

## Tesis de Posgrado

# El receptor acoplado a proteína G del herpes virus asociado al sarcoma de Kaposi (Kaposi's Sarcoma associated herpesvirus o KSHV) es una oncoproteína viral y un activador angiogénico

Bais, Carlos E.

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Bais, Carlos E.. (2000). El receptor acoplado a proteína G del herpes virus asociado al sarcoma de Kaposi (Kaposi's Sarcoma associated herpesvirus o KSHV) es una oncoproteína viral y un activador angiogénico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3288\\_Bais.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3288_Bais.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Bais, Carlos E.. "El receptor acoplado a proteína G del herpes virus asociado al sarcoma de Kaposi (Kaposi's Sarcoma associated herpesvirus o KSHV) es una oncoproteína viral y un activador angiogénico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000. [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3288\\_Bais.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3288_Bais.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y  
NATURALES**

**Tesis para optar al título de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires**

**El receptor acoplado a proteína G del herpes virus asociado  
al sarcoma de Kaposi (Kaposi's Sarcoma associated  
herpevirus o KSHV) es una oncoproteína viral y un  
activador angiogénico**

**Autor: Carlos E. Bais  
Director: Dr. Enrique A. Mesri  
Co-Director: Dr. Mariano Levin**

**Weill Cornell Medical College**

**2000**

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y  
NATURALES**

**A thesis presented to the faculty of University of Buenos  
Aires in partial fulfillment of the requirements for the degree  
of Doctor**

**The G protein coupled receptor encoded by the Kaposi's  
Sarcoma Associated Virus is a viral oncoprotein and an  
angiogenic activator**

**Author: Carlos E. Bais  
Advisor: Dr. Enrique A. Mesri  
Co-Director: Dr. Mariano Levin**

**Weill Cornell Medical College**

**2000**

## The G protein coupled receptor encoded by the Kaposi's sarcoma -associated virus is a viral oncoprotein and angiogenesis activator

The Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus (KSHV-HHV-8) is a  $\gamma$ -2 herpesvirus that is implicated in the pathogenesis of Kaposi's sarcoma and of primary effusion B-cell lymphomas (PELs), it encode putative oncogenes, and genes that may cause Kaposi's sarcoma lesions by stimulating angiogenesis. The G-protein-coupled receptor encoded by an open reading frame (ORF 74) of KSHV is expressed in Kaposi's Sarcoma lesions and in PELs, and stimulates signaling pathways linked to cell proliferation in a constitutive (agonist-independent) way. Here we show that signaling by this G-Protein Coupled Receptor leads to cell transformation an tumorigenicity, and induces a switch to an angiogenic phenotype mediated by vascular endothelial growth factor (VEGF), an angiogenesis and Kaposi's-spindle cell growth factor. We find that this receptor can activate ( in HEK293T) two protein kinases, JNK/SAPK and p38MAPK, by triggering signaling cascades like the ones induced by inflammatory cytokines that are angiogenic activators and mitogens for Kaposi's sarcoma-cells and B cells. Although this is a suggestive result, when we express KSHV-GPCR in different cell types it activate different signaling cascades, and induces different phenotypes. Using pathway specific dominant negatives and pharmacological inhibitors we show that, in the cell line NIH3T3, the activation of JNK and p38 play a major rol in the molecular mechanism of KSHV-GPCR induced cell transformation.

Endothelial cells play a central rol in kaposi's sarcoma pathogenesis. KSHV infects endothelial cells and spindle-like cells, of suspected endothelial origin, wich are present in the kaposi's sarcoma lesions. Therefore, in the context of viral infection, KSHV-GPCR is expressed in endothelial cells. As the expression of KSHV-GPCR has different biological and biochemical effects in different cell types we decide to study the consequences of KSHV-GPCR expression in human primary endothelial cells.

KSHV-GPCR expression in endothelial cells induce strong morphologic changes, modifications in the cytoskeleton structure, secretion of metalloproteases and resistance to serum starvation mediated by activation of the PI3K/AKT pathway's. All those changes are reminiscent of the transformed phenotype.

Usually, the expression of transforming oncogenes in primary cells induces shortage of telomeres, premature senescence, and cell death. In sharp contrast the expression of KSHV-GPCR in primary endothelial human cells stabilize telomere length, by an alternative mechanism independent of telomerase activity (Alternative Lengthening of Telomeres or ALT ), and immortalize endothelial cells. To our knowledge this is the first demonstration that a protein encoded by KSHV is able to immortalize primary human cells. Thus using a KSHV oncogenic protein we created a new immortalized endothelial cell line that we call Ecs-KSGPCR. As predicted by the multistep carcinogenesis hypothesis, our preliminary experiments suggest that the mechanisms of Terminal Proliferation Arrest (TPA) are not completely suppressed by KSHV-GPCR and that additional oncogenic events are necessary in order to fully transform human primary endothelial cells. Further research will determine whether other KSHV's oncogenes can cooperate oncogenically with KSHV-GPCR.

KDR/VEGFR-2 and Tie-2 are endothelial specific tyrosine kinase receptors that play key roles in vascular biology. These two receptors regulate cell survival and proliferation of endothelial cells during angiogenesis, as a consequence of this they appear to be minimally expressed in quiescent endothelium *in vivo*, and they are down regulated after a few passages, *in vitro*, of primary endothelial cells. Surprisingly KDR and Tie-2 are overexpressed in long term cultures of Ecs-KSGPCR. Although in this work we show that the sustained expression of those receptors is functional, further experiments are required to determine if they play any role in the immortalization process.

We conclude that KSHV-GPCR is a viral oncogene that can exploit cell signaling pathways to induce oncogenesis and angiogenesis in KSHV-mediated oncogenesis.

# **Introducción**

# 1) Introducción al sarcoma de Kaposi:

Esta enfermedad fue descrita por primera vez en el año 1872 por un dermatólogo húngaro llamado Moriz Kaposi (Kaposi M., 1872). Clínicamente se presenta como manchas rojo-purpúreas diseminadas en la piel (ver figura 1) que se caracterizan por la intensa neovascularización (o angiogénesis) que también afecta los ganglios linfáticos y en los casos más avanzados las vísceras. Básicamente el sarcoma de Kaposi puede definirse como un tumor vascular.

Antes de la epidemia de SIDA se consideraba al sarcoma de Kaposi como una enfermedad poco frecuente y relativamente indolente que afectaba principalmente a ancianos de origen mediterráneo y era endémico en África ecuatorial, concomitantemente con la epidemia de VIH comenzó a verse con frecuencia una forma sumamente agresiva de esta enfermedad en pacientes jóvenes con SIDA (SIDA-SK). Actualmente el sarcoma de Kaposi es el cáncer de mayor prevalencia en pacientes con SIDA.

## 1.1) Análisis histológico de las lesiones de sarcoma de Kaposi

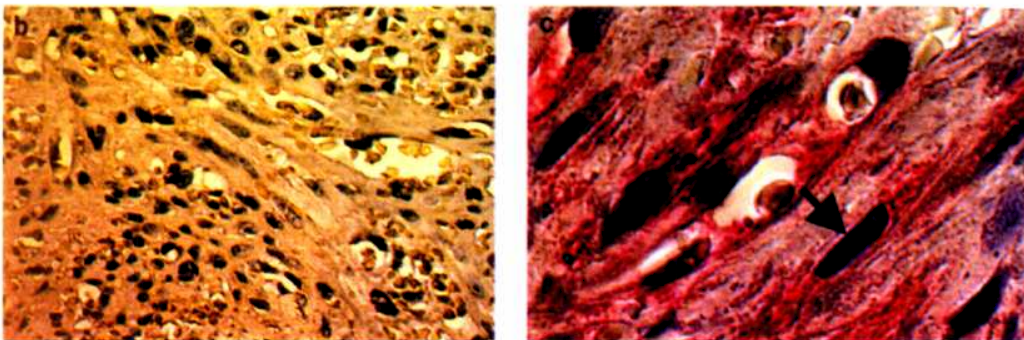
Histológicamente las lesiones de Sarcoma de Kaposi son complejas, pero presentan características sumamente definidas en cada uno de los diferentes estadios de esta enfermedad:

### i) Estadio de Parche (Patch stage):

En las lesiones tempranas, que normalmente aparecen en la piel, se evidencia una colección de pequeños espacios irregulares revestidos por células endoteliales que recubren los vasos dérmicos normales y en los que en general se observa un infiltrado inflamatorio de linfocitos.



**Fig 1:** Lesiones avanzadas en las piernas de un paciente con **Sarcoma de Kapósi Clásico**. Entre los dedos del pie derecho pueden observarse también las típicas lesiones rojo-púrpuras características de un estadio menos avanzado de esta enfermedad.



**Fig. 2:** Corte histológico de una lesión de SK en estadio nodular. En la foto de la izquierda pueden verse numerosas células ahusadas, espacios vasculares y extravasamiento de eritrocitos. En la foto de la derecha se observa una típica ahusada de SK (flecha) teñida (en violeta) con un anticuerpo contra Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)



**ii) Estadío de placa (plaque stage):**

Al estadío de parche le sigue el de placa que se caracteriza por la expansión de células ahusadas en un proceso de invasión vascular hacia la dermis. Estas células ahusadas forman canales vasculares en forma de hendiduras que contienen eritrocitos (estadío de placa).

**iii) Estadío nodular (nodular stage):**

En este estadío final las lesiones de sarcoma de Kaposi están cubiertas por capas, sumamente vascularizadas de células ahusadas, algunas de las cuales se encuentran realizando mitosis ( figura 2 se puede ver y un detalle de los tres estadíos en la figura 11).

En síntesis tres de las principales características histopatológicas de esta enfermedad son las siguientes:

- **Angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes)**
- **Infiltrado inflamatorio.**
- **Proliferación de células endoteliales (CE) y células de fenotipo ahusado.**

**1.2) Histogénesis del Sarcoma de Kaposi**

Como las células ahusadas (fig. 2) son el principal tipo celular presente en las lesiones avanzadas de SK se piensa que son el componente neoplásico de estas lesiones. A pesar de que generalmente se asume que estas células son de origen endotelial existe cierta controversia sobre su histogénesis, si bien la mayoría de estas células son positivas para marcadores endoteliales (factor VIII+ y CD34+) algunas de ellas expresan marcadores de células de músculo liso, macrófagos o de células dendríticas (Nickoloff y Griffiths 1989, Sturzl et al 1992). Algunas células ahusadas expresan simultáneamente marcadores antigénicos característicos de distintos tipos celulares sugiriendo que las células ahusadas

presentes en el SK podrían derivarse de un precursor mesenquimático totipotente o alternativamente podrían derivarse de un precursor mesenquimático que haya sufrido un proceso de diferenciación desregulado. De hecho se han aislado y cultivado *in vitro* células circulantes ahusadas de SK provenientes de pacientes de SIDA-SK y de individuos VIH positivos que posteriormente desarrollaron el SK. (Browning et al. 1994). Estas células circulantes tienen fenotipo adherente y expresan simultáneamente marcadores de macrófagos y de células endoteliales (Siriani et al. 1997) y han dado lugar a la llamada *hipótesis del precursor circulante de SK*.

### **1.3) Origen neoplásico vs origen reactivo de las lesiones de SK.**

Es todavía controversial si la naturaleza de las lesiones de sarcoma de Kaposi es neoplásica o si las lesiones son consecuencia de una hiperplasia reactiva.

Al principio de la enfermedad (en el estadio de parche) las “células tumorales” (las células ahusadas) forman una parte minoritaria del componente celular de las lesiones siendo la mayoría de las células de origen inflamatorio, además el hecho de que se presente clínicamente como múltiples lesiones en la piel con una distribución definida y de que frecuentemente se observan remisiones espontáneas favorecen la idea de que el SK sea una enfermedad reactiva y no un tumor neoplásico.

Cuando se cultivan células provenientes de lesiones de SK casi siempre presentan un cariotipo diploide normal y solamente crecen por unos pocos pasajes *in vitro*. Solo se han podido establecer tres líneas celulares con características verdaderamente neoplásicas y todas ellas provienen de pacientes con lesiones de SK muy avanzadas (Siegal 1990, Lunardi-Iskandar 1998, Albini 1997).

La hipótesis neoplásica predice un origen clonal de las “células tumorales” mientras que la hipótesis reactiva predice un origen policlonal de las lesiones. Estudios preliminares en pacientes femeninos utilizando la inactivación del cromosoma X como marcador de clonalidad muestran que probablemente en estadios avanzados las lesiones de SK pueden ser de origen clonal (Rabkin et al. 1995, 1997).

Un posible escenario de patogénesis es que en el SK temprano (estadio de parche) la proliferación de células endoteliales o de precursores endoteliales (ej. angioblastos) sea policlonal (reactiva) y que se deba a la prominente respuesta inflamatoria y angiogénica (Risau et al., 1997) mientras que las lesiones avanzadas pueden evolucionar como una enfermedad realmente clonal (neoplásica) con metástasis de células ahusadas clonalmente derivadas diseminadas en distintas partes del cuerpo. Este modelo es comparable a la linfo-proliferación policlonal observada en individuos inmunodeficientes infectados con Epstein Bar Virus (EBV) que posteriormente puede progresar hacia un linfoma clonal de células B.

Una hipótesis alternativa es que el SK empiece siempre como una neoplasia y que la célula neoplásica sea rara y morfológicamente indistinguible de las otras células ahusadas, los leucocitos, células ahusadas y endoteliales presentes en la lesión probablemente representen en este caso una hiperplasia reactiva en respuesta a factores secretados por las células neoplásicas minoritarias. Este modelo sería de algún modo análogo a la enfermedad de Hodgkin con la diferencia de que en Hodgkin la células neoplásicas minoritarias (Reed Steenberg) son gigantes y fácilmente identificables.

#### **1.4) Rol de las citoquinas inflamatorias en la hiperplasia reactiva del SK.**

Cuando se inyectan células provenientes de lesiones de SK en ratones inmunodeficientes estos animales desarrollan tumores benignos transientes ( que duran unos diez días) y que contienen células del ratón ( Salahuddin 1998 ) indicando que las células humanas xenotransplantadas no pueden crecer indefinidamente, pero proveen factores de crecimiento que permiten el desarrollo de tumores transientes en el ratón. Un fenómeno similar con lesiones muy parecidas a las de SK puede ser producido por ciertas combinaciones de citoquinas inflamatorias (Samaniego 1995,1997, Nair 1992).

*In vitro* las células endoteliales responden a varias de estas citoquinas proliferando y adquiriendo un fenotipo ahusado. A su vez tanto *in vitro* como *in vivo* las células de SK producen altos niveles de citoquinas como Interleuquina 6 (IL-6), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Tumor Necrosis alpha (TNF- $\alpha$ ), Oncostatina M (Onc-M) e Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) (Ensoli et al. 1989, 1994; Miles et al. 1990; Nair et al. 1992; Salahuddin et al. 1998; Samaniego et al. 1995). En particular se ha demostrado que VEGF, IL-6, bFGF, e IFN- $\gamma$  son angiogénicas *in vitro* y en algunos ensayos *in vivo*.

En síntesis varios experimentos sugieren que la histogénesis de las células ahusadas de SK puede recapitularse (al menos parcialmente) cuando se tratan células endoteliales con citoquinas inflamatorias y ciertos factores angiogénicos que se encuentran presentes localmente en altas concentraciones en las lesiones de SK. Dada la naturaleza del SK se ha sugerido que estas lesiones son impulsadas y mantenidas por estas citoquinas.

### 1.5) Clasificación epidemiológica del Sarcoma de Kaposi.

Segun los grupos de riesgo y prevalencia el Sarcoma de Kaposi (SK) puede clasificarse del siguiente modo:

- **Sarcoma de Kaposi clásico**: Forma poco agresiva e infrecuente de la enfermedad que afecta mayormente a judios ancianos de origen mediterráneo (Safai et. Al. 1984 y Ziegler et. al 1984).
- **Sarcoma de Kaposi endémico**: Aparece exclusivamente en poblaciones del áfrica ecuatorial. (Oettle, 1962). Esta forma se encuentra presente en individuos jóvenes y ancianos.

- **Sarcoma de Kaposi post-transplante o iatrogénico** (Franceschi and Geddes, 1995). Se presenta en pacientes que han recibido tratamiento inmunosupresivo.
- **Sarcoma de Kaposi asociado al Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA)**: ( Safai 1985). Es el mas frecuente tumor asociado al SIDA. Es la forma mas común y agresiva de Sarcoma de Kaposi se manifiesta como una enfermedad fulminante que empieza con unas pocas lesiones en la piel, pero sin tratamiento generalmente evoluciona diseminándose y afectando varios órganos, incluyendo pulmones, hígado intestino y vaso.

### **1.6) Sarcoma de Kaposi asociado al SIDA:**

En los años '80 comenzó a empezar a observarse frecuentemente en pacientes jóvenes homosexuales masculinos una forma agresiva de SK. Con el posterior descubrimiento del Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida (SIDA) y del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) se verificó que en todos los casos reportados hasta entonces estos "inusuales" pacientes con SK sufrían de SIDA y que las chances de contraer SK eran 100.000 veces mayores en el grupo de riesgo (VIH positivos) que en el resto de la población general (Beral 1991). Por ello se invocó al SIDA como la causa primaria de esta enfermedad. Sin embargo esta hipótesis no daba cuenta del hecho de que la incidencia de SK en pacientes homosexuales masculinos fuera 20 veces mayor que en cualquier otro grupo de pacientes con SIDA. Como consecuencia de ello, para explicar la altísima prevalencia de esta enfermedad en hombres homosexuales con SIDA era necesario invocar la presencia de un *co-factor desconocido* sexualmente transmitido que hiciera que la incidencia del sarcoma de Kaposi fuera coherente con los datos epidemiológicos.

### **1.7) En busca del co-factor etiológico desconocido:**

Durante muchos años se había sospechado de una etiología viral para esta enfermedad (Oettle 1962). En 1972 partículas de tipo herpesviral fueron detectadas en lesiones de SK, pero se atribuyeron erróneamente a el citomegalovirus (CMV) (Giraldo et al. 1972, 1995). Varios virus se han encontrado presentes en estas lesiones, sin embargo ninguno de ellos se encuentra consistentemente en las lesiones (Monini 1996, Rappersberget al. 1996, Huang et al. 1992).

En 1981 como consecuencia del surgimiento del SIDA-SK la hipótesis del factor infeccioso cobro nuevo vigor.

En 1994 un grupo liderado por Yuang Chang (Chang 1994) en la Universidad de Columbia realizó un análisis de representación diferencial (Representational Differential Analisis o RDA) substrayendo el ADN de zonas no afectadas al ADN de las lesiones de SK. Las secuencias de ADN sustraído diferencialmente por esta técnica fueron secuenciadas y el resultado fue impactante por que las secuencias que encontraron tenían altísima homología con Epstein Bar Virus (EBV) y Herpes Virus Saimiri (HVS), dos gamaherpes virus oncogénicos. En el mismo trabajo decidió bautizarse el supuesto nuevo virus como Herpes Virus asociado al Sarcoma de Kaposi (Kaposi's Sarcoma associated Herpesvirus o KSHV)

Estudios preliminares utilizando PCR demostraron que secuencias pertenecientes a este virus se hallaban presentes en prácticamente todas las lesiones de las 4 diferentes formas epidemiológicas de sarcoma de Kaposi.

## 2) Herpes Virus asociado al Sarcoma de Kaposi (KSHV) o Herpes Virus Humano-8 (HVH-8) .

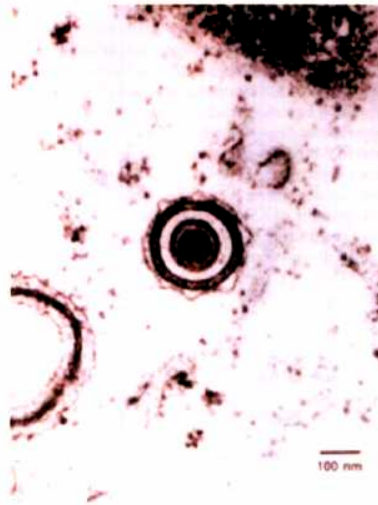
En 1996 se terminó de secuenciar la totalidad ( 140Kb) del genoma del KSHV (Figura 7, Russo 1996). Como se había predicho KSHV pertenecía a la familia de  $\gamma$  Herpes Virus (género radinovirus) que son virus linfotrópicos oncogénicos (para mas detalles ver secciones 2.03 y 2.04) .

Nuestro laboratorio fue el primero en demostrar que estas secuencias herpesvirales eran capaces de encapsidarse formando partículas virales infectivas (ver figs. 3 y 4, Mesri 1995). La microscopía electrónica de las partículas virales ha demostrado que los viriones de KSHV poseen la clásica arquitectura herpesviral. (sección 2.01, fig 3, Mesri 1995, Renne 1996)

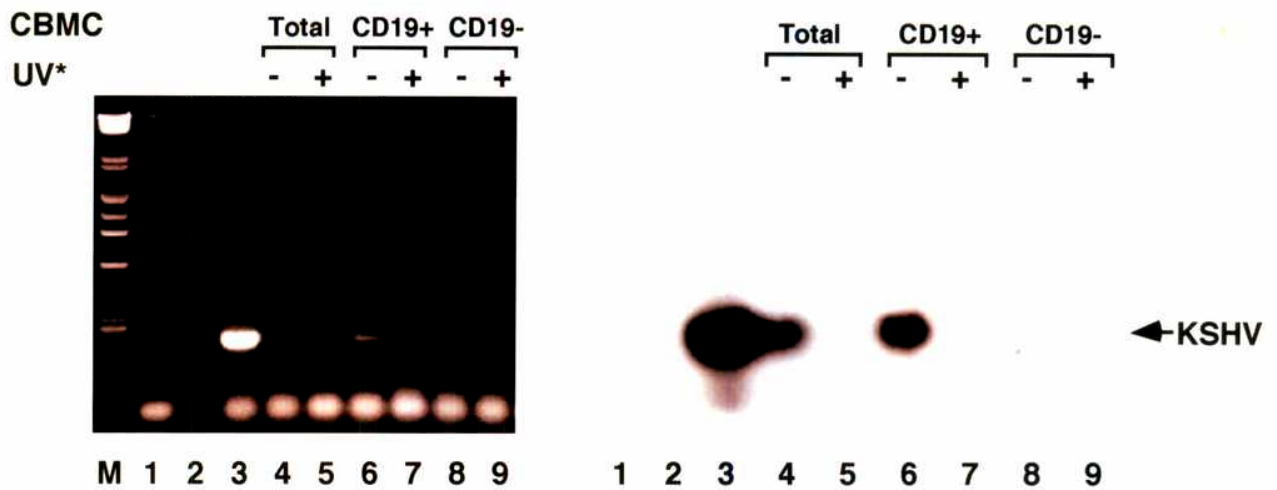
### 2.0) Introducción a los Herpesvirus:

#### 2.01) Descripción:

La pertenencia a esta familia viral está determinada básicamente por la arquitectura del virion y la secuencia genómica ( "Fields Virology", 1996, capítulo 71 y Chee M., 1990) Un herpesvirus típico posee una zona central en donde se localiza el genoma compuesto por *ADN lineal doble cadena* que está recubierto por una *capside* icosaedraica (de unos 110nm) hueca en el centro y compuesta por 162 capsómeros). Usualmente un material amorfo y asimétrico llamado *tegumento* recubre la capsida. La parte mas externa



**Figura 3: Micrografía electrónica de KSHV:** En la fotografía puede observarse que KSHV posee la estructura viral característica de los Herpesvirus (foto tomada de Renne et al. 1996)



**Figura 4: KSHV infecta células CD19+ (células B):** Sobrenadantes conteniendo partículas de KSHV fueron utilizados para infectar CMBC o células CD19+ aisladas (extraído de Mesri et al. 1995) Lane 1, P3H-R1 Cells (Negative control); lane 2, Genereleaser; lane 3, BC-1 cells (positive control); lanes 4 and 5, total CBMC; lanes 6 and 7, CD19+ cells; lanes 8 and 9, B-cell depleted CBMCs; lanes 4, 6 and 8, active virus; lanes 6, 7 and 9, virus irradiated with UV. The left panel shows the analysis of the PCR products on an agarose gel, the right panel shows the result of the Southern blot of the same gel hybridized with the KSHV-DNA internal probe (Cesarman et al., 1995a; Cesarman et al., 1995b; Chang et al., 1994), in all the cases the PCR was positive for p53 (not shown).



del vibrion es la *envoltura* que contiene las espigas de glicoproteínas virales en su superficie (fig. 3).

Si bien el ADN es mantenido en forma lineal dentro del vibrion, se circulariza (forma un episoma) inmediatamente después de liberarse de su capsido al entrar al núcleo de la célula infectada donde puede replicarse sincrónicamente con la célula y permanecer en forma latente (episomal) o entrar en fase lítica (multiplicación viral) para lo cual el ADN se lineariza y se replica por el mecanismo de círculo rodante.

## 2.02) Características generales de los Herpesvirus:

- i) Todos los herpesvirus poseen un gran número de enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos nucleicos ( timidina quinasa, dUTPasa, ribonucleotido reductasa etc.), síntesis de ADN (polimerasas, helicasas, primasas) y enzimas involucradas en el procesamiento de proteínas (por ej. Quinasas de proteínas), (figura 7)
- ii) La síntesis de ADN y el ensamblaje de las capsides ocurre en el núcleo.
- iii) La producción de progenie infectiva invariablemente destruye a la célula infectada.
- iv) Todos los herpesvirus conocidos son capaces de mantenerse en estado de *latencia* dentro de sus huéspedes naturales. En el estado de latencia el genoma viral se mantiene episomalmente y se transcribe solamente un mínimo número de genes necesarios para la persistencia y propagación del genoma episomal en las células infectadas de modo que son virtualmente invisibles para el sistema inmune.

Por otro lado los herpesvirus divergen notablemente en cuanto a su biología. Algunos de ellos tienen un amplio rango de huéspedes, se multiplican eficientemente y rápidamente destruyen a las células que infectan (ej. HVS-1 y 2). Otros infectan específicamente determinados tipos celulares (ej. EBV y HHV-6) o se multiplican muy lentamente (HCMV). A pesar de que todos los herpesvirus pueden mantenerse latentes en un subconjunto específico de células, el tipo celular en el que pueden mantenerse en estado latente varía de un herpesvirus a otro (por ej HVS en neuronas y EBV en linfocitos). La heterogeneidad de las manifestaciones clínicas de las enfermedades que producen es un reflejo de la diversidad en las estrategias replicativas y adaptativas previamente mencionada.

### 2.03) Gamaherpesvirus:

Una particularidad de los miembros de esta subfamilia es que el rango de huésped es que son linfotrópicos y “especie específicos” (solamente infectan las células de sus huéspedes naturales o de especies muy relacionadas). Infectan e *In vitro* se replican en células linfoblastoides. En general en los tejidos linfoides estos virus se encuentran en estado de latencia y lítico en fibroblastos y/o tejidos epiteliales. Esta subfamilia contiene dos géneros:

**i) linfocriptovirus (ej. EBV):** Se encuentran únicamente presentes en primates del viejo mundo y tienen en común una alta homología de secuencia y una estructura organizacional y orden de los genes dentro del genoma conservada.

**ii) Radinivirus:** KSHV es el primer ejemplo descrito de un radinivirus humano (Chang 1994) Los miembros de este grupo de Herpesvirus poseen una estructura genómica común que consiste en un segmento central de ADN con bajo contenido de GC (ADN-L) flanqueado por secuencias GC multirrepetitivas (AND-H) que confieren a estos genomas la característica física a la que su nombre hace referencia (radino = frágil). Una característica virulenta de los *radinivirus animales* es que cuando estos virus infectan especies relacionadas pero distintas a su huésped “natural” producen enfermedades linfoides fulminantes.

#### 2.04) Radinivirus y cancer

Otra característica común a los *radinivirus animales* descritos hasta la actualidad es su epidemiología. Son sumamente frecuentes en sus huéspedes naturales (>50%) donde la infección no se asocia a ninguna enfermedad aparente, pero como se ha mencionado previamente, la infección en especies cercanamente relacionadas causa enfermedades linfoproliferativas fulminantes. Un ejemplo clásico es el del Herpes Virus Saimiri (que es sumamente homólogo a KSHV) para el que no hay ninguna evidencia de patogenia en su huésped natural ( el mono ardilla), sin embargo cuando infecta especies relacionadas (pequeños monos comunes y algunos otros primates del nuevo mundo) produce linfomas policlonales de células T.

A pesar de que se sospecha de que KSHV es el agente causal de tumores en su huésped natural (los humanos) no necesariamente tiene que ser una excepción a esta regla.

La incidencia (cantidad de individuos sintomáticos) de SK es tan baja comparada a la prevalencia (cantidad de individuos infectados) de KSHV en la población (sección 2.2) que posiblemente esta asociación puede haber pasado desapercibida en modelos animales. Un claro ejemplo de ello es EBV (que es el herpesvirus humano conocido mas homologo a KSHV) que claramente está asociado con mononucleosis infecciosa y con varios tipos de cancer en humanos, a pesar de ello la infección primaria con EBV es asintomática ( a pesar de que la mayor parte de la población humana adulta está infectada con este virus) y no presenta síntomas clínicos a menos que otros co-factores como la inmunosupresión o la infección tardía disturben el delicado equilibrio entre el virus y el huésped (que han co-evolucionado durante largos periodos de tiempo). La infección de otras especies diferentes a los huéspedes naturales es posiblemente un ejemplo de un “accidente” asociado con el incremento de la tumorigenicidad.

De este modo la falta de evidencia de procesos oncogénicos por radinivirus animales en sus huéspedes naturales y el hecho de que la infección de especies relacionadas cause síndromes linfoproliferativos puede interpretarse como una clave que indicaría el potencial patogénico de estos virus en sus huéspedes naturales bajo esporádicas, pero determinadas circunstancias (Neipel F., 1998).

## **2.1) KSHV y linfoproliferación:**

### **2.11) Linfomas de efusión primaria (Primary effusion lymphomas o PELs)**

Dos diferentes grupos reconocieron por primera vez los aspectos únicos de ciertos linfomas presentes en pacientes con SIDA y definieron las PELs (Knowles et al., 1989; Walts et al., 1990)

Las células de los linfomas en estos casos son negativas para la mayoría de los antígenos asociados a linajes celulares, (Otra evidencia que señala una posible diferenciación anormal de un progenitor hematopoiético) a pesar de ello se hallaron rearrreglos genéticos en los genes de inmunoglobulinas indicando que se trataba de células B de origen clonal. Posteriormente se demostró otra singularidad de estos linfomas que es una alta prevalencia de EBV en ausencia de rearrreglos en el gen de c-myc (que es una de las características definitorias de los linfomas de Burkitt asociados a EBV). (Karcher et al. 1992) estos mismos autores también notaron una tendencia de la enfermedad a quedar contenida en las cavidades corporales (predominantemente en cavidades pleurales, peritoneales y pericardicas) y no diseminarse. Cesarman et. al. ( 1995a) demostraron que KSHV se asociaba específicamente con las PELs y no con otros linfomas asociados al SIDA (figura 5).

Las PELs tienen una epidemiología sorprendentemente similar a la del SIDA-SK dado que ocurren predominantemente en individuos VIH positivos con avanzados niveles de inmunosupresión (Komanduri et al. 1995), pero también se observan esporádicamente en individuos VIH negativos ( Komanduri et al. 1995; Strauchen et al. 1997; Said et al 1996) Además, al igual que el SK, tiene una notable incidencia en pacientes masculinos homosexuales, pero no se observa en otros grupos de de riesgo VIH positivos. (Jaffe et al. 1996, Nador et. al 1996).

Todas las PELs que no tienen rearrreglos en c-myc contienen KSHV (Nador et al. 1996) Por otro lado la mayoría, pero no todas las PELs están co-infectadas con EBV (Ansari et al. 1996, Cesarman et al. 1995a,b, Otsuki et al. 1996) sugiriendo que ambos virus cooperan en la transformación neoplásica. En el caso de EBV se ha demostrado el origen clonal del virus en las PELs ( Cesarman et al. 1996b, Nador et al 1996). Las células de las PELs no presentan los defectos moleculares consistentemente asociados con neoplasias de células B maduras como ser la activación de los oncogenes Bcl-2, N-ras, K-ras y mutaciones en p53 (Carbone et al., 1996; Nador et al. 1995).

La presencia de KSHV en este subset de linfomas a permitido el desarrollo de líneas celulares que han servido para propagar el virus y para desarrollar anticuerpos que reconozcan las proteínas virales para los ensayos serológicos.

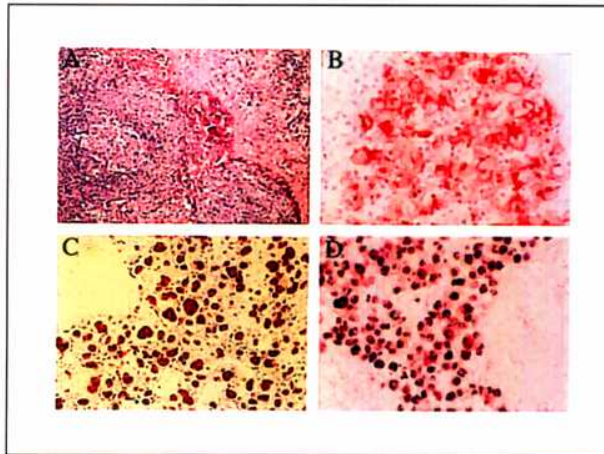
Virus purificados a partir de estas líneas celulares han servido para demostrar la capacidad de las secuencias herpesvirales de KSHV para encapsidarse e infectar células B y endoteliales (Mesri et al. 1995, Fiore et al 1998).

### **2.12) Enfermedad de Castleman**

La enfermedad de Castleman es una enfermedad usualmente policlonal, de baja incidencia y etiología desconocida (Castleman et al. 1956). En particular la enfermedad de Castleman multicentrica (MCD) se presenta como una linfadenopatía generalizada con anomalías inmunológicas. Remarcablemente los pacientes con MCD tienen altas chances de desarrollar SK y linfomas de células B. (Peterson et al. 1993)

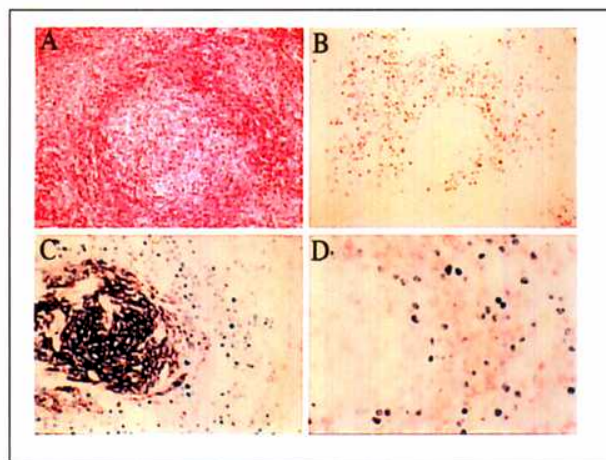
KSHV está presente en prácticamente el 100% en las biopsias de individuos VIH positivos con MCD. ( figura 6, Soulier et al. 1995; Dupin et al. 1995; Gessain et al. 1996 ), sin embargo en los casos de MCD en individuos VIH negativos KSHV está presente únicamente en el 40% de los casos.

Previamente se había hipotetizado que un virus podría actuar como cofactor de el MCD probablemente a través de la producción de citoquinas (Peterson et al 1995). Existe una abrumadora evidencia experimental que señala un rol fundamental para IL-6 en el desarrollo del MCD, notablemente KSHV codifica para un homólogo de IL-6 (vIL-6).



**Figura 5: KSHV se halla presente en los linfomas de efusión primaria.**

A) Las células anaplásticas de gran tamaño que se observan en esta biopsia de nódulo linfático están característicamente presentes en los linfomas de efusión primaria. B) Estas células neoplásicas expresan CD30 (un marcador de activación) y también son positivas (C) para antígenos de KSHV/HHV-8 (en este caso LNA-1, que es una proteína latente). (D) la co-tinción confirma que CD30 (rojo, membrana plasmática) y LNA-1 (púrpura y nuclear) colocalizan en las células neoplásicas. Extraído de Dupin N., 1999



**Figura 6: Expresión de CD23, CD79a-cy y LNA-1 (de KSHV) en la biopsia de un paciente con MCD.**

A) Folículo teñido con H/E, B) tinción con LNA-1 (rojo) mostrando que varias de las células de la zona del manto están infectadas por KSHV, c) La co-tinción CD23 (membrana plasmática, púrpura oscuro) y LNA-1 confirma que las células infectadas por KSHV no expresan CD23 (otro marcador de activación). D) co-tinción con anticuerpos anti LNA-1 (azul, nuclear) y CD79a-cy muestran que las células infectadas por KSHV son negativas para CD79 (un marcador de células B).

## 2.2) Análisis de la secuencia de KSHV

Hasta la fecha se han descripto mas de 80 marcos de lectura abiertos para este virus (figura 7), que se los ha nombrado de acuerdo a su homología con genes presentes en HVS. Los genes no homologos de KSHV se han designado con una K (K1-K15)

La adquisición de genes del genoma del huesped es un rasgo común de los herpesvirus en general (Murphy 1997, McGeoch y Davison 1995) y de los radinovirus en particular. Sin embargo el número de genes homologos humanos transducido al genoma de KSHV no tiene precedentes entre los virus conocidos. Hasta la actualidad se han descripto 14 marcos de lectura abiertos en el genoma de KSHV que tienen contrapartes celulares (figura 7 y 8).

Los genes responsables de los aspectos centrales de la replicación y de la estructura del virion se encuentran conservados entre todos los herpesvirus y probablemente ya formaran parte del antecesor común de los herpesvirus contemporáneos, mientras que la adquisición de homologos a genes celulares u otros elementos genéticos son posiblemente eventos mas recientes y en general cumplen funciones adaptativas para la permanencia de un virus particular en un tipo celular y en microambientes determinados (Figura 8 y McGeoch y Davison 1995). De este modo, se piensa que la mayoría de los genes “pirateados” no son esenciales para la replicación del virus en cultivo, si no que mas bien cumplen funciones adaptativas en los habitats “naturales” del virus relacionadas con el ciclo viral.

A pesar de que diferentes radinovirus adquirieron distintos genes celulares se piensa que funcionalmente convergen para :

- **Incrementar la replicación viral e independizarla del ciclo celular.**
- **Expandir la subpoblación de células infectables.**
- **Contra atacar los mecanismos de respuesta del huesped contra la infección viral..**

El incremento de la replicación viral con independencia del estadio del ciclo celular está mediada básicamente por las enzimas del metabolismo de nucleótidos previamente mencionadas y conservadas entre los herpesvirus. Sin embargo KSHV también codifica para homólogos a ciclina D (Cesarman et al. 1996b, Chang et al. 1996, Li et al 1997) Interleuquina-6 (IL-6) ( Moore et al. 1996 y Neipel et al. 1997a) y para un homólogo del receptor de Interleuquina 8 (Cesarman et al. 1996b, Arvanitakis et al 1997) que podrían incrementar la proliferación celular y expandir de este modo la subpoblación de células infectables (figura 8). Las tres MIPs (Macrophage inflammatory proteins) codificadas en este virus (Boshoff et al. 1997) también podrían cumplir un rol similar al atraer células susceptibles a ser infectadas e inducir la angiogenesis (figura 8 y modelo de la figura 14). La apoptosis es una típica respuesta de la célula huésped a la infección viral, en este sentido KSHV codifica para un homólogo de bcl-2 (vbcl-2) y otro de Flip (vFLIP) que inhiben la apoptosis por dos diferentes mecanismos (Figura 8 y Cheng EH 1997, Sarid R 1997, Thome M 1997) y podrían extender la vida de las células infectadas. También codifica para un homólogo del factor de respuesta a Interferon (v-IFN) que puede bloquear la supresión mediada por interferón y también mimificar el efecto proliferativo del hIRF-2 (Taniguchi et al. 1995).

A pesar de que usualmente la función de estos genes virales está relacionada con el ciclo viral y no con la transformación neoplásica, KSHV (al igual que otros radinovirus) tiene genes que “accidentalmente” podrían contribuir al desarrollo de tumores. Ejemplo de tales “accidentes” son la infección por radinovirus de huéspedes “no naturales”, infecciones tardías, la infección de huéspedes inmunodeprimidos y las infecciones no productivas o ciclos líticos abortivos.

Los datos provenientes del análisis de la secuencia del genoma de KSHV son sumamente provocativos dado que este virus codifica para potenciales oncogenes, homólogos a citoquinas inflamatorias, moléculas angiogénicas candidatas y proteínas antiapoptóticas que podrían explicar la patogenia y la histogénesis del SK. Es por ello rápidamente empezó a generalizarse la idea de que el KSHV era un excelente candidato para ser el *co-factor etiológico* que se había estado buscando pero para para ello había que demostrar primero la que la prevalencia de este virus era coherente con la epidemiología del Sarcoma de Kaposi.



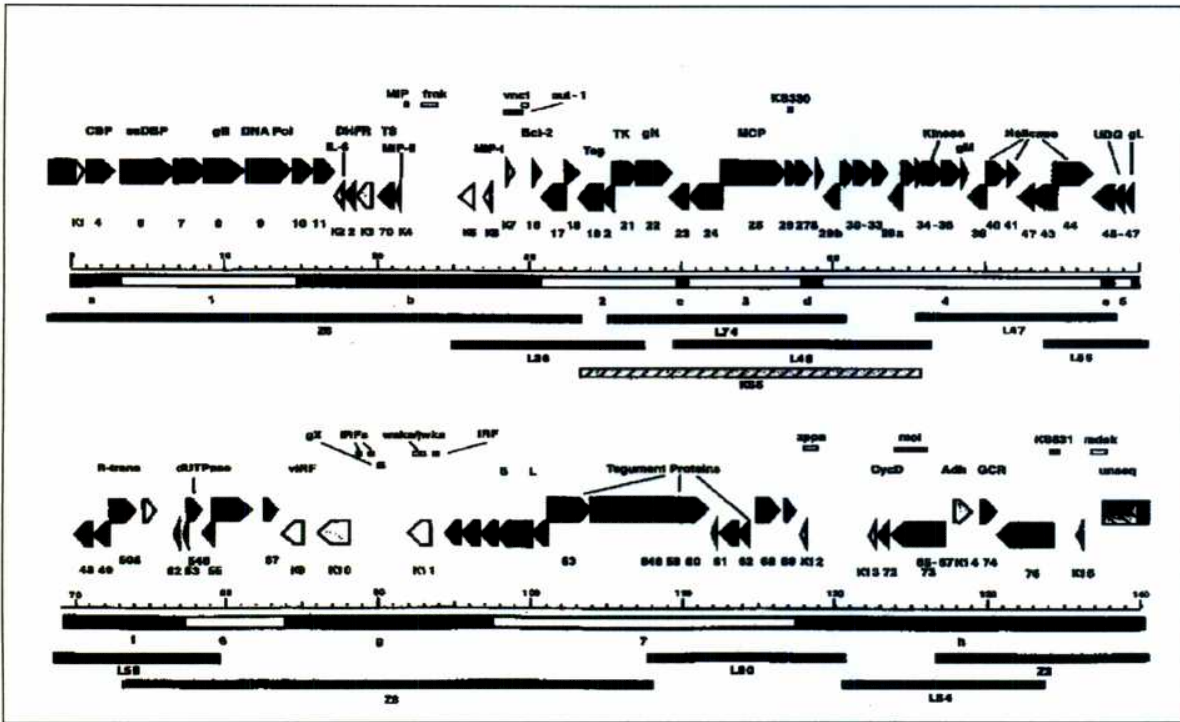


Figura 7: Representación gráfica de los marcos de lectura abiertos codificados en el genoma de KSHV/HHV-8 (Russo et al. 1996).

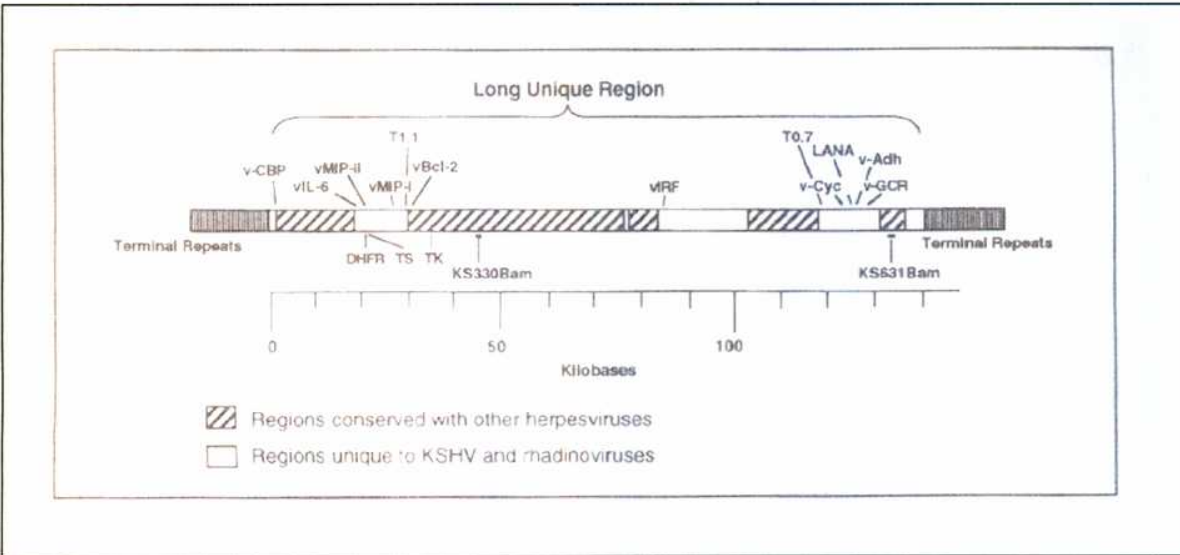
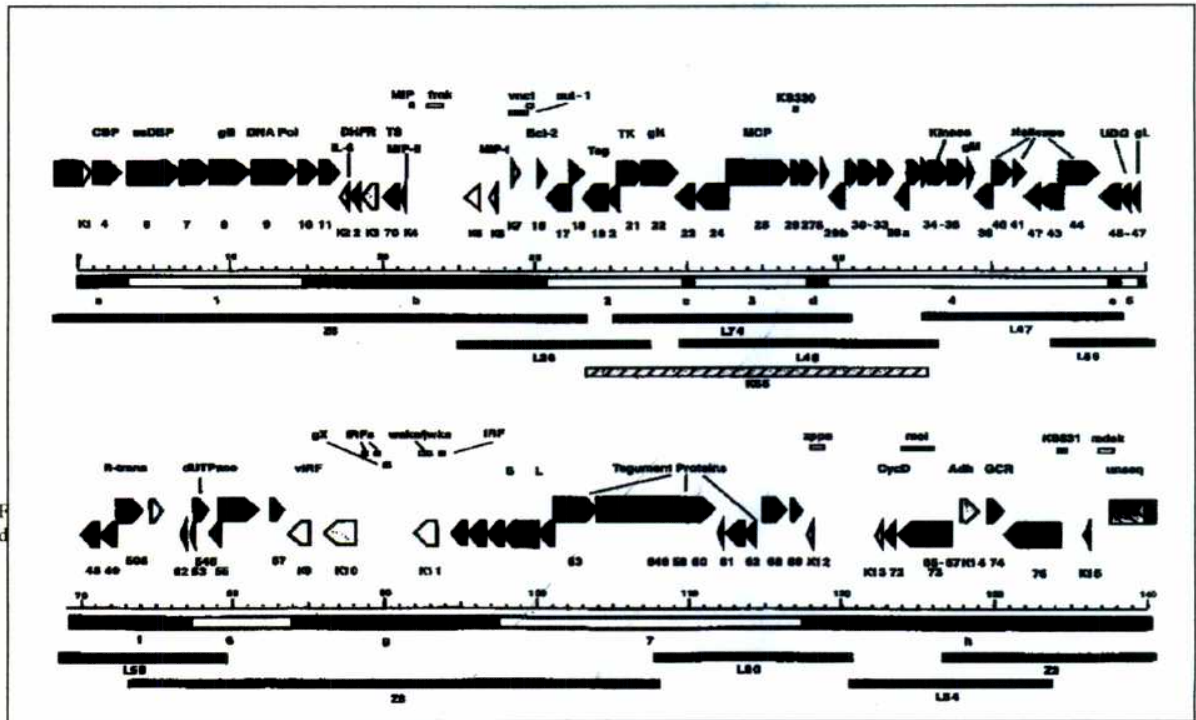
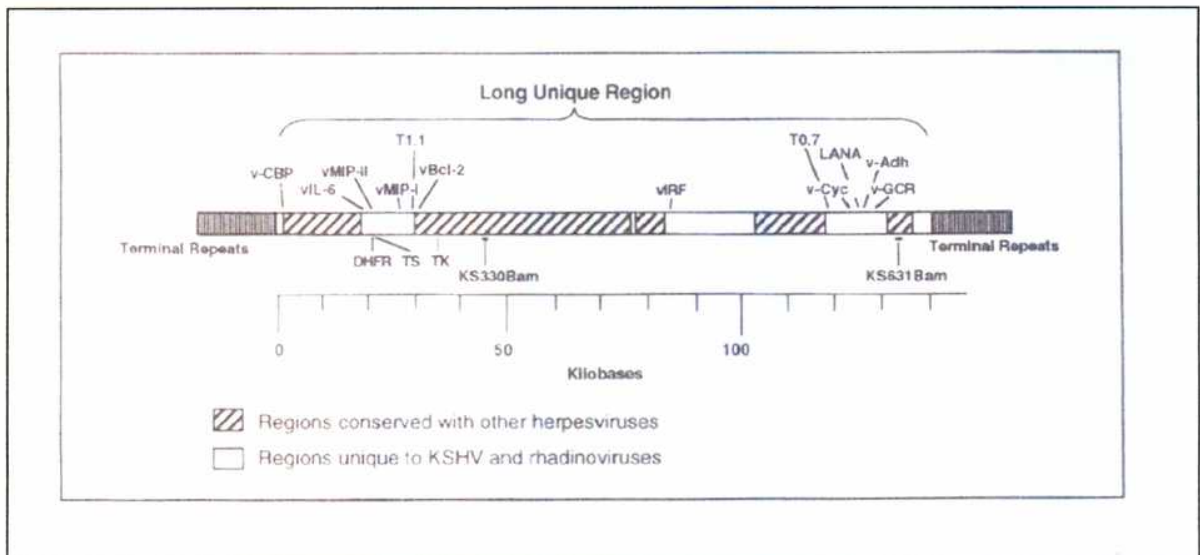


Figura 8: Representación simplificada del genoma de KSHV que muestra la localización de los genes de este virus que codifican para proteínas con homología a proteínas regulatorias celulares: Notese que todos los genes de KSHV que codifican para proteínas con contrapartes celulares están agrupadas dentro de los bloques de genes no conservados entre herpesvirus (Moore P. y Chang M.).



**Figura 7: Representación gráfica de los marcos de lectura abiertos codificados en el genoma de KSHV/HHV-8** (Russo et al. 1996).



**Figura 8: Representación simplificada del genoma de KSHV que muestra la localización de los genes de este virus que codifican para proteínas con homología a proteínas regulatorias celulares:** *Notese que todos los genes de KSHV que codifican para proteínas con contrapartes celulares están agrupadas dentro de los bloques de genes no conservados entre herpesvirus* (Moore P. y Chang M.).

## 2.2) Prevalencia del KSHV, incidencia del Sarcoma de Kaposi y consideraciones epidemiológicas:

La primera indicación de que KSHV está involucrado en la patogénesis de <sup>SK</sup> KS fue la detección de secuencias de KSHV (por PCR) en las cuatro distintas formas epidemiológicas de SK en todas las biopsias frescas testeadas ( figura 9, Boshoff et al 1995, Moore and Chang 1995, Schalling et al 1995, Dupin et al 1995b). En estos pacientes KSHV es raramente detectado fuera de las lesiones de SK (excepto en la sangre) indicando que la carga viral es máxima las zonas de las lesiones y en la sangre. Una interpretación no causal alternativa para estas observaciones es que el medio rico en citoquinas de las lesiones de SK podría aumentar la eficiencia de replicación viral de KSHV o del tipo celular que hospeda a KSHV seleccionando positivamente la presencia de este virus en las lesiones. Si esto fuera cierto KSHV sería solamente un “pasajero” en las lesiones y no la causa de estas. Sin embargo KSHV no está presente en otros tumores vasculares como angiomas y angiosarcomas y es solamente raramente detectable en otras formas de tumores de piel como carcinomas escamosos y melanomas en pacientes inmunosuprimidos (Adams et al 1995, Boshoff et al 1996, Uthman et al 1996)

Para que KSHV pueda estar causalmente relacionado con el Sarcoma de Kaposi ( y las otras enfermedades en donde esta presente) la infección tiene que preceder a la manifestación de la enfermedad. Este es considerado un requerimiento absoluto de causalidad.

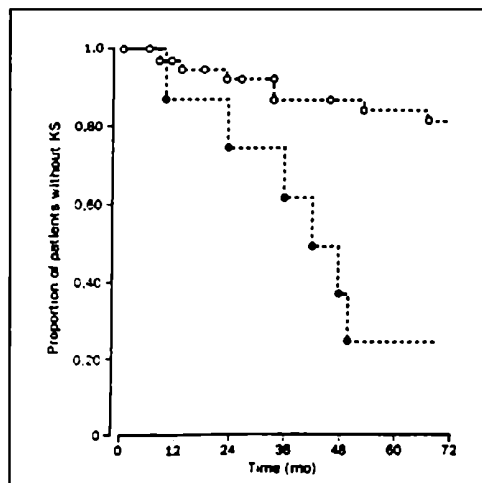
En este sentido tanto seroconversión (medida con anticuerpos contra proteínas codificadas por KSHV) como estudios basados en la identificación de secuencias de KSHV (por PCR) demuestran que los pacientes han sido infectados con el virus antes de que la enfermedad se manifieste, además los títulos de KSHV tienen valor pronóstico sobre la probabilidad de desarrollar esta patología. (figura 8, Moore et al 1996b, Whitby et al, 1995).

**Table II** PCR Detection of KSHV DNA in Biopsies

Type of KS lesion	Number positive	Number tested	Percentage positive
AIDS KS	252	259	97%
Classic KS	160	175	91%
Endemic KS	13	13	100%
Atypical KS	71	80	89%
HIV-negative patients with KS	8	9	89%
Other lesions	14	743	1.8%

Source: Figini et al. 1993, 1996; Nair et al. 1996; Huang et al. 1995; Dapkin et al. 1995; Moore et al. 1995; Moore and Chang 1995; Leiby et al. 1995; 1996; Moore et al. 1996; O'Neil et al. 1996; Buonaguro et al. 1996; Gattumata et al. 1996; Moore et al. 1996; Tucker et al. 1996; Marchioni et al. 1996; Lippman et al. 1996; Moore et al. 1996.

**Figura 9: KSHV se encuentra presente en prácticamente todas las biopsias provenientes de pacientes con las cuatro formas epidemiológicas del sarcoma de Kaposi**



**Figura 10: la presencia de KSHV tiene valor pronóstico sobre el subsecuente desarrollo de sarcoma de Kaposi. La curva de Kaplan-Meier muestra que en el grupo de riesgo estudiado (Hombres homosexuales HIV positivos) la presencia del virus (detectada por PCR) en células mononucleares periféricas aisladas de la sangre (PMBCs) predice la probabilidad de que estos individuos desarrollen el sarcoma de Kaposi. Con puntos negros se indica la proporción de pacientes cuya sangre periférica fue positiva para KSHV, los puntos blancos indican la proporción de pacientes negativos para el virus. (extraído de Whitby et al. 1995)**

La estrecha asociación entre la infección por el KSHV con el desarrollo de SK es ciertamente consistente con un importante rol etiológico de este virus, pero es obvio también que no es muy eficiente como agente patogénico.

La incidencia del KSHV en la población general permanece de algún modo controversial, pero está establecido que los patrones geográficos de infección son coincidentes con la incidencia de SK previa a la epidemia de SIDA. Los resultados más recientes sugieren que la prevalencia del KSHV estaría entre el 2 % y el 7% en EEUU (Simpson GR et al., 1996, Gao SJ et al. 1996, Gallo review). Estos porcentajes son claramente mucho mayores que el riesgo de contraer SK. La incidencia de la infección es mucho mayor en Italia, donde el SK clásico es más prevalente, además la incidencia de SK en distintas partes de Italia es proporcional a la prevalencia de KSHV (Gao SJ et al 1996, Whitby D et al 1998, Gallo review).

KSHV se encuentra presente en más del 60% de la población en ciertas partes de África (Ariyoshi et al 1998, Gao SJ et al 1996, Mayama S et al. 1998 Gallo review) en donde el SK era endémico aun antes de la epidemia de SIDA.

En resumen la evidencia seroepidemiológica sugiere que la infección con el KSHV es un factor etiológico que juega un rol necesario (imprescindible), pero muy poco eficiente, en el desarrollo del SK. Es claro también que el desarrollo del SK requiere otros factores, en el caso del SK asociado al SIDA es claro que el cofactor es el VIH, los co-factores involucrados en las otras formas de SK actualmente se desconocen.

Estas observaciones subrayan la naturaleza multifactorial del SK en particular y de las enfermedades infecciosas en general. Con la "posible excepción" de la rabia y del VIH no se conoce ninguna enfermedad infecciosa causada por un único agente que no dependa de la contribución de factores particulares ambientales o del huésped. (sección 3.01, review Moore and Chang 1998). De este modo la infección asintomática es la norma para la mayoría de los agentes infecciosos por lo que cabe esperar (coherentemente con los datos epidemiológicos) que solo un porcentaje minoritario de las personas infectadas con KSHV desarrolle el SK. (ver sección 3.01 de patología viral y gráfico 10).

### **2.3) Distribución de KSHV en las lesiones de SK**

La presencia de KSHV en las lesiones de SK se ha caracterizado mayormente utilizando técnicas de “*in situ* hybridization” e inmunohistoquímica. De este modo se ha demostrado la presencia de este virus en la mayoría de las células “tumorales” atípicas del SK y en células endoteliales (3 y 8) y también que la mayor parte de las células en las lesiones están latentemente infectadas (6 y 9), aunque un porcentaje de estas células (5-10%) están líticamente infectadas (6, 10, 11,12).

Utilizando anticuerpos contra una proteína latente de KSHV (LNA-1) se ha demostrado que el virus está presente en menos del 10% de las células atípicas en las lesiones tempranas, pero que en el estadio nodular se encuentra presente en el 90% de estas células y de los vasos en forma de hendidura presentes en las lesiones (figura 9). Estos datos son coherentes con la idea de que al menos en los estadios iniciales el SK es reactivo (ver modelo figura 12).

KSHV (LNA-1) correlaciona con la presencia de VEGFR-3 un marcador de precursores endoteliales y endotelio linfático en lesiones tempranas y tardías sugiriendo que o bien que KSHV infecta precursores endoteliales o células endoteliales linfáticas que luego derivaran en células atípicas o la hipótesis menos probable de que KSHV regule la expresión de VEGFR-3. (Dupin N 1999, PNAS Boshoff).

### **2.4) Transmisión del KSHV:**

La transmisión sexual juega un rol importante en la transmisión del KSHV entre hombres homosexuales en los países occidentales, entre los cuales el KSHV es más prevalente que entre cualquier otro grupo de riesgo para el VIH. Entre el 20% y el 40% de los hombres homosexuales en Dinamarca, EEUU, reino Unido y Holanda son seropositivos para antígenos del KSHV. Seropositividad y en algunos casos seroconversión están asociados con un incremento en la promiscuidad sexual, con penetración anal receptiva y con sexo oral.

No hay evidencia que apoye la transmisión por actividad sexual entre heterosexuales de este virus.

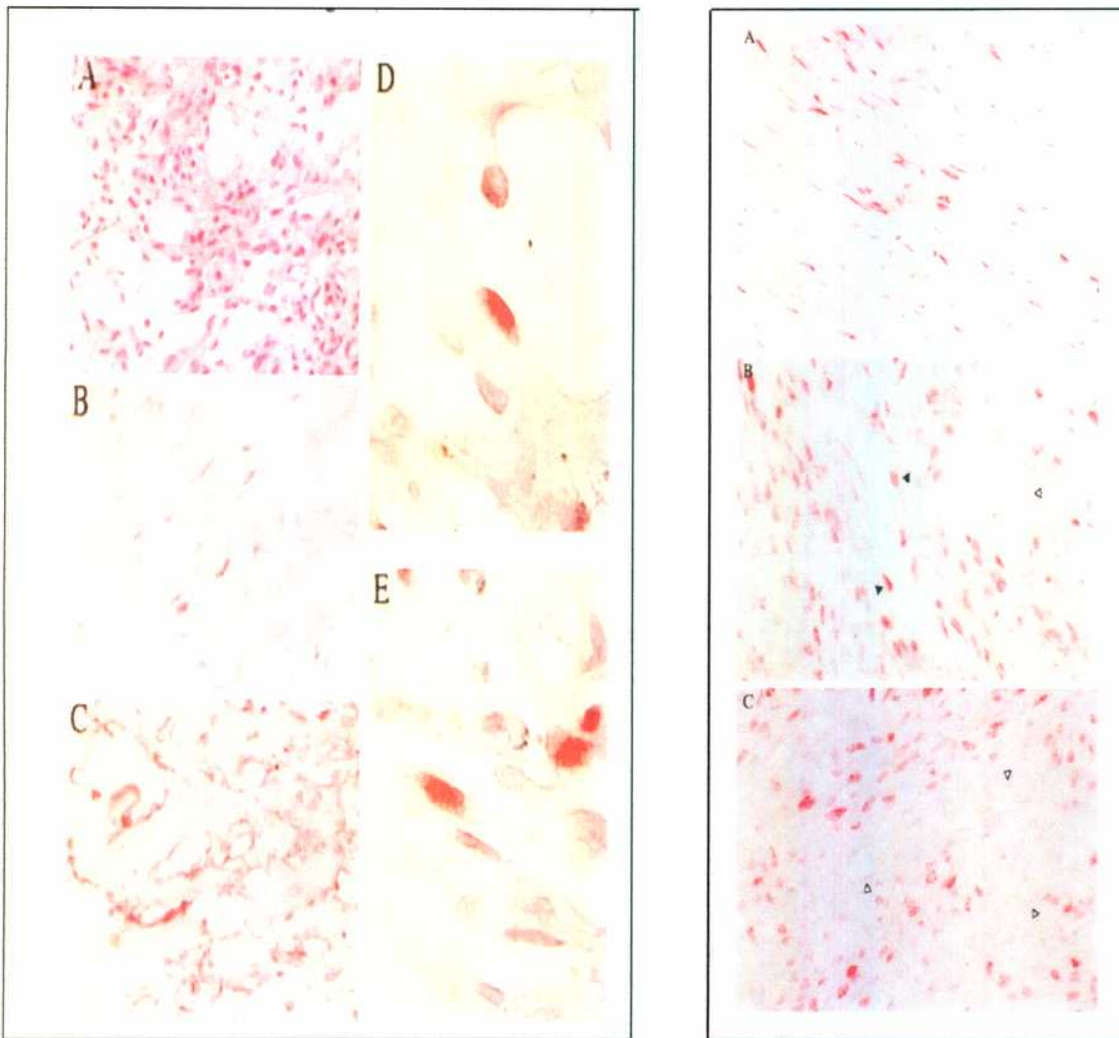


Fig  
11

**Figura 9:** El porcentaje de células ahusadas infectadas por KSHV es menor al 10% en los estadios tempranos de la enfermedad (estadio de parche) y mayor al 90% en los estadios avanzados (estadio nodular). **Izquierda:** **A izq)** Tinción de H/E de una lesión de SK en estadio de parche. **B izq)** La tinción con un anticuerpo anti-LNA-1 revela que las células fusiformes que forman las paredes de los espacios vasculares abiertos (característicos de estas lesiones) están infectadas latentemente por KSHV. **C izq)** La tinción con un anticuerpo anti-VEGFR-3 (un marcador de endotelio linfático) muestra que todas las células que forman las paredes de estos vasos son positivas para este marcador. **D) y E)** muestran una mayor magnificación de la lesión teñida con el anticuerpo anti LNA-1 que muestra una célula en la pared de un espacio vascular abierto infectada con el virus (**D**) y varias células infectadas que componen las paredes de los vasos en forma de hendidura (**E**) **Derecha** **A der)** Lesión de estadio de placa teñida con anticuerpos LNA-1 donde se observa que casi un 50% de las células ahusadas que rodean los espacios vasculares abiertos están infectadas latentemente por KSHV, **B y C der)** Mas del 90% de las células ahusadas son positivas en las lesiones en estadio nodular. Las células endoteliales que rodean un vaso "angulado" son positivas para LNA-1 (flechas negras), sin embargo en estas dos últimas figuras las células endoteliales que rodean los espacios vasculares maduros (flechas blancas) no parecen estar infectadas por KSHV

En países donde el KSHV es endémico este virus está presente en niños y en sus madres, mujeres en general y en hombres lo cual es consistente con una ruta de transmisión no sexual (vertical y probablemente horizontal también) en estas regiones. En contraste la presencia de este virus en niños en EEUU y Reino Unido es sumamente rara.

La infección por el KSHV también puede ocurrir como consecuencia del trasplante de órganos.

A pesar de la preocupación por la transmisión a través de la transfusión de sangre de este virus no hay ninguna evidencia que soporte esta vía de contagio.

A su vez el virus se encuentra muy raramente en el semen de individuos infectados por el KSHV, pero si se encuentra en la saliva de estos individuos. De este modo la vía de transmisión de este virus no esta totalmente clarificada todavía.

Después del descubrimiento de KSHV y los estudios serológicos el problema pareció centralizarse en como KSHV contribuye a causar el sarcoma de Kaposi y cual es la contribución de este virus en el proceso oncogénico.

A pesar de que la evidencia que soporta a KSHV como posible agente etiológico del SK es abrumadora no se ha demostrado aun causalidad.



## 3) KSHV, Sarcoma de Kaposi y Modelos de Patogenia viral.

Oncogenes?

### 3.01) Breve introducción a la Patogénesis Viral

Se define como *patogénesis viral* al mecanismo por el cual los virus causan enfermedades en sus huéspedes ( Fields B., 1996, capítulo 7 y 8)

A pesar de ello es importante destacar que los eventos patogénicos son una consecuencia relativamente inusual de las infecciones virales. (figura 10) 12

La capacidad de un virus, comparado a otros virus cercanamente relacionados, para producir enfermedades en el huésped se define como *virulencia*. Dado que la virulencia depende de una variedad de factores tanto del huésped como del virus debe definirse en términos de factores específicos virales ( dosis de virus, ruta de entrada etc.) y en términos de factores específicos del huésped ( edad, inmunocompetencia, especie etc).

Frecuentemente el número de individuos con infecciones asintomáticas es mucho mayor que el número de individuos infectados que presentan manifestaciones clínicas (figura 10) 12

La supervivencia de los virus en la naturaleza depende de la infección continua de individuos susceptibles. Dentro de un individuo los virus pueden causar infecciones agudas o bien pueden establecer infecciones crónicas o persistentes (figura 10) 12

Durante las infecciones agudas los virus son eliminados rápidamente por el sistema inmune necesitando por ello para perpetuarse la habilidad de transmitirse rápidamente o la capacidad para sobrevivir extraorganismicamente. Durante esta clase de infecciones muchos de estos virus inhiben el metabolismo de las células infectadas productivamente ocasionando efectos citopáticos o muerte celular. Por razones evidentes los mecanismos de patogénesis de virus que producen infecciones agudas ( rabia, gripe, polio) son mucho mas evidentes y estan mejor caracterizados que las de los de los virus que producen

infecciones persistentes. Durante los últimos años ha empezado a reconocerse el rol de las infecciones crónicas (persistentes) virales en un importante y creciente número de enfermedades humanas ( SIDA causado por el VIH, hepatitis crónica y carcinoma hepatocelular causado por la infección del virus de la hepatitis B, cánceres anogenitales causados por infección con el papilloma virus, el SK asociado a la infección con KSHV etc).

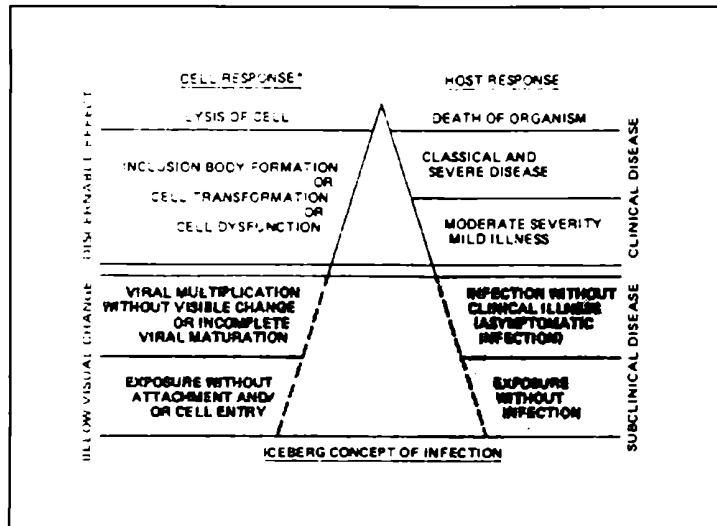
Para establecer infecciones persistentes hacen falta mecanismos que permitan limitar los efectos citotóxicos desencadenados por las infecciones virales y evadir la resistencia del huésped a la infección. La manifestación clínica de la patología en cuestión es por lo general un fenómeno multicausal y no determinístico que se evidencia varios años después de la infección. Es por ello que la patogénesis viral de los virus persistentes es muchísimo más compleja y sutil que la de los virus virulentos que producen infecciones agudas.

Implicito en el estudio de la patogénesis viral está el concepto de que a pesar de la diversidad de virus y huéspedes existen ciertas estrategias comunes que han evolucionado en función de la relación general virus-huésped (figura 14).

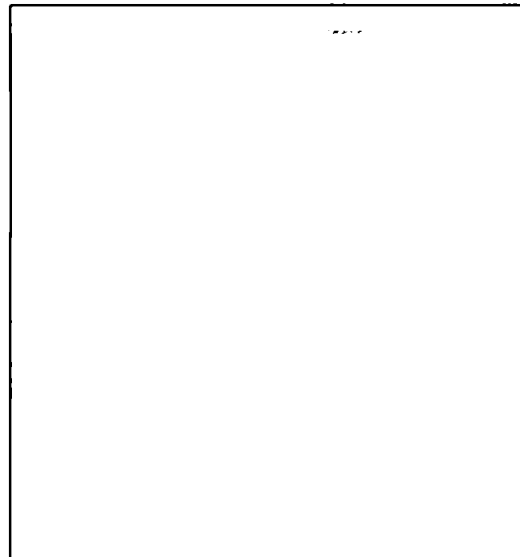
El estudio de la patogénesis viral puede ser conceptualizado en varios niveles:

- **A nivel organismico** la patogénesis viral investiga preguntas tales como ¿Cuál es la ruta de entrada del virus?, ¿Cuál es el sitio donde se realiza la replicación primaria del virus?, ¿qué órganos y tejidos infecta?, ¿cómo se transmite?.
- **A nivel celular** la patogénesis viral investiga cuestiones como ¿Cuál es la naturaleza del receptor viral en las células susceptibles?, ¿cuál es el mecanismo de entrada del virus a las células?, ¿cómo la infección viral altera las funciones celulares?, ¿Cuáles son las vías y mecanismos por los cuales los virus son liberados de las células?.

La relevancia aplicada del estudio de los mecanismos virales de patogenia reside en la utilización de este conocimiento para el desarrollo de estrategias racionales para el control, prevención y terapia de las enfermedades de origen viral.



12  
**Figura 10:** Representación esquemática de las posibles respuestas celulares y del huésped a la infección viral. (tomado de Evans A. y Branchman P., 1991)



**Figura 11:** Las estrategias replicativas virales y las respuestas del huésped originan cuatro patrones generales de evolución de los títulos virales en función del tiempo ( "Fields Virology", capítulo 8, 1996)

Animal	Cell
Entry into the host	Adsorption
Primary replication	Penetration
Spread through the host	Uncoating
Direct and indirect transmission	Transcription
Host immune responses	Translation
Secondary replication	Replication
Cell injury	Assembly
Recovery	Release

**Figura 12:** Etapas del ciclo viral en que la patogenesis viral puede manifestarse ( "Fields Virology", capítulo 7, 1996)

### 3.02) Virus oncogénicos y transformación celular.

En el desarrollo de la biología molecular contemporánea los virus han sido frecuentemente utilizados como modelos genéticamente definidos y simples con los cuales se pueden estudiar complejos eventos celulares. La transformación celular inducida por virus oncogénicos ha jugado un rol central en la dilucidación de los mecanismos oncogénicos moleculares y en la comprensión del cáncer como una enfermedad ocasionada por alteraciones genéticas definidas y secuenciales.

Estudios genéticos con virus oncogénicos han definido el *fenotipo celular transformado*. En este sentido virus mutantes condicionales y la expresión ectópica de proteínas virales utilizando vectores de expresión han sido instrumentales en el entendimiento del efecto de las oncoproteínas virales en la fisiología celular. Usualmente **la transformación maligna es acompañada por drásticas modificaciones en el crecimiento y la morfología celular.**

Las alteraciones en el crecimiento básicamente afectan tres parámetros:

#### **i) Pérdida del mecanismo de inhibición por contacto:**

Cuando las células adherentes "normales" (no transformadas) proliferan en cultivo crecen hasta formar una monocapa confluyente que cubre toda la superficie disponible, en ese momento las células dejan de dividirse (aun si se agrega gran cantidad de nutrientes). A este mecanismo de control de la proliferación celular se lo denomina "inhibición por contacto". Las células están transformadas son capaces de seguirse dividiendo aun después de formar la monocapa confluyente reflejando de este modo la capacidad de estas células de crecer unas sobre otras formando apilamientos de células transformadas. Si una monocapa de células normales es infectada y transformada por unas pocas partículas virales la pérdida de inhibición por contacto en las células transformadas producirá el crecimiento de microtumores (evidenciado como apilamientos de células que sobresalen de la monocapa de células normales) llamados "focos de transformación celular".

**ii) Reducción en el requerimiento de factores de crecimiento**

Las células normales necesitan de factores de crecimiento específicos para proliferar y sobrevivir. Usualmente los factores de crecimiento están incorporados en el suero que forma parte del medio con el que se alimentan las células en cultivo o alternativamente se agregan específicamente (dependiendo del tipo celular) preparando un medio de cultivo más definido. La transformación celular generalmente elimina (*serum independent growth*) o reduce esta dependencia de factores de crecimiento. Un caso particular de este fenómeno son los "loops autócrinos" en el cual la célula transformada secreta un factor de crecimiento que actúa como mitógeno sobre la propia célula.

**iii) Proliferación no dependiente de la adhesión celular (*anchorage independent growth*).**

Las células adherentes normales necesitan una superficie sólida a la cual adherirse antes de proliferar, la transformación celular produce una pérdida de esta dependencia de adherencia para crecer

(*anchorage independent growth*). Usualmente las células transformadas son capaces de crecer en un soporte semisólido (como agar por ej.) de modo que utilizando esta técnica se pueden separar células normales de transformadas.

Como su nombre lo implica la transformación celular también induce cambios en la morfología de las células que pueden afectar el citoesqueleto, la superficie celular, la matriz extracelular y la secreción de metaloproteasas.

En particular el estudio de los virus oncogénicos de ADN con pequeños genomas (poliomavirus, papillomavirus, adenovirus etc), ha contribuido a entender los mecanismos que controlan la proliferación celular de las células de mamíferos. Estos estudios han permitido, por ejemplo, dilucidar el rol de p53 y retinoblastoma (Rb) dos proteínas supresoras claves que regulan la transición desde G1 a S en las células de mamífero (figura 13 A). La mayoría de las oncoproteínas codificadas por los virus tumorigénicos con pequeños genomas de ADN no tienen obvias homologías con proteínas celulares, son esenciales para la replicación viral y actúan inhibiendo la acción de estas

dos proteínas supresores de tumores (Rb y p53) "empujando" de este modo a las células infectadas hacia la fase S del ciclo celular (figura 13).

Los genes virales pueden ser clasificados como tempranos o tardíos dependiendo del estadio del ciclo viral donde se expresan. En general los genes tempranos codifican para proteínas que preparan a la célula infectada para replicar el ADN viral, mientras que los genes tardíos codifican para proteínas estructurales. En estos virus de ADN las oncoproteínas son siempre tempranas.

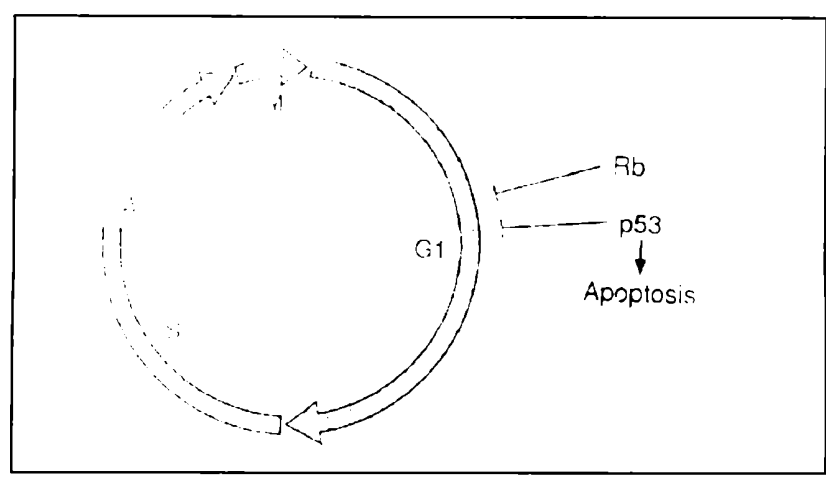
En los virus con pequeños genomas de ADN la infección de una célula permisiva generalmente tiene como consecuencia la infección productiva o lítica con consecuencias citolíticas para la célula huésped, de este modo la transformación inducida por estos virus ocurre solamente si la infección por algún motivo es no permisiva (es decir si el ciclo lítico es abortado). La ineficiencia con la que estos virus transforman células infectadas (frecuencia  $10^{-5}$ ) refleja la baja probabilidad de que accidentalmente una de los oncogenes virales se integre en el genoma del huésped y se exprese.

La habilidad de algunas de las proteínas codificadas por estos virus de estimular a células quiescentes infectadas para que entren en la fase S del ciclo celular es clave para completar el ciclo viral. Sin embargo si la replicación viral no se completa debido a que la célula es no permisiva o a que alguna mutación bloquea la progresión del ciclo lítico la desregulación del control de la proliferación celular que tenía como "objetivo" preparar a las células para la replicación viral puede inducir la transformación celular.

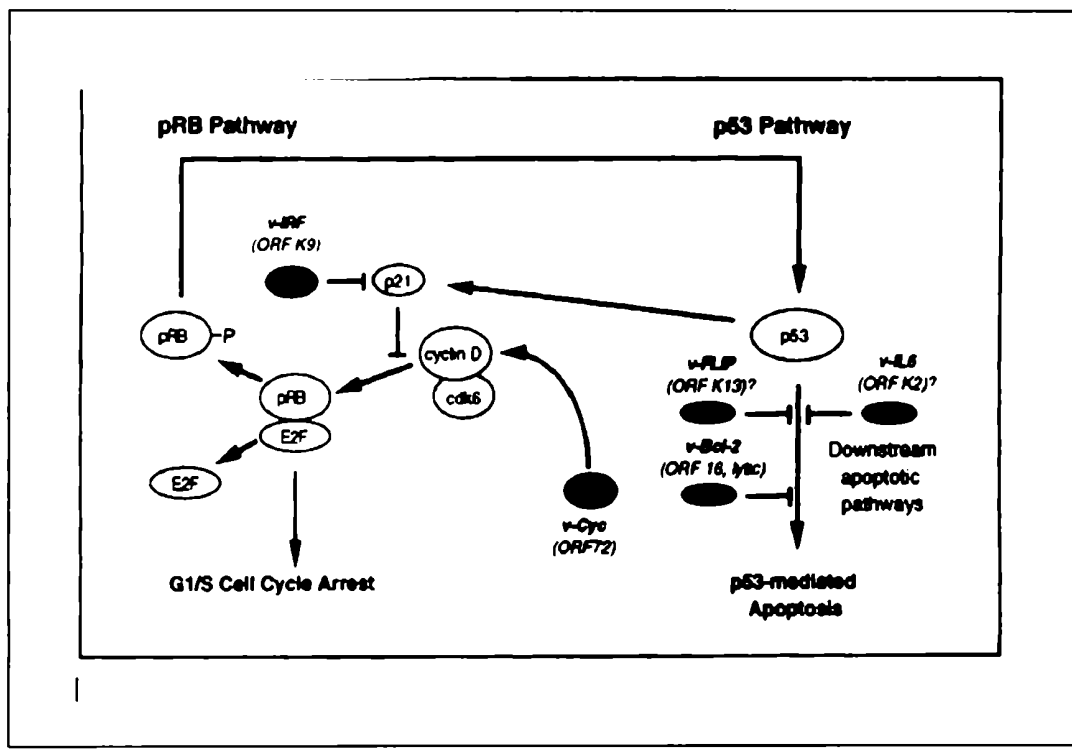
El análisis de oncogenes transducidos por retrovirus (genoma de ARN) también ha sido clave en el entendimiento de las vías de transducción de señales que conectan la membrana plasmática con el control de la expresión genética en el núcleo. A diferencia de los oncogenes codificados por virus de ADN los oncogenes retrovirales han sido adquiridos durante la replicación viral (son homólogos a genes celulares) y seleccionados por su función transformante., es por ello que el estudio de estos genes no puede ser contextualizado en el marco de una estrategia viral replicativa, además la replicación de los retrovirus no es citolítica por lo cual la transformación celular es compatible con la producción de progenie viral.

Dado que el fenotipo transformado es fácilmente reconocible y de que los retrovirus tienen la capacidad de "atrapar" en su genoma genes que codifican para proteínas que

A



B



**Figura 13: Manipulación viral del ciclo celular:** *A) La mayoría de los oncoproteínas virales codificadas en los virus de ADN con pequeño genoma no tienen homologías obvias con proteínas celulares conocidas, pero son transformantes gracias a su habilidad para interactuar con p53 y Rb, dos proteínas supresoras claves en el control del ciclo celular. B) KSHV es un Herpesvirus con un complejo genoma de ADN de unas 140Kb. que codifica para varias proteínas con alto grado de homología con proteínas celulares claves que potencialmente podrían interactuar directa e indirectamente con p53 y Rb. El rol de estas proteínas en el desarrollo de las patologías asociadas a KSHV actualmente se desconoce.*

participan del control celular, alterarlas en el proceso y modificar a consecuencia de ello drásticamente los mecanismos de control de proliferación celular, los retrovirus han sido sumamente útiles para identificar las proteínas celulares encargadas del control de la proliferación celular.

Algunos virus pueden actuar como carcinógenos dentro de su ambiente natural, mientras que otros revelan su potencial oncogénico únicamente en contextos experimentales. La potencia de los virus como agentes transformantes varía también ampliamente, los retrovirus oncogénicos mas virulentos pueden inducir tumores en animales en cuestion de días y virtualmente en todos los individuos infectados. Sin embargo la mayoría de los virus requieren un período de latencia mucho mas largo y solamente una pequeña fracción de los huéspedes infectados termina desarrollando tumores (todos lo tumores humanos asociados a infecciones virales pertenecen a este último grupo). El hecho de que la infección por virus oncogénicos no determine inevitablemente la formación de tumores refleja la naturaleza secuencial y en etapas del cancer (*multistep carcinogenesis* o *carcinogénesis en etapas*) en el cual cada paso constituye un evento genético independiente e irreversible que sucesivamente contribuye a la desregulación de los mecanismos de control de la proliferación celular. La infección viral representa solamente uno de estos pasos, el cancer evolucionara solo si algunos de los otros cambios genéticos necesarios para la transformación oncogénica ocurren en una misma célula. Sin lugar a duda el estudio de los virus oncogénicos ha jugado un rol central en la dilucidación y el entendimiento de los mecanismos que controlan el crecimiento celular proveyendo metodologías para disectar las vías de transducción de señales y brindando un marco conceptual en la cual los mecanismos regulatorios pudieron ser interpretados. La contribución en estos estudios de los virus de ADN y de los retrovirus ha sido distinta pero complementaria, así como el análisis de bioquímico y genético en levaduras ha iluminado los mecanismos de control del ciclo celular, la combinación de estos dos sistemas virales oncogénicos ha proporcionado una invaluable cantidad de metodologías y conocimiento en el cual el control del crecimiento celular y la diferenciación pueden ser estudiadas en el contexto de la disrupcion de este control que se hace evidente durante la transformación oncogénica.



### **3.03) Virus de Epstein-Barr (EBV) como modelo de $\gamma$ -Herpes virus oncogénico humano**

EBV es el virus humano más homólogo a KSHV y también es oncogénico y linfotrópico (ambos son gama herpesvirus). Como se ha explicado en la sección 2.0 los herpesvirus poseen complejos genomas de ADN y establecen infecciones persistentes dentro de sus huéspedes con ciclos de reactivación viral.

EBV fue aislado de pacientes con linfoma de Burkitt por primera vez en 1964 (Epstein M. 1964). Dado que EBV es sumamente prevalente en la población humana y está asociado a numerosas enfermedades la biología de este virus se ha caracterizado extensamente y es por ello que se trata de un paradigma de patogénesis y persistencia herpesviral que tiene y ha tenido gran influencia en la modelización y racionalización de los mecanismos de patogenia inducidos por la infección con KSHV.

El virus de Epstein-Barr es sumamente prevalente dentro de la especie humana (se calcula, dependiendo de la región, que entre el 35 y el 95% de la población adulta está infectada por este virus). La ubicuidad previamente mencionada y la persistencia son dos características típicas de las infecciones herpesvirales (Fields B, 1996, capítulo 75 y Masucci M., 1994).

Al igual que otros herpesvirus EBV infecta un tipo celular que sostiene predominantemente la infección lítica (epitelio de la mucosa) y otro tipo celular (reservoreo) en donde la infección es mayormente latente (células B).

Cuando la infección con este virus se produce durante o después de la adolescencia causa una enfermedad linfoproliferativa benigna llamada mononucleosis infecciosa, sin embargo en la mayoría de los casos la infección con EBV es asintomática.

El concepto de que EBV es un virus oncogénico proviene del hecho de que se encuentra asociado estrechamente a un gran número de enfermedades linfoproliferativas humanas como ser linfomas inmunoblásticos en pacientes inmunosuprimidos, linfoma de Burkitt endémico, carcinoma nasofaríngeo no diferenciado y se lo halla también asociado (40%) al linfoma de Hodgkin y otras enfermedades.

Además *in vitro* EBV es el agente transformante más potente conocido. Entre el 10 y el 50% de las células B provenientes de cualquier donante pueden ser immortalizadas como

líneas celulares linfoblastoides (LCLs) cuando se exponen a virus EBV *wild type* o a cepas de laboratorio. Además se pueden establecer LCLs por cultivo de células B purificadas a partir de individuos previamente infectados con EBV.

Uno de los motivos por los cuales en general la infección por EBV es asintomática es que las LCLs son inmunogénicas y causan fuertes respuestas humorales y celulares, de hecho ciertos anticuerpos que reconocen antígenos virales asociados con la transformación viral se encuentran siempre presentes en los pacientes infectados con EBV. Además las LCLs pueden causar fuertes respuestas citotóxicas y proliferativas *in vitro*. El hecho de que la mayor parte de los individuos infectados por este virus ( ubicuo y potencialmente oncogénico) no presente síntomas clínicos es consecuencia del control inmunológico y de la selección de múltiples estrategias virales que favorecen la supervivencia de las células infectadas dentro de individuos inmunocompetentes.

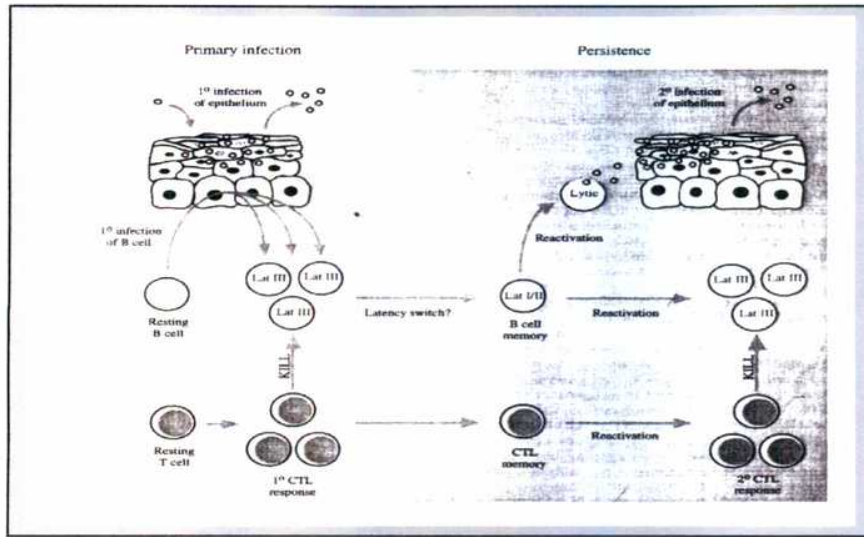
La figura 14 es una representación esquemática del ciclo viral de EBV. La infección viral primaria ocurre como consecuencia de virus o de células productivamente infectadas presentes en la saliva y se asocia con el establecimiento de zonas de replicación viral en el epitelio nasofaríngeo y con la entrada del virus al *pool* de células B circulantes. Los eventos iniciales después de la infección de células *in vivo* parecen ser similares a los observados inmediatamente después de las infecciones *in vitro* que implica la expresión a partir de los promotores Wp, Cp, LMP y expresión de el *cluster* completo de proteínas latentes (llamado patrón de expresión de latencia III). Este particular programa de expresión latente tiene dos mayores efectos que ayudan al establecimiento de la persistencia viral en el sistema linfoide:

- i) Es capaz de inducir una rápida expansión policlonal de las células B infectadas tempranamente (antes que la respuesta inmune comience)
- ii) La expresión de la proteína latente viral LMP1 regula en las células B la expresión de Bcl-2 y A20 dos proteínas celulares claves que normalmente determinan la supervivencia de una pequeña fracción de las células B como células de memoria y que de este modo favorecen la supervivencia de las células infectadas.

Esta fase temprana de proliferación de células B inducidas por la infección viral es drásticamente controlada por la respuesta de las células T del huésped en donde la mayoría de las células infectadas son eliminadas. A pesar de la fuerte respuesta inmune la

infección viral nunca es completamente eliminada. Se supone que en esta etapa se produce un switch (probablemente inducido por la diferenciación de las células B infectadas) en el programa genético de expresión de EBV cambiando a los programas de latencia I/II donde básicamente se expresa un número mínimo de proteínas virales latentes cuya única función es la manutención episomal del genoma de EBV. A pesar de que ello implica una transición de un fenotipo proliferativo a uno prácticamente quiescente, estas células son capaces de escapar al control inmunológico y por ende actúan como reservorio ya que pueden reactivarse o pasar a latencia III en diferentes circunstancias.

El rol del control inmune en limitar el potencial onogénico-proliferativo de las células infectadas por EBV es ilustrada in vivo por el rechazo agudo que acompaña la mononucleosis infecciosa y por el desarrollo de linfomas inmunoblásticos EBV-positivos en pacientes inmunosuprimidos. Este delicado balance dominado por un pequeño y constante número de células infectadas controladas por el sistema inmune puede disrumpirse en ciertos contextos (como la inmunosupresión) y manifestarse luego clínicamente como enfermedades linfoproliferativas asociadas a la infección por EBV. A pesar de las obvias homologías entre EBV y KSHV existen diferencias sustantivas entre los dos virus. En principio KSHV posee varios genes homólogos a genes celulares que no están codificados en el genoma de EBV. Además los tipos celulares que ambos tipos de virus infectan son diferentes y están asociados a distintas patologías. Por otro lado EBV es muchísimo más prevalente que KSHV lo cual posiblemente refleje importantes diferencias en las estrategias infecciosas y replicativas de ambos virus. Otra diferencia importante que EBV infecta y transforma eficientemente células in vitro mientras que KSHV no infecta células en cultivo productivamente y las células infectadas pierden el virus después de pocos pasajes. De este modo a pesar de que KSHV está asociado a enfermedades linfoproliferativas no existe evidencia de que como en el caso de EBV la infección y expresión de los genes latentes de KSHV represente un evento oncogénico. Actualmente se desconoce hasta que extremo el paradigma de EBV sirve para explicar la patogénesis de las enfermedades asociadas a KSHV.



**Figura 13:** Representación de las interacciones virus-huesped que ocurren como consecuencia de las infecciones primarias y persistentes por EBV y que modulan los programas de expresión genética de este virus. (“Fields Virology”, capítulo 75, 1996)

	Latency I		Latency II		Latency III	
Pattern of EBV gene expression						
Lymphoma type	Burkitt's (HIV+/-)	Primary effusion	Hodgkin's	T/NK cell	AIDS-NHL (large cell)	Post-transplantation
Other transforming events	c-myc +/- p53	KSHV/HHV-8 +/- BCL-6	?	?	+/- BCL-6 +/- c-myc +/- p53 +/- Ras	+/- BCL-6 +/- c-myc +/- p53 +/- N-ras
Immunogenicity	-		+/-		+++	

© 1999 Lippincott Williams & Wilkins

**Figura 14:** La interacción entre la expresión genética de EBV y otros eventos oncogénicos adicionales (en general alteraciones genéticas en la célula huesped) cooperan en la patogénesis de distintos tipos de linfomas. En la figura se muestran los distintos patrones de expresión latente de EBV y las distintas alteraciones genéticas del huesped o co-infecciones virales asociadas específicamente a los diferentes tipos de linfomas. En negritas se muestran los eventos que ocurren prácticamente en el 100% de los casos. Note que las patologías asociadas al patrón de latencia III únicamente prosperan en contextos donde el huesped no es inmunocompetente. El hecho de que se necesiten multiples eventos para desarrollar estos linfomas es consecuencia de la naturaleza genéticamente compleja del proceso oncogénico (carcinogénesis en etapas). Esta figura intenta ilustrar el hecho de que la interacción del genoma viral con el genoma humano crea un nuevo contexto genético en donde eventos oncogénicos novedosos pueden ocurrir en circunstancias esporádicas, pero determinadas ( Figura: Mesri y Cesarman 1999).

### **3.1) Intentando Probar el rol Causal de KSHV en la patogénesis del sarcoma de kaposi**

Dos problemas metodológicos experimentales emergen claramente cuando se intenta probar el rol patogénico del KSHV.

#### **i) Falta de modelos animales:**

- No se conocen tumores similares en animales.
- Hasta la fecha no se conoce ningún modelo animal infectable por el KSHV.

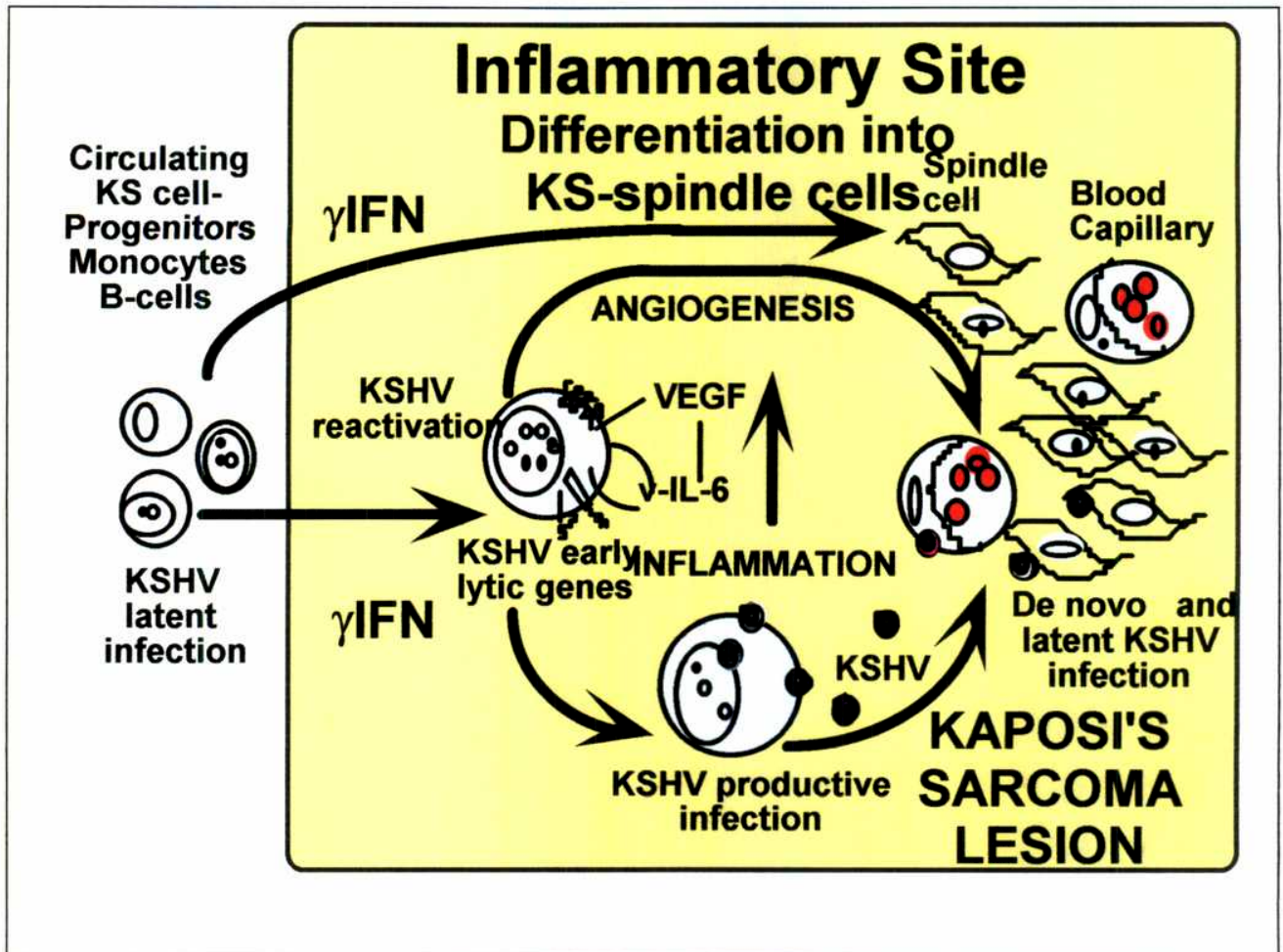
#### **ii) Ausencia de sistemas eficientes de infecciones en células de cultivo:**

- Actualmente solo es posible realizar infecciones agudas con muy baja eficiencia en células en cultivo (Neipel F et al 1997, Foreman KE et al. 1997, Moore and Chang review) por ello los ensayos de formación de placa y los experimentos genéticos clásicos con virus mutantes, recombinantes y Knock-outs se han visto impedidos.
- Otro problema es que las células de SK pierden el virus después de los primeros pasajes en cultivo.

A pesar de ello, desde el descubrimiento del KSHV se han logrado obtener algunos reactivos útiles para el estudio de la biología de este virus. Como se ha mencionado varias líneas celulares derivadas de Linfomas de Efusiones Pleurales (otra enfermedad asociada al SIDA y a el KSHV) se han aislado y contienen de 40-80 copias de genoma de HVSK por célula lo cual se ha utilizado como una herramienta para propagar el virus (de hecho se han infectado células B y endoteliales con virus provenientes de estas células) para ensayos serológicos y para estudiar los programas líticos y latentes del KSHV.

### **3.2) Modelando el rol de KSHV en la etiopatogenia del SK asociado al SIDA.**

Como se ha mencionado previamente es evidente que la infección por KSHV representa solo uno de las múltiples etapas involucradas en el desarrollo del SK ( Gallo 1998, Ganem 1998), adicionalmente la virulencia de KSHV está parcialmente determinada por el patrón de expresión genética viral y del contexto celular e inmune en el que los productos de estos genes se expresan, todas estas variables son interdependientes y son moduladas tanto por factores virales como del huésped. En el caso del SK asociado al SIDA algunos de los co-factores identificados son la desregulación inmune y la expresión de la proteína Tat del VIH (Gallo 1998, Ensoli 1998). KSHV al igual que otros herpesvirus es capaz de producir infecciones latentes o infecciones productivas (líticas) que destruyen las células infectadas. La mayor parte de las células en las lesiones están infectadas latentemente sugiriendo que esta la expresión genética latente es necesaria para el mantenimiento del fenotipo maligno de las lesiones de SK (Staskus 1997). A pesar de ello la mayoría de las proteínas virales que se sospecha que podrían tener una actividad patogénica son controladas por genes líticos expresados únicamente en el subset de células infectadas productivamente (Sun 1999, Staskus 1997). Eventualmente estos genes líticos podrían jugar importantes roles en la génesis del precursor circulante o neoplásico del SK ( ver secciones 1.2 y 1.3), en la infección "de novo" o al ser activados específicamente fuera del contexto del ciclo viral por factores del huésped. Otra interesante posibilidad es que estos genes jueguen un rol importante en la evolución del SK por estimulación parácrina de las células vecinas ( figura 16 ver secciones 1.3 y 1.4 ). La presencia de citoquinas inflamatorias del tipo Th1 (como por ejemplo IFN  $\gamma$ ) precede a la infección de KSHV en las lesiones tempranas de SK (Sirianni 1998), notablemente estas citoquinas son capaces de reactivar el ciclo lítico de KSHV e inducir la diferenciación de progenitores circulantes a un fenotipo similar al de las células ahusadas del SK. (Monini 1999). Estos datos son coherentes con un mecanismo de patogénesis del sarcoma de Kaposi en múltiples etapas (Mesri 1999,



18  
**Figura.... :Un posible modelo para la patogénesis del Sarcoma de Kaposi .** Cuando los progenitores circulantes se hallan en ambientes ricos en citoquinas inflamatorias se diferencian en células ahusadas del sarcoma de Kaposi y las células latentemente infectadas por KSHV inician el ciclo lítico, esta reactivación induce la expresión de varios genes "early lytic" como vIL-6, KSHV-GPCR y K1 que son potencialmente patogénicos. La expresión de proteínas patogénicas y la producción de virus alimentan la creación de un ambiente inflamatorio-angiogénico que es necesario para aumentar el número de células infectables (células endoteliales por ej.) en la cercanía de la lesión. A pesar de que la mayoría de de las células ahusadas y endoteliales en las lesiones están infectadas latentemente entre el 5-10% de estas células y un porcentaje variable de monocitos se encuentran líticamente infectadas. La regresión de las lesiones de SK que generalmente acompaña la terapia de HAART en los pacientes de SIDA-KS sugiere que la constante reactivación y reinfección por el virus en el contexto de la inmunosupresión y desregulación son necesarios para mantener las lesiones.

Ensoli 1998) en el cual la combinación de inflamación y reactivación de KSHV inducen la evolución de una lesión hiperplásica inflamatoria crónica retroalimentada por un circuito de citoquinas inflamatorias, Tat y factores parácrinos estimulatorios codificados por KSHV que finalmente inducen transformación maligna.

Uno de los posibles escenarios para la patogénesis del SK inducida por la infección de KSHV se describe en la figura 16

### **3.3) Estrategia de genes candidatos e hipótesis de trabajo**

El descubrimiento del virus de KSHV, los datos epidemiológicos y la secuenciación de su genoma permitieron que se racionalice la patogénesis del SK desde una nueva perspectiva.

Nuestra interpretación de los datos epidemiológicos y experimentales es que a pesar de que la infección por KSHV no es determinísticamente oncogénica, la interacción del genoma viral con el genoma humano crea un nuevo contexto genético en donde eventos oncogénicos novedosos pueden ocurrir bajo circunstancias determinadas pero esporádicas (ello explicaría por que la incidencia es menor que la prevalencia)

Un claro ejemplo de ello es el desbalance del control inmunológico ( infección de VIH, o la inmunosupresión en los pacientes transplantados) que permite la reactivación del ciclo replicativo viral y la expresión de proteínas de KSHV (early lytic and late lytic) que normalmente se encuentran reprimidas para poder escapar al control inmunológico.

Nuestra hipótesis de trabajo es que la expresión de los genes "pirateados" por este virus bajo inusuales, pero determinadas circunstancias (co-factores) juegan un rol central en la etiopatogenia del SK. De hecho KSHV codifica para un notable número de genes con homología a genes humanos como IL-6, quemoquinas como las MIPs, un homólogo a l receptor de IL-8 (una quemoquina inflamatoria y angiogénica) y otros genes (figura 17) que tienen la potencialidad de desencadenar los fenotipos más relevantes observados en las lesiones del SK:



- **Angiogénesis**
- **Infiltrado inflamatorio**
- **Proliferación de células endoteliales (CE) y células de fenotipo ahusado.**

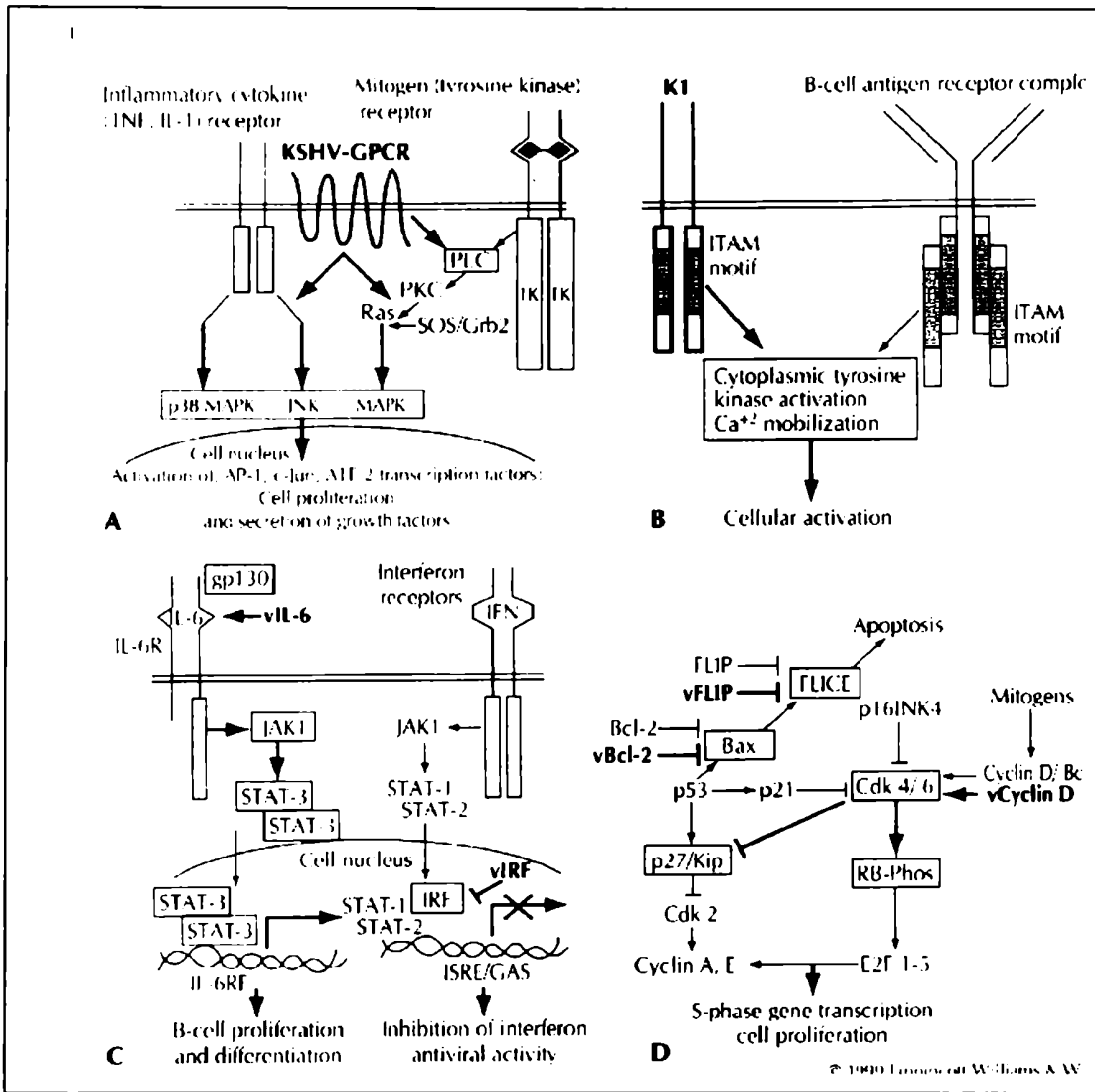
Notablemente con excepción de la Ciclina D y la proteína Fly viral ( implicada en procesos antiapoptóticos) todos los genes de KSHV con potencialidad patogénica tienen un patrón de expresión lítico temprano o "early-lytic" (**figuras relacionadas**) .

Nuestro razonamiento es que KSHV posee la maquinaria molecular para desencadenar los fenotipos previamente mencionados, pero en el contexto del control del sistema inmune estos genes solo pueden ser expresados minoritaria y controladamente durante los escasos eventos de reactivación viral. En determinados contextos, como cuando se debilita el control inmunológico sobre la reactivación viral , la probabilidad de entrada al ciclo lítico y los títulos virales aumentan ( De hecho como se ha mencionado en la sección... Los títulos virales tienen valor pronóstico sobre la probabilidad de desarrollar el SK). Con el aumento de expresión de genes early-lytic las chances de la ocurrencia de eventos estocásticos oncogénicos se incrementa dramáticamente.

Basados en esta hipótesis de trabajo decidimos expresar constitutivamente genes "early-lytic" candidatos de KSHV en sistemas de cultivo para evaluar su potencialidad para producir los fenotipos mas relevantes SK

- **Potencialidad oncogénica ( Transformación o Inmortalización).**
- **Capacidad para inducir procesos angiogénicos.**
- **Capacidad para inducir procesos inflamatorios.**

**En síntesis, la hipótesis subyacente es que KSHV es el co-factor etiológico causante del sarcoma de Kaposi y como tal posee la maquinaria molecular capaz de desencadenar, al menos en ciertos contextos, algunos de los fenotipos característicos de las lesiones de SK.**



**Figura ....: KSHV codifica para genes capaces de manipular las vías de transducción de señales involucradas en proliferación y supervivencia celular.**

**A** la actividad constitutiva de KSHV-GPCR es capaz de reclutar MAPKs que activan factores transcripcionales que a su vez regulan la proliferación celular y la secreción de factores de crecimiento.

**B** los dominios citoplasmáticos ITAM presentes en K1 pueden reclutar cascadas involucradas en la activación de células B. **C** Ciertos genes de KSHV también son capaces de modular las vías de señales que responden a citoquinas, vIL-6 se une a gp130 y activando la vía JAK1/STAT3 y consecuentemente la transcripción desde genes modulados por IL6RE que generalmente se relacionan con la proliferación y diferenciación de células B; vIRF es un represor transcripcional que bloquea la activación de los genes regulados por el hIRF.

**D** vCyclin D activa CDK4 y causando la fosforilación de Rb y evitando de este modo que esta proteína pueda causar el arresto del ciclo celular, a su vez el complejo vCycD/CDK6 degrada al inhibidor de CDKp27 desregulando de este modo los mecanismos de control sobre la transición G1/S. v-BCL2 y vFLIP pueden inhibir la apoptosis al interactuar con moléculas pro-apoptóticas del huésped como Bax y FLICE. (figura extraída de Cesarman E. y Mesri E. 1999).

#### 4) Elección de KSHV-GPCR como gen candidato

El ORF 74 de KSHV ( KSHV-GPCR ) codifica para un receptor acoplado a proteína G (figura 17) que es sumamente homólogo al receptor humano de IL-8 (Cesarman et al 1996). Llamativamente este receptor viral se encuentra codificado en una región dentro del genoma de KSHV donde se localiza un “cluster” de genes potencialmente oncogénicos (figura 18; Boshoff 1998).

Como los  $\gamma$  herpesvirus son oncogénicos y se ha demostrado que receptores acoplados a proteína G pueden ser transformantes bajo ciertas circunstancias ( por ejemplo ver Julius D, Science 1989), **nuestra hipótesis es que KSHV-GPCR es un virus oncogénico cuya capacidad oncogénica se debe en parte a KSHV-GPCR**. Esta posibilidad está soportada por el hecho de la específica asociación de KSHV con el SK y con los linfomas de efusión primaria y el hecho de que el mensajero de KSHV-GPCR se transcriba en ambos tipos de enfermedades (Cesarman et al J of Virology 1996, Arvanitakis L, Blood 1996).

KSHV-GPCR tiene ciertas características inusuales que lo diferencian del receptor de hIL-8 (Arvanitakis et al Nature 1997) :

- KSHV-GPCR activa cascadas de transducción de señales independientemente de la presencia de agonistas (es un receptor constitutivamente activado)
- Está acoplado a una variedad mucho mayor de proteínas G que el hIL-8R (por ejemplo, cuando se expresa en células Cos-1 no necesita de la co-transfección de G16 para transducir señales eficientemente)

Estas características definen a KSHV-GPCR como un receptor promiscuo capaz de activar cascadas de transducción de señales constitutivamente en diferentes tipos y contextos celulares.

La activación constitutiva de GPCRs endógenos ocurre generalmente como consecuencia de mutaciones específicas en estos receptores (Milano C, Science 1994; Lefkowitz, R Trends Pharmac Science 1993, Alblas J, EMBO J, 1996) que originan distintas enfermedades proliferativas y tumores (Coughlin S, Curr Opin. Cell Biology

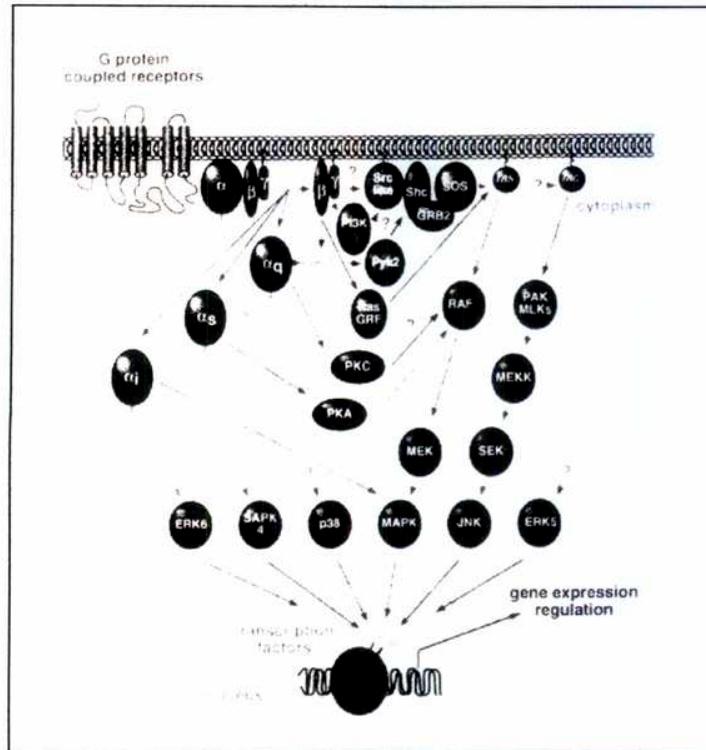


Figura.....<sup>20</sup>: Representación esquemática de la estructura de un receptor acoplado a proteína G (GPCR) y las vías de transducción de señales que estos receptores activan. Note que la mayoría de estas cascadas divergentes se integran a nivel de las MAPKs (citoplasma) antes de modificar la expresión genética de las células (núcleo) (tomado de Gutkind S 1998)

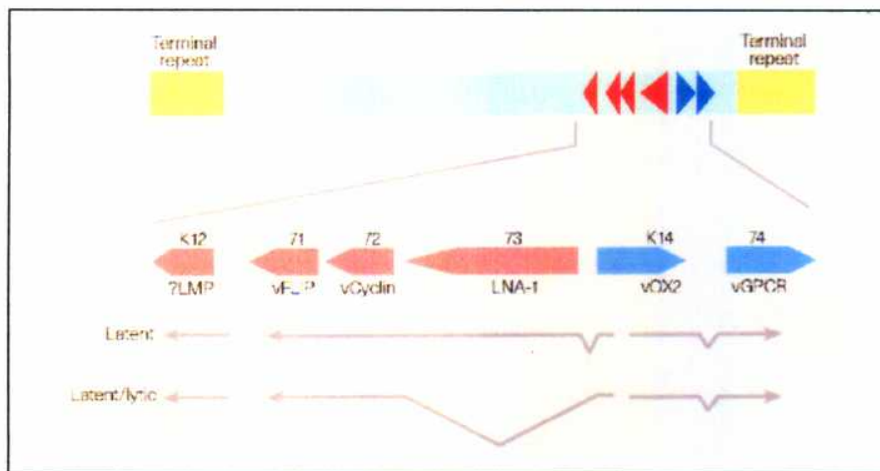


Figura.....<sup>21</sup>: El GPCR codificado por KSHV(ORF74) se encuentra dentro de "cluster" de genes potencialmente oncogénicos. Las dos proteínas que no tienen obvias contrapartes celulares son LNA-1 (Latent Nuclear Antigen) que tiene homología con los Antígenos Nucleares de EBV (EBNAs) y K12 es una proteína latente expresada en las células endoteliales y latentes del SK que podría potencialmente jugar un rol oncogénico similar al de las proteínas LMPs de EBV. (extraído de Boshoff 1998)

especie - chachalaca

1994, Sande J V J. Clin. Endocrin. Metab. 1995). El incremento de proliferación observado en células NRK-49F expresando KSHV-GPCR soporta un rol para este receptor en tumorigenesis (Arvanitakis et al Nature, 1997).

A su vez existen dos mecanismos complementarios por los cuales KSHV-GPCR podría actuar en el desarrollo de las enfermedades asociadas a KSHV.

- **Directos:** en la cual las cascadas de señales constitutivamente activadas por KSHV-GPCR inducen transformación neoplástica
- **Indirectos:** En la cual genes activados como consecuencia de la expresión de KSHV-GPCR podrían parácrina o autocrinamente jugar un rol central en el desarrollo de estas patologías. Lo cual sería coherente con la hipótesis reactiva (ver introducción).

Un ejemplo de mecanismo indirecto podría ser la activación de genes angiogénicos como bFGF y VEGF que juegan roles centrales en el desarrollo del SK, son factores de crecimiento de células endoteliales y ahusadas (Ensoli B Science 1989) y cuyos promotores son dramáticamente modulados por secuencias responsivas a AP-1 (Erdos G, J. Cell Physiol 1995) . Llamativamente KSHV-GPCR activa la vía PKC/AP-1 (Arvanitakis et al, Nature 1997).

Además IL-8 es un importante factor angiogénico, si las cascadas de transducción de señales activadas por el hIL-8R y KSHV-GPCR estuvieran conservadas cabría esperar consecuencias proliferativas y angiogénicas específicas de células endoteliales en respuesta a la expresión de este receptor viral.

Estos datos indican que KSHV-GPCR es un interesante gen candidato con potencialidad para inducir los fenotipos mas relevantes presentes en las lesiones. del Sarcoma de Kaposi.

Si bien para la probar formalmente el rol de KSHV en el desarrollo del SK hace falta generar modelos animales de infección viral y patogénesis, la demostración de que determinados genes virales pueden potencialmente producir algunos de los fenotipos relevantes a la patogénesis del SK puede ilustrar los mecanismos moleculares relevantes y subyacentes a esta patología que podrían eventualmente tener un impacto en la comprensión de esta enfermedad y en el tratamiento de los pacientes con enfermedades asociadas a KSHV.

# **OBJETIVOS**

## Objetivos:

- **Objetivo general** : Modelar la etiopatogenia del Sarcoma de Kaposi a través de la expresión ectópica de genes candidatos
- **Objetivo primario**: Evaluar el potencial oncogénico y angiogénico de KSHV-GPCR y eventualmente caracterizar las vías de transducción de señales y los mecanismos moleculares subyacentes a estas respuestas biológicas.

# **RESULTADOS**



## Resultados :

# 1) KSHV-GPCR es una oncoproteína viral y un activador angiogénico

## 1.1) La expresión ectópica de KSHV-GPCR induce transformación celular en fibroblastos inmortalizados de ratón ( NIH3T3).

Para determinar si la expresión del GPCR constitutivamente activado codificado por el ORF 74 de KSHV podía inducir transformación celular se decidió expresar esta proteína en NIH3T3 y utilizando el ensayo de formación de focos de transformación celular (FFA) medir su potencial oncogénico (Ver sección 3.02). Esta metodología ha sido utilizada previamente para demostrar el potencial oncogénico de otros GPCRs ( Julius 1989, Gutkind 1991)

Con el propósito de sobreexpresar este receptor viral en NIH3T3 se subclonó KSHV-GPCR en el sitio múltiple de clonado de el vector de expresión pCEFL cuyo promotor es el del factor de elongación 2 de ratón.

Para verificar la expresión de KSHV-GPCR se transfectaron células NIH3T3 y se seleccionaron en G418 (pCEFL contiene un gen de resistencia a esta droga). La transcripción del mensajero de este receptor viral se verificó por RT-PCR ( figura 2) y su actividad bioquímica se demostró midiendo la acumulación de IP3 en las células transfectadas con KSHV-GPCR comparadas con los niveles acumulados en células control (NIH3T3 transfectadas con pCEFL). (ver figura 3). Estos resultados indican que la proteína se está traduciendo, que se localiza correctamente en la membrana plasmática y que en este sistema este receptor es bioquímicamente activo.

Como se observa en la figura 4 la expresión de KSHV-GPCR reproduciblemente induce focos de células transformadas exactamente tres semanas después de que las células llegaron a confluencia. En la misma figura se ve también que la expresión de KSHV-GPCR aumenta la probabilidad de transformación en NIH 3T3 y que el número de focos es proporcional a la cantidad de vectores pCEFL/KSHV-GPCR que se transfectan (fig 4). En contraste las células transfectadas con pCEFL permanecen inhibidas por contacto formando una monocapa de células inhibidas por contacto y como consecuencia de ello no se observan focos en estas placas.

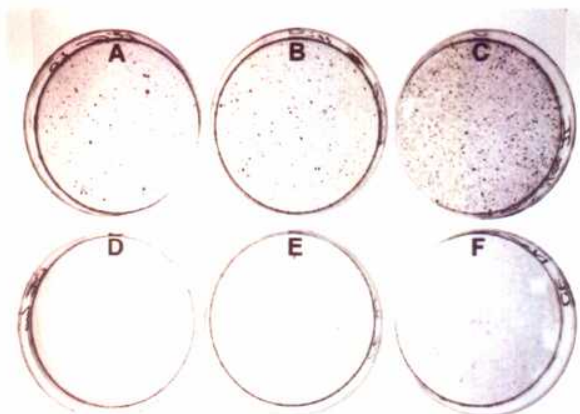
La eficiencia de transfección de ambos vectores (pCEFL y pCEFL/KSHV-GPCR) calculada como el número de colonias G418 resistentes después de transfectar NIH3T3 con el mismo número de plásmidos es la misma. De modo que la diferencia en el número de focos solo puede ser explicada por la actividad transformante de KSHV-GPCR.

A su vez la potencia oncogénica de KSHV-GPCR (medida como la cantidad de focos producido por un número determinado de plásmidos) es similar a la de M1 (otro GPCR) pero muy inferior a la de Ras V12 (ver tabla 1).

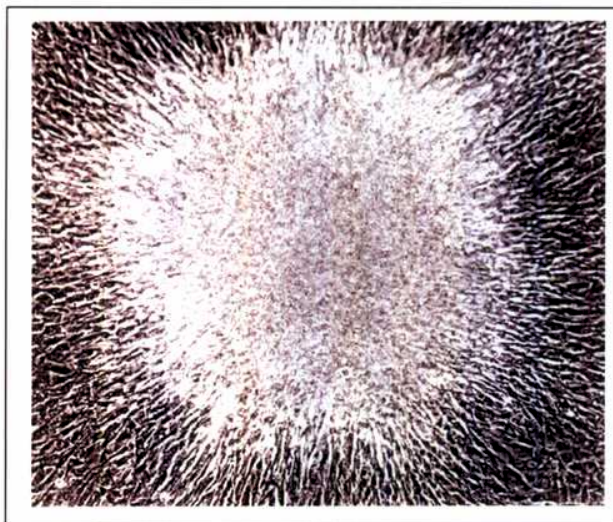
Dos características distintivas de estos focos los diferencian de los inducidos por expresión ectópica de RasV12 (un mutante de Ras que está constitutivamente activado):

- **El fenotipo:** Los focos inducidos por KSHV-GPCR son muchísimos más compactos y densos que los focos inducidos por expresión de RasV12. (ver figura 2) De hecho el fenotipo es parecido a los focos inducidos por expresión de RhoQL (un mutante de Rho que está constitutivamente activado) y a los focos inducidos por Mas ( otro GPCR oncogénico que transforma principalmente a través de Rac).
- **La cinética de formación de los "focos KSHV-GPCR" :** los focos KSHV-GPCR tardan tres semanas en formarse en contraste los "focos RasV12" tardan solo 9 días en aparecer.

Estas observaciones son importantes por que podrían indicar que los mecanismos de transformación y las vías de transducción de señales activadas por Ras y por KSHV-GPCR son diferentes.



**Figura 3: La expresión de KSHV-GPCR en NIH3T3 induce focos de transformación celular.** Células NIH3T3 fueron transfectadas con pCEFL-KSHV-GPCR (A,B y C) o con PCEFL (D,E y F) como control negativo, exactamente tres semanas después de la confluencia las células fueron teñidas y fijadas como se describe en la sección de métodos. Si bien en los distintos experimentos la cantidad de plásmidos transfectados varía, la cantidad de ADN utilizada en todas las transfecciones es la misma (25ug). A y D fueron transfectados con 0.2ug de ADN plásmidico (pCEFL-KSHV-GPCR y pCEFL respectivamente), B y E con 2ug y C y F fueron transfectadas con 0.2ug y tratadas posteriormente (desde las 24hs después de la transfección) con G418 (750ug/ml). Como puede verse en la figura la expresión de KSHV-GPCR induce focos de transformación celular y la cantidad de focos observados es proporcional al número de células que expresan este receptor viral. En contraste no se observa pérdida de inhibición por contacto en las células transfectadas con pCEFL.



**Figura 4: Detalle de un foco de células transformadas por expresión de KSHV-GPCR.** En la foto se puede observar la apariencia microscópica de un foco de células transformadas como consecuencia de la expresión de KSHV-GPCR, en contraste puede observarse que la monocapa de células NIH3T3 que rodean al foco permanecen inhibidas por contacto. Note que la apariencia del foco es compacta (a diferencia de los focos de Ras que son mas difusos) y muestra gran similitud con el "fenotipo" de los focos que se producen como consecuencia de la expresión de versiones constitutivamente activadas de "pequeñas proteínas G" como Rac y Rho.

## **1.2) Las células NIH3T3 transformadas por KSHV-GPCR son tumorigénicas**

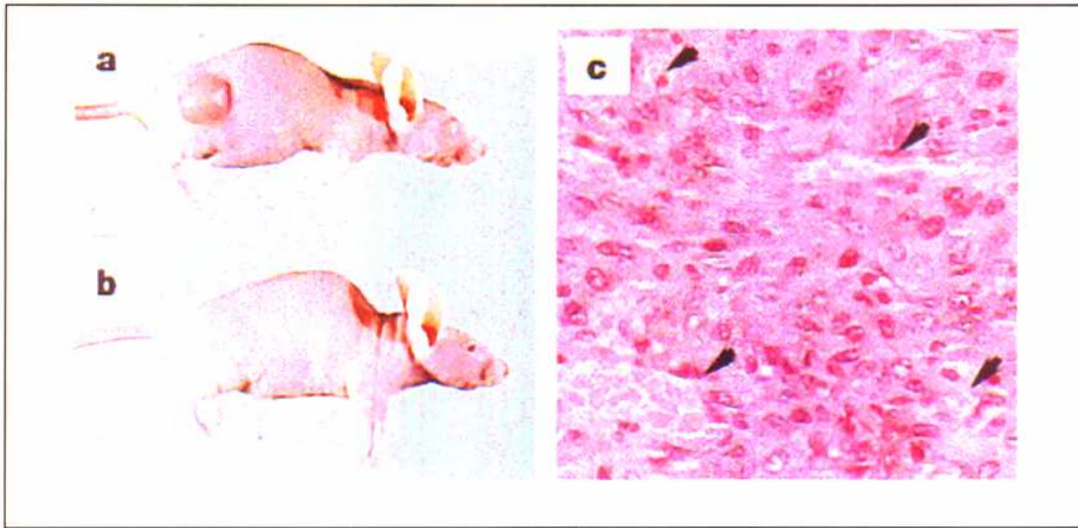
Otro criterio experimental ampliamente utilizado para determinar transformación celular es la capacidad de estas células para formar tumores en ratones desnudos. El ensayo de tumorigenicidad en ratones no es exactamente equivalente al ensayo de formación de focos por que la formación de tumores en ratones implica una serie de características fenotípicas mucho mas complejas que la ausencia de inhibición por contacto.

Los focos de células transformadas por KSHV-GPCR fueron aislados individualmente utilizando cilindros de clonado y las células fueron expandidas en presencia de G418 para luego ser inyectadas en los ratones. Como control se utilizaron células transfectadas con pCEFL y seleccionadas en G418.

Tres de los cuatro clones transformados expresando KSHV-GPCR dieron tumores en los ratones de aproximadamente 1.5 cm<sup>3</sup> entre 10 y 28 días después de su inyección. Por contraste no se observaron tumores cuando se inyectaron las células establemente transfectadas con pCEFL. (ver tabla 1 y figura 5)

Las células de los tumores fueron rescatadas y expandidas nuevamente en G418. Como se observa en la figura 6 estas células expresan altos niveles de ARNm de KSHV-GPCR y acumulan altos niveles de IP3 indicando que este receptor viral estaba bioquímicamente activo en las células tumorales.

Estos datos demuestran que KSHV-GPCR puede actuar potencialmente como un oncogen viral y que tiene la capacidad de activar vías de transducción de señales que participan en los procesos de transformación y tumorigenicidad.



**Figura 4: Las células NIH3T3 transformadas como consecuencia de la expresión de KSHV-GPCR son tumorigénicas en ratones desnudos.**

Aproximadamente 300.000 células /200ul PBS fueron inyectadas en el flanco de cada ratón. Fotografía tomada 10 días después de las inyecciones. **a** ratón inyectado con células provenientes de un foco de células transformadas, **b** ratón inyectado con células establemente transfectadas con el vector pCEFL, **c** Apariencia microscópica de un tumor teñido con H/E (X400). Las flechas indican la presencia de vasos.

<u>Plásmido</u>	<u>Colonias G418</u>	<u>Nro. de focos</u>	<u>Clones tumorigénicos</u>
<i>PCEFL</i>	3500	0	0/3
<i>pCEFL-KSHV-GPCR</i>	2800	400	3/4
<i>pCMV-M1 AchR</i>	3000	680	ND
<i>pCEFL-RasV12</i>	2500	2000	ND

**Tabla 1: Transformación celular y tumorigenicidad inducida por la expresión de KSHV-GPCR.** Las células NIH3T3 fueron transfectadas con 0,2 o 2ug de plásmido según se indica en la sección de métodos.

La eficiencia de transfección fue determinada plaqueando las células en presencia de G418 (750ug/ml) y contando el número de colonias resistentes.

La potencia oncogénica fue determinada transfectando las células con 0,2ug de plásmido. Los focos fueron contados tres semanas después de que las células llegaran a confluencia para los GPCRs y 10 días después para RasV12.

Los tumores se contabilizaron un mes después de haber inyectado las células NIH3T3 en los ratones desnudos. PCMV-M1 fue utilizado como un control positivo de un GPCR transformante (las células fueron cultivadas en presencia de 100uM de carbacol).

### **1.3) La expresión de KSHV-GPCR en NIH3T3 induce la secreción de factores pro-angiogénicos.**

KSHV-GPCR es sumamente homólogo al receptor de la quemoquina angiogénica IL-8 (Kolch 1992). Anteriormente se había demostrado que KSHV-GPCR estimula la transcripción a partir de un promotor regulado por secuencias AP-1 (Arvanitakis 1997) que son secuencias que típicamente regulan la expresión de numerosos factores angiogénicos (Kolch 1995)

Como se ha mencionado en la introducción (sección 1.1) una peculiaridad del SK es la intensa vascularización observada en las lesiones (lo cual es particularmente llamativo en el SK por que no se trata de un tumor sólido) y la activa proliferación de células endoteliales y de células de forma ahusada (supuestamente de origen endotelial). En este contexto es que decidimos investigar si la expresión de KSHV-GPCR en NIH3T3 podía inducir la secreción de factores pro-angiogénicos. En el corte histológico de los tumores inducidos por la expresión de KSHV-GPCR puede observarse (figura) que se trata de un típico fibrosarcoma, pero tiene la peculiaridad de que se encuentra intensamente vascularizado. Esta es una observación que podría ser relevante para nuestros estudios (el SK es básicamente un tumor vascular), pero dado que las células tumorales necesitan formar nuevos vasos para proliferar y no morir necrotizadas (ver sección.... de la introducción) existe una presión selectiva que favorece a las células capaces de inducir un switch angiogénico. No es posible a través del análisis histológico determinar si el switch angiogénico es una consecuencia directa de la expresión de KSHV-GPCR (previa a la inyección) o si por el contrario unas pocas células angiogénicas que no eran representativas de la población general y fueron seleccionadas y amplificadas después de ser inyectadas en el ratón.

Para discriminar entre estas dos hipótesis se diseñaron una serie de experimentos con el propósito de determinar el potencial angiogénico de KSHV-GPCR.

La línea celular NIH3T3 no induce estimulación parácrina de angiogénesis "in vitro" y ha sido previamente utilizada para estudiar el switch angiogénico causado activado por

oncogenes virales y humanos ( Grugel 1995, Sheibani 1996). De este modo decidimos testear la capacidad de los medios condicionados de las células transfectadas con KSHV-GPCR y los controles para inducir la angiogénesis “in vitro” y la proliferación de células endoteliales.

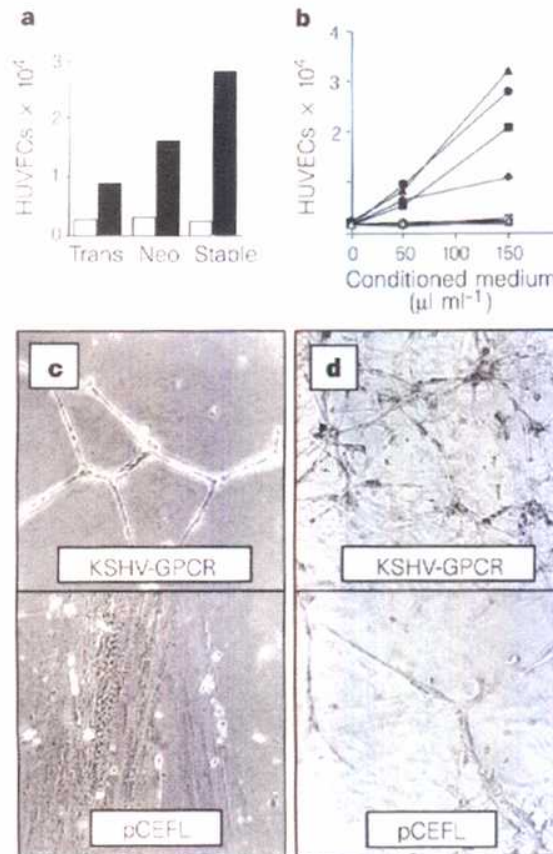
La figura.... muestra que únicamente los medios condicionados provenientes de células expresando KSHV-GPCR fueron capaces de inducir angiogénesis “in vitro” y la proliferación de células endoteliales ( Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs). Estos resultados indican que la expresión de KSHV-GPCR es suficiente para inducir un desbalance entre los activadores e inhibidores de la angiogenesis activando de este modo un switch angiogénico ( citar a folkman) que podría paracrina y/o autocrinamente incrementar la proliferación de celulas endoteliales y la formación de vasos.

#### **1.4) La activación angiogénica inducida por KSHV-GPCR está mediada por VEGF**

Uno de los principales inductores angiogénicos es el factor de crecimiento de endotelio vascular (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) (Ferrara 1996, Hanahan 1996) además VEGF es un factor de crecimiento para las células ahusadas del SK ( Cornalli 1996, Masood 1997, Nakamura 1997) y está transcripcionalmente regulado por secuencias AP-1 (Kolch 1995).

Por estos motivos sospechamos que una posibilidad era que KSHV-GPCR estuviera de algun modo incrementando los niveles deVEGF. Como se ve en el Northernblot de la figura... en las células expresando KSHV-GPCR los niveles de mensajero de VEGF estan incrementados de 5 a 8 veces cuando se los compara con los controles transfectados con pCEFL.

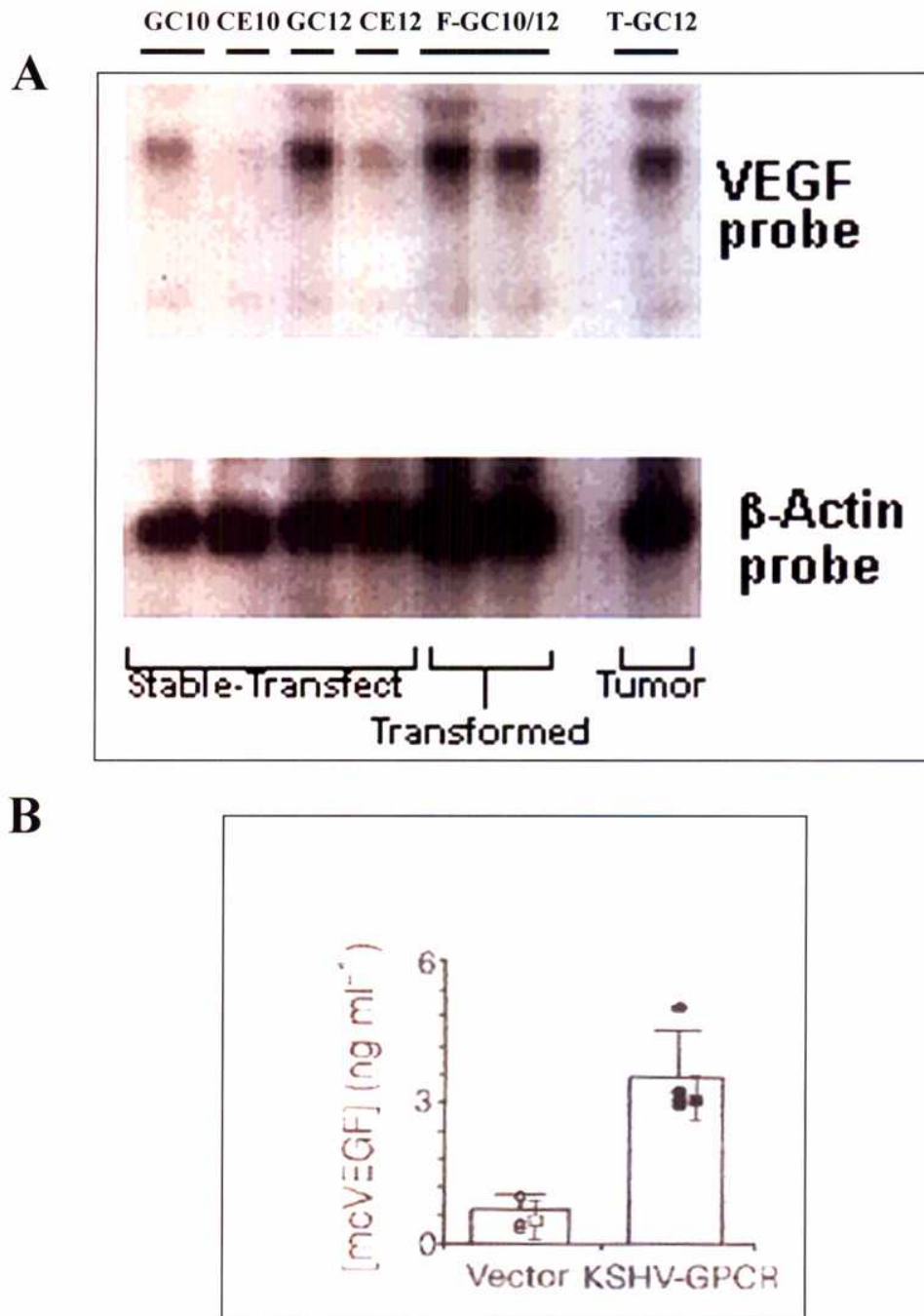
VEGF tiene muchos mecanismos de control post-transcripcionales por ello decidimos medir los niveles de VEGF de los medios condicionados por ELISA Como puede verse en



**Figura 4: El medio condicionado que proviene de las células NIH3T3 que expresan KSHV-GPCR contiene factores angiogénicos.**

*a y b estimación parácrina de células endoteliales (HUVECs). a Mitogenicidad de las células HUVECs en respuesta a medio condicionado proveniente de células transfectadas con KSHV-GPCR (barras negras) o con pCEFL (barras blancas). b Mitogenicidad en HUVECs inducida por los medios condicionados que provienen de distintos grupos de células transfectadas establemente con KSHV-GPCR (símbolos negros), pCEFL (símbolos blancos) o sin transfectar (triángulos blancos). Los datos experimentales son la media de dedeterminaciones hechas en duplicado en un experimento representativo. La desviación de los datos fue en todos los casos menor al 10%. c Formación de microvasculatura endotelial "in vitro" inducida por los medios condicionados de las células NIH 3T3 transfectadas. Las fotografías (X400, contraste de fase) muestran la apariencia de la superficie de matrigel 24hs después de haber plaqueado las células HUVECs en presencia de los diferentes medios condicionados. Note que la formación de "túbulos" interconectados solo aparece en las células que fueron incubadas con los medios condicionados de las células que expresaban KSHV-GPCR. d Formación de "microvasculatura in vitro" por co-incubación de HUVECs con células transfectadas. Las células transfectadas fueron mezcladas con el matrigel y las células HUVECs fueron plaqueadas arriba. Note el incremento de formación de "microtúbulos" y la invasión de la matriz tridimensional que ocurre en el experimento donde las HUVECs fueron mezcladas con las células NIH3T3 que expresaban KSHV-GPCR. Estas fotografías fueron tomadas 48hs después de el plaqueo (X100, contraste de fase)*





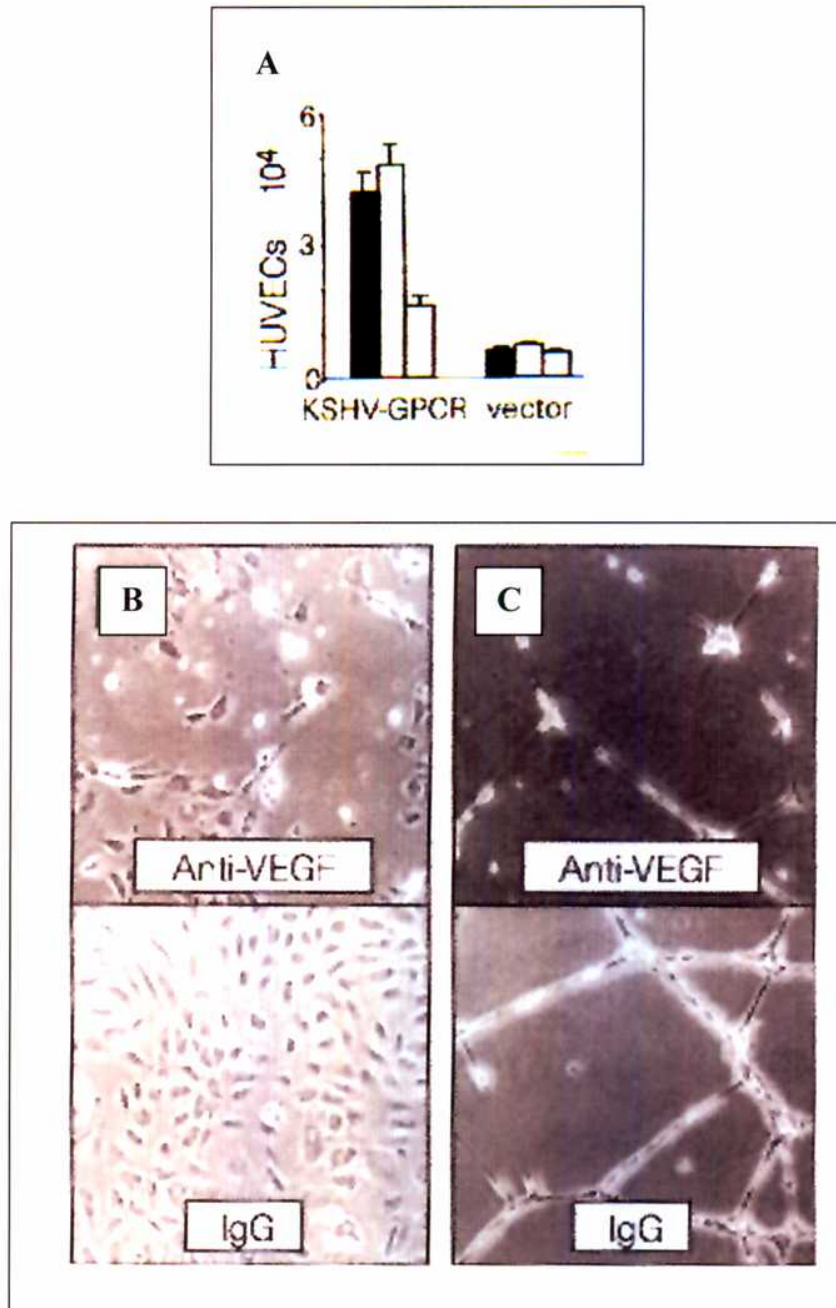
**Figura 5: La expresión de KSHV-GPCR en NIH3T3 incrementa los niveles de VEGF.**

**A** El northern blot de la figura muestra que los niveles de ARN mensajero de VEGF se encuentran incrementados en las células que expresan KSHV-GPCR; 10 y 12 son células seleccionadas independientemente y en paralelo, GC indica que el ARN proviene de células que expresan KSHV-GPCR, CE que el ARN proviene de células transfectadas con pCEFL, la letra F (F-GC) indica que las células provienen de focos transformados y la T (T-GC) que son células rescatadas del tumor de ratón. **B** El ELISA demuestra que los medios condicionados de las células que fueron transfectadas con KSHV-GPCR contienen altos niveles de VEGF, en negro se ilustran los niveles de VEGF para los medios que provienen de las células que fueron transfectadas con KSHV-GPCR, en blanco el de las células transfectadas con pCEFL. Los distintos medios condicionados provienen de células seleccionadas independientemente y en paralelo.

la figura... los niveles de VEGF son proporcionales al “poder mitogénico” de los medios condicionados ( $r=0.92$ ) sugiriendo que VEGF podría estar mediando estas respuestas.

Para testear esta hipótesis se preincubaron los diferentes medios condicionados con anticuerpos bloqueantes anti-VEGF o con anticuerpos anti-IgG como control. Como se puede ver en la figura... el anticuerpo anti-VEGF fue capaz de bloquear el efecto mitogénico y angiogénico de los medios condicionados provenientes de células que expresaban KSHV-GPCR.

Estos resultados indican que VEGF, uno de los más importantes factores implicados en las respuestas angiogénicas fisiológicas y patológicas, está mediando el switch angiogénico inducido por la expresión de KSHV-GPCR.



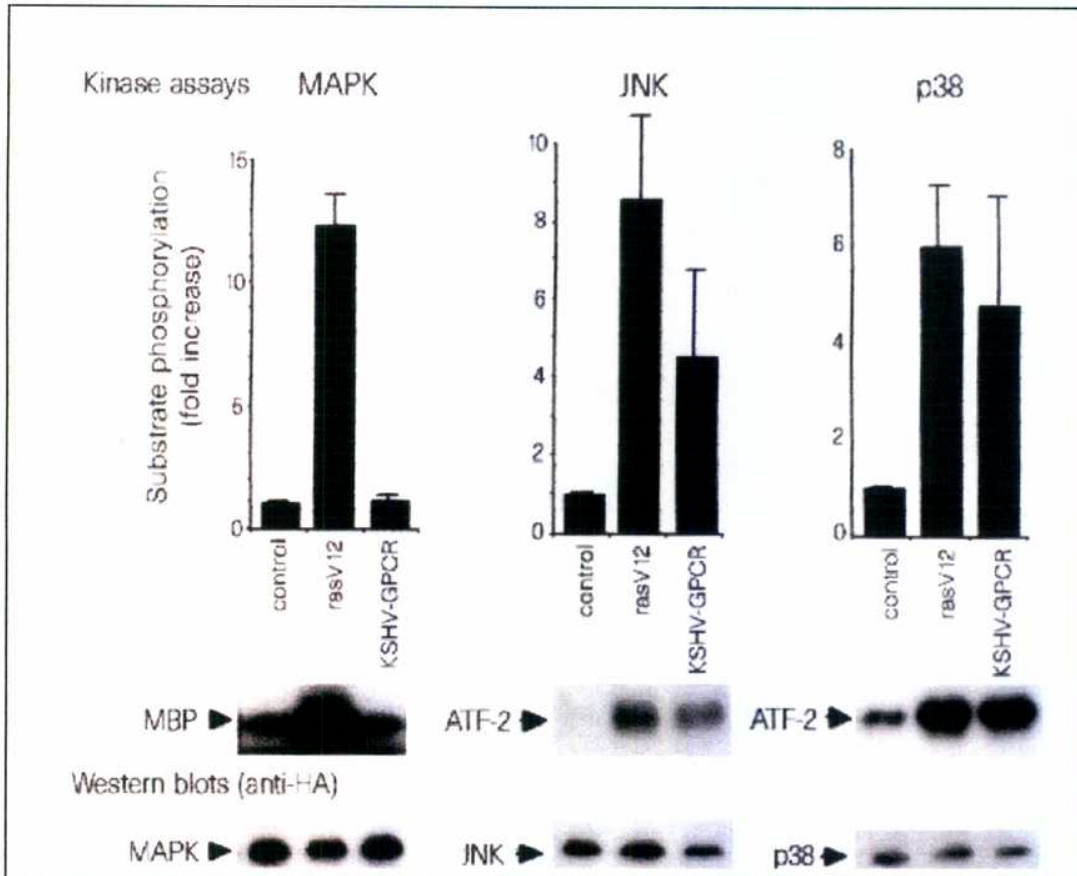
**Figura 6: La angiogenicidad inducida por KSHV-GPCR está mediada por VEGF.** Los medios condicionados de las células que expresan KSHV-GPCR fueron pre-incubados con anticuerpos bloqueantes anti-VEGF o anticuerpos IgG (control). Las figuras **A** (cuantitativa) y **B** muestran como el anticuerpo anti-VEGF bloquea específicamente la actividad mitogénica endotelial de los medios condicionados. **B** Las barras negras indican la proliferación inducida por la incubación de células endoteliales con medio condicionado, las barras blancas el poder mitogénico del mismo medio condicionado pretratado con anticuerpos anti IgG y las barras grises la mitogenicidad del mismo medio pre-incubado con anticuerpos anti-VEGF. **C** La pre-incubación de los medios condicionados provenientes de células que expresaban KSHV-GPCR con el anticuerpo anti-VEGF también bloquea específicamente la formación de estructuras "microvasculares in vitro". (la fotografía muestra la apariencia de los microtubulos después de 24hs de incubación; contraste de fase, X100).

## **2) Rol de la activación de las MAPKs en la transformación oncogénica inducida por la expresión de KSHV-GPCR.**

### **2.1) la expresión de KSHV-GPCR en HEK293T activa JNK/SAPK y p38 dos kinasas que típicamente transducen señales de tipo inflamatorio y de stress.**

Nuestros resultados sugieren que KSHV-GPCR es capaz de activar cascadas de señales que participan en procesos oncogénicos y angiogénicos.

Tres de las principales kinasas que son activadas durante el proceso de transducción de señales entre los receptores de membrana activados y el núcleo pertenecen a la familia de las MAPK. Las ERK/MAPK son activadas generalmente por estímulos mitogénicos (típicamente por receptores con actividad tirosina quinasa) (Robinson 1997), por otro lado JNK/SAPK (Derijard 1994, Sluss 1994) y p38MAPK (Freshney 1994, Rouse 1994) responden a otros tipos de estímulos como stress y citoquinas inflamatorias. (Davis 1994, Kyriakis 1996, Robinson 1997). Distintos GPCRs activan diferentes miembros de la familia de MAPKs y en particular se ha demostrado el rol de algunas de estas kinasas (ERK y JNK en particular) en el mecanismo de transformación oncogénica mediada por GPCRs ( ver por ej Gutkind 1998). Para investigar cuales eran las MAPK activadas por KSHV-GPCR co-expresamos este receptor viral con versiones tagueadas de ERK-2 (HA-ERK2), p38 (HA-p38) y JNK (HA-JNK) en la línea celular HEK 293T. Como puede observarse en la figura..... la expresión de KSHV-GPCR activó a JNK y a p38 pero no a ERK-2.



**Figura 7: La expresión de KSHV-GPCR en células HEK293T induce la activación de miembros de la superfamilia de MAPKs.** Las células HEK293T fueron co-transfectadas con 2ug de plásmido/placa de pCEFL-KSHV-GPCR o pCEFL (control) y uno de los siguientes vectores pCDNA3-HA-JNK, pCDNA3-HA-ERK-2 o pCEFL-p38 (1ug por placa). Como controles positivos las células fueron transfectadas con pCEFL-RasV12 (control para ERK-2) o estimuladas con Anisomicina (10ug/ml) para el control positivo de los experimentos de JNK y p38. Las reacciones del ensayo de quinasa fueron realizadas con los inmunoprecipitados anti-HA, ATP  $\gamma$  radioactivo y los sustratos específicos correspondientes. La figura ilustra los resultados de los ensayos de quinasa (autorradiografía) y el western-blot (anti-HA) de un experimento representativo. Los datos representan la media de tres experimentos independientes y la activación es respecto al control negativo (transfectado con pCEFL).

Este provocativo resultado es consistente con la idea de que la transducción de señales activada por KSHV-GPCR en las células infectadas por KSHV podría mimificar el efecto de las citoquinas inflamatorias que son angiogénicas y que además actúan como factores de crecimiento para las células B y células endoteliales y ahusadas del SK (introducción secciones 1.3 y 1.4 ).

## **2.2) Vías de transducción de señales activadas por KSHV-GPCR en NIH-3T3**

La observación de que la expresión de KSHV-GPCR en HEK293T podía activar vías de señales típicamente activadas por citoquinas inflamatorias dejaba abierta la posibilidad de que el mecanismo molecular por el cual este GPCR transformaba NIH3T3 fuera atípico (ERK independiente) y de que este oncogen constituyera un modelo para estudiar la conexión molecular entre inflamación y cancer.

Sin embargo no teníamos evidencia de que la activación de p38 y JNK estuviera causalmente relacionada con la transformación maligna inducida por la expresión de KSHV-GPCR en NIH3T3, además las vías de transducción de señales activadas por KSHV-GPCR en ambas líneas celulares (HEK293T y NIH3T3 ) no tienen por que ser necesariamente idénticas.

En un esfuerzo por tratar de comprender los mecanismos oncogénicos activados por este receptor decidimos utilizar NIH3T3 como modelo unificado en donde estudiar la transformación maligna y las vías de transducción de señales activadas por la expresión de KSHV-GPCR.

Uno de los problemas experimentales con los que nos encontramos es que como consecuencia de que KSHV-GPCR está constitutivamente activado los clones seleccionados en G418 (se tarda aprox. un mes en aislar clones establemente transfectados) podrían haber sufrido procesos estocásticos que alterasen las vías de transducción de señales activadas directamente y que estos cambios no reflejen las consecuencias de la expresión de KSHV-GPCR.

Por este motivo decidimos medir el efecto de la expresión transiente de KSHV-GPCR en NIH3T3.

Para ello volvimos a recurrir al sistema de co-transfección de KSHV-GPCR (o controles apropiados) y MAPKs tagueadas, pero esta vez las células fueron transfectadas con lipofectamina para aumentar la eficiencia de transfección en NIH3T3 (La eficiencia de transfección de estas células por el método de  $\text{CaCl}_2$  es muy baja).

Como puede observarse en la figura... la expresión transiente de KSHV-GPCR en estas células no parece estar activando ninguna de las tres quinasas estudiadas a pesar de que utilizando la misma metodología RasV12 (un mutante constitutivamente activado de Ras) activa a ERK-2 y anisomicina (un antibiótico que típicamente se utiliza como control positivo de activación de las vías de stress) activa a JNK y a p38.

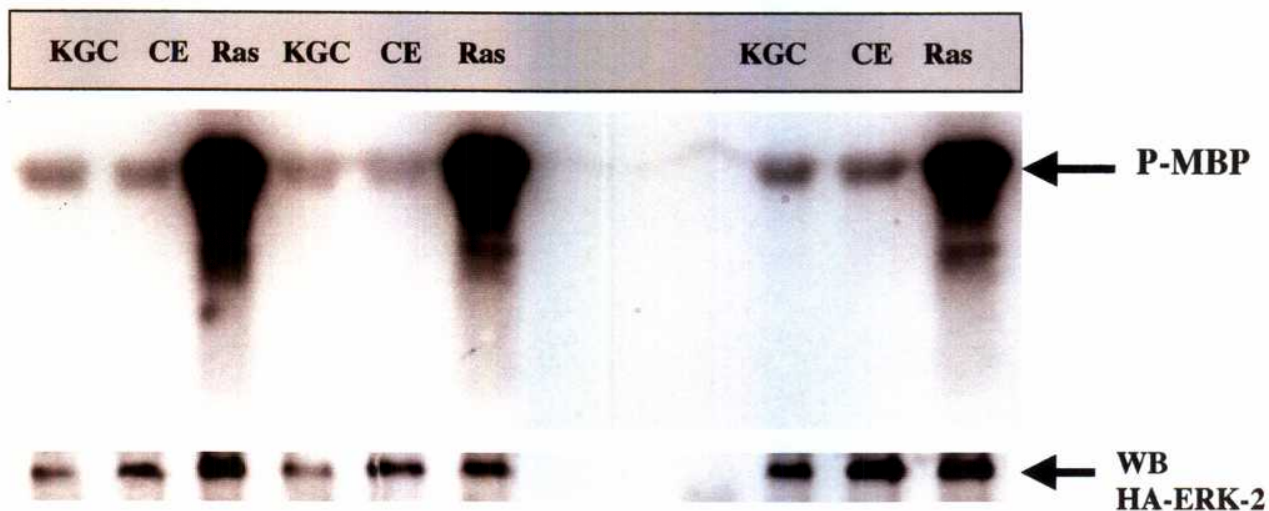
Estos resultados fueron repetidos consistentemente en numerosas ocasiones y en distintas condiciones experimentales.

Las MAPKs forman parte de un mecanismo agudo y rápido de respuesta a estímulos extracelulares. Usualmente los picos de activación son de entre 5 y 40 minutos después de la inducción del receptor por el ligando correspondiente. Numerosos trabajos demuestran como la activación de las MAPKs deja de ser evidente después de prolongadas estimulaciones con el ligando (Ver por ejemplo Coso et al.).

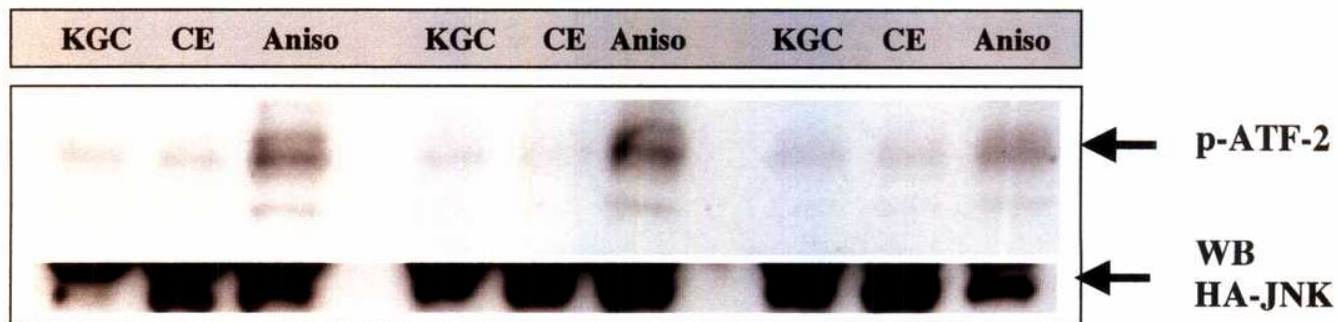
La activación constitutiva de un oncogen cuyo mecanismo de transformación involucra a las MAPKs no necesariamente implica la activación crónica de estas quinasas. De hecho utilizando M1 y su ligando carbacol (M1 es un GPCR ligando dependiente) pudimos reproducir en nuestro sistema los resultados de Coso et al. (datos no mostrados) y la activación de las MAPKs deja de ser evidente después de la exposición crónica de las células a carbacol (el ligando).

La explicación de por que KSHV-GPCR es capaz de activar "crónicamente" a las MAPK en HEK293T reside posiblemente en que estas células fueron transformadas con "large T" por lo cual amplifican dramáticamente el número de plásmidos con origen replicativo de SV40 (como pCEFL y pCDNA) por célula y posiblemente saturan rápidamente los mecanismos fisiológicos de control de la actividad de MAPKs, de hecho el mismo fenómeno se observa también en cuando se transfecta

A



B



**Figura...: Falta de evidencia de activación de las MAPKs en experimentos de expresión**

**transiente de KSHV-GPCR en NIH3T3.** A y B Triplicados de un experimento representativo de quinasas in vitro en ambos casos las versiones etiquetadas de las MAPKs fueron co-transfectadas con pCEFL (CE) como control negativo, un control positivo que fue pCEFL-RasV12 (Ras) para el experimento de activación de Erk, tratamiento de células transfectadas con pCEFL con anisomicina para el control positivo del experimento de JNK, o alternativamente transfectadas con pCEFL-KSHV-GPCR (KGC) 36hs después de la transfección las células fueron lisadas para luego realizar una inmunoprecipitación a partir de esos extractos con la que se realizaron los ensayos de Kinasa. **A.** Los extractos correspondientes fueron incubados en presencia de MBP (que es sustrato de ERK) y fosforo radioactivo de modo que la intensidad de las bandas de p-MBP es proporcional a la actividad de ERK-2. A pesar de que RasV12 activa potentemente la actividad de ERK no hay diferencias significativas entre KSHV-GPCR (KGC) y el control negativo **B** En este caso los extractos correspondientes son incubados con GST-ATF-2 que es sustrato de JNK y fosforo radioactivo, al igual que en el experimento de ERK, a pesar de que el control positivo valida el procedimiento experimental no se evidencian diferencias significativas entre KSHV-GPCR (KGC) y el control negativo.



KSHV-GPCR en la línea celular COS7 que también expresa “large T” (datos no mostrados).

A pesar de nuestra falla en detectar activación de MAPK en NIH3T3 este oncogen es capaz de producir transformación celular y secreción de VEGF en estas células. En ausencia de un ligando conocido capaz de super-activar a KSHV-GPCR agudamente decidimos intentar medir efectores río abajo de las MAPKs que fueran mas estables en el tiempo y que pudieran dar cuenta indirecta de la activación previa de estas quinasas. El “Serum Response Element o SRE” es una secuencia regulatoria de la transcripción que típicamente se encuentra presente en genes que se transcriben cuando la células se estimulan con suero (Treisman 1990 review) básicamente está regulado por dos factores de transcripción SRF (Norman 1988) que contiene el dominio que reconoce la secuencia canónica del SRE y el TCF (Ternary Complex Factor) formado por las proteínas Elk-1, SAP-1 y SAP-2 y que participan cooperativamente con SRF en el mecanismo de transactivación de los genes regulados por SRE. Los TCFs regulan la actividad del SRE en respuesta a MAPKs, en particular Elk-1 es fosforilado, y de este modo activado por ERK-1/2, p38 y JNK ( Treisman 1994.....citas p38 y JNK).

Para tratar de dilucidar si KSHV-GPCR activa las MAPKs en NIH3T3 decidimos hacer un ensayo reportero de la actividad de SRE-Luc como consecuencia de la expresión de este receptor viral.

En la figura .... Se muestra que KSHV-GPCR es capaz de activar el gen reportero de SRE casi tan potentemente como RasV12. Sin embargo este resultado no necesariamente implica activación de MAPKs por que existen evidencias de un mecanismo de activación de SRE por suero que es TCF independiente (Hill C.S., 1995) y que esta mediado por la activación de SRF por GTPasas de la familia de Rho.

Para determinar si el mecanismo de activación involucraba la fosforilación de Elk-1 por alguna de las MAPKs se realizó un experimento con un sistema “reportero en trans” de la actividad de Elk-1 (ver figura).

De este modo se demostró que KSHV-GPCR es capaz de activar “in vivo” a las MAPKs dado que Elk-1 se activa en presencia de este receptor. Como Elk-1 es sustrato de Erk,

p38 y JNK no es posible determinar cuales de estas quinasas resultan individualmente activadas por la expresión de KSHV-GPCR en NIH3T3.

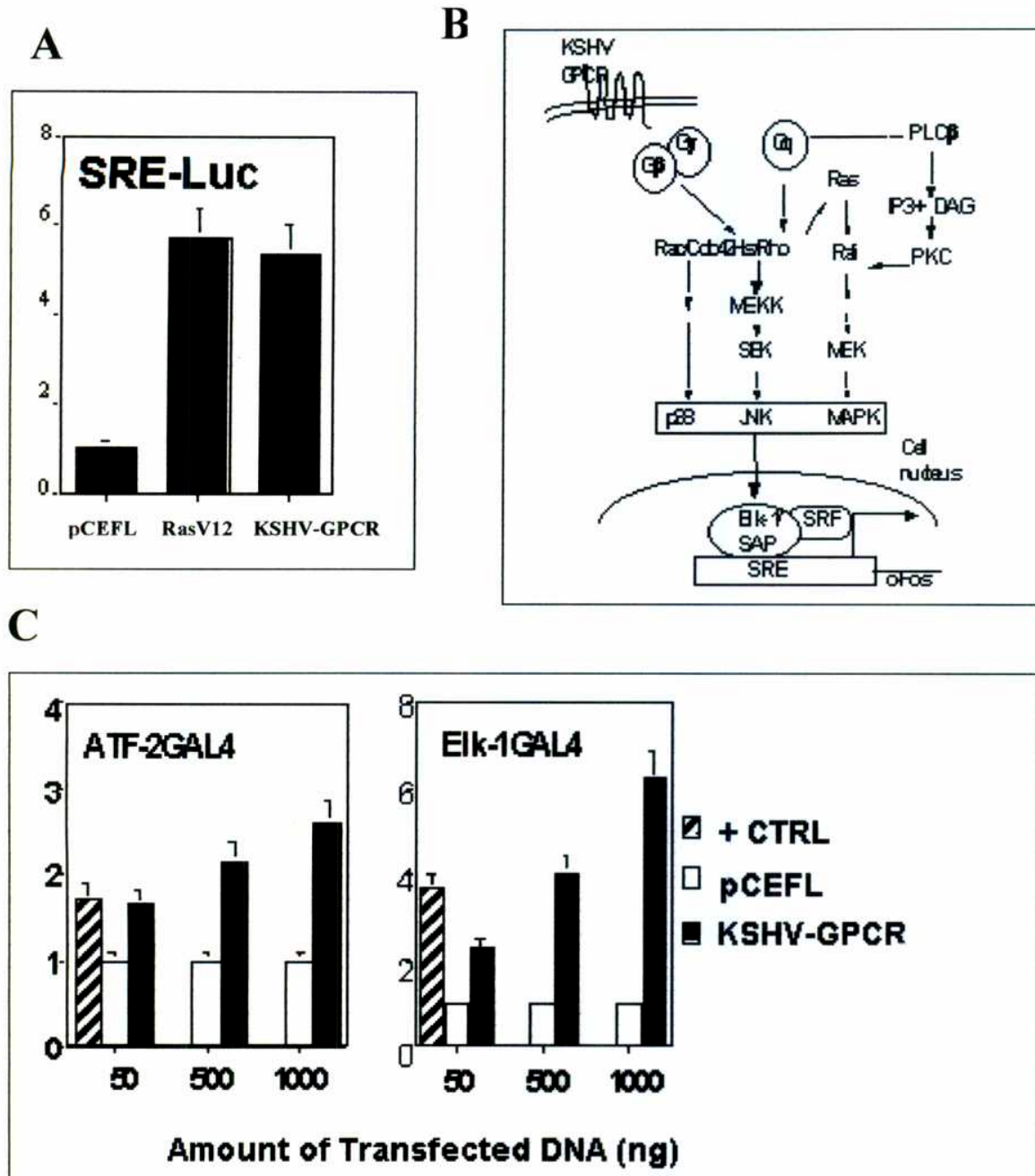
ATF-2 es un factor de transcripción que es fosforilado específicamente por p38 y JNK, pero no por ERK (cit. ....), para determinar si estas dos quinasas resultaban activadas en NIH3T3 como consecuencia de la expresión de KSHV-GPCR se midió la activación de ATF-2 utilizando nuevamente un sistema reportero en trans. Como se puede ver en la figura KSHV-GPCR “fosforila” a ATF-2 en forma dosis dependiente indicando que KSHV-GPCR es capaz de activar a JNK y/o p38 en NIH3T3.

En síntesis estos resultados demuestran que las MAPKs resultan activadas como consecuencia de la expresión de KSHV-GPCR en NIH3T3, además el resultado de activación de ATF-2 indica que las vías de transducción de señales de tipo inflamatoria (JNK o p38 o ambas enzimas) están activadas en estas células.

No es posible determinar por estos experimentos si ERK-1/2 resulta activada o no.

Para intentar disecar las vías de transducción de señales involucradas en la activación de Elk-1 y ATF-2 por KSHV-GPCR decidimos cotransfectar dominantes negativos que fueran capaces de bloquear específicamente estas vías de transducción. Como puede verse en la figura... La interpretación de estos resultados es sumamente compleja. En parte ello se debe a que los dominantes negativos afectan dramáticamente los niveles basales del promotor de CMV que controla (entre otros) la expresión del vector pCDNAIII/Gal-4-Elk-1 (o Gal-4-ATF-2); los niveles de expresión basales de estos factores de transcripción quiméricos tienen que ser muy bajos en este tipo de experimentos (se transfectan 50ng de estos vectores) por que si no la transcripción del minigen Gal4RE-LUC es constitutiva y se independiza de la activación por fosforilación de la quimera.

A pesar de que los resultados son sumamente reproducibles, no pudimos ver efectos de los dominantes negativos que fueran realmente específicos y/o que resistieran los controles apropiados.



**Figur 8: KSHV-GPCR activa MAPKs en NIH3T3.** *A* La activación de un gen reportero de SRE indica que las MAPKs podrían ser activadas por KSHV-GPCR. *B* en la figura se ilustran las vías de activación de SRE que pueden activar al factor transcripcional MAPK/Elk dependientes. También las secuencias SRE puede ser activadas transcripcionalmente por un mecanismo MAPK/ELK independiente que es regulado por la vía de Rho/SRF. *C* experimentos realizados con sistemas trans-reporteros (sistema de un híbrido Gal4/dominio de transactivación de interés) indican que Elk es fosforilado demostrando que KSHV-GPCR activa SRE por un mecanismo MAPK dependiente. A la izquierda de la misma figura puede observarse que KSHV-GPCR también activa ATF-2 un factor transcripcional que es sustrato de p38 y JNK.

### **2.3) Vías de transducción de señales implicadas en la transformación oncogénica inducida por la expresión de KSHV-GPCR.**

Para investigar el rol de las distintas MAPKs en la transformación maligna inducida por la expresión de KSHV-GPCR decidimos recurrir nuevamente al ensayo de FFA y co-expresar dominantes negativos capaces de bloquear específicamente las vías de activación de ERK-1/2 (Raf301), JNK (SEK1) o p38 (SB415286, o MEK1/2). (citados...)

Estas quinasas cumplen funciones regulatorias fundamentales en el ciclo celular por lo tanto la sobreexpresión de un dominante negativo que bloquee completamente uno de estos caminos pueden afectar aspectos centrales de la fisiología celular (como la entrada o salida de G1 por ejemplo) lo cual modificaría inespecíficamente la habilidad de las células para transformarse independientemente de que si esa vía de transducción resulte activada o no por la expresión de KSHV-GPCR.

Por otro lado la sobreexpresión de un dominante negativo puede forzar interacciones moleculares inespecíficas con proteínas que son miembros de otras cascadas de transducción de señales. Además las vías de transducción de señales no son estrictamente paralelas y existe considerable “cross talk” entre ellas.

De alguna manera la concepción de este experimento es farmacológica en el sentido de que las “dosis” ( los niveles de expresión) determinan la especificidad del dominante negativo. Por otro lado hacen falta también controles estrictos para determinar que a las dosis utilizadas la potencia oncogénica de otros oncogenes que transforman utilizando distintas vías de transducción de señales no se vea significativamente afectada y adicionalmente hay que controlar el efecto de “cross talk” entre distintas vías.

En la figura ..... se ilustran varios de los experimentos que se hicieron para tratar de entender cuales eran las vías de señales que mediaban el mecanismo de transformación por KSHV-GPCR.

En la figura se muestra un experimento representativo en el que cada transfección fue realizada independientemente y por triplicado. Estos resultados sugieren fuertemente un rol central de la activación de p38 y JNK en el mecanismo de transformación activada por KSHV-GPCR y un rol menor de ERK-1/2 en este proceso.

Estos resultados son novedosos por que sugieren por primera vez que en determinados contextos p38 puede tener un rol clave en ciertos procesos oncogénicos ilustrando una conexión molecular por el cual cancer e inflamación pueden estar relacionados y sugiriendo que podría ser el blanco molecular de ciertas drogas anti-inflamatorias que tienen efectos anticancerígenos. (citas.....).

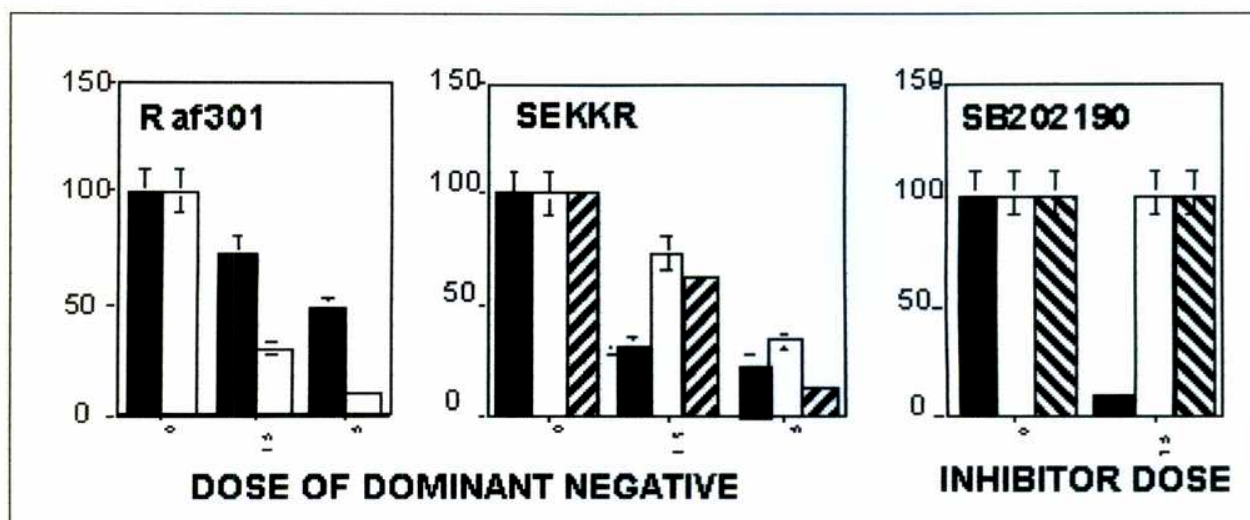
Sin embargo nuevamente la interpretación de estos experimentos no es inequívoca. Dada la complejidad y el tamaño del experimento no fue posible comparar los niveles de expresión relativa de los distintos vectores en los distintos experimentos.

Usualmente los resultados del FFA son sumamente reproducibles de modo tal que una cantidad determinada de plásmido (por ejemplo de pCEFL-KSHV-GPCR) produce un número determinado y bastante preciso de focos (que es lo que en estos experimentos se definió como 100%). Sin embargo este no fue el caso con las inhibiciones donde ,a pesar de que las tendencias se mantuvieron, los porcentajes de inhibición variaban considerablemente entre diferentes experimentos.

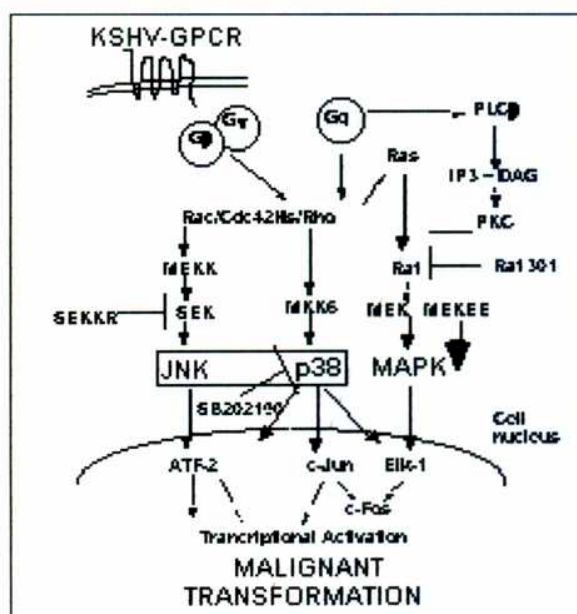
El experimento con el inhibidor de p38 se repitió en cuatro ocasiones y en una de ella no hubo efecto alguno de esta droga. A si mismo en un experimento aislado Raf301 fue incapaz de inhibir la transformación por RasV12.

Las razones para esta variabilidad se desconocen.

A



B



**Figura 9: Dominantes negativos de las vías de MAPKