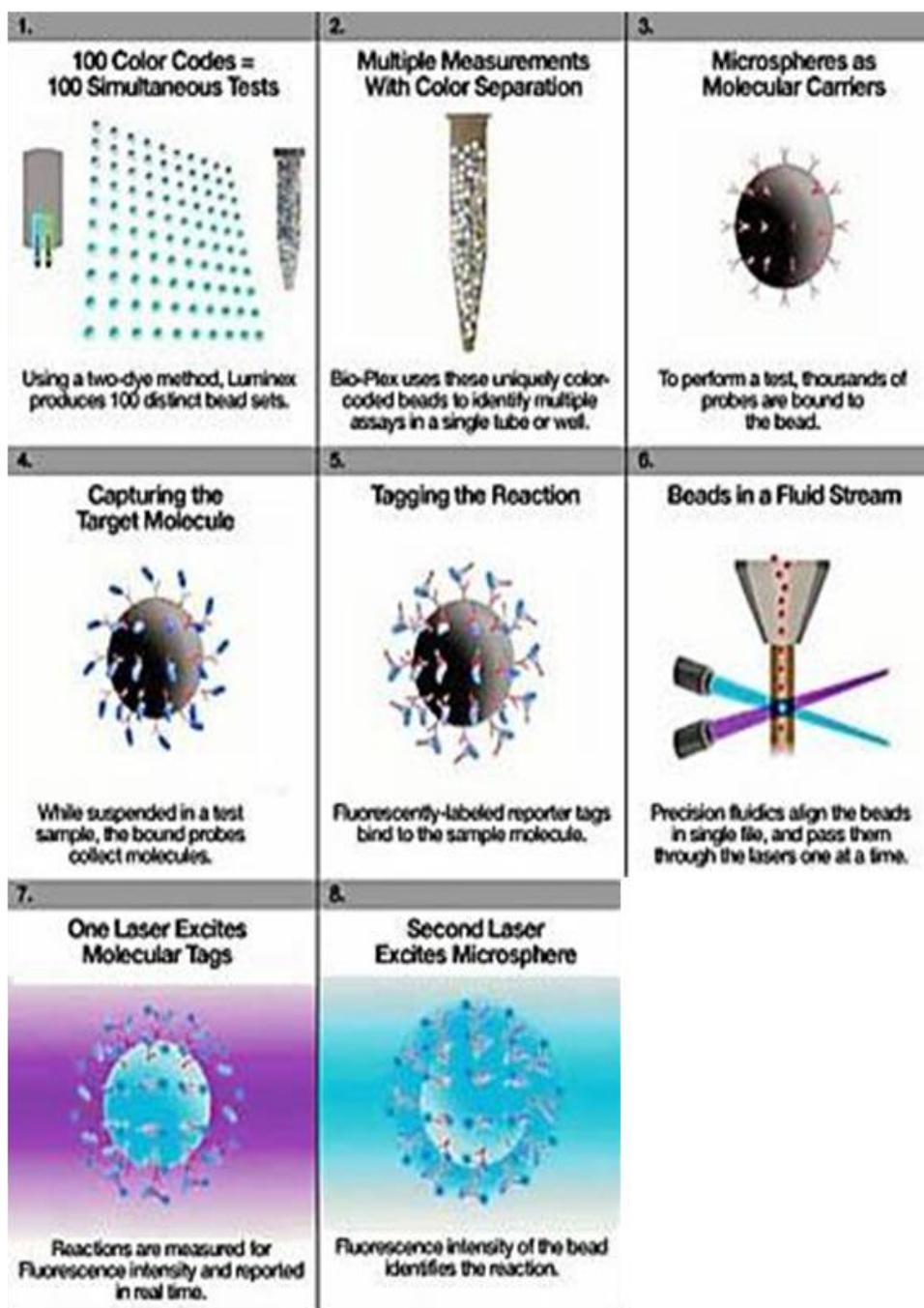
## ***Dosaggio delle citochine mediante Bio-Plex System***

La determinazione dei valori citochinici espressi nel sovranatante delle cellule è stata eseguita utilizzando la innovativa tecnologia *Luminex*. A tal fine è stato impiegato il Bio-Plex Cytokine Assay (Biorad) il quale è un sistema integrato per analisi quantitative di proteine composto da un lettore a doppio laser (uno rosso ed uno verde) per micropiastre a 96 pozzetti, il software di controllo ed analisi dei dati. Il sistema è stato progettato per permettere l'analisi simultanea di un numero massimo di 100 differenti analiti all'interno dello stesso campione.

Il sistema sfrutta un set di 100 microsfere di polistirene di 5,5 µm di diametro caratterizzate ognuna da una specifica combinazione di due fluorofori diversi. Mentre il laser rosso detto "Classify channel" eccita i 2 fluorofori di ogni microsfera e, tramite filtri di emissione selettivi, ne discrimina le 2 emissioni in modo da identificarne sia il colore e quindi identificare il saggio che si sta analizzando, sia discriminare le microsfere singole da quelle aggregate eliminando quindi risultati quantitativi falsati.

Il laser verde detto "Reporter channel", eccita le molecole reporter (anticorpi biotinilati streptoavidina-ficoeritrina coniugati) associate alle microsfere

permettendo la quantificazione dell'analita catturato (Figura IX). Grazie a questa doppia "colorazione" sono state create 100 differenti microsferi su ognuna delle quali è possibile far aderire anticorpi specifici per una proteina. Successivamente alle microsferi viene aggiunto il campione da analizzare e si procede con una incubazione affinché avvenga il legame con gli analiti. Dopo l'incubazione il contenuto di ogni micropiastra viene analizzato tramite il lettore Bio-Plex e i risultati quantitativi forniti vengono interpretati dal programma Bio-Plex Manager. Tali risultati sono molto accurati ed attendibili poiché ogni singolo dato quantitativo è calcolato sulla fluorescenza media emessa dagli anticorpi secondari presenti su molte decine di microsferi, ognuna delle quali può quindi essere considerata come un microreplicato all'interno del saggio intero.

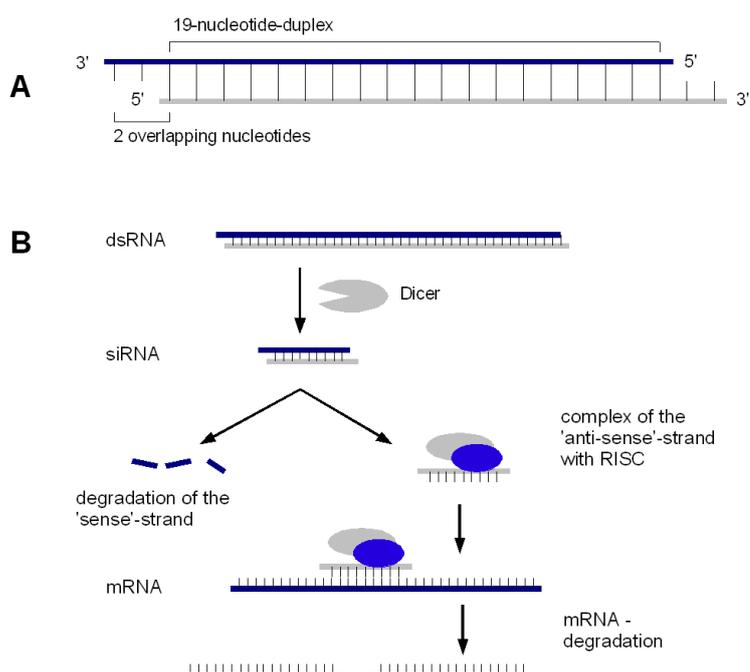


**Figura IX:** Tappe della metodica utilizzata dal sistema biplex

## ***Silenziamento genico del recettore TLR9***

Per studiare il coinvolgimento del recettore TLR9 nell'attivazione della produzione di citochine, abbiamo silenziato il recettore TLR9 in due diversi modi. In un primo momento abbiamo utilizzato la cloroquina che opera un blocco selettivo del recettore, e successivamente un metodo più specifico che utilizza la strategia degli RNA-interference (siRNA) in grado di reprimere selettivamente l'espressione post-trascrizionale degli mRNA (Figura X). La cloroquina, molecola notoriamente utilizzata come antimalarico, ha la proprietà specifica di inibire l'acidificazione dell'endosoma, condizione necessaria perché avvenga l'attivazione del TLR9; il blocco del recettore TLR9 porta, quindi, ad una inibizione dell'espressione genica. Come fase preliminare, è stato necessario condurre delle prove sulla possibile tossicità cellulare esercitata dalla cloroquina, allo scopo di determinare la dose efficace ma non tossica (ovvero la concentrazione che provoca una percentuale di morte cellulare inferiore al 50%). La vitalità delle cellule di milza di topo, esposte a diverse concentrazioni di cloroquina, è stata valutata mediante saggio di esclusione con Trypan blue e la concentrazione massima non tossica è risultata essere pari a 10  $\mu$ M. Questi dati hanno permesso di progettare il successivo esperimento, nel quale le cellule di milza di topo, precedentemente incubate con la cloroquina, sono state stimolate con i vari ligandi del TLR9.

Il silenziamento genico del TLR9, utilizzando gli RNA-interference, è stato invece mediato da piccoli frammenti di RNA a doppio filamento (small interfering RNAs – siRNA) precisamente nel nostro caso da due diversi siRNA che si localizzano in posizioni diverse del gene TLR9. Tali siRNA sono stati sintetizzati e transfettati utilizzando kit commerciali (Qiagen, Hilden, Germany).



**Figura X:** Processo molecolare utilizzando specifici siRNA

## ***Analisi statistica***

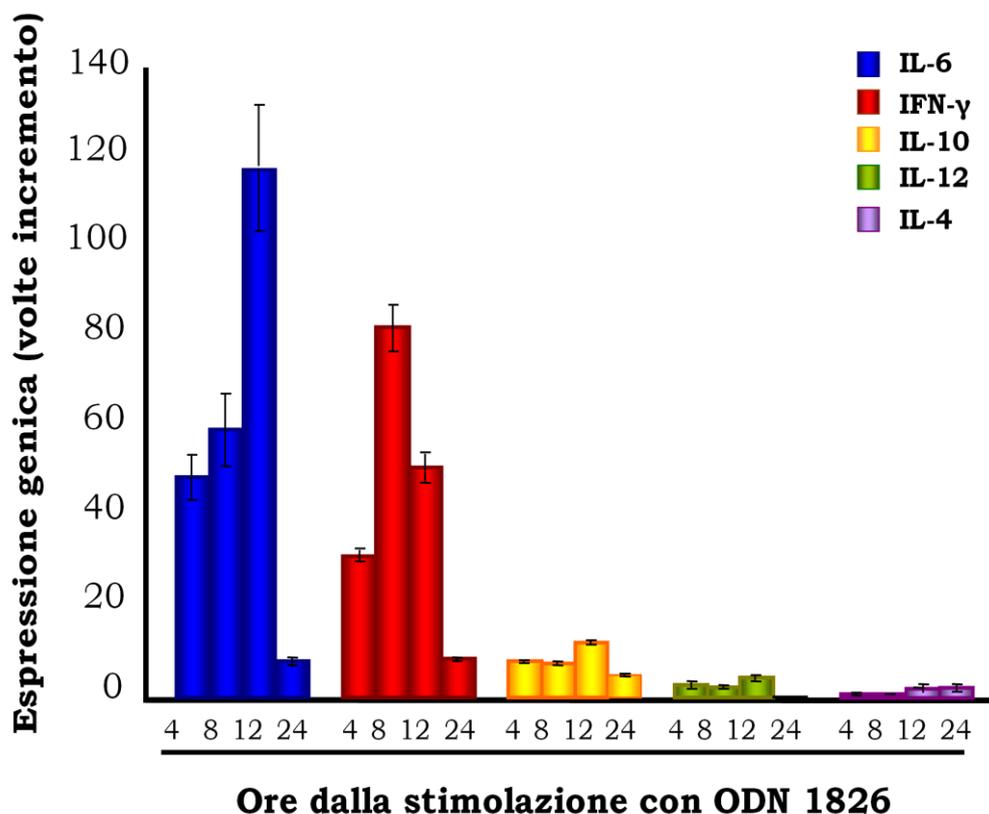
Le differenze tra le medie sono state stimate mediante il test t di Student a due code. Tutti i test sono stati realizzati adottando il programma SPSS versione 8.0 per windows.

## **Sezione III**

### ***Risultati***

## ***Messa a punto di un modello sperimentale “in vitro” e analisi dell’espressione genica delle citochine***

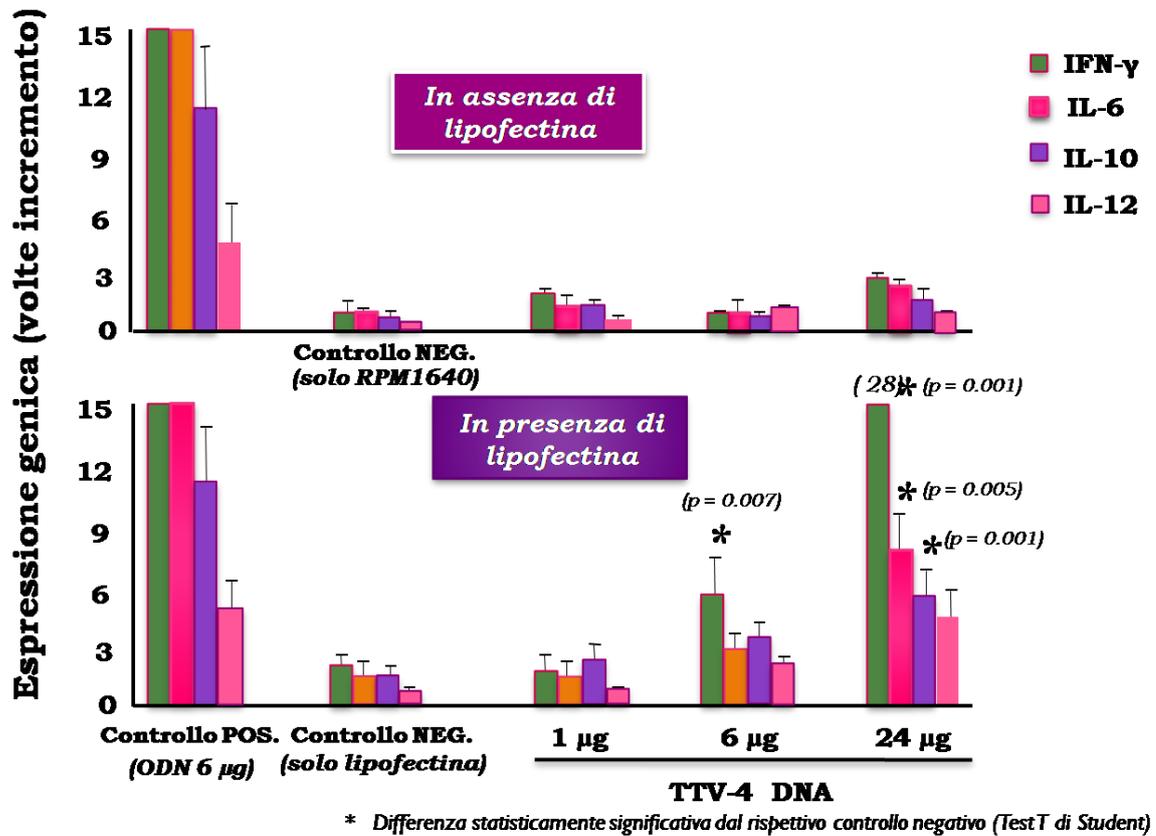
Scopo di questo progetto di ricerca è lo studio dei meccanismi e degli effetti dell’interazione fra il recettore TLR9 e il virus Torqueteno e le conseguenze che questa interazione ha sul sistema immunitario dell’ospite. Per far ciò, come primo obiettivo è stata valutata l’induzione dell’espressione genica delle citochine e quindi della loro sintesi, da parte del DNA di TTV nel momento in cui esso interagisce con il recettore TLR9, attivandolo. A tal fine è stato necessario avere a disposizione genomi virali interi appartenenti a diversi genogruppi di TTV, in particolare sono stati utilizzati 5 cloni di genomi virali interi appartenenti a 4 diversi genogruppi, in particolare l’isolato ViPiSal appartenente al genogruppo 4 è stato isolato e interamente clonato dal mio gruppo di ricerca, mentre gli altri 4 isolati, TTH7 appartenente al genogruppo 5, TTH3 e Pttv appartenenti al genogruppo 1 e H2 appartenente al genogruppo 3, sono stati forniti da gruppi di ricerca internazionali con cui da tempo sono state intraprese collaborazioni. Per realizzare il primo obiettivo di questo studio è stato messo a punto un modello sperimentale “in vitro” che utilizza come substrato le cellule di milza di topo particolarmente ricche di TLR9. Le tempistiche utilizzate per valutare l’espressione genica delle varie citochine sono state decise dopo uno studio preliminare sulla loro cinetica d’espressione. Le citochine esaminate sono state quelle di tipo Th1, IFN- $\gamma$  e IL-12, quelle di tipo regolatorio IL-6 e IL-10, e quelle di tipo Th-2, ossia IL-4. Lo stimolo scelto per questo studio preliminare è stato l’ODN 1826. La cinetica d’espressione è stata valutata a tempi diversi (4, 8, 12, 24 ore) dall’inizio della stimolazione. I risultati ottenuti sono espressi come volte di incremento dell’espressione della citochina da parte delle cellule stimolate, rispetto a cellule di controllo non stimolate. Come mostrato nella figura XI, la stimolazione con ODN 1826 ha indotto la massima attivazione a 12 ore dallo stimolo per IL-6, IL-10 e IL-12, invece il picco di espressione per IFN- $\gamma$  risulta a 8 ore ma dopo 12 ore è ancora presente una buona induzione di questa molecola. Da notare come l’IL-4, l’unico mediatore di classe Th-2 in analisi, non sia stato attivato dalla presenza dell’ODN 1826.



