

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE
"AMEDEO AVOGADRO"**

**DOTTORATO DI RICERCA
IN MEDICINA MOLECOLARE**

DANIELA GIOIA

Università degli Studi del Piemonte Orientale
“A.Avogadro”

Facoltà di Medicina e Chirurgia

Tesi di Dottorato in Medicina Molecolare
XVI ciclo

**Caratterizzazione dei geni Interferon-inducibili
appartenenti alla famiglia IFI200:
un modello sperimentale per lo studio dell'attività di
controllo della crescita cellulare indotta dagli
Interferoni**

Supervisore
Prof.ssa Marisa Gariglio

Candidata
Daniela Gioia

La linea di ricerca del laboratorio di Microbiologia e Virologia Molecolare, diretto dalla Prof.ssa Gariglio ed in cui la candidata ha svolto l'attività pratica durante il corso di Dottorato, riguarda i meccanismi molecolari attraverso i quali gli Interferoni (IFN) svolgono la loro azione, controllando la proliferazione cellulare e regolando l'interazione virus-ospite durante il processo infettivo. In dettaglio, il lavoro svolto ha riguardato lo studio e la caratterizzazione dei geni interferon-inducibili appartenenti alla famiglia murina Ifi200 ed alla controparte umana HIN200. Una visione d'insieme sul sistema interferon e sulle proprietà peculiari delle famiglie Ifi200/HIN200 sono riportate nel lavoro allegato al termine dell' introduzione.

Particolare attenzione è stata volta inizialmente alla caratterizzazione della proteina murina p204, codificata dal gene Ifi204, alla sua attività nel controllo della crescita cellulare ed alla sua implicazione nella replicazione del citomegalovirus murino. I dati raccolti hanno evidenziato che l'attività antiproliferativa di p204 dipende dall'interazione con un regolatore chiave del ciclo cellulare, il prodotto del gene del Retinoblastoma o pRb, e che la mancanza dei siti di legame specifici per Rb fa assumere alla p204 la capacità di trasformare fibroblasti embrionali *in vitro*. Si è inoltre dimostrata l'attivazione trascrizionale del gene Ifi204 da parte del virus citomegalico murino, nonché la sua importanza per la replicazione di questo agente infettivo.

Una breve relazione sui lavori già pubblicati (con allegati i lavori stessi) così come i più recenti sviluppi della ricerca su questa parte del progetto è riportata nella parte A di questa tesi.

Più recentemente, la candidata si è occupata della caratterizzazione del gene IFI16, controparte umana del murino Ifi204 e della correlazione esistente con le infezioni da Papillomavirus umano (HPV) nei tumori dei distretti testa-collo e cutaneo. Un recente lavoro pubblicato dal gruppo cui la candidata afferisce ha dimostrato la presenza di IFI16 non solo nelle cellule del sistema monocitario/macrofagico, ma anche nelle cellule endoteliali e negli epiteli squamosi pluristratificati, distretto quest'ultimo normalmente infettato dagli HPV. Inoltre, anche IFI16 come la controparte murina è in grado di legare pRb e di interagire con p53, bersagli principali rispettivamente delle oncoproteine E6 ed E7 degli HPV ad alto rischio. Una linea di ricerca è stata dunque indirizzata alla comprensione delle interazioni esistenti tra IFI16 e questa famiglia di virus, con particolare riguardo al distretto cutaneo.

Nella parte B è presentato inoltre un lavoro in corso di stampa in cui è stato caratterizzato un paziente affetto da una variante di Epidermodisplasia Verruciforme (EV), rara sindrome con interessamento cutaneo in cui è ormai dimostrata l'implicazione di particolari genotipi di HPV.

Infine, la parte C e' invece dedicata ai dati raccolti nel corso di una linea di ricerca volta al chiarimento della funzione della proteina IFI16 nel corso del processo angiogenetico. Noto dalla letteratura il ruolo giocato dagli interferoni nella regolazione dell'angiogenesi, dimostrata la presenza di IFI16 nelle cellule endoteliali e soprattutto dimostrata l'attività antiproliferativa dei geni appartenenti alla famiglia Ifi200/HIN200, abbiamo valutato l'impatto di una sovraespressione di IFI16 in questo modello cellulare. Il lavoro presentato dimostra che cellule endoteliali primarie (HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells) perdono la capacità di proliferare e di formare tubuli in vitro in seguito alla sovra-espressione di IFI16. Al contrario, le caratteristiche tipiche del processo angiogenetico (chemiotassi e chemoinvasione) vengono

mantenute in HUVEC che esprimono in contemporanea le oncoproteine E6 ed E7 di HPV16, dimostrando l'importanza di pRb e di p53 per la corretta funzione di IFI16.

INDICE

- Relazione introduttiva	I
- Indice	IV
- INTRODUZIONE	1
- Il sistema Interferon e i geni Interferon-inducibili	1
- La famiglia di geni Ifi200/HIN-200	4
- Bibliografia	10
- Lavori presentati nell'introduzione:	14
De Andrea M., Ravera R., Gioia D. , Gariglio M., Landolfo S. (2002) The Interferon system: an overview. <i>Europ J Paediatr Neurol</i> , 6(suppl. A):A41-6.	14
- PARTE A	20
- Il gene murino Ifi204 e l'omologo umano IFI16	20
- Il Citomegalovirus	30
- Ifi204 e il Citomegalovirus	34
- Bibliografia	37

- Lavori presentati nella parte A:	42
De Andrea M., Gioia D. , Azzimonti B., Noris E., Landolfo S.. and Gariglio M (2001): Proprietà biologiche ed organizzazione genomica della famiglia di geni interferon-inducibile murina IFI200 e della controparte umana HIN200. <i>L' Igiene moderna</i> , 119: 135-145	42
De Andrea M., Rolle S., Noris E., Ying GG., Gioia D. , Azzimonti B., Gariglio M., Landolfo S. (2002) The interferon-inducible gene, Ifi204, acquires malignant transformation capability upon mutation at the Rb-binding sites. <i>FEBS Lett</i> , 515(1-3):51-7.	53
Rolle S., De Andrea M., Gioia D. , Lembo D., Hertel L., Landolfo S., Gariglio M.(2001) The interferon-inducible 204 gene is transcriptionally activated by mouse cytomegalovirus and is required for its replication. <i>Virology</i> , 286(2):249-55.	61
- PARTE B	68
- I papillomavirus	68
- Struttura	68
- Patogenesi	71
- Epidermodisplasia Verruciforme	74
- Epidemiologia	74
- Manifestazioni cutanee	75

- Bibliografia	79
- Lavori presentati nella parte B:	84
Barbara Azzimonti; Michele Mondini; Marco De Andrea; Daniela Gioia ; Umberto Dianzani; Riccardo Mesturini; Giorgio Leigheb; Rossana Tiberio; Santo Landolfo and Marisa Gariglio. CD8 ⁺ T cells lymphocytopenia and lack of <i>EVER</i> mutations in a patient with clinically and virologically typical epidermodysplasia verruciformis. <i>Arch. Dermatol.</i> , in press.	84
- PARTE C	92
- Angiogenesi	92
- Introduzione	92
- La regolazione dell'angiogenesi	93
- L'angiogenesi fisiologica	96
- L'angiogenesi nella crescita tumorale e nelle metastasi	97
- Inibizione dell'angiogenesi	99
- Attività antitumorale degli Interferoni	102
- Studi preclinici	102
- Studi clinici	102
- Attività antiangiogenetica degli Interferoni	104
- IFI16 e angiogenesi	106
- Bibliografia	109

- Lavori presentati nella parte C:	125
Ravera R., Gioia D. , De Andrea M., Cappello P., Giovarelli M., Marconi P., Manservigi R., Gariglio M., Landolfo S. : The Interferon-inducible IFI16 gene inhibits tube morphogenesis and proliferation of primary, but not HPV16 E6/E7-immortalized human endothelial cells. <i>Exp. Cell. Res.</i> 293, 331-345.	125
- CONCLUSIONI	140

INTRODUZIONE

Il sistema Interferon e la famiglia di geni Ifi200/HIN-200.

Gli Interferoni (IFN) rappresentano una famiglia di proteine segnale che svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della difesa dell'organismo ospite, nei confronti non solo delle infezioni virali ma anche della proliferazione incontrollata tipica delle cellule tumorali. La capacità degli IFN di indurre nelle cellule uno stato di resistenza alle infezioni virali è probabilmente la caratteristica più conosciuta, essendo stata la proprietà fondamentale che ne ha permesso la scoperta. Gli IFN infatti sono essenziali per la sopravvivenza dei vertebrati superiori in quanto forniscono una prima linea di difesa contro le infezioni virali, difesa che compare ore o giorni prima delle risposte immunitarie. Oltre alle ben note proprietà antivirali, tuttavia, essi partecipano attivamente alla regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare e sono in grado di modulare l'attività funzionale di popolazioni di cellule effettrici del sistema immunitario quali i linfociti T citotossici, le cellule natural killer (NK) ed i macrofagi (De Mayer, 1988). Le caratteristiche principali di ciò che è definito come "sistema degli Interferoni" sono riportate nella review intitolata "**The Interferon system: an overview**", pubblicata nel supplemento alla rivista *European Journal of Paediatric Neurology* che raccoglie gli interventi al Meeting Internazionale sulla Sindrome di Aicardi-Goutières (Pavia, ITALIA, Maggio 2001).

Classificati come Interferone di tipo I (IFN α e IFN β) o di tipo II (IFN γ), le tre specie di IFN sono contraddistinte dalla capacità di suscitare risposte parzialmente differenti. Così gli IFN α/β , prodotti dai leucociti e dai fibroblasti, sono essenzialmente coinvolti nel contrastare ed eradicare le infezioni virali, mentre l'IFN γ , prodotto dai linfociti T e B, dalle cellule NK e dai macrofagi ha come ruolo

chiave la regolazione delle risposte immuni cellulari. Nonostante queste differenze funzionali, il sistema mediante il quale le cellule rispondono a tutti e tre i tipi di IFN è fondamentalmente unico e può essere riassunto in tre fasi:

- 1) legame dell'IFN a recettori specifici espressi sulla membrana citoplasmatica delle cellule bersaglio;
- 2) attivazione delle vie intracellulari di trasduzione del segnale;
- 3) attivazione della trascrizione di set specifici di geni interferon-inducibili e conseguente produzione delle proteine effettrici.

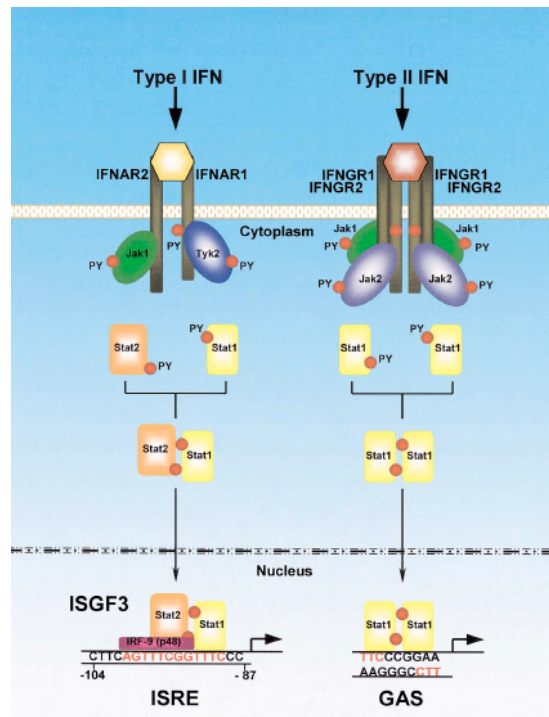


Figura 1. Schema di attivazione della via Jak-Stat degli Interferoni.

Gli elementi principali di questo sistema sono tre: un recettore specifico di tipo I (per l'IFN α/β) o di tipo II (per l'IFN γ), almeno tre proteine della famiglia delle

“*Janus kinases*” (JAK) e almeno due proteine della famiglia delle “*Signal Transducers and Activators of Transcription*” (STAT, Trasduttori del segnale e attivatori della trascrizione). La funzione principale delle JAK è quella di attivare, mediante fosforilazione di particolari residui di tirosina, sia il recettore che le proteine STAT, mentre queste ultime propagano il segnale fino al nucleo. L’intera cascata di attivazione è estremamente rapida: sono infatti sufficienti da 1 a 15 minuti affinché tutti i componenti vengano fosforilati in seguito alla stimolazione del recettore. Quali siano le modalità che regolano la migrazione delle proteine STAT attivate non è ancora del tutto noto. Una volta nel nucleo, tuttavia, esse agiscono come fattori di trascrizione e, legandosi a particolari sequenze di DNA, regolano l’espressione trascrizionale dei molteplici geni interferon-inducibili. Nel caso dell’IFN γ , il complesso GAF (*Gamma Activated Factor*), omodimero di due proteine STAT1 (p91), è in grado di riconoscere e legare direttamente la sequenza GAS (*Gamma Activated Sequence*) presente a monte dei geni regolati dall’IFN γ . L’attivazione del recettore dell’IFN α/β porta invece alla formazione del complesso ISGF3 (*Interferon Stimulated Gene Factor 3*) composto da una STAT1, una STAT2 (p113) e una terza proteina denominata ISGF3 $\gamma/p48$, la quale aumenta l’affinità di legame dell’eterodimero alla sequenza ISRE (*Interferon Stimulated Regulatory Element*) presente sul promotore dei geni inducibili da IFN α/β (Ihle e al., 1994 e 1995).

ISGF3 $\gamma/p48$, definita oggi IRF9, appartiene ad una famiglia di almeno nove proteine definite IRFs (*Interferon regulatory factors*) che negli ultimi anni ha assunto una notevole importanza nella comprensione dei meccanismi di regolazione degli IFN (Taniguchi e al., 2001). In particolare, la generazione di topi knockout ne ha chiarito il ruolo nella risposta immune e nell’oncogenesi (Sato e al., 2001).

Una volta trasmesso dal recettore al nucleo, il segnale dato dalla presenza dell'IFN nell'ambiente extracellulare viene convertito nell'espressione di numerose proteine effettrici le quali mediano le due principali funzioni degli IFN: l'attività antivirale e l'attività antiproliferativa.

Praticamente tutte le tappe necessarie alla replicazione virale possono venire inibite dagli IFN, compresa l'entrata nella cellula, la trascrizione dei geni virali, la stabilità dell'RNA messaggero (mRNA) così prodotto, l'inizio della traduzione dell'mRNA in proteina, la maturazione dei virioni, il loro assemblaggio e il rilascio di particelle virali mature.

Come già detto in precedenza, gli IFN agiscono anche come potenti inibitori della crescita cellulare e, in parallelo, come regolatori della morte cellulare programmata o apoptosi. Mentre almeno alcuni geni coinvolti nei meccanismi di controllo dell'apoptosi da parte degli IFN sono già stati identificati, nessun gene interferon-inducibile è stato fino ad oggi direttamente collegato all'attività antiproliferativa.

La famiglia di geni Ifi200/HIN-200

La famiglia di proteine Ifi200 o HIN-200 (dall'inglese *Hematopoietic IFN-inducible nuclear proteins with a 200 aminoacids repeat*) comprende alcune proteine umane e murine altamente omologhe, aventi sequenze primarie e caratteristiche biologiche molto simili. I membri umani sino ad oggi scoperti comprendono le proteine IFI16 (Trapani e al., 1992), MNDA (*Myeloid cell Nuclear Differentiation Antigen*) (Burrus e al., 1992) e AIM2, (*Absent In Melanoma 2*) (DeYoung e al., 1997), mentre i membri murini sono almeno quattro, p202, p203, p204 e D3

(Choubey e al., 1989; Gribaudo e al., 1997; Tannenbaum e al., 1993). Sia i geni umani che murini sono localizzati sul cromosoma 1, in posizione q21-22, e la loro trascrizione è positivamente regolata da entrambi i tipi di IFN. Dal punto di vista strutturale le proteine appartenenti ad entrambe le famiglie presentano vari motivi comuni. In particolare, tutti i membri sia umani che murini condividono almeno uno dei due segmenti altamente conservati di circa 200 aminoacidi, denominati dominio *a* e dominio *b*. La percentuale di omologia tra i domini delle differenti proteine è variabile, ma nel complesso il livello di conservazione è piuttosto elevato. Oltre a questi segmenti, le sette proteine presentano anche altre regioni, diverse o mancanti nei vari elementi, le quali con buona probabilità sono alla base delle differenze nell'espressione tissutale, nell'inducibilità da parte degli IFN e ovviamente nella funzione dei vari polipeptidi.

Le proprietà del gene murino Ifi204 e della sua controparte umana IFI16 saranno discusse in dettaglio nella parte A. Qui di seguito sono invece presentate le caratteristiche principali degli altri componenti della famiglia.

Il gene sino ad oggi più studiato tra gli HIN-200 murini è Ifi202, codificante una proteina fosforilata di 52 kDa la cui concentrazione intracellulare aumenta di 15-20 volte in seguito alla stimolazione della cellula con IFN α/β o IFN γ . In cellule non stimulate la proteina p202 è localizzata nel citoplasma, ma la prolungata esposizione della cellula agli IFN ne causa la pressoché completa migrazione nel nucleo, il sito principale d'azione, mentre il citoplasma rappresenta solamente la regione di accumulo della sua forma latente (Choubey e al., 1993). Gli studi pubblicati durante gli ultimi anni hanno permesso di ipotizzare un coinvolgimento di questa proteina sia nella modulazione dell'attività trascrizionale della cellula sia nel controllo della

proliferazione cellulare. È stata infatti dimostrata l'interazione fisica sia *in vitro* che *in vivo* tra la p202 e il prodotto del gene del retinoblastoma pRb, il quale controlla il passaggio della cellula dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. La proteina p202 sarebbe inoltre in grado di legare anche alcuni esponenti della famiglia di E2F (E2F-1/DP1 e E2F-4/DP1), i fattori nucleari posti sotto il diretto controllo di pRb. In tutti questi casi, la principale conseguenza dell'interazione è l'inibizione della normale attività di questi fattori, culminante nel blocco della trascrizione di svariate proteine necessarie per la replicazione del DNA. Lavori pubblicati recentemente hanno ulteriormente ampliato il gruppo di partners della p202, includendovi la p202 stessa, che sarebbe quindi in grado di formare omodimeri, nonché una serie di proteine (sm53BP1, NF-kB, AP-1, MyoD, Miogenina) coinvolte in svariate funzioni cellulari, come la risposta immediata agli stimoli di differente natura o il controllo della differenziazione cellulare. In tutti questi casi l'interazione con la p202 ha come risultato finale l'inibizione del legame di questi fattori di trascrizione al loro sito specifico sul DNA (Johnstone e al., 1999).

Il trattamento di linee cellulari murine o umane con gli Interferoni provoca un generale rallentamento della progressione nel ciclo cellulare, con una riduzione della velocità di transizione delle cellule dalla fase G1 alla fase S. Il fatto che la p202 fosse indotta dal trattamento con IFN e fosse in grado di interagire fisicamente con svariate proteine direttamente coinvolte nel controllo del ciclo cellulare, ha fatto nascere il sospetto che essa potesse essere dotata di attività antiproliferativa. A questo riguardo, numerosi sono i lavori che ascrivono alla p202 un ruolo di questo tipo (Lembo e al., 1995; Yan e al., 1999; Gutterman e al., 1999), ma i modelli cellulari utilizzati non hanno mai permesso di ottenere risultati convincenti e definitivi.

Inoltre, il tentativo di creare dei topi che non esprimessero la proteina p202 si è rivelato fallimentare a causa della presenza di una proteina che differisce dalla selvatica per soli 7 aminoacidi su 445 e di uno pseudogene, definiti rispettivamente p202b e p202c (Wang e al., 1999).

Mentre le informazioni relative alla proteina D3 sono in larga misura incomplete e riguardano soprattutto l'induzione selettiva del suo gene nei macrofagi peritoneali murini in seguito a stimolazione con IFN o altri induttori (come l'LPS), un numero maggiore di dati è stato accumulato sulla proteina di 408 aminoacidi definita p203, il cui cDNA è stato clonato nel nostro laboratorio (Gribaudo e al., 1997). Sia l'RNA messaggero che la proteina derivanti dal gene Ifi203 sono risultati inducibili dal trattamento con IFN α in differenti linee cellulari indipendentemente dalla loro origine istologica. L'analisi *in vivo* ha invece dimostrato che entrambi sono costitutivamente espressi nel timo, milza e midollo osseo del topo e la loro espressione non viene incrementata dall'inoculazione intraperitoneale dell'RNA sintetico a doppia elica poli rI:rC, che aumenta i livelli di IFN nel siero. In secondo luogo, il paragone tra il pattern di espressione dell'mRNA codificante per la proteina p202 e quello codificante per la p203 ha evidenziato che l'espressione del gene 203 dipende dal ceppo murino considerato e la presenza dell'mRNA codificante per le due proteine è mutualmente esclusiva (Gribaudo e al., 1999). Mentre infatti l'mRNA del gene 203 è espresso in modo costitutivo nella milza dei topi C57BL/6 e BALB/c ed è assente nei topi DBA/2, l'mRNA del gene 202 è fortemente indotto dal trattamento con poli rI:rC nei topi DBA/2 e BALB/c, mentre è assente nei C57BL/6.

La proteina MNDA è stata scoperta mediante esperimenti di immunoistochimica volti a individuare antigeni nucleari espressi specificamente in linee di cellule mieloidi (Hudson e al., 1988). Nella sua regione 5' non tradotta sono stati individuati

due elementi di risposta alla stimolazione con gli IFN o ISRE (Kao e al., 1996). MNDA codifica per una proteina di 403 aminoacidi, omologa al 40% con la p203, costitutivamente espressa in cellule della linea mieloide negli stati tardivi del differenziamento, nelle cellule del midollo osseo, nei granulociti e nei monociti periferici e fortemente inducibile in seguito a trattamento con IFN- α . Non viene invece espressa nelle cellule mieloidi meno differenziate ed in quelle della linea linfoide (Cousar e al., 1990).

La proteina presenta nella propria sequenza primaria siti di potenziale legame al DNA, caratteristica tipica delle proteine coinvolte nella regolazione genica come fattore trascrizionale (Burrus e al., 1992), mentre ne è stato dimostrato il legame con nucleolina e con B23, proteine coinvolte nella regolazione trascrizionale tramite l'interazione con il fattore YY1 (Xie e al., 1998). Questi dati, sommati alla sua localizzazione nucleare ed alla capacità di formare omodimeri (Trapani e al., 1992), ne suggeriscono un qualche coinvolgimento nel processo differenziativo ma, fino ad ora, questa ipotesi non è stata suffragata da alcuna dimostrazione sperimentale.

Il cDNA del gene AIM2 (*Absent In Melanoma 2*) è stato isolato da un gruppo di cDNA espressi esclusivamente in linee cellulari di melanoma, in cui il fenotipo tumorigenico era stato soppresso tramite trasfezione di una copia del cromosoma 6 (Trent e al., 1990). Esso codifica per una proteina di 344 aa, che presenta il caratteristico dominio di 200 aa di tipo *a* (DeYoung e al., 1997). L' mRNA corrispondente è costitutivamente espresso nella milza, nell'intestino e in leucociti di sangue periferico, ed indotto da IFN γ nelle HL-60. A differenza degli altri membri della famiglia, la sua localizzazione è esclusivamente citoplasmatica.

La sovraespressione di AIM2 in cellule trasfettate ritarda la proliferazione e, in condizioni di concentrazione di siero ridotte, aumenta la suscettibilità alla morte

cellulare (Choubey et al., 2000). Inoltre essa eterodimerizza con p202 *in vitro* (Choubey et al., 2000). Come per MNDA, anche per AIM-2 al momento non è ascrivibile alcuna funzione specifica.

Bibliografia

Burrus GR, Briggs JA, Briggs RC (1992) Characterisation of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen: relationship to the interferon-induced proteins. *J Cell Biochem* 48, 190-202.

Choubey D, Snoddy J, Chaturvedi V, Toniato E, Opdenakker G, Thakur A, Samanta H, Engel DA, Lengyel P (1989) Interferon as gene activators: indications for repeated gene duplication during the evolution of a cluster of interferon-activatable genes on murine chromosome 1. *J Biol Chem* 264, 17182-17189.

Choubey D, Lengyel P (1993) Interferon action: cytoplasmic and nuclear localization of the interferon-inducible 52 kD protein that is encoded by the Ifi202 gene from the gene 200 cluster. *J Interferon Res* 13, 43-52.

Choubey D, Walter S, Geng Y, Xin H (2000) Cytoplasmic localization of the interferon-inducible protein that is encoded by the AIM2 (absent in melanoma) gene from the 200-gene family. *FEBS Lett* 474, 38-42.

Cousar JB, Briggs RC (1990) Expression of human myeloid cell nuclear differentiation antigen (MNDA) in acute leukemias. *Leuk Res* 14, 915-920.

De Mayer E, De Mayer-Guignard J (1988) Interferon and other regulatory cytokines. *Wiley and Sons, New York*.

DeYoung KL, Ray ME, Johnstone RW, Su YA, Anzick SL, Meltzer PS, Trapani JA, Trent JM (1997) Cloning of a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. *Oncogene* 15, 453-457.

Gribaudo G, Ravaglia S, Guandalini L, Riera L, Gariglio M, Landolfo S (1997) Molecular cloning and expression of a novel interferon-inducible protein encoded by a 203 gene from the gene 200 cluster. *Eur J Biochem* 249, 258-264.

Gribaudo G, Riera L, De Andrea M, Landolfo S (1999) The antiproliferative activity of the murine Interferon-inducible Ifi 200 proteins depends on the presence of two 200 aminoacids domains. *FEBS Lett* 456, 31-36.

Gutterman JU, Choubey D (1999) Retardation of cell proliferation after expression of p202 accompanies an increase in p21(WAF1/CIP1). *Cell Growth Differ* 10, 93-100.

Hudson CR, Bellew T, Briggs JA, Casey SB, Briggs RC (1988) Production and use of rat monoclonal antibodies to the human myeloid cell nuclear differentiation antigen. *Hybridoma*. 7, 541-553.

Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Thierfelder WE, Kreider B, Silvennoinen O (1994) Signalling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci* 119, 222-227.

Ihle JN, Kerr IM (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily. *Trends Genet* 11, 69-74.

Johnstone RW, Trapani JA (1999) Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins. *Mol Cell Biol* 19, 5833-5838.

Kao WY, Dworkin LL, Briggs JA, Briggs RC (1996) Characterization of human myeloid cell nuclear differentiation antigen gene promoter. *Biochim Biophys Acta* 1303, 201-204.

Lembo D, Angeretti A, Benefazio S, Hertel L, Gariglio M, Novelli F, Landolfo S (1995) Constitutive expression of the interferon-inducible protein p202 in NIH3T3 cells affects cell cycle progression. *J Biol Regul Homeost Agents* 9, 42-46.

Sato M, Taniguchi T, Tanaka N (2001) The interferon system and interferon regulatory transcription factors – studies from gene knockout mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 12, 133-142.

Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N (2001) IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Ann Rev Immunol* 19, 623-655.

Tannenbaum CS, Major J, Ohmori Y, Hamilton TA (1993) A lipolysaccharide-inducible macrophage gene (D3) is a new member of an interferon-inducible gene cluster and is selectively expressed in mononuclear phagocytes. *J Leukoc Biol* 53, 563-568.

Trapani JA, Browne KA, Dawson MJ, Ramsay RG, Eddy RL, Shows TB, White PC, Dupont B (1992) A novel gene constitutively expressed in human lymphoid cells is induced with interferon- γ in myeloid cells. *Immunogenetics* 36, 369-376.

Trent JM, Stanbridge EJ, McBride HL, Meese EU, Casey G, Araujo DE, Witkowski CM, Nagle RB (1990) Tumorigenicity in human melanoma cell lines controlled by introduction of human chromosome 6. *Science* 247, 568-71.

Wang H, Chatterjee G, Meyer JJ, Liu CJ, Manjunath NA, Bray-Ward P, Lengyel P (1999) Characteristics of three homologous 202 genes (Ifi202a, Ifi202b, and Ifi202c) from the murine interferon-activatable gene 200 cluster. *Genomics* 60, 281-94.

Xie J, Briggs JA, Briggs RC (1998) Human hematopoietic cell specific nuclear protein MNDA interacts with the multifunctional transcription factor YY1 and stimulates YY1 DNA binding. *J Cell Biochem* 70, 489-506.

Yan DH, Wen Y, Spohn B, Choubey D, Gutterman JU, Hung MC (1999) Reduced growth rate and transformation phenotype of the prostate cancer cells by an interferon-inducible protein, p202. *Oncogene* 18, 807-811.



REVIEW ARTICLE

The interferon system: an overview

MARCO DE ANDREA,^{1,2} RAFFAELLA RAVERA,¹ DANIELA GIOIA,² MARISA GARIGLIO,²
SANTO LANDOLFO^{1,3}

¹Department of Public Health and Microbiology, Medical School, University of Turin, Turin, Italy; ²Department of Medical Sciences, Medical School, University of Eastern Piedmont, Novara, Italy; ³Immunogenetics and Experimental Oncology Center, CNR, Turin, Italy

Interferons are a family of related and naturally occurring signal proteins grouped in three major species (alpha, beta and gamma) according to their cellular origin and inducing agents and historically described for their antiviral activity. Upon binding to specific receptors they lead to the activation of a signal transduction pathway that activates a broad range of genes, that are now known involved not only in antiviral but also in immunomodulatory and antiproliferative activities. The inhibition of virus growth and/or cell proliferation by interferons is associated with several physiological changes, some of which depend on the activity of specific proteins that are interferon-inducible. This review will attempt to illustrate the history and main properties of the interferon system, taking a look at recent discoveries about some interferon-inducible genes.

Keywords: Interferon. Viruses. Antiviral state. Interferon-inducible genes. Ifi200. HIN200.

History and generalities

Interferons are one of the so-called natural defences of human organisms against the invasion of external agents such as viruses, microbes or tumour cells.

The notion of interferon is strictly related to the notion of viral interference, a concept which implies that some cells, once infected by a virus, become resistant to subsequent infections caused by the same or by similar viruses. The first observations in this respect were made in the mid-1930s. Hoskins' work on rabbits demonstrated that these animals, after being infected by the herpes simplex virus, were protected against subsequent infections by the same virus.¹

A few years later, Findlay and MacCallum demonstrated the same phenomenon but with a wider spectrum, in that these animals were also resistant to infections caused by viruses not antigenically identical.² However, such observa-

tions lacked any biological confirmation, since, at that time, the existence of any molecules capable of mediating this activity had not been demonstrated yet. It was only in 1957 that Isaacs and Lindenmann observed that supernatants of cells taken from cell cultures infected by a virus produced a protein that could make other cells resistant to other viruses.³ In particular, they made use of chorioid fragments from chicken embryos, infected them with thermo-inactivated influenza virus and saw that these cells could produce a protein that was able to protect other fragments of the same type when subsequently infected by a virus that was no longer an inactivated but a live virus. Therefore, this was the first observation that something that mediated this protection against the viral infection actually existed.

It can therefore be said that the name 'interferon' stems from this observation, from this capacity of having a viral interference on the cells. Today's knowledge of the interferon system is much wider. In particular, it is known that interferon provides

Correspondence: Santo Landolfo MD, Full Professor, Department of Public Health and Microbiology, Medical School, University of Turin, Via Santena 9 bis, 10126 - Torino, Italy. Tel: 0039-011-6706604; Fax: 0039-011-6966977; e-mail: santo.landolfo@unito.it

protection and is a natural barrier against infections caused by external viruses, bacteria, mitogens and tumour cells.

As of today, interferons are considered cytokines belonging to the group of interleukins and three types of interferon are known: interferon-alpha, beta, and gamma. Interferon-alpha, and interferon-beta belong to the same type I sub-class, whereas interferon-gamma belongs to a separate sub-class or type II. These are functionally correlated proteins that are produced by cells after the latter have been stimulated by external agents. In order to obtain an antiviral effect. However, other proteins must be produced: these are called 'effector' proteins. Therefore, interferon is an inducer molecule acting on other proteins which actually trigger an antiviral and/or anti-proliferative mechanism.

To date three key features are known of interferons: there is the historically acknowledged antiviral action, but they show also an immunomodulatory and an anti-proliferative action that have been recently studied.⁴⁻⁶ The fact that, under specific conditions, some interferons can block cells at a given stage of the cell cycle has made the investigation of their anti-tumour activity become crucial.

Interferon-alpha, which is also known as 'leukocyte interferon' due to the cells that produce it, is coded for by not less than 15 genes and 9 pseudogenes docked on human chromosome 9 and murine chromosome 4. It follows that interferon-alpha is not unique, but rather a protein family made up of different types of interferon-alpha. The main feature is that each of those genes does not contain any introns, i.e. it does not contain any regions that do not code for DNA, and the whole gene codes for interferon-alpha. The protein that is thus formed consists of 166 amino acids with no glycosylation sites and stable at a very acidic pH.

The main features of interferon-alpha is that it is produced by macrophages and particularly by lymphocytes, especially under the action of external agents such as eukaryotic or tumour cells, or by virus-infected cells, as well as by prokaryotic cells and by mitogens in general. However, the crucial point is that all these inducers trigger the production of interferon-alpha by macrophages and lymphocytes.

The first interferon ever discovered is the beta type, which was first observed by Isaacs and Lindenmann. It used to be called 'fibroblast interferon' because it is produced by epithelial cells and fibroblasts under the action of foreign nucleic acids like viruses or other types. Also interferon-beta is coded by a gene docked on human chromosome 9. In this case, only one gene

exists and once again there are no introns, therefore the whole gene codes for the protein. This protein consists of 166 amino acids. In this case, it contains a glycosylation site and it is once again stable at pH 2. Compared with interferon-alpha, its homology is as high as 40-50%.

Interferon-gamma belongs to a separate sub-class, the so-called type II interferon that is named 'immune interferon'. It is produced especially by lymphocytes sensitized with the help of macrophages and only under the action of external mitogens. Also in this case there is a single gene which, however, is not docked on chromosome 9, but on chromosome 12. In addition, it contains 3 introns, which was not the case with interferon-alpha and interferon-beta. These and other features cause interferon-gamma to be allocated to a separate class which has different characteristics from interferon-alpha and beta.

Another peculiar trait of interferon-gamma is that it is unstable at an acidic pH and these are very important characteristics, especially as far as interferon-based therapy is concerned. Moreover, there is no analogy with interferons alpha and beta.

Properties of different interferon classes are summarized in Table 1.

Antiviral activity

When a cell is infected by a virus or simply when it meets a viral genome, several processes occur within the cell, the ultimate outcome of which is the activation of the signals that will lead to the formation of interferon. The released interferon can follow two pathways: either it can be partially 'sensed' by the receptors located in the same cell and, therefore, it will protect this cell against future infections or, and this is the commonest instance, it causes what is known as an induction of the antiviral condition on adjacent cells. Interferon is sensed by special receptors that are present on other cells. In these cells, a whole set of genes are induced that are responsible for the so-called antiviral state which made it possible to identify interferon in the past. This antiviral state produces its effects, for instance, by making viruses incapable of being taken up by the cell that is infected, or it causes the activation of some proteins that can break down viral RNAs.

The effect of interferon on these infected cells can be seen at several levels: for instance, it can cause the viral RNAs transcription to be inhibited. Otherwise, the inhibition can occur at the level of translation of these RNAs, hence at a later stage.

Table 1 Properties of human interferons

	Type I		Type II
	Interferon-alpha (leukocyte)	Interferon-beta (fibroblast)	Interferon-gamma (immune)
Produced by	Peripheral leukocytes	Fibroblasts	Lymphocytes
Inducing agent	Virus infection, dsRNA	Virus infection, dsRNA	Mitogens (non-sensitized lymphocytes), specific antigens (sensitized lymphocytes)
Number of genes	At least 15 functional and 9 pseudogenes	1	1
Presence of introns	none	none	3
Chromosomal location	9	9	12
Size of primary protein (amino acids)	166	166	166
Length of signal sequence (amino acids)	23	21	20
Size of actual protein (amino acids)	143	145	146
Glycoprotein	no	yes	yes
Stability at pH 2.0	yes	yes	no
Activity in the presence of SDS	yes	yes	no

Moreover, if these two mechanisms have failed, other mechanisms can set in. For instance, if the viral proteins must be glycosylated, that is if they must undergo subsequent changes in order to become active, glycosyltransferase proteins need to be operating. In this case, the inhibiting action of interferon can be deployed by incapacitating these glycosylating proteins. Finally, is the virus release from the cell that could be inhibited.

This means that all the mechanisms responsible for viral maturation are thus inhibited.

As schematically represented in Fig. 1, in the case of an RNA virus attack, in order for this virus to be released from the cell and to positively spread its

infective action, all the factors leading to the transcription and, then, to the translation of viral RNA must be present. Similarly, the DNA viruses must somehow activate genes that are already in the cell. In both cases, however, it is important to know that the introduction of DNA or RNA viruses causes the cell interferons to increase, with two consequences: the expression of viral genes can be attenuated and therefore these cannot be expressed any more. Conversely, there may be a concurrent greater expression of cellular genes that are responsible for inhibiting the virus. We will see some of these genes in greater details. However, the final result is that the replication of the virus is inhibited.

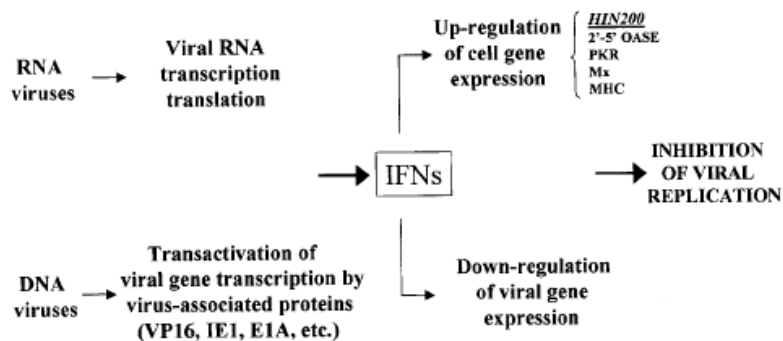


Fig. 1. Mechanisms of viral replication inhibition by interferons (IFNs).

Antiproliferative activity

To date, the other major chapter concerning interferon action has to do with its antiproliferative hence, in some cases, with its antitumour activity. It is known that interferon-alpha can act on T-cells causing the differentiation of the so-called T-helper 1 cells, while at the same time inhibiting the growth of other lymphocytes. In this way, specific cells against a specific target are produced. Similarly, interferon-alpha can act on NK cells and macrophages, thus enhancing their production of interferon and especially their production of interleukin 1 and their proliferation, consequently increasing the number of circulating cells.⁷

As far as tumour cells are concerned, interferon-alpha can enhance the expression of the class 1 major histocompatibility complex and, especially, it can cause these cells to express antigens such that these can be recognized by the host's defence systems. Therefore, it may be said that interferon-alpha causes tumour cells to produce surface signals that will then allow them to be recognized by other defence elements.

Interferon-gamma deploys a different action: it enhances the activation of T-cells in synergy, i.e. in combination, with a very important interleukin, that is interleukin 2. As far as macrophages are concerned, it can increase the production of the class 2 major histocompatibility complex and, with respect to tumour cells, besides increasing the quantity of the class 1 histocompatibility complex cells, as is the case with interferon-alpha, it can also decrease the proliferation of tumour cells. This was observed on cultured cells for some types of tumours.⁷

Interferon-based anti-tumour therapy has been introduced quite recently. Towards the mid-1980s, interferons started to be massively used against a large number of tumours. Actually, in this case, the expectations related to the use of interferons have been met but partially. As a matter of fact, a survey was recently published by Jonasch and Haluska⁷ which lists a number of studies that review the use of interferon through the years. Their conclusion is that interferon is almost always used in combination with other treatments, like chemotherapy, and it is only active against some types of cancer, in particular against chronic myeloid leukaemia or follicular lymphoma. In the case of other tumours and, to a lesser extent, also for these forms, the adverse effects induced in patients by interferon are always rather severe and more in-depth studies still need to be conducted to decide whether it is advisable to use these molecules in anti-tumour treatments.

Signal transduction

To exert their activities, interferons bind to specific membrane receptors that permit cells to sense the external signal of interferon and then transfer it in the interior, so that the cell can produce the so-called interferon-inducible proteins.

As previously described for interferons, receptors too are divided into two classes, namely the receptor for interferon-alpha and interferon-beta on the one side and the receptor of interferon-gamma on the other side. Actually, a receptor is not a single unit, but it consists of two sub-units. Joined together, these two sub-units form the actual interferon receptor. These are transmembrane proteins with an extracytoplasmic domain and an intracytoplasmic domain displaying particular motives that bind to proteins that are key in making it possible for this external signal to be sensed within the cell. There are tyrosine kinase proteins that are particularly important, since, at this stage, they can phosphorylate tyrosine residues; these belong to the so-called JAK proteins. The JAK acronym has a dual meaning: at a time when several proteins that may have this kinase activity were being discovered, an additional protein of this kind was found, so that this acronym would stand for 'just another kinase'. Another explanation is due to the fact that this molecule contains two very similar kinase domains, but only one of these is active. When the molecule becomes active, these two domains almost face one another, somewhat mimicking the Roman two-faced Janus, hence the name 'Janus kinase'.⁸

Other important proteins in this respect are the so-called STAT proteins. These have a dual role in that, as explained by their name, they are signal transducers, so that they can let the external signal get inside and, at the same time, they are also transcription activators, since these proteins, after binding to the receptor, travel until they reach the nucleus where they later trigger the transcription of interferon-inducible genes.⁹

Finally, another group of proteins playing a pivotal role in the interferon signal transduction is composed by the interferon regulatory factors (IRFs). They compose a family of nine structurally related transcription factors whose functional roles, through self-interactions or interactions with other transcription factors, are recently becoming clearer.¹⁰ In particular, studies from gene knockout mice revealed an involvement in the regulation of host defence, such as innate and adaptive immune responses and oncogenesis.¹¹

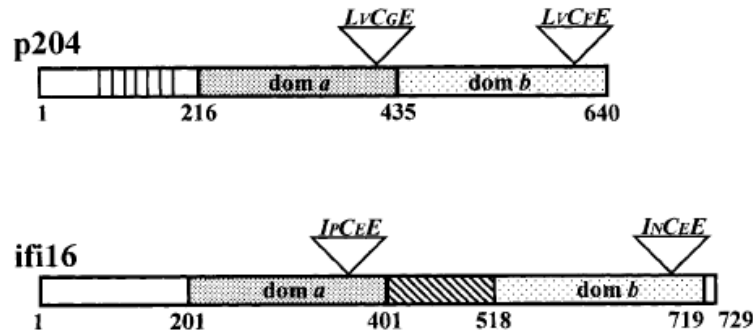


Fig. 2. Homology between murine p204 and human Ifi16 proteins. Triangles represent Retinoblastoma (pRb) binding motifs.

Interferon-inducible genes

The number of proteins that are induced by interferons and, therefore, that are transcribed starting from the STAT and/or IRF factors is constantly increasing, also depending on the introduction of new analysis methods, such as the microarray technology.

The best characterized of them are the 2'-5' oligoadenylate synthetase, the RNA-dependent protein kinase, or PKR, and the Mx proteins. Each of them has peculiar characteristics. For instance, the 2'-5' oligoadenylate synthetase system consists of a set of different enzymes whose ultimate effect is to break down the viral RNA.¹² The other interferon-inducible protein is the so-called PKR or RNA-dependent protein kinase. Once phosphorylated under the action of interferon or double-stranded RNA, this protein succeeds in triggering several changes within the cell, the outcome of which is, in this case, to inhibit the viral protein synthesis. This happens because of the sequestration of the transcription starting factors that are essential for the viral transcription to occur.¹³ As underlined for the 2'-5' oligoadenylate synthetase, besides having this antiviral action, the PKR has also been shown to have an antiproliferative effect and, in some cases, a tumour-suppressing action.¹⁴

Mx proteins are another group of proteins, conserved in different vertebrate species, whose functional characteristics are not well understood yet. They were originally characterized for their anti-viral activity in mouse¹⁵ and later in human. In particular, human MxA protein can partially inhibit the action of some viruses, in particular of orthomyxo- and paramyxoviruses.¹⁶

The interest of our laboratory is currently focused on a particular family of interferon-inducible genes, the murine Ifi200 and more

recently its human counterpart HIN200 gene family. The name stems from the fact that the nuclear phosphoproteins encoded by these genes contain one or two 200 amino acid domains, defined as *a* and *b*. This family is actually coded by a gene cluster docked on chromosome 1, in positions q21-22, both in mouse and in human. The four murine and three human homologous display almost the same characteristics: they are induced by interferon, lipopolysaccharides, DNA or RNA viruses and that they are expressed mostly in haematopoietic tissues. In particular, some of them are induced by interferon in the monocytic macrophage cell system.^{17,18}

Some recent results from our and from other research teams have also demonstrated that these proteins can control the cell cycle and, in particular, the overexpression of cultured cells. As a matter of fact, these cells have shown to be blocked at a precise cell cycle stage, i.e. before the start of DNA synthesis, between phase G1 and phase S.¹⁹

As a paradigm of the family, in Fig. 2 we schematically represent the more important members of this family: the murine protein p204 and its human counterpart Ifi16. They display both *a* and *b* domains and two particularly important sequences that concur to bind a protein that is key in controlling the cell cycle: the Retinoblastoma protein or pRb.²⁰

Recent experiments confirm that p204 is expressed in the haematopoietic tissue like the other proteins of the same family, but its peculiarity is that it is highly inducible in the monocyte and macrophage cell system, besides being expressed in activated endothelial cells and especially in microglial cells, hence in a particular cell population within the midbrain. Moreover, recent immunohistochemical analysis undertaken at our laboratory to check Ifi16 expression seem to

demonstrate that this protein is particularly expressed in the endothelial cells of arteries affected by atherosclerotic damage (De Andrea *et al.*, in preparation).

These data, taken together with studies showing an involvement of members of this family in the susceptibility to systemic lupus,^{21,22} prompt us to investigate in more detail the role of human Ifi16 in correlation with several diseases.

References

- Hoskins M. A protective action of neurotropic against viscerotropic yellow fever virus in *Macacus rhesus*. *Am J Trop Med Hyg* 1935; **15**: 675–680.
- Findlay GM, Mac Callum FO. An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses. *J Path Bact* 1937; **44**: 405–424.
- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc Roy Soc* 1957; **B147**: 258–267.
- Pestka S, Langer JA, Zoon KC, Samuel CE. Interferons and their actions. *Ann Rev Biochem* 1987; **56**: 727–777.
- DeMaeyer EM, DeMaeyer-Guignard J. *Interferons and Other Regulatory Cytokines*. New York: Wiley-Interscience, 1988.
- Landolfo S, Gribaudo G, Angeretti A, Gariglio M. Mechanisms of viral inhibition by interferons. *Pharmacol Ther* 1995; **65**: 415–422.
- Jonasch E, Haluska FG. Interferon in oncological practice: review of interferon biology, clinical applications, and toxicities. *The Oncologist* 2001; **6**: 34–55.
- Duhé RJ, Farrar WL. Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword. *J Interferon Cytokine Res* 1998; **18**: 1–15.
- Schindler C, Darnell JE. Transcriptional responses to polypeptide ligands: the Jak-Stat pathway. *Ann Rev Biochem* 1995; **64**: 621–651.
- Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Ann Rev Immunol* 2001; **19**: 623–655.
- Sato M, Taniguchi T, Tanaka N. The interferon system and interferon regulatory factor transcription factors – studies from gene knockout mice. *Cytokine Growth Factor Rev* 2001; **12**: 133–142.
- Silverman RH. 2-5A dependent RNaseL: a regulated endoribonuclease in the interferon system. In: *Ribonuclease: Structure and Functions*. D'Alessio G, Riordan JF (eds). New York: Academic Press, 1997: 515–551.
- Hovanessian AG. The double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferons: dsRNA-PK. *J Interferon Res* 1989; **9**: 641–647.
- Clemens KL, Elia A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Res* 1997; **17**: 503–524.
- Kolb E, Laine E, Strehler D, Staeheli P. Resistance to influenza virus infection of Mx transgenic mice expression Mx protein under the control of constitutive promoters. *J Virol* 1992; **66**: 1709–1716.
- Ponten A, Sick C, Weeber M, Haller O, Kochs G. Dominant-negative mutants of human MxA protein: domains in the carboxy-terminal moiety are important for oligomerization and antiviral activity. *J Virol* 1997; **71**: 2591–2599.
- Landolfo S, Gariglio M, Gribaudo G, Lembo D. The Ifi200 genes: an emerging family of IFN-inducible genes. *Biochemie* 1998; **80**: 721–728.
- Gariglio M, De Andrea M, Lembo M *et al.* The murine homolog of the HIN200 family, Ifi204, is constitutively expressed in myeloid cells and selectively induced in the monocyte/macrophage lineage. *J Leukocyte Biol* 1998; **64**: 608–614.
- Lembo M, Sacchi C, Zappador C *et al.* Inhibition of cell proliferation by the interferon-inducible 204 gene, a member of the Ifi200 cluster. *Oncogene* 1998; **16**: 1543–1551.
- Hertel L, Rolle S, De Andrea M *et al.* The retinoblastoma protein is an essential mediator that links the interferon-inducible 204 gene to cell cycle regulation. *Oncogene* 2000; **19**: 3598–3608.
- Seelig HP, Ehrfeld H, Renz M. Interferon-gamma-inducible protein p16. A new target of antinuclear antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1994; **37**: 1672–1683.
- Rozzo SJ, Allard JD, Choubey D, Vyse TJ, Izui S, Peltz G, Kotzin BL. Evidence for an interferon-inducible gene, Ifi202, in the susceptibility to systemic lupus. *Immunity* 2001; **15**: 435–443.

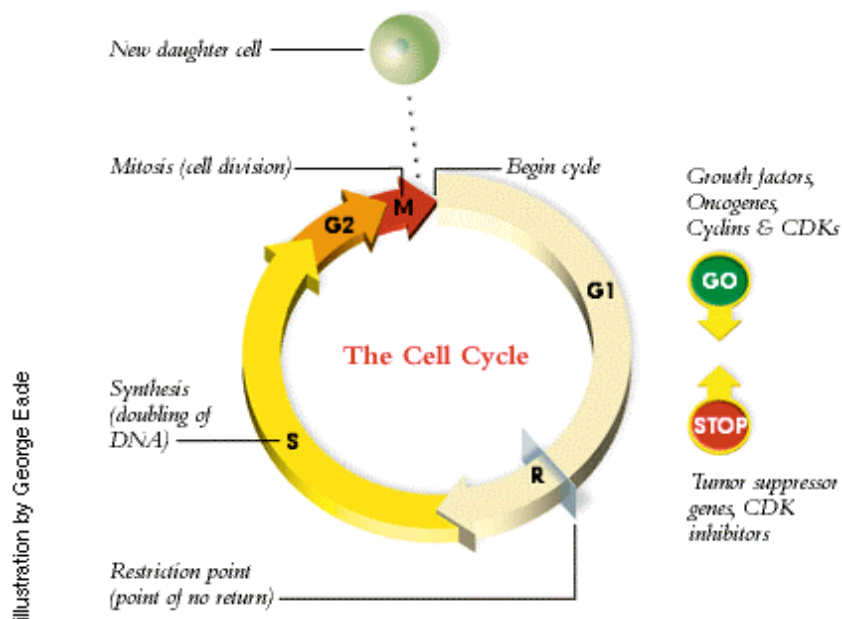
PARTE A

Il gene murino IFI204 e l'omologo umano IFI16

Una descrizione dettagliata sulle proprietà biologiche e l'organizzazione genomica delle famiglie di geni Interferon-inducibili murina e umana, argomento di questa tesi, sono state pubblicate sulla rivista italiana l' Igiene Moderna con il titolo **“Proprietà biologiche ed organizzazione genomica della famiglia di geni interferon-inducibile murina IFI200 e della controparte umana HIN200”**.

Contrariamente agli altri membri della famiglia Ifi200/HIN200, molte informazioni sono attualmente disponibili sulla proteina p204, la più complessa e completa tra le proteine murine appartenenti a questo gruppo, su cui abbiamo focalizzato la nostra attenzione in questi ultimi anni. Oltre infatti a possedere una copia del dominio *a* ed una del dominio *b*, la p204 è caratterizzata da un lungo segmento amino-terminale contenente una sequenza peculiare costituita da sette aminoacidi ripetuti sette volte, assente nella p202 e nella p203 ma presente in sole quattro ripetizioni nella D3. Anche la p204 è una fosfoproteina ma la sua concentrazione intracellulare viene aumentata dall'azione dell'IFN in modo decisamente più marcato rispetto alla p202, con un incremento di circa 50 volte dopo 24 ore di esposizione e di 75 volte dopo 48 ore (Choubey e al., 1992). I dati inerenti la sua localizzazione intracellulare sono ancora contrastanti, ma sembrano concordare nel situare la p204 sia nel nucleo che nel citoplasma di cellule non trattate e prevalentemente nel compartimento nucleolare di cellule stimolate con IFN. Molto interessanti sono invece i dati raccolti nel nostro laboratorio riguardanti la distribuzione della p204 *in vivo* nei tessuti di topi trattati o meno con IFN (Gariglio e al., 1998). Mentre la p202 è espressa in modo costitutivo ad alti livelli nel midollo osseo, linfonodi e milza e a livelli intermedi nel cuore, polmoni, fegato e reni, la p204

è pressoché assente in questi ultimi organi e risulta presente soltanto nei tessuti mieloidi e linfoidi. In cellule della linea mielomonocitaria (monociti, megacariociti e macrofagi) la p204 è espressa costitutivamente a bassi livelli, ma la sua concentrazione può venire aumentata in modo significativo in seguito a trattamento con IFN α o IFN γ . Questa particolare distribuzione tissutale così come la selettiva inducibilità di questa proteina, hanno indotto a ipotizzare che la p204 possa essere coinvolta in modo specifico nella maturazione e nel differenziamento di questa particolare linea cellulare. Come la p202, anche la p204 è coinvolta nella regolazione della crescita cellulare. La sua attività di potente inibitore della proliferazione è risultata infatti evidente nel fallimento del tentativo di produrre linee cellulari esprimenti questa proteina in modo stabile: alti livelli di p204 non possono venire tollerati dalla cellula. Anche la produzione di topi transgenici esprimenti in modo costitutivo il gene Ifi 204 in tutti i tessuti, ha permesso di trarre le medesime conclusioni, in quanto nessun animale vivo contenente una copia intatta del transgene è stato ottenuto. L'analisi di linee cellulari esprimenti questa proteina in modo



inducibile ha invece permesso di evidenziare il punto esatto del ciclo cellulare in cui la p204 esplica la sua attività inibitoria: la transizione dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare (Lembo e al., 1997).

L'intero processo replicativo di una cellula normale (composto dalle fasi G0, G1, S, G2, ed M) è altamente controllato mediante due tipi di meccanismi diversi: i cosiddetti punti di verifica (checkpoints) e il punto di restrizione (punto R). Durante i checkpoints la cellula si accerta che il suo stato metabolico sia in ordine, che il suo genoma sia intatto e che le tappe precedenti del ciclo siano state eseguite perfettamente: se l'esito è positivo, essa procede verso lo stadio successivo.

Mentre i punti di verifica sono molteplici, il punto di restrizione è unico e ha luogo durante la fase G1, che ne risulta divisa in fase G1 precoce e fase G1 tardiva. Il punto R è di fondamentale importanza poiché in questo momento la cellula verifica se i segnali ricevuti dall'ambiente esterno durante un periodo di tempo piuttosto lungo (i primi 2/3 della fase G1) sono nel complesso favorevoli alla crescita: se la risposta finale è positiva si avrà il passaggio attraverso il punto R e il proseguimento

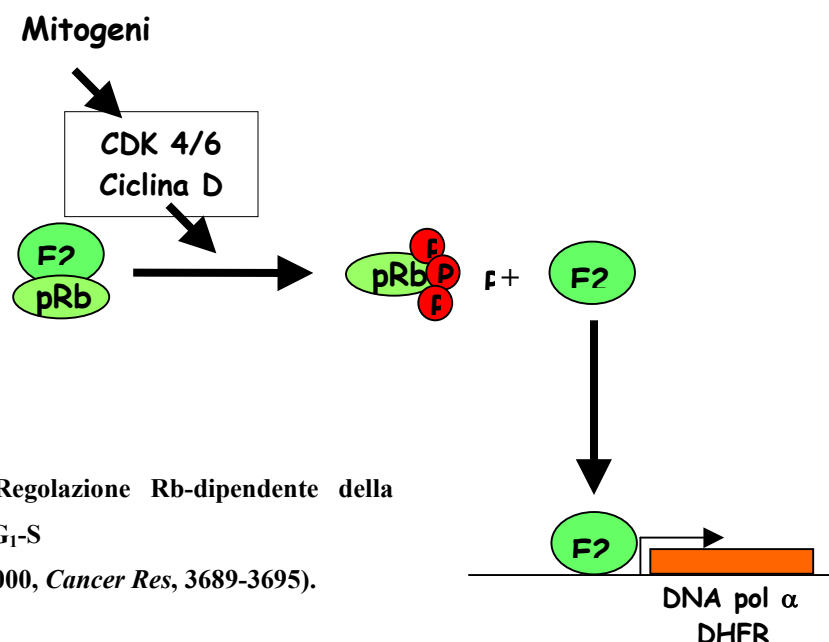


Figura 5. Regolazione Rb-dipendente della transizione G₁-S

(da Sherr, 2000, *Cancer Res*, 3689-3695).

lungo il ciclo duplicativo. Se la risposta è invece negativa, si avrà l'uscita dal ciclo e l'entrata in quiescenza seguita o meno dall'inizio del programma di differenziazione.

Un ruolo chiave nella regolazione del punto di restrizione è svolto dal prodotto del gene del retinoblastoma, pRb, che è in grado di impedire il passaggio della cellula attraverso il punto R sino a quando segnali appropriati non ne causano l'inattivazione permettendo quindi alla cellula di procedere nel ciclo. Il meccanismo molecolare che sta alla base della regolazione Rb-dipendente, come schematizzato nella figura 5, è il seguente: nel suo stato ipofosforilato pRb lega direttamente alcuni membri della famiglia dei fattori di trascrizione E2F (E2F1, E2F2 e E2F3) impedendo loro di attivare la trascrizione di numerosi geni i cui prodotti mediano la progressione del ciclo cellulare (ad es., gli enzimi coinvolti nella replicazione del DNA, come la DNA polimerasi α o la diidrofoloreduttasi, DHFR). Quando viene fosforilata, pRb non è più in grado di trattenere E2F la cui attività quindi non è più inibita. Dato il ruolo chiave svolto da pRb nel controllo del punto di restrizione, è evidente che qualunque fattore in grado di influenzarne l'attività sarà anche in grado di influire sull'intero processo replicativo della cellula, sebbene in modo indiretto. Così, la perdita della funzione di pRb mediante ad esempio delezione o mutazione di entrambi gli alleli del gene predispone all'insorgenza di tumori, mentre l'interazione con proteine modulatrici può potenziarne così come inibirne l'attività (Lundberg e al., 1999).

Come già detto in precedenza, quest'ultima è probabilmente una delle modalità attraverso cui la proteina p202 blocca la proliferazione cellulare. Poiché i) la proteina p204 inibisce la crescita cellulare rallentando il passaggio G1-S posto sotto il controllo di pRb (Hertel et al., 2000); ii) entrambi i domini di 200 aminoacidi (dominio *a* e *b*) sono necessari affinché la p204 possa arrestare la cellula al confine G1/S e inibire l'attività trascrizionale di E2F (Gribaudo e al., 1999); iii) entrambi i

domini contengono la sequenza aminoacidica LxCxE nota per essere un potenziale sito di legame per i membri della famiglia di pRb, era ragionevole quindi supporre che la p204 potesse esercitare la sua attività antiproliferativa attraverso il sistema di pRb. Per verificare questa ipotesi sono state prodotte tre forme mutanti della p204, mancanti di uno o entrambi i motivi LxCxE e in grado di agire come transdominanti negativi, e sono state utilizzate due linee di fibroblasti embrionali murini (MEF) provenienti da topi $Rb^{-/-}$ (in cui il gene codificante per pRb è stato geneticamente distrutto) o dalla loro controparte normale $Rb^{+/+}$. Questo approccio ci ha permesso di stabilire che solamente se entrambi i domini della p204 leganti Rb sono presenti e solamente se il sistema di Rb è integro, la p204 può arrestare la cellula in modo efficiente al confine G1/S. Questa funzione risulta invece alterata se uno o entrambi i motivi LxCxE sono mutati o deleti oppure se pRb è assente (come nei MEF- $Rb^{-/-}$) o alterata (come nelle due linee cellulari umane testate, C33A e Saos-2). Inoltre (Hertel, et al., 2000) è stata dimostrata mediante coimmunoprecipitazione e saggi di GST pull-down l'interazione diretta *in vivo* tra la p204 e tutti e i tre membri della famiglia delle cosiddette "pocket proteins": la p105/pRb, la p107 e la p130.

Successivamente, siamo andati a valutare la possibilità che la proteina p204 mutata in entrambi i siti di legame per pRb potesse acquisire capacità trasformante. Trasfettando in modo stabile un mutante con una delezione al terminale carbossilico e con una mutazione puntiforme nel primo motivo LxCxE in fibroblasti murini, abbiamo osservato l'insorgenza di tre caratteristiche tipiche dell'evento trasformante, vale a dire la crescita di numerose colonie su soft-agar, la capacità di crescere in diminuite concentrazioni di siero e di formare tumori in topi nudi. Inoltre, come riportato nel lavoro "**The interferon-inducible gene, Ifi204, acquires malignant transformation capability upon mutation at the Rb-binding sites**", *FEBS Letters*

515, 2002, l'attività telomerasica di queste cellule risultava notevolmente aumentata in confronto a cellule trasfettate con il vettore di controllo, dimostrando che la p204 incapace di legare pRb manifesta proprietà di tipo oncogenico.

L'attuale linea di ricerca è ora volta a stabilire in che modo avvenga il blocco della cellula in fase G1, se mediante l'inibizione della liberazione di E2F o tramite impedimento della fosforilazione di pRb.

Infine, tramite l'utilizzo del sistema del doppio ibrido, utilizzando come esca il dominio *b* di p204 e come bersaglio una libreria di cDNA derivanti da fibroblasti embrionali di topo, siamo andati a ricercare altri partner di interazione con la nostra proteina. Questo lavoro ha portato alla identificazione di un componente della membrana nucleare, la proteina Tpr, quale interattore specifico di p204. Tramite studi biochimici e di analisi in microscopia confocale, Tpr (dall'inglese *Translocated Promoter Region*) è stata recentemente identificata come una proteina di tipo filamentoso che attraversa tutto lo spessore della membrana nucleare e responsabile dello *shuttling* di varie proteine dal compartimento citoplasmatico a quello nucleare (Strambio-de-Castilla e al., 1999). In particolare essa sembrerebbe indirizzare le proteine importate verso la matrice nucleolare (Paddy, 1998). Considerata la localizzazione di p204 in seguito ad induzione con Interferone, ne consegue che l'interazione con Tpr sarebbe importante per la localizzazione di p204 nei sub-compartimenti nucleari (De Andrea, et al., 2002).

Poiché dati provenienti dall'analisi mediante Western blotting di estratti cellulari da linee umane (HeLa, HL-60, Saos-2), mediante l'utilizzo di anticorpo policlonale anti-p204, hanno fatto sospettare l'esistenza di un omologo umano della proteina, si è avviato un nuovo progetto di ricerca finalizzato al clonaggio di questo ipotetico cDNA mediante screening di una libreria a cDNA in vettore fagico generata a partire

da mRNA estratto da cellule HeLa. Il risultato di questo lavoro ha portato alla definitiva identificazione del gene IFI16 quale controparte umana di Ifi204.

Identificato originariamente nel corso di una ricerca volta ad identificare proteine antigeniche specifiche delle linee linfoidi umane (Dawson e al., 1995), il gene di IFI16 consiste di 10 esoni e 9 introni. Il prodotto genico contiene due segmenti aminoacidici parzialmente conservati, uno di tipo *a* e uno di tipo *b* e, a differenza di p202 e p204, in cui i domini sono contigui, in IFI16 essi sono separati da una sequenza di 116 aa (Trapani e al., 1992). L'esone 1 non è tradotto ma comprende sequenze che conferiscono inducibilità da parte degli IFN- α e γ (Trapani e al., 1994).

In esperimenti di western blotting condotti su cellule mieloidi con anticorpi anti-IFI16 si individuano tre specie proteiche con peso molecolare compreso tra 80 e 95 kDa, che corrispondono a tre isoforme (IFI16a, IFI16b e IFI16c), le quali differiscono nella regione spaziatrice tra i domini *a* e *b*. Esse derivano dallo splicing alternativo dell'mRNA che può contenere rispettivamente una, due o tre copie di un dominio altamente conservato di 56 aa (S/T/P costituito dalla ripetizione degli aminoacidi Serina/Treonina/Prolina) (Johnstone e al., 1998a), ma sembra che solo l'isoforma "b" sia quella realmente funzionante.

La proteina IFI16, analogamente alle altre proteine MNDA, p204, p203 e pD3, presenta all'estremità N-terminale una sequenza di consenso nucleare CcN. Tale sequenza può essere fosforilata in serina, consentendo di regolare la traslocazione nucleare della proteina (Briggs e al., 2001). Inoltre IFI16 contiene un dominio, sempre all'estremità N-terminale, in grado di legare il DNA, la cui presenza indica una possibile attività di fattore trascrizionale. Esso è stato sperimentalmente fuso con un dominio legante il DNA GAL4 ed è stata così dimostrata la funzione di repressore

trascrizionale (Johnstone e al., 1998b). Come p204, anche IFI16 contiene due siti canonici per il legame con pRb ed inoltre è stata dimostrata sperimentalmente la sua capacità di legare p53 (Johnstone e al., 2000).

Come per gli altri due membri umani della famiglia MNDA e AIM2, anche la localizzazione di IFI16 è sempre stata considerata ristretta alle cellule della linea ematopoietica (da cui l'acronimo HIN-200). In particolare, IFI16 risultava espressa nei precursori ematopoietici CD34+ e rimaneva fortemente espressa durante il differenziamento della linea linfoide e tra i precursori di monociti e monociti circolanti periferici (Dawson e al., 1995 e 1996), mentre non si ritrovava nei macrofagi maturi. Ciononostante, non esistevano studi pubblicati mirati a descriverne la localizzazione *in vivo* al di fuori del compartimento ematopoietico. Utilizzando anticorpi policlonali monospecifici generati nel nostro laboratorio contro la porzione C-terminale della proteina, se ne è così valutata la distribuzione tissutale mediante analisi immunohistochimica. IFI16 risulta espressa in maniera specifica nelle cellule endoteliali, nei linfociti e nelle cellule basali proliferanti degli epitelii. Soprattutto negli epitelii pavimentosi stratificati, come laringe, cervice e cute l'espressione di IFI16 è elevata nello strato basale proliferante, con una graduale riduzione che si accompagna al processo di differenziamento cellulare. Questi dati suggeriscono una stretta correlazione tra espressione di IFI16 ed il controllo dei processi di proliferazione e differenziamento *in vivo*. Infatti, con il processo di differenziamento e l'uscita definitiva dal ciclo cellulare di una cellula normale, l'espressione di questa proteina viene progressivamente inibita (Gariglio et al., 2002). E' noto che gli epitelii pavimentosi della cervice uterina, della laringe e della cute possono essere infettati con i papillomavirus, che infettano lo strato basale degli epitelii squamosi stratificati e replicano negli strati soprabasali. Questi virus mancano degli enzimi necessari per

replicarsi e quindi devono indurre l'entrata in fase S delle cellule normalmente quiescenti dello strato soprabasale per attivare il sistema enzimatico cellulare necessario per la replicazione del DNA virale. La capacità del virus di indurre la fase S nelle cellule soprabasali contribuisce alla manifestazione patologica del virus che varia da lesioni proliferative benigne come verruche e condilomi al carcinoma invasivo.

I nostri studi sono così ora indirizzati a chiarire dal punto di vista molecolare il ruolo della proteina IFI16 nella replicazione e trasformazione dei papillomavirus. Più in particolare stiamo ora esaminando lesioni proliferative della cute, come il cheratoacantoma, che possono presentarsi in varie fasi che vanno dalla lesione benigna con regressione spontanea, al carcinoma in situ fino all'epitelioma spinocellulare metastatizzante. La caratterizzazione di questi tipi di lesioni dal punto di vista istopatologico, sfruttando marcatori già esistenti in associazione all'espressione della proteina IFI16, potrebbe risultare molto utile nella difficile diagnosi differenziale tra lesione benigna in regressione e precancerosi o carcinoma in situ. Inoltre, l'indagine per la ricerca del genoma di HPV permetterà di chiarire il ruolo svolto da questi virus nella genesi e nell'evoluzione di queste lesioni.

Al fine di associare a queste osservazioni *in vivo* anche un modello *in vitro*, siamo attualmente impegnati nell'allestimento di colture primarie di cheratinociti umani ottenuti da prepuzio. Queste colture rappresentano infatti lo stesso tipo cellulare coinvolto nelle lesioni proliferative, verruche, cheratoacantomi, epitelomi, oltre ad essere il bersaglio dell'infezione da HPV. Sfruttando vettori virali ricombinanti (Retrovirus, Herpes) già prodotti che esprimono la proteina IFI16 e soprattutto permettono di trasdurre cellule primarie come i cheratinociti difficilmente trasfettabili con tecniche convenzionali, è stato allestito un modello di sovraespressione di IFI16

che permetterà di svolgere una serie di esperimenti volti a chiarire il ruolo di questa proteina nella normale fisiologia dei cheratinociti.

IL CITOMEGALOVIRUS

I Citomegalovirus (CMV) appartengono al sottogruppo beta della famiglia degli herpesvirus e sono caratterizzati da una stretta specie-specificità, indicativa di un lungo periodo di co-evoluzione con il proprio organismo ospite. Essi infettano comunemente molte specie di mammiferi, e nell'uomo l'infezione da CMV umano (HCMV) è molto diffusa (50-95% di sieroprevalenza). Benché l'infezione primaria sia generalmente ben controllata dal sistema immunitario e appaia quindi pressoché asintomatica, la completa eliminazione del virus non viene mai raggiunta. Il genoma virale infatti persiste in forma non produttiva in cellule specifiche dell'organismo ospite, e la sua replicazione è frequentemente riattivata dallo stato di latenza con conseguente rilascio di particelle virali. In individui il cui sistema immunitario è ancora immaturo o fortemente compromesso, tuttavia, l'HCMV è in grado di provocare danni irreversibili e spesso fatali. L'infezione intra-uterina può ad esempio dare origine a difetti congeniti, con frequenti anomalie a carico del sistema nervoso centrale. In pazienti affetti da AIDS (Sindrome da Immunodeficienza Acquisita), invece, l'HCMV è la causa principale di retiniti con conseguente cecità, mentre in pazienti artificialmente immunodepressi con farmaci anti-rigetto in seguito a trapianto d'organo il virus può provocare gravi infermità (polmoniti, epatiti, febbre prolungata) e determinare la perdita dell'organo trapiantato (Alford e al., 1993).

Dal punto di vista strutturale, i virus citomegalici sono caratterizzati dal possesso di un genoma a DNA bicatenario lineare di dimensioni notevoli (180-240.000 paia di basi) racchiuso in un capsido icosaedrico, a sua volta circondato da un tegumento e da una membrana lipoproteica. La loro moltiplicazione in vitro è piuttosto lenta se paragonata a quella di altri herpesvirus: al fine di ottenere il

rilascio di particelle virali mature sono infatti necessarie 24-36 ore per il CMV di topo (MCMV) e 48-72 ore per il CMV umano. Il ciclo replicativo avviene esclusivamente in un ristretto numero di tipi cellulari e per la propria espressione genica durante la crescita produttiva in cellule permissive il CMV dipende strettamente dall'apparato di trascrizione e traduzione della cellula ospite. La replicazione dei CMV è altamente regolata e dipende dall'espressione sequenziale di una serie di geni virali suddivisi, in base al momento post-infezione in cui avviene la loro sintesi, in tre classi: i geni immediati-precoci (IE, *immediate early* o a), i precoci (E, *early* o b) e i tardivi (L, *late* o g). I geni IE sono espressi in assenza di sintesi di proteine virali e i loro prodotti sono coinvolti nella regolazione della trascrizione positiva e negativa di molti geni sia virali che cellulari. La trascrizione dei geni precoci invece dipende dalla precedente espressione delle proteine IE ma non richiede la sintesi di DNA virale. La loro funzione è in gran parte ignota ma alcuni dei loro prodotti sono coinvolti nella replicazione e nel metabolismo del DNA. I geni tardivi sono espressi dopo i geni E e vengono raggruppati nelle due classi g1 e g2 a seconda che i loro prodotti vengano trascritti rispettivamente in scarsa quantità o non vengano trascritti del tutto quando la sintesi di DNA virale viene inibita. Si ritiene che la maggior parte codifichino per proteine strutturali (Mocarski, 1993).

Sia mediante l'espressione di questi geni, sia tramite le proteine contenute nel virione, il Citomegalovirus è in grado di alterare sensibilmente lo stato metabolico della cellula infettata. A differenza della maggior parte dei virus erpetici il CMV sia umano che murino non uccide immediatamente la cellula ospite e non inibisce i processi metabolici. Al contrario, la sintesi di RNA, DNA e proteine nella cellula ospite è fortemente stimolata, ed il pretrattamento della cellula con agenti che ne influenzano il metabolismo, come l'actinomicina D o i raggi UV, può provocare il rapido blocco della replicazione del virus. Fra le proteine la cui trascrizione o

attività è fortemente incrementata in seguito all'infezione da CMV vi sono alcuni proto-oncogeni (*c-myc*, *c-jun* e *c-fos*) (Boldogh e al., 1990), fattori di trascrizione (p53 e NF-kB) (Gribaudo e al., 1996; Jault e al., 1995) e diversi enzimi coinvolti nel metabolismo del DNA (timidina kinasi, la polimerasi α , l'ornitina decarbossilasi e la topoisomerasi II) (Hirai e al., 1976; Estes e al., 1977; Isom, 1979; Benson e al., 1990). Confrontando le modificazioni indotte dal CMV con quelle provocate da molti altri tipi di virus inoltre è possibile rilevare due interessanti differenze. Mentre infatti per molti virus (come gli Adenovirus e i Papovavirus) è necessario indurre l'ingresso forzato della cellula ospite in fase S al fine di ottenere la duplicazione del proprio DNA, il Citomegalovirus ha sviluppato la capacità di inibire fortemente la crescita delle cellule infettate. Tale inibizione deriva dal blocco del ciclo cellulare in stadi specifici, fra i quali la transizione G1/S, e avviene contemporaneamente alla stimolazione della sintesi di molteplici proteine cellulari coinvolte nel metabolismo del DNA (Salvant e al., 1998). Questa strategia permette al CMV di aumentare la disponibilità dei fattori cellulari e dei nucleotidi necessari alla replicazione del proprio DNA, annullando nel medesimo tempo la competizione da parte del genoma cellulare. La realizzazione di questo processo richiede la messa in atto di molteplici strategie di controllo dell'apparato di regolazione del ciclo cellulare, così come degli enzimi e di altri fattori proteici coinvolti nella biosintesi del DNA. Alcuni dei meccanismi utilizzati dai CMV sono già noti: lavori pubblicati durante gli ultimi sette anni, ad esempio, hanno elucidato il complesso rapporto tra i geni IE dell'HCMV e i membri della famiglia dei fattori di trascrizione E2F, che fungono da legame tra la proteina pRb (principale fattore di controllo del punto di restrizione e del passaggio della cellula dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare) e la trascrizione di numerosi geni coinvolti nella sintesi del DNA. È stato infatti dimostrato che la proteina IE1 è associata, nelle cellule infettate dal virus, alla

p107, un membro della famiglia delle "pocket proteins", cui appartiene non solo pRb ma anche la proteina p130 (Poma e al., 1996). In saggi in vitro inoltre IE1 si è rivelata dotata di attività chinasi nei confronti della p107, della p130 e dei tre fattori di trascrizione E2F-1, E2F-2 e E2F-3, ma le conseguenze funzionali della fosforilazione mediata da IE1 sono ancora ignote. IE2 invece è in grado di legare non solo pRb ma anche un altro potente regolatore del ciclo cellulare, la proteina p53 (Speir e al., 1994): anche in questo caso non è ancora stato compreso appieno quale sia il significato di tale legame, poichè le funzioni svolte dalla p53 nel checkpoint di controllo del danno al DNA non risultano alterate e l'attività antiapoptotica di IE2 non sembra essere mediata dalla p53. Lavori pubblicati molto di recente inoltre hanno evidenziato che non solo i geni immediati precoci dell'HCMV sono coinvolti nella regolazione della transizione G1/S delle cellule infette, ma anche alcune proteine contenute nel virione sembrano partecipare al processo. La trasfezione in transiente della proteina UL69, ad esempio, può arrestare la cellula in fase G1, mentre la sovraespressione di un altro componente del virione, il polipeptide pp71 causa un'accelerazione nella transizione dalla fase G1 alla fase S.

L'insieme di questi dati quindi dimostra che, al fine di ottimizzare la replicazione del proprio genoma, il virus ha usurpato una serie di attività associate al normale controllo del ciclo della cellula infetta, a scapito delle conseguenze per l'ospite. Il risultato netto di questa deregolazione è la perdita del controllo del processo di divisione cellulare e giustifica i sospetti di un coinvolgimento del CMV nello sviluppo di neoplasie. In lavori pubblicati nel passato, del resto, l'HCMV è stato associato alla genesi del carcinoma della prostata e della cervice, nonché dell'adenocarcinoma e del sarcoma di Kaposi (Spector e al., 1984).

Ifi204 e Citomegalovirus

Mentre appare ormai chiarito che la proteina codificata dal gene Ifi204 è dotata di una forte attività antiproliferativa e che quest'ultima è strettamente dipendente dalla presenza di una forma funzionale di pRb, poco o nulla è noto riguardo al ruolo svolto dai geni HIN-200 murini nell'induzione dello stato antivirale da parte degli IFN. La prospettiva di analizzare se la p204 fosse anche dotata di attività antivirali era quindi particolarmente interessante, soprattutto alla luce dei risultati ottenuti al riguardo della sua interazione con il sistema di Rb. Il ruolo prominente svolto da pRb nel controllo del punto R, infatti, ne ha fatto il bersaglio di molte strategie virali per guadagnare il controllo dell'apparato di duplicazione della cellula ospite. Così, al fine di provocare forzatamente il rilascio di E2F e la successiva espressione dei geni cellulari della fase S, utilizzati dai virus per la replicazione del proprio genoma, sia gli Adenovirus che i Papovavirus (per citare gli esempi più noti) hanno evoluto la capacità di esprimere proteine in grado di legare specificamente la forma ipofosforilata di pRb inattivandola.

A tal fine quindi i medesimi MEF Rb^{+/+} impiegati in precedenza per valutare il grado di interazione tra p204 e pRb, sono stati trasfettati stabilmente con i plasmidi recanti la forma selvatica di p204 o le sue forme mutate in uno od entrambi i siti LxCxE. La suscettibilità dei cloni, così ottenuti, all'infezione da parte di virus appartenenti a diverse famiglie (*Rhabdoviridae* - con il virus della stomatite vescicolare VSV-, *Picornaviridae* - con il virus dell'encefalomiocardite EMCV-, *Poxviridae* - con il virus Ectromelia-, *Alpha-* e *Betaherpesviridae* - con il virus dell'herpes simplex HSV-1 e il citomegalovirus murino MCMV) è stata quindi testata (Hertel et al.,1999). Nonostante la presenza delle forme mutate della p204 agenti come transdominanti negativi e inibenti quindi l'attività della proteina normale, tutti e tre i cloni si sono dimostrati pienamente sensibili all'attività

antivirale dell'IFN α quando infettati con i due virus ad RNA (EMCV e VSV) o con due dei tre virus a DNA (Ectromelia e HSV-1). Ciò indica quindi che la p204 non è coinvolta nei meccanismi antivirali indotti dall'IFN α . L'infezione dei medesimi cloni con MCMV ha invece evidenziato l'assoluta dipendenza del virus dalla presenza, durante l'infezione, di una forma funzionalmente attiva della p204: le linee cellulari mutate infatti non sono più in grado di sostenere la replicazione virale e la produzione di nuove particelle infettanti.

Il fatto che l'infezione produttiva da citomegalovirus provochi nella cellula ospite l'arresto della progressione nel ciclo e l'alterazione dell'attività di proteine coinvolte nella sua regolazione ci ha fatto supporre che il CMV abbia evoluto un sistema per utilizzare la p204 a proprio vantaggio, al fine di arrestare la crescita della cellula e di sfruttarne l'apparato replicativo per la duplicazione del proprio genoma. Tale ipotesi è stata suffragata dalle osservazioni presentate nel lavoro **“The Interferon-inducible 204 gene is transcriptionally activated by mouse cytomegalovirus and is required for its replication”**, *Virology*, 2001. Precedenti lavori avevano già dimostrato che il citomegalovirus umano, probabilmente attraverso il recettore cellulare per gB, è in grado di attivare l'espressione di due geni interferon-inducibili (Navarro e al., 1998; Boyle e al., 1999), senza però stabilire se tale induzione fosse necessaria per la replicazione del virus stesso. Questo nostro studio ha dimostrato invece per la prima volta che la famiglia di geni interferon-inducibili Ifi200, codificanti per proteine che regolano la progressione dalla fase G1 alla S del ciclo cellulare, sono stimulate da componenti virali durante le fasi precoci dell'infezione da CMV ed inoltre sono indispensabili per la sua replicazione. Inoltre, i risultati presentati dimostrano che l'infezione nella fase S di cellule in rapida divisione, in cui la p204 endogena è stata regolata negativamente dai dominanti-negativi, ritarda la progressione del ciclo vitale del

virus ed è associata con una significativa percentuale di cellule che procedono attraverso la fase S e G2/M.

Bibliografia

Alford CA, Britt WJ (1993) Cytomegalovirus. In: *The Human Herpesviruses*, Roizman B et al. (ed.), Raven Press, New York, 227-255.

Benson JD, Huang ES (1990) Human cytomegalovirus induces expression of cellular topoisomerase II. *J Virol* 64, 9-15.

Boldogh I, AbuBakar S, Albrecht T (1990) Activation of protooncogenes: an immediate early event in human cytomegalovirus infection. *Science* 247, 961-964.

Boyle KA, Pietropaolo RL, Compton T (1999) Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol Cell Biol* 19, 3607-13.

Briggs LJ, Johnstone RW, Elliot RM, Xiao CY, Dawson M, Trapani JA, Jans DA (2001) Novel properties of the protein kinase CK2-site-regulated nuclear-localization sequence of the interferon-induced nuclear factor IFI 16. *Biochem J* 353, 69-77.

Choubey D, Lengyel P (1992) Interferon action: nucleolar and nucleoplasmic localization of the interferon-inducible 72 kD protein that is encoded by the Ifi204 gene from the gene 200 cluster. *J Cell Biol* 116, 1333-1341.

Dawson MJ, Trapani JA (1995) IFI 16 gene encodes a nuclear protein whose expression is induced by interferons in human myeloid leukaemia cell lines. *J Cell Biochem* 57, 39-51.

Dawson MJ, Trapani JA (1996) HIN-200: a novel family of IFN-inducible nuclear proteins expressed in leukocytes. *J Leukoc Biol* 60, 310-316.

De Andrea., Zanetti C., Noris E., Gariglio M., Azzimonti B. and Landolfo S. (2002) The mouse interferon-inducible gene Ifi204 product interacts with the Tpr protein, a component of the nuclear pore complex. *J. Interferon Cytokine Res.* 22

Estes JE, Huang ES (1977) Stimulation of cellular thymidine kinase by human cytomegalovirus. *J Virol* 24, 13-21.

Gariglio M., De Andrea M., Lembo M., Ravotto M., Zappador C., Valente G. and Landolfo S. (1998) The murine homolog of the HIN200 family, Ifi 204, is constitutively expressed in myeloid cells and selectively induced in the monocyte/macrophage lineage", *J Leukoc Biol* 64.

Gariglio M., Azzimonti B., Pagano M., Palestro G., Valente G. Voglino G., Navino L. and Landolfo (2002) Immunohistochemical expression analysis of the human interferon-inducible gene IFI16, a member of the HIN200 family, not restricted to hematopoietic cells. *J Interferon Cytokine Res.* 22, 815-821.

Gribaudo G, Riera L, De Andrea M, Landolfo S (1999) The antiproliferative activity of the murine Interferon-inducible Ifi 200 proteins depends on the presence of two 200 aminoacids domains. *FEBS Lett* 456, 31-36.

Gribaudo G, Ravaglia S, Guandalini L, Cavallo R, Gariglio M, Landolfo S (1996) The murine cytomegalovirus immediate early protein 1 stimulates NF- κ B activity by transactivating the NF- κ B p105/p50 promoter. *Virus Res* 45, 15-27.

Hertel L., De Andrea M., Azzimonti B., Rolle A., Gariglio M., Landolfo S. (1999) The Interferon-inducible 204 gene, a member of the Ifi 200 family, is not involved in the antiviral state induction by IFN- α , but is required by the mouse cytomegalovirus for its replication. *Virology*, 262(1):1-8.

Hertel L., Rolle S., De Andrea M., Azzimanti B., Osello R., Gribaudo G., Gariglio M., Landolfo S. (2000): The retinoblastoma protein is an essential mediator that links the interferon-inducible 204 gene to cell-cycle regulation. *Oncogene*, 74, 4979 – 87.

Hirai K, Furukawa T, Plotkin SA (1976) Induction of DNA polymerase in WI-38 guinea pig cells infected with human cytomegalovirus (HCMV). *J Virol* 70, 251-255.

Isom HC (1979) Stimulation of ornithine decarboxylase by human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 42, 265-278.

Johnstone WR, Kerry JA, Trapani JA (1998b) The human interferon-inducible protein, IFI 16, is a repressor of transcription. *J Biol Chem* 273, 17172-17177.

Johnstone WR, Kershaw MH, Trapani JA (1998a) Isotypic variants of the interferon-inducible transcriptional repressor IFI16 arise through differential mRNA splicing. *Biochemistry* 37, 11924-11931.

Jault FM, Jault J, Ruchti F, Fortunato EA, Clark C, Corbeil J, Richman DD, Spector DH (1995) Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J Virol* 69, 6697-6704.

Johnstone WR, Wei W, Greenway A, Trapani JA (2000) Functional interaction between p53 and the interferon-inducible nucleoprotein IFI 16. *Oncogene* 19, 6033-6042.

Lembo M, Sacchi C, Zappador C, Bellomo G, Gaboli M, Pandolfi PP, Gariglio M, Landolfo S (1997) Inhibition of cell proliferation by the interferon-inducible 204 gene, a member of the Ifi 200 cluster. *Oncogene* 16, 1543-1551.

Lundberg AS, Weinberg RA (1999) Control of cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer* 35, 531-539.

Mocarski ES (1993) Cytomegalovirus biology and replication. In: *The Human Herpesviruses*, Roizman B et al. (ed.), Raven Press, New York, 173-225.

Navarro L, Mowen K, Rodems S, Weaver B, Reich N, Spector D, David M (1998) Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Mol Cell Biol* 18, 3796-802.

Paddy MR (1998) Nuclear structure '98. The Tpr protein: linking structure and function in the nuclear interior? *Am J Hum Genet* 63, 305-310.

Poma EE, Kowalik TF, Zhu L, Sinclair JH, Huang E-S (1996) The human cytomegalovirus IE1-72 protein interacts with the cellular p107 protein and relieves p107-mediated transcriptional repression of an E2F-responsive promoter. *J Virol* 70, 7867-7877.

Salvant BS, Fortunato EA, Spector DH (1998) Cell cycle disregulation by human cytomegalovirus: influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J Virol* 72, 3729-3741.

Spector DH, Spector SA (1984) The oncogenic potential of human cytomegalovirus. *Prog Med Virol* 29, 5-89.

Speir E, Modali R, Huang E-S, Leon MB, Shawl F, Finkel T, Epstein SE (1994) Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 265, 391-394.

Strambio-de-Castilla C, Blobel G, Rout MP (1999) Proteins connecting the nuclear pore complex with the nuclear interior. *J Cell Biol* 144, 839-855.

Trapani JA, Browne KA, Dawson MJ, Ramsay RG, Eddy RL, Shows TB, White PC, Dupont B (1992) A novel gene constitutively expressed in human lymphoid cells is inducible with interferon- γ in myeloid cells. *Immunogenetics* 36, 369-376.

Trapani JA, Dawson MJ, Apostolidis VA, Browne KA (1994) Genomic organization of Ifi16, an interferon-inducible gene whose expression is associated with human myeloid cell differentiation: correlation of predicted protei domains with exon organization. *Immunogenetics* 40, 415-424.

UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE "A. AVOGADRO" - NOVARA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

* UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO
DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA E DI MICROBIOLOGIA

**PROPRIETÀ BIOLOGICHE ED
ORGANIZZAZIONE GENOMICA DELLA
FAMIGLIA DI GENI INTERFERON-INDUCIBILE
MURINA IFI200 E DELLA CONTROPARTE
UMANA HIN200**

**De Andrea M.*
Noris E.***

**Gioia D.
Landolfo S.***

**Azzimonti B.
Gariglio M.**

Key words: Interferon - HIN200 - Ifi200 - Interferon-inducibile.

SUMMARY – «Biological properties and genomic organization of the family of Interferon-inducible murine Ifi 200 and its human counterpart HIN200».

Interferons (IFN) are cytokines that upon binding to specific membrane receptors can modulate many biological activities, such as antiviral, immunomodulatory and growth regulatory. They can specifically induce the expression of several endogenous proteins designated as IFN-induced proteins. Among the proteins positively regulated by type I (α and β) and type II (γ) IFNs, there is the murine Ifi200 family and its human counterpart HIN200, both localised on chromosome 1. Recent studies demonstrated that these

Indirizzo/Postal Address: *Prof.ssa M. Gariglio* - Dipartimento di Scienze Mediche - Università del Piemonte Orientale "A. Avogadro" - Via Solarofi, 17 - 28100 Novara - Tel. 0321-660649 - Fax 0321-620421 - E-mail: gariglio@med.unipmn.it

proteins are involved in cell cycle regulation and differentiation both *in vitro* and *in vivo*. Here, we report on their principal properties, showing the genomic organization of both the murine and human loci.

RIASSUNTO – Gli Interferoni (IFN) sono citochine che in seguito al legame con specifici recettori di membrana sono in grado di modulare diverse attività cellulari (antivirale, immunomodulatoria e di controllo della proliferazione cellulare) inducendo specificamente l'espressione o l'attivazione di proteine endogene. La scarsità di informazioni sui meccanismi molecolari coinvolti nella modulazione dei geni IFN-inducibili ha reso fino ad oggi difficile un uso terapeutico ottimale degli IFN. La famiglia di geni murina Ifi200 e la sua controparte umana HIN200 (dall'inglese: *hematopoietic interferon-inducible nuclear proteins with a 200-amino-acid repeat*), localizzate sul cromosoma 1, comprendono proteine positivamente regolate da Interferoni sia di tipo I (α e β) e II (γ) e sono direttamente coinvolte nella modulazione della proliferazione e della differenziazione cellulare sia *in vitro* che *in vivo*. L'obiettivo di quest'articolo è la presentazione delle principali caratteristiche delle due famiglie, con particolare riferimento all'organizzazione genomica dei loci murino ed umano.

Ifi200/HIN200: caratteristiche generali

I geni presenti nel locus murino ed umano sono localizzati sul cromosoma 1, in posizione q21-22. Essi codificano per proteine con sequenza aminoacidica primaria e caratteristiche biologiche simili: nel topo Ifi202, Ifi203, Ifi204 e D3 (14) e nell'uomo Ifi16, MNDA (dall'inglese *Myeloid Nuclear Differentiation Antigen*) e AIM-2 (*Absent In Melanoma*). Presentano come motivo strutturale ripetuto un dominio di 200 aminoacidi (da cui il nome della famiglia), presente in singola o duplice copia (Figura 1). I domini sono due (definiti *a* e *b*) contigui in p202 e p204, e separati da una regione spaziatrice ricca di serine-treonine e proline (*S/T/P rich region*) in Ifi16. La regione spaziatrice è sotto il controllo di uno splicing alternativo dell'RNA messaggero e, di conseguenza, può contenere una, due o tre copie del dominio S/T/P altamente conservato e codificato da esoni distinti, dando origine a tre proteine differenti denominate Ifi16 -A, -B e -C. Tutti gli altri membri della famiglia umana possiedono un solo dominio. La composizione aminoacidica sia del dominio *a* che *b* è altamente conservata tra i vari membri della famiglia. Al contrario, l'omologia tra il dominio *a* ed il dominio *b* della stessa o di diverse proteine della famiglia è sempre piuttosto bassa. Sommando le analisi di omologia con la localizzazione relativa sul cromosoma (vedi dopo), è ipotizzabile la duplicazione di

un gene primordiale codificante il segmento ancestrale di 200 aminoacidi da cui è derivato il secondo dominio. La regione ripetuta di 200 aminoacidi è tipica di questa famiglia di geni e non contiene alcun motivo funzionale riconducibile a quelli noti. Esistono comunque delle ripetizioni di aminoacidi, come la sequenza MFHATVAT, presenti nei domini *a* e *b* di tutti i membri della famiglia, la cui conservazione nel corso dell'evoluzione sembrerebbe indicarne una qualche importanza funzionale o strutturale.

Oltre al dominio peculiare di 200 aminoacidi, tutti i membri della famiglia esclusa la p202 presentano un'alta omologia nella struttura primaria della regione amino-terminale, con la conservazione di residui di leucina che, almeno per Ifi16 e MNDA, sembrerebbero coinvolti in processi di omodimerizzazione e di formazione di regioni "leucin-zipper" imperfette.

I membri della famiglia murina Ifi200

La proteina codificata dal gene Ifi204, denominata p204, con peso molecolare di 72kDa, viene sintetizzata in seguito all'induzione con IFN sia di tipo I che II, in varie linee cellulari murine con l'esclusione di quelle derivate dal ceppo C57BL/6 (7). La proteina p204 presenta numerosi siti di fosforilazione per varie protein-chinasi e viene fosforilata *in vivo*, come dimostrato tramite esperimenti di immunoprecipitazione in cellule AKR-2B marcate con ³²P. La regione N-terminale della p204 contiene un dominio peculiare costituito da 7 aminoacidi ripetuti 7 volte, non ancora associato a particolari funzioni. Nella regione C-terminale di ciascun dominio di 200 aminoacidi è presente una sequenza LxCxE responsabile del legame con il prodotto del gene del Retinoblastoma (pRb). L'espressione transiente della p204 inibisce la crescita cellulare ritardando la progressione nella fase di sintesi e modulando in senso negativo l'attività trascrizionale mediata da E2F (13). L'attività antiproliferativa della p204 è strettamente dipendente dall'interazione con la proteina di Retinoblastoma (pRb), che svolge una funzione fondamentale nel controllo del ciclo cellulare, con particolare riferimento al passaggio dalla fase G1 alla fase S. Utilizzando cDNA di Ifi204 mutati in uno od entrambi i siti LxCxE, abbiamo dimostrato che la presenza di questi siti è in effetti essenziale per l'attività antiproliferativa di p204. Inoltre, esperimenti di trasfezione transiente in fibroblasti embrionali derivati da topi knockout per pRb (Rb-/-

MEF), ed anche in linee cellulari con una pRb inattiva, hanno dimostrato che la mancata interazione diretta tra le due proteine (p204 e pRb) elimina completamente l'attività antiproliferativa della p204. Possiamo quindi concludere che la p204 interviene nella regolazione dell'attività antiproliferativa mediata dagli IFN, il cui bersaglio principale per il blocco della replicazione del DNA dalla fase G1 è rappresentato dal sistema Rb (12).

Il gene 204 non sembra essere coinvolto nell'induzione dello stato antivirale dopo stimolazione con Interferone ma al contrario è necessario per la replicazione di virus a DNA come il citomegalovirus, strettamente dipendenti dalla cellula ospite per la loro replicazione. L'inattivazione di p204 endogena attraverso la trasfezione del mutante, p204dm, determina una deregolazione del ciclo cellulare rendendo le cellule resistenti alla replicazione del citomegalovirus (11). Questi dati suggeriscono che il citomegalovirus induce direttamente l'espressione di p204 per regolare il ciclo cellulare con arresto in fase G1/S necessario per l'espressione dei geni virali immediati precoci e per il sequestro di proteine cellulari indispensabili alla replicazione virale completa. Come dimostrato da esperimenti di Western blotting e di Northern blotting il gene Ifi204 è attivato trascrizionalmente nelle primissime fasi dell'infezione da citomegalovirus. L'induzione di p204 determina quindi un blocco delle cellule in fase G1 in modo da modificare l'attività metabolica cellulare a favore della sintesi del DNA e della replicazione del virus stesso. In assenza dell'espressione fisiologica di p204, l'espressione dei geni immediati precoci (IE) e precoci (E), la sintesi del DNA virale e la comparsa dell'effetto citopatico dopo infezione con citomegalovirus risultano notevolmente ritardati (15).

Esperimenti di immunostochimica su organi di topo hanno dimostrato una localizzazione specifica della p204 nelle cellule della linea mielomonocitica, con induzione dopo inoculazione per via intraperitoneale di poli rI: rC nei macrofagi peritoneali (8). Questa peculiare distribuzione tissutale permette di ipotizzare un potenziale coinvolgimento della p204 nella differenziazione e maturazione della linea mielomonocitaria.

La generazione di topi knockout (KO) per p204, geneticamente modificati in modo da non esprimere la proteina, potrà chiarire definitivamente il ruolo fisiologico della p204 stessa.

La proteina p202 (52kDa), codificata dal gene Ifi202, è stata la prima proteina della famiglia identificata e clonata. La p202 viene indotta sia *in vivo* che *in vitro*, oltre che dagli IFN, anche da LPS e

poli rI:rc (8), ed è presente, come p204, in forma fosforilata. Come conseguenza della stimolazione, la proteina fosforilata si accumula nel citoplasma per poi passare, dopo 24h, nel nucleo (2). È stato dimostrato che la p202 è in grado di legare i complessi E2F-1/DP1 e E2F-4/DP1 (3), inibendo la trascrizione normalmente indotta da questi fattori. Interagisce anche con l'omologo murino della p53BP1 umana, inibendo l'espressione dei geni normalmente regolati dalla p53 (4).

La proteina p203, costituita da 408 aminoacidi, è tradotta a partire da un cDNA di 3.8kb isolato recentemente nel nostro laboratorio (9). Contiene un unico dominio di tipo *b*, omologo al 75% con quello della p204, ma la sua localizzazione intracellulare e la funzione non sono ancora state chiarite.

La proteina D3 possiede invece un unico dominio di tipo *a*. In realtà questo polipeptide di 425 aminoacidi, isolato da una libreria di cDNA di macrofagi peritoneali murini indotti con LPS (15), presenta anche una regione N-terminale altamente omologa a quella della p204, che si differenzia soltanto per la presenza di 5 ripetizioni di 7 aminoacidi, contro le 7 della p204 (Figura 1). Anticorpi diretti contro la porzione N-terminale di p204 sono infatti in grado di riconoscere D3 in esperimenti di Western blotting.

Esperimenti di trasfezione con l'impiego di proteine chimeriche e di mutanti delezionali della p203, hanno dimostrato che l'attività antiproliferativa delle proteine della famiglia Ifi200 è strettamente dipendente dalla presenza di entrambi i domini *a* e *b*. In accordo con questi dati la p203 e D3 non possiedono attività antiproliferativa (10).

I membri della famiglia umana HIN200

La porzione codificante il gene Ifi16 umano fu inizialmente mappata sul cromosoma 1 in posizione q12-qter tramite ibridazione su un pannello di cellule ibride uomo-topo (16). Il cDNA corrispondente, isolato da una libreria di espressione ottenuta da linfociti T citotossici umani con l'impiego di un antisiero di coniglio diretto contro i granuli citolitici delle stesse cellule, era in grado di riconoscere un unico mRNA di 2.7kb espresso esclusivamente in cellule della linea emopoietica. Lavori più recenti hanno ristretto la localizzazione cromosomica alla regione omologa a quella murina (1q21-22) e soprattutto hanno chiarito alcune caratteristiche della proteina codificata. Ifi16 contiene entrambi i domini caratteristici

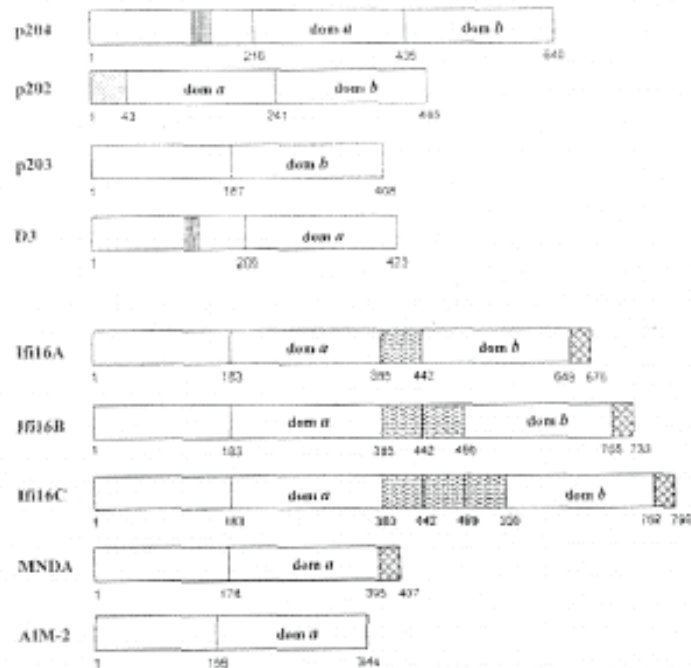


Figura 1 - Rappresentazione schematica della struttura delle proteine codificate dai geni murini della famiglia Ifi200 (p204, p202, p203 e D3) e dagli omologhi umani Ifi16, MND4 e AIM2. Sono riportati il dominio conservato di 200 aminoacidi (segmenti di tipo *a* e *b*) e gli altri motivi caratteristici.

della famiglia, *a* e *b*, oltre ad almeno un dominio spaziatore, per un totale di 729 aminoacidi. La porzione N-terminale mostra un'alta omologia con quella della p204 e anche Ifi16 contiene due motivi per il legame con il prodotto del gene di Retinoblastoma (vedi Figura 2). Nelle linee cellulari della serie mieloide, come HL-60 e U937, l'mRNA risulta fortemente inducibile da IFN γ , acido retinoico e dimetilsolfossido. Analisi in immunofluorescenza hanno evidenziato una localizzazione della proteina nel nucleo di monociti e linfociti di sangue periferico normale. La presenza di Ifi16 nei nucleoli e nel nucleoplasma delle cellule mononucleate e non nei granulociti, suggerisce una funzione ristretta a cellule aventi nucleoli, cioè non terminalmente differenziate (5).

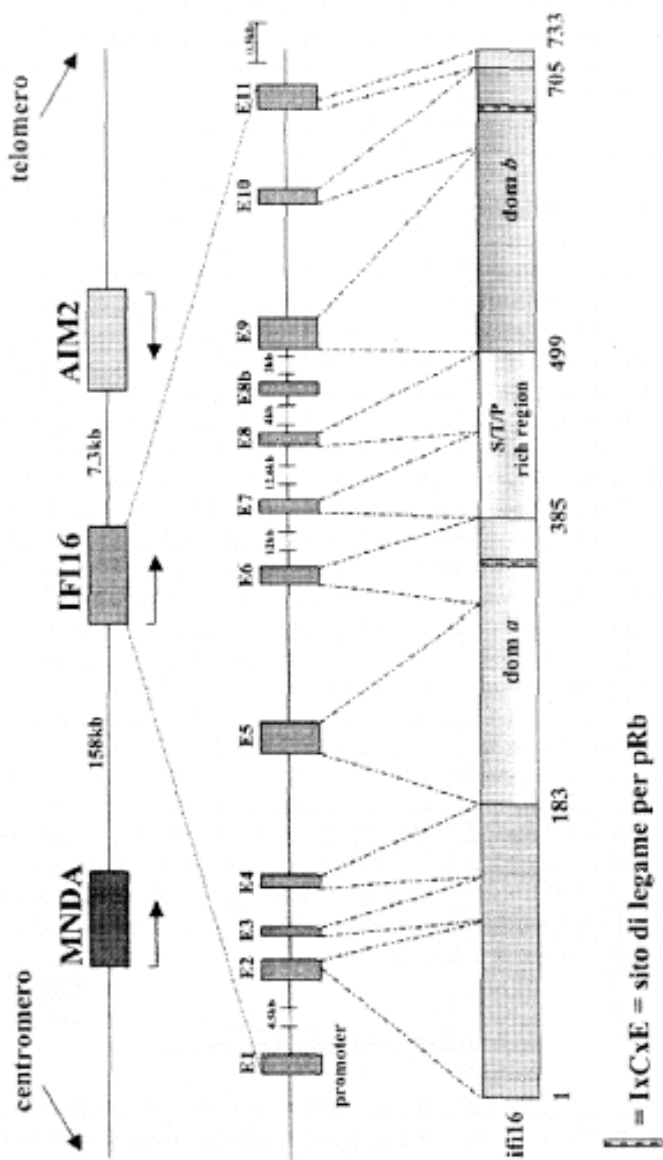


Figura 2 - Organizzazione genomica del locus umano HIN200. Le frecce riportate sotto ogni gene indicano la direzione della trascrizione.

Nel nostro laboratorio sono in corso di svolgimento analisi in immunostochimica su sezione paraffinate di tessuti umani normali e neoplastici, per valutare l'espressione di Ifi16 *in vivo*. Risultati preliminari evidenziano una localizzazione di Ifi16 a livello degli endoteli attivati e di cellule in attiva proliferazione, soprattutto in alcuni tessuti tumorali o comunque soggetti ad infezioni di tipo virale, oltre che confermare la sua presenza in cellule della linea mieloide. In passato, la presenza di tre differenti bande in esperimenti di western blotting sembrava suggerire l'esistenza di forme diversamente fosforilate. Oggi sappiamo che la differenza è invece dovuta ad una regione spaziatrice più o meno lunga tra i due domini di 200 aminoacidi e codificata da tre diversi esoni (Figura 2). Nel complesso, i lavori già pubblicati dal nostro laboratorio e da altri autori sembrano ormai confermare che Ifi16 sia la controparte umana della p204 murina.

MNDA, che codifica per una proteina di 403 aminoacidi omologa al 40% con la p203, è stato il primo cDNA umano dotato di una certa omologia alla famiglia murina ad essere individuato (1). L'mRNA corrispondente, di circa 1,8 kb, è stato osservato sia in monociti che in granulociti, ma la sua induzione da IFN α era osservabile solo in monociti nonché in linee cellulari quali HL-60 e U937. MNDA interagisce con la nucleolina, una proteina probabilmente coinvolta nella trasduzione del segnale e nella regolazione trascrizionale, e sembra in grado di formare omodimeri (17). Questi dati ne suggeriscono un qualche coinvolgimento nel processo differenziativo ma, fino ad ora, questa ipotesi non è stata suffragata da alcuna dimostrazione sperimentale. Infine, studi mirati all'isolamento di cDNA specificamente espressi in una linea cellulare di melanoma con soppressione cromosomica, hanno permesso di isolare un altro membro della famiglia HIN200, denominato AIM2 (6). Esso codifica per una proteina di 344 aminoacidi, con forte omologia verso Ifi16 e p204. L'mRNA corrispondente è costitutivamente espresso nella milza, nell'intestino e in leucociti di sangue periferico, ed indotto da IFN γ nelle HL-60.

Organizzazione genomica

I notevoli mezzi impiegati nell'ambito del cosiddetto Progetto Genoma Umano, volto alla comprensione del nostro patrimonio genetico, hanno permesso di chiarire esattamente la localizzazione cromosomica e la posizione reciproca, tra gli altri, dei geni appartenenti

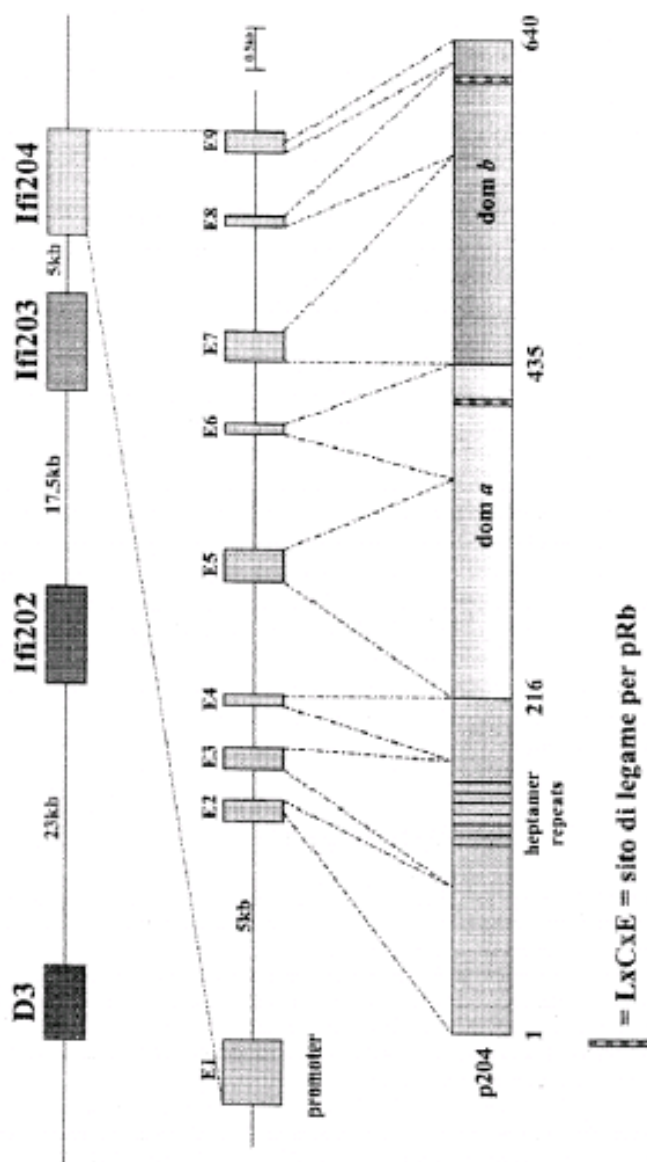


Figura 3 - Organizzazione genomica del locus murino Ifi200.

alla famiglia HIN200. I tre geni formano un *locus*, mappato in modo preciso in posizione 1q22 cioè nella regione subito a valle di quella comprendente il gene per la spettina alfa, con MNDA in posizione prossimale rispetto al centromero e AIM2 più distale (Figura 2). Come anticipato precedentemente, la proteina codificata da Ifi16 è sotto il controllo di uno splicing alternativo. In particolare, la forma di 733 aminoacidi funzionalmente attiva, definita Ifi16B, è codificata da 11 esoni, di cui il 7 ed l'8 codificano per la regione spaziatrice ricca di serine e treonine. Se l'esone 8 non viene trascritto, si ha la forma definita Ifi16A (673aa), mentre se viene trascritto un esone supplementare omologo all'8, e per questo chiamato 8b, la proteina prodotta è la Ifi16C (785aa).

Per il *locus* murino la situazione non è così chiara, ma le recenti acquisizioni ottenute dal sequenziamento di materiale genomico nonché l'utilizzo ed il confronto di banche dati informatiche ci hanno permesso di mappare con più precisione la posizione relativa dei 4 geni murini. Come rappresentato nella Figura 3, anche questi geni sono organizzati a formare un *cluster* in posizione 1q21-22, ed anche in questo caso vicino alla regione codificante per la spettina alfa. Prendendo in considerazione la posizione relativa dei due *loci* e la disposizione dei differenti geni all'interno del rispettivo *locus* appare chiara la derivazione comune da un unico gene ancestrale, con conseguente duplicazione. Il risultato è l'espressione di proteine strutturalmente simili, alcune delle quali funzionalmente attive, come p204 e Ifi16, ed altre prive di ruoli fisiologicamente importanti.

Bibliografia

- 1) *Burrus G.R., Briggs J.A., Briggs R.C.* (1992): Characterization of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen: relationship to interferon-inducible proteins. *J. Cell. Biochem.*, 48, 190-202.
- 2) *Choubey D., Lengyel P.* (1993): Interferon action: cytoplasmic and nuclear localization of the interferon-inducible 52-kD protein that is encoded by the Ifi 202 gene from the gene 200 cluster. *J. Interferon Res.*, 13, 43-52.
- 3) *Choubey D., Guterman J.U.* (1997): Inhibition of E2F-4/DP-1-stimulated transcription by p202. *Oncogene*, 15, 291-301.
- 4) *Datta B., Li B., Choubey D., Nallur G., Lengyel P.* (1996): p202, an interferon-inducible modulator of transcription, inhibits transcriptional activation by the p53 tumor suppressor protein, and a segment from the p53-binding protein 1 that binds to p202 overcomes this inhibition. *J. Biol. Chem.*, 271, 27544-27555.
- 5) *Dawson M.J., Trapani J.A.* (1995) The interferon-inducible autoantigen, Ifi 16: lo-

- calization to the nucleolus and identification of a DNA-binding domain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 152-162.
- 6) DeYoung K.L., Ray M.E., Siu Y.A., Anzick S.L., Johnstone R.W., Trapani J.A., Meltzer P.S., Trent J.M. (1997): Cloning a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma. *Oncogene*, **15**, 453-457.
 - 7) Gariglio M., Panico S., Cavallo G., Choubey D., Lengyel P., Landolfo S. (1992): Impaired transcription of the poly rI:C- and interferon-activatable 202 gene in mice and cell lines from the C57BL/6 strain. *Virology*, **187**, 115-123.
 - 8) Gariglio M., De Andrea M., Lembo M., Ravotto M., Zappador C., Valente G. and Landolfo S. (1998): The murine homolog of the HIN200 family, I6i 204, is constitutively expressed in myeloid cells and selectively induced in the monocyte/macrophage lineage. *J. Leuk. Biol.*, **64**, 608-614.
 - 9) Gribaudo G., Ravaglia S., Guandalini L., Riera L., Gariglio M., Landolfo S. (1997): Molecular cloning and expression of a novel interferon-inducible protein encoded by a 203 gene from the gene 200 cluster. *Eur. J. Biochem.*, **249**, 258-264.
 - 10) Gribaudo G., Riera L., De Andrea M. and Landolfo S. (1999): The antiproliferative activity of the murine interferon-inducible I6i 200 proteins depends on the presence of two 200 amino acid domains. *FEBS Lett.*, **456**, 31-36.
 - 11) Hertel L., De Andrea M., Azzimonti B., Rolle S., Gariglio M. and Landolfo S. (1999): The interferon-inducible 204 gene, a member of the I6i 200 family, is not involved in the antiviral state induction by IFN-alpha, but is required by the mouse cytomegalovirus for its replication. *Virology*, **262**, 1-8.
 - 12) Hertel L., Rolle S., De Andrea M., Azzimonti B., Osello R., Gribaudo G., Gariglio M., Landolfo S. (2000): The retinoblastoma protein is an essential mediator that links the interferon-inducible 204 gene to cell-cycle regulation. *Oncogene*, **74**, 4979-4987.
 - 13) Lembo M., Sacchi C., Zappador C., Bellomo G., Gaboli M., Pandolfi P.P., Gariglio M. and Landolfo S. (1998): Inhibition of cell proliferation by the interferon-inducible 204 gene, a member of the I6i 200 cluster. *Oncogene*, **16**, 1543-1551.
 - 14) Lengyel P., Choubey D., Li S.J., Datta B. (1995): The interferon-activatable gene 200 cluster: from structure toward function. *Sem. Virology*, **6**, 203-215.
 - 15) Rolle S., De Andrea M., Gioia D., Lembo D., Hertel L., Landolfo S. and Gariglio M. (2001): The interferon-inducible 204 gene is transcriptionally activated by mouse cytomegalovirus and is required for its replication. *Virology*, **287**, in corso di stampa.
 - 16) Tannenbaum C.S., Major J., Ohmori Y., Hamilton T.A. (1993): A lipopolysaccharide-inducible macrophage gene (D3) is a new member of an interferon-inducible gene cluster and is selectively expressed in mononuclear phagocytes. *J. Leuk. Biol.*, **53**, 563-568.
 - 17) Trapani J.A., Browne K.A., Dawson M.J., Ramsay R.G., Eddy R.L., Shows T.B., White P.C., Dupont B. (1992): A novel gene constitutively expressed in human lymphoid cells is inducible with interferon-gamma in myeloid cells. *Immunogen.*, **36**, 369-376.
 - 18) Xie J., Briggs J.A., Briggs R.C. (1997): MND4 dimerizes through a complex motif involving an N-terminal basic region. *FEBS Lett.*, **408**, 151-150.

The interferon-inducible gene, *Ifi204*, acquires malignant transformation capability upon mutation at the Rb-binding sites

Marco De Andrea^a, Monica Ravotto^a, Emanuela Noris^a, Guo-Guang Ying^a, Daniela Gioia^b, Barbara Azzimonti^b, Marisa Gariglio^b, Santo Landolfo^{a,c,*}

^aDepartment of Public Health and Microbiology, Medical School, Via Santena 9, 10126 Turin, Italy

^bDepartment of Medical Sciences, Medical School, Via Sokalovi 17, 28100 Novara, Italy

^cImmunogenetics and Experimental Oncology Section, C.N.R., 10126 Turin, Italy

Received 5 November 2001; revised 15 January 2002; accepted 5 February 2002

First published online 26 February 2002

Edited by Masayuki Miyasaka

Abstract p204 overexpression in retinoblastoma (Rb)-/- mouse embryo fibroblasts or transfection of p204 mutated at both Rb-binding sites confer growth advantages, resulting in a significantly higher number of foci in a cell focus assay. To investigate the possibility that mutated p204 acquires malignant transformation capability, NIH3T3 cells were stably transfected with the expression vector pRcRSV204 double-mutant (p204dm) harboring both the C-terminal deletion up to amino acid 568 and the point mutation from glutamic acid to lysine at position 427, and analyzed for markers typical of cell immortalization and transformation. We detected a greater abundance of cell colonies in soft agar with p204dm-expressing cells than vector control cells. The p204dm-transfected cells also displayed two other characteristics associated with malignant transformation, i.e. growth under low-serum conditions and formation of tumors in athymic nude mice. Moreover, their telomerase activity was significantly higher than in the vector control cells. It would thus seem that p204, devoid of functional Rb-binding motifs, can become oncogenic. © 2002 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Key words: Interferon-inducible gene; *Ifi204*; Retinoblastoma; Oncogenic activity; p204 mutant

1. Introduction

To exert their antiproliferative activity, interferons (IFNs) activate a family of transcription factors designated signal transducers and activators of transcription and interferon regulatory factors, respectively, that translocate into the nucleus and stimulate the expression of the IFN-stimulatable genes [22,23]. One of the first downstream targets was identified as the *c-myc* gene since its mRNA expression in hematopoietic cells was suppressed at the transcriptional level by IFN- α [6]. Moreover, its disruption by ectopic expression of deregulated *c-myc* partially suppressed the ability of IFN- α to arrest cells specifically in the G0/G1 phase [14]. The pRb protein was then identified as another independent target of the IFN- α signaling capable to complement the partial cell cycle arrest

mediated by *c-myc* inhibition through the suppression of its phosphorylation [20]. The cyclin D3 and *cdc25A* genes have since been shown to be primary targets of the IFN- α signaling cascade. Suppression of *cdc25A* phosphatase is indeed the main pathway for inhibition of cyclin E- and cyclin A-associated kinase activities by IFN- α [6,24].

Of the several genes induced by IFNs, the mouse *Ifi200* genes [17,19] and their human homologues, myeloid nuclear differentiation antigen [2] and *Ifi16* [12], are transcriptionally activated, both in vivo and in vitro. *Ifi204*, a member of the *Ifi200* gene cluster, encodes a 72 kDa phosphoprotein (p204) that contains two partially conserved 200 amino acid segments, designated type a and type b, bearing an LXCXE motif, known to be a potential site for binding to the retinoblastoma (Rb)-family proteins [4]. Overexpression of p204 in C2C12 myoblasts induced their fusion to myotubes suggesting that it may be involved in muscle differentiation [5]. In vivo the *Ifi204* is constitutively expressed in myeloid cells and selectively induced in the monocytes by IFNs, likely driving their differentiation to macrophages [7]. p204 overexpression in mouse embryo fibroblasts (MEF) retarded their proliferation, delayed G1 progression into S-phase and accumulated cells with a DNA content equivalent to cells arrested in late G1 [18]. These effects on cell cycle progression were strictly dependent on its association with the Rb protein [11]. Altogether these studies demonstrated that p204-pRb interaction is physiologically relevant to growth control and cell differentiation, and changes in this pathway confer growth advantages. Moreover, these findings suggested that p204 mutated at the Rb-binding sites can acquire cell transformation capability, as shown for the mutated form of the PKR gene, another IFN-inducible gene involved in growth control [16]. The aim of the present study, therefore, was to investigate the oncogenic activity of mutated p204 expression. For this purpose, NIH3T3 cells were transfected with the expression construct containing the mutated 204 cDNA and several aspects associated with cell immortalization or malignant transformation, namely growth under low-serum conditions, amplification of telomerase activity (TERT), anchorage-independent growth and the ability to form tumors in nude mice were evaluated.

2. Materials and methods

2.1. Cell cultures and transfection

NIH3T3 cells were grown as monolayers in Dulbecco's modified

*Corresponding author. Fax: (39)-11-6966977.
E-mail address: santo.landolfo@unito.it (S. Landolfo).

Abbreviations: IFN, interferon; Rb, retinoblastoma; MEF, mouse embryo fibroblast; TERT, telomerase activity; DHFR, dihydrofolate reductase; PCNA, proliferating cell nuclear antigen

Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 10% donor calf serum (DCS). Transfections were performed using Lipofectamine Plus (Gibco) according to the manufacturer's protocol. 2 µg of expression construct DNA pRcRSV204dm (for brevity p204dm), containing the Ili204 cDNA mutated at both Rb-binding sites with an in-frame fusion at the C-terminus with the hemagglutinin (HA) epitope as described by Hertel et al. [10], were used for approximately 3×10^5 cells. Stable transfectants were selected in the presence of 800 µg/ml G418 in the culture medium. Pools of at least 100 colonies were harvested and maintained in G418 selection. Expression of the exogenous protein was evaluated by Western blotting using the anti-HA-probe monoclonal antibody (Boehringer). The morphology of the cells was examined using an Olympus microscope.

2.2. Telomerase assay

Cells were washed in PBS, lysed, and TERT activity in the indicated amount of total cell extracts was measured with the TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} kit (Roche Molecular Biochemicals) according to the manufacturer's protocol [3]. The telomerase PCR ELISA is an extension of the original described TRAP protocol [13] and allows for the highly specific amplification of telomerase-mediated elongation products, combined with non-radioactive detection following an ELISA protocol. Each assay was performed with an extract-free sample that contained only the reaction mixture to detect PCR amplification of primer dimers, and one in which extracts were treated with 1 U of RNase A as a control for telomerase specificity. Only assays in which all control lanes showed the expected results were included in this study.

2.3. Cell lysis and Western blotting

Cells were lysed in 3% SDS lysis buffer as previously described [11]. Insoluble material was removed by centrifugation. Protein concentration was determined by the Bio-Rad Dc Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). Total cell extracts were separated on SDS–8.5% polyacrylamide gel and transferred onto PVDF membrane (Amersham). Membranes were blocked in blocking solution (10 mM Tris–HCl, pH 7.5, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween 20, 5% [w/v] non-fat dry milk) and incubated in the same buffer with primary antibodies for 3 h at room temperature, followed by a 1 h incubation with the appropriate horseradish-peroxidase-conjugate secondary antibody and then detected by enhanced chemoluminescence (Amersham). pRb was detected using the Rb control antibody from Santa Cruz Biotechnology (C-15/sc-50) at a dilution of 1:4000. The phosphorylation status of pRb at Ser-780 was detected with the phospho-Rb (Ser-780) antibody from Cell Signaling Technology at a dilution of 1:4000. Monoclonal anti-actin antibodies (Boehringer) were used as internal control. Densitometry was performed by scanning the radiographs and then analyzing the bands with the software Quantity One (Bio-Rad).

2.4. Soft agar and *in vivo* tumorigenicity assay

After transfection, cells were grown in the presence of G418 for 2.5 weeks. Pools of stable transfectants were harvested and aliquots were added to 60-mm dishes in duplo containing 0.5% (w/v) SeaPlaque agarose (FMC BioProducts) in complete culture medium on top of a layer of 1% (w/v) SeaPlaque agarose. As a positive control, transfectants with a construct containing an activated ras allele (Kirstein) were included. Cells transfected with the empty vector pRcRSV were included as negative controls. Aliquots of 1000, 10000 and 100000 cells were plated in duplo. After 16 days, 25 squares of 1 cm² were counted. Transfected cells were subcutaneously inoculated into the right flank of 6–8-week-old female athymic nude mice (Charles River Laboratories) at the indicated concentrations. Each group consisted of six animals. After inoculation, the incidence and growth of tumors were evaluated at least twice a week. Neoplastic masses were measured with calipers in the two perpendicular diameters for at least 40 days. The mice were sacrificed when tumor growth started to interfere with the health of the animals.

2.5. Expression analysis

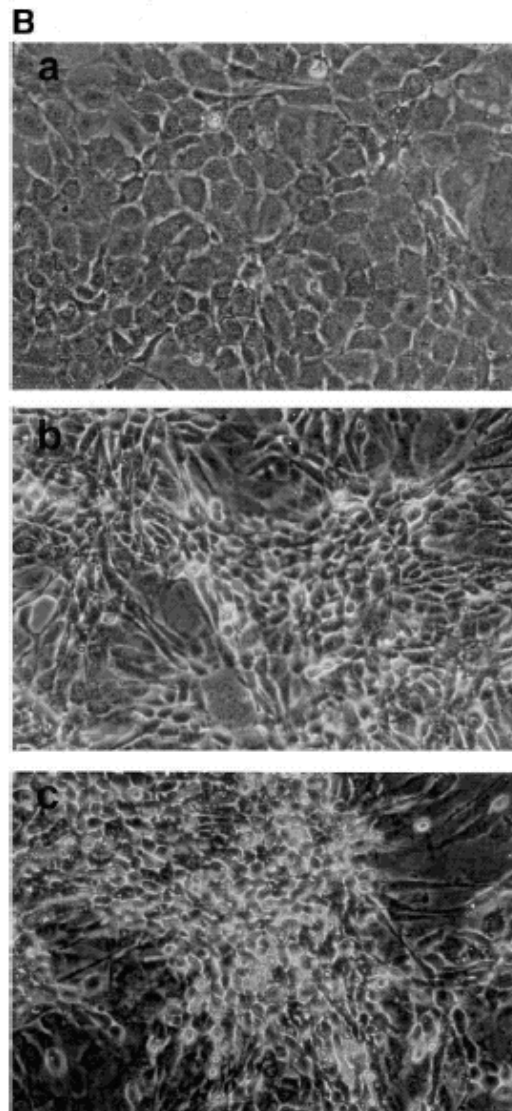
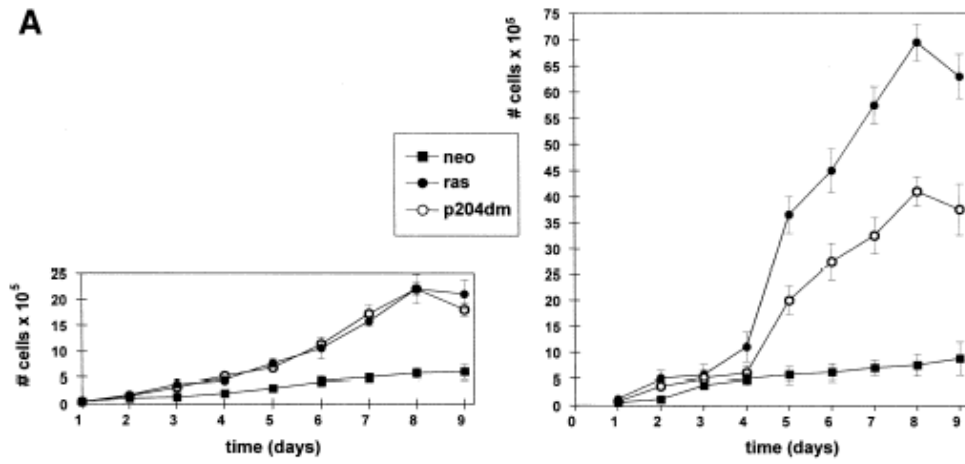
Total cellular RNA was isolated by using the total RNA extraction solution EUROzol (EUROclone). Semiquantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was carried out using 1 µg of total RNA as previously described [21]. Briefly, total RNA was reversed-transcribed into mRNA-dependent cDNA by using Moloney murine leukemia virus RT (Ambion Inc.). 1-µg aliquot for each sample served as non-RT control to control for genomic contamination in subsequent PCR reactions. Equivalent amounts of cDNA were then subjected to PCR analysis performed in a Hybaid PCR Express Thermal cycler. The Ili204 primers (sense [5'-AAAGAGACAACCAAGCAATACACC-3'] and antisense [5'-GAATGTTAGATGAAGCCGAAGATGAG-3']) amplified a 567 bp fragment. The β-actin primers (sense [5'-TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAA-3'] and antisense [5'-TAAAACGCAGCTCAGTAAACAGTCCG-3']) amplified a 348 bp fragment. For amplification of the DNA fragments, a cycle number which was in the middle of the linear amplification range (with a minimum of 25 and a maximum of 35 cycles) was used. The reaction mixtures for each sample were added to a tube containing 50 pmol each of the oligonucleotide primers for amplification of both Ili204 and β-actin. PCR was carried out as follows: 5-min denaturation step at 95°C, followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s and 72°C for 30 s, followed by 72°C for 5 min to allow for complete extension. Under these conditions, amplification of Ili204 and β-actin product is in the exponential phase and the assay is linear with respect to the amount of input RNA. Water controls in which all components of the RT-PCR reaction were present, except RNA, were also included. PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose and stained with ethidium bromide for visualization.

3. Results and discussion

As a first attempt to verify whether the p204 mutant displays any oncogenic activity, NIH3T3 cells were first transfected with the expression vector pRcRSV204 double mutant (for brevity p204dm) harboring both the C-terminal deletion up to amino acid 568 and the point mutation from glutamic acid to lysine at position 427, which means that the protein is devoid of any functional Rb-binding domain. Cells transfected with an activated ras allele (226 cells) or the empty vector (neo) were included as positive and negative controls. We chose NIH3T3 cells because this cell line has been used successfully to demonstrate the phenotypic effects of a number of proto-oncogenes [25]. After G418 selection for 2.5 weeks, pooled populations of neomycin-resistant clones were harvested and used for further analysis. Expression of the transfected mutant form was assessed by Western blotting by using anti-HA monoclonal antibodies as previously described (data not shown) [10].

Since growth in the absence of exogenous growth factors is a characteristic of immortalized, transformed cells, the transfected cells were tested for their ability to grow under low-serum conditions (1 and 5% DCS). As can be seen in Fig. 1 (panel A), p204dm transfectants grew faster and to higher densities compared to neo cells, which invariably displayed lower growth rates and density. A similar growth pattern was observed with 226 cells transformed by a c-Ki-ras gene. Differences in the numbers of cells when reaching confluence between the p204dm transfectants on one hand and the neo cells on the other hand was mainly due to their ability to grow to higher densities. Moreover, the morphologies of NIH3T3

Fig. 1. A: Growth curves of NIH3T3-transfected cells under low-serum conditions. Counts of the cells cultured in medium supplemented with 1% DCS (left panel), or 5% DCS (right panel) are shown. Each point represents the mean ± standard deviation of data obtained in three independent experiments. B: Morphological changes in NIH3T3 expressing the empty vector (a), p204dm (b), and oncogenic ras (c). Cells were cultured in 10% DCS-DMEM, allowed to grow until confluence, and photographed with an inverted microscope.



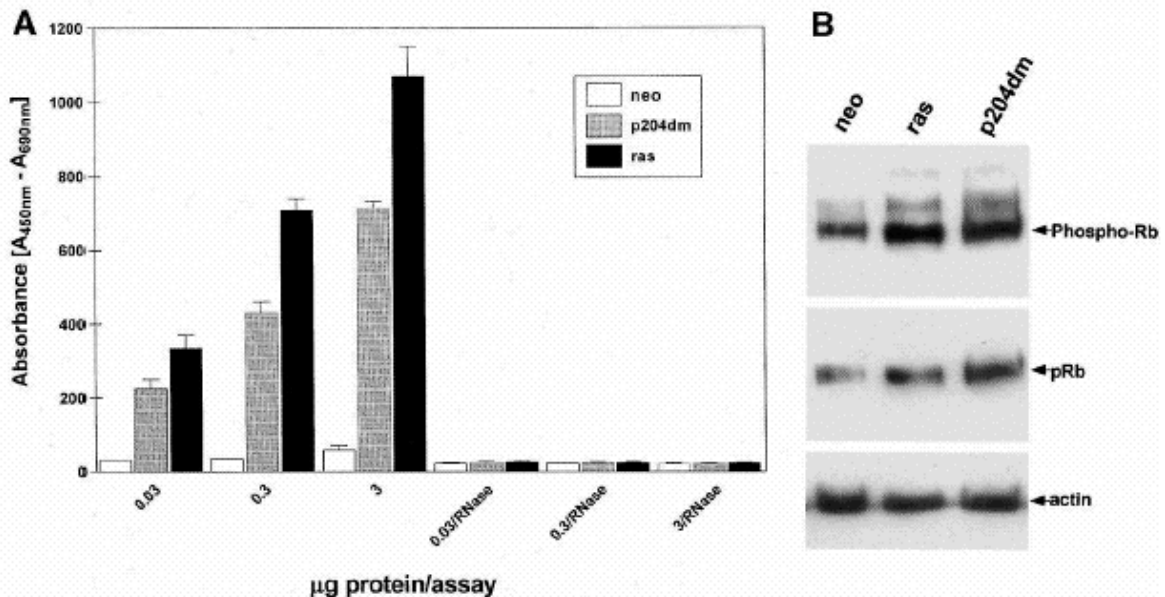


Fig. 2. A: Effect of p204dm overexpression on TERT detected by ELISA. Different amounts of total protein extracts from neo, p204dm and ras cells pretreated or not with RNase were assayed for TERT using telomerase PCR ELISA assay. Absorbance values are reported as the $A_{450\text{nm}}$ reading against blank control (reference wavelength $A_{690\text{nm}}$). Each point represents the mean \pm standard deviation of data obtained in three independent experiments. B: Effect of p204dm overexpression on pRb phosphorylation. Total cell extracts (50 μg) were size-fractionated by 8.5% SDS-PAGE, transferred to PVDF membrane, and subjected to Western blotting for detection of pRb expression (pRb) and phosphorylation (phospho-Rb). Actin immunodetection was performed as internal control.

cells transfected with p204dm or oncogenic ras were clearly different from those of the neo cells. After approximately 8–10 days, both p204dm and ras-transfected cells were more refractile, elongated, and piled up when they reached confluence, each other, whereas neo cells showed epithelial-like morphology and formed elongated, rounded and neatly aligned structures (Fig. 1, panel B).

TERT has been demonstrated in a high percentage of extracts from most tumor types [13]. Cell lines, immortalized either spontaneously or after transformation by oncogenic viruses, such as simian virus 40 and human papillomavirus types 16 or 18, are usually telomerase-positive [15]. Moreover, TERT should be regarded as a biomarker of cell proliferation rather than malignant transformation [1]. Since the above experiments demonstrated that introduction of p204dm confers growth characteristics typical of immortalized cells, neo, p204dm and ras cells were compared for TERT activity. As shown in Fig. 2, panel A, TERT was barely detectable in neo cells, but significantly increased (10-fold) in p204dm cells. As expected, ras cells displayed very high levels of TERT activity,

possibly associated with the growth properties of the Ki-ras oncogene.

Altogether these results demonstrate that mutation at both Rb-binding motifs wipes out the antiproliferative activity of the *h*204 gene and endows it with growth-promoting activity.

We previously reported that as a consequence of p204 overexpression and growth arrest, the Rb protein is almost completely converted to the rapidly migrating hypophosphorylated status [18]. To investigate the effect of p204dm overexpression on the Rb phosphorylation status, total cell extracts were obtained from exponentially growing neo and p204dm transfectants. As control, extracts from ras-transformed cells were included. As shown in Fig. 2, panel B, a significant increase of pRb phosphorylation (2.5-fold) was detected in p204dm extracts, by using a phosphospecific Rb antibody, in comparison to the neo cells. As expected, ras-transformed cells showed high levels of phosphorylated pRb (four-fold induction). As a consequence of pRb phosphorylation, the E2F transcription factors are released and activate the expression of the E2F-dependent genes required for

Table 1
Microscopic counts and plating efficiencies in soft agar assay

Construct	1×10^5 cells		1×10^4 cells		1×10^3 cells	
	Colonies/cm ²	Plating eff. (%) ^a	Colonies/cm ²	Plating eff. (%)	Colonies/cm ²	Plating eff. (%)
Neo	5 (4–6) ^b	0.005	2 (2–2)	0.02	–	–
p204dm	58 (52–64)	0.05	32 (31–33)	0.3	12 (10–14)	1.2
ras	76 (72–80)	0.05	49 (46–52)	0.4	21 (20–22)	2.1

^aPlating efficiency in the number of colonies \times 100 divided by the number of cells plated.

^bThe values for the duples are given separately between brackets.

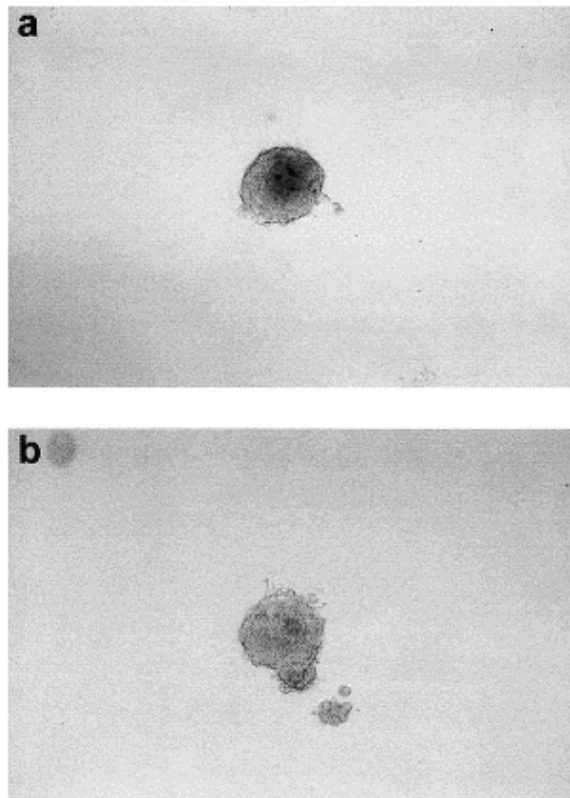


Fig. 3. Morphology of soft agar colonies formed by p204dm (a) or oncogenic ras (b) transfected NIH3T3 cells. The colony size and morphological changes were detected by microscope observation. Representative photomicrographs are shown. Magnification: $10\times$.

S-phase entry. Consistent with this hypothesis, we have previously shown that overexpression of wild type p204 but not p204dm leads to a significant decrease of both proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and dihydrofolate reductase (DHFR) protein levels, known to be regulated in a E2F dependent manner [11].

Since anchorage-independent growth is one of the characteristics of malignantly transformed cells, 1000, 10 000 and 100 000 transfected cells were plated in duplo onto soft agar dishes. After 16 days, macroscopic colonies were present in all dishes, including those of the negative controls and the ras-transformed cells. Typical colony images are shown in Fig. 3. The numbers of colonies and plating efficiencies are displayed in Table 1. When compared to neo cells, p204dm transfectants yielded a number of colonies and a plating efficiency significantly higher. As expected, the positive control (ras) clearly demonstrated a better colony-forming efficiency than any other transfectants. Microscopic examination also revealed that the morphology of the p204dm colonies resembled that of ras colonies (Fig. 3). These results indicated that overexpression of p204dm in NIH3T3 cells enhanced the cellular proliferation rate and conferred anchorage-independent characteristics.

To establish whether p204dm transfectants form tumors *in vivo*, cells were inoculated at the indicated concentrations into the right flank of nude mice. Tumor size was examined twice a week and palpable tumors were measured on two perpendicular axes. Tumor volume was calculated by assuming spher-

ical growth, using the standard formula. All mice injected with p204dm-transfected cells developed tumors in an inverse dose–time-dependent manner within 10–25 days (Fig. 4, upper panel). The mean tumor size in p204dm-transplanted nude mice was approximately 4 cm^3 at day 20 after transplantation (with 10^6 cells/mouse); whereas, the mean tumor volume in nude mice injected with neo cells (10^6 cells/mouse) only reached 1 cm^3 at day 35 after transplantation (Fig. 4, lower panel). As expected, all the ras-inoculated mice bore large tumors (2 cm^3) as early as 2 weeks after inoculation. These results indicate that p204dm not only promoted tumor growth, but also enhanced the tumor incidence rate in nude mice. After dissection, the tumors were analyzed by RT-PCR for expression of the Ifi204dm and the β -actin gene as control. The results, presented in Fig. 5, showed comparable expression levels of the mutated 204 cDNA in the tumor extracts derived from the p204dm group inoculated with the highest cell concentration. By contrast, tumor extracts derived from mice inoculated with 1×10^6 neo-cells were negative.

The results of this study demonstrate that expression of the p204dm inactivated by mutation at both LXCXE motifs increases cell proliferation along with TERT activity and anchorage independence. In addition, when p204dm-transfected NIH3T3 were transplanted into nude mice, they also enhanced tumor size and incidence. It has been demonstrated that Rb and the related p107 and p130 primarily inhibit growth by targeting the E2F family transcription factors [9]. We previously observed that the Rb protein is an essential mediator that links the IFN-inducible 204 gene to cell-cycle regulation [8,11]. FACS analysis together with BrdU incorporation and expression of DHFR and PCNA proteins in Rb+/+ MEF transfected with wild type p204 demonstrated indeed that interaction of p204 with Rb represses E2F transcriptional activity. Although the effect of p204 binding on pRb function remains to be explored, we can conclude that the transdominant negative p204dm increases pRb phosphorylation and relieves E2F to activate transcription of target genes, such as DHFR, involved in cell growth stimulation.

Acknowledgements: We thank Mirella Giovarelli, Turin, for helpful discussion and statistical analysis of *in vivo* data. This work was supported by grants from Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), and MURST-CNR (‘Biotechnology Program L95/95’ and ‘Program 40%’).

References

- [1] Blair, C.D., Yeager, T.R., Lopez, P.M. and Reznikoff, C.A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13677–13682.
- [2] Briggs, R.C., Kao, W.Y., Dworkin, L.L., Dessypris, E.N. and Clark, J. (1994) *J. Cell. Biochem.* 56, 559–567.
- [3] Cherry, A.M., Bangs, C.D., Oei, Y., Bodnar, A., Bronstein, A., Chiu, C.-P. and Scott, H.G. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 26141–26148.
- [4] Choubey, D. and Lengyel, P. (1992) *J. Cell. Biol.* 116, 1333–1341.
- [5] Cj, L., Wang, H., Zhao, Z., Yu, S., Lu, Y.B., Chatterjee, G., Deschamps, S., Roc, B.A. and Lengyel, P. (2000) *Mol. Cell. Biol.* 20, 7024–7036.
- [6] Einat, M., Resnitzky, D. and Kimchi, A. (1985) *Nature (London)* 313, 597–600.
- [7] Gariglio, M., De Andrea, M., Lembo, M., Ravotto, M., Zappador, C., Valente, G. and Landolfo, S. (1998) *J. Leuk. Biol.* 64, 608–614.

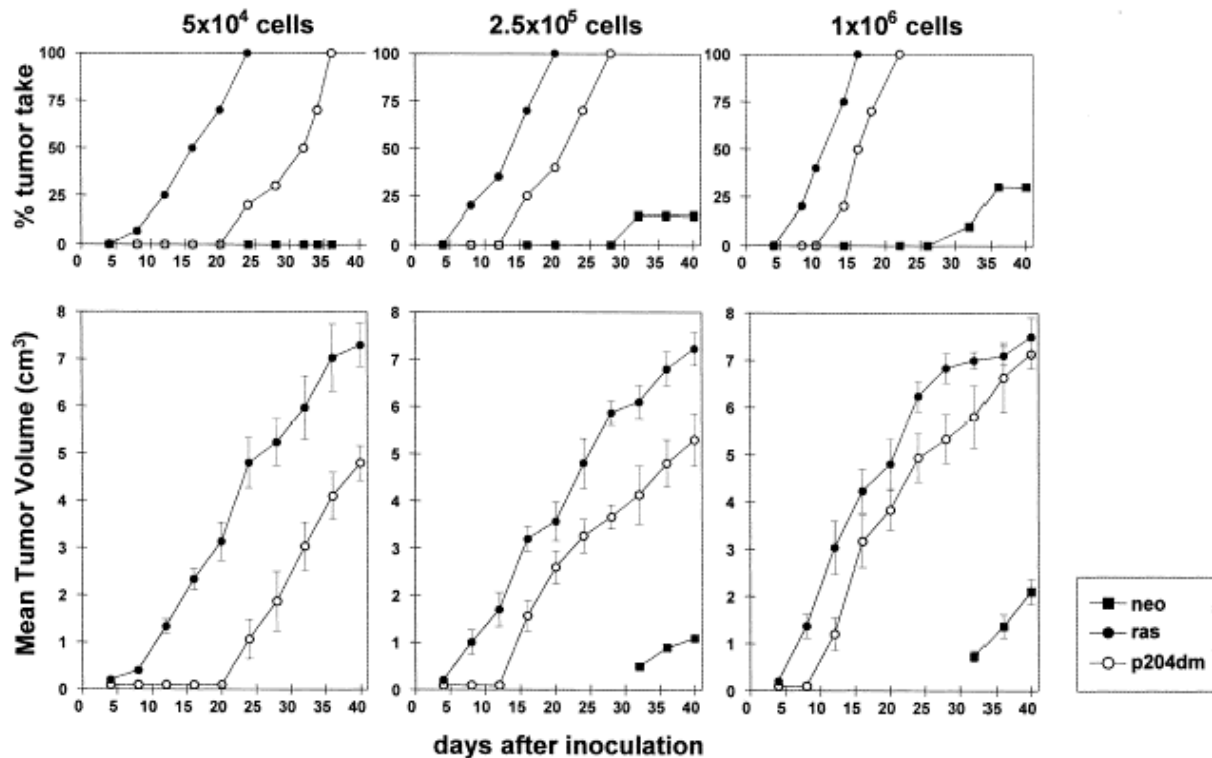


Fig. 4. Effect of p204dm overexpression on tumor growth in vivo. Percentage of tumor take (upper panel) and mean tumor volume (lower panel) of palpable tumors arising in nude mice (six mice/group) after inoculation of 5×10^4 , 2.5×10^5 , 1×10^6 NIH3T3 cells expressing the empty vector, p204dm and oncogenic ras.

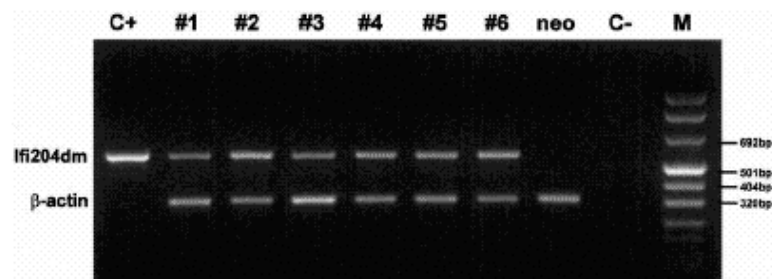


Fig. 5. Expression levels of Ifi204dm and control β -actin in tumors from nude mice injected with 1×10^6 cells as measured by semiquantitative RT-PCR. The marker (M) shown is the 100 bp ladder VIII (Roche Biochemicals). Amplification was performed by Ifi204 sense and antisense primers originating a 567 bp fragment. The β -actin (348 bp fragment) was coamplified as an internal control. C- contains a water control for the RT-PCR. Neo corresponds to RT-PCR amplification of total RNA obtained from tumor developed after neo cell injection. C+ corresponds to RT-PCR amplification of total RNA obtained from the pooled population of p204dm-transfected cells used to inject mice.

- [8] Gribaudo, G., Riera, L., De Andrea, M. and Landolfo, S. (1999) FEBS 456, 31–36.
- [9] Harbour, J.W. and Dean, D.C. (2000) Genes Dev. 14, 2393–2409.
- [10] Hertel, L., De Andrea, M., Azzimonti, B., Rolle, S., Gariglio, M. and Landolfo, S. (1999) Virology 262, 1–8.
- [11] Hertel, L., Rolle, S., De Andrea, M., Azzimonti, B., Osello, R., Gribaudo, G. and Gariglio, M. (2000) Oncogene 19, 3598–3608.
- [12] Johnstone, R.W. and Trapani, J.A. (1999) Mol. Cell. Biol. 19, 5833–5838.
- [13] Kim, N.W., Piatyszek, M.A., Prowse, K.R., Harley, C.B., West, M.D., Ho, P.L.C., Coviello, G.M., Wright, W.E. and Weinrich, S.L. (1994) Science 266, 2011–2015.
- [14] Kimchi, A., Resnitzky, D., Ber, R. and Gat, G. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 2828–2836.
- [15] Klingelutz, A.J., Barber, S.A., Smith, P.P., Dyer, K. and McDougall, J.K. (1994) Mol. Cell. Biol. 14, 961–969.
- [16] Koromilas, A.E., Roy, S., Barber, G.N., Katze, M.G. and Sonenberg, N. (1992) Science 257, 1685–1689.
- [17] Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G. and Lembo, D. (1998) Biochimie 80, 721–728.
- [18] Lembo, M., Sacchi, C., Zappador, C., Bellomo, G., Gaboli, M., Pandolfi, P.P., Gariglio, M. and Landolfo, S. (1998) Oncogene 16, 1543–1551.
- [19] Lengyel, P., Choubey, D., Li, S.-J. and Datta, B. (1995) Sem. Virol. 6, 203–213.

- [20] Resnitzky, D., Tiefenbrun, N., Berissi, H. and Kimchi, A. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 402–406.
- [21] Rolle, S., De Andrea, M., Gioia, D., Lembo, D., Hentel, L., Landolfo, S. and Gariglio, M. (2001) *Virology* 286, 249–255.
- [22] Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R.G., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227–264.
- [23] Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. and Tanaka, N. (2001) *Annu. Rev. Immunol.* 19, 623–655.
- [24] Tiefenbrun, N., Melamed, D., Levy, N., Resnitzky, D., Hoffmann, I., Reed, S.I. and Kimchi, A. (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 3934–3944.
- [25] Weinberg, R.A. (1989) *Cancer Res.* 49, 3713–3721.

RAPID COMMUNICATION

The Interferon-Inducible 204 Gene Is Transcriptionally Activated by Mouse Cytomegalovirus and Is Required for Its Replication

Sandra Rolle,*¹ Marco De Andrea,*^{†1} Daniela Gioia,[†] David Lembo,[†] Laura Hertel,*[†] Santo Landolfo,*[‡] and Marisa Gariglio^{‡2}

*Department of Public Health and Microbiology, Medical School of Torino, Turin, Italy; [†]Department of Medical Sciences, Medical School of Novara, Novara, Italy; and [‡]Immunogenetics and Experimental Oncology Center, C.N.R., Turin, Italy

Received November 27, 2000; returned to author for revision March 7, 2001; accepted May 17, 2001

Infection of cells with viable or UV-inactivated murine cytomegalovirus (MCMV) increased the IFN-inducible 204 gene at both the mRNA and the protein levels. The activity of a reporter gene driven by the mouse *Ifl204* promoter induced following virus infection showed that this increase was due to transcriptional activation. Moreover, FACS analysis of infected mouse embryo fibroblasts (MEF) stably transfected with a p204-dominant-negative mutant (p204dmMEF) revealed that they do not accumulate at the G1/S border in the same way as infected MEF transfected with the empty vector (neoMEF). MCMV DNA synthesis is significantly delayed (144 h in p204dmMEF vs 72 h in neoMEF), due to retarded expression of viral genes, namely, IE1 and DNA polymerase, as shown by Western blot comparison of p204dmMEF and neoMEF extracts. These results demonstrate that MCMV may exploit the *Ifl204* gene to regulate the cell cycle and enhance its DNA synthesis. © 2001 Academic Press

Introduction, results, and discussion. Infection of permissive cells with cytomegalovirus (CMV), a β -herpesvirus, results in the progression of a sequentially ordered set of physiological responses similar to growth factor- or cytokine-induced cellular activation (1, 3). However, this activation does not lead to cell division (14). Earlier studies revealed indeed that CMV rapidly inhibits the growth of fibroblasts, by blocking cell cycle progression at multiple points, including the G1-to-S-phase transition (3, 6, 7, 18). The demonstration by Salvant *et al.* (20) that infection in the S phase delays the expression of immediate-early (IE) viral genes further emphasizes the importance of cell cycle regulation for human cytomegalovirus (HCMV) replication. However, in contrast to this blockade, CMV infection also stimulates the growth-regulated pathway together with a number of enzymes involved in nucleotide metabolism and DNA replication (10, 16).

Differential display analysis and DNA microarray assay demonstrated that HCMV infection before the onset of virus DNA synthesis caused changes of about 258 cellular mRNAs, some of which are also induced by interferons (IFNs) (21). In line with these findings it has been demonstrated that soon after infection HCMV acti-

vates interferon immediate-early response gene expression and interferon regulatory factor-3 (IRF-3) containing an interferon-stimulated response element-binding complex (19). The principal mechanism by which CMV induces intracellular signaling and activation of the interferon response is via an interaction of the primary viral ligand, glycoprotein B (gB), with its cognate cellular receptor, although other mechanisms involving different receptors and signal transduction pathways cannot be excluded (2).

Among the IFN-stimulated genes (ISGs), one family, designated *Ifl200*, includes the p202, p203, p204, and D3 proteins and their human homologues, myeloid nuclear differentiation antigen, *Ifl16*, and AIM2 (15). The 204 protein, encoded by the *Ifl204* member of the *Ifl200* gene cluster, contains two LXCXE motifs that are potential sites for binding to the retinoblastoma (Rb) gene product and functions as a growth suppressor in sensitive cell lines by delaying G0/G1 progression into S phase (13, 17) and impairing E2F-mediated transcriptional activity (11). Recent results from our laboratory demonstrated that expression of mutant 204 proteins devoid of one or both domains interferes with the murine cytomegalovirus (MCMV) multiplication cycle, but does not affect IFN antiviral activity, suggesting that the IFN-inducible protein 204 is somehow related to MCMV replication (12). The finding that inactivation of p204 by dominant-negative mutants deregulates the cell cycle and renders cells intrinsically resistant to MCMV replication might there-

¹ S. Rolle and M. De Andrea contributed equally to this work.

² To whom correspondence and reprint requests should be addressed at Department of Medical Sciences, Medical School of Novara, Via Solaroli, 17, 28100 Novara, Italy. Fax: +39.0321.620421. E-mail: gariglio@med.unipmn.it.



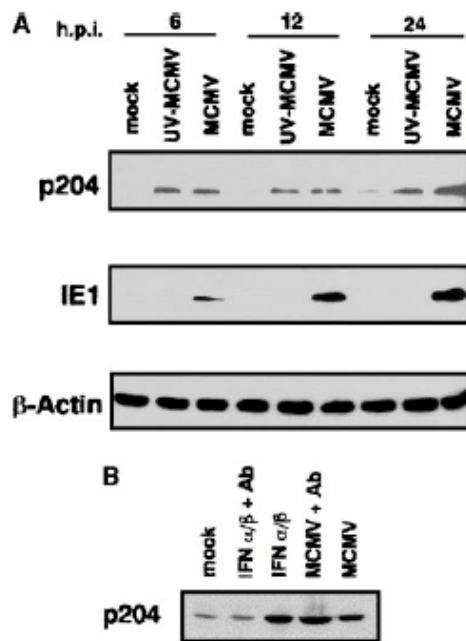


FIG. 1. (A) Induction of p204 during MCMV infection. MEF cultured at 2% FBS were infected with MCMV (m.o.i. of 2), infected with UV-irradiated MCMV, or mock-infected. Total cell extracts were prepared at the indicated time points after infection, fractionated by SDS-PAGE (30 μ g/lane), and analyzed by immunoblotting with anti-p204 or anti-IE1 Abs. The membrane was then incubated with goat anti-rabbit Ig horse-radish peroxidase conjugate as secondary antibody and visualized with an ECL kit (Amersham). Actin immunodetection was performed as an internal control. (B) Anti-IFN- α/β Abs do not block p204 induction by MCMV. MEF cultured at 2% FBS were incubated with 100 neutralization units of sheep polyclonal Abs against mouse IFN- α/β for 1 h and then infected with MCMV (m.o.i. of 2). As a control, 100 U of mouse IFN- α/β was added with or without preincubation with 100 neutralization units of anti-IFN Abs to MEF cultured at 2% FBS. After 24 h total cell extracts were prepared and analyzed by immunoblotting with anti-p204 Abs.

fore suggest that MCMV exploits p204 to regulate the cell cycle and consequently its DNA synthesis.

To determine whether MCMV infection up-regulates p204 expression, lysates from MCMV-infected mouse embryo fibroblasts (MEF) were assessed for its expression by Western blotting analysis. Time course experiments revealed a detectable induction of p204 levels as early as 6 h postinfection (p.i.). This gradually increased at 12 h p.i., peaked at 24 h p.i., and then declined (Fig. 1A). To see whether this induction was due to virion constituents or viral gene expression, cells were also infected with UV-inactivated MCMV and expression of viral IE1 was used as a marker of infectivity. As shown in Fig. 1A, p204 induction does not appear to require viable MCMV virions, since infection of MEF with the UV-inactivated virus resulted in its up-regulation in a manner comparable to that for replication-component virus. To confirm that UV-inactivated virus does not express IE genes, cell extracts were also probed with anti-IE1 antibodies (Abs). As shown in Fig. 1A, UV inactivation

blocked IE gene expression without affecting p204 induction. As expected, mouse IFN- α/β induced p204 at levels slightly higher than those observed with MCMV (data not shown).

IFN- α/β was not detectable in the supernatants from infected MEF positive for p204 expression, excluding the possibility that it was triggered by CMV through induction of IFN (data not shown). Moreover, addition of Abs against mouse IFN strongly affected p204 induction upon IFN treatment, but did not impair its activation upon MCMV infection (Fig. 1B), demonstrating that MCMV directly stimulates p204 expression.

To determine whether the increase in p204 levels observed in MCMV-infected MEF represented specific activation of its transcription, MCMV-infected and IFN-treated fibroblasts were first analyzed by semiquantitative RT-PCR. Time course analysis demonstrated that stimulation of cells with either MCMV or IFN- α resulted in the rapid induction of *Irf204* mRNA levels (Fig. 2A). The abundance of *Irf204* mRNA was significantly up-regulated (fivefold) compared with the untreated control. Levels for the MCMV-infected cells peaked after 3 h of stimulation and then declined. As observed in Western blotting analysis, UV inactivation did not impair *Irf204* stimulation, confirming that virion constituents are responsible for gene induction (Fig. 2A). The activation response to IFN treatment was very similar (sixfold), except that the induction lingered longer and was still detectable 12 h p.i.

Irf204 expression is regulated primarily at the transcriptional level following IFN treatment (15). The effects of MCMV infection on the expression of a transiently transfected luciferase reporter gene driven by the *Irf204* promoter were therefore evaluated. MEF were transfected by lipofectamine with the reporter plasmid pLuc204 (which contains the luciferase cDNA driven by the *Irf204* promoter) and then infected with MCMV at a m.o.i. of 2 for 6 or 18 h. As shown in Fig. 2B, MCMV infection resulted in *Irf204* promoter stimulation that began at 6 h p.i., as indicated by the significant increase of the luciferase activity (about threefold induction), and reached a maximum at 18 h p.i. (about sixfold induction). In accord with the Western blotting analysis, the activation potentials of viable and UV-inactivated MCMV were equivalent, indicating that MCMV-mediated transactivation is generated by interaction of virion constituents with the cell membrane.

The finding that MCMV induces expression of the *Irf204* gene raised the question of whether it is merely a by-product of CMV infection or whether MCMV induces ISGs such as *Irf204* to actually regulate cell cycle progression and create an environment favorable to its replication.

To verify this hypothesis we investigated the impact of CMV infection on the cell growth of neoMEF and p204dmMEF, stably transfected with a p204 mutated at

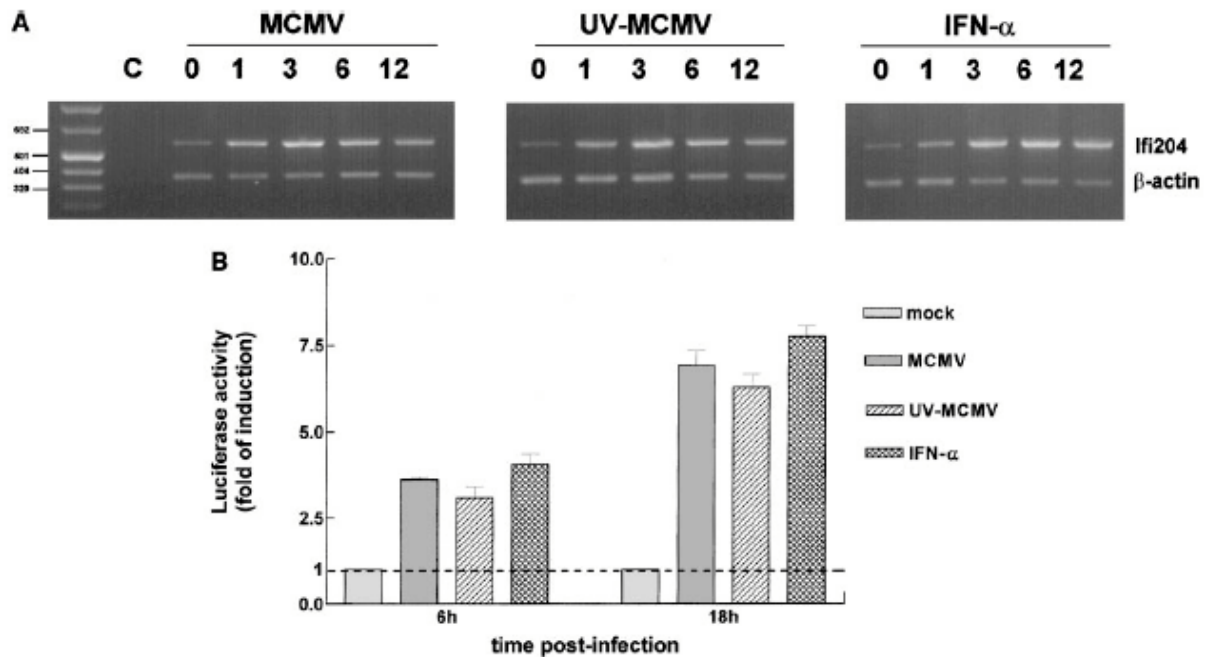


FIG. 2. (A) Induction of Ifi204 mRNA during MCMV infection. MEF cultured at 2% FBS were infected with MCMV (m.o.i. of 2) or UV-irradiated MCMV or treated with IFN- α/β (1000 U/ml). Total RNA was isolated at the indicated time points, retrotranscribed, and analyzed by PCR. Amplification was performed by Ifi204 sense and antisense primers originating a 567-bp fragment. The β -actin (348-bp fragment) was coamplified as an internal control. Data are representative of a single experiment performed independently four times. (B) Effect of MCMV infection of Ifi204 promoter activity. DNA (2 μ g) from p204Luc or pGL3 was transiently transfected into MEF as described under Materials and Methods. After 48 h cells were infected with MCMV (m.o.i. of 2) or UV-irradiated MCMV or treated with IFN- α/β (1000 U/ml). Total cytoplasmic extracts were isolated at the indicated time points and assayed for luciferase activity. Reporter gene activity was normalized to the amount of plasmid DNA introduced into recipient cells by DNA dot-blot analysis. The resulting luciferase activity is expressed as the fold induction relative to the basal level measured in cells transfected with p204Luc and then mock-infected, which was set at 1. The data represent the means of the normalized luciferase activities from at least three repeated experiments.

both Rb-binding sites that behaves like a dominant-negative inhibiting accumulation of IFN-treated cells at the G1/S border (13). To determine whether accumulation of MCMV-infected cells in the G1 phase of the cell cycle was impaired by overexpression of the dominant-negative p204 mutant, FACS analysis was performed. Both neoMEF and p204dmMEF, plated at 80% confluence, were infected at a m.o.i. of 2 as described previously and maintained in 2% FBS. Cells were then harvested at various times p.i. and the DNA content in isolated nuclei was measured by propidium iodide (PI) staining and FACS analysis. Virus-infected neoMEF displayed a G0/G1 peak (51.9% cells with 2N content) at 24 h p.i. (Fig. 3A) that broadened and became progressively more intense at 72 h p.i., consistent with the expected accumulation of viral DNA. Mock-infected neoMEF, cultured at 2% FBS, exhibited a G0/G1 peak of 49.4% cells at 24 h after mock infection that increased progressively to 81.2% at 120 h. By contrast, the DNA profile of the infected p204dmMEF was significantly different (Fig. 3B). At 24 h p.i. approximately 35.0 and 47.6% of these MEF were in G0/G1 and S phase, respectively. These cells continued to cycle normally and reached confluence at 96 h p.i., with only 14.4% of cells being in S phase. However, at 120 h p.i. the G0/G1 peak started to broaden and reached

the highest intensity at 144 h p.i., compared with 72 h p.i. for the neoMEF. To exclude the possibility that the amount of viral DNA could be moving cells from 2N to greater than 2N, gancyclovir (GCV) was added at the beginning of the infection to remove the obscuring effects of viral DNA replication. As shown in Fig. 3C, in the presence of GCV, both neoMEF and p204dmMEF at 72 and 120 h p.i. accumulated at the G1/S border, demonstrating that broadening of the cell profile with a content greater than 2N was due to viral DNA synthesis.

In view of these results, it was important to determine whether the delay in the onset of viral DNA synthesis was associated with a delay in MCMV protein expression. neoMEF and p204dmMEF were therefore infected as described for FACS analysis, and at the indicated times cell lysates were prepared and analyzed by Western blotting for viral protein expression. As probes, we used Abs specifically recognizing the MCMV IE1 p89 or the E viral protein DNA polymerase (DNApol). As shown in Fig. 4, IE1 protein in infected neoMEF started to increase as early as 6 h p.i. and was highly expressed at 48 h p.i. By contrast, in infected p204dmMEF, IE1 was detectable only at 72 h and was highly expressed at 96 h. The kinetics of the appearance of the viral early protein DNApol was also slower in the p204 mutants. The band

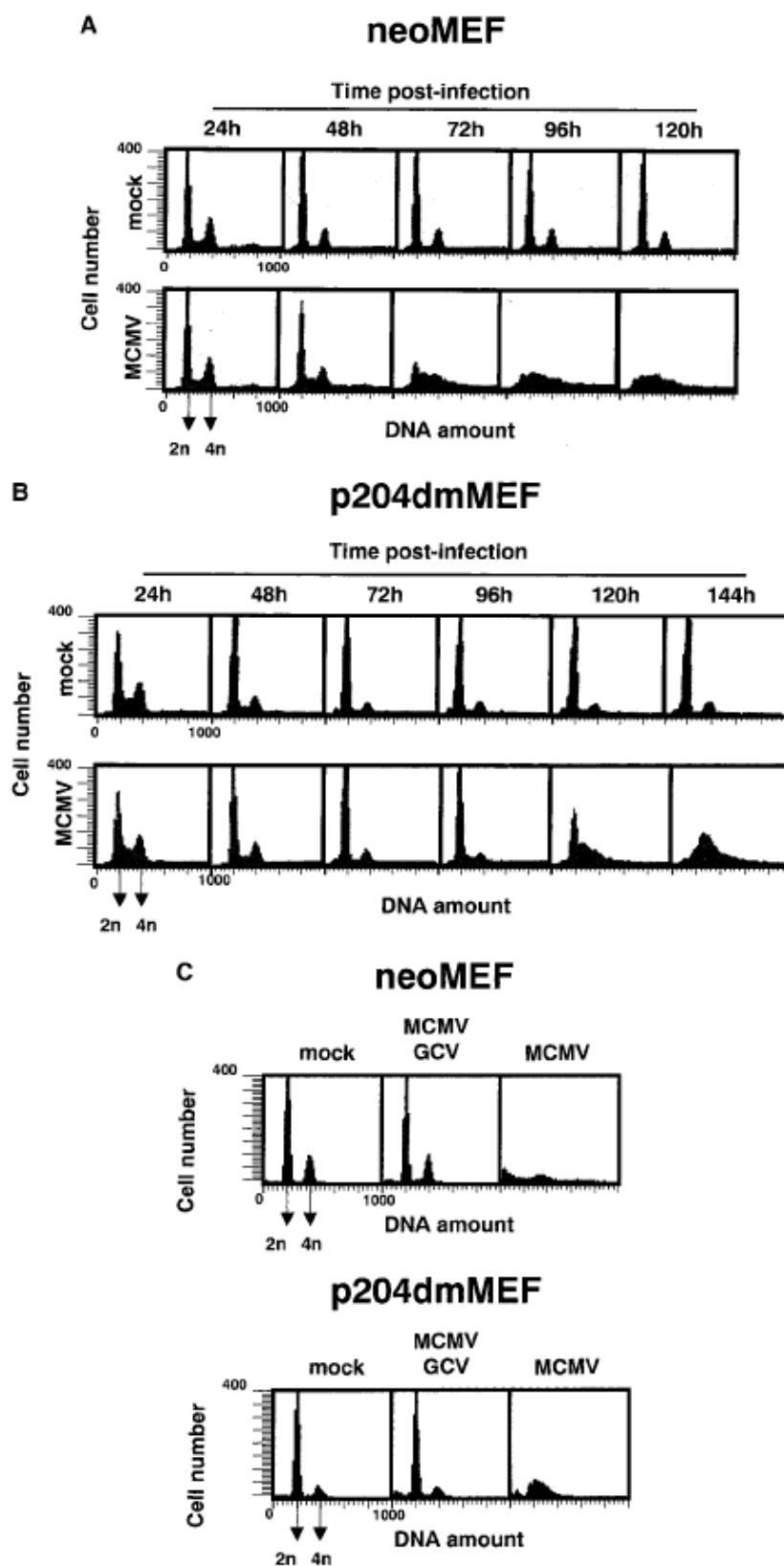


FIG. 3. Inactivation of endogenous p24 delays MCMV DNA synthesis. MEF was transfected with p24dm, encoding the dominant-negative p24 mutated at both Rb-binding sites (p204dmMEF), or the empty vector pRcRSV (neoMEF). Twelve days after transfection, resistant clones were pooled,

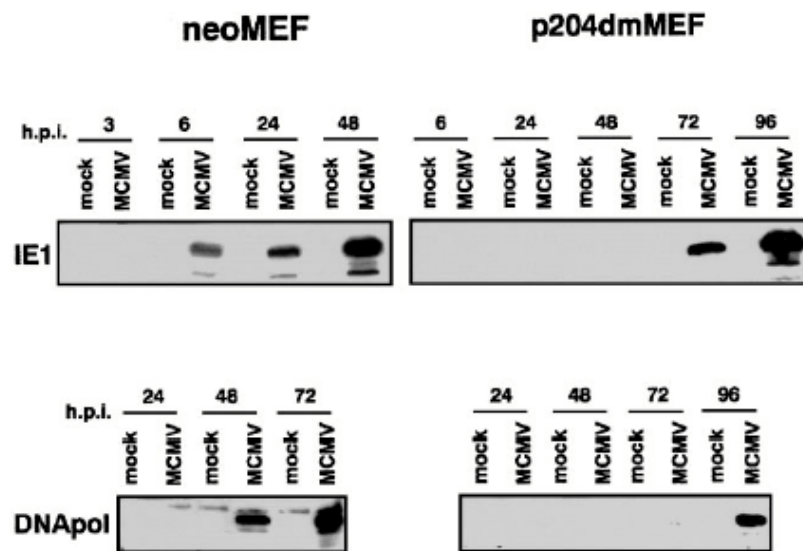


FIG. 4. Expression of viral IE1 and DNA polymerase in p204dmMEF or neoMEF during MCMV infection. p204dmMEF or neoMEF were infected with MCMV (m.o.i. of 2) or UV-irradiated MCMV or mock-infected in 2% FBS. Total cell extracts were prepared at the indicated time points after infection, fractionated with SDS-PAGE (30 μ g protein/lane), and analyzed by immunoblotting with anti-IE1 or anti-DNA polymerase Abs. The membrane was then incubated with goat anti-rabbit Ig horseradish peroxidase conjugate as secondary antibody and visualized with an ECL kit (Amersham).

specific for the viral DNApol was not detected at 24 h p.i. in neoMEF, started to increase at 48 h p.i., and peaked at 72 h p.i. A different pattern of protein induction was observed when p204dmMEF were analyzed: a band corresponding to the viral DNApol was barely detectable at 72 h p.i. and was highly expressed at 96 h p.i., correlating the level of protein expression with the kinetics of viral DNA synthesis observed by FACS analysis.

In activating the host cell metabolism to allow optimal viral replication, MCMV infection alters the expression of key cell cycle-regulatory proteins and this ultimately leads to cell cycle arrest (14, 20). The *lfi204* gene encodes a protein that controls transition from the G1 to the S phase by interacting with the retinoblastoma and E2F proteins (13, 15, 17). Inactivation of the endogenous p204 by dominant-negative mutants bearing a modified Rb-binding motif significantly impairs MCMV replication and delays the appearance of the cytopathic effect (CPE). In this report, we present data that provide insight into the nature of the virus–host interaction that culminates in cell cycle arrest. Binding of MCMV to the cell membrane of normal MEF activates p204 expression. This is accompanied by expression of viral IE genes that then leads to early gene induction and onset of DNA synthesis. It is therefore conceivable that MCMV induces p204 to accu-

mulate infected cells to the G1/S border and create an environment more favorable to its DNA synthesis and replication. This conclusion can be inferred from the results of both FACS analysis and Western blotting in infected p204dmMEF. In the absence of physiological levels of endogenous p204, the onset of IE and E genes and viral DNA synthesis is significantly delayed and retards the appearance of the CPE.

Previous studies have shown that HCMV, probably by engaging the cellular receptor for gB, activates the IRF-3-containing IFN-stimulated response element-binding complex that in turn leads to the expression of two IFN-inducible genes, namely, the OAS and ISG54 (2, 19). These studies, however, failed to establish whether the induced genes were required for HCMV replication. Our studies now demonstrate for the first time that members of another family of IFN-inducible genes, the *lfi200* genes, which encode proteins that regulate the progression from G1 to S phase, are stimulated by virion components during the early stage of CMV infection and are required for its replication.

Altogether, these results demonstrate that infection in S phase of rapidly dividing cells, in which the endogenous p204 has been down-regulated by dominant-negatives, delays progression of the viral life cycle and is

plated at 80% confluence, and infected with MCMV at a m.o.i. of 2 in 2% FBS. To prevent MCMV DNA synthesis, 20 μ g/ml of GCV was added to the culture after virus adsorption and left for the entire period of infection (72 h for neoMEF and 144 h for p204dmMEF). Cells were then harvested and the DNA content in isolated nuclei was measured by PI staining and FACS analysis. Data are from a single experiment representative of three independent experiments with similar results. (A) Untreated mock-infected or infected neoMEF. (B) Untreated mock-infected or infected p204dmMEF. (C) Gancyclovir-treated neoMEF and p204dmMEF.

associated with a significant fraction of the cells progressing through S phase and G2/M. The intracellular environment during active DNA synthesis may not be favorable for the early stages of viral replication. In the attempt to correlate stimulation of host DNA synthesis by CMV and lack of expression of a subset of an early virus gene, DeMarchi and Kaplan (5) proposed that (i) cellular DNA replication and efficient synthesis of viral proteins were mutually exclusive events and (ii) an early gene product expressed in cells fully permissive for the infection was required for this apparent inhibition of cell DNA synthesis (4). Consistent with this hypothesis, our data demonstrate that CMV infection dissociates the cell cycle from cell DNA synthesis by early activation of the IFN pathway. This results in the induction of cellular genes (i.e., the *Ifl204*) capable of inhibiting progression from the G1 to the S phase and allows expression of viral IE genes, which may then sequester and exploit cellular genes of the DNA metabolism, i.e., DHFR, TS, and Rr for viral DNA replication.

Materials and methods. MCMV (mouse salivary gland virus, strain Smith, ATCC VR.194) was purchased from ATCC (Rockville, MD) and produced as described (16). Inactivation of virus by UV light was performed as previously described (16) and verified by both IE1 expression (Fig. 1) and cytopathic effect. No plaques were observed after 10 days in culture, confirming that the virus was completely inactivated (data not shown).

The plasmid pRcRSV204dmRb (p204dm) was constructed as previously described (12). The *Ifl204* promoter vector (p204Luc) was constructed by subcloning the *Ifl204* promoter region (*HindIII*-*XbaI* segment, 1277 bp in length, blunt-ended) from a Lambda FIX II genomic clone into the *SmaI* site of pGL3Basic (Promega) luciferase reporter plasmid.

Mouse embryo fibroblasts 3T3 were kindly provided by T. Upton (Dana-Farber Cancer Institute) and cultured as previously described (12). Cells were transfected by lipofectamine and a pooled cell population of neomycin-resistant clones at 12–14 days were designated p204dmMEF when transfected with a vector encoding the p204 mutated at both Rb-binding sites (p204dm) or neoMEF when transfected with the empty vector (pRcRSV, Invitrogen), as previously described (12). For transient transfections with p204Luc, MEF were infected with MCMV at a m.o.i. of 2 at 48 h after transfection and at the indicated time points luciferase activity was measured as previously described (16).

Rabbit polyclonal monospecific Abs raised against the C-terminal moiety of p204 and the viral IE-1 protein have been previously described (8, 9). The presence of the MCMV DNA polymerase was detected with polyclonal monospecific Abs raised by injecting rabbits with the purified GST-DNApol C-terminus (amino acids 791–1031) fusion protein. The sera obtained after the

animals were bled 1 week after the fourth immunization were purified on a protein A affinity column (Pharmacia) according to the specifications of the supplier. Mouse IFN- α/β and sheep polyclonal Abs directed against mouse IFN- α/β were from ICN and RDI, respectively. Monoclonal anti-actin Abs (Boehringer) were used as an internal control.

For Western blotting analysis, total cell extracts prepared by lysing in 3% SDS-lysis buffer were separated on 8.5% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF membrane (Amersham) as previously described (13). Total cellular RNA was isolated by using the total RNA extraction solution EUROzol (EUROclone). One microgram of total RNA was reversed-transcribed into mRNA-dependent cDNA by using Moloney murine leukemia virus RT (Ambion Inc.). A 1- μ g aliquot for each sample served as a non-RT control for genomic contamination in subsequent PCRs. Equivalent amounts of cDNA were then subjected to PCR analysis performed in a Hybaid PCR Express Thermal cycler. The *Ifl204* primers (sense, 5'AAAGAGACAACCAAGAGCAATACACC3') and antisense, 5'GAATGTTAGATGAAGCCGAAGATGAG3') amplified a 567-bp fragment. The β -actin primers amplified a 348-bp fragment. For amplification of the DNA fragments, a cycle number in the middle of the linear amplification range (with a minimum of 25 and a maximum of 35 cycles) was used. The reaction mixtures for each sample were added to a tube containing 50 pmol each of the oligonucleotide primers for amplification of both *Ifl204* and β -actin. PCR was carried out as follows: a 5-min denaturation step at 95°C followed by 30 cycles of 95°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s, followed by 72°C for 5 min to allow for complete extension. Under these conditions, amplification of *Ifl204* and β -actin product is in the exponential phase and the assay is linear with respect to the amount of input RNA. Water controls in which all components of the RT-PCR were present, except RNA, were also included. PCR products were electrophoresed on 1.5% agarose and stained with ethidium bromide for visualization. Quantification was performed by scanning the specific bands and measuring the density and the width of each PCR product by using Quantity One software (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA).

For the analysis of DNA content, cells were infected with MCMV at a m.o.i. of 2. At the time of harvest, cells were washed with PBS, counted, and stored at 4°C in PBS with 40% ethanol. DNA content was determined by flow cytometry following staining of the cells with propidium iodide as described previously (13).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from A.I.R.C., the Italian AIDS Research Project, MURST-CNR Biotechnology Program L. 95/96, and the Ministry of Public Health.

REFERENCES

1. Boldogh, I., AbuBakar, S., Deng, C. Z., and Albrecht, T. (1991). Transcriptional activation of cellular oncogenes *fos*, *jun*, and *myc* by human cytomegalovirus. *J. Virol.* 65, 1568–1571.
2. Boyle, K. A., Pietropaolo, R. L., and Compton, T. (1999). Engagement of the cellular receptor for glycoprotein B of human cytomegalovirus activates the interferon-responsive pathway. *Mol. Cell Biol.* 19, 3607–3613.
3. Bresnahan, W. A., Boldogh, I., Thompson, E. A., and Albrecht, T. (1996). Human cytomegalovirus inhibits cellular DNA synthesis and arrest productively infected cells in late G1. *Virology* 224, 150–160.
4. DeMarchi, J. M. (1983). Correlation between stimulation of host cell DNA synthesis by human cytomegalovirus and lack of expression of a subset of early virus gene. *Virology* 129, 274–286.
5. DeMarchi, J. M., and Kaplan, A. S. (1976). Replication of human cytomegalovirus DNA. Lack of dependence on cell DNA synthesis. *J. Virol.* 18, 1063–1070.
6. Dittmer, D., and Mocarski, E. S. (1997). Human cytomegalovirus infection inhibits G₁/S transition. *J. Virol.* 71, 1629–1634.
7. Fortunato, E. A., McElroy, A. K., Sanchez, I., and Spector, D. H. (2000). Exploitation of cellular signaling and regulatory pathways by human cytomegalovirus. *Trends Microbiol.* 8, 111–119.
8. Gariglio, M., De Andrea, M., Lembo, M., Ravotto, M., Zappador, C., Valente, G., and Landolfo, S. (1998). The murine homolog of the HIN 200 family, Ili 204, is constitutively expressed in myeloid cells and selectively induced in the monocyte/macrophage lineage. *J. Leukocyte Biol.* 64, 608–614.
9. Gariglio, M., Foresta, P., Sacchi, C., Lembo, D., Hertel, L., and Landolfo, S. (1997). Suppression of high mobility group protein T160 expression impairs mouse cytomegalovirus replication. *J. Gen. Virol.* 78, 665–670.
10. Gribaudo, G., Riera, L., Lembo, D., De Andrea, M., Gariglio, M., Rudge, T. L., Johnson, L. F., and Landolfo, S. (2000). Murine cytomegalovirus stimulates cellular thymidylate synthase gene expression in quiescent cells and requires the enzyme for replication. *J. Virol.* 74, 4979–4987.
11. Gribaudo, G., Riera, L., Bertetti, G. L., and Landolfo, S. (1999). The antiproliferative activity of the murine interferon-inducible Ili 200 proteins depends on the presence of two 200 amino acid domains. *FEBS Lett.* 456, 31–36.
12. Hertel, L., De Andrea, M., Azzimonti, B., Rolle, S., Gariglio, M., and Landolfo, S. (1999). The interferon-inducible 204 gene, a member of the Ili 200 family, is not involved in the antiviral state induction by IFN- α , but is required by the mouse cytomegalovirus for its replication. *Virology* 262, 1–8.
13. Hertel, L., Rolle, S., De Andrea, M., Azzimonti, B., Osello, R., Gribaudo, G., Gariglio, M., and Landolfo, S. (2000). The retinoblastoma protein is an essential mediator that links the interferon-inducible 204 gene to cell-cycle regulation. *Oncogene* 19, 3598–3608.
14. Jault, F. M., Jault, J.-M., Ruchti, F., Fortunato, E. A., Clark, C., Corbeil, J., Richman, D. D., and Spector, D. H. (1995). Cytomegalovirus infection induces high levels of cyclins, phosphorylated Rb, and p53, leading to cell cycle arrest. *J. Virol.* 69, 6697–6704.
15. Landolfo, S., Gariglio, M., Gribaudo, G., and Lembo, D. (1998). The Ili 200 genes: An emerging family of IFN-inducible genes. *Biochimie* 80, 721–728.
16. Lembo, D., Gribaudo, G., Hofer, A., Riera, L., Cornaglia, M., Mondo, A., Angeretti, A., Gariglio, M., Thelander, L., and Landolfo, S. (2000). Expression of an altered ribonucleotide reductase activity associated with the replication of murine cytomegalovirus in quiescent fibroblasts. *J. Virol.* 74(24), 11557–11565.
17. Lembo, M., Sacchi, C., Zappador, C., Bellomo, G., Gaboli, M., Pandolfi, P. P., Gariglio, M., and Landolfo, S. (1998). Inhibition of cell proliferation by the interferon-inducible 204 gene, a member of the Ili 200 cluster. *Oncogene* 16, 1543–1551.
18. Lu, M., and Shenk, T. (1996). Human cytomegalovirus infection inhibits cell cycle progression at multiple points, including the transition from G₁ to S. *J. Virol.* 70, 8850–8857.
19. Navarro, L., Mowen, K., Rodems, S., Weaver, B., Reich, N., Spector, D., and David, M. (1998). Cytomegalovirus activates interferon immediate-early response gene expression and an interferon regulatory factor 3-containing interferon-stimulated response element-binding complex. *Mol. Cell Biol.* 18, 3796–3802.
20. Salvant, B. S., Fortunato, E. A., and Spector, D. H. (1998). Cell cycle dysregulation by human cytomegalovirus: Influence of the cell cycle phase at the time of infection and effects on cyclin transcription. *J. Virol.* 72, 3729–3741.
21. Zhu, H., Cong, J., and Stenk, T. (1997). Use of differential display analysis to assess the effect of human cytomegalovirus infection on the accumulation of cellular RNAs. Induction of interferon-responsive RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13985–13990.

PARTE B

I Papillomavirus.

Le verruche genitali (*condyloma acuminata*) sono state documentate fin dal tempo di Ippocrate, e quelle cutanee dal primo secolo AD. Tuttavia, fino alla fine del diciottesimo secolo la loro natura infettiva rimase sconosciuta. Nel 1891 Payne dimostrò per la prima volta che le verruche cutanee erano trasmissibili. Nel 1901 Heidingsfeld descrisse invece la trasmissione dei condilomi attraverso contatto sessuale. Nel 1949 Strauss e collaboratori isolarono l'agente responsabile delle verruche, il papillomavirus umano (HPV) (Syrjanen e al., 2000).

Le infezioni da papillomavirus sono state associate sia a lesioni maligne che benigne. Le lesioni benigne comprendono le comuni verruche (*verruca vulgaris*), le verruche plantari, i condilomi genitali, lesioni della bocca, del naso e della gola, papillomatosi della congiuntiva e neoplasie cervicali intraepiteliali. Il virus è stato anche associato alle epidermodisplasia verruciforme, un malattia non ereditaria in cui i pazienti sviluppano cancro alla pelle dopo esposizione solare. Le lesioni maligne includono carcinomi squamosi orali e respiratori, tumori anogenitali e della cervice uterina.

Ad oggi non esiste una terapia definitiva per le infezioni da HPV. I trattamenti correnti includono ablazione tissutale, chemioterapia e immunomodulazione, anche se sono al vaglio di test clinici numerosi tipi di vaccino.

Struttura

I papillomavirus umani appartengono alla famiglia *papillomaviridae*, che include anche papillomavirus infettanti altre specie (Howley e al., 2001). Sono virus privi di rivestimento e a simmetria icosaedrica, con 72 capsomeri formanti la superficie esterna, organizzati nella proteina capsidica maggiore e minore. Il

genoma consiste di un DNA a doppia elica, circolare, lungo circa 8 kb e codificante per nove geni in parte sovrapposti (figura 2). Contiene inoltre una singola regione di controllo. I geni sono distribuiti in una regione precoce (E1-E7) ed in una tardiva (L1 e L2). I geni precoci codificano per proteine coinvolte nel controllo della replicazione e trascrizione del DNA virale e sono responsabili delle capacità trasformanti degli HPV ad alto rischio. I geni L1 e L2 codificano invece rispettivamente per la proteina capsidica maggiore e minore.

La proteina E1 possiede attività ATPasica ed elicastica, esercitando le funzioni di promuovere la replicazione virale e di inibire l'integrazione nel menoma dell'ospite (Frattoni e al., 1996; Dixon e al., 2000).

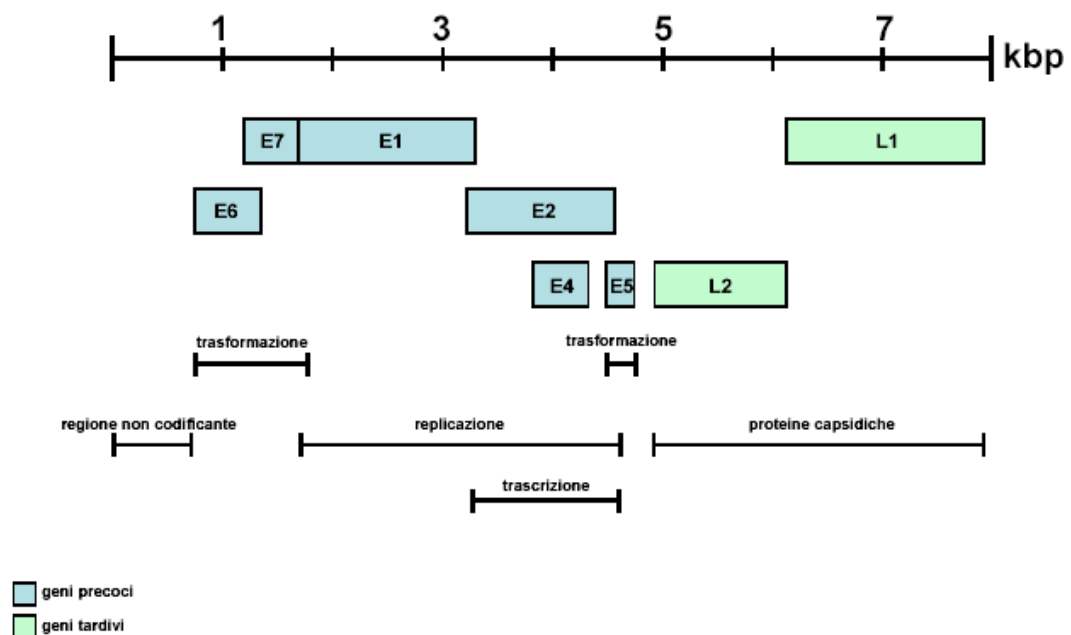


Figura 2. Organizzazione genomica di HPV16.

La proteina E2 aumenta in modo significativo l'affinità di E1 per l'origine di replicazione virale ed infatti è stato dimostrato che la presenza di entrambe le proteine è necessaria e sufficiente per indurre la replicazione del DNA virale

(Chiang e al., 1992). Inoltre, E2 possiede un ruolo nella trascrizione del virus. E' stato dimostrato che E2 è in grado di inibire la crescita cellulare *in vitro* in cellule che contengono gli HPV ad alto rischio 16 e 18 (Dowhanick e al., 1995) . Questi dati suggeriscono che la proteina E2 svolge un ruolo importante nel prevenire la trasformazione oncogenica delle cellule infettate.

La proteina E4 sembra essere associata con il collasso del sistema delle citocheratine cellulari e con la conseguente fuoriuscita della virus dalla cellula (Doorbar e al., 1991). Non sembra comunque essere necessaria per il processo di trasformazione.

La proteina E5 può causare trasformazione tumorigenica *in vitro*, in modo del tutto indipendente, probabilmente in seguito a modificazioni delle vie dei fattori di crescita (DiMaio e al., 1994). Essa può infatti legarsi ai recettori per il PDGF e per l'EGF, attivandoli in modo costitutivo (Cohen e al., 1993).

Il potenziale oncogeno degli HPV ad alto rischio è comunque maggiormente legato alle proteine E6 ed E7. I cheratinociti terminalmente differenziati perdono la capacità di replicare il DNA. E6 ed E7 permettono al virus di usare le proteine

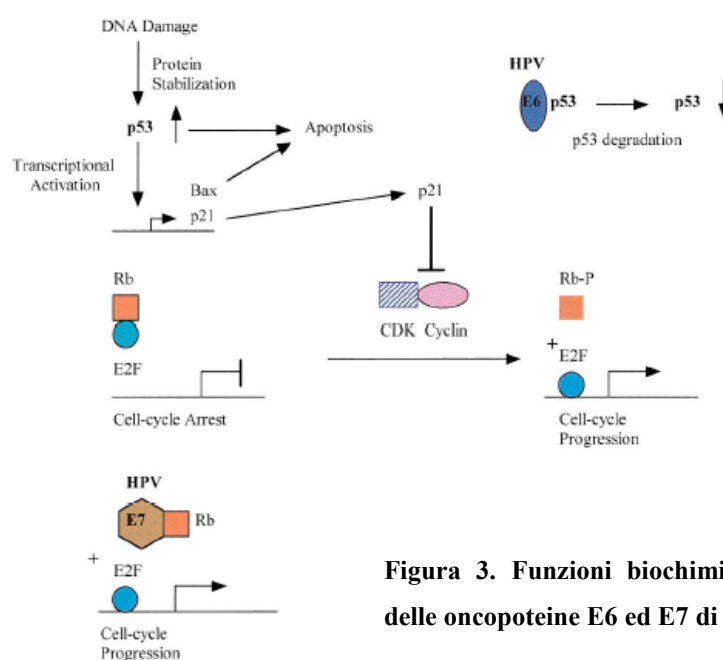


Figura 3. Funzioni biochimiche e biologiche delle oncoproteine E6 ed E7 di HPV.

cellulari per la propria continua replicazione arrestando, nel contempo, il processo di differenziazione dei cheratinociti. In particolare, queste proteine sono in grado di inibire le funzioni rispettivamente di p53 e pRb (Scheffner e al., 1993; Boyer e al., 1996). Diversi studi suggeriscono che E6 (in particolare degli HPV ad alto rischio) è in grado di legare p53 con grande affinità, aumentandone la degradazione (Gu e al., 2001). Come p53, anche pRb gioca un ruolo molto importante nel controllo del ciclo cellulare. Nella sua forma ipofosforilata, pRb rilascia E2F che stimola la progressione del ciclo cellulare (Hartwell e al., 1994). Il legame tra E7 e pRb agisce in modo simile alla ipofosforilazione. Inoltre, E7 di HPV16 promuove la degradazione di pRb (Giarre e al., 2001).

Numerosi lavori hanno poi dimostrato che E6 ed E7 sono in grado di inibire l'espressione dei geni interferon-inducibili e degli interferoni stessi, limitando la risposta immune all'infezione virale (Lee e al., 2001; Nees e al., 2001).

Patogenesi

Tutti gli HPV infettano cellule epiteliali squamose. Le infezioni cominciano con l'entrata del virus attraverso l'epitelio traumatizzato e quindi seguono uno dei tre seguenti destini: infezione latente, in cui non c'è evidenza microscopica della malattia; infezione subclinica, in cui la colposcopia o l'indagine microscopica rivelano l'infezione in assenza di malattia clinica; malattia clinica vera e propria.

Molte infezioni da HPV genitale sono latenti o subcliniche (Koutsky e al., 1997). Nelle infezioni cliniche o subcliniche, i geni precoci sono espressi nello strato basale dell'epitelio. La traduzione delle proteine tardive avviene nei cheratinociti terminalmente differenziati, mentre le proteine precoci controllano la trascrizione e traduzione cellulari.

Le evidenze cliniche ed istopatologiche delle infezioni da HPV solitamente si evidenziano dopo 1-8 settimane dall'esposizione. In assenza di trasformazione, il virus segue il suo normale ciclo di riproduzione: adesione, penetrazione, trascrizione-traduzione dei geni virali, replicazione del proprio genoma, assemblaggio ed uscita (Tyler e al., 1990). Le manifestazioni fisiche dell'infezione includono la riduzione dello spessore dell'epidermide, una iperplasia dello strato spinoso ed ipercheratosi.

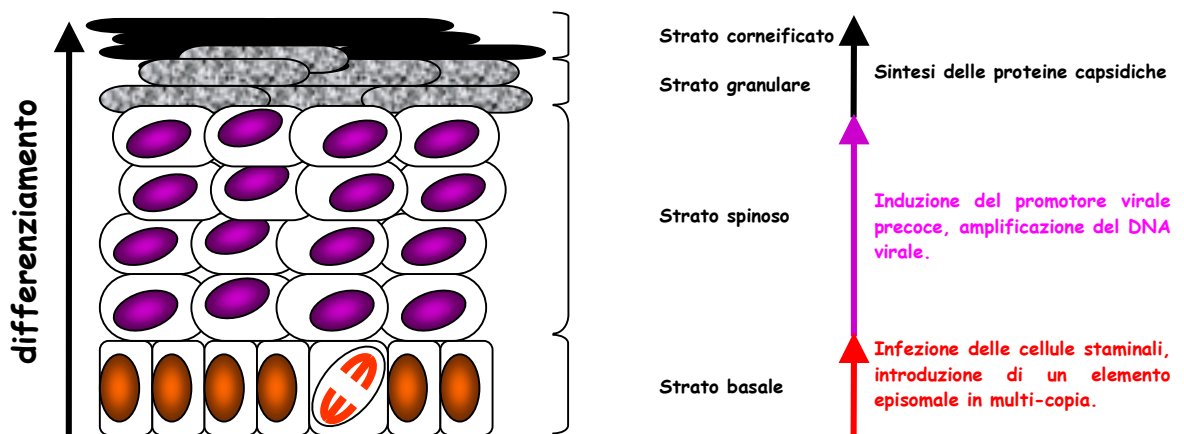


Figura 4. Ciclo vitale dei papillomavirus nell'epitelio.

Non trattate, queste lesioni possono regredire spontaneamente, persistere come lesioni benigne o progredire in lesioni precancerose ed eventualmente in cancro (Carr e al., 2000)

Il modo in cui gli HPV ad alto rischio portano alla trasformazione oncogena non è chiaro. L'evidenza corrente è che il processo di trasformazione richiede l'integrazione del genoma virale nel DNA dell'ospite (Kalantari e al., 2001). Sebbene il sito di integrazione non sia specifico, il genoma circolare spesso presenta delle rotture nella regione E1-E2, con conseguente perdita di controllo

trascrizionale dei geni precoci E6 ed E7. Il potenziale carcinogenico ne risulta così considerevolmente aumentato, anche se altri fattori sono necessari per la formazione del carcinoma nelle cellule infettate (Jackson e al., 1993).

Epidermodisplasia Verruciforme.

L'Epidermodisplasia Verruciforme (EV) è una genodermatosi rara associata all'infezione da parte di specifici Papillomavirus cutanei umani (Orth et al., 2001). La malattia è familiare, ed è sicuramente in relazione con un difetto genetico non ancora ben conosciuto.

E' una patologia rara che si manifesta con la comparsa di numerosissime verruche cutanee che diffondendosi arrivano a coinvolgere tutta la cute del soggetto (vi è quindi una incapacità alla risoluzione spontanea). I soggetti con EV presentano un'elevata frequenza di degenerazione maligna delle verruche in carcinomi cutanei di tipo squamocellulare, che avviene solo nelle parti cutanee esposte alla luce solare (Boxman et al., 2000).

E' una condizione familiare la cui precisa incidenza è difficile da determinare a causa della sua manifestazione sporadica. La sua modalità di trasmissione è autosomica recessiva, infatti è stata individuata un'alta frequenza di consanguineità nei pazienti affetti da questa malattia.(Lutzner, 1978)

L'EV è caratterizzata da una suscettibilità nei confronti dell'infezione da parte del Papillomavirus umano (HPV); si presuppone infatti che nei pazienti con EV ci sia un difetto associato ad un gene soppressore sconosciuto, il quale è presente anche nei soggetti sani (Antonsson et al., 2000), ma nei quali è in grado di prevenire le infezioni da parte degli EV HPV.

Epidemiologia

I pazienti EV presentano frequentemente più di un tipo di HPV (infezioni multiple). Le lesioni benigne presenti in EV sono causate da numerosi genotipi (HPV-27, HPV-29, HPV-37, HPV-38, HPV-46, HPV-48, HPV-49) mentre i

tumori cutanei generalmente sono associati solo a due tipi di HPV, ovvero all'HPV-5 e all' HPV-8. Sebbene gli HPV non siano in grado di dare manifestazioni cliniche evidenti negli individui normali, esse si possono invece riscontrare nei pazienti immunodepressi (in particolar modo nei soggetti affetti da HIV); in essi si osservano lesioni caratterizzate da pitiriasi versicolor e verruche, quest'ultime associate agli HPV-3 e HPV-10. I pazienti immunodepressi sviluppano inoltre tumori maligni correlati all'EV HPV così confermando il ruolo oncogeno di questi virus (De Villiers, 2000)

Manifestazioni cutanee

Le lesioni cutanee sono polimorfiche e caratterizzate da macchie rosse, incolori o marroncine simili alle placche della pitiriasi versicolor (PV) o da lesioni simili a verruche piane, generalmente appiattite e più abbondanti rispetto a quelle della popolazione generale, sviluppate soprattutto in larghezza e disseminate in tutto il corpo. Si localizzano sul dorso delle mani, sugli avambracci, sulle gambe e sul tronco. Mentre sul volto e sulle estremità le lesioni sono simili a verruche, sul tronco prevalgono placche rosse. La struttura istologica dei cheratinociti localizzati negli strati superficiali dell'epidermide è molto specifica: notevoli dimensioni, con un nucleo vacuolato e citoplasma ialino contenente granuli rotondi di cheratoialina. Questo effetto citopatico è già stato dimostrato per tutti gli HPV, indipendentemente dal genotipo. La microscopia elettronica evidenzia nuclei chiari e la presenza di particelle virali cristalline.

Il corso naturale della malattia può essere caratterizzato dalla evoluzione di EV in SSC. I cambiamenti cutanei non sono evidenti fino all'età di 5–8 anni, sebbene in alcuni pazienti possano manifestarsi placche rosse sul tronco. Se infettati esclusivamente con EV HPV, i soggetti EV presentano buone condizioni

generali, in quanto non mostrano infezioni concomitanti; diversamente i pazienti infettati con EV HPV e con HPV-3 sono inclini alle infezioni batteriche e virali (alcuni pazienti hanno riportato anche ritardo mentale).

Le prime manifestazioni maligne, invece, si manifestano generalmente nella 4° decade della vita e sono caratterizzate da cheratosi attinica e da cellule squamose precoci microinvasive carcinomatose del tipo di Bowen, lentamente trasformanti in tumori invasivi. Le manifestazioni cliniche HPV indotte si presentano presto nel corso della vita nella maggior parte degli individui immunodeficienti, dopodiché è possibile che l'infezione possa mantenersi latente per un periodo variabile, anche se più della metà dei pazienti osservati per 20–30 anni ha sviluppato tumori cutanei, cheratosi attinica e malattia di Bowen.

La localizzazione preferenziale per le lesioni pre-maligne è la fronte, mentre le placche rosse sono localizzate in modo specifico, anche su palpebre e collo; raramente segue la trasformazione maligna. I tumori cutanei, invece, iniziano a svilupparsi dopo i 30 anni, generalmente sulla fronte e nelle aree traumatizzate; possono essere microinvasivi o invasivi con possibile azione locale distruttiva; se non trattati con raggi x crescono lentamente senza provocare metastasi.

Sono state recentemente identificate mutazioni non senso in due geni adiacenti chiamati EVER 1 ed EVER 2 (Ramos et al., 2002) e sono state associate all' EV in 3 famiglie consanguinee algerine e 2 colombiane. Gli individui malati appartenenti alle 2 famiglie algerine e a quella colombiana mostrano mutazioni omozigoti non senso di EVER 1. Nell'altra famiglia algerina ed in quella colombiana gli individui omozigoti presentano mutazioni omozigoti di EVER 2.

Recentemente sono state osservate due nuove mutazioni nel gene EVER 1 in un paziente giapponese affetto da EV.

Analisi di sequenza hanno mostrato che EVER 1 (20 esoni) ed EVER 2 (16 esoni) sono proteine integrali di membrana con rispettivamente 10 e 8 presunti domini transmembrana.

Non è ancora chiaro se EVER 1 ed EVER 2 possano essere coinvolte nell'interazione tra cheratinociti epidermici e gli HPV o nella risposta immune innata di adattamento che conduce alla risoluzione dell'infezione (Azzimonti et al., 1999).

Nello studio accettato per la pubblicazione dalla rivista *Arch. Dermatol.* e intitolato **“CD8⁺ T cells lymphocytopenia and lack of EVER mutations in a patient with clinically and virologically typical epidermodysplasia verruciformis”** un paziente affetto da Epidermodisplasia verruciforme è stato analizzato e caratterizzato dal punto di vista clinico, virologico, immunologico e molecolare.

E' stata valutata la presenza di mutazioni nei geni EVER 1 ed EVER 2 indicate da alcuni autori come fattori di suscettibilità ed è stato analizzato l'immunofenotipo del paziente. Dal momento che è stato dimostrato il coinvolgimento dei papillomavirus umani (HPV) nello sviluppo dei tumori cutanei in pazienti con questa rara malattia ereditaria, è stata condotta un'analisi in PCR per determinare quali tipi di HPV avessero infettato il paziente.

Gli HPV cutanei possiedono una debole capacità trasformante e non sono in grado di immortalizzare i cheratinociti primari umani. Avendo osservato sul paziente la trasformazione maligna delle lesioni nelle aree cutanee fotoesposte e non potendo escludere che l'aumentata suscettibilità ai raggi UV possa giocare un ruolo preminente nell'immunosoppressione locale e nell'aumentata replicazione dell'HPV, sono state allestite colture di cheratinociti primari e fibroblasti immortalizzati con retrovirus ricombinanti esprimenti E6 ed E7 di HPV16 per chiarire la non ben nota relazione tra i raggi UV e l'insorgenza della malattia.

Entrambe le linee sono state ricavate dal paziente EV, al fine di valutare gli effetti degli UVB in termini di proliferazione cellulare e produzione di citochine.

Inoltre esiste anche una forma sporadica di EV i cui fattori genetici predisponenti sono completamente ignoti. Sulla base dei risultati ottenuti è stato possibile ritenere che il paziente preso in esame rappresenti una forma di EV con caratteristiche particolari che la rendono eccezionale, rappresenta infatti il primo caso di EV con carenza di linfociti T CD8+ ed assenza di mutazioni nei geni EVER1 ed EVER2.

BIBLIOGRAFIA

Antonsson A, Forslund O, Ekberg H, Sterner G, Hansson BG. (2000) The ubiquity and impressive genomic diversity of human skin papillomaviruses suggest a commensalic nature of these viruses. *J of Virol.* 74 -11636-11641.

Azzimonti B, Hertel H, Pia F, Monga G, Zocchi M, Landolfo S, Gariglio M. (1999) Demonstration of multiple HPV types in laryngeal premalignant lesion using polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *J Of Med. Vir.* 59, 110-116.

Boyer SN, Wazer DE, Band V (1996) E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* 56, 4620-4624.

Boxman IL, Russell A, Mulder LH, Bouwes Bavinc JN, Schegget J, Green A. (2000) Case-control study in a subtropical australian population to assess the relation between nonmelanoma skin cancer and epidermodysplasia verruciformis human papillomavirus DNA in plucked eyebrow hairs. *Int J Cancer*, 86, 118-121.

Carr J, Gyorfı T (2000) Human papillomavirus: epidemiology, transmission and pathogenesis. *Clin Lab Med* 20, 235-255.

Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT (1992) Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 5799-5803.

Cohen BD, Goldstein DJ, Rutledge L, Vass WC, Lowy DR, Schlegel R, Schiller JT (1993) Transformation-specific interaction of the bovine papillomavirus E5 oncoprotein with the platelet-derived growth factor receptor transmembrane domain and the epidermal growth factor receptor cytoplasmic domain. *J Virol* 67, 5303-5311.

De Villiers EM. (1998) Human papillomavirus infections in skin cancers. *Biomed Pharmacother.* 52, 26-33.

DiMaio D, Petti L, Hwang E (1994) The E5 transforming proteins of the papillomaviruses. *Seminars in Virology* 5, 369-379.

Dixon EP, Pahel GL, Rocque WJ, Barnes JA, Lobe DC, Hanlon MH, Alexander KA, Chao SF, Lindley K, Phelps WC (2000) The E1 helicase of human papillomavirus type 11 binds to the origin of replication with low sequence specificity. *Virology* 270, 345-357.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature* 352, 824-827.

Dowhanick JJ, McBride AA, Howley PM (1995) Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J Virol* 69, 7791-7799.

Frattini MG, Lim HB, Laimins LA (1996) In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation-dependent late expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 3062-3067.

Giarre M, Caldeira S, Malanchi I, Ciccolini F, Leao MJ, Tommasino M (2001) Induction of pRb degradation by the human papillomavirus type 16 E7 protein is essential to efficiently overcome p16INK4a-imposed G1 cell cycle arrest. *J Virol* 75, 4705-4712.

Gu J, Rubin RM, Yuan ZM (2001) A sequence element of p53 that determines its susceptibility to viral oncoprotein-targeted degradation. *Oncogene* 20, 3519-3527.

Hartwell LH, Kastan MB (1994) Cell cycle control and cancer. *Science* 266,1821-1828.

Howley PM, Lowy DR (2001) Papillomaviruses and their replication. In: *Knipe DM, Howley PM, editors. Fields virology, vol. 2, 4th edition. Philadelphia: Lipincott, Williams and Wilkins, 2197-2229.*

Jackson ME, Campo MS, Gaukroger JM (1993) Cooperation between papillomavirus and chemical cofactors in oncogenesis. *Crit Rev Oncog* 4, 277-291.

Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B (2001) Physical state ofHPV16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 10, 46-54.

Koutsky L (1997) Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* 102, 3-8.

Lee SJ, Cho YS, Cho MC, Shim JH, Lee KA, Ko KK, Choe YK, Park SN, Hoshino T, Kim S, Dinarello CA, Yoon DY (2001) Both E6 and E7 oncoproteins of human papillomavirus 16 inhibit IL-18-induced IFN- γ production in human peripheral blood mononuclear and NK cells. *J Immunol* 167, 497-504.

Lutzner M. (1978) Epidermodysplasia verruciformis: an autosomal recessive disease characterized by viral warts and skin cancer- a model for viral oncogenesis. *Bull Cancer* 65, 169-182.

Nees M, Geoghegan JM, Hyman T, Frank S, Miller R, Woodworth CD (2001) Papillomavirus type 16 oncogenes downregulate expression of interferon-responsive genes and upregulate proliferation-associated and NF- κ B-responsive genes in cervical keratinocytes. *J Virol* 75, 4283-4296.

Orth G., Favre M., Majewski S., Jablonska S. (2001) Epidermodysplasia Verruciformis defines a subset of cutaneous human papillomaviruses, *Letters to the Editor, Journal of virology*, 4952-4953.

Ramoz N, Rueda L, Bouadjar B, Montoya L, Orth G, Favre.(2002) Mutations in two novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat. Genetics*. 32, 579-581.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM (1993) The HPH-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.

Syrjanen K, Syrjanen S (2000) Historical overview of papillomavirus research: papillomavirus infections in human pathology. *New York: John Wiley & Sons Ltd*, 1.

Tyler K, Fields B (1990) Pathogenesis of viral infections. *In: Fields B, Knipe DM, editors. Fields virology, vol. 1, 2nd edition. New York: Raven Press*, 191.

CORRESPONDENCE-VIGNETTE

CD8⁺ T cells lymphocytopenia and lack of *EVER* mutations in a patient with clinically and virologically typical epidermodysplasia verruciformis.

Barbara Azzimonti, PhD; Michele Mondini, PhD; Marco De Andrea, PhD; Daniela Gioia, PhD; Umberto Dianzani, MD, PhD; Riccardo Mesturini, PhD; Giorgio Leigheb, MD; Rossana Tiberio, MD; Santo Landolfo MD, and Marisa Gariglio, MD, PhD *.

From the Department of Medical Sciences (Drs Azzimonti, Gioia, Dianzani, Mesturini, Leigheb, Tiberio and Gariglio) Medical School of Novara-Italy; Department of Public Health and Microbiology (Drs Mondini, De Andrea and Landolfo) Medical School of Turin-Italy.

* Corresponding author: Dr. Marisa Gariglio, Department of Medical Sciences, Medical School of Novara, Via Solaroli 17 – 28100 Novara Italy.

e-mail gariglio@med.unipmn.it

fax +39- 0321-620421

tel +39-0321-660649

In this study, we investigated some virologic, immunologic and clinical parameters of a patient with Epidermodysplasia verruciformis (EV), an infrequently reported clinical lifelong entity, characterized by: i) highly polymorphic cutaneous lesions starting in early childhood with widespread, long lasting, pityriasis versicolor-like macules and flat, wart-like papules that can undergo malignant transformation; and ii) abnormal susceptibility to human papillomavirus (HPV) infection that are considered to be harmless for the general population; iii) mental retardation in some and immunologic abnormalities in most cases.^{1,2}

Report of a case. A 37-year-old mentally retarded man was admitted to our hospital with a diagnosis of EV associated with its malignant conversion. There is no known history of EV in other family members, but he was the result of a consanguineous marriage. Physical examination of the patient revealed multiple flat whitish papular lesions on the hands and forearms, and disseminated brownish pityriasis versicolor-like lesions on the whole body. He underwent total resection of two crusty and partially exudative erythematous lesions on the forehead, which were histologically diagnosed as SCC and Bowen's disease respectively. In spite of the almost generalized skin involvement, genital and buccal mucosa were not involved. Moreover, genetic analysis for *EVER1* (20 exons) or *EVER2* (16 exons) gene mutations did not detect any mutations that would result in a loss of function.³ Physical examination of his parents did not reveal any significant skin lesions and their general condition was satisfactory.

Human papillomavirus DNA analysis was performed from both formalin-fixed paraffin-embedded surgical specimens and skin-swabs collected with prewetted cotton-tipped swabs from different sites of the skin corresponding to either affected or unaffected areas. Table 1 illustrates the results obtained by PCR analysis.⁴

Immunophenotype analysis of PBMC was performed in the patient and his parents by immunofluorescence and flow cytometry. As illustrated in Figure 2 panel A, the EV patient displayed reduced counts of total T cells (CD3⁺ cells) with moderate decrease of CD4⁺ T cells and striking decrease of CD8⁺ T cells (2%). Despite the striking CD8⁺ lymphocytopenia, neither opportunistic infections or known immunosuppression forms were observed and patient condition was satisfactory. Proliferation assays of peripheral blood mononuclear cell (PBMC), from EV patient and his parents, stimulated with PHA, anti-CD3 mAb, or anti-CD3 mAb plus B7.1-Ig, showed that he was almost unresponsive to all stimuli. The supernatants were examined for cytokines production and the results obtained are illustrated in Figure 2 panel B. NK activity was in the normal range in both EV patient and his parents. The patient did not develop contact allergy to dinitrochlorobenzene sensitization and the intradermal response to Candida antigens and PPD were also negative. By contrast, his parents did develop contact allergy and were reactive to the antigenic stimuli.

COMMENT

This paper is the first to describe a clinically and virologically typical case of EV presenting the peculiar features of lack of *EVER* gene mutations, virtually no change in CD4⁺ T cell counts and a noteworthy decrease in CD8⁺ T cell levels, suggesting the possibility of variant forms of EV.⁵

Acknowledgment

We wish to thank Gerard Orth, Institut Pasteur, Paris-France for his contribution to *EVER* genes sequencing. This work was supported by Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC), Lega italiana per la lotta contro i tumori, section of Novara, Special Project Oncology "Compagnia di San Paolo", and MIUR ("Program 40%" to S.L. and M.G.). M.M. is a recipient of a Research Fellowship from the Fondazione Internazionale di Ricerca in Medicina Sperimentale, Turin.

References

1. De Oliveira WRP, Festa Neto C, Rady PL, Tying SK. Clinical aspects of epidermodysplasia verruciformis. *JEADV*. 2003; 17:394-398.
2. Jablonska S, Majewski S. Epidermodysplasia verruciformis: immunological and clinical aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 1994; 186:157-173.
3. Ramoz N, Rueda LF, Bouadjar B, Montoya L.S, Orth G, Favre M. Mutations in two adjacent novel genes are associated with epidermodysplasia verruciformis. *Nat Gen*. 2002; 32:1-3.
4. Harwood CA, Spink PJ, Suretheran T, et al. Degenerate and nested PCR: a highly sensitive and specific method for detection of human papillomavirus infection in cutaneous warts. *J Clin Microbiol*. 1999; 37:3545-3555.

5. Aoyama H, Seki S, Abo T, Usuba Y, Tomita Y, Tagami H. Epidermodysplasia verruciformis accompanied by Familial Large Granular Lymphocytosis and a decrease in T lymphocytes. *Acta Derm Venereol (Stockh)*. 1993; 73:52-54.

Legend to Figures

Figure 1. Clinical, histologic and virologic findings of the EV patient. A, Advanced pre-malignant and early malignant lesions on the forehead. The temporal area shows a microinvasive squamous cell carcinoma. B, Biopsy specimen from the verruca plana-like papule shows the characteristic EV cytopathic effect with prominent vacuolating cells in the spinous and granular layers. C, HPV DNA presence in skin samples from different sites collected with a saline-soaked cotton-tipped swab and from paraffin-embedded EV patient's surgical specimens (previously stripped to remove superficial layers). PCR amplifications were performed with a combination of primer sets amplifying the L1 ORF including CP62/CP69 as an outer primer pair and additional nested primer pairs as previously described⁵.

Figure 2. Immunological analysis of the EV patient and his parents. A, Distribution of PBMC subpopulations. Similar results have been obtained from bleedings performed over one year period. B, Cytokine secretion by PBMC from EV patient, his mother, and his father vs healthy controls. PBMC were stimulated with anti-CD3 mAb (1µg/mL) in the presence or absence of B7.1-Ig, a soluble form of the CD28 ligand (1µg/mL), or with an optimal dose of PHA (1µg/ml). Each culture was performed in presence or absence of IL-2 (2 U/mL), as indicated. Cytokines were measured on day-2 culture supernatants using a cytometric bead array kit. Results are expressed as proportions of the cytokine

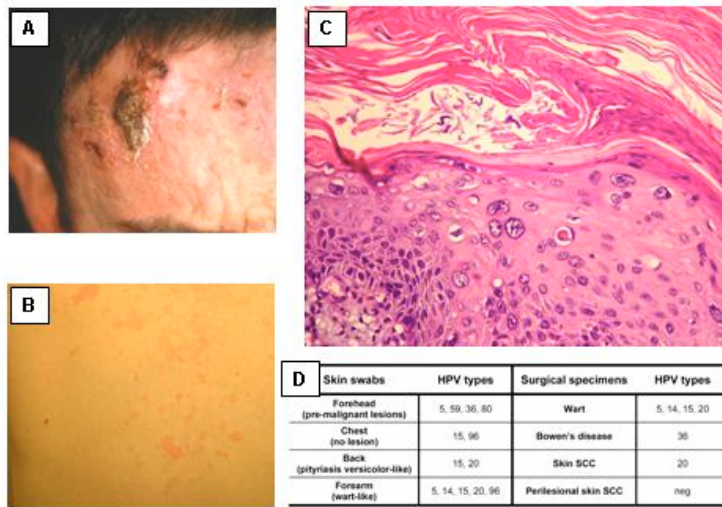


Figure 1. Azzimonti et al.

levels detected in each subject compared with the levels secreted by control PBMC activated in the same manner and run in parallel. They are averages of two experiments.

A	CD3	CD4	CD8	CD20	CD56	CD14
EV Patient	460 (34) ↓	430 (31)	30 (2) ↓	290 (21)	380 (27)	240 (18)
Mother	1200 (52)	1010 (44)	160 (7) ↓	184 (8)	322 (14)	780 (34)
Father	1160 (55)	930 (43)	230 (11)	480 (23)	170 (8)	570 (32)
Normal Range	570-2380 (52-85)	330-1680 (30-60)	120-1100 (11-38)	70-640 (6-23)	70-870 (6-31)	50-950 (5-35)

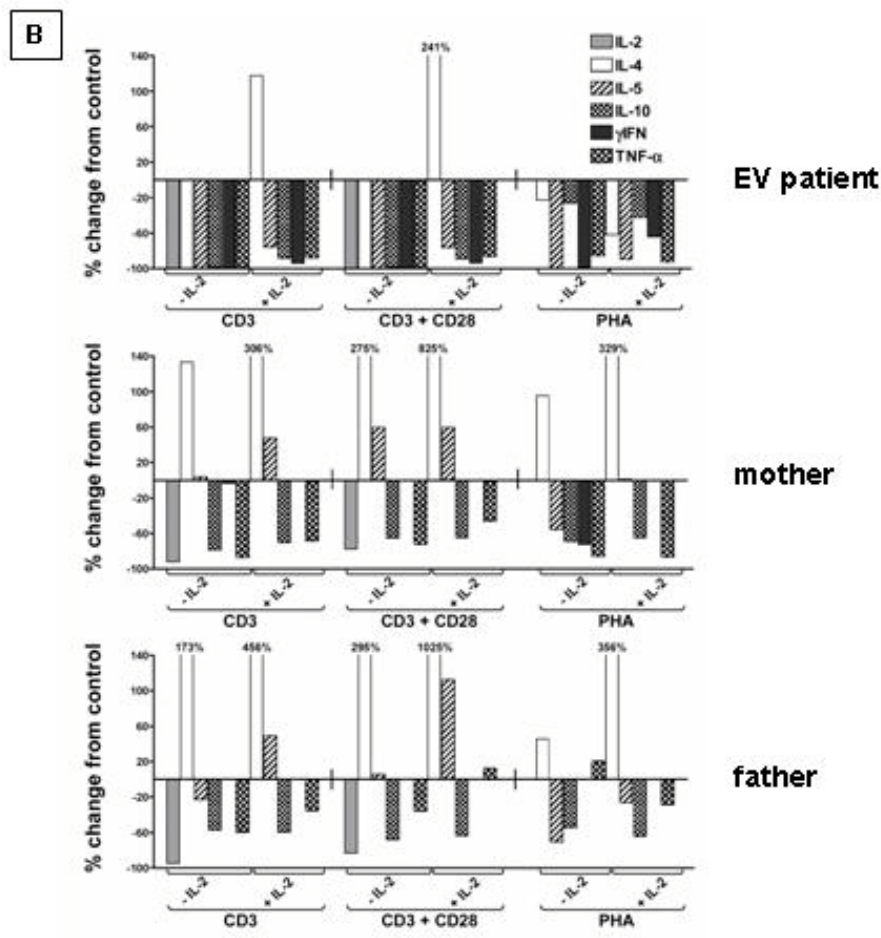


Figure 2. Azzimonti et al.

PARTE C

L'ANGIOGENESI

Introduzione

Con il termine angiogenesi si indica il processo di formazione di nuovi vasi sanguigni (Liekens et al., 2001). Nell'adulto il grado di proliferazione delle cellule endoteliali è molto basso, se paragonato a quello di numerosi altri tipi cellulari. Vi sono tuttavia alcune circostanze fisiologiche in cui l'angiogenesi avviene sotto stretta regolazione: nel sistema riproduttivo femminile e durante la cicatrizzazione delle ferite (Hyder et al., 1999). L'angiogenesi deregolata dà origine a differenti patologie (Folkman et al., 1995), come l'artrite reumatoide (Koch, 1995), la retinopatia diabetica (Ferrara et al., 1999), la psoriasi e ad emangiomi pediatrici (Powell, 1999). Infine, la crescita tumorale e le metastasi sono angiogenesi-dipendenti (Hanahan, 1998). Un tumore in crescita necessita di un'elevata ramificazione di capillari per apportare nutrienti ed ossigeno. Inoltre i capillari sanguigni all'interno della massa tumorale forniscono possibile una via alle cellule tumorali per entrare in circolo e metastatizzare organi anche molto distanti.

L'angiogenesi avviene secondo un meccanismo complesso che coinvolge

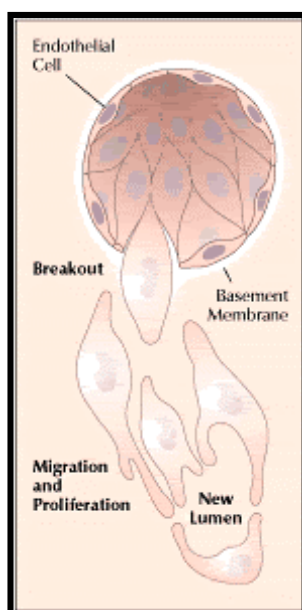


FIGURA 3. Il processo angiogenico.

relazioni fra le cellule, fattori di crescita e componenti della matrice extracellulare (ECM).

La regolazione dell'angiogenesi

Per iniziare la formazione di nuovi capillari, le cellule endoteliali dei vasi sanguigni esistenti devono degradare la membrana basale sottostante e invadere lo stroma del tessuto circostante (Mignatti et al., 1996). L'invasione e la migrazione delle cellule endoteliali necessitano della cooperazione fra il sistema dell'attivatore del plasminogeno (PA) e delle metalloproteasi (MMPs).

Le uPAs e le tPAs (*urokinase-tipe* e *tissue-tipe*) sono serina proteasi che convertono il plasminogeno in plasmina (Mignatti et al., 1996; Bikfalvi et al., 1997). L'interazione di uPA con il suo recettore concentra l'attività enzimatica sul “*focal attachment sites*” presente sulla superficie cellulare e stimola la traduzione del segnale, determinando migrazione e invasione cellulare (Blasi, 1997). Inoltre la plasmina ha un'ampia specificità di substrato e degrada numerosi componenti della ECM, quali fibrina, fibronectina, laminina (Mignatti et al., 1996). La plasmina può attivare molte MMPs.

Le MMPs sono enzimi solubili, ad eccezione delle MT-MMPs (membrane type-MMP) che sono transmembrana, che degradano una grande varietà di componenti della ECM, quali collagene, gelatina, laminina, fibronectina, proteoglicani (Westermarck et al., 1999).

L'espressione di PAs e MMPs è fortemente controllata, attivata da fattori di crescita angiogenici (Giuliani et al., 1999; Mandriota et al., 1997; Bond et al., 1998; Uria et al., 1998; Wang et al., 1998) e citochine (Van Hinsberg et al., 1990); la loro attività viene inibita da PAIs (PA Inhibitors) (Blasi, 1997; Bajou et al., 1998), α_2 -antiplasmina e TIMPs (Tissue Inhibitor of MMPs) (Blavier et al.,

1999). PAs e MMPs sono secrete insieme ai loro inibitori specifici e ciò assicura il massimo controllo della loro attività proteolitica. Vi è un'ampia letteratura che documenta che tale regolazione è persa durante la crescita tumorale e il processo metastatizzante (Rasmussen et al., 1997).

Alla degradazione dell'ECM segue l'inizio della migrazione delle cellule endoteliali "leader" attraverso la matrice degradata. Tali cellule sono seguite da altre cellule endoteliali proliferanti, che sono stimulate da molti fattori di crescita specifici alcuni dei quali sono rilasciati dall'ECM stessa.

I numerosi induttori della proliferazione delle cellule endoteliali possono essere suddivisi in tre classi (Klagsbrun et al., 1999): 1) la famiglia del VEGF e dell'angiopoietina, specifici per cellule endoteliali; 2) molte citochine, chemochine (IL-3, IL-8) (Moore et al., 1998) ed enzimi angiogenici (Brown et al., 1998; Chiarugi et al., 1998) che sono attivi su molti tipi cellulari oltre che sulle cellule endoteliali e a tale gruppo appartiene anche l'FGF-2 che è stato uno dei primi peptidi ad attività angiogenica ad essere caratterizzati; 3) un gruppo di molecole angiogeniche che agiscono indirettamente, quali TGF- β e TNF- α , il cui effetto sull'angiogenesi si esplica con il rilascio di fattori appartenenti alla prime due classi da parte di macrofagi, cellule endoteliali e tumorali.

In vitro il VEGF stimola la degradazione della ECM, la proliferazione, la migrazione e la tubulogenesi delle cellule endoteliali, inducendo l'espressione di uPA, PAI-1, uPAR and MMP-1 (Pepper et al., 1992; Pepper et al., 1992; Unemori et al., 1992; Mandriota et al., 1995). *In vivo*, è stato dimostrato che il VEGF regola la permeabilità cellulare, e ciò è importante per iniziare l'angiogenesi (Dvorak et al., 1995).

L'espressione del VEGF è indotta da numerosi fattori di crescita e citochine, fra cui PDGF, EGF, TNF- α , TGF- β e IL-1 β (Akagi et al., 1999; Enholm et al., 1997). I livelli di VEGF vengono anche regolati dalla tensione di ossigeno, difatti

l'ipossia induce l'espressione di VEGF, sia aumentandone la trascrizione, sia stabilizzandone l' mRNA (Mukhopadhyay et al., 1995; Ikeda et al., 1995). Il meccanismo d'azione del VEGF prevede il legame con due recettori specifici localizzati sulla membrana delle cellule endoteliali, VEGFR-1 e VEGFR-2, la cui attività e specificità sono nettamente distinte e la cui espressione è regolata dall'ipossia (Waltenberger et al., 1996).

Nelle cellule endoteliali l'FGF induce *in vitro* proliferazione, chemotassi, tubulogenesi, produzione di uPA, modula l'espressione delle integrine, attiva l'espressione di VEGF, VEGFR-2 e uPAR (Presta et al., 1986; Hata et al., 1999; Bussolino et al., 1996).

L'FGF viene prodotto in piccole quantità dalla maggior parte dei tessuti e si lega a recettori specifici ad alta affinità, FGFR, determinando proliferazione e migrazione, differenziamento, produzione di proteasi e angiogenesi (Florkiewicz et al., 1995; Johnson et al., 1993). Presenta anche dei siti di legame a bassa affinità, rappresentati dai proteoglicani (Heparan Sulfate PGs) (Rusnati et al., 1996). Tali HSPGs si trovano nella ECM, nella membrana basale e sulla superficie cellulare e rappresenterebbero dei siti di accumulo e stabilizzazione dell'FGF (Schlessinger et al., 1995). L'FGF-2 è prodotto *in vitro* da molti tipi di cellule tumorali e si ritiene che svolga un ruolo fondamentale nella vascolarizzazione dei tumori solidi. Elevati livelli di FGF-2 sono presenti nelle cellule endoteliali del sarcoma di Kaposi (Samaniego et al., 1995) e negli emangiomi (Chang et al., 1999).

I processi d'invasione, migrazione e proliferazione delle cellule endoteliali non dipendono unicamente da enzimi, fattori di crescita e recettori, ma sono anche determinate da molecole d'adesione. Per iniziare il processo angiogenico le cellule endoteliali hanno bisogno di dissociarsi dalle cellule vicine, prima di poter invadere il tessuto sottostante. Durante l'invasione e la migrazione, l'interazione

delle cellule endoteliali con l'ECM è mediata dalle integrine. Le molecole di adesione cellulare possono essere raggruppate in quattro famiglie, in relazione alle loro caratteristiche biochimiche e strutturali: le selectine (E-selectin e P-selectin), la "immunoglobulin supergene family" (ICAM-1 e VCAM-1), le caderine (VE-cadherin) e le integrine (Bischoff, 1997).

Particolarmente importante durante l'angiogenesi è risultata essere l'integrina $\alpha_v\beta_3$, che è un recettore per fibronectina, vitronectina, laminina, fibrinogeno, collagene (Eliceiri et al., 1999; Brooks et al., 1996). L' $\alpha_v\beta_3$ non viene quasi espressa dall'endotelio quiescente, mentre lo è fortemente nell'angiogenesi indotta da citochine o da tumore. Negli endoteli attivati inibisce l'attività di p53 e di p21, e aumenta il rapporto fra Bcl-2 e Bax, con un effetto antiapoptotico (Stromblad et al., 1996).

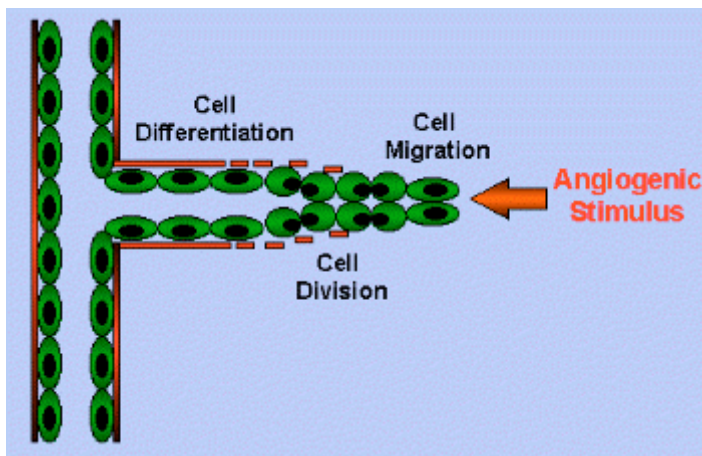


FIGURA 4. Schema della formazione di un nuovo capillare.

L'angiogenesi fisiologica

Oltre che durante l'embriogenesi, l'angiogenesi è anche attivata nel sistema riproduttivo femminile, durante l'ovulazione, la formazione del corpo luteo e

l'impianto dell'embrione. Durante tali processi l'angiogenesi è guidata per lo più dal VEGF (Ferrara et al., 1999; Ferrara et al., 1998). La neovascolarizzazione gioca un ruolo fondamentale anche nella cicatrizzazione delle ferite, dove è probabilmente regolata da fattori di crescita come l'FGF-2 (Ortega et al., 1998) e il VEGF (Nissen et al., 1998). I macrofagi possono inoltre contribuire alla cicatrizzazione rilasciando tali fattori (Swift et al., 1999).

L'angiogenesi nella crescita tumorale e nelle metastasi

La crescita tumorale è un processo multifasico che inizia con la perdita del controllo della proliferazione ovvero le cellule tumorali iniziano a dividersi rapidamente dando origine ad un microscopico tumore sferico, un carcinoma *in situ*. Man mano che la massa tumorale cresce, le cellule si vengono a trovare distanti dal capillare sanguigno più vicino, a questo punto il tumore cessa di proliferare, raggiungendo uno stato di equilibrio in cui il numero di cellule che si dividono è pari al numero di cellule che muoiono. I carcinomi *in situ* possono rimanere tali per molti anni e le metastasi raramente sono associate a questi piccoli tumori non vascolarizzati (2-3 mm³). Dopo molti mesi o addirittura anni un carcinoma *in situ* può assumere fenotipo angiogenico, inducendo la formazione di nuovi capillari e cominciando ad invadere il tessuto circostante. Tale "switch" dipende dallo squilibrio fra fattori promuoventi e inibenti l'angiogenesi nel tumore. Perciò il fenotipo angiogenico può derivare sia dalla produzione di fattori di crescita, quali VEGF e FGF, da parte delle cellule tumorali, sia dall'inibizione di modulatori negativi in tessuti con una vascolatura quiescente (Pepper et al., 1997).

Sia nell'angiogenesi fisiologica che patologica, un ruolo fondamentale è svolto dall'ipossia; la sopravvivenza e la crescita delle cellule dipendono infatti da un adeguato apporto di ossigeno e nutrienti e dalla rimozione dei metaboliti tossici.

L'ipossia induce l'espressione del VEGF e del suo recettore via HIF-1 α (Hipopxia-inducibile Factor-1 α) e funziona anche richiamando i macrofagi (Carmeliet et al., 1998; Jiang et al., 1997). Anche molti oncogeni, come *v-ras*, *K-ras*, *v-raf*, *src*, *fos* e *v-yes* (Kerbal et al., 1998; Okada et al., 1998) determinano l'espressione di fattori come il VEGF e aumentano la produzione di citochine ed enzimi proteolitici (Arbiser et al., 1997).

Il passo finale nella progressione di un tumore è la metastasi (Folkman et al.,

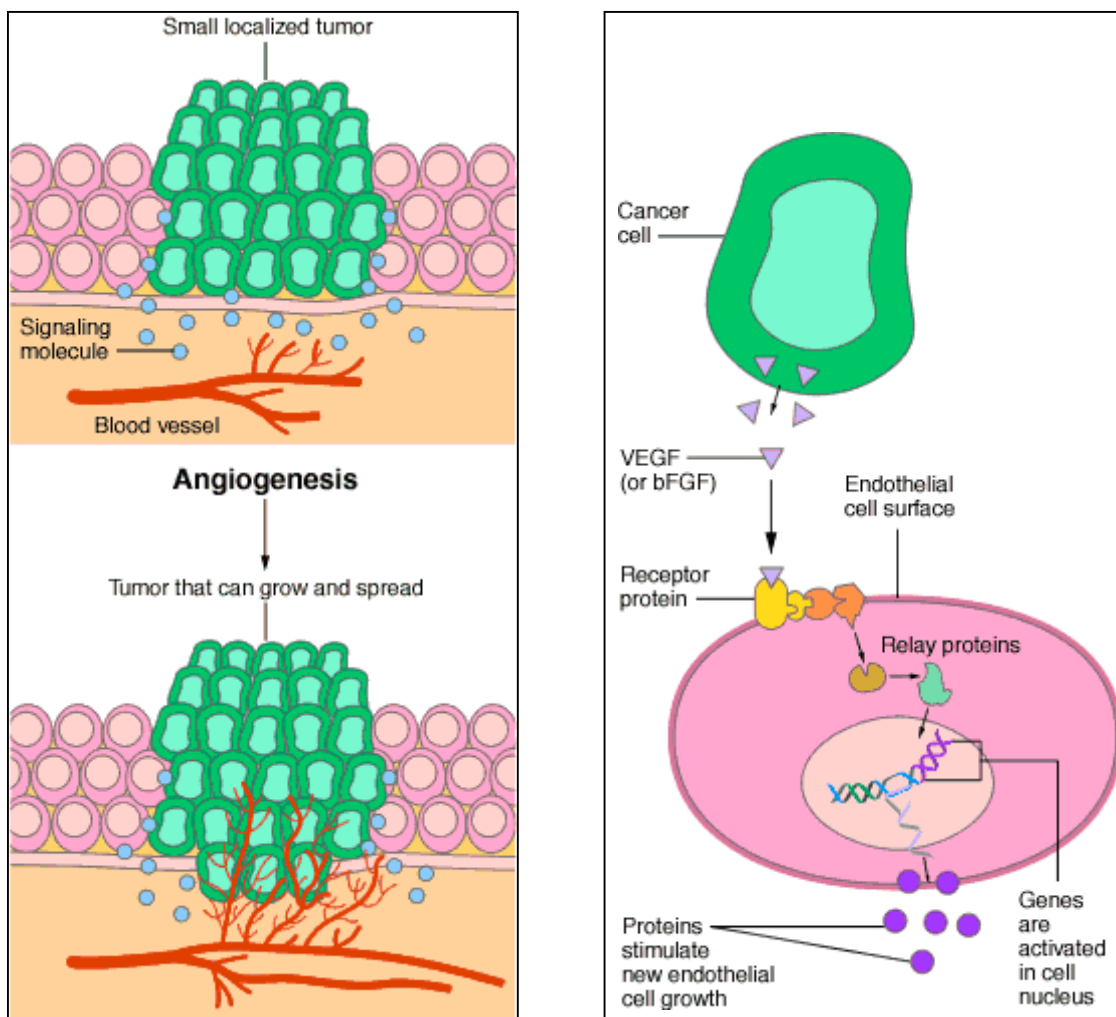


FIGURA 5. L'angiogenesi tumorale.

1999). La neovascolarizzazione di un carcinoma primario aumenta la possibilità che le cellule tumorali entrino nel flusso sanguigno, propagandosi così ad altri organi (Kleiner et al., 1999). La maggior parte delle metastasi non ha un'elevata percentuale di espansione finché non va incontro a vascolarizzazione.

Inibizione dell'angiogenesi

Sono stati descritti numerosi inibitori naturali dell'angiogenesi. Fra quelli che agiscono sull'endotelio attivato, TSP-1 (Thrombospondin-1) è considerato il principale inibitore fisiologico, costitutivamente prodotto dalle cellule normali. La sua espressione diminuisce invece durante la tumorigenesi. La produzione di TSP-1 è regolata da p53 e mutazioni di p53 che ne determinano la mancata produzione e il passaggio verso un fenotipo angiogenico (Grossfeld et al., 1997; Iruela-Arispe et al., 1997). Per contro, la sovraespressione di TSP-1 determina la diminuzione dell'angiogenesi e l'inibizione della crescita tumorale (Streit et al., 1999).

L'angiostatina e l'endostatina sono inibitori endogeni, generati dalla proteolisi di precursori inattivi. In topi con LLC (Lewis Lung Carcinoma) si è visto che il mediatore della produzione dell'angiostatina è una metalloelastasi espressa dai macrofagi infiltranti il tumore (Dong et al., 1997). Tuttavia le stesse cellule tumorali sono in grado di produrre tale attività proteolitica, generando l'angiostatina dal plasminogeno, ma con un meccanismo differente da quello che coinvolge i macrofagi infiltranti il tumore (Gately et al., 1996). Esperimenti compiuti *in vivo* sui topi hanno mostrato come l'angiostatina inibisca la crescita tumorale e la formazione delle metastasi (Cao, 1999). Tale processo non sembra essere dovuto alla diminuzione del grado di proliferazione, ma all'aumento dell'apoptosi (O' Reilly et al., 1996).

L'endostatina, un frammento carbossi-terminale del collagene XVIII derivato per taglio di una elastasi specifica, agisce sia inibendo la proliferazione delle cellule tumorali, sia aumentando il grado di apoptosi, senza modificarne la proliferazione (Wen et al., 1999).

Inibitori endogeni dell'attività delle MMPs sono rappresentati dai TIMPs (Gomez et al., 1997) e da PEX (Brooks et al., 1998), un frammento non-catalitico della MMP-2, che agisce prevenendo il legame dell'enzima al recettore $\alpha_v\beta_3$.

Esistono inoltre numerosi composti sintetici che vengono attualmente testati in laboratorio o sono già utilizzati in trials clinici. Fra questi il TNP-470 (AGM-1470), un composto sintetico derivato dall'antibiotico fumagillina, è forse il più studiato inibitore dell'angiogenesi (Ingber et al., 1990). TNP-470 lega la metionina-aminopeptidasi di tipo 2 (Griffith et al., 1997), determinando la mancata biosintesi della metionina e bloccando la sintesi di proteine non note, essenziali per la crescita delle cellule endoteliali (Turk et al., 1999). In modelli animali, TNP-470 è attivo nei trattamenti di una grande varietà di tumori e delle loro metastasi (Yanase et al., 1993).

Il talidomide, il cui meccanismo d'azione, non è ancora noto, possiede un'efficace attività antiinfiammatoria e antiangiogenica (D' Amato et al., 1994). La sua efficacia antitumorale è stata dimostrata in studi clinici che riguardavano pazienti affetti da mieloma multiplo (Singhal et al., 1999).

Il batimastat (BB-94) e il marimastat (BB-2516) sono composti simili, che agiscono inibendo l'attività delle MMPs, andando a competere con il substrato specifico (Drummond et al., 1999).

Molte strategie sono state sviluppate per inibire la produzione ed il rilascio di VEGF e FGF-2, interferendo con la loro trasduzione del segnale. In modelli animali, l'utilizzo di anticorpi anti-VEGF, di recettori solubili per il VEGF e di dominanti negativi per Flk-1 diminuisce il numero di vasi neoformati in molti

tumori (Millauer et al., 1996). Per interferire direttamente nella trasduzione del segnale sono studiati inibitori sintetici a basso peso molecolare, quale SU5416, che blocca selettivamente la fosforilazione di Flk-1 indotta dal ligando. *In vivo* determina un incremento dell'apoptosi delle cellule tumorali (Fong et al., 1999; Shaheen et al., 1999).

Poichè la disponibilità di FGF-2 è strettamente dipendente dalla concentrazione extracellulare di eparina, l'attività antiangiogenica del FGF-2 può essere modulata *in vivo* usando analoghi esogeni dell'eparina, quali suramina (Takano et al., 1994) e pentosan polisolfato (PPS) (Zugmaier et al., 1992).

ATTIVITA' ANTITUMORALE DEGLI INTERFERONI

Studi preclinici

Gli IFNs sono stati i primi regolatori endogeni identificati per la loro attività antiangiogenica (Lindner, 2002); Brouty-Boye e Zetter hanno mostrato che l'IFN α/β inibisce *in vitro* la motilità delle cellule endoteliali (Brouty-Boye et al., 1980). Successivamente Sidky e Borden hanno mostrato che fattori di crescita non noti secreti da cellule tumorali umane potevano essere soppressi da IFN- β umano, e non da IFN- β murino, dimostrandone la specie-specificità. Cellule tumorali pretrattate con IFN- β perdevano la capacità angiogenica, misurata mediante inoculo nel derma e nella cornea murini (Sidky et al., 1987). L'IFN- γ ha mostrato una simile attività anti-angiogenica, inibendo *in vitro* la proliferazione e la migrazione delle HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) e *in vivo* bloccando l'angiogenesi indotta da FGF-2 nel derma (Norioka et al., 1994) e nella cornea (Voest et al., 1995) murini.

Studi clinici

L'esempio clinico più eclatante dell'attività antiangiogenica degli IFNs deriva dal trattamento degli emangiomi cutanei pediatrici (Filder, 2001). Tali emangiomi rappresentano una forma di angiogenesi patologica in cui le cellule endoteliali crescono rapidamente nel primo anno di vita (proliferative phase); segue una piccola regressione nei successivi cinque anni (phase involuting) e generalmente una completa regressione nel giro di 10-15 anni (phase involuted). In una piccola percentuale di casi, tali emangiomi infantili continuano a proliferare fino ad interessare anche i vasi più grossi, compromettendo l'ossigenazione dei tessuti,

determinando coagulopatia da consumo, collasso cardiaco, e mettendo in pericolo organi vitali. Degli emangiomi che sono resistenti alla terapia standard con corticosteroidi, il 90% ha mostrato una regressione in seguito a trattamento con IFN- α (Ezekowitz et al., 1991). Recentemente l'IFN- α è stato utilizzato con successo nel trattamento degli angioblastomi.

Per determinare se la progressione o la regressione di tali emangiomi cutanei infantili è correlata alla sovraespressione di molecole proangiogeniche o alla mancanza di molecole antiangiogeniche, è stato analizzato un grande numero di emangiomi in immunistochemica. I risultati hanno mostrato che emangiomi proliferanti esprimono bFGF e VEGF, e non esprimono IFN- β (mRNA e proteina). Si è inoltre notato che l'epidermide che sovrasta tali emangiomi proliferanti è iperplastica, mentre non lo è in emangiomi regrediti. A differenza dell'epidermide sana, che esprime sia i fattori proangiogenici che antiangiogenici, elevati livelli di bFGF, VEGF, IL-8, e non IFN- β sono stati riscontrati nell'epidermide iperplastica (Bielenberg et al., 1999). Generalmente si è visto che gli IFNs sono più efficaci quando il tumore è piccolo e molto differenziato, se utilizzati come trattamento adiuvante e in combinazione con altri farmaci, ad es. citostatici (Gutterman, 1994).

Gli IFNs sono attualmente utilizzati in clinica come farmaci per il trattamento di molti tumori maligni, fra cui mielomatosi, micosi fungoide, linfoma follicolare, leucemia mieloide cronica (CML), carcinoma renale, sarcoma di Kaposi (Rios et al., 1985), melanoma maligno (Legha, 1997), epiteliomi basocellulari e squamocellulari (Tucker, 1993), carcinoidi, tumori pancreatici, carcinoma vescicale (Stadler et al., 1997) e ovarico. Gli IFNs sono anche stati introdotti in molte nazioni come trattamento preventivo del carcinoma epatico in casi di epatite B cronica, epatite C cronica, epatite D cronica, e anche per il trattamento di tumori associati a virus, come papillomatosi laringea e conditomi acuminati.

Tali tumori sono anche stati associati ad un'elevata concentrazione di bFGF, che spesso si ritrova nelle urine o nel siero dei pazienti (O'Brien et al., 1995). Si è perciò indagato se gli IFNs potessero modulare l'espressione del bFGF. IFN- α e IFN- β , ma non IFN- γ , inibiscono l'espressione sia del messaggero sia della proteina dell'FGF in HRCC (Human Renal Cancer Cell), e in carcinomi di vescica, prostata, colon e seno (Singh et al., 1995). Inoltre, la somministrazione di IFN- α umano, diminuisce l'espressione *in vivo* di FGF, il numero di capillari e la crescita di cellule di carcinoma vescicale umano inoculate in topi nudi (Dinney et al., 1998).

Attività antiangiogenica degli IFNs

Gli IFNs sono in grado di colpire selettivamente la vascolatura tumorale, che spesso presenta una morfologia anormale, con capillari discontinui e fessurati. La somministrazione di IFN- α/β in topi inoculati con cellule tumorali determina necrosi delle cellule endoteliali all'interno del tumore, risparmiando i vasi normali, e diminuzione delle metastasi a livello di fegato e milza. La soppressione del flusso sanguigno determina la necrosi del tumore (Dvorak et al., 1989). Inoltre, gli IFNs inibiscono la sintesi del collagene e la formazione della ECM, con conseguente diminuzione della formazione *in vitro* di tubuli (Sato et al., 1990). HUVEC piastrate su Matrigel ("reconstituted basement membrane matrix") normalmente formano tubuli; tale capacità viene abolita in presenza degli IFNs (Maheshwari et al., 1991).

Probabilmente l'attività antiangiogenica degli IFNs si attua principalmente modulando l'espressione genica sia delle cellule tumorali, sia del tessuto normale circostante. L'inibizione dell'espressione dell'FGF è probabilmente il meccanismo principale attraverso cui si esplica l'attività antiangiogenica. In

cellule di sarcoma di Kaposi, l'IFN- α inibisce l'espressione dei protooncogeni della famiglia del FGF (Sinkovics et al., 1991). In HDMEC (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells) l'IFN- γ e il bFGF esplicano effetto opposto sull'espressione dell'integrina $\alpha_v\beta_3$: l'IFN- γ inibisce l'espressione di $\alpha_v\beta_3$, mentre il bFGF ne aumenta l'espressione. IFN- α e IFN- β , ma non IFN- γ , inibiscono l'espressione sia del messaggero sia della proteina dell'FGF in HRCC e in carcinomi di vescica, prostata, colon, seno (Gohji et al., 1994).

Gli IFNs sono anche in grado di inibire l'angiogenesi indotta dal VEGF. Emangiomi pediatrici proliferanti presentano un elevato rapporto VEGF/IFN- β , mentre tale rapporto diminuisce in emangiomi in regressione, suggerendo che VEGF e IFN- β hanno attività contrapposte. Inoltre, in cellule di carcinoma renale l'IFN- β inibisce l'espressione di MMP-2, mentre in linee cellulari derivate da un astroglioma e da un fibrosarcoma diminuisce l'espressione di MMP-9 (Ma et al., 2001).

L'attività antiangiogenica degli IFNs aumenta in presenza di altri inibitori dell'angiogenesi. Ciò è stato verificato associando IFN- α e TNP-470: tale unione ha mostrato effetti sinergici sul blocco dell'angiogenesi. In modo analogo l'unione di IFN- α e talidomide aumenta l'attività antiproliferativa e antiangiogenica in melanomi umani (Minischetti et al., 2000).

Risultati promettenti sembrano derivare dalla terapia genica, ottenuta andando a sovraesprimere IFNs in cellule tumorali. L'infezione con vettori retrovirali codificanti per IFN- α o IFN- β di cellule EAHY926 determina l'inibizione dell'angiogenesi sia in topi nudi, sia in topi immuno-competenti (Albini et al., 2000).

IFI16 e l' angiogenesi.

Partendo dunque dal presupposto che IFI16 è un gene indotto dagli IFNs, il cui ruolo angiostatico è ampiamente documentato; che è la controparte umana di Ifi204, la cui attività antiproliferativa è nota; ed è fortemente espresso negli endoteli, siamo andati a sovraesprimere IFI16 nelle HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*) per poter valutare il suo coinvolgimento nel processo di angiogenesi.

In collaborazione con il Prof. Manservigi è stato generato un vettore virale contenente il cDNA di IFI16, che garantisce un'elevata efficienza di infezione anche in linee primarie, notoriamente poco trasfettabili. Il vettore replicazione-difettivo utilizzato è un HSV1 di seconda generazione, ovvero delecto di tre geni immediati precoci (IE) essenziali per il ciclo litico del virus. Precisamente i geni delecti sono ICP4, ICP27 e ICP22. La mancanza di questi geni rende il virus incapace di replicarsi o perlomeno soltanto in una linea cellulare di complementazione. Inoltre, la delectione dei geni IE in questione riduce notevolmente la citotossità del virus ricombinante aumentando l'espressione del transgene. Per ottenere il virus le cellule di complementazione vengono contemporaneamente trasfettate con il plasmide di espressione (che porta il gene di interesse) e il DNA genomico del virus difettivo, che presenta a sua volta un gene reporter per la β -galattosidasi inserito nella stessa cassetta di espressione in cui è inserito il transgene nel plasmide. L'evento di ricombinazione omologa porta quindi alla sostituzione della cassetta di espressione della β -galattosidasi con la cassetta di espressione del transgene. L'uso di questi vettori ha permesso una maggiore efficienza di espressione del gene esogeno rispetto alle normali tecniche di trasfezione, soprattutto in linee primarie spesso difficilmente trasfettabili.

I risultati di questo studio sono riportati nel lavoro intitolato “**The interferon-inducible IFI16 gene inhibits tube morphogenesis and proliferation of primary, but not HPV16 E6/E7-immortalized human endothelial cells**”, Ravera R., Gioia D., De Andrea M., Cappello P, Giovarelli M., Marconi P., Manservigi R., Gariglio M., Landolfo S., (2004) *Exp.l Cell Res.* 293: 331-345

BIBLIOGRAFIA

Liekens S., De Clercq E., Neyts J.(2001) Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.* 61: 253-70.

Hyder S.M., Stancel G.M. (1999) Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Mol. Endocrinol.* 13, 806-11.

Folkman J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1, 27-31.

Koch A.E. (1998) Review: angiogenesis: implications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med.* 5, 1359-64.

Ferrara N, Alitalo K. (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med.* 5, 1359-64.

Powell J. (1999) Update on hemangiomas and vascular malformations. *Curr. Opin. Pediatr.* 11, 457-63.

Hanahan D. (1998) A flanking attack on cancer. *Nat. Med.*, 4,13-24.

Mignatti P., Rifkin D.B. (1996) Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme protein.* 49, 117-37.

Bikfalvi A., Klein S., Pintucci G., Rifkin D.B. (1997) The roles of proteases in angiogenesis. *Tumor angiogenesis*. Oxford University press. 115-24.

Blasi F., (1997) uPA, uPAR, PAI-1, key intersection of proteolytic, adhesive and chemotactic highways? *Immunology today* 18, 415-17.

Westermarck J., Kahari V. M. (1999) Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. *FASEB J.*, 13, 781-92.

Giuliani R., Bastaki M., Coltrini D., Presta M. (1999) Role of endothelial cell extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ in urokinase-type plasminogen activator upregulation and *in vitro* angiogenesis by fibroblast growth factor-2. *J. Cell. SC.* 112, 2597-606.

Mandriota S. J., Pepper M. S. (1997) Vascular endothelial growth factor induced *in vitro* angiogenesis and plasminogen activator expression are dependent on endogenous basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Sci.* 110, 2293-302.

Bond M., Fabunmi R. P., Baker A. H., Newby A. C. (1998) Synergistic upregulation of metalloproteinase-9 by growth factors and inflammatory cytokine: an absolute requirement for transcription factor NF-kB. *FEBS Lett.* 435, 29-34.

Uria J. A., Balbin M., Lopez J. M., Alvarez J., Bizzoso F., Takigawa M., Lopez-Otin C. (1998) Collagenase-3 (MMP-13) expression in chondrosarcoma cells and its regulation by basic fibroblast growth factor. *Am. J. Pathol.* 153, 91-101.

Wang H., Keiser J. A. (1998) Vascular endothelial growth factor upregulate the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1. *Circ. Res.* 83, 832-40.

Van Hinsberg V. W., Van den Berg E. A., Fiers W., Dooijewaard G. (1990) Tumor necrosis factor induce the production of urokinase-type plasminogen activator by human endothelial cells. *Blood.* 75, 1991-8.

Bajou K., Noel A., Gerard R. D., Masson V., Brunner N., Holst-Hansen C., Skobe M., Fusenig N. E., Carmeliet P., Collen D., Foidart J. M. (1998) Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularisation . *Nat. Med.* 4, 923-28.

Blavier L., Henriët P., Imren S., Declerck Y. A. (1999) Tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in cancer. *Ann. NY Acad. Sci.* 878, 108-19.

Rasmussen H. S., McCann P. P. (1997) Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat. *Pharmacol Ther.* 75, 69-75.

Klagsburn M., Moses M. A. (1999) Molecular angiogenesis. *Chem. Biol.* 6, 217-24.

Moore B. B., Keane M. P., Addinson C. L., Arenberg D. A., Strieter R. M. (1998) CXC chemokine modulation of angiogenesis: the importance of balance between angigenic and angiostatic members of te family. *J. Investig. Med.* 46, 113-20.

Brown N. S., Bicknell R. (1998) Thymidine phosphorilase, 2-deoxy-d-ribose and angiogenesis. *Biochem. J.* 334, 1-8.

Chiarugi V., Magnelli L., Gallo O. (1998) Cox-2, iNOS and p53 as playmarkers of tumor angigenesis (review). *Int. J. Mol Med.* 2, 715-19.

Pepper M. S., Ferrara N., Orci L., Montesano R. (1992) Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 902-6.

Unemori E. N., Ferrara N., Bauer E. A., Amento E. P. (1992) Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 153, 557-62.

Mandriota S. J., Seghezzi G., Vassalli J. D., Ferrara N., Wasi S., Mazziere R., Mignatti P., Pepper M. S. (1995) Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 9709-16

Dvorak H. F., Brown L. F., Detmar M., Dvorak A. M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability and angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 146, 1029-39.

Akagi Y., Liu W., Xie K., Zebrowski B., Shaheen R. M., Ellis L. M. (1999) Regulation of vascular endothelial growth factor expression in human colon cancer by interleukin 1 β . *Br. J. Cancer* 80, 1506-11.

Enholm B., Paavonen K., Ristimaki A., Kumar V., Gunji Y., Klefstrom J., Kivinen L., Laiho M., Olofsson B., Joukov V., Eriksson U., Alitalo K. (1997) Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factor, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene* 14, 2475-83.

Mukhopadhyay D., Tsiokas L., Zhou X. M., Foster D., Brugge J. S., Sukhatme V. P. (1995) Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature* 375, 577-81.

Ikeda E., Achen M. G., Breier G., Risau W. (1995) Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J. Biol. Chem.* 270, 19761-66.

Waltenberger J., Mayr U., Pentz S., Hombach V. (1996) Functional upregulation of the vascular endothelial growth factor receptor KDR by hypoxia. *Circulation* 94, 1647-54.

Presta M., Moscatelli D., Joseph-Silverstein J., Rifkin D. B. (1986) Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis and migration. *Mol. Cell. Biol.* 6, 4060-6.

Hata Y., Rook S. L., Aiello L. P. (1999) Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase-dependent pathway. *Diabetes* 48, 1145-55.

Bussolino F., Albini A., Camussi G., Presta M., Viglietto G., Ziche M., Persico G. (1996) Role of soluble mediators in angiogenesis. *Eur. J. Cancer* 32A, 388-99.

Florkiewicz R. Z., Majack R. A., Buechler R. D., Florkiewicz E. (1995) Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J. Cell. Physiol.* 162, 388-99.

Jhonsen D. E., Williams L. T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv. Cancer Res.* 60, 1-41.

Rusnati M., Presta M. (1996) Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparan sulfate proteoglycans. Biological implications in neovascularisation. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 26, 15-23.

Schlessinger J., Lax I., Lemmon M. (1995) Regulation of growth factor activation by proteoglycans: what is the role of the low affinity receptors? *Cell* 83, 357-60.

Samaniego F., Markham P. D., Gallo R. C., Ensoli B. (1995) Inflammatory cytokines induce AIDS-Kaposi's sarcoma-derived spindle cells to produce and release basic fibroblast growth factor and enhance Kaposi's sarcoma-like lesion formation in nude mice. *J. Immunol.* 154, 3582-92.

Chang J., Most D., Bresnick S., Mehrara B., Steinbrech D. S., Reinisch J., Longaker M. T., Turk A. E. (1999) Proliferative hemangiomas: analysis of cytokine gene expression and angiogenesis. *Plast. Reconstr. Surg.* 103, 29-37.

Bischoff J. (1997) Cell adhesion and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 100, S37-9.

Eliceri B. P., Cheresch D. A. (1999) The role of α_v integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J. Clin. Invest.* 103, 1227-30.

Brooks P. C., Stromblad S., Sanders L. C., Von Schalscha T. L., Aimes R. T., Stelter –Stevenson W. G., Quigley J. P., Cheresch D. A. (1996) Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin $\alpha_v\beta_3$. *Cell* 85, 683-93.

Stronblad S., Becker J. C., Yebra M., Brooks P.C., Cheresch D. A. (1996) Suppression of p53 activity and p21^{WAF1/CIP1} expression by vascular cell integrin $\alpha_v\beta_3$ during angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 98, 426-33.

Ferrara N. (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 273, 1-30.

Ferrara N., Chen H., Davis-Smyth T., Gerber H. P., Nguyen T. N., Peers D., Chisholm V., Hillan K. J., Schwall R. H. (1998) Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat. Med.* 4, 336-40.

Ortega S., Ittman M., Tsang S. H., Ehrlich M., Basilico C. (1998) Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *PNAS.* 95, 5672-7.

Nissen N. N., Polverini P. J., Koch A. E., Volin M. V., Gamelli R. L., Di Pietro L. A. (1998) Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am. J. Pathol.* 152, 1445-52.

Swift M. E., Kleinman H. K., Di Pietro L. A. (1999) Impaired wound repair and delayed angiogenesis in aged mice. *Lab. Invest.* 79, 1479-87.

Pepper M. S. (1997) Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 605-19.

Carmeliet P., Dor Y., Herbert J-M., Fukumura D., Brusselmans K., Dewerchin M., Neeman M., Bono F., Abramovich R., Maxwell P., Koch C. J., Ratcliffe P., Moons L., Jain R. K., Collen D., Keshert E., Keshet E. (1998) Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. *Nature* 394, 485-90.

Jiang B. J., Agani F., Passaniti A., Semenza G. L. (1997) V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.* 57, 5328-35.

Kerbel R. S., Villoira-Petit A., Okada F., Rak J. (1998) Establishing a link between oncogenes and tumor angiogenesis. *Mol. Med.* 4, 286-95.

Okada P., Rak J. W., St. Croix B., Lieubeau B., Kaya M., Roncari L., Shiraswa S., Sasazuki T., Kerbel., R. S. Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant *K-ras* up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability

factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells. *PNAS* 95, 3609-14.

Arbisier J.L., Moses M.A., Fernandez C.A., Ghiso N., Cao Y., Klauber N., Frank D., Brownlee M., Flynn E., Parangi S., Byers H.R., Folkman J. (1992) Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways. *PNAS* 94, 861-6.

Folkman J., Shining Y. (1992) Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 10931-4.

Kleiner D.E., Stetler-Stevenson W. G. (1999) Matrix Metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 43, S42-51.

Groosfeld G. D., Ginsberg D. A., Stein J. P., Bochner B. H., Esrig D., Groshen S., Dunn M., Nichols P. W., Taylor C. R., Skinnen D. G., Cote R. J. (1997) Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis and tumor progression. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 219-27.

Iruela-Arispe M. L., Dvorak H. F. (1997) Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. *Thromb. Haemost.* 78, 672-7.

Streit M., Velasco P., Brown L. F., Skobe M., Richerd L., Riccardi L., Lawler J., Detmar M. (1999) Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am. J. Pathol.* 155, 441-52.

Dong Z., Kumar R., Yang X., Fidler I. J. (1997) Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. *Cell*. 88, 801-10.

Gately S., Twardowski P., Stack M. S., Patrick M., Boggio L., Cundiff D. L., Shnaper H. W., madison L., Volpert O., Bouck N., Enghild J., Kwaan H. C., Soff G. A. (1996) Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res*. 56, 4887-90.

Cao Y. (1999) Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Hematologica* 84, 643-50.

O' Reilly M. S., Holmgren L., Chen C., Folkman J. (1996) Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat. Med.* 2,689-92.

Wen W., Moses M. A., Wiederschain D., arbiser J. L.,Folkman J. (1999) The generation of endostatin is mediated by elastase. *Cancer Res*. 59, 6052-6.

Gomez D. E., Alonso D. F., Yoshiji H., Thorgeirsson U. P. (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur. J. Cell. Biol.* 74, 111-22.

Brooks P. C., Silletti S., Von Schalscha T. L., Friedlander M., Cheresch D. A. (1998) Distrupction of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell* 92, 391-400.

Ingber D., Fujita T., Kishimoto S., Sudo K., Kanamaru T., Brem H., Folkman J. (1990) Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumor growth. *Nature* 348, 555-7.

Griffith E. C., Su Z., Turk B. E., Chen S., Chang Y. H., Wu Z., Bieman K., Liu J. O. (1997) Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis inhibitor AGM-1470 and ovalicin. *Chem. Biol.* 4, 461-71.

Turk B. E., Griffith E. C., Wolf S., Biemann K., Chang Y. H., Liu J. O. (1999) Selective inhibition of amino-terminal methionine processing by TNP-470 and ovalicin in endothelial cells. *Chem. Biol.* 6, 823-33.

Yanase T., Tamura M., Fujita K., Kodama S., Tanaka K. (1993) Inhibitory effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and metastasis of human cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 53, 2566-70.

D' Amato R. J., Loughnan M. S., Flynn E., Folkman J. (1994) Thalidomide is an inhibitor of angiogenesis. *PNAS* 55, 1827-34.

Singhal S., Metha J., Desikan R., Ayers D., Roberson P., Eddlemon P., Munshi N., Anaissie E., Wilson C., Dhodapkar M., Zeddis J., Barlogie B. (1999) Antitumor activity of thalidomide in refractory multiple myeloma. *N. Engl. J. Med.* 341-1565-71.

Drummond A. H., Beckett P. D., Brown P. D., Bone E. A., Davidson A. H., Galloway W. A., Gearing A. J., Huxley P., Laber D., Mc Court M., Whittaker M.,

Wood L. M., Wright A. (1999) Preclinical and clinical studies of MMP inhibitors in cancer. *Ann. NY Acad. Sci.* 878, 228-35.

Millauer B., Longhi M. P., Plate K. H., Shawver L. K., Risau W., Ullrich A., Strawn L. M. (1996) Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types *in vivo*. *Cancer Res.* 56, 1615-20.

Fong T. A., Shawver L. K., Sun L., Tang C., App H., Powell T. J., Kim Y. H., Schreck R., Wang X., Rsau W., Ullrich A., Hirth K. P., McMahon G. (1999) SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascular endothelial growth factor receptor (Flk-1) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization and growth of multiple tumor types. *Cancer res.* 59, 99-106.

Shaheen R. M., Davis D. W., Liu W., Zebrowski B. K., Wilson M. R., Bucana C. D., McConkey D. J., McMahon G., Ellis L. M. (1999) Angiogenetic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res.* 59, 5412-6.

Takano S., Gately S., Neville M. E., Herbin W. F., Gross J. L., Engelhard H., Perricone M., Eidsvoog K., Brem S. (1994) Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation and induction of urokinase-type plasminogen activator. *Cancer Res.* 54, 2654-60.

Zugmaier G., Lippman M. E., Wellstein A. (1992) Inhibition by pentosan polysulfate (PPS) of heparin-binding growth factors released from tumor cells and blockage by PPS of tumor growth in animals. *J. Natl. cancer Inst.* 84, 1716-24.

Lindner D. J. (2002) Interferons as antiangiogenic agents. *Curr. Oncol. Rep.* 4, 510-4.

Brouty-Boye D., Zetter E. C. Inhibition of cell motility by interferon. (1980) *Science* 208, 516-18.

Sidky Y. A., Borden E. C. (1987) Inhibition of angiogenesis by interferons: effects on tumor and lymphocyte-induced vascular responses. *Cancer Res.* 47, 5155-61.

Norioka K., Mitaka T., Mochizuki Y., Hara M., Kawagoe M., Nakamura H. (1994) Interaction of interleukin-1 and interferon-gamma on fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *Jpn. J. Cancer. Res.* 85, 522-29.

Voest E. E., Kenyon B. M., O' Reilly M. S., Truitt G., D' Amato R. J., Folkman J. (1995) Inhibition of angiogenesis *in vivo* by interleukin-12. *J. Natl. Cancer. Inst.* 87, 581-6.

Filder I. J. (2001) Regulation of neoplastic angiogenesis. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 28, 10-4.

Ezekowitz A., Mulliken J., Folkman J. (1991) Interferon alpha therapy of hemangiomas in newborns and infants. *Br. J. Haematol.* 79, (Suppl 1), 67-8.

Bielenberg D. R., Bucana C. D., Sanchez R., Mulliken J. B., Folkman J., Fidler I. J. (1999) Progressive growth of infantile cutaneous hemangiomas is directly correlated with hyperplasia and angiogenesis of adjacent epidermis and inversely correlated with expression of the endogenous angiogenesis inhibitor, IFN-beta. *Int. J. Oncol.* 14, 401-8.

Guttermann J. U. (1994) Cytokine therapeutics: lessons from interferon alpha. *PNAS* 91, 1198-205.

Rios A., Mansell P. W., Newell G. R., Reuben J. M., Hersh E. M., Guttermann J. U. (1985) Treatment of acquired immunodeficiency syndrome-related Kaposi's sarcoma with lymphoblastoid interferon. *J. Clin. Oncol.* 3, 506-12.

Legha S. S. (1997) The role of interferon alfa in the treatment of metastatic melanoma. *Semin. Oncol.* 24 (Suppl 4), S24-31.

Tucker S. B. Interferon-alpha treatment of basal cell and squamous cell skin tumors. *Cancer Bull.* 45, 270-4.

Stadler W. M., Kuzel T. M., Raghavan D., Levine E., Vogelzang N. J., Roth B., Dorr F. A. (1997) Metastatic bladder cancer: advances in treatment. *Eur. J. Cancer* 33 (Suppl 1), S23-6.

O' Brien T. S., Smith K., Cranston D., Fuggle S., Bicknell R., Harris A. L. (1995) Urinary basic fibroblast growth factor in patients with bladder cancer and benign prostatic hypertrophy. *Br. J. Urol.* 76, 311-4.

Singh R. K., Gutman M., Bucana C. D., Sanchez R., Llansa N., Fidler I. J. (1995) Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *PNAS* 92, 4562-6.

Dinney C. P., Bielenberg D. R., Perrotte P., Reich R., Eve B. Y., Bucana C. D., Fidler I. J. (1998) Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. *Cancer Res.* 58, 808-14.

Dvorak H. F., Gresser I. (1989) Microvascular injury in pathogenesis of interferon-induced necrosis of subcutaneous tumor in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 497-502.

Sato N., Nariuchi H., Tsuruoka N., Nishihara T., Beitz J. G., Calabresi P., Frackelton A. R. Jr. (1990) Actions of TNF and INF-gamma on angiogenesis *in vitro*. *J. Invest. Dermatol.* 95 (Suppl 6), 85S-89S.

Maheshwari R. K., Srikantan V., Bhartiya D., Kleinman H. K., Grant D. S. (1991) Differential effects of interferon gamma and alpha on *in vitro* model of angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* 146, 164-9.

Sinkovics J. G. (1991) Kaposi's sarcoma: its 'oncogenes' and growth factors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 11,87-107.

Gohji K., Filder I. J., Tsan R., Radinsky R., Von Eschenbach A. C., Tsuruo T., Nakajima M. (1994) Human recombinant interferons-beta and gamma decrease

gelatinase production and invasion by human KG-2 renal-carcinoma cells. *Int. J. Cancer* 58, 380-4.

Ma Z., Qin H., Benveniste E. N. (2001) Transcriptional suppression of matrix metalloproteinase-9 gene expression by IFN-gamma and IFN-beta: critical role of STAT-1 alpha. *J. Immunol.* 167, 5150-9.

Minischetti M., Vacca A., Ribatti D., Iurlaro M., Ria R., Pellegrino A., Gasparini G., Dammacco A. F. (2000) TNP-470 and recombinant human interferon-2 α inhibit angiogenesis synergistically. *Br. J. Haematol.* 109, 829-37.

Albini A., Marchisone C., Del Grosso F., Benelli R., Masiello L., Tacchetti C., Bono M., Ferratini M., Rozera C., Truini M., Belardelli F., Santi L., Noonan D. M. Inhibition of angiogenesis and vascular tumor growth by interferon-producing cells: a gene therapy approach. *Am. J. Pathol.* 156, 1381-93.

The interferon-inducible IFI16 gene inhibits tube morphogenesis and proliferation of primary, but not HPV16 E6/E7-immortalized human endothelial cells

Ravera Raffaella,^a Daniela Gioia,^b Marco De Andrea,^a Paola Cappello,^c Mirella Giovarelli,^c Peggy Marconi,^d Roberto Manservigi,^d Marisa Gariglio,^b and Santo Landolfo^{a,*}

^aDepartment of Public Health and Microbiology, University of Turin, 10126 Turin, Italy

^bDepartment of Medical Sciences, University of Eastern Piedmont, Novara, Italy

^cCERMS, San Giovanni Battista Hospital, Turin, Italy

^dDepartment of Experimental and Diagnostic Medicine, University of Ferrara, Ferrara, Italy

Received 31 July 2003, revised version received 17 October 2003

Abstract

Immunohistochemical analysis has demonstrated that the human IFI16 gene, in addition to the hematopoietic tissues, is highly expressed in endothelial cells and squamous stratified epithelia. In this study, we have developed a reliable HSV-derived replication-defective vector (TO-IFI16) to efficiently transduce IFI16 into primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), which are usually poorly transfectable. HUVEC infection with TO-IFI16 virus suppressed endothelial migration, invasion and formation of capillary-like structures in vitro. In parallel, sustained IFI16 expression inhibited HUVEC cell cycle progression, accompanied by significant induction of p53, p21, and hypophosphorylated pRb. Further support for the involvement of these pathways in IFI16 activity came from the finding that infection with TO-IFI16 virus does not impair the in vitro angiogenic activity and cell cycle progression of HUVEC immortalized by HPV16 E6/E7 oncogenes, which are known to inactivate both p53 and pRb systems. This use of a reliable viral system for gene delivery into primary human endothelial cells assigns a potent angiostatic activity to an IFN-inducible gene, namely IFI16, and thus throws further light on antiangiogenic therapy employing IFNs.

© 2003 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: IFN-inducible IFI16 gene; HUVEC; Tube morphogenesis; Cell growth arrest; HPV16 E6/E7; p53; pRb

Introduction

Angiogenesis is mediated by multiple positive and negative regulatory molecules: the balance of these mediators determines the outcome of this process [1,2]. Anti-angiogenic therapy uses negative neovascularization regulators to suppress pro-angiogenic signals or increase inhibitory sig-

nals [3]. IFNs, along with their role in viral interference and cell proliferation, possess potent antiangiogenic activity [4–6]. They down-regulate the expression of several proangiogenic molecules, such as bFGF [7], matrix metalloproteases (MMP-2 and MMP-9) [8–10], and IL-8 [11].

Binding of IFNs to their cognate cell surface receptors initiates a series of intracellular signaling cascades resulting in the activation of specific target genes, known as IFN-stimulated genes (ISGs) [12]. The proteins encoded by these genes mediate the necessary biological response [12]. Hundreds of cellular genes can be induced following IFN stimulation, whereas the molecular and biological functions of many of their products are often not known. Among these are the members of the Ifi200 family in mice (Ifi202, Ifi204, Ifi203, and D3) [13–15] and their human counterpart (HIN200 family), including IFI16 [16], MNDA (Myeloid Nuclear Differentiation Antigen) [17], and AIM2 (Absent In

Abbreviations: AIM2, absent in melanoma 2; bFGF, basic fibroblast growth factor; HSV, herpes simplex virus; HEGF, human epidermal growth factor; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; IFNs, interferons; IGF-1, insulin growth factor-1; ISGs, IFN-stimulated genes; MNDA, myeloid nuclear differentiation antigen; moi, multiplicity of infection; VEGF, vascular endothelial growth factor.

* Corresponding author. Department of Public Health and Microbiology, University of Turin, Via Santena 9, 10126 Turin, Italy. Fax: +39-11-6966977.

E-mail address: santo.landolfo@unito.it (S. Landolfo).

Melanoma 2) [18]. A highly conserved 200-amino-acid domain present singly or in duplicate is a structural motif found in all members and harbors an LXCXE motif that is a potential site for binding to the retinoblastoma gene products [13–15].

Several reports have examined the molecular and cellular functions of mouse Ifi200 and human HIN-200 proteins. Overexpression of p204 in mouse embryo fibroblasts retarded their proliferation, delayed G1 progression into S-phase, and accumulated cells with a DNA content equivalent to cells arrested in late G1 [19]. These effects were strictly dependent on the association of progression with the Rb proteins [20,21]. Sustained expression of p204 induced the fusion of C2C12 myoblasts to myotubes, suggesting that it may be involved in muscle differentiation [22]. In humans, Johnstone et al. [23] demonstrated that IFI16 and p53 interact *in vitro* and *in vivo* to cause a dose-dependent increase in p53-mediated transactivation. A correlation between binding of IFI16 to p53 and modulation of p53-mediated transactivation was also observed. However, the physiological significance of the IFI16/p53 interaction and the precise mechanism(s) involved in the regulatory function of IFI16 on p53 still need to be fully dissected.

Consistent with a role for p200-family proteins in cell-growth regulation, there are indications that viral oncoproteins functionally inactivate p202 [24]. Expression of AIM2 is lost by frameshift mutations in colorectal tumors, and loss of MND4 expression in prostate carcinoma is linked to progression to more aggressive metastatic prostate cancer [25,26]. Recent studies have revealed that increased levels of IFI16 in prostate epithelial cells contribute to senescence-associated irreversible cell growth arrest. Moreover, its overexpression in human prostate cancer cell lines, which did not express IFI16, inhibited colony formation [27]. Altogether, these observations support the idea that the loss of function of p200-family proteins, by providing growth advantage to the affected cells, may contribute to the development of cancer.

Previous immunohistochemical analysis has demonstrated strong IFI16 expression in lymphocytes and monocytes [16]. By contrast, only some resident macrophages were stained and granulocytes were negative. In addition, in normal adult human tissues, IFI16 is expressed in a highly restricted pattern in selected cells within certain organs [28,29]. Prominent IFI16 expression is seen in stratified squamous epithelia, particularly intense in basal cells in the proliferating compartments, whereas it gradually decreases in the more differentiated suprabasal compartment. In addition, all vascular endothelial cells from both blood and lymph vessels strongly expressed IFI16.

As IFI16 modulates transcriptional activation by p53 and regulate the cell cycle through interaction with pRb, and since it is highly expressed in endothelial cells, it is conceivable to infer that IFI16 regulates endothelial cell physiology through these mechanisms.

In this study, we have developed a reliable HSV-derived replication-defective vector [30,31] to efficiently transduce

IFI16 into primary human umbilical vein embryo cells (HUVEC), which are usually poorly transfectable by conventional methods. Evaluation of some features of *in vitro* angiogenesis, namely chemotaxis, Matrigel invasion, tube morphogenesis, and cell cycle progression, has provided for the first time demonstration that the IFN-inducible protein IFI16 impairs the tube morphogenesis and proliferation of human endothelial cells. The observation that HPV16 E6/E7 oncogenes abolish this activity suggests that IFI16 directly acts on the tubulogenesis and proliferation of primary HUVEC through the interaction with p53 and/or pRb pathways.

Materials and methods

Isolation and culture of HUVECs

HUVEC were isolated from cannulated human umbilical veins by treatment with collagenase and maintained in complete endothelial growth medium (EGM-2, Clonetics, San Diego, CA) containing 2% FBS, human recombinant vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), human epidermal growth factor (hEGF), insulin growth factor (IGF-1), hydrocortisone, ascorbic acid, heparin, GA-1000 (gentamicin and amphotericin B, 1 µg/ml), according to the recommendations of the supplier. Each culture was used only up to five population doublings. The cells were seeded into 100-mm culture dish coated with 0.2% gelatin and grown under 5% CO₂ at 37°C in medium renewed every 3–4 days. When indicated, HUVEC were growth-arrested by confluence and culturing them for 48 h in basal EBM-2 medium containing 2% FBS and supplements, but lacking VEGF, bFGF, hEGF, and IGF-1.

Plasmid and recombinant virus constructions

Plasmids are pUL41-ICPO-lacZ and pUL41-ICPO-IFI16. The reporter construct consisted of the lacZ gene upstream from the SV40 polyadenylation signal flanked by *PacI* restriction sites [30,31]. In the plasmid, the reporter gene, under the control of the herpes ICP0 promoter, was placed within the UL41 coding sequences to allow homologous recombination of the expression cassette into the viral genome. The full-length IFI16 cDNA (Asp718 2700-bp fragment from pBKS-IFI16; kindly provided by Joseph Trapani) was placed downstream from the ICP0 promoter after digestion with *EcoRI* and *XbaI* blunt-ended to remove the lacZ gene. The vector TOZ was created by recombining the lacZ expression cassette described above into the UL41 locus of the replication defective herpes mutant deleted of ICP4, ICP27, and ICP22 IE genes (T.2), and therefore incapable of replicating in cells that do not express the essential ICP4 and ICP27 genes *in trans*. Briefly, T.2 genome DNA was cotransfected with 1 µg linearized

pUL41-ICP0-lacZ plasmid, containing the lacZ gene flanked by the unique *PacI* sites within the UL41 viral sequences, using the CaPO₄ method into monolayers of 7B cells in 60-mm culture plates. Recombinant viruses created by disruption of UL41 and its replacement by the lacZ expression cassette were identified by their blue plaque phenotype after X-gal staining. The vector TO-IFI16 was generated by homologous recombination between TOZ viral DNA and the plasmid pUL41-ICP0-IFI16 using the *PacI* recombination system as described above. Recombinants containing IFI16 in place of the lacZ reporter gene were identified by their clear plaque phenotype after X-gal staining. Recombinant viruses form individual plaques were purified to homogeneity by three rounds of limiting dilution, and the presence of the transgene in place of lacZ was identified by Southern blot analysis. Titers of all stocks were determined by plaque formation in the complementing cell line 7B with agar overlay as described by Marconi et al. [31].

Recombinant herpes virus infection

HUVECs were infected in suspension with TOZ and TO-IFI16 at a concentration of 1×10^6 plaques forming units (p.f.u./ml) in EGM-2 medium with 0.5% FBS, for 90 min at 37°C at moi 2. The infected cells were then seeded in 60-mm culture dishes in EGM-2 medium with 2% FBS. After 6 h, the medium was discarded, and the cells were extensively washed and cultured in fresh medium with 2% FBS. To measure the efficiency of infection after 24-h incubation, β -galactosidase was evaluated using X-gal as substrate.

Retroviral expression vectors

The retroviral vector pBabe-puro containing the HPV16 E6/E7 ORF was kindly provided by Massimo Tommasino (International Agency for Research on Cancer, Lyon, France). High-titer retrovirus-containing supernatants ($>5 \times 10^6$ IU/ml) were generated by transient transfection of second-generation retrovirus producer Phoenix cells and used to infect the cells as previously described by Pear et al. [32]. After infection, HUVEC were selected in 0.2 μ g/ml puromycin for 10 days and designated E6/E7 HUVEC.

Western blot analysis

For crude extract preparation, cells were lysed in 3% SDS-lysis buffer containing 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 3% SDS, 10 mM DTT, 10% glycerol with the addition of protease inhibitors (0.2 mM PMSF, 1 mg/ml pepstatin, 0.1 mM benzamidine, 2 mg/ml aprotinin), and briefly sonicated [16]. Insoluble material was removed by centrifugation at 13,000 rpm for 5 min. Protein concentration was determined by the Bio-Rad D_c Protein Assay (Bio-Rad Laboratories). Proteins were separated on an 8.5% or 15% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto a PVDF membrane (Amer-

sham) according to the instruction manual. The membrane was blocked in a blocking solution (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1 M NaCl, 0.1% Tween-20, 5% [w/v] nonfat dry milk) overnight at 4°C, and incubated with affinity-purified anti-IFI16 rabbit polyclonal antibody (diluted 1:2000), pRb, p53, and p21WAF1 (all from Santa Cruz Biotechnology), pRb Ser780 (Cell Signaling Technology), actin (Chemicon International). Appropriate secondary Abs conjugated with horseradish peroxidase conjugate were used (Sigma), and the chemiluminescence reaction was visualized by enhance chemiluminescence (Pierce Supersignal), according to the manufacturer's instructions. Densitometry was performed by scanning the radiographs and then analyzing the bands with Quantity One software (Bio-Rad).

Chemotaxis assays

This test was carried out in Boyden chambers as described by Albin et al. [33]. Briefly, uninfected or infected HUVEC were resuspended in EBM2 with 0.1% BSA. The lower compartment of Boyden chambers was filled with 200 μ l EGM2 containing VEGF and bFGF as chemoattractants. EBM-2 without chemoattractants added of 0.1% BSA was used as a negative control. HUVEC ($1 \times 10^5/400$ μ l/chamber) were placed in the upper compartment. The two compartments were separated by a polycarbonate filter (12- μ m pore size) coated with gelatin (5 mg/l) to allow cell adhesion. The chambers were incubated for 6 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After incubation, cells on the upper side of the filter were removed. The cells that had migrated to the lower side of the filter were fixed in 3% paraformaldehyde, washed in PBS, and stained with crystal violet. Eight to ten units/filter per filter were counted at $\times 160$ magnification with a microscope (Olympus).

Chemoinvasion assay

The invasion assays were carried out as described for the chemotaxis assays with the following modifications. The filter insets (upper chambers) were coated with growth factor-depleted Matrigel (1 mg/ml), a reconstituted basement membrane. This assay assesses the invasive capability of endothelial cells by mimicking the process of extravasation through the vascular basement membrane [34].

Matrigel morphogenesis assay (tube morphogenesis)

A 24-well plate, prechilled at -20°C , was coated with 300 μ l/well of Matrigel Basement Membrane (5 mg/ml; Becton and Dickinson) and then placed in an incubator at 37°C for 30 min until solidified. HUVEC in complete medium, either uninfected or infected [8×10^4 cells/(500 μ l well)], were seeded onto the matrix and allowed to incubate at 37°C in a 5% CO₂ environment. Plates were photographed at 12 h using an Olympus inverted microscope.

Cell cycle analysis

Cell cycle analysis was performed using the PI staining of DNA. Briefly, cells were harvested and fixed in 50% cold ethanol for 60 min at 4 °C. The cells were then washed twice with PBS, incubated at 37 °C in citrate buffer (0.05 M Na₂HPO₄, 25 mM sodium citrate, 0.1% Triton X-100 pH 7.8), and stained with 100 µg/ml PI for 30 min (for dye stabilization) in the presence of RNase (100 ng/ml). Cellular DNA content was then assessed with a FACScalibur flow cytometer (Becton and Dickinson) and analyzed with the ModFit LT software program (Becton and Dickinson).

Results

Modulation of IFI16 expression during endothelial cell growth

Immunohistochemical analysis demonstrated that IFI16 is highly expressed in endothelial cells, suggesting that it

may be involved in angiogenesis [28,29]. When HUVEC are maintained at subconfluent density in complete medium, they proliferate and are highly sensitive to growth arrest by contact inhibition. A representative cell cycle profile for proliferating or growth-arrested HUVEC is presented in Fig. 1A. Typically, 43.5% of proliferating cells are in G1, 35.8% in S, and 20.7% in G2. Confluence is followed by growth arrest with more than 70% of cells in G1, 11.9% in S phase, and 16.4% in G2. To define the optimal culture conditions for infection with transducing viral vectors, HUVEC were seeded at different cell concentration/cm² (from 2.5×10^3 to 1.5×10^4 cells) and after 48 h, cell extracts were analyzed for IFI16 expression by Western blotting analysis. As shown in Fig. 1B, in proliferating cells with the majority of the cells in S and G2/M phases, IFI16 was barely detectable (lane 1). By contrast, upon reaching confluence-induced growth arrest, significantly higher levels of all three IFI16 protein isoforms were observed (lanes 2 and 3).

Altogether, these results demonstrate that proliferating HUVEC express low levels of endogenous IFI16 protein

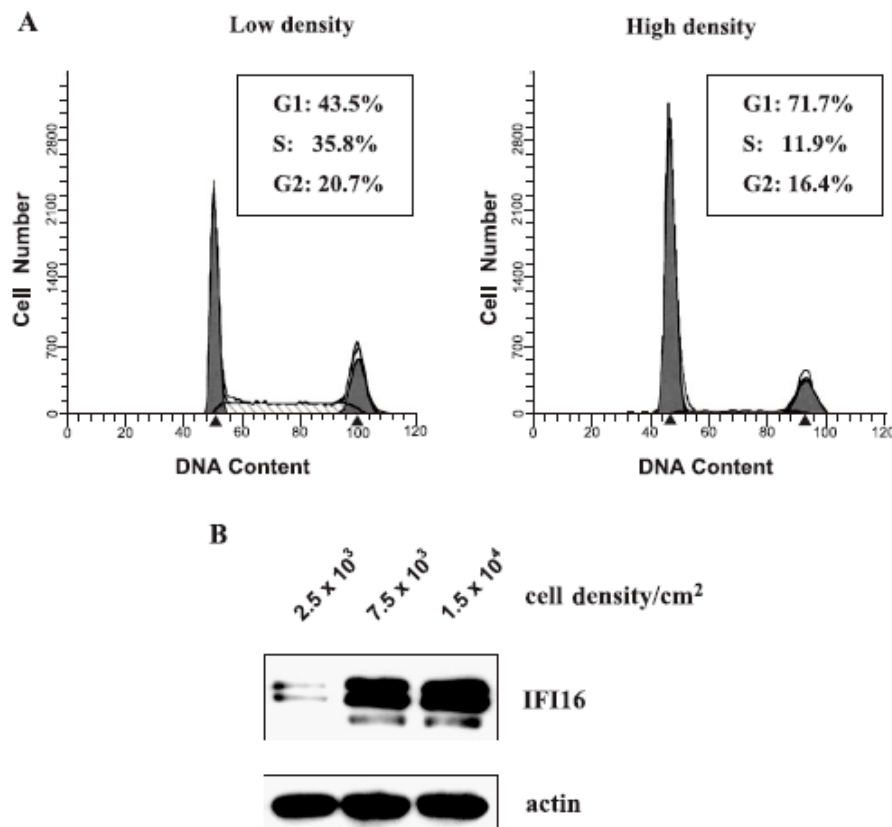


Fig. 1. Expression of IFI16 protein in HUVEC proliferating or growth-arrested by contact inhibition. (A) Cell cycle distribution of HUVEC cultured at low (2.5×10^3 /cm²) or high (1.5×10^4 /cm²) density as measured by DNA content flow cytometry. The experiment has been repeated three times and one representative is reported. (B) HUVEC were cultured at increasing cell densities per cm² (2.5×10^3 , 7.5×10^3 , 1.5×10^4 cells, respectively), and after 48 h, total cell lysates were analyzed in immunoblots with anti-IFI16 affinity-purified rabbit polyclonal monospecific Abs. Actin immunodetection with a monoclonal antibody (Chemicon International) was performed as internal control.

and therefore represent a suitable system for infection with the HSV-derived vectors.

Construction of a replication-defective herpes simplex virus vector for efficient IFI16 transduction in HUVEC

The triply-deleted replication-defective herpes simplex virus (HSV) T.2, in which the ICP4, ICP27, and ICP22 genes have been deleted, shows substantially reduced cytotoxicity and can be used to efficiently transfer and transiently express transgenes in many cell types. The vector TO-IFI16 was created in two steps. First, the bacterial lacZ gene, under the control of the HSV ICP0 IE promoter and flanked by *PacI* restriction sites (not present in the viral genome), was inserted into the UL41 locus of the replication-deficient vector T.2, to generate TOZ, as illustrated in Fig. 2A. Subsequently, using the *PacI* system (see Materials and methods), the transgene was introduced into the UL41 locus of TOZ vector by digestion of the viral DNA and by homologous recombination with an expression cassette containing the cDNA encoding IFI16 (isoform B) under the control of the HSV ICP0 IE promoter. This promoter has been previously shown to express transgenes efficiently. A herpesvirus vector expressing the β -galactosidase as reporter gene, termed TOZ, was used to evaluate the efficiency of gene delivery to the endothelial cells.

To evaluate whether HUVEC infected with TO-IFI16 recombinant virus could express IFI16 and to quantify the transgene levels, Western blotting assay was performed on total proteins extracted from cells infected at different time points at a multiplicity of infection (moi) of 2. This moi was chosen because when the TOZ recombinant virus was used, it yielded more than 80% of blue cells after X-gal staining (data not shown). In accord with previous reports [31], we also observed increases in IFI16 isoform B steady state levels in TO-IFI16-infected cells. Its levels peaked between 24 h and 48 hpi (Fig. 2B, lanes 3 and 5), and then gradually declined, being substituted by the increase of the endogenous IFI16 isoforms (Fig. 2B, lanes 6 and 7). By contrast, in TOZ-infected cells, IFI16 was barely detectable at 24 hpi when cells proliferate vigorously and significantly increased at 72 hpi when cells cease to grow because of contact inhibition. This expression pattern is in line with earlier reports showing that transgene expression in HSV replication defective vectors peaks in the first 24–48 hpi and gradually decreases in the next few days [31].

By using the highly efficient infection conditions described above, we then determined whether IFI16 over-expression affects the in vivo growth kinetics of HUVEC. The cell growth number was assessed at 24 h periods over 96 h. After the indicated hours, cells were detached and counted by Trypan blue assay as previously described [20]. As shown in Fig. 2C, the growth kinetics of TOZ-infected cells was similar to the uninfected cells: the cell number doubled every 24 h and peaked at 72 h after cell seeding. Interestingly, the number of TO-IFI16-infected HUVEC did

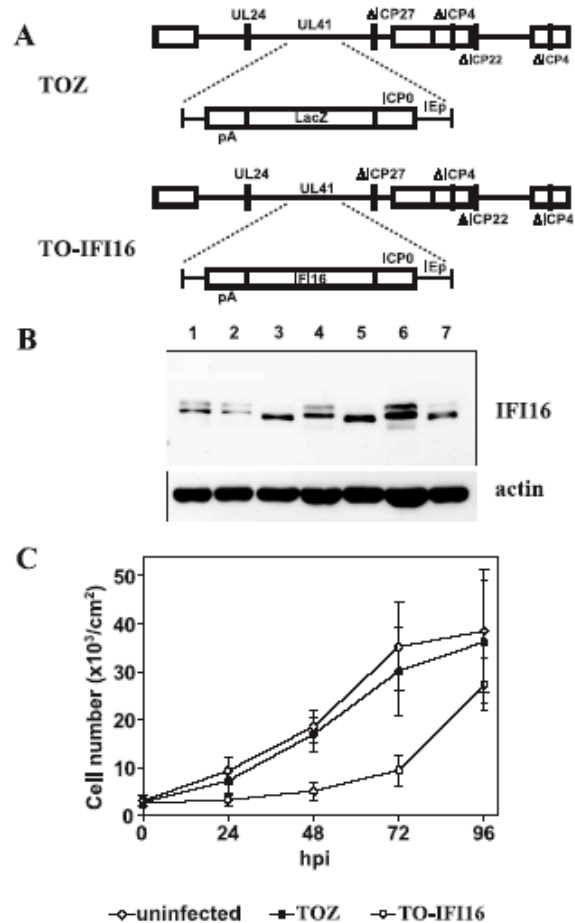


Fig. 2. HSV-transduced IFI16 expression is inversely related to endothelial cell proliferation. (A) Schematic representation of the recombinant vectors TOZ and TO-IFI16. The triple mutant herpes virus (TO) is replication-deficient due to the deletion of the essential ICP4, ICP27, and ICP22 genes, respectively. Vertical bars indicate deletions. The two recombinant vectors contain the lacZ and IFI16 transgene under the control of the HSV ICP0 promoter in the UL41 locus. (B) Time course of IFI16 expression after infection of HUVEC with TO-IFI16 vector or in control cells infected with TOZ as determined by Western blot analysis. Equal amounts of total cell extracts from HUVEC uninfected (lane 1), or infected with TOZ or TO-IFI16 vectors at 24 hpi (lanes 2 and 3), 48 hpi (lanes 4 and 5), or 72 hpi (lanes 6 and 7), respectively. The presence of IFI16 was detected with affinity-purified rabbit polyclonal monospecific Abs. Actin immunodetection with a monoclonal antibody (Boehringer) was performed as internal control. (C) Growth rates of TOZ- or TO-IFI16-infected HUVEC. Cells were seeded at equal densities in EGM2 plus 2% FBS (2.5×10^3 cells/cm²), and at the indicated time points, cells were trypsinized, combined with any floating cells, pelleted, and counted with a hemocytometer. More than 200 cells were counted for each variable. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$).

not vary significantly in the first 48 h when the levels of exogenous IFI16 are maximal, and started to double after 72 h along with the decrease of exogenous IFI16 expression. Moreover, the slope of the growth curve demonstrates that sustained and transient expression of exogenous IFI16

protein reversibly inhibits HUVEC proliferation without causing cell death in accord to the results obtained with Ifi204 overexpression in mouse fibroblasts [19,20]. These conclusions are further supported by the finding that IFI16-expressing HUVEC marginally undergo apoptosis as shown by annexin V binding (data not shown).

Altogether, these results demonstrate that sustained and transient expression of exogenous IFI16 halts growth of proliferating HUVEC and hence that this system is suitable for *in vitro* angiogenesis studies.

Inhibition of HUVEC chemotaxis, invasion, and tube morphogenesis by IFI16 overexpression

Endothelial cell responses to angiogenic factors can be measured *in vitro* by assessment of induction of endothelial cell chemotaxis and chemoinvasion [33–36]. For this purpose, HUVECs were infected with either TO-IFI16 or TOZ viruses or left uninfected, and their migration and invasion capabilities evaluated. Infection of endothelial cells with

TO-IFI16 inhibited chemoattractant-induced migration through gelatin-coated porous membranes by 54% compared to TOZ-infected cells whose migration degree is similar to that observed with uninfected endothelial cells. When both VEGF and bFGF were omitted in the lower chamber, no migration was observed (Fig. 3A). Because it has been demonstrated that IFNs inhibit endothelial cell migration across the basal lamina propria [4,5], we tested the effect of IFI16 expression on VEGF and bFGF-induced invasion (transmigration) of a reconstituted basal lamina in modified Boyden chambers. In this assay [35,36], cells transmigrate from an upper well through a porous filter coated with Matrigel toward chemoattractants (i.e. VEGF and bFGF) in the lower chamber. As shown in Fig. 3B, the presence of chemoattractants induced invasion of TOZ-infected-HUVEC through the Matrigel to a degree similar to that observed with uninfected HUVEC (95 ± 5 vs. 103 ± 6 cells/field, respectively). By contrast, overexpression of IFI16 reduced HUVEC migration by 49% as compared with TOZ virus. As shown before in the chemotaxis assay, when

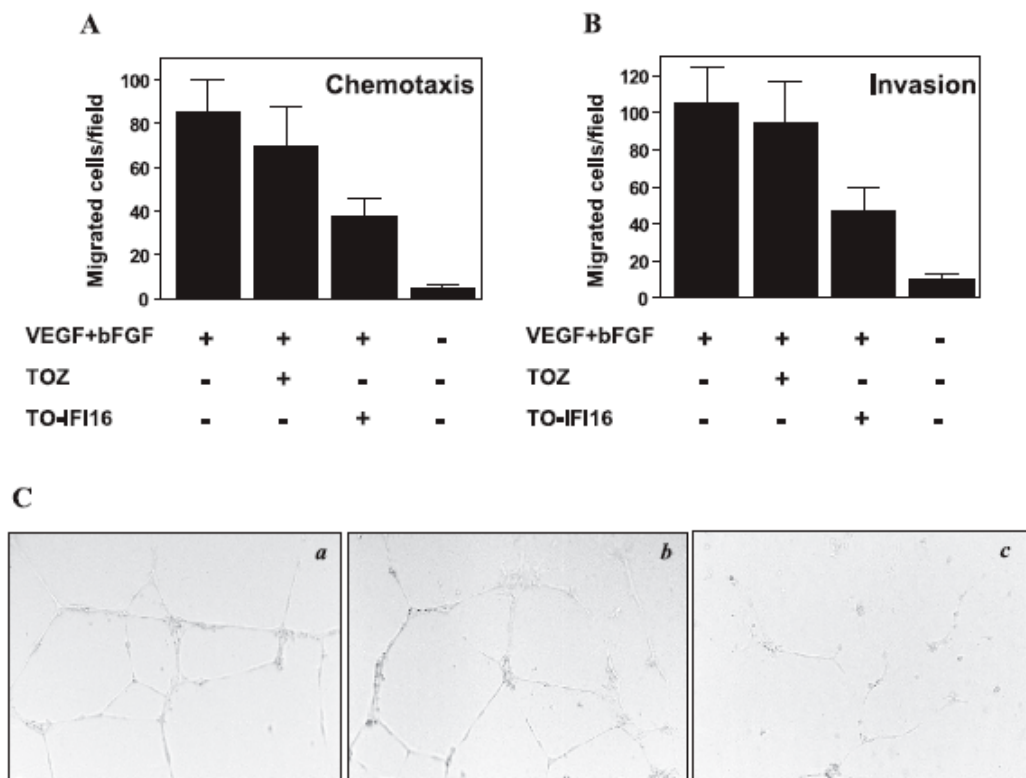


Fig. 3. Sustained IFI16 expression inversely correlates with HUVEC migration, invasion, and tube morphogenesis. (A,B) VEGF and bFGF-induced migration (A) and invasion (B) of HUVEC in modified Boyden chambers. Cells uninfected or infected with TOZ and TO-IFI16, respectively (36 hpi), were placed in the upper compartment of 24-well Boyden chambers as described in Materials and methods. VEGF and bFGF were added in lower wells. Cells migrated through the filter were counted after 6 h and data are expressed as the number of migrated cells in high-power fields. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). (C) Tube Morphogenesis activity. Cells (8×10^4 cells/well) uninfected (a) or infected with TOZ (b) and TO-IFI16 (c), respectively (36 hpi), were seeded onto Matrigel-precoated wells and cultured in presence of complete EGM-2 medium. Photographs were taken 12 h later. Original magnification, $\times 160$. Each experiment performed in triplicate has been repeated at least five times and one representative is reported.

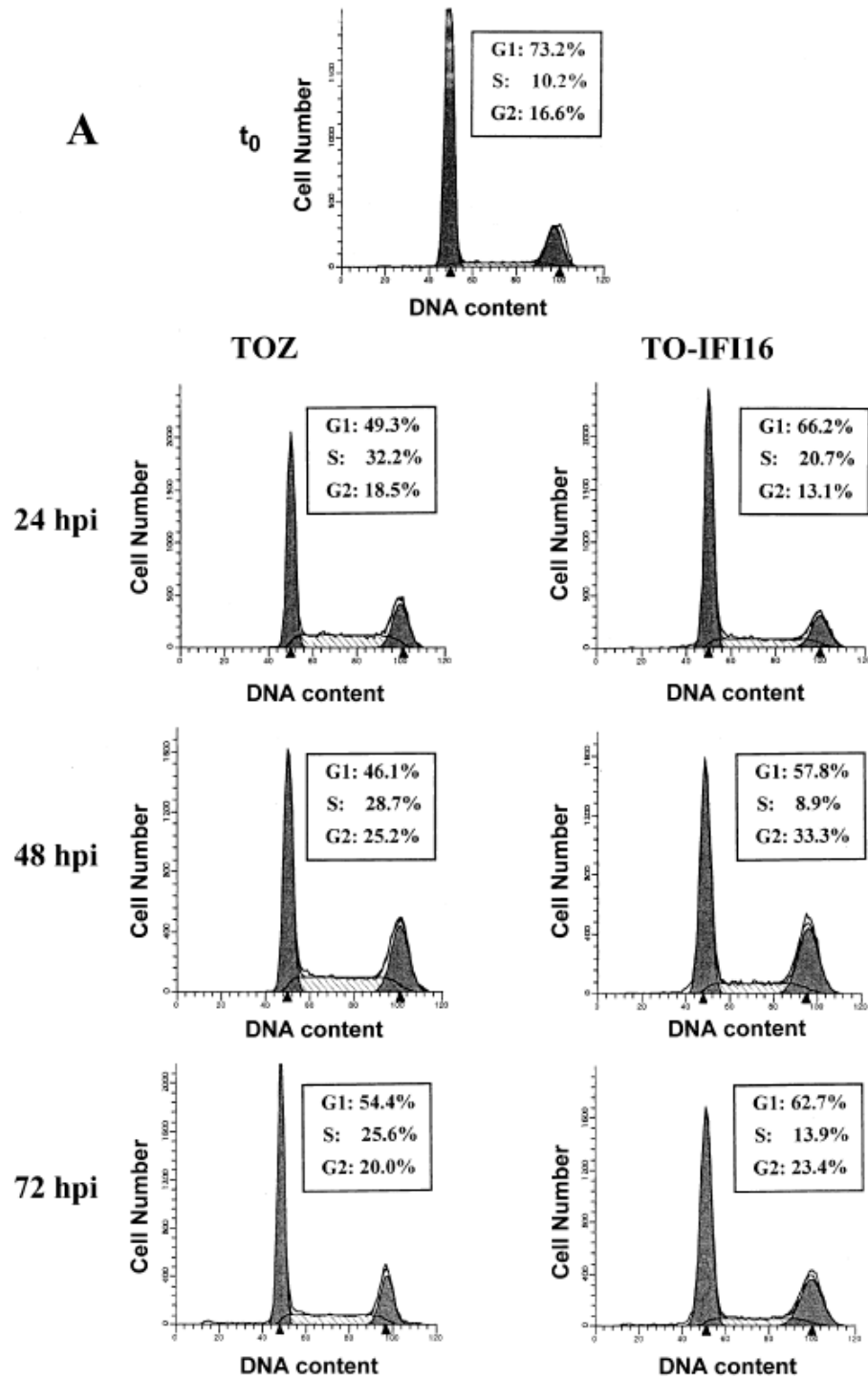


Fig. 4. Sustained IFI16 overexpression inhibits HUVEC cell cycle progression. (A) Growth-arrested HUVEC (indicated as t_0) were infected with TOZ or TO-IFI16 vectors, replated at low cell density, and then cultured in complete EGM-2 medium. At the indicated times post infection, cell cycle distribution was evaluated. (B) Proliferating HUVEC (indicated as t_0) were infected with TOZ or TO-IFI16 vectors, replated at low cell density, and at the indicated times post infection analyzed for cell cycle distribution. Cellular DNA content was assessed with a FACScalibur flow cytometer (Becton and Dickinson) and analyzed with the ModFit LT software program (Becton and Dickinson). The experiments were repeated three times and one representative is reported.

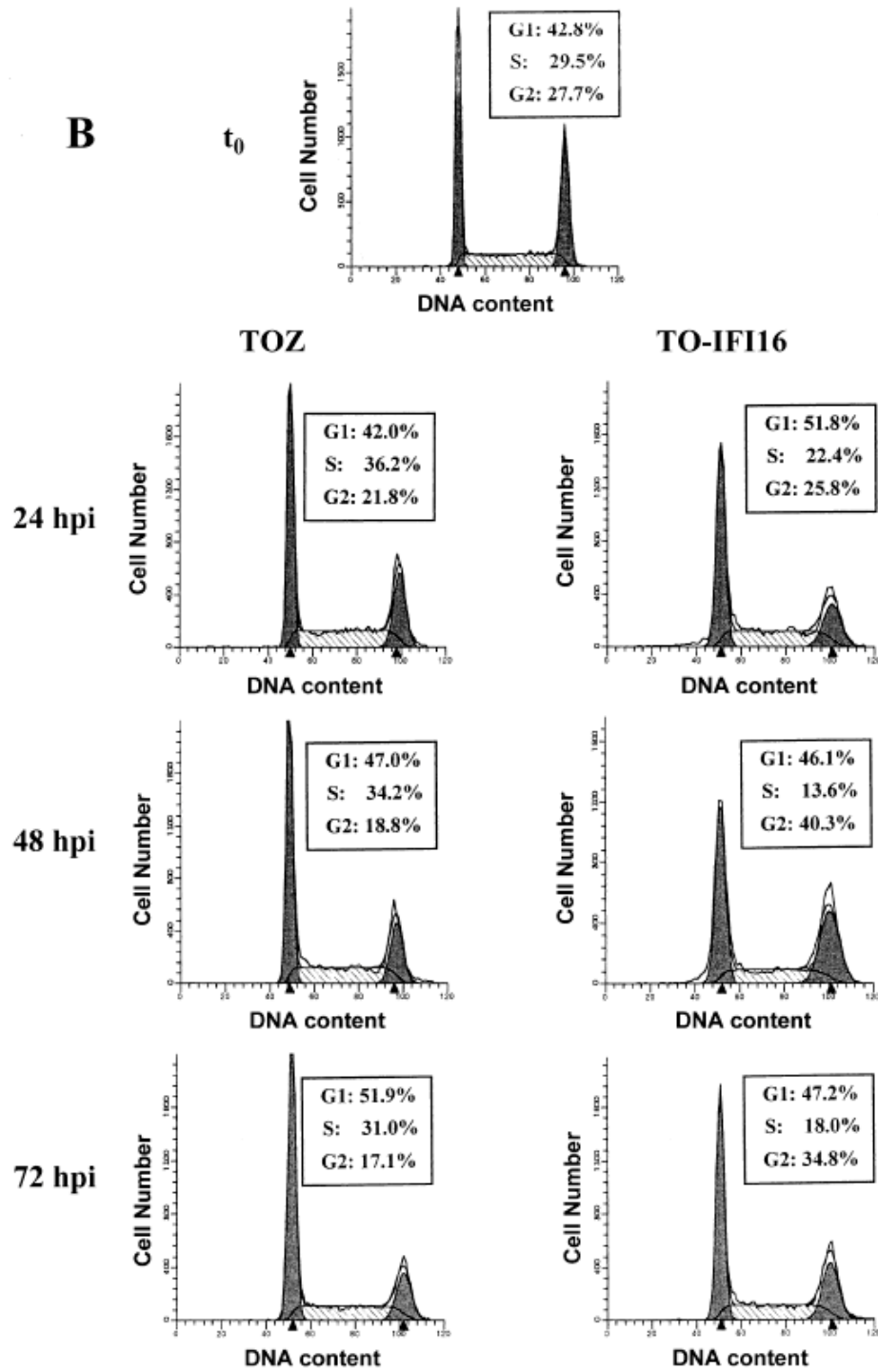


Fig. 4 (continued).

chemoattractants were not present, HUVEC migration through the Matrigel-coated membrane was not stimulated (Fig. 3B).

Apart from migration and invasion, tube formation is another important parameter of endothelial function that can be evaluated in vitro. HUVEC cultured on a Matrigel

rapidly align, extend processes into the matrix, and, finally, form capillary-like structures [37,38]. These structures are composed of polarized cells connected via complex junctions surrounding a central lumen. Within 24 h after seeding on Matrigel, TOZ-infected HUVEC showed the typical anastomosed cellular network observed with uninfected HUVEC, with an increased number of intercellular contacts and overall complexity of the network (Fig. 3C, insets a and b). In contrast, IFI16-overexpression completely inhibited the formation of these capillary structures, blocking HUVEC growth and tube morphogenesis on Matrigel (Fig. 3C, inset c). To prove specificity of IFI16-mediated antiangiogenic activity, infected HUVEC were also analyzed for class I MHC expression. As shown by FACS analysis, this cellular function was not affected by IFI16 overexpression (data not shown).

Altogether, these data demonstrate that sustained expression of IFI16 impairs some functions of HUVEC considered to be important *in vitro* parameters of angiogenesis.

Sustained IFI16 overexpression inhibits HUVEC cell cycle progression

We have previously shown that mouse 3T3 cells arrest in the G1 phase of the cell cycle upon transfection of the *Ifi202* or *Ifi204* genes [39,40]. This arrest was not further characterized, nor was the fate of the cells upon growth inhibition, that is senescence, apoptosis, or necrosis. To verify whether IFI16 causes a G1 arrest in HUVEC and determine its modalities, several experiments were performed using either HUVEC growth-arrested by both contact inhibition and culturing for 48 h in basal EBM-2 medium, or exponentially growing by culturing them at low density in EGM-2 medium.

Growth-arrested HUVEC (designated as t_0 , Fig. 4A) were infected with TOZ or TO-IFI16 recombinant viruses, replated at low density in complete medium, and DNA content was determined by flow cytometry. Characterization at different intervals post infection provided a more complete picture of the life cycle kinetics of the infected cell lines. Fig. 4A shows the proportion of cell cycle arrest in infected cells at various time points post infection. After 24 h, about 51% of TOZ-infected cells had progressed to S and G2/M phases with only 49% in G1 phase. This pattern of cell distribution did not vary during the subsequent evaluations at 48 and 72 hpi, indicating that the empty vector does not influence cycle progression. In contrast, when HUVEC were infected with TO-IFI16, the highest proportion of cells remained in the G1 phase (66% cells at 24 h, >57% cells at 48 h, and >62% cells at 72 h), whereas the other phases displayed cell percentages significantly lower than those observed with TOZ-infected cells at all time points.

To determine whether the IFI16 activity on cell cycle progression depends on the phase of the cell cycle when

the infection is performed, exponentially growing cells were infected with either TOZ and TO-IFI16 recombinant viruses, replated at low density in complete medium, and at various time points post infection the DNA content was analyzed. As shown in Fig. 4B, infection with TOZ vector did not significantly influence cell cycle progression from 24 to 72 hpi. Cell percentage in G1 increased from >42% to >51%, decreased from >21% to 17% in G2, and from 36% to 31% in S. A different pattern of cell distribution emerged with exponentially growing TO-IFI16-infected cells. At 24 h post infection, >51% HUVEC were in G1 phase, >25% in G2 phase, and >22% in S phase. At 48 h post infection, >46% HUVEC were in G1 phase, >13% in S phase, but, remarkably, >40% HUVEC accumulated in G2/M phase. Finally, at 72 h post infection, >47% HUVEC were in G1, about 18% in G2, and >34% were in S phase.

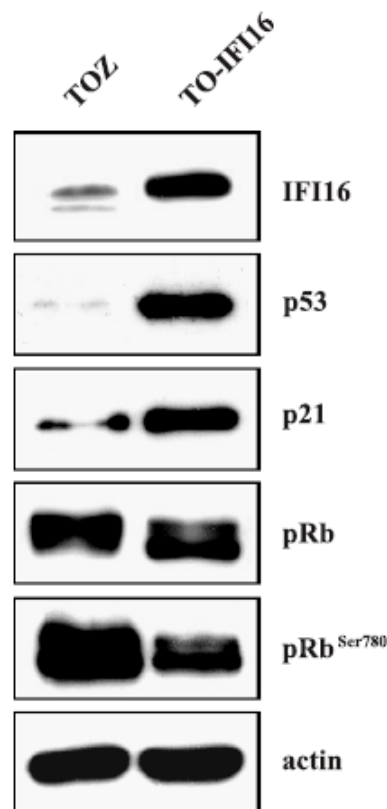


Fig. 5. Effect of IFI16 overexpression on cell cycle regulatory proteins. Immunoblots of cellular lysates corresponding to TOZ- or TO-IFI16-infected cells are shown. At 48 h after infection, cell lysates were prepared, and equal amounts (20 μ g) were separated by gel electrophoresis and transferred to Immobilon membranes. The proteins were then probed with rabbit affinity-purified anti-IFI16, anti-p53, anti-p21, anti-pRb, and anti-pRb Abs. The membrane was then incubated with the appropriate secondary Ab conjugated with horseradish peroxidase and visualized with an ECL kit (Amersham). Actin immunodetection was performed as an internal control.

Altogether, these results demonstrate that IFI16 gene inhibits the progression of HUVEC through the cell cycle, but the outcome of cell accumulation strictly depends on the growth phase in which IFI16 overexpression occurs. When

it is overexpressed in growth-arrested cells, they do not enter the S phase and accumulate in G1, whereas if IFI16 gene is overexpressed in an exponentially growing population, they accumulate in the G2/M phase.

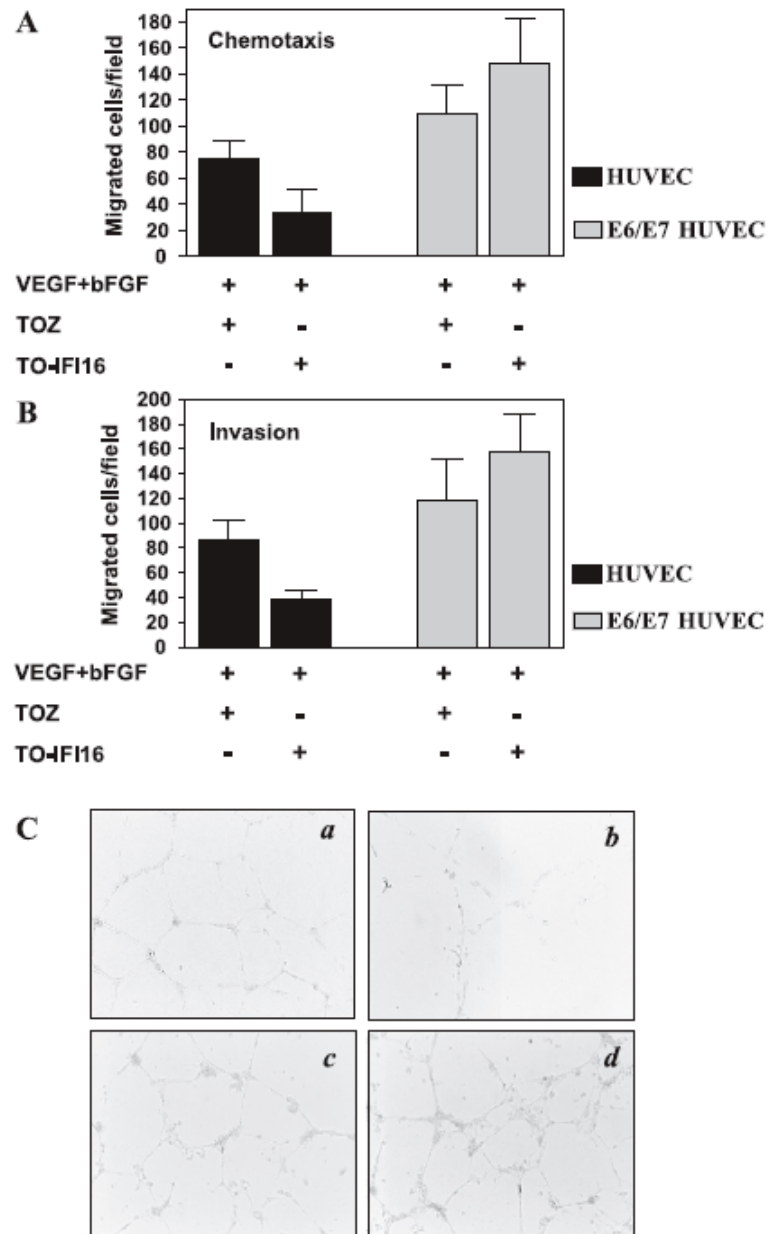


Fig. 6. HPV16 E6/E7 oncogenes reverse the effects of IFI16 overexpression on HUVEC migration, invasion and tube morphogenesis. (A,B) VEGF and bFGF-induced migration (A) and invasion (B) of primary or HPV16 E6/E7 immortalized HUVEC in modified Boyden chambers. Cells infected with TOZ and TO-IFI16, respectively (36 hpi) were placed in the upper compartment of 24-well Boyden chambers as described in Materials and methods. VEGF and bFGF were added in lower wells. Cells migrated through the filter were counted after 6 h and data are expressed as the number of migrated cells in high-power fields. Data are expressed as mean \pm SD ($n = 3$). (C) Morphogenesis activity. Primary or HPV16 E6/E7 immortalized HUVEC (8×10^4 cells/well) infected with TOZ (a and c, respectively) or TO-IFI16 (b and d, respectively) (36 hpi) were seeded onto Matrigel-precoated wells and cultured in presence of complete EGM-2 medium. Photographs were taken 12 h later. Original magnification, $\times 160$. Each experiment performed in triplicate was repeated at least three times and one representative is reported.

Earlier reports showed that 200 gene families modulate cell growth by interacting with both p53 and pRb systems and down-regulate transcription mediated by E2F [20,22,40]. To further define the molecular events underlying the effects of IFI16 on HUVEC physiology, that is migration, invasion, tube formation, and proliferation, the steady state levels of the tumor suppressor proteins p53 and pRb, and the p21Cip1/WAF1 (p21WAF1), were monitored at 48 h after infection with either TO-IFI16 or TOZ recombinant viruses, when cell growth is arrested according to FACS analysis. As shown in Fig. 5, the levels of both p53 and p21WAF1 were significantly augmented upon infection with TO-IFI16 compared to those observed with the TOZ virus. Interestingly, the increase in p21WAF1 suggest that the induced p53 is functional [41]. When the levels of pRb expression were analyzed, although no modulation of the Rb steady state levels was observed, the protein appeared to be significantly hypophosphorylated, suggesting that it is in the active form typical of cells arrested in the G1 phase.

Inhibition of cell cycle progression by IFI16 overexpression is counteracted by HPV16 E6/E7 genes

The best characterized HPV16 E6 activity is its ability to induce degradation of the tumor suppressor protein p53 via the ubiquitin pathway [42,43]. The other viral oncoprotein, E7, from the high-risk HPV types, is a strong activator of the cell cycle and promotes G1/S transition, even in the presence of negative cell cycle regulators [44]. This E7 activity is in part explained by inactivation of the tumor suppressor retinoblastoma [44].

To establish whether IFI16 antiangiogenic activity requires both functional p53 and pRb pathways, HUVEC were transduced with recombinant retroviruses expressing the E6 and E7 genes of HPV16. E6 and E7 gene expression was confirmed by RT-PCR (data not shown). Transduced HUVEC were then infected with both TO-IFI16 and TOZ and the ability of E6/E7 proteins to alleviate the in vitro activity of IFI16 on HUVEC functions was determined.

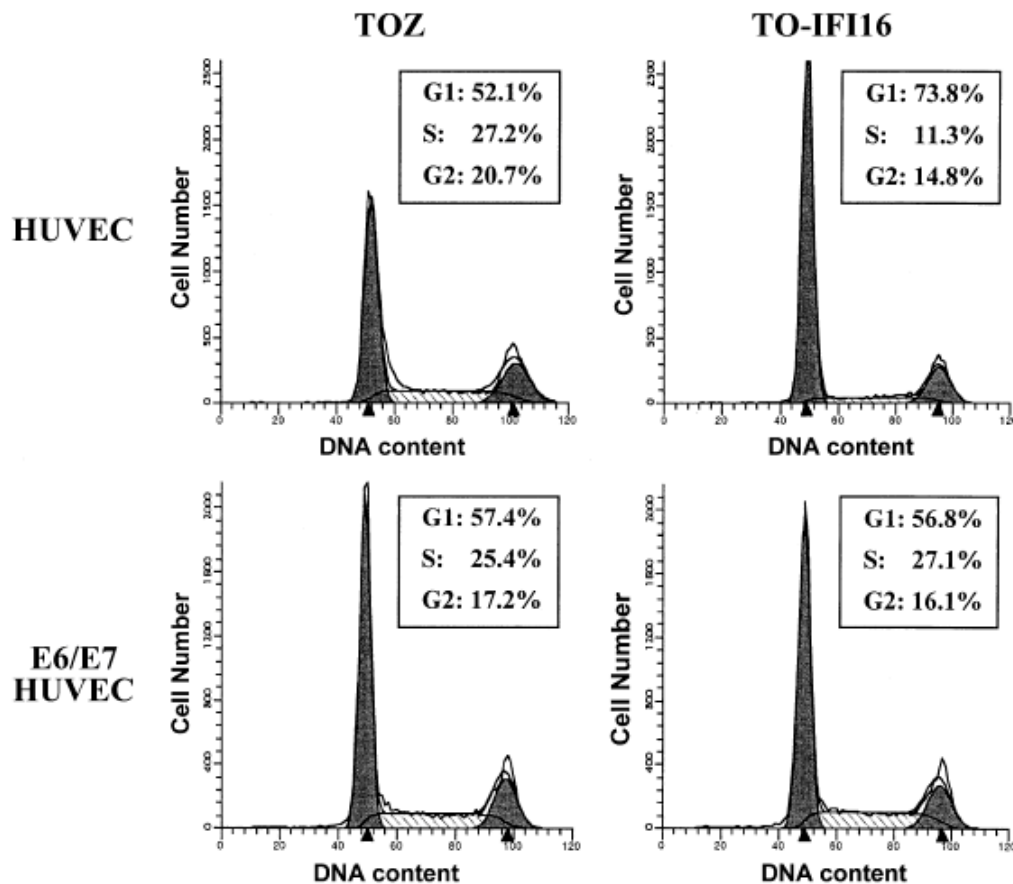


Fig. 7. HPV16 E6/E7 oncogenes reverse the effects of IFI16 overexpression on HUVEC cell cycle progression. Growth-arrested primary or HPV16 E6/E7-immortalized HUVEC were infected with TOZ or TO-IFI16 vectors, replated at low cell density, and then cultured in complete EGM 2 medium. At 48 hpi, cell cycle distribution was evaluated. Cellular DNA content was assessed with a FACScalibur flow cytometer (Becton and Dickinson) and analyzed with the ModFit LT software program (Becton and Dickinson). The experiments have been repeated three times and one representative is reported.

For this purpose, parental- or E6/E7 immortalized-HUVEC were infected with TOZ or TO-IF116 and their motility and invasion capabilities, tube morphogenesis, and cycle progression compared. As shown in Fig. 6, infection with TO-IF116 strongly inhibited motility (panel A) and invasion capabilities (panel B) along with the formation of capillary-like structures (panel C) of primary HUVEC compared with TOZ-infected HUVEC. In contrast, when HUVEC immortalized with HPV16 E6/E7 oncogenes were infected with TO-IF116, the number of cells migrating throughout the filters coated with gelatin (148 ± 16 migrating cells/field) or Matrigel (158 ± 15 invading cells/field) was significantly higher than that observed with cells infected with TOZ (110 ± 8 migrating cells/field and 118 ± 12 invading cells/field, respectively). In line with these results, IF116 overexpression in immortalized HUVEC significantly enhanced tube formation with an increased number of intercellular contacts and overall complexity of the network compared to that observed with immortalized HUVEC infected with TOZ (Fig. 6C, insets c and d vs. a and b, respectively).

To determine whether HPV16 E6/E7 oncogenes reverse IF116-induced growth inhibition, parental HUVEC or HUVEC transduced with pBabeE6/E7 (E6/E7 HUVEC) were growth-arrested both by contact inhibition and by culturing them in EBM-2 medium; cells were then infected with TOZ or TO-IF116, and at 48 hpi the cell cycle profiles were determined by FACS analysis. As shown in Fig. 7, E6/E7 HUVEC overexpressing IF116 displayed a much lower percentage of cells in G1 than that observed with primary HUVEC infected with TO-IF116 (56.8% vs. 73.8%, respectively), but very similar to that observed with E6/E7 HUVEC or primary HUVEC infected with TOZ. In contrast, an opposite effect was observed when the other phases of the cell cycle were compared: a higher percentage of cells in both S and G2/M was constantly observed in E6/E7 HUVEC similar to those observed with cells infected with TOZ.

Altogether, these results suggest that in the absence of functional p53 and pRb systems following E6/E7 infection, IF116 not only loses its ability to exert antiangiogenic and antiproliferative activities, but even enhances some parameters of *in vivo* angiogenesis, that is endothelial cell invasion and tube morphogenesis.

Discussion

Earlier reports demonstrated that the mouse *Ifi200* genes, namely *Ifi202* and *Ifi204*, when overexpressed in primary mouse embryo fibroblasts or NIH3T3 cells, arrest their proliferation by delaying transition from G1 to S phase [39,40]. Interaction with both pRb and p53 systems appears to be essential for this antiproliferative activity [19–23,45]. By contrast, less information is available about the human homolog IF116, probably due to the lack

of an appropriate normal cellular model in the human system.

In this study, we have developed a suitable experimental model to test IF116 biological functions by using primary HUVEC, which are usually poorly transfectable by conventional methods, transduced with a HSV-derived replication-defective vector carrying the IF116 cDNA. The choice of the endothelial cell system was dictated by two previous findings. *In vivo*, along with hematopoietic and stratified squamous epithelial cells, endothelial cells specifically express IF116, suggesting a role of this gene in the control of their physiology. *In vitro*, Western blotting analysis demonstrated that in proliferating HUVEC, IF116 expression is barely detectable and gradually increases when cell growth halts upon reaching confluence. It may thus be involved in the modulation of endothelium differentiation and proliferation. The use of the HSV-derived TO-IF116 vector allowed overexpression of the IF116 protein in primary HUVEC and revealed for the first time that sustained IF116 expression suppresses their growth, migration, and organization into capillary-like structures, together with cell cycle progression. Taken together, our results suggest that IF116 contributes to maintenance of a quiescent, differentiated phenotype in HUVEC and that its expression must decrease for tube morphogenesis to proceed.

Angiogenesis occurs by a series of sequential steps. In response to angiogenic stimuli, endothelial cells degrade the basement membrane by secreting proteolytic enzymes that include metalloproteinases (MMPs) and serine proteases [1,2,37]. The cells then migrate through the degraded basement membrane and continue to break down the interstitial stroma as they move. The endothelial cells at the tip of sprout do not usually divide, whereas the trailing cells at the base of the new vessel proliferate [38]. The endothelium then aligns in a bipolar fashion to form a lumen. Given the crucial function of MMPs in the degradation of basement membrane in the initial steps of angiogenesis, it is therefore conceivable that one of the mechanisms exploited by IF116 to inhibit chemotaxis, chemoinvasion, and tube morphogenesis is down-regulation of MMPs secretion. We have, in fact, observed that in zymography experiments the supernatants from HUVEC infected with TO-IF116 contain less proteolytic activity attributable to MMP2 and MMP9 in consequence of a decreased expression of MMP2 and MMP9 proteins (data not shown). This observation is consistent with a previous report showing that another IFN-inducible gene, namely the guanylate protein-1 GTPase, controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression [10].

In addition to proteolytic enzyme secretion and migration, tube morphogenesis depends on endothelial cell proliferation [1,2,37,38]. Analysis of cell growth and cell cycle profile upon TO-IF116 infection suggests that sustained expression of IF116 affects HUVEC proliferation. Moreover, Western blotting analysis and IF116 overexpression in

HPV16E6/E7-transduced cells revealed that its activity depends on both functional p53 and pRb pathways. The p53 and pRb protein families are key cell cycle regulators that manage the response to a variety of stimuli either by inducing cell growth arrest, senescence, or apoptosis [46–48]. The mouse homolog p202 was found to bind the murine homolog of the human p53-binding protein 1 (p53BP1) and regulate transcriptional activation mediated by p53 [45]. The mouse p204 contains the pRb binding motifs LXCXE and binds pRb [20]. Its overexpression, as here with IFI16, delays progression of cells from the G1 to the S phase. IFI16 directly binds to the C-terminal region of p53 through the consensus motif MFHATVAT in the 200-amino-acid domain a, and augments p53-mediated transcriptional activation [23]. The outcome of immunoblotting analysis confirms that sustained IFI16 expression increases both p53 and pRb levels, the latter in its hypophosphorylated form. The molecular mechanisms underlying cell cycle regulation by p53 have been well defined. p53 transcriptionally up-regulates the p21WAF1 gene, the protein product of which inhibits the kinase activity of cdk4/cyclin D [49]. Activation of cdk4/cyclin D results in phosphorylation of pRb, release of pRb from the pRb/E2F/DP-1 complex, and progression to S phase via activation of E2F/DP-1 responsive genes [50]. Thus, p21WAF1 provides a link between IFI16, p53, and pRb regulatory pathways. It can act to limit the phosphorylation of pRb, thereby preventing cells from exiting the G1 phase of the cell cycle.

The transforming proteins of DNA tumor viruses such as SV40 large T antigen, adenovirus E1A/E1B, or HPV16 E6/E7 extend the life span of human cells in culture [51]. Extension of life span is dependent on the ability of these viral proteins to target the tumor suppressor proteins, p53 and pRb, and render them functionally inactive. When HPV16 E6/E7-transduced HUVEC were analyzed to determine their tubulogenesis activity and cell cycle progression upon IFI16 overexpression, it became evident that inactivation of both p53 and pRb pathways renders them resistant to IFI16 antitubulogenesis and antiproliferative activities. In this context, Xin et al. [52] reported that ectopic expression of IFI16 in prostate cancer cell lines resulted in colony formation inhibition that differed with respect to expression of functional pRb and p53; the maximum inhibition was seen in LNCaP (these cells express functional Rb) and minimum inhibition was seen in DU-145 cells (these cells do not express functional Rb and p53). Importantly, up-regulation of p21WAF1 and inhibition of E2F-stimulated transcription accompanied inhibition of cell growth by IFI16 in these prostate cancer cell lines. Moreover, Johnstone et al. [23] earlier reported that IFI16 can directly bind to the C-terminal region of p53 and augment p53-mediated transcriptional activation of a reporter construct containing the promoter from the p21WAF1 gene with a p53-binding site. Altogether, these observations supported the possibility that IFI16-mediated antiangiogenic activity depends on the presence of functional p53 and pRb. On the contrary, Kwak

et al. [53] reported that the inhibition of endogenous IFI16 expression by small interfering RNA (siRNA) induces p21WAF1 mRNA and protein expression through p53, and results in cell cycle arrest. However, there are numerous differences between the experiments conducted by Kwak et al. and the ones reported here that may affect the cellular response to growth-inhibitory signals. For example, they have employed a tumor cell line, U2OS, expressing high level of endogenous IFI16, whereas we have used primary normal endothelial cells (HUVEC) whose basal IFI16 level is very low and highly inducible by various stimuli. In addition, unlike our experiments, they have inhibited endogenous IFI16 expression in U2OS cells that constitutively display high IFI16 levels and strongly argues against its antiproliferative activity. In light of this, IFI16 is possibly functionally inactive in U2OS, or it may even be the case that mutations occurred in its downstream signaling pathways.

Our observations on the capability of IFI16 to control some aspects of endothelial cell physiology have some interesting implications. The first is that until now, it has been difficult to assign a biological function to the IFI16 gene. Its homology to the mouse *Ifi204* indicated its involvement in cell cycle control, but the lack of efficient transducing vectors and appropriate cell systems has hampered definition of its biological function. HSV-derived vectors overcame these obstacles and provided the first evidence of a link between IFI16 and inhibition of cell proliferation. The second is based on previous *in vivo* findings. Immunohistochemistry revealed that IFI16 is highly expressed in endothelial and epithelial cells and may be of significance in their physiology. The use of primary HUVEC established a link between IFI16 expression and control of tube morphogenesis *in vitro*, considered to be the counterpart of *in vivo* angiogenesis. The third implication is that at the molecular level IFI16 exploits both p53 and pRb pathways to control the cell cycle and proliferation. Thus, these data may help to explain why *in vivo* transformed cells bearing mutations at these two important regulators of cell cycle progression become resistant to the IFN treatment because of the acquisition to evade the IFN antiproliferative and antiangiogenic activities. The fourth one is that IFNs so far have been found to have antiangiogenic properties *in vivo* and *in vitro* through down-regulation of the expression of proangiogenic molecules, such as bFGF [6], MMP-2 and MMP-9 [7–9], and IL-8 [10]. Our present findings showing that sustained expression of IFI16 impairs tube morphogenesis and growth by inhibiting HUVEC cell cycle progression provide a further illustration of the molecular mechanisms exploited by IFNs to regulate angiogenesis.

Acknowledgments

We thank Filippo Renò (Novara) and Adriana Albini (Genova) for helpful discussion and manuscript revision,

and Barbara Azzimonti (Novara) for preparing retroviral vectors. We thank Joseph Trapani for his generous gift of the pBKS-IFI16 plasmid. This work was supported by grants from Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro, Special Project Oncology “Compagnia di San Paolo”/FIRMS, Lega Italiana per la Lotta contro i Tumori (section of Novara) and Program 40% (MIUR).

References

- [1] W. Risau, Mechanisms of angiogenesis, *Nature* 386 (1997) 671–674.
- [2] G.D. Yancopoulos, S. Davis, N.W. Gale, J.S. Rudge, S.J. Wiegand, J. Holash, Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, *Nature* 407 (2000) 242–248.
- [3] R. Kerbel, J. Folkman, Clinical translation of angiogenesis inhibitors, *Nat. Cancer Rev.* 2 (2002) 727–738.
- [4] M. Iurlaro, R. Benelli, L. Masiello, M. Rosso, A. Albini, Beta interferon inhibits HIV-1 Tat induced angiogenesis: synergism with 13-cis retinoic acid, *Eur. J. Cancer* 34 (1998) 570–576.
- [5] A. Albini, C. Marchisone, F. Del Grosso, R. Benelli, L. Masiello, L. Tacchetti, M. Bono, M. Ferrantini, C. Rozera, M. Truini, F. Belardelli, L. Santi, D.M. Noonan, Inhibition of angiogenesis and vascular tumor growth by interferon-producing cells, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 1381–1393.
- [6] E. Guenzi, K. Topolt, E. Cornali, C. Lubeseder-Martellato, A. Jorg, K. Matzen, C. Zietz, E. Krenmer, F. Nappi, M. Schwemmler, C. Hohenadl, G. Barillari, E. Tschachler, P. Monini, B. Enzoli, M. Stuzl, The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines, *EMBO J.* 20 (2001) 5568–5577.
- [7] R.K. Singh, M. Gutman, C.D. Bucana, R. Sanchez, N. Llansa, I.J. Fidler, Interferon alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 4562–4566.
- [8] K. Gohji, I.J. Fidler, R. Tsan, R. Radinsky, A.C. van Eshenbach, T. Tsuruo, M. Nakajima, Human recombinant interferons-beta and -gamma decrease production and invasion by human KG-2 renal carcinoma cells, *Int. J. Cancer* 58 (1994) 380–384.
- [9] N. Kato, A. Nawa, K. Tamakoshi, F. Kikkawa, N. Suganuma, T. Okamoto, S. Goto, Y. Tomoda, M. Hamaguchi, M. Nakajima, Suppression of gelatinase production with decreased invasiveness of choriocarcinoma cells by recombinant interferon- β , *Am. J. Obstet. Gynecol.* 172 (1995) 601–606.
- [10] E. Guenzi, K. Topolt, C. Lubeseder-Martellato, A. Jorg, E. Nascherberger, A. Albini, M. Stuzl, The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression, *EMBO J.* 22 (2003) 3772–3782.
- [11] R.K. Singh, M. Gutman, N. Llansa, I.J. Fidler, Interferon- β prevents the upregulation of interleukin-8 in human melanoma cells, *J. Interferon Cytokine Res.* 16 (1996) 577–584.
- [12] G.R. Stark, I.M. Kerr, B.R. Williams, R.H. Silverman, R.D. Schreiber, How cells respond to interferons, *Annu. Rev. Biochem.* 67 (1998) 227–264.
- [13] P. Lengyel, D. Choubey, S.J. Li, B. Datta, The interferon-activatable gene 200 cluster: from structure toward function, *Semin. Virol.* 6 (1995) 203–215.
- [14] S. Landolfo, M. Gariglio, G. Gribaudo, D. Lembo, The Ifi 200 genes: an emerging family of IFN-inducible genes, *Biochimie* 80 (1998) 721–728.
- [15] R.W. Johnstone, J.A. Trapani, Transcription and growth regulatory functions of the HIN-200 family of proteins, *Mol. Cell. Biol.* 19 (1999) 5833–5838.
- [16] J.A. Trapani, K.A. Browne, M.J. Dawson, R.G. Ramsay, R.L. Eddy, T.B. Show, P.C. White, B. Dupont, A novel gene constitutively expressed in human lymphoid cells is inducible with interferon- γ in myeloid cells, *Immunogenetics* 19 (1992) 369–376.
- [17] G.R. Burrus, J.A. Briggs, R.C. Briggs, Characterization of the human myeloid cell nuclear differentiation antigen: relationship to interferon-induced proteins, *J. Cell. Biochem.* 48 (1992) 190–202.
- [18] K.L. DeYoung, M.E. Ray, Y.A. Su, S.L. Anzick, R.W. Johnstone, J.A. Trapani, P.S. Meltzer, J.M. Trent, Cloning of a novel member of the human interferon-inducible gene family associated with control of tumorigenicity in a model of human melanoma, *Oncogene* 15 (1997) 453–457.
- [19] M. Lembo, C. Sacchi, C. Zappador, G. Bellomo, M. Gaboli, P.P. Pandolfi, M. Gariglio, S. Landolfo, Inhibition of cell proliferation by the interferon-inducible 204 gene, a member of the Ifi 200 cluster, *Oncogene* 16 (1998) 1543–1551.
- [20] L. Hertel, S. Rolfe, M. De Andrea, B. Azzimonti, R. Osello, G. Gribaudo, M. Gariglio, S. Landolfo, The retinoblastoma protein is an essential mediator that links the interferon-inducible 204 gene to cell-cycle regulation, *Oncogene* 19 (2000) 3598–3608.
- [21] M. De Andrea, M. Ravotto, E. Noris, G.-G. Ying, D. Gioia, B. Azzimonti, M. Gariglio, S. Landolfo, The interferon-inducible gene, Ifi204, acquires malignant transformation capability upon mutation at the Rb-binding sites, *FEBS Lett.* 515 (2002) 51–57.
- [22] C.-J. Liu, B. Ding, H. Wang, P. Lengyel, The MyoD-inducible p204 protein overcomes the inhibition of myoblasts differentiation by Id proteins, *Mol. Cell. Biol.* 22 (2002) 2893–2905.
- [23] R.W. Johnstone, W. Wei, A. Greenway, J.A. Trapani, Functional interaction between p53 and the interferon-inducible nucleoprotein IFI16, *Oncogene* 19 (2000) 6033–6042.
- [24] H. Xin, S. D’Souza, L. Fang, P. Lengyel, D. Choubey, p202, an interferon-inducible negative regulator of cell growth, is a target of the adenovirus E1A protein, *Oncogene* 20 (2001) 6828–6839.
- [25] J.Y. Mori, A. Rashid, B.A. Loggett, J. Young, L. Simms, P.M. Kuehl, P. Langenberg, S.J. Meltzer, O.C. Stine, Instability typing: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability, *Cancer Res.* 61 (2001) 6046–6049.
- [26] S. Varambally, S.M. Dhanasekaram, M. Zhou, T.R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M.G. Sanda, D. Ghosh, K.J. Pienta, R.G. Sewalt, A.P. Otte, M.A. Rubin, A.M. Chinnaiyan, The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer, *Nature* 419 (2002) 624–629.
- [27] H. Xin, J. Curry, R.W. Johnstone, B.J. Nickoloff, D. Choubey, Role of IFI16, a member of the interferon-inducible p200-protein family, in prostate epithelial cellular senescence, *Oncogene* 22 (31) (2003) 4831–4840.
- [28] M. Gariglio, B. Azzimonti, M. Pagano, G. Palestro, M. De Andrea, G. Valente, G. Voglino, L. Navino, S. Landolfo, Immunohistochemical expression analysis of the human interferon-inducible gene IFI16, a member of the HIN200 family, not restricted to hematopoietic cells, *J. Interferon Cytokine Res.* 22 (2002) 815–821.
- [29] W. Wei, C.J. Clarke, G.R. Somers, K.S. Cresswell, K.A. Loveland, J.A. Trapani, R.W. Johnstone, Expression of IFI16 in epithelial cells and lymphoid tissues, *Histochem. Cell Biol.* 119 (2003) 45–54.
- [30] D.M. Krisky, P.C. Marconi, T.J. Oligino, R.J. Rouse, D.J. Fink, J.B. Cohen, S.L. Watkins, J.C. Glorioso, Development of herpes simplex virus replication-defective multigene vectors for combination gene therapy application, *Gene Ther.* 5 (1998) 1517–1530.
- [31] P. Marconi, M. Simonato, S. Zucchini, G. Bregola, R. Argnani, D. Krisky, J.C. Glorioso, R. Manservigi, Replication-defective herpes simplex virus vectors for neurotrophic factor gene transfer in vitro and in vivo, *Gene Ther.* 6 (1999) 904–912.
- [32] W.S. Pear, G.P. Nolan, M.L. Scott, D. Baltimore, Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 8392–8396.
- [33] A. Albini, Y. Iwamoto, H.K. Kleinman, G.R. Martin, S.A. Aaronson, J.M. Kozlowski, R.N. McEwan, A rapid in vitro assay for quantitat-

- ing the invasive potential of tumor cells, *Cancer Res.* 47 (1987) 3239–3245.
- [34] G. Tarabozetti, D. Roberts, L.A. Lotta, R. Giavazzi, Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility and growth: a potential angiogenesis regulatory factor, *J. Cell Biol.* 111 (1990) 765–772.
- [35] Y. Kubota, H.K. Kleinman, G.R. Martin, T.J. Lawley, Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures, *J. Cell Biol.* 107 (1988) 1589–1598.
- [36] A. Albini, Tumor and endothelial cell invasion of basement membranes, *Pathol. Oncol. Res.* 14 (1998) 1–12.
- [37] M. Nguyen, J. Arkell, J.C. Jackson, Human endothelial gelatinases and angiogenesis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33 (2001) 960–970.
- [38] B. Lubarsky, M.A. Krasnow, Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes, *Cell* 112 (2003) 19–28.
- [39] D. Lembo, A. Angeretti, S. Benefazio, L. Hertel, M. Gariglio, F. Novelli, S. Landolfo, Constitutive expression of the interferon-inducible protein p202 in NIH 3T3 cells affects cell cycle progression, *J. Biol. Regul. Homeostatic Agents* 9 (1995) 42–46.
- [40] G. Gribaudo, L. Riera, M. De Andrea, S. Landolfo, The antiproliferative activity of the murine interferon-inducible Ifi200 proteins depends on the presence of two 200 amino acid domains, *FEBS Lett* 456 (1999) 31–36.
- [41] K.F. Macleod, N. Sherry, G. Hannon, D. Beach, T. Tokino, K. Kinzler, B. Vogelstein, T. Jacks, p53-Dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage, *Genes Dev.* 9 (1995) 935–944.
- [42] M. Thomas, D. Pim, L. Banks, The role of the E6-p53 interaction in the molecular pathogenesis of HPV, *Oncogene* 18 (1999) 7690–7700.
- [43] M. Tommasino, R. Accardi, S. Caldeira, W. Dong, I. Malanchi, A. Smet, I. Zehbe, The role of TP53 in cervical carcinogenesis, *Hum. Mutat.* 21 (2003) 307–312.
- [44] H. Zur Hausen, Papillomavirus causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis, *J. Natl. Cancer Inst* 78 (2000) 1–29.
- [45] B. Datta, B. Li, D. Choubey, G. Nallur, P. Lengyel, p202, an interferon-inducible modulator of transcription, inhibits transcriptional activation by the p53 tumor suppressor protein, and a segment from the p53-binding protein 1 that binds to p202 overcomes this inhibition, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 27544–27555.
- [46] A.J. Levine, p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell* 88 (1997) 323–331.
- [47] C.H. Arrowsmith, Structure and function in the p53 family, *Cell Death Differ.* 6 (1999) 1169–1173.
- [48] N. Dyson, The regulation of E2F by pRB-family proteins, *Genes Dev.* 12 (1998) 2245–2262.
- [49] M.G. Ritt, J. Mayor, J. Wojcieszyn, R. Smith, C. Barton, J.F. Modiano, Sustained nuclear localization of p21/WAF-1 upon growth arrest induced by contact inhibition, *Cancer Lett.* 158 (2000) 73–84.
- [50] G. Mulligan, T. Jacks, The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests, *Trends Genet.* 14 (1998) 223–229.
- [51] S.J. Flint, L.W. Enquist, R.M. Krug, V.R. Racaniello, A.M. Skalka (Eds.), *Principles of Virology. Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*, ASM Press, Washington, DC, 2000.
- [52] H. Xin, J. Curry, R.W. Johnstone, B.J. Nickoloff, D. Choubey, Role of IFI16, a member of the interferon-inducible p200-protein family, in prostate epithelial cellular senescence, *Oncogene* 22 (2003) 4831–4840.
- [53] J.C. Kwak, P.P. Ongusaha, T. Ouchi, S.W. Lee, IFI16 as a negative regulator in the regulation of p53 and p21Waf1, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 40899–40904.

CONCLUSIONI

Conclusioni

Gli Interferoni (IFN) svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione della difesa dell'organismo ospite nei confronti non solo delle infezioni virali, ma anche della proliferazione incontrollata tipica delle cellule tumorali. La capacità degli Interferoni di indurre nelle cellule uno stato di resistenza alle infezioni virali è probabilmente la caratteristica più conosciuta, essendo la proprietà fondamentale che ne ha permesso la scoperta. Oltre alle ben note proprietà antivirali, gli IFN partecipano anche attivamente alla regolazione della proliferazione e del differenziamento cellulare. Durante il lungo periodo di co-evoluzione con il proprio organismo ospite, molti virus hanno sviluppato strategie particolari sia per utilizzare a proprio vantaggio le proteine chiave del ciclo cellulare, sia per contrastare le attività antivirali degli Interferoni.

Il progetto di ricerca svolto durante i quattro anni del corso di Dottorato ha riguardato l'approfondimento delle basi molecolari dell'attività antiproliferativa, antiangiogenetica e antivirale degli Interferoni, nonché lo studio della complessa relazione esistente tra infezione da Citomegalovirus (CMV) e Papillomavirus (PV) ed espressione/attività di alcune proteine cellulari, appartenenti o meno al sistema Interferon.

I risultati di questo studio hanno evidenziato come almeno due dei membri di questa famiglia, la murina p204 e la sua controparte umana IFI16, siano dotati di una forte attività antiproliferativa esercitata almeno in parte mediante l'interazione fisica con i membri della famiglia delle "pocket proteins", di cui l'esponente più noto è senza dubbio il prodotto del gene del retinoblastoma, pRb. Come già detto in precedenza, gli Interferoni agiscono anche come potenti inibitori della crescita cellulare e, in parallelo, come regolatori della morte cellulare programmata o apoptosi. Mentre almeno alcuni geni coinvolti nei meccanismi di controllo

dell'apoptosi da parte degli IFN sono già stati identificati, nessun gene interferon-inducibile è stato fino ad oggi direttamente collegato all'attività antiproliferativa. I dati raccolti sui geni HIN-200 ci permettono tuttavia di ipotizzare che almeno alcuni membri di questa famiglia possano costituire il collegamento cercato.

Molto interessanti sono anche i risultati indicanti che la p204 non è coinvolta nell'attività antivirale degli Interferoni, ma è necessaria per il completamento del ciclo riproduttivo del CMV. Appare quindi evidente che questo virus particolare ha sviluppato strategie specifiche per l'utilizzo non solo di proteine facenti parte del normale apparato metabolico cellulare (come la T160 o l'enzima DHFR descritto in seguito) ma anche di proteine appartenenti a sistemi evoluti dalla cellula per contrastare le infezioni virali, come il sistema Interferone. La determinazione dei meccanismi mediante i quali ciò avviene è attualmente oggetto di ricerca nel nostro gruppo.

Abbastanza chiarite sono invece le modalità mediante le quali il CMV umano sfrutta a proprio vantaggio le proprietà enzimatiche della proteina diidrotolato reduttasi (DHFR), le cui funzioni chiave nella via di biosintesi delle purine, della timidina e dell'aminoacido glicina erano già note da tempo. Nel nostro studio abbiamo dimostrato che l'HCMV è in grado di indurre non solo la trascrizione del gene della DHFR (normalmente silente in cellule quiescenti e attiva soltanto durante la fase S, quando avviene la sintesi del DNA cellulare) ma anche di incrementarne l'attività enzimatica in cellule infettate. La nostra ricerca ha inoltre definitivamente evidenziato che questo enzima è il bersaglio dell'attività anticitomegalica del farmaco Metatrexate.

Per quanto riguarda IFI16, appurato che essa rappresenta effettivamente la controparte umana di Ifi204, ci siamo occupati di valutarne l'espressione *in vivo*, tramite l'utilizzo di anticorpi policlonali monospecifici generati nel laboratorio a cui la candidata afferisce. Dopo aver dimostrato che la sua espressione non è

limitata al compartimento ematopoietico, ma risulta particolarmente intensa nelle porzioni proliferanti degli epitelii squamosi stratificati e nelle cellule endoteliali, ci siamo occupati della sua caratterizzazione dal punto di vista molecolare. In particolare, considerato il suo pattern di espressione e la sua capacità di legare pRb con lo stesso motivo riscontrabile anche nella sequenza aminoacidica dell'oncogene E7 di HPV, la linea di ricerca è stata volta a creare un sistema *in vitro* che ci permettesse di chiarire il rapporto esistente tra IFI16 ed infezione virale. A tal fine, considerata la bassa efficienza delle comuni tecniche di trasfezione in colture primarie (cheratinociti, cellule endoteliali, fibroblasti), abbiamo generato una serie di vettori retrovirali ed erpetici con i quali è stato possibile trasdurre la proteina in maniera efficiente.

In particolare, nel lavoro presentato nella parte C, è stato dimostrato che cellule endoteliali primarie (HUVEC - Human Umbilical Vein Endothelial Cells), difficilmente trasfettabili, trasdotte con vettori erpetici difettivi per la replicazione e recanti il cDNA di IFI16, perdono la capacità di proliferare e di formare tubuli *in vitro*. Le caratteristiche tipiche del processo angiogenetico, incluse la chemiotassi e l'invasione di un supporto in Matrigel, vengono invece mantenute in HUVEC che esprimono in contemporanea le oncoproteine E6 ed E7 di HPV16, dimostrando l'importanza di pRb e di p53 per la corretta funzione di IFI16.

Inoltre in un lavoro in via di elaborazione, dal titolo provvisorio "Restoration of IFI16 expression in a null head&neck squamous cell carcinoma-derived cell line inhibits its growth and increases doxorubicin sensitivity", non presentato in questa tesi, abbiamo valutato l'espressione di IFI16 in una serie di linee cellulari derivate da diversi HNSCC (carcinomi squamosi del distretto testa-collo). Ogni linea, derivata direttamente da frammenti tumorali espianati è caratterizzata da morfologia epitelioide. In particolare, nella linea denominata HN136, che è risultata IFI16 negativa anche in seguito ad induzione con IFN, abbiamo

dimostrato come il ripristino di IFI16 mediante l'utilizzo di vettori retrovirali determina una inibizione della crescita cellulare e della proprietà trasformante in vitro. Inoltre, per chiarire i meccanismi attraverso i quali IFI16 esercita questa proprietà nei cheratinociti e per fornire nuovi spunti per la terapia degli HNSCC, abbiamo valutato l'effetto del ripristino di IFI16 nella medesima linea cellulare esposta a doxorubicina, noto agente che induce danni al DNA. Confrontando la risposta di questa linea con cheratinociti normali e con cheratinociti spontaneamente immortalizzati (HaCaT), abbiamo identificato nella cosiddetta catastrofe mitotica associata ad arresto in G2/M il possibile meccanismo responsabile della inibizione della crescita cellulare nella linee HNSCC.

In questa tesi è inoltre presentato un lavoro in corso di stampa in cui si è valutato dal punto di vista virologico, genetico ed immunologico un paziente affetto da Epidermodisplasia Verruciforme (EV), una rara malattia ereditaria, autosomica recessiva. Considerata l'elevata suscettibilità dei pazienti affetti da EV all'infezione da papillomavirus normalmente presenti come commensali nella popolazione sana, si è dapprima confermata la presenza di questi EV-HPV (oggi identificati come genere *beta*) anche nel paziente in esame. Quindi, le successive indagini hanno permesso di evidenziare come la patologia di questo paziente rappresentasse una variante dal momento che: i) non si è riscontrata alcuna mutazione nei geni EVER, mutati nella maggioranza dei casi EV; ii) è stata evidenziata una forte riduzione dei linfociti T CD8 positivi, pur presentando un quadro clinico del tutto analogo ai pazienti EV descritti in letteratura.