**Figura XI:** Cinetica d'espressione delle citochine dopo stimolazione con ODN 1826

Sulla base di questi risultati e dal momento che l'ODN 1826 contiene nella sua sequenza motivi CpG di tipo stimolatorio che mimano l'effetto del DNA virale, è stato fissato per i successivi esperimenti una incubazione substrato-stimolo della durata di 12 ore. Il passo successivo è stato quello di stabilire se anche il DNA di TTV fosse in grado di indurre il medesimo effetto dell'ODN 1826. Il DNA di TTV utilizzato inizialmente è stato quello dell'isolato ViPiSal appartenente al genogruppo 4 (DNA-TTV4), isolato dal siero di un paziente affetto da artrite reumatoide. Lo studio è stato focalizzato sulla valutazione dell'espressione di IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12 e IL-10, le citochine maggiormente indotte dalla stimolazione dell'ODN. Preliminarmente il DNA-TTV4 a diverse concentrazioni ( 1, 6, 24  $\mu$ g) è stato incubato a 37°C per 12 ore con cellule di milza di topo; il DNA virale utilizzato è costituito da due frammenti genomici di diversa lunghezza e mescolati in modo tale da ottenere concentrazioni equimolari. Come controllo

positivo dell'esperimento è stato utilizzato l'ODN 1826 mentre come controllo negativo è stata utilizzata acqua apirogena. Come mostrato nella figura XII il DNA di TTV, a tutte le concentrazioni usate, non ha prodotto una significativa espressione di nessuna delle citochine analizzate. La stimolazione con ODN 1826 ha mostrato invece una significativa attivazione delle citochine di tipo regolatorio (IL-6, IL-10) e dell' IFN- $\gamma$ , mentre l'espressione dell'IL-12 non è risultata significativamente aumentata. Il fatto che il DNA di TTV non abbia mostrato alcun effetto stimolatorio, poteva essere dovuto alla sua mancata penetrazione all'interno del compartimento cellulare. Per ovviare a tale problema, il DNA virale e i rispettivi controlli sono stati incubati assieme ad una concentrazione standard di lipofectina per evitare che il DNA virale potesse essere pre-digerito da nucleasi esogene non riuscendo così a penetrare la membrana cellulare. Come mostrato nella figura X, il DNA-TTV4 è stato in grado di indurre incrementi statisticamente significativi di tutte le citochine di classe Th-1 e regolatorie e tale incremento è risultato dipendente dalla concentrazione di DNA virale usata. In particolare, la citochina che ha mostrato un maggiore picco d'espressione è stata l'IFN- $\gamma$  e tale picco era paragonabile a quello osservato dopo stimolazione con ODN 1826, . Le cellule inoltre sono state sottoposte a stimolazione con la sola lipofectina (controllo negativo) e come atteso non è stato osservato alcun incremento significativo nell'espressione delle citochine analizzate.



**Figura XII:** Espressione genica delle citochine dopo stimolazione con dosi crescenti di TTV

### ***Dosaggio delle citochine prodotte dall'isolato ViPiSal***

L'evidenza di una significativa induzione dell'espressione genica dovuta alla presenza del DNA virale dell'isolato ViPiSal, ha portato ad ipotizzare che TTV possa le quantità di citochine sintetizzate dopo stimolazione con il DNA-TTV4 (sempre utilizzato in combinazione con avere un'azione immunomodulante, spingendo il sistema immunitario verso una risposta di tipo Th-1. I geni maggiormente espressi da TTV sono infatti quelli per l'IFN-γ e l'IL-6. Perciò sono stati eseguiti esperimenti per valutare se all'aumentata espressione genica, corrisponda anche un'effettiva sintesi della proteina. L'esperimento è stato

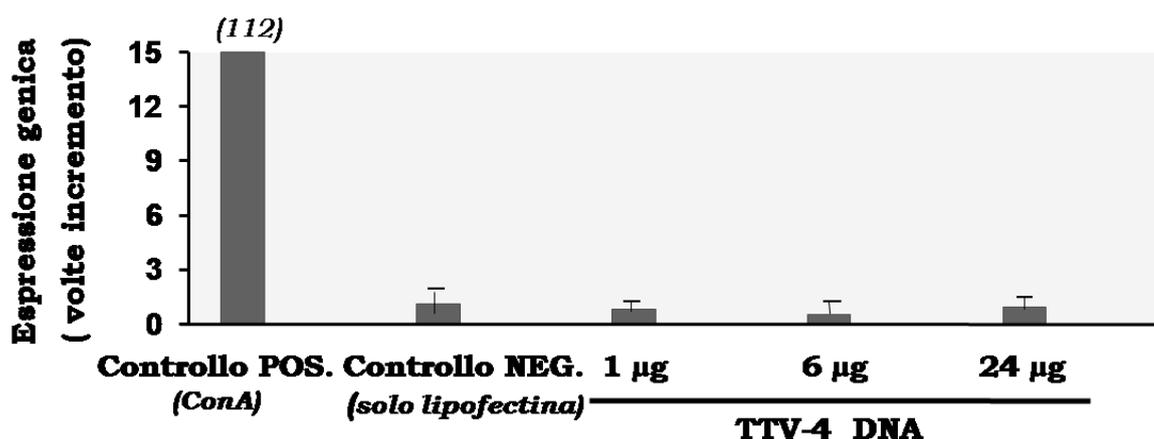
condotto confrontando le quantità di citochine sintetizzate dopo stimolazione con il DNA-TTV4 (utilizzato sempre in combinazione con la lipofectina) con quella indotta da uno stimolo di controllo rappresentato dalla sola lipofectina. Dagli esperimenti è risultato evidente un significativo incremento nella sintesi di IFN- $\gamma$  e IL-6 dopo stimolazione con il DNA-TTV4. In particolare, dopo 16 ore di incubazione, si verifica un picco nella produzione di IFN- $\gamma$ , tale livello di sintesi risulta altamente significativo quando confrontato con la sintesi della citochina indotta dallo stimolo di controllo; per quanto riguarda invece l'IL-6 tale picco si verifica dopo 24 ore di incubazione col genoma virale (tabella IV); per entrambe le citochine è stato così dimostrato come all'aumentata espressione del gene corrisponde invariabilmente la produzione della proteina.

Citochine (ore)	TTV-4 DNA (media pg/ml $\pm$ DS)	Solo Lipofectina (media pg/ml $\pm$ DS)	Differenza statistica
<b>IFN - <math>\gamma</math></b>			
8	16.7 $\pm$ 3.0	1.4 $\pm$ 0.1	p < 0.01
12	26.7 $\pm$ 3.3	2.1 $\pm$ 1.8	p < 0.01
16	35.5 $\pm$ 2.5	1.5 $\pm$ 0.2	p < 0.05
<b>IL-6</b>			
18	22.5 $\pm$ 4.1	5.5 $\pm$ 1.0	p < 0.05
24	27.9 $\pm$ 0.1	4.1 $\pm$ 0.3	p < 0.01

**Tabella IV:** Produzione di citochine indotta dal DNA- TTV4

E' stato inoltre esaminato se la mancata attivazione genica dell'IL-4, citochina di classe Th2, da parte dell'ODN 1826, ottenuta negli esperimenti iniziali di messa a punto del sistema "in vitro", si verificasse anche quando lo stimolo fosse rappresentato dal DNA-TTV4. E' stato così allestito un esperimento per valutare l'espressione genica dell' IL-4 stimolando il substrato, rappresentato dalle cellule di milza di topo, con dosi differenti di TTV4 (1, 6, 24  $\mu$ g) sempre in associazione con la lipofectina e con due controlli: uno negativo il cui stimolo è rappresentato

dalla sola lipofectina e uno positivo, rappresentato dalla concanavalina-A, che notoriamente è in grado di indurre l'espressione genica delle citochine utilizzando, però, per la trasduzione del segnale recettori differenti dal TLR9. Confrontando i substrati stimolati col DNA virale con quelli di controllo, è stato evidenziato che, indipendentemente dalla dose utilizzata, TTV non induce aumento dell'espressione del gene per l'IL-4, infatti i livelli di espressione nei substrati trattati con lo stimolo DNA-TTV4 sono i medesimi di quelli riscontrati nel controllo negativo (figura XIII). Al contrario, nel substrato trattato con il controllo positivo, rappresentato dalla concanavalina-A, è stato osservato un netto incremento dell'espressione genica dell' IL-4, e ciò conferma l'ipotesi che il genoma di TTV interagendo con il recettore TLR9 non è in grado di attivare il gene dell'IL4.



**Figura XIII:** Espressione genica dell'IL-4

A conferma dei risultati ottenuti, è stata dosata la produzione della proteina nel sovrinatante delle cellule, e come riportato nella tabella non si evidenzia nessun incremento nella sintesi di IL-4 a seguito della stimolazione con i complessi lipofectina-DNA-TTV4, anche quando il tempo di incubazione stimolo-substrato è stato aumentato fino a 24 ore. Tali risultati avvalorano maggiormente l'ipotesi che l'interazione fra TTV e TLR9 non porta alla produzione di IL-4, citochina di classe Th2, ma spinge il sistema immunitario verso la produzione di citochine di classe Th1 ( tabella V).

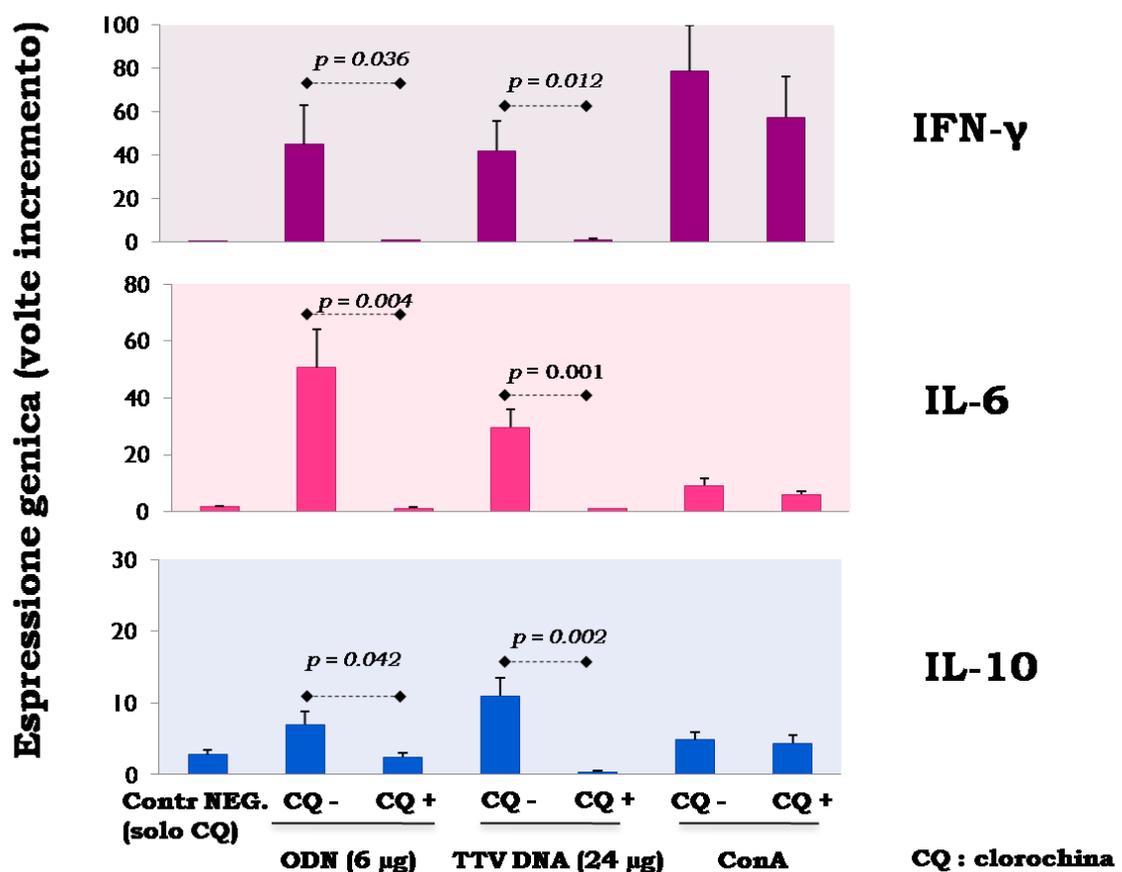
IL-4 (ore)	DNA-TTV4 (media pg/ml $\pm$ DS)	Solo lipofectina (media pg/ml $\pm$ SD)	Differenza statistica
<b>18</b>	<b>0.6 <math>\pm</math> 0.2</b>	<b>0.9 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>NS</b>
<b>24</b>	<b>0.9 <math>\pm</math> 0.5</b>	<b>0.5 <math>\pm</math> 0.1</b>	<b>NS</b>

**Tabella V:** Produzione dell'IL-4 indotta dal DNA-TTV4

### ***Dimostrazione dell'interazione fra TTV-DNA e il TLR9***

Il passo successivo è stato quello di studiare il coinvolgimento del recettore TLR9, nell'attivazione delle citochine di tipo Th1 indotte dal DNA-TTV4. In un primo momento è stata utilizzata la cloroquina, tale molecola ha la capacità di inibire l'acidificazione del lisosoma, condizione necessaria affinché abbia luogo l'attivazione del TLR9. In tal modo il blocco del recettore TLR9 conduce all'inibizione dell'espressione genica. Come fase preliminare, è stato necessario condurre delle prove sulla possibile tossicità cellulare esercitata dalla cloroquina, allo scopo di determinare la dose efficace ma non tossica (ovvero la concentrazione che provoca una percentuale di morte cellulare inferiore al 50%). La vitalità delle cellule di milza di topo, esposte a diverse concentrazioni di cloroquina, è stata valutata mediante saggio di esclusione con Trypan blue e la concentrazione massima non tossica è risultata essere pari a 10  $\mu$ M. Questi dati hanno permesso di progettare il successivo esperimento, nel quale le cellule di milza di topo, precedentemente incubate con la cloroquina, sono state stimulate con i vari ligandi del TLR9: ODN, DNA-TTV4 e Concanavalina-A. È stata così esaminata l'espressione genica dell'IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-10. I risultati hanno mostrato come i substrati cellulari, rappresentati dalle cellule di milza di topo, stimulate con DNA-TTV4 sempre in associazione con la lipofectina o con ODN, in seguito a pre-trattamento con cloroquina riducono quasi totalmente l'espressione delle citochine da noi analizzate. Al contrario nelle cellule di milza di topo in cui era stata aggiunta la Concanavalina-A non si osserva alcun significativo effetto sull'espressione delle citochine, perché come atteso la Concanavalina-A è in grado di indurre la trascrizione dei geni per le citochine attraverso un

meccanismo TLR9-indipendente. Come mostrato nella figura XIV, la citochina maggiormente espressa è risultata essere l'IFN-  $\gamma$  e poiché è anche la più rappresentativa delle citochine di classe Th1 è stato scelto di dosare solo la produzione di questa proteina. I risultati dell'analisi dei dosaggi dell' IFN-  $\gamma$ , riportati nella tabella VI, hanno mostrato come le cellule di milza di topo stimulate con DNA-TTV4 sono in grado di produrre dosi elevate di IFN-  $\gamma$ , mentre quando le stesse cellule, precedentemente trattate con cloroquina, stimulate poi con DNA-TTV4 non sono in grado di produrre e secernere tale molecola. Quindi l'analisi dei dosaggi dell'interferone hanno rafforzato l'ipotesi che il DNA-TTV4, attraverso il recettore TLR9, è in grado di indurre la produzione di citochine prevalentemente di classe Th1.

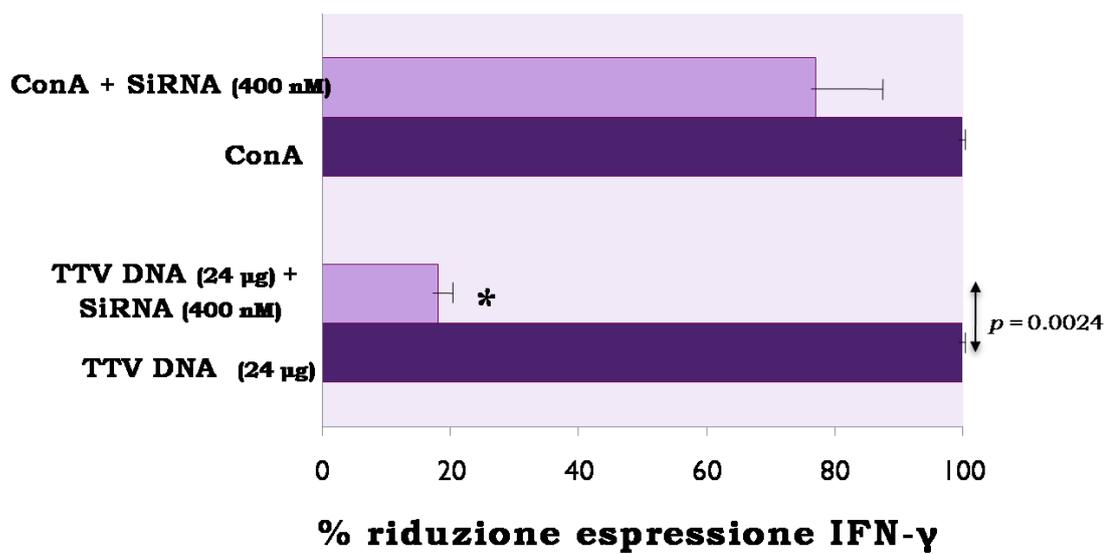


**Figura XIV:** Espressione genica indotta da vari stimoli in presenza e in assenza di cloroquina.

Ligandi TLR9	Clorochina	IFN- $\gamma$ (media pg/ml $\pm$ DS)
DNA-TTV4	NO	34.0 $\pm$ 2.9 *
DNA-TTV4	SI	0.5 $\pm$ 5.6

**Tabella VII:** Dosaggi di IFN-  $\gamma$

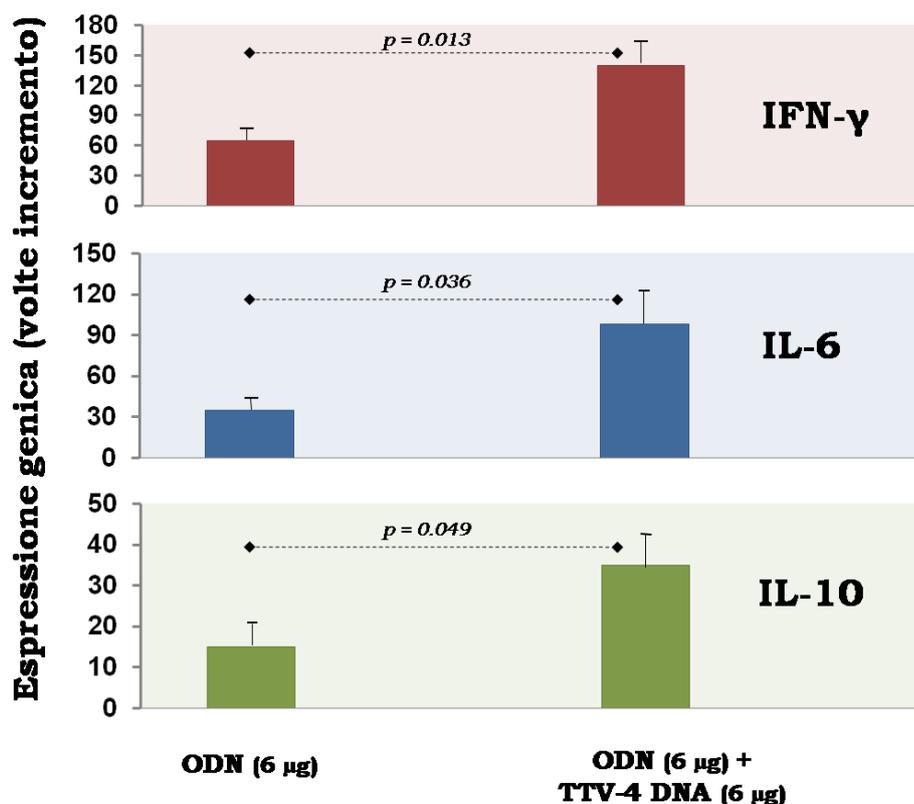
Un' ulteriore dimostrazione della veridicit  dell'ipotesi presa in esame   stata ottenuta mediante un metodo pi  specifico di silenziamento genico del TLR9, che utilizza la strategia degli RNA-interference (siRNA) in grado di reprimere selettivamente l'espressione post-trascrizionale degli mRNA. E' stato cos  allestito un esperimento in cui sono stati valutati i livelli di espressione genica dell' IFN-  $\gamma$  in cellule di milza di topo stimulate con DNA-TTV4, sempre in associazione con la lipofectina e con Concanavalina A; tali livelli di espressione sono stati poi confrontati con i valori ottenuti da cellule di milza di topo silenziate con gli specifici siRNA e contemporaneamente stimulate con gli stessi ligandi (DNA-TTV4 e ConA). Come mostrato nella figura XV, le cellule stimulate con il DNA-TTV4 dopo trattamento con gli specifici siRNA sono state in grado di ridurre quasi totalmente l'espressione dell'IFN- $\gamma$ ; in particolare tali livelli di espressione sono stati significativamente ridotti pi  dell'80%. Al contrario l'uso degli siRNA specifici per il TLR9 non ha mostrato alcun significativo effetto sull'espressione delle citochine prodotte dalla Concanavalina-A, indicando chiaramente come la produzione di citochine da parte del DNA di TTV sia mediato dal recettore TLR9. I risultati ottenuti ci hanno, cos , permesso di dimostrare come il DNA di TTV dell'isolato utilizzato   stato in grado di indurre il sistema immunitario verso la produzione di citochine di classe Th1.



**Figura XV:** Espressione genica dell' IFN- $\gamma$  con l'uso di specifici siRNA per il TLR9

### **Sinergismo fra TTV-DNA e ODN**

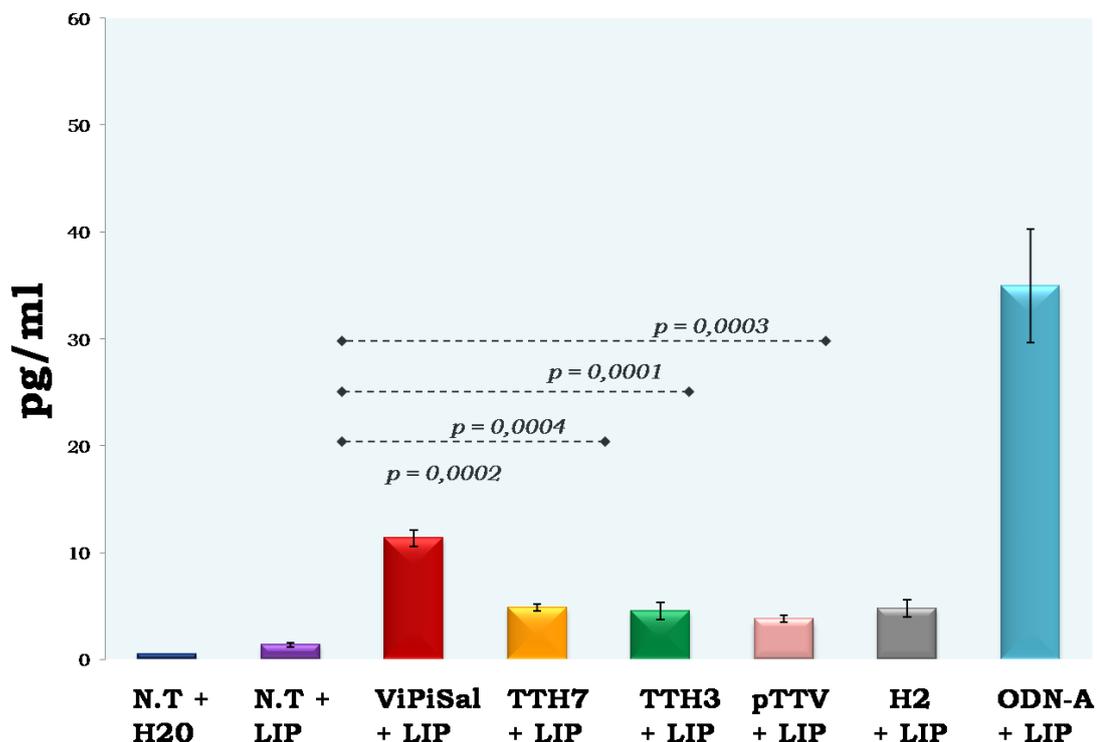
Ottenuti i precedenti risultati è stato interessante andare a valutare la potenziale capacità del DNA virale di modulare l'azione dell'ODN1826, che da solo risulta un potente attivatore delle citochine di classe Th1. Così è stato allestito un esperimento in cui le cellule di milza di topo sono state stimulate con ODN1826 da solo e in combinazione con 6 µg di DNA-TTV4 associato sempre con la lipofectina. Come riportato in figura XVI, il DNA-TTV4 usato in combinazione con l'ODN1826 ha indotto nelle cellule una espressione genica delle citochine più spiccata rispetto a quella indotta dalla stimolazione con solo ODN1826. Ciò fa ipotizzare che il DNA di TTV sia in grado di agire sinergicamente con l'ODN potenziandone così l'azione. Ancora una volta la citochina che ha mostrato la maggiore attivazione è stata l' IFN-γ, confermando così la capacità dell'isolato di TTV preso da noi in esame , di spingere verso una risposta immunitaria di tipo Th1.



**Figura XVI:** Effetto sinergico fra il DNA di TTV e ODN

## ***Studio dell'effetto di isolati diversi di TTV sul sistema immunitario dell'ospite***

I risultati ottenuti dai precedenti esperimenti in cui è stato utilizzato l'isolato ViPiSal appartenente al genogruppo 4 di TTV, hanno permesso di dimostrare come tale l'isolato sia in grado di spingere il sistema immunitario verso una risposta di tipo Th1. E' stato così interessante andare a valutare l'effetto degli altri isolati di TTV sulla risposta immunitaria locale e sistemica dell'ospite. Poiché è stato precedentemente dimostrato che all'aumentata espressione del gene corrisponde invariabilmente la produzione della proteina, è stato allestito un esperimento in cui sono state dosate le citochine prodotte nel sovrantante delle cellule di milza di topo, dopo 16 ore dalla stimolazione con il DNA di TTV dei diversi isolati. E' stato, però, scelto di dosare solo la produzione di IFN- $\gamma$  in quanto questa è stata la citochina che nei precedenti esperimenti ha mostrato livelli di espressione più elevati e perché è la più rappresentativa delle citochine di classe Th1. Anche in questo caso il DNA di TTV dei vari isolati, da noi accumulato come descritto precedentemente nella sezione Materiali e Metodi, è stato utilizzato nell'esperimento sempre in combinazione con la lipofectina. I risultati, come mostrato nella Figura XVII, hanno evidenziato una differenza significativa tra l'isolato ViPiSal, utilizzato come isolato di riferimento nei precedenti esperimenti, e gli altri 4 isolati presi da noi in esame, in particolare l'isolato TTH7 appartenente al genogruppo 5, TTH3 appartenente al genogruppo 1, pTTV appartenente al genogruppo 1 e H2 appartenente al genogruppo 3, e una notevole produzione di IFN- $\gamma$  da parte dell'ODN di classe A, utilizzato come controllo positivo. La lettura dei risultati, quindi, evidenzia come l'isolato ViPiSal appartenente al genogruppo 4, abbia una differente capacità di interazione con il sistema immunitario dell'ospite. Ciò appare interessante e apre nuove strade di ricerca per indagare se altri isolati del genogruppo 4 abbiano un ruolo diverso nel modulare la risposta immunitaria dell'ospite ed agire come un cofattore aggravante in alcune patologie.

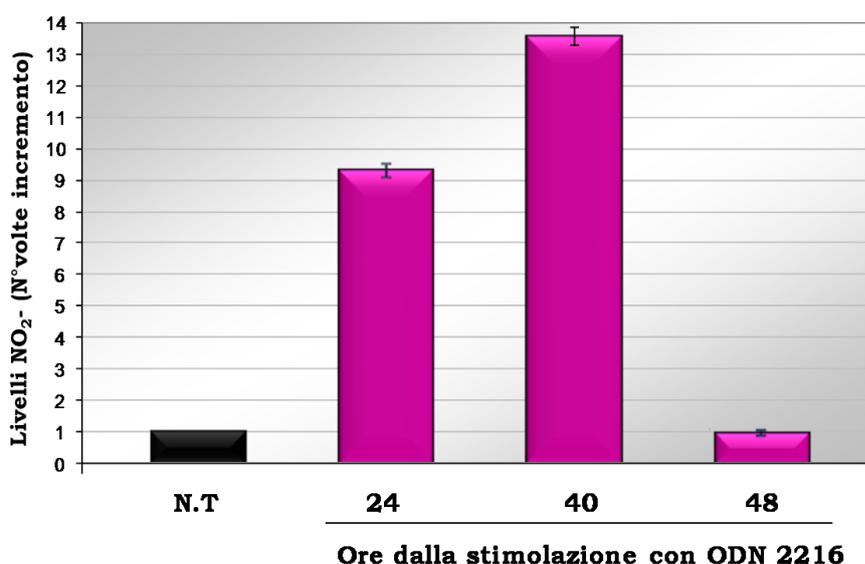


**Figura XVII:** Dosaggio delle citochina IFN- $\gamma$  da parte dei diversi isolati di TTV

### ***Studio dell'effetto del genoma di TTV su una linea cellulare umana di origine respiratoria***

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'espressione e la funzionalità del recettore TLR9 e dell'enzima iNOS, deputato alla produzione di NO, mediante stimolazione con i motivi CpG sintetici (ODN) e il DNA di TTV. La scelta di utilizzare una linea cellulare umana respiratoria, in particolare la linea A549 di epitelio alveolare, deriva sia da studi presenti in letteratura (Jiang et al., 2009) sia dalla dimostrazione in precedenti studi condotti su bambini affetti da malattie respiratorie acute, che il tratto respiratorio è sede di infezione primaria e continua replicazione di TTV (Maggi et al., 2003) e che i titoli del virus, trovati a livello del tratto respiratorio, sono correlati ad un aumentato livello di ossido nitrico (NO) nell'aria espirata. A tal fine è stata valutata la produzione di NO, utilizzando il reagente di Greiss, l'espressione del recettore TLR9 e l'attivazione dell'enzima inducibile iNOS, mediante Real-Time PCR. Come primo passo è stato

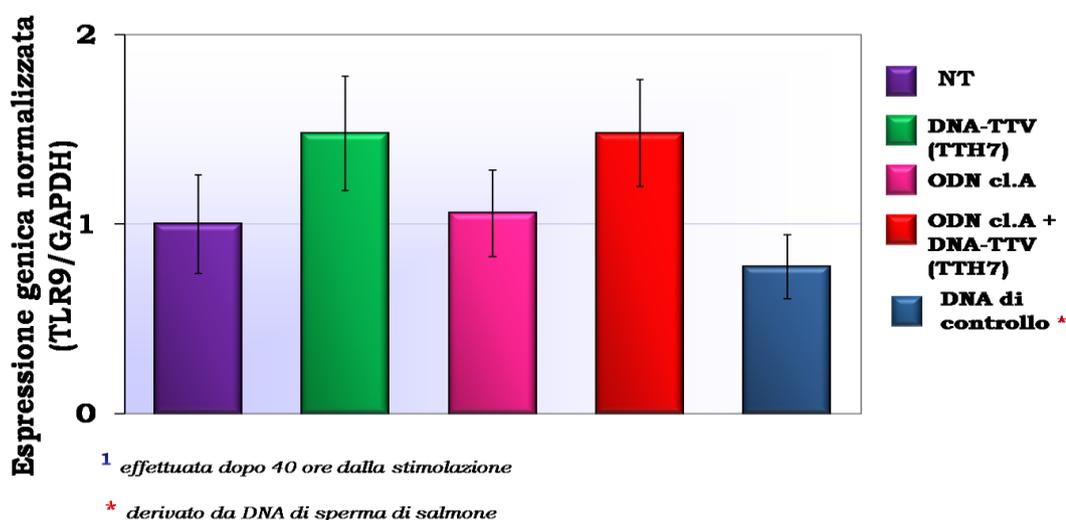
condotto uno studio preliminare per individuare quale fosse il tempo d'incubazione ottimale fra le cellule A549 e gli stimoli utilizzati. Come stimolo, in questo studio pilota, è stato utilizzato l'ODN 2216 di classe A, poiché in molti lavori presenti in letteratura è riportato che i CpG-ODN di classe A sono abili ad attivare l'enzima ossido nitrico inducibile deputato alla produzione di NO (Kneuferrmann et al., 2008). Il dosaggio per la valutazione della produzione di NO è stato effettuato a tempistiche differenti, in particolare dopo 24, 40 e 48 ore dalla stimolazione ed è stata valutata la produzione di NO, utilizzando il Reagente di Greiss che permette la determinazione dei nitriti come indicatore di produzione di ossido nitrico mediante il metodo spettrofotometrico che presenta il massimo assorbimento a 520 nm. Come riportato in figura XVIII è stato osservato che la stimolazione con ODN 2216 ha indotto la massima produzione di NO dopo 40 ore dalla stimolazione anche se una buona produzione risultava presente dopo 24 ore.



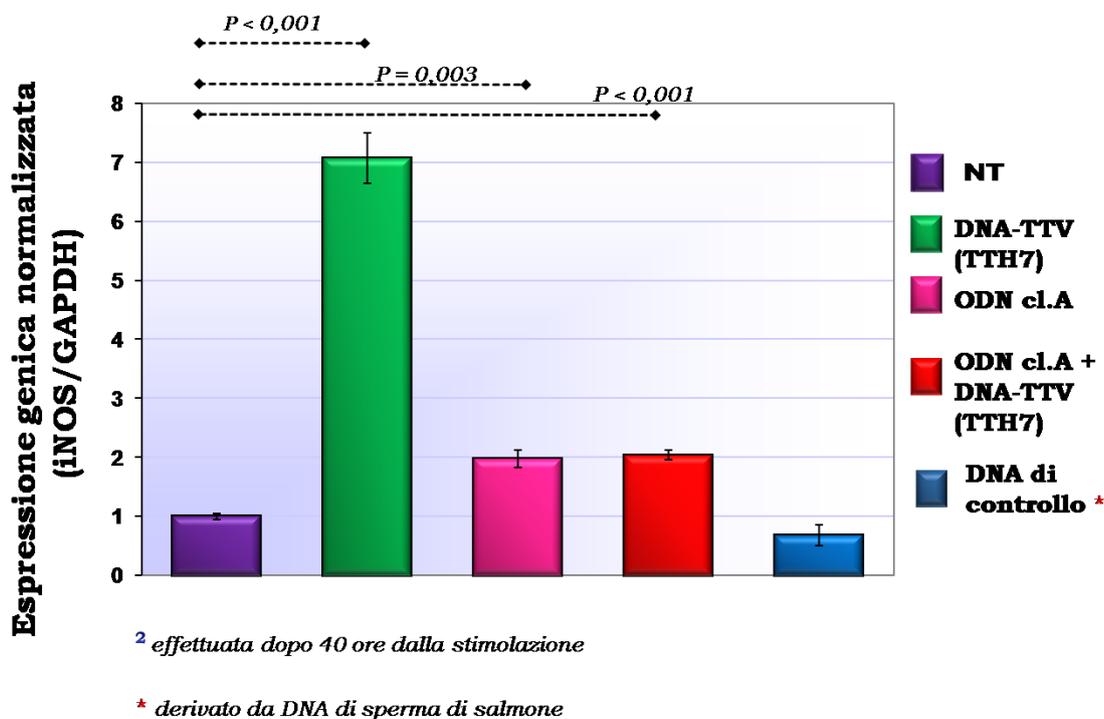
**Figura XVIII:** Dosaggio delle produzioni di NO utilizzando come stimolo ODN 2216

Sulla base di questi risultati e dal momento che l'ODN 2216 contiene nella sua sequenza motivi CpG di tipo stimolatorio che mimano l'effetto del DNA virale, è stato condotto l'esperimento incubando le cellule A549 con il DNA di TTV di un isolato, in particolare in questi esperimenti è stato utilizzato il DNA dell'isolato TTH7 in quanto è uno tra gli isolati che nel precedente esperimento ha mostrato

una produzione di IFN- $\gamma$  comparabile agli altri presi in esame confrontati poi all'isolato di riferimento ViPiSal. Come stimoli positivi nell' esperimento sono stati utilizzati l'ODN 2216 da solo e in associazione con il DNA di TTV ed inoltre è stato utilizzato anche un DNA di controllo, Salmon sperm DNA, che contiene all'interno della sua sequenza motivi CpG metilati e quindi non in grado di attivare il TLR9 e di conseguenza tutta la cascata di trasduzione che culmina nella produzione di citochine pro-infiammatorie. E' stata, così, valutata l'espressione del recettore TLR9 e l'attivazione dell'enzima inducibile iNOS mediante Real-Time PCR, con quantizzazione relativa, dopo 40 ore dalla stimolazione. I risultati, come mostrato in Figura XIX hanno evidenziato una attivazione pressoché identica del recettore TLR9 da parte di tutti gli stimoli utilizzati nell'esperimento, mentre la valutazione dell'espressione genica dell' iNOS, mostrata in Figura XX, ha rilevato come il DNA di TTV utilizzato sia stato in grado di indurre incrementi statisticamente significativi rispetto al controllo negativo e all'ODN 2216.



**Figura XIX:** Espressione genica del TLR9



**Figura XX:** Espressione genica dell'iNOS

Tali risultati rafforzano ulteriormente, ciò che è stato dimostrato nel modello murino, ovvero il DNA di TTV interagendo con il TLR9 attiva la cascata del segnale che porta alla traslocazione nel nucleo del fattore di trascrizione Nf-Kb e la conseguente attivazione del gene iNOS. Ciò è anche dimostrato dal fatto che non si ha un aumento nel numero dei recettori TLR9 attivati, in quanto l'espressione genica è costante in tutti gli stimoli utilizzati nell'esperimento, ma l'attivazione del gene iNOS dipende proprio dall'interazione DNA-TTV/TLR9.

## **Sezione IV**

### ***Discussione***

Gli *anellovirus* sono un vasto ed eterogeneo gruppo di virus caratterizzati da alcune peculiarità: un'elevata diffusione nella popolazione generale, una prolungata e/o un' indefinita persistenza nell'ospite, un ampio tropismo tissutale ed una elevata eterogeneità genetica, straordinaria per virus a DNA. Dal 1997, anno in cui fu scoperto il primo isolato di TTV, prototipo degli *anellovirus*, sono stati condotti numerosi studi per investigare il ruolo patogenetico di questi virus e, sebbene siano state formulate diverse ipotesi, nessuna è stata definitivamente confermata, tanto che alcuni autori hanno ritenuto il virus un semplice commensale dell'uomo. Studi condotti nel laboratorio dove ho svolto la mia attività di ricerca (Maggi et al., 2003a) hanno evidenziato che in bambini con broncopolmonite circolano titoli di TTV più elevati rispetto a quelli presenti in bambini con patologie respiratorie più lievi. Inoltre, tra i bambini con broncopolmonite, coloro che presentavano coinfezioni con altri virus respiratori, mostravano un titolo di TTV più alto rispetto a quelli infettati dal solo TTV. Questi studi, pur non dimostrando con certezza che TTV sia l'agente causale della patologia osservata, hanno suggerito un suo probabile ruolo nell'aggravare la malattia respiratoria. Un altro aspetto interessante, sicuramente da studiare approfonditamente, riguarda le interazioni esistenti tra *anellovirus*, in particolare TTV, e il sistema immunitario dell'ospite. Al momento, sono poche le informazioni presenti in letteratura riguardo a questo aspetto. Tuttavia, appare ormai ben dimostrato che TTV non solo è in grado di penetrare nelle cellule del sistema immunitario ma è anche capace di replicare al loro interno. Infatti markers di replicazione del virus (DNA a doppio filamento, mRNA) sono stati ritrovati nel midollo osseo (Okamoto et al., 2000b) e in cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) attivate. Al contrario, TTV non replica in cellule linfoidi che si trovano in fase stazionaria (Maggi et al., 2001b). Quest'ultimo aspetto suggerisce che l'interazione fra TTV e il sistema immunitario possa rappresentare una tappa fondamentale nella patogenesi del virus. Studi condotti nel laboratorio dove ho svolto il mio progetto di ricerca, hanno dimostrato che nei bambini di età inferiore ai due anni affetti da infezioni respiratorie acute (MRA) il tratto respiratorio è sede di infezione primaria e continua replicazione di TTV. In questa stessa popolazione di soggetti è stato anche osservato un possibile ruolo di TTV nella modulazione del sistema immunitario a livello locale e sistemico (Maggi et al., 2003). Infatti è stato dimostrato che i titoli del virus correlano con i livelli di

alcune sottopopolazioni linfocitarie circolanti: in particolare è stata osservata una correlazione inversa con i livelli di linfociti T CD3 e CD4 ed una correlazione positiva con i livelli di linfociti B (Maggi et al., 2003b). Interessanti poi, a tale riguardo, sono le correlazioni emerse, in soggetti asmatici, tra un marker d'infiammazione, quale la proteina cationica eosinofilia (ECP), i livelli di NO nell'aria espirata e i titoli di TTV nel plasma (Maggi et al., 2004). Come dimostrato in molti lavori, l'elevata espressione di ECP, una glicoproteina rilasciata dagli eosinofili attivati, e di NO nelle vie aeree, è indice del grado di infiammazione nel tratto respiratorio, e predittiva di un più probabile sviluppo dell'asma nelle età successive (Pifferi et al., 2001). Questo studio di tesi ha proposto un nuovo modo con cui investigare la relazione tra TTV e sistema immunitario dell'ospite, in particolare cercando di valutare se e come il DNA del virus, in relazione al suo contenuto in motivi CpG possa indurre la produzione di mediatori immunologici nell'ospite (interleuchine e/o citochine). Il background di questo studio è basato su lavori presenti in letteratura che riportavano come alcuni virus a DNA hanno la potenzialità di stimolare le cellule del sistema immunitario alla produzione di IFN- $\gamma$  ed altre citochine pro-infiammatorie mediante i motivi CpG presenti nel loro genoma (Guggemoos et al., 2008, Lundberg et al., 2003, Malmgaard., 2004). Tale stimolazione avviene attivando particolari recettori che svolgono importanti funzioni in cellule implicate nella risposta immunitaria innata: come i macrofagi, le cellule dendritiche e i linfociti B. Questi recettori, noti col nome di Toll-like receptors (TLRs), hanno proprietà immunomodulanti. In particolare, in questo studio, l'attenzione è stata concentrata sull'effetto derivante dall'interazione del genoma virale con il TLR-9, recettore che presenta specificità di riconoscimento con genomi a DNA virale o batterico contenenti motivi CpG non metilati (Hemmi et al., 2000). Il lavoro di tesi è stato articolato in due parti principali. Nella prima parte del progetto è stato messo a punto un modello sperimentale "in vitro" che fosse capace, mediante l'analisi dell'espressione di determinate citochine, di valutare l'effetto del DNA di TTV sul sistema immunitario. In questo modello sperimentale il sistema target dell'effetto del DNA era costituito da cellule di milza di topo della linea BALB/c; tali cellule infatti sono ampiamente utilizzate in quanto particolarmente ricche di TLR9. Proprio per valutare l'effetto dell'interazione tra il DNA di TTV e le cellule di milza di topo, è stato necessario avere a disposizione genomi virali interi

appartenenti ai diversi genogruppi di TTV, data la straordinaria eterogeneità genetica del virus. Infatti, come riportato nell'Introduzione di questo progetto, studi di sequenza condotti sulla UTR e sull'intero genoma hanno portato all'identificazione di più di 40 genotipi e 70 sottotipi, suddivisi in 5 genogruppi principali (Peng et al., 2002). Per tale motivo appare plausibile che l'elevata eterogeneità genetica possa riflettersi in una differente capacità di interazione dei diversi isolati con il sistema immunitario dell'ospite. Abbiamo così utilizzato 5 cloni di genomi virali interi appartenenti a 4 diversi genogruppi, in particolare l'isolato ViPiSal (DNA-TTV4) appartenente al genogruppo 4 è stato isolato e interamente clonato dal mio gruppo di ricerca, mentre gli altri 4 isolati; TTH7 (genogruppo 5), TTH3 e PTTV (genogruppo 1) e H2 (genogruppo 3), sono stati forniti da gruppi di ricerca internazionali con cui da tempo sono state intraprese collaborazioni scientifiche. Il DNA di TTV utilizzato inizialmente in tutti gli esperimenti, e quindi considerato l'isolato di riferimento, è stato il DNA-TTV4. La scelta delle citochine da analizzare è stata basata sui dati presenti in letteratura che dimostrano come gli ODN o i motivi CpG di tipo stimolatorio, frequenti nel genoma di batteri e virus, siano in grado di indurre le cellule di milza di topo a produrre IL-12, IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$  (Krieg et al., 1998). Al contrario, gli stessi stimoli, non inducono la produzione di IL-4 (Klinman et al., 1996). Le tempistiche utilizzate per valutare l'espressione genica delle citochine nei diversi esperimenti sono state decise dopo un preliminare ed accurato studio sulla loro cinetica d'espressione. Infatti, in accordo con dati riportati in letteratura, le citochine hanno mostrato cinetiche di attivazione differenti in relazione allo stimolo utilizzato. In particolare, la stimolazione di cellule di milza di topo con LPS ha indotto il picco d'attivazione citochinico dopo 4 ore d'incubazione (Hartman et al., 1999). Al contrario, la stimolazione con ODN1826, che grazie alla presenza nella sua sequenza di motivi stimolatori mima il DNA batterico e virale, ha indotto la massima attivazione dopo 12 ore d'incubazione. Questi risultati ci hanno consentito di progettare la giusta tempistica dei nostri esperimenti, stabilendo il tempo d'incubazione a 12 ore. I successivi esperimenti sono stati progettati per comprendere se il DNA di TTV fosse in grado di indurre la produzione di citochine pro-infiammatorie e/o regolatorie e per indagare se la concentrazione di DNA virale potesse influenzare tale processo. A tale scopo le cellule di milza di topo, sono state incubate, oltre che con stimoli di controllo, anche con diverse

concentrazioni di DNA virale. I risultati hanno mostrato che l'ODN 1826, utilizzato come controllo positivo, ha indotto una significativa espressione di tutte le citochine di classe Th-1 e regolatorie, mentre, come atteso, la citochina di classe Th-2 è stata attivata solo dalla stimolazione con ConA. Il DNA-TTV4 usato come tale non ha invece prodotto una significativa espressione di nessuna delle citochine analizzate. Una possibile spiegazione di tale risultato poteva essere l'incapacità da parte del DNA virale di giungere integro nel compartimento intracellulare, infatti i legami fosfordiestere, presenti nel DNA, possono essere facilmente idrolizzati dalle nucleasi cellulari, mentre i legami fosforotioati, presenti nell'ODN 1826, conferiscono protezione verso tali enzimi. A conferma di ciò, l'utilizzo della lipofectina per transfettare il DNA-TTV4 all'interno delle cellule ha modificato i risultati del precedente esperimento (Xu et al., 1996). Infatti, i complessi lipofectina-DNA-TTV4 hanno indotto incrementi statisticamente significativi dell'espressione delle citochine analizzate, con particolare riferimento all'IL6 e IFN- $\gamma$ . Questi risultati sono in accordo con quanto osservato da Wilkström studiando il circovirus porcino di tipo 2 (PCV-2). In tale studio, un incremento significativo di IFN- $\alpha$  si osservava solo dopo che il DNA del PCV-2 era incubato con lipofectina, la quale probabilmente agiva proteggendo il DNA dalla degradazione e dirigendolo più facilmente verso il compartimento endosomiale dove avviene l'interazione con il recettore TLR9 (Wilkström et al., 2007). Il nostro studio ha poi mostrato come l'incremento d'espressione delle citochine sia risultato dipendente dalla quantità di DNA utilizzata, facendo ipotizzare nell'infezione naturale un ruolo fondamentale della carica virale. A conferma dei risultati ottenuti, che indicano come l'isolato virale preso in esame sia in grado di indurre il sistema immunitario verso una risposta di tipo Th1, sono state dosate nel sovranatante delle cellule le citochine prodotte, in particolare l'IFN- $\gamma$ , l'IL6 e l'IL4. Tale dosaggio come atteso ha mostrato un netto incremento della produzione di IFN- $\gamma$  e di IL6 dopo stimolazione con il DNA-TTV4 e/o con ODN, dimostrando come all'aumentata espressione genica corrisponda invariabilmente la produzione della proteina. Mentre il dosaggio dell'IL4 non ha mostrato alcuna differenza significativa tra la produzione della proteina indotta dal DNA-TTV4 e dal controllo negativo, rappresentato dalla sola lipofectina. Questi risultati avvalorano ancora di più l'ipotesi che l'isolato ViPiSal non sia in grado di indurre la sintesi dei mediatori di classe Th-2. Un altro interessante aspetto che è stato

indagato ha riguardato il meccanismo attraverso il quale il DNA-TTV4, determina un aumento di espressione delle citochine di classe Th-1. In particolare è stato studiato il coinvolgimento del recettore TLR9 nella cascata di attivazione d'espressione genica in due diversi modi. In un primo momento è stata utilizzata la cloroquina, molecola in grado di inibire l'acidificazione endosomiale, prerequisito necessario affinché il TLR9 riconosca i motivi CpG non metilati (Latz et al., 2007), e successivamente un metodo più specifico che utilizza la strategia degli RNA-interference (siRNA) in grado di reprimere selettivamente l'espressione post-trascrizionale degli mRNA. I risultati degli esperimenti effettuati hanno mostrato come le cellule di milza di topo, stimulate con il DNA-TTV4 o con ODN, in seguito a pre-trattamento con cloroquina riducono quasi totalmente l'espressione genica di IFN- $\gamma$  e che tali livelli di espressione sono ridotti di più dell'80% dopo il trattamento con gli specifici siRNA. Al contrario l'uso sia della cloroquina sia degli siRNA specifici per il TLR9 non ha mostrato alcun significativo effetto sull'espressione delle citochine prodotte dalla ConA. Ciò dimostra chiaramente come sia la cloroquina sia gli siRNA utilizzati, agiscono inibendo la via di trasduzione del TLR9, e quindi come la produzione di citochine da parte del DNA-TTV4 sia mediata proprio da questo recettore. Altro risultato interessante è emerso transfettando le cellule di milza di topo con il DNA-TTV4 insieme all'ODN 1826. In questo caso l'aggiunta del DNA virale, anche senza la lipofectina, è stata in grado di incrementare significativamente l'espressione delle citochine di classe Th-1 e regolatorie indotte dall'ODN 1826. Questa apparente contraddizione, ossia l'effetto del DNA di TTV anche in assenza di lipofectina, può essere spiegata supponendo che, anche se la quantità di DNA virale integro che raggiunge il compartimento intracellulare è ridotta a causa dell'azione delle nucleasi cellulari, è in questo caso tuttavia sufficiente a potenziare l'espressione genica poiché agisce amplificando un segnale già innescato da un potente attivatore d'espressione come l'ODN 1826. Dai risultati ottenuti è stato quindi possibile dimostrare come il DNA di TTV dell'isolato ViPiSal sia in grado di indurre il sistema immunitario verso la produzione di citochine di classe Th1. Altro aspetto interessante che è stato studiato ed indagato è quello relativo all'effetto indotto dal DNA di TTV appartenente a diversi genogruppi. Per questo è stato allestito un esperimento in cui sono state dosate le citochine prodotte nel sovrnatante delle cellule, 16 ore dopo la stimolazione con il DNA di TTV dei

diversi isolati per vedere l'effetto della risposta immunitaria locale e sistemica. E' stata dosata solo la produzione di IFN- $\gamma$  in quanto è stata la citochina che nei precedenti esperimenti aveva mostrato livelli di espressione più elevati e perché è la più rappresentativa delle citochine di classe Th1. I risultati di tale esperimento hanno evidenziato una differenza significativa tra l'isolato ViPiSal, utilizzato come isolato di riferimento in tutti i precedenti esperimenti, e gli altri quattro isolati presi in esame appartenenti ai diversi genogruppi di TTV. La lettura dei risultati ha quindi evidenziato come l'isolato ViPiSal appartenente al genogruppo 4, abbia una differente capacità di interazione con il sistema immunitario dell'ospite rispetto a tutti gli altri isolati presi in esame. In quest'ottica, tali risultati assumono una notevole importanza in quanto, come accade per i circo virus animali, anche TTV potrebbe essere considerato un cofattore importante nella patogenesi di numerose patologie in cui si verifica una abnorme risposta immunitaria di tipo Th-1. Quest'ipotesi può assumere ancor di più particolare rilievo sapendo che il DNA virale preso in esame (DNA-TTV4) è stato isolato e amplificato da un soggetto affetto da artrite reumatoide, patologia autoimmune nella quale si assiste proprio ad una anomala risposta immunitaria di tipo Th-1. Ciò anche in considerazione del fatto che questo gruppo di TTV è risultato particolarmente prevalente nei pazienti affetti da questa malattia (Maggi et al., 2007).

La seconda parte di questo progetto di ricerca ha avuto come obiettivo lo studio dell'effetto del genoma di TTV su una linea cellulare umana di origine respiratoria, A549. La scelta di utilizzare tale linea cellulare deriva da precedenti studi, condotti da Maggi e collaboratori, su bambini affetti da malattie respiratorie acute, che hanno dimostrato come il tratto respiratorio sia sede di infezione primaria e continua replicazione di TTV (Maggi et al., 2003) e come i titoli del virus, rilevati a livello del tratto respiratorio, correlano con un aumentato livello di ossido nitrico nell'aria espirata. Inoltre le A549, come riportato in molti lavori presenti in letteratura (Droemann et al., 2005; Jiang et al., 2009) sono una linea cellulare di tipo alveolare che stimolate con i CpG-ODN sono in grado di produrre citochine e ossido nitrico attraverso l'attivazione del recettore TLR9, perciò rappresentano il substrato ottimale per i nostri esperimenti. E' stata, dapprima, valutata la produzione di NO, l'espressione e la funzionalità del recettore TLR9 e l'attivazione dell'enzima inducibile iNOS,

mediante Real-Time PCR. E' stato prima allestito uno studio preliminare per individuare quale fosse il tempo ottimale di incubazione fra il substrato cellulare e gli stimoli utilizzati. In questo studio pilota è stato utilizzato come stimolo l'ODN 2216 di classe A, in quanto come riportato in molti lavori, i CpG-ODN di classe A sono abili ad attivare l'enzima ossido nitrico inducibile deputato alla produzione di NO (Kneuferrmann et al., 2008). Questo evento è mediato dall'attivazione del fattore di trascrizione Nf-Kb, il quale è anche coinvolto nell'espressione dei geni specifici per le citochine pro-infiammatorie. Il dosaggio per la valutazione della produzione di NO è stato effettuato a tempistiche differenti, in particolare a 24, 40 e 48 ore, ed è stato osservato che la stimolazione con ODN 2216 era in grado di indurre la massima produzione di NO dopo 40 ore dalla stimolazione. Sulla base di questi risultati e dal momento che l'ODN 2216 contiene nella sua sequenza motivi CpG di tipo stimolatorio che mimano l'effetto del DNA virale è stato progettato l'esperimento, incubando le cellule A549 con il DNA di TTV per un tempo di 40 ore. Per tutti i successivi esperimenti è stato utilizzato come stimolo il DNA di TTV dell'isolato TTH7 appartenente al genogruppo 5, in quanto tale isolato è di facile accumulo in seguito alla digestioni enzimatiche necessarie per ricavare il DNA da utilizzare negli esperimenti. Come controllo positivo è stato utilizzato l'ODN 2216 ed è stato utilizzato anche un DNA di controllo rappresentato dal DNA di sperma di salmone, che contiene all'interno della sua sequenza motivi CpG metilati e quindi non in grado di attivare il TLR9. I risultati hanno evidenziato una attivazione pressoché identica del recettore TLR9 da parte di tutti gli stimoli utilizzati nell'esperimento, mentre l'enzima inducibile iNOS, è stato fortemente attivato dal DNA di TTV dell'isolato utilizzato e dall'ODN 2216, usato come controllo positivo. Nel complesso i risultati ottenuti rafforzano quanto già dimostrato nel modello murino, ovvero che il DNA di TTV è in grado di attivare il recettore TLR9, di indurre la traslocazione nel nucleo del fattore di trascrizione Nf-Kb, il quale a sua volta è coinvolto sia nell'espressione dei geni specifici per le citochine pro-infiammatorie quali IFN- $\gamma$ , IL-6 che nell'attivazione dell'enzima inducibile iNOS deputato alla produzione di NO. Questi dati aprono la strada ad ulteriori più approfondite indagini per valutare la capacità dei vari isolati di TTV a produrre differentemente NO e/o citochine coinvolte nel processo infiammatorio.

In conclusione, i risultati di questo lavoro di tesi hanno evidenziato alcuni aspetti nuovi ed interessanti del rapporto tra gli anellovirus e il sistema immunitario dell'ospite. La messa a punto di sistemi sperimentali *"in vitro"*, costituiti da substrati cellulari ricchi di TLR9, ha permesso di dimostrare come il DNA di TTV sia in grado di indurre la produzione di citochine di classe Th-1 e di portare all'attivazione dell'enzima iNOS deputato alla produzione di NO. Ciò fa sicuramente riflettere sul vero ruolo che gli *anellovirus* possono avere nelle patologie dell'uomo e dubitare assai seriamente sul fatto che questi virus possano rappresentare soltanto degli innocui apatogeni commensali.

## ***Ringraziamenti***

Giunta alla fine di questo lavoro penso sia più che giusto spendere due parole anche verso coloro che mi hanno aiutato e sostenuto in questo percorso lungo 3 anni.

In primo luogo desidero ringraziare il Dottor Fabrizio Maggi, mio tutor nel presente lavoro di ricerca, già mio relatore di tesi di laurea, perché si è mostrato sempre presente e disponibile con i suoi suggerimenti e acuti consigli rivelatesi sempre veritieri.

Un grazie anche al Professor Ceccherini-Nelli che ha permesso lo svolgimento di questo progetto di ricerca all'interno del Dipartimento di cui è Direttore, oltre ad essere lui stesso Presidente del corso di Dottorato da me svolto.

Un grazie particolare va a mio padre per avermi dato fiducia e la possibilità di fare tutto questo, a mio fratello Simone che, nonostante i suoi silenzi, è sempre presente e lo sarà per sempre.

Grazie a mia madre per aver contribuito fortemente a costruire quella parte del mio carattere che mi ha permesso di raggiungere, nonostante le difficoltà, traguardi importanti della mia vita. Se fosse ancora tra noi sarebbe fiera di me.

Grazie ad Alessandro, che con il suo amore, ha saputo comprendere il sacrificio del nostro tempo per lo studio e i tanti impegni.

Vorrei inoltre ringraziare tutti i miei colleghi di Dottorato e del laboratorio di Virologia per la pazienza con la quale mi hanno sopportato ogni giorno; in particolare Melania, compagna di questo percorso, Letizia, Elisabetta e Jara.

Grazie a tutti

*Valentina*

## **Sezione V**

### ***Riferimenti Bibliografici***

**Akahane, Y., Sakamoto, M., Miyazaki, Y., Okada, S., Inoue, T., Ukita, M., Okamoto, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (1999). Effect of interferon on a nonenveloped DNA virus (TT virus) associated with acute and chronic hepatitis of unknown etiology. *J Med Virol* **58**, 196-200.

**Akira, S. & Takeda, K.**(2004) Toll-like receptor signalling. *Nature Rev. Immunol.* **4**, 499–511.

**Ali, S., Fevery, J., Peerlinck, K., Verslype, C., Schelstraete, R., Gyselinck, F., Emonds, M. P., Vermynen, J. and Yap, S. H.** (2002). TTV infection and its relation to serum transaminases in apparently healthy blood donors and in patients with clotting disorders who have been investigated previously for hepatitis C virus and GBV-C/HGV infection in Belgium. *J Med Virol* **66**, 561-6.

**Asabe, S., Nishizawa, T., Iwanari, H. and Okamoto, H.** (2001). Phosphorylation of serine-rich protein encoded by open reading frame 3 of the TT virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* **286**, 298-304.

**Bafica, A., Santiago, H.C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., Sher, A., Cuttingedge** (2006) TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection, *J. Immunol.* **177** 3515–9.

**Bafica, A., Scanga, C.A., Feng, C.G., Leifer, C., Cheever, A., Sher, A.,**(2005) TLR9 regulates Th1 responses and cooperates with TLR2 in mediating optimal resistance to *Mycobacterium tuberculosis*, *J. Exp. Med.* **202** 1715–24

**Ball, J. K., Curran, R., Berridge, S., Grabowska, A. M., Jameson, C. L., Thomson, B. J., Irving, W. L. and Sharp, P. M.** (1999). TT virus sequence heterogeneity in vivo: evidence for co-infection with multiple genetic types. *J Gen Virol* **80**, 1759-68.

**Bando, M., Ohno, S., Oshikawa, K., Takahashi, M., Okamoto, H. and Sugiyama, Y.** (2001). Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med* **95**, 935-42.

**Banjar, H.,** (2007). Clinical profile of Saudi children with bronchiectasis. *Indian J Pediatr* **74** (2),149-52.

**Bandinelli, M., Pistello, M., Maggi, F., Fornai, C., Freer, G. and Vatteroni, M. L.** (2001). Molecular properties, biology, and clinical implications of TT virus, a recently identified widespread infectious agent of humans. *Clin Microbiol Rev* **14**, 98-113.

**Berg, T., Schreier, E., Heuft, H. G., Hohne, M., Bechstein, W. O., Leder, K., Hopf, U., Neuhaus, P. and Wiedenmann, B.** (1999). Occurrence of a novel DNA virus (TTV) infection in patients with liver diseases and its frequency in blood donors. *J Med Virol* **59**, 117-21.

**Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Cantaloube, J. F., de Micco, P. and de Lamballerie, X.** (1999). Determination and phylogenetic analysis of partial sequences from TT virus isolates. *J Gen Virol* **80 ( Pt 2)**, 419-24.

**Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Cantaloube, J. F., Touinssi, M., de Micco, P. and de Lamballerie, X.** (2001a). Comparison of systems performance for TT virus detection using PCR primer sets located in non-coding and coding regions of the viral genome. *J Clin Virol* **22**, 91-9.

**Biagini, P., Gallian, P., Attoui, H., Touinssi, M., Cantaloube, J., de Micco, P. and de Lamballerie, X.** (2001b). Genetic analysis of full-length genomes and subgenomic sequences of TT virus-like mini virus human isolates. *J Gen Virol* **82**, 379-83.

**Biagini, P., Gallian, P., Touinssi, M., Cantaloube, J. F., Zapitelli, J. P., de Lamballerie, X. and de Micco, P.** (2000). High prevalence of TT virus infection in French blood donors revealed by the use of three PCR systems. *Transfusion* **40**, 590-5.

**Biagini, P.**(2009). Classification of TTV and related viruses. (Anellovireuses). *Curr.Top. Microbiol. Immunol.* **341**, 21-33.

**Boysen, T., Christensen, J. K., Madsen, C. D., Eugen-Olsen, J., Christensen, L. S., Moller-Sorensen, H., Weber, A., Ladefoged, S. D. and Krogsgaard, K.** (2003). Presence and significance of TT virus in Danish patients on maintenance hemodialysis. *Scand J Urol Nephrol* **37**, 259-64.

**Brummel, R., Lenert, P.,**(2005) Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides, *J. Immunol.* **174** 2429–34.

**Cacoub, P., Rosenthal, E., Gerolami, V., Hausfater, P., Ghillani, P., Sterkers, Y., Thibault, V., Khiri, H., Piette, J. C. and Halfon, P.** (2003). Transfusion-associated TT virus co-infection in patients with hepatitis C virus is associated with type II mixed cryoglobulinemia but not with B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Clin Microbiol Infect* **9**, 39-44.

**Callahan, C. W., Gregory, J. R.,** (2002). Bronchiectasis in children: orphan disease or persistent problem? *Pediatr Pulmonol* **33**, 492-96.

**Chan, P. K., Chik, K. W., Li, C. K., Tang, N. L., Ming, M. S., Cheung, J. L., Ng, K. C., Yuen, P. M. and Cheng, A. F.** (2001). Prevalence and genotype distribution of TT virus in various specimen types from thalassaemic patients. *J Viral Hepat* **8**, 304-9.

**Chayama, K., Kobayashi, M., Tsubota, A., Arase, Y., Suzuki, Y., Saitoh, S., Murashima, N., Ikeda, K., Okamoto, K., Hashimoto, M., Matsuda, M., Koike, H., Kobayashi, M. and Kumada, H.** (1999). Susceptibility of TT virus to interferon therapy. *J Gen Virol* **80 ( Pt 3)**, 631-4.

**Chen, B. P., Rumi, M. G., Colombo, M., Lin, Y. H., Ramaswamy, L., Luna, J., Liu, J. K., Prati, D. and Mannucci, P. M.** (1999). TT virus is present in a high frequency of Italian hemophilic patients transfused with plasma-derived clotting factor concentrates. *Blood* **94**, 4333-6.

**Christensen, J. K., Eugen-Olsen, J., M, S. L., Ullum, H., Gjedde, S. B., Pedersen, B. K., Nielsen, J. O. and Krogsgaard, K.** (2000). Prevalence and prognostic significance of infection with TT virus in patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **181**, 1796-9.

**Cleavinger, P. J., Persing, D. H., Li, H., Moore, S. B., Charlton, M. R., Sievers, C., Therneau, T. M. and Zein, N. N.** (2000). Prevalence of TT virus infection in blood donors with elevated ALT in the absence of known hepatitis markers. *Am J Gastroenterol* **95**, 772-6.

**Colombatto, P., Brunetto, M. R., Kansopon, J., Oliveri, F., Maina, A., Aragon, U., Bortoli, M. L., Scatena, F., Baicchi, U., Houghton, M., Bonino, F. and Weiner, A. J.** (1999). High prevalence of G1 and G2 TT-virus infection in subjects with high and low blood exposure risk: identification of G4 isolates in Italy. *J Hepatol* **31**, 990-6.

**Comar, M., Ansaldi, F., Morandi, L., Dal Molin, G., Foschini, P. M., Croce, S. L., Bonin, S., Stanta, G., Tiribelli, C. and Campello, C.** (2002). In situ polymerase chain reaction detection of transfusion-transmitted virus in liver biopsy. *J Viral Hepat* **9**, 123-7.

**Dai, C. Y., Yu, M. L., Chuang, W. L., Hou, N. J., Hou, C., Chen, S. C., Lin, Z. Y., Hsieh, M. Y., Wang, L. Y. and Chang, W. Y.** (2002). The response of hepatitis C virus and TT virus to high dose and long duration interferon-alpha therapy in naive chronic hepatitis C patients. *Antiviral Res* **53**, 9-18.

**Davidson, F., MacDonald, D., Mokili, J. L., Prescott, L. E., Graham, S. and Simmonds, P.** (1999). Early acquisition of TT virus (TTV) in an area endemic for TTV infection. *J Infect Dis* **179**, 1070-6.

**Deng, X., Terunuma, H., Handema, R., Sakamoto, M., Kitamura, T., Ito, M. and Akahane, Y.** (2000). Higher prevalence and viral load of TT virus in saliva than in the corresponding serum: another possible transmission route and replication site of TT virus. *J Med Virol* **62**, 531-7.

**Desai, M., Pal, R., Deshmukh, R. and Banker, D.** (2005). Replication of TT virus in hepatocyte and leucocyte cell lines. *J Med Virol* **77**, 136-143.

**Devalle, S. and Niel, C.** (2004). Distribution of TT virus genomic groups 1-5 in brazilian blood donors, HBV carriers, and HIV-1 infected patients. *J Med Virol* **72**, 133-73.

**Duramad, O., Fearon, K.L., Chan, J.H., Kanzler, H., Marshall, J.D., Coffman, R.L., Barrat, F.J.,**(2003) IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG containing immunostimulatory sequences, *Blood* **102** 4487–92.

**Edwards, E. A., Asher, M. I., Byrnes, C. A.,** (2003). Pediatric bronchiectasis in the twenty-first century: experience of a tertiary children's hospital in New Zealand. *J Pediatr Child Health* **39**, 111-17.

**Erker, J. C., Leary, T. P., Desai, S. M., Chalmers, M. L. and Mushahwar, I. K.** (1999). Analyses of TT virus full-length genomic sequences. *J Gen Virol* **80 ( Pt 7)**, 1743-50.

**Fall, A. and Spencer, D.** (2006). Paediatric bronchiectasis in Europe: what now and where next? *Paediatr Respir Rev* **7**(4), 268-74.

**Fields, N.** (1996). Virology, p 2950. In Fields N., Kinpe D. M., Howley P. M., Chanok M. R., Melnick J. L., Monath T. P., Roizman B., Straus S. E., Fields Virology 3rd d.-1996. *Lippincot –Raven, Philadelphia.*

**Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'Garra, A.,**(1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages, *J. Immunol.* **147** 3815–22

**Fornai, C., Maggi, F., Vatteroni, M. L., Pistello, M. and Bendinelli, M.** (2001). High prevalence of TT virus (TTV) and TTV-like minivirus in cervical swabs. *J Clin Microbiol* **39**, 2022-4

**Forns, X., Hegerich, P., Darnell, A., Emerson, S. U., Purcell, R. H. and Bukh, J.** (1999). High prevalence of TT virus (TTV) infection in patients on maintenance hemodialysis: frequent mixed infections with different genotypes and lack of evidence of associated liver disease. *J Med Virol* **59**, 313-7.

**Fujiwara, T., Iwata, A., Iizuka, H., Tanaka, T. and Okamoto, H.** (1998). Transfusion transmitted virus. *Lancet* **352**, 1310-1.

**Gad, A., Tanaka, E., Orii, K., Kafumi, T., Serwah, A. E., El-Sherif, A., Nooman, Z. and Kiyosawa, K.** (2000). Clinical significance of TT virus infection in patients with chronic liver disease and volunteer blood donors in Egypt. *J Med Virol* **60**, 177-81.

**Gallian, P., Berland, Y., Olmer, M., Raccach, D., de Micco, P., Biagini, P., Simon, S., Bouchouareb, D., Mourey, C., Roubicek, C., Touinssi, M., Cantaloube, J. F., Dussol, B. and de Lamballerie, X.** (1999). TT virus infection in French hemodialysis patients: study of prevalence and risk factors. *J Clin Microbiol* **37**, 2538-42.

**Gallian, P., Biagini, P., Zhong, S., Touinssi, M., Yeo, W., Cantaloube, J. F., Attoui, H., de Micco, P., Johnson, P. J. and de Gallian, P., Biagini, P., Attoui, H., Cantaloube, J. F., Dussol, B., Berland, Y., de Micco, P. and de Lamballerie, X.** (2002). High genetic diversity revealed by the study of TLMV infection in French hemodialysis patients. *J Med Virol* **67**, 630-5.

**Gern, J. E.** (2000). Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **105**, 497-502.

**Gern, J. E.** (2004). Viral respiratory infection and the link to asthma. *Pediatr Infect Dis J* **23**, S78-86.

**Gern, J. E. and Busse, W. W.** (2004). Relationship of viral infections to wheezing illnesses and asthma. *Nat Rev Immunol* **2**, 132-8.

**Gerner, P., Oettinger, R., Gerner, W., Falbrede, J. and Wirth, S.** (2000). Mother-to-infant transmission of TT virus: prevalence, extent and mechanism of vertical transmission. *Pediatr Infect Dis J* **19**, 1074-7.

**Gibbs, M. J. and Weiller, G. F.** (1999). Evidence that a plant virus switched hosts to infect a vertebrate and then recombined with a vertebrate-infecting virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8022-7.

**Gilliet, M., Cao, W., Liu, Y.J.** (2008) Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases *Immun* **8**, 594-606

**Gimenez-Barcons, M., Forn, X., Ampurdanes, S., Guilera, M., Soler, M., Soguero, C., Sanchez-Fueyo, A., Mas, A., Bruix, J., Sanchez-Tapias, J. M., Rodes, J. and Saiz, J. C.** (1999). Infection with a novel human DNA virus (TTV) has no pathogenic significance in patients with liver diseases. *J Hepatol* **30**, 1028-34.

**Griffiths, P.** (1999). Time to consider the concept of a commensal virus? *Rev Med Virol* **9**, 73-4.

**Guggemoos, ., Hangel, D., Hamm, S., Heit, S., Bauer, S., Adler, H.**(2008). TLR9 contributes to antiviral immunity during gammaherpesvirus infection. *J. Immuol.* **180**, 438-443.

**Gustaffson, L., Leone, A. and Persson , M.** (1991). Endogenous nitric oxide is not influenced by spirometry, inspiratory effort and nose clip in asthmatic with or without rhinitis. *Biochem Biophys Res Commun.* **181**, 852-57.

**Hallett, R. L., Clewley, J. P., Bobet, F., McKiernan, P. J. and Teo, C. G.** (2000). Characterization of a highly divergent TT virus genome. *J Gen Virol* **81**, 2273-9.

**Handa, A., Dickstein, B., Young, N. S. and Brown, K. E.** (2000). Prevalence of the newly described human circovirus, TTV, in United States blood donors. *Transfusion* **40**, 245-51.

**He, C., Nomura, F., Yukimasa, N., Itoga, S., Yamada-Osaki, M., Sumazaki, R. and Nakai, T.** (1999). Transfusion-transmitted virus infection in China: prevalence in blood donors and in patients with liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol* **14**, 899-903.

**Hemmi, H., O. Takeuchi, T. Kawai, T. Kaisho, S. Sato, H. Sanjo, M. Matsumoto, K. Hoshino, H. Wagner, K. Takeda and S. Akira.** (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**, 740-45

**Hijikata, M., Takahashi, K. and Mishiro, S.** (1999). Complete circular DNA genome of a TT virus variant (isolate name SANBAN) and 44 partial ORF2 sequences implicating a great degree of diversity beyond genotypes. *Virology* **260**, 17-22.

**Hino, S.** (2002). TTV, a new human virus with single stranded circular DNA g  
**Hino, S. and Miyata, H.,** (2007). Torquetenovirus (TTV): current status. *Rev Med Virol* **17**, 45-57.

**Hirata, D., Kaneko, N., Iwamoto, M., Yoshio, T., Okazaki, H., Mimori, A., Masuyama, J. and Minota, S.** (1998). Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) associated with non-A to G hepatitis in patients with rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* **37**, 1361-2.

**Hogg, J. C.** (1993). Pathology of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **92**, 1-5.

**Hokey, D.A., Larregina, A.T., Erdos, G., Watkins, S.C., Falo Jr., L.D.,** (2005) Tumor cell loaded type-1 polarized dendritic cells induce Th1-mediated tumor immunity, *Cancer Res.* **65** 10059-67.

**Holgate, S. T.** (1993). Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Thorax* **48**, 103-9.

**Holgate, S. T.** (2004). The epidemic of asthma and allergy. *J R Soc Med* **97**, 103-10.

**Hsieh, S. Y., Wu, Y. H., Ho, Y. P., Tsao, K. C., Yeh, C. T. and Liaw, Y. F.** (1999). High prevalence of TT virus infection in healthy children and adults and in patients with liver disease in Taiwan. *J Clin Microbiol* **37**, 1829-31.

**Ikeda, H., Takasu, M., Inoue, K., Okamoto, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (1999). Infection with an unenveloped DNA virus (TTV) in patients with acute or chronic liver disease of unknown etiology and in those positive for hepatitis C virus RNA. *J Hepatol* **30**, 205-12.

**Inami, T., Konomi, N., Arakawa, Y. and Abe, K.** (2000). High prevalence of TT virus DNA in human saliva and semen. *J Clin Microbiol* **38**, 2407-8.

**Irving, W. L., Ball, J. K., Berridge, S., Curran, R., Grabowska, A. M., Jameson, C. L., Neal, K. R., Ryder, S. D. and Thomson, B. J.** (1999). TT virus infection in patients with hepatitis C: frequency, persistence, and sequence heterogeneity. *J Infect Dis* **180**, 27-34.

**Itoh, K., Hirakawa, K., Okamoto, H., Ukita, M., Tanaka, H., Sawada, N., Tsuda, F., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (1999a). Infection by an unenveloped DNA virus associated with non-A to -G hepatitis in Japanese blood donors with or without elevated ALT levels. *Transfusion* **39**, 522-6.

**Itoh, K., Takahashi, M., Ukita, M., Nishizawa, T. and Okamoto, H.** (1999b). Influence of primers on the detection of TT virus DNA by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* **180**, 1750-1.

**Itoh, Y., Takahashi, M., Fukuda, M., Shibayama, T., Ishikawa, T., Tsuda, F., Tanaka, T., Nishizawa, T. and Okamoto, H.** (2000). Visualization of TT virus particles recovered from the sera and feces of infected humans. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 718-24.

**Iwata, N., Fujino, M., Tuchiya, K., Iwata, A., Otaki, Y. and Ueda, S.** (1998). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant chicken anemia virus proteins expressed in a baculovirus vector system. *J Vet Med Sci* **60**, 175-80.

**Jarnicki, A.G., Conroy, H., Brereton, C., Donnelly, G., Toomey, D., Walsh, K., Sweeney, C., Leavy O., Fletcher, J., Lavelle, E.C., Dunne, P., Mills, K.H.,** (2008) Attenuating regulatory T cell induction by TLR agonists through inhibition of p38 MAPK signaling in dendritic cells enhances their efficacy as vaccine adjuvants and cancer immunotherapeutics, *J. Immunol.* **180** 3797–806.

**Jelcic, I., Hotz-Wagenblatt, A., Hunziker, A., Zur Hausen, H. and de Villiers, E. M.** (2004). Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hypervariable region. *J Virol* **78**, 7498-507.

**Jiang, R. L., Lu, Q., Luo, K. X. and Tan, F. M.** (1999). A prospective study of transfusion-transmitted virus transmission by blood transfusion. *J Viral Hepat* **6**, 49-51.

**Jones, M., Kapoor, A., Lukashov, V., Simmonds, P., Hecht, T. and Delwar, E.** (2005) New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. *J Virol* **79**, 8230-6.

**Kaisho, T. & Akira, S.**(2006) Toll-like receptor function and signaling. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 979–87.

**Kakkola, L., Hedman, K., Vanrobaeys, H., Hedman, L. and Soderlund-Venermo, M.** (2002). Cloning and sequencing of TT virus genotype 6 and expression of antigenic open reading frame 2 proteins. *J Gen Virol* **83**, 979-90.

**Kamada K., Kamahora T., Kabat, P. and Hino, S.** (2004). Transcriptional regulation of TT virus: promoter and enhancer regions in the 1.2-kb noncoding region. *Virology* **10**, 341-8.

**Kamahora, T., Hino, S. and Miyata, H.** (2000). Three spliced mRNAs of TT virus transcribed from a plasmid containing the entire genome in COS1 cells. *J Virol* **74**, 9980-6.

**Kanda, T., Yokosuka, O., Ikeuchi, T., Seta, T., Kawai, S., Imazeki, F. and Saisho, H.** (1999a). The role of TT virus infection in acute viral hepatitis. *Hepatology* **29**, 1905-8.

**Kanda, Y., Chiba, S., Tanaka, Y., Kami, M., Saito, T., Asai, T., Izutsu, K., Yuji, K., Ogawa, S., Honda, H., Mitani, K., Chiba, S., Yazaki, Y. and Hirai, H.** (1999b). TT virus in frequently transfused patients. *Am J Med* **106**, 116-7.

**Kao, J. H., Chen, W., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S.** (2000). TT virus infection in patients with chronic hepatitis B or C: influence on clinical, histological and virological features. *J Med Virol* **60**, 387-92.

**Kao, J. H., Chen, W., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S.** (2002). Prevalence and implication of a newly identified infectious agent (SEN virus) in Taiwan. *J Infect Dis* **185**, 389-92.

**Kao, J. H., Chen, W., Hsiang, S. C., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S.** (1999). Prevalence and implication of TT virus infection: minimal role in patients with non-A-E hepatitis in Taiwan. *J Med Virol* **59**, 307-12.

**Karakoc, G. B., Yilmaz, M., Altintas, D. U., Kendirli, S. G.,** (2001). Bronchiectasis: still a problem. *Pediatr Pulmonol* **32**, 175-78.

**Kato, T., Mizokami, M., Mukaide, M., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Tanaka, Y., Kato, H., Sugauchi, F., Ueda, R., Hirashima, N., Shimamatsu, K., Kage, M. and Kojiro, M. R.** (2000). Development of a TT virus DNA quantification system using real-time detection PCR. *J Clin Microbiol* **38**, 94-8.

**Katsara, M., Donnelly, D., Iqbal, S., Elliot, T. and Everard, M.** (2006). Relationship between exhaled nitric oxide levels and compliance with inhaled corticosteroids in asthmatic children. *J. Respir Med* **24**, 1396-401.

**Kawanaka, M., Niiyama, G., Mahmood, S., Ifukube, S., Yoshida, N., Onishi, H., Hanano, S., Ito, T. and Yamada, G.** (2002). Effect of TT virus co-infection on interferon response in chronic hepatitis C patients. *Liver* **22**, 351-5.

**Kazi, A., Miyata, H., Kurokawa, K., Khan, M. A., Kamahora, T., Katamine, S. and Hino, S.** (2000). High frequency of postnatal transmission of TT virus in infancy. *Arch Virol* **145**, 535-40.

**Kharatinov, S. A., Yates, D. and Barnes, P. J.** (1995). Increased nitric oxide in exhaled air of normal subjects with upper respiratory tract infections. *Eur Respir J* **8**, 295-7.

**Kharitinov, S. A., Rajakulasingam, K., O'Connor, B., Durham, S. R. and Barnes, P. J.** (1997b). Nasal nitric oxide is increased in patients with asthma and allergic rhinitis and may be modulated by nasal glucocorticoids. *J Allergy Clin Immunol* **99**, 58-64.

**Kikuchi, K., Miyakawa, H., Abe, K., Kako, M., Katayama, K., Fukushi, S. and Mishiro, S.** (2000). Indirect evidence of TTV replication in bone marrow cells, but not in hepatocytes, of a subacute hepatitis/aplastic anemia patient. *J Med Virol* **61**, 165-70.

**Kissoon, N., Duckworth, L., Blake, K., Murphy, S., Taylor, C. L., and Sikoff, P. E.** (2000). FEno: relationship to exhalation rates and on line versus bag collection in healthy adolescents. *Am J Respir Crit Care Med* **162**, 539-45.

**Klinman, D.M., A.-K. Yi, S.L. Beaucage, J. Conover and A.M Krieg.** (1996). CpG motifs present in bacterial DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **7**, 2879-83.

**Koller, D. Y., Wojnarowski, C., Herkner, K. R., Weinlander, G., Raderer, M., Eichler, I. and Frischer, T.** (1997). High levels of eosinophil cationic protein in wheezing infants predict the development of asthma. *J Allergy Clin Immunol* **99**, 752-6.

**Kooistra, K., Zhang, Y. H., Henriquez, N. V., Weiss, B., Mumberg, D. and Noteborn, M. H.** (2004). TT virus-derived apoptosis-inducing protein induces apoptosis preferentially in hepatocellular carcinoma-derived cells. *J Gen Virol* **85**, 1445-50.

**Krekulova, L., Rehak, V., Killoran, P., Madrigal, N. and Riley, L. W.** (2001). Genotypic distribution of TT virus (TTV) in a Czech population: evidence for sexual transmission of the virus. *J Clin Virol* **23**, 31-41.

**Lakowics, J. R.** (1983). Chapter 10. Energy transfer. In: Principles of fluorescent spectroscopy. *Plenum Press*, N. Y., 303-39.

**Lamballerie, X.** (2000). TT virus: a study of molecular epidemiology and transmission of genotypes 1, 2 and 3. *J Clin Virol* **17**, 43-9.

**Lundberg, P., Welander, X., Han, X., Cantin, E.** (2003). Herpes simplex virus type I DNA is immunostimulatory in vitro and in vivo. *J. Virol.* **77**, 11158-11169.

**Latz, E. et al.** (2007) Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nature Immunol.* **8**, 772-9.

**Leary, T. P., Erker, J. C., Chalmers, M. L., Desai, S. M. and Mushahwar, I. K.** (1999). Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *J Gen Virol* **80 ( Pt 8)**, 2115-20.

**Lefrère, J. J., Roudot-Thoraval, F., Lefrere, F., Kahfer, A., Mariotti, M., Lerable, J., Thauvin, M., Lefevre, G., Rouger, P. and Girot, R.** (1999). Natural history of the TT virus infection through follow-up of TTV DNA-positive multiple-transfused patients. *Blood* **95**, 347-51.

**Lemanske, R. F.** (2003). Viruses and asthma: inception, exacerbation, and possible prevention. *J Pediatr* **142**, S3-7.

**Lemanske, R. F.** (2004). Viral infections and asthma inception. *J Allergy Clin Immunol* **114**, 1023-6.

**Lenert, P., Brummel, R., Field, E.H., Ashman, R.F.,**(2005) TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production, *J. Clin. Immunol.* **25** 29–40

**Liew, F.Y., Xu, D., Brint, E.K., O'Neill, L.A.,** (2005) Negative regulation of toll-like receptor mediated immune responses, *Nat. Rev. Immunol.* **5** 446–58.

**Lisitsyn, N. and Wigler, M.** (1993). Cloning the differences between two complex genomes. *Science* **259**, 946-51.

**Liu, C. J., Kao, J. H., Chen, W., Tsai, R. J., Chen, P. J., Lai, M. Y. and Chen, D. S.** (2000). Interspousal transmission of TT virus: low efficiency and lack of apparent risk factors. *J Gastroenterol Hepatol* **15**, 1287-91.

**Lopez-Alcorocho, J. M., Mariscal, L. F., de Lucas, S., Rodriguez-Inigo, E., Casqueiro, M., Castillo, I., Bartolome, J., Herrero, M., Manzano, M. L., Pardo, M. and Carreno, V.** (2000). Presence of TTV DNA in serum, liver and peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis. *J Viral Hepat* **7**, 440-7.

**Luo, K. X., Zhang, L., Wang, S. S., Nie, J., Yang, S. C., Liu, D. X., Liang, W. F., He, H. T. and Lu, Q.** (1999). An outbreak of enterically transmitted non-A, non-E viral hepatitis. *J Viral Hepat* **6**, 59-64.

**Maggi, F., Andreoli, E., Lanini, L., Fornai, C., Vatteroni, M., Pistello, M., Presciuttini, S. and Bendinelli, M.** (2005). Relationship between total plasma load of torquetenovirus (TTV) and TTV genogroups carried. *J Clin Microb* **43**, 4807-10.

**Maggi, F., Fornai, C., Morrica, A., Casula, F., Vatteroni, M. L., Marchi, S., Cicciorossi, P., Riente, L., Pistello, M. and Bendinelli, M.** (1999). High prevalence of TT virus viremia in Italian patients, regardless of age, clinical diagnosis, and previous interferon treatment. *J Infect Dis* **180**, 838-42.

**Maggi, F., Fornai, C., Vatteroni, M. L., Siciliano, G., Menichetti, F., Tascini, C., Specter, S., Pistello, M. and Bendinelli, M.** (2001a). Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system disorders. *J Med Virol* **65**, 418-22.

**Maggi, F., Fornai, C., Zaccaro, L., Morrica, A., Vatteroni, M. L., Isola, P., Marchi, S., Ricchiuti, A., Pistello, M. and Bendinelli, M.** (2001b). TT virus (TTV) loads associated with different peripheral blood cell types and evidence for TTV replication in activated mononuclear cells. *J Med Virol* **64**, 190-4.

**Maggi, F., Pifferi, M., Fornai, C., Andreoli, E., Tempestini, E., Vatteroni, M., Presciuttini, S., Marchi, S., Pietrobelli, A., Boner, A., Pistello, M. and Bendinelli, M.** (2003a). TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol* **77**, 2418-25.

**Maggi, F., Pifferi, M., Tempestini, E., Fornai, C., Lanini, L., Andreoli, E., Vatteroni, M., Presciuttini, S., Pietrobelli, A., Boner, A., Pistello, M. and Bendinelli, M.** (2003b). TT virus loads and lymphocyte subpopulations in children with acute respiratory diseases. *J Virol* **77**, 9081-3.

**Maggi, F., Pifferi, M., Tempestini, E., Lanini, L., De Marco, E., Fornai, C., Andreoli, E., Presciuttini, S., Vatteroni, M. L., Pistello, M., Ragazzo, V., Macchia, P., Pietrobelli, A., Boner, A. and Bendinelli, M.** (2004). Correlation between torque tenovirus infection and serum levels of eosinophil cationic protein in children hospitalized for acute respiratory diseases. *J Infect Dis* **190**, 971-4.

**Maggi, F., Andreoli, E., Riente, S., Meschi, S., Rocchi, J., Delle Sedie, A., Vatteroni, M.L., Ceccherini-Nelli, L., Specter, S., Bendinelli, M.** (2007). Torquetonovirus in patients with arthritis. *Rheumatology*. **46**, 885-886.

**Malmgaard, L.**(2004). Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J. Interferon Cytokine Res.* **24**, 439-454.

**Manni, F., Rotola, A., Caselli, E., Bertorelle, G. and Di Luca, D.** (2002). Detecting recombination in TT virus: a phylogenetic approach. *J Mol Evol* **55**, 563-72.

**Mariscal, L. F., Lopez-Alcorocho, J. M., Rodriguez-Inigo, E., Ortiz-Movilla, N., de Lucas, S., Bartolome, J. and Carreno, V.** (2002). TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology* **301**, 121-9.

**Marostica, P. J. and Fischer, G. B.,** (2006). Non-cystic-fibrosis bronchiectasis: a perspective from South America.

**Martelli, F., Capriolo, A., Di Bartolo, I., Cibir, V., Pezzotti, G., Ruggeri, F. M., and Ostanello, F.** (2006). Detection of Swine torque teno virus in italian pig herds. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* **53**, 234-8.

**Martinez, N. M., Garcia, F., Alvarez, M., Bernal, M. C., Piedrola, G., Hernandez, J. and Maroto, M. C.** (2000). TT virus DNA in serum, peripheral blood mononuclear cells and semen of patients infected by HIV. *Aids* **14**, 1464-6.

**Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Kihana, T., Yano, M., Mori, T. and Onji, M.** (2001). Existence of TT virus DNA and TTV-like mini virus DNA in infant cord blood: mother-to-neonatal transmission. *Hepatology Res* **21**, 280-7.

**Matsubara, H., Michitaka, K., Horiike, N., Yano, M., Akbar, S. M., Torisu, M. and Onji, M.** (2000). Existence of TT virus DNA in extracellular body fluids from normal healthy Japanese subjects. *Intervirology* **43**, 16-9.

- Matsumoto, A., Yeo, A. E., Shih, J. W., Tanaka, E., Kiyosawa, K. and Alter, H. J.** (1999). Transfusion-associated TT virus infection and its relationship to liver disease. *Hepatology* **30**, 283-8.
- Mikuni, M., Moriyama, M., Tanaka, N., Abe, K. and Arakawa, Y.** (2002). SEN virus infection does not affect the progression of non-A to -E liver disease. *J Med Virol* **67**, 624-9.
- Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M. A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K. and Hino, S.** (1999). Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol* **73**, 3582-6.
- Moen, E. M., Sleboda, J. and Grinde, B.** (2002a). Real-time PCR methods for independent quantitation of TTV and TLMV. *J Virol Methods* **104**, 59-67.
- Moen, E. M., Sleboda, J. and Grinde, B.** (2002b). Serum concentrations of TT virus and TT virus-like mini virus in patients developing AIDS. *Aids* **16**, 1679-82.
- Moriyama, M., Matsumura, H., Shimizu, T., Shioda, A., Kaneko, M., Miyazawa, K., Miyata, H., Tanaka, N., Uchida, T. and Arakawa, Y.** (2001). Histopathologic impact of TT virus infection on the liver of type C chronic hepatitis and liver cirrhosis in Japan. *J Med Virol* **64**, 74-81.
- Morrica, A., Maggi, F., Vatteroni, M. L., Fornai, C., Pistello, M., Ciccorossi, P., Grassi, E., Gennazzani, A. and Bendinelli, M.** (2000). TT virus: evidence for transplacental transmission. *J Infect Dis* **181**, 803-4.
- Muller, T., Hamm, S., Bauer, S.** (2008). TLR9-mediated recognition of DNA. *Handb. Exp. Pharmacol.* **183**, 51-70.
- Mushahwar, I. K.** (2000). Recently discovered blood-borne viruses: are they hepatitis viruses or merely endosymbionts? *J Med Virol* **62**, 399-404.

**Mushahwar, I. K., Erker, J. C., Muerhoff, A. S., Leary, T. P., Simons, J. N., Birkenmeyer, L. G., Chalmers, M. L., Pilot-Matias, T. J. and Dexai, S. M.** (1999). Molecular and biophysical characterization of TT virus: evidence for a new virus family infecting humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3177-82.

**Mutwiri, G., van Drunen Littel-van den Hurk, S., Babiuk, L. A.** (2009) Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, doi:10.1016/j.addr.2008.12.004

**Nakagawa, N., Ikoma, J., Ishihara, T., Yasui-Kawamura, N., Fujita, N., Iwasa, M., Kaito, M., Watanabe, S. and Adachi, Y.** (2000). Biliary excretion of TT virus (TTV). *J Med Virol* **61**, 462-7.

**Nakano, T., Park, Y. M., Mizokami, M., Choi, J. Y., Orito, E., Ohno, T., Kato, T., Kondo, Y., Tanaka, Y., Kato, H., Kato, T. and Kim, B. S.** (1999). TT virus infection among blood donors and patients with non-B, non-C liver diseases in Korea. *J Hepatol* **30**, 389-93.

**Naoumov, N. V.** (2000). TT virus--highly prevalent, but still in search of a disease. *J Hepatol* **33**, 157-9.

**Naoumov, N. V., Petrova, E. P., Thomas, M. G. and Williams, R.** (1998). Presence of a newly described human DNA virus (TTV) in patients with liver disease. *Lancet* **352**, 195-7.

**Niel, C. and Lampe, E.** (2001). High detection rates of TTV-like mini virus sequences in sera from Brazilian blood donors. *J Med Virol* **65**, 199-205.

**Niel, C., de Oliveira, J. M., Ross, R. S., Gomes, S. A., Roggendorf, M. and Viazov, S.** (1999). High prevalence of TT virus infection in Brazilian blood donors. *J Med Virol* **57**, 259-63.

**Niel, C., Diniz-Mendez, L. and Devalle, S.,** (2005). Rolling-circle amplification of Torque teno virus (TTV) complete genomes from human and swine sera and identification of a novel swine TTV genogroup. *J Gen Virol* **86**, 1343-1347.

**Niel, C., Saback, F. L. and Lampe, E.** (2000). Coinfection with multiple TT virus strains belonging to different genotypes is a common event in healthy Brazilian adults. *J Clin Microbiol* **38**, 1926-30.

**Ninomiya, M., T. Nishizawa, M. Takahashi, F. R. Lorenzo, T. Shimosegawa and H. Okamoto.** (2007). Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J.Gen.Virol.* **88**, 1939-44.

**Ninomiya, M. T.Takahashi,T. Nishizawa, T. Shimosegawa, H. Okamoto.** (2008).Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *J. Clin. Microbiol.* **46**, 207-514

**Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (1997). A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* **241**, 92-7.

**Nishizawa, T., Okamoto, H., Tsuda, F., Aikawa, T., Sugai, Y., Konishi, K., Akahane, Y., Ukita, M., Tanaka, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (1999). Quasispecies of TT virus (TTV) with sequence divergence in hypervariable regions of the capsid protein in chronic TTV infection. *J Virol* **73**, 9604-8.

**Oguchi, T., Tanaka, E., Orii, K., Kobayashi, M., Hora, K. and Kiyosawa, K.** (1999). Transmission of and liver injury by TT virus in patients on maintenance hemodialysis. *J Gastroenterol* **34**, 234-40.

**Ohto, H., Ujiie, N., Takeuchi, C., Sato, A., Hayashi, A., Ishiko, H., Nishizawa, T. and Okamoto, H.** (2002). TT virus infection during childhood. *Transfusion* **42**, 892-8.

**Okamoto, H.** (2009). History of discoveries and pathogenicity of TTVviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **331**, 1-20

**Okamoto, H. and Mayumi, M.** (2001). TT virus: virological and genomic characteristics and disease associations. *J Gastroenterol* **36**, 519-29.

**Okamoto, H., Akahane, Y., Ukita, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (1998a). Fecal excretion of a nonenveloped DNA virus (TTV) associated with posttransfusion non A-G hepatitis. *J Med Virol* **56**, 128-32

**Okamoto, H., Fukuda, M., Tawara, A., Nishizawa, T., Itoh, Y., Hayasaka, I., Tsuda, F., Tanaka, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (2000a). Species-specific TT viruses and cross-species infection in nonhuman primates. *J Virol* **74**, 1132-9.

**Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, Y., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (1998b). Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatol Res* **10**, 1-16.

**Okamoto, H., Nishizawa, T., Takahashi, M., Asabe, S., Tsuda, F. and Yoshikawa, A.** (2001). Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* **288**, 358-68.

**Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Kishimoto, J., Sai, T. and Sugai, Y.** (2000b). TT virus mRNAs detected in the bone marrow cells from an infected individual. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 700-7.

**Okamoto, H., Takahashi, M., Kato, N., Fukuda, M., Tawara, A., Fukuda, S., Tanaka, T., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (2000c). Sequestration of TT virus of restricted genotypes in peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* **74**, 10236-9.

**Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Fukai, K., Muramatsu, U., Naito, Y. and Yoshikawa, A.** (2002). Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *J Gen Virol* **83**, 1291-7.

**Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tawara, A., Sugai, Y., Sai, T., Tanaka, T. and Tsuda, F.** (2000d). Replicative forms of TT virus DNA in bone marrow cells. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 700-7.

**Okamoto, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ukita, M., Fukuda, M., Tsuda, F., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (1999). Marked genomic heterogeneity and frequent mixed infection of TT virus demonstrated by PCR with primers from coding and noncoding regions. *Virology* **259**, 428-36.

**Okamura, A., Yoshioka, M., Kubota, M., Kikuta, H., Ishiko, H. and Kobayashi, K.** (1999). Detection of a novel DNA virus (TTV) sequence in peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol* **58**, 174-7.

**Ott, C., Duret, L., Chemin, I., Trepo, C., Mandrand, B. and Komurian-Pradel, F.** (2000). Use of a TT virus ORF1 recombinant protein to detect anti-TT virus antibodies in human sera. *J Gen Virol* **81**, 2949-58.

**Pfaffl, M. W., Horgan, G.W., Dempfle, L.** (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, 36.

**Piacentini, G. L., Bodini, A., Costella, S., Vicentini, L., Mazzi, P., Sperandio, S. and Boner, A. L.** (1999). Exhaled nitric oxide and sputum eosinophil markers of inflammation in asthmatic children. *Eur Respir J* **13**, 1386-90.

**Pifferi, M., Ragazzo, V., Caramella, D. and Baldini, G.** (2001). Eosinophil cationic protein in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis: predictive value for subsequent development of persistent wheezing. *Pediatr Pulmonol* **31**, 419-24.

**Pifferi, M., Maggi, F., Andreoli, E., Lanini, L., De Marco, E., Fornai, C., Vatteroni, M.L., Pistello, M., Ragazzo, V., Macchia, P., Boner, A.L., Bendinelli, M.** (2005). Relationship between nasal TT virus burdens and spirometric indices in asthmatic children. *J. Infec. Dis.* 192, 1141-1148

**Pirovano, S., Bellinzoni, M., Ballerini, C., Cariani, E., Duse, M., Albertini, A. and Imberti, L.** (2002a). Transmission of SEN virus from mothers to their babies. *J Med Virol* **66**, 421-7.

**Pirovano, S., Bellinzoni, M., Matteelli, A., Ballerini, C., Albertini, A. and Imberti, L.** (2002b). High prevalence of a variant of SENV in intravenous drug user HIV-infected patients. *J Med Virol* **68**, 18-23.

**Pistello, M., Morrica, A., Maggi, F., Vatteroni, M. L., Freer, G., Fornai, C., Casula, F., Marchi, S., Ciccorossi, P., Rovero, P. and Bendinelli, M.** (2001). TT virus levels in the plasma of infected individuals with different hepatic and extrahepatic pathology. *J Med Virol* **63**, 189-95.

**Pollicino, T., Raffa, G., Squadrito, G., Costantino, L., Cacciola, I., Brancatelli, S., Alafaci, C., Florio, M. G. and Raimondo, G.** (2003). TT virus has ubiquitous diffusion in human body tissues: analyses of paired serum and tissue samples. *J Viral Hepat* **10**, 95-102.

**Prescott, L. E. and Simmonds, P.** (1998). Global distribution of transfusion-transmitted virus. *N Engl J Med* **339**, 776-7.

**Prieto, L.** (2002). Measurement of exhaled nitric oxide concentrations in asthma. Technical aspects and clinical usefulness. *Allergol Immunol Clin* **17**, 72-87.

**Qiao,, B., Li, B., Yang, X., Zhang, H., Chu, Y., Wang, Y., Xiong, S.** (2005) Specific siRNA downregulated TLR9 and altered cytokine expression pattern in macrophage after CpG DNA stimulation. *Cell Mol Immunol* **2**, 130-5

**Qiu, J., Kakkola, L., Cheng, F., Ye, C., Soderlund-Venermo, M., Hedman, K. and Pintel, D. J.** (2005). Human circovirus TT virus genotype 6 expresses six proteins following transfection of a full-length clone. *J Virol* **79**, 6505-10.

**Rama, M., Yousef, E.,** (2006). Bronchiectasis and chronic asthma: how common in pediatrics? *Allergy Asthma Proc* **27**, 354-8.

**Ramratnam, B., Bonhoeffer, S., Binley, J., Hurley, A., Zhang, L., Mittler, J. E., Markowitz, M., Moore, J. P., Perelson, A. S. and Ho, D. D.** (1999). Rapid production and clearance of HIV-1 and hepatitis C virus assessed by large volume plasma apheresis. *Lancet* **354**, 1782-5.

**Rodriguez-Inigo, E., Casqueiro, M., Bartolome, J., Ortiz-Movilla, N., Lopez-Alcorocho, J. M., Herrero, M., Manzarbeitia, F., Oliva, H. and Carreno, V.** (2000). Detection of TT virus DNA in liver biopsies by in situ hybridization. *Am J Pathol* **156**, 1227-34.

**Saback, F. L., Gomes, S. A. and Niel, C.** (2002). High frequency of mixed TT virus infections in healthy adults and children detected by a simplified heteroduplex mobility assay. *J Virol Methods* **101**, 117-25.

**Santamaria, F., Montella, S., Camera, L., Palumbo, C., Greco, L. and Boner, A. L.** (2006). Lung structure abnormalities, but normal lung function in pediatric bronchiectasis. *Chest* **130** (2), 480-6.

**Schroter, M., Polywka, S., Zollner, B., Schafer, P., Laufs, R. and Feucht, H. H.** (2000). Detection of TT virus DNA and GB virus type C/Hepatitis G virus RNA in serum and breast milk: determination of mother-to-child transmission. *J Clin Microbiol* **38**, 745-7.

**Scollo, M., Zanconato, S., Ongaro, R., Zaramella, C., Zacchello, F. and Baraldi, E.** (1999). Exhaled nitric oxide and exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic children. *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 1047-50.

**Shang, D., Lin, Y. H., Rigopoulou, I., Chen, B., Alexander, G. J. and Allain, J. P.** (2000). Detection of TT virus DNA in patients with liver disease and recipients of liver transplant. *J Med Virol* **61**, 455-61.

**Shibata, M., Morizane, T., Baba, T., Inoue, K., Sekiyama, K., Yoshiba, M. and Mitamura, K.** (2000). TT virus infection in patients with fulminant hepatic failure. *Am J Gastroenterol* **95**, 3602-6.

**Shibayama, T., Masuda, G., Ajisawa, A., Takahashi, M., Nishizawa, T., Tsuda, F. and Okamoto, H.** (2001). Inverse relationship between the titre of TT virus DNA and the CD4 cell count in patients infected with HIV. *Aids* **15**, 563-70.

**Shields, M. D., Brown, V., Stevenson, E. C., Fitch, P. S., Schock, B. C., Turner, G., Taylor, R. and Ennis, M.** (1999). Serum eosinophilic cationic protein and blood eosinophil counts for the prediction of the presence of airways inflammation in children with wheezing. *Clin Exp Allergy* **29**, 1382-9.

**Sigurs, N.** (2001). Epidemiologic and clinical evidence of a respiratory syncytial virus-reactive airway disease link. *Am J Respir Crit Care Med* **163**, S2-6.

**Sigurs, N., Bjarnason, R., Sigurbergsson, F. and Kjellman, B.** (2000). Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1501-7.

**Simmonds, P.** (2002). TT virus infection: a novel virus-host relationship. *J Med Microbiol* **51**, 455-8.

**Simmonds, P., Davidson, F., Lycett, C., Prescott, L. E., MacDonald, D. M., Ellender, J., Yap, P. L., Ludlam, C. A., Haydon, G. H., Gillon, J. and Jarvis, L. M.** (1998). Detection of a novel DNA virus (TTV) in blood donors and blood products. *Lancet* **352**, 191-5.

**Smith, A. D., Cowan, J., Brosett, K., Herbison, P. and Taylor, R.** (2005). Use of Exhaled Nitric Oxide Measurements to Guide Treatment in Chronic Asthma. *The N. Engl J Med* **352**, 2163-173.

**Steininger, C., Aberle, S. W. and Popow-Kraupp, T.** (2001) Early detection of acute rhinovirus infections by a rapid reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol* **39**, 129-33.

**Streeton, D.** Non adrenergic, non cholinergic neural controller of the airways. (1991). *Clin Exp Pharmacol Pathol.* **18**, 675-84

**Suzuki, F., Chayama, K., Tsubota, A., Akuta, N., Someya, T., Kobayashi, M., Suzuki, Y., Saitoh, S., Arase, Y., Ikeda, K. and Kumada, H.** (2001). Pathogenic significance and organic virus levels in patients infected with TT virus. *Intervirology* **44**, 291-7.

**Suzuki, T., Suzuki, R., Li, J., Hijikata, M., Matsuda, M., Li, T. C., Matsuura, Y., Mishiro, S. and Miyamura, T.** (2004). Identification of Basal Promoter and Enhancer elements in a untranslated region of the TT virus genome. *J Virol* **78**, 10820-4.

**Szladek, G., Juhasz, A., Asztalos, L., Szoke, K., Murvai, M., Szarka, K., Veress, G., Gergely, L. and Konya, J.** (2003). Persisting TT virus (TTV) genogroup 1 variants in renal transplant recipients. *Arch Virol* **148**, 841-51.

**Takahashi, K., Hijikata, M., Samokhvalov, E. I. and Mishiro, S.** (2000a). Full or near full length nucleotide sequences of TT virus variants (Types SANBAN and YONBAN) and the TT virus-like mini virus. *Intervirology* **43**, 119-23.

**Takahashi, K., Iwasa, Y., Hijikata, M. and Mishiro, S.** (2000b). Identification of a new human DNA virus (TTV-like mini virus, TLMV) intermediately related to TT virus and chicken anemia virus. *Arch Virol* **145**, 979-93.

**Takahashi, M., Asabe, S., Gotanda, Y., Kishimoto, J., Tsuda, F. and Okamoto, H.** (2002). TT virus is distributed in various leukocyte subpopulations at distinct levels, with the highest viral load in granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 242-8.

**Takayama, S., Yamazaki, S., Matsuo, S. and Sugii, S.** (1999). Multiple infection of TT virus (TTV) with different genotypes in Japanese hemophiliacs. *Biochem Biophys Res Commun* **256**, 208-11.

**Tanaka, M., Nishiguchi, S., Tanaka, T., Enomoto, M., Takeda, T., Shiomi, S., Kuroki, T. and Otani, S.** (1999). Prevalence of TT virus in patients with fulminant hepatic failure in Japan. *J Gastroenterol* **34**, 589-93.

**Tanaka, Y., Mizokami, M., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Kato, T., Iida, S. and Ueda, R.** (2000a). Lack of integrated TT virus (TTV) genomes in cellular DNA in infected human hematopoietic cells. *Leuk Lymphoma* **38**, 411-7.

**Tanaka, Y., Orito, E., Ohno, T., Nakano, T., Hayashi, K., Kato, T., Mukaide, M., Iida, S. and Mizokami, M.** (2000b). Identification of a novel 23kDa protein encoded by putative open reading frame 2 of TT virus (TTV) genotype 1 different from the other genotypes. *Arch Virol* **145**, 1385-98.

**Tawara, A., Akahane, Y., Takahashi, M., Nishizawa, T., Ishikawa, T. and Okamoto, H.** (2000). Transmission of human TT virus of genotype 1a to chimpanzees with fecal supernatant or serum from patients with acute TTV infection. *Biochem Biophys Res Commun* **278**, 470-6.

**Taylor, R.** (2006). Nitric oxide as a clinical guide for asthma management. *J of allergy and clinical Immunol.* **117**, 259-62.

**Theiner, G., Rossner, S., Dalpke, A., Bode, K., Berger, T., Gessner, A., Lutz, M.B.** (2008) TLR9 cooperates with TLR4 to increase IL-12 release by murine dendritic cells, *Mol. Immunol.* **45** 244-52.

**Tiddens, H., A.** (2006). Chest computed tomography scans should be considered as a routine investigation in cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev* **7**(3), 202-8.

**Todd, D., Bendinelli, M., Biagini, P., Hino, S., Mankertz, A., Mishiro, S., Niel, C., Okamoto, H., Raidal, S., Ritchie, B. and Teo, C. G.** (2002). Circovirus classification: past, present and future. XIIth International Congress of Virology. Paris, July 27 – August 1, 2002.

**Todd, D., Creelan, J. L., Mackie, D. P., Rixon, F. and McNulty, M. S.** (1990). Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. *J Gen Virol* **71 ( Pt 4)**, 819-23.

**Todd, D., McNulty, M. S., Adair, B. M. and Allan, G. M.** (2001). Animal circoviruses. *Adv Virus Res* **57**, 1-70.

**Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Hebisawa, A., Takahashi, M. and Okamoto, H.** (2001a). Influence of TT virus on the histopathological features of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* **19**, 197-211.

**Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Takahashi, M. and Okamoto, H.** (2001b). Influence of TT virus infection on the thrombocytopenia of patients with chronic liver disease. *Hepatol Res* **20**, 288-300.

**Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Tawara, A., Takahashi, M. and Okamoto, H.** (2001c). Influence of TT virus on the clinical course of alcoholic liver disease. *Hepatol Res* **19**, 180-93.

**Tokita, H., Murai, S., Kamitsukasa, H., Yagura, M., Harada, H., Takahashi, M. and Okamoto, H.** (2002). High TT virus load as an independent factor associated with the occurrence of hepatocellular carcinoma among patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J Med Virol* **67**, 501-9.

**Touinssi, M., Gallian, P., Biagini, P., Attoui, H., Vialettes, B., Berland, Y., Tamalet, C., Dhiver, C., Ravaux, I., De Micco, P. and De Lamballerie, X.** (2001). TT virus infection: prevalence of elevated viraemia and arguments for the immune control of viral load. *J Clin Virol* **21**, 135-41.

**Toyoda, H., Nomura, C., Watanabe, M., Takahama, K., Hobara, R., Yokozaki, S., Fukuda, Y. and Nakano, H.** (2000). Investigation of the association between infection with *Helicobacter pylori* and with TT virus, a novel DNA virus, in patients with gastroduodenal ulcer or ulcer scar. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **12**, 1289-93.

**Trinchieri, G.**,(2001) Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection, *J. Exp. Med.* **194** F53-7.

**Tsuda, F., Okamoto, H., Ukita, M., Tanaka, T., Akahane, Y., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (1999). Determination of antibodies to TT virus (TTV) and application to blood donors and patients with post-transfusion non-A to G hepatitis in Japan. *J Virol Methods* **77**, 199-206.

**Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., Akahane, Y., Konishi, K., Yoshizawa, H. and Okamoto, H.** (2001). IgM-class antibodies to TT virus (TTV) in patients with acute TTV infection. *Hepatol Res* **19**, 1-11.

**Ukita, M., Okamoto, H., Kato, N., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (1999). Excretion into bile of a novel unenveloped DNA virus (TT virus) associate with acute and chronic non-A-G hepatitis. *J Infect Dis* **179**,1245-8.

**Ukita, M., Okamoto, H., Nishizawa, T., Tawara, A., Takahashi, M., Iizuka, H., Miyakawa, Y. and Mayumi, M.** (2000). The entire nucleotide sequences of two distinct TT virus (TTV) isolates (TJN01 and TJN02) remotely related to the original TTV isolates. *Arch Virol* **145**, 1543-59.

**Umemura, T., Alter, H. J., Tanaka, E., Orii, K., Yeo, A. E., Shih, J. W., Matsumoto, A., Yoshizawa, K. and Kiyosawa, K.** (2002). SEN virus: response to interferon alfa and influence on the severity and treatment response of coexistent hepatitis C. *Hepatology* **35**, 953-9.

- Umetsu, D. T., McIntire, J. J. , Akbari, O., Macaubas, C. and Dekruyff, R. H.** (2002). Asthma: an epidemic of dysregulated immunity. *Nat Immunol* **3**, 715-20.
- Vasconcelos, H. C., Cataldo, M. and Niel, C.** (2002). Mixed infections of adults and children with multiple TTV-like mini virus isolates. *J Med Virol* **68**, 291-8.
- Venge, P.** (2004). Monitoring the allergic inflammation. *Allergy* **59**, 26-32.
- Vernel-Pauillac, F., Merien, F.**(2006) Proinflammatory and immunomodulatory cytokine mRNA time course profiles in hamsters infected with a virulent variant of *Leptospira interrogans*. *Infect Immun.* **74** 4172-9.
- Verschoor, E. J., Langenhuijzen, S. and Heeney, J. L.** (1999). TT viruses (TTV) of non-human primates and their relationship to the human TTV genotypes. *J Gen Virol* **80 ( Pt 9)**, 2491-9.
- Viazov, S., Ross, R. S., Niel, C., de Oliveira, J. M., Varenholz, C., Da Villa, G. and Roggendorf, M.** (1998). Sequence variability in the putative coding region of TT virus: evidence for two rather than several major types. *J Gen Virol* **79 ( Pt 12)**, 3085-9.
- Vihinene-Ranta, M., Kakkola, L., Kalela, A., Vilja, P. and Vuento, M.** (1997). Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins. *Eur J Biochem* **250**, 389-94.
- Whalley, S. A., Murray, J. M., Brown, D., Webster, G. J., Emery, V. C., Dusheiko, G. M. and Perelson, A. S.** (2001). Kinetics of acute hepatitis B virus infection in humans. *J Exp Med* **193**, 847-54.
- White, P. A., Li, Z., Zhai, X., Marinos, G. and Rawlinson, W. D.** (2000). Mixed viral infection identified using heteroduplex mobility analysis (HMA). *Virology* **271**, 382-9.

**Wilkström, FH., Meehan, BM., Berg, M., Timmusk, S., Elvin, J., Fuxler, L., Magnusson, M., Allan, GM., McNeilly F. and Fossum, C.** (2007) Structure-dependent modulation of alpha interferon production by porcine circovirus 2 oligodeoxyribonucleotide and CpG DNAs in porcine peripheral blood mononuclear cells. *J Virol* **81**, 4919-27.

**Worobey, M.** (2000). Extensive homologous recombination among widely divergent TT viruses. *J Virol* **74**, 7666-70.

**Yamada-Osaki, M., Sumazaki, R., Noguchi, E., Shibasaki, M. and Matsui, A.** (1998). Transfusion transmitted virus. *Lancet* **352**, 1309-10; author reply 1310-1.

**Yi, A.K., Yoon, J.G., Yeo, S.J., Hong, S.C., English, B.K., Krieg, A.M.,**(2002) Role of mitogenactivated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response, *J. Immunol.* **168** 4711-20.

**Yokoyama, H., Yasuda, J., Okamoto, H. and Iwakura, Y.** (2002). Pathological changes of renal epithelial cells in mice transgenic for the TT virus ORF1 gene. *J Gen Virol* **83**, 141-50.

**Yokozaki, S., Fukuda, Y., Nakano, I. and Katano, Y. (1999a).** TT virus: a mother-to-child transmitted rather than bloodborne virus. *Blood* **93**, 3569-70.

**Yokozaki, S., Toyoda, H., Nakano, I., Katano, Y., Ebata, M., Fukuda, Y., Takamatsu, J., Saito, H. and Hayakawa, T.** (1999b). Infection with TT virus, a novel transfusion-transmissible DNA virus, in haemophiliacs and in blood products. *Br J Haematol* **105**, 1114-9.

**Yu, Q., Shiramizu, B., Nerurkar, V. R., Hu, N., Shikuma, C. M., Melish, M. E., Cascio, K., Imrie, A., Lu, Y. and Yanagihara, R.** (2002). TT virus: preferential distribution in CD19(+) peripheral blood mononuclear cells and lack of viral integration. *J Med Virol* **66**, 276-84.

**Yuki, N., Kato, M., Masuzawa, M., Ishida, H., Inoue, T., Tabata, T., Matsushita, Y., Kishimoto, H., Sasaki, Y., Hayashi, N. and Hori, M.** (1999). Clinical implications of coinfection with a novel DNA virus (TTV) in hepatitis C virus carriers on maintenance hemodialysis. *J Med Virol* **59**, 431-6.

**Yuncu, G., Ceylan, K.C., Sevinc, S., Ucvet, A., Kaya, S.O., Kiter, G., Unsal, S. and Ozsinan, F.** (2006). Functional results of surgical treatment of bronchiectasis in a developing country. *Arch Bronconeumol* **42 (4)**, 183-8.

**Xu, Y., Jr Szoka, F.C.**(1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* **35**, 5616-5623.

**Zhong, S., Yeo, W., Tang, M., Liu, C., Lin, X. R., Ho, W. M., Hui, P. and Johnson, P. J.** (2002). Frequent detection of the replicative form of TT virus DNA in peripheral blood mononuclear cells and bone marrow cells in cancer patients. *J Med Virol* **66**, 428-34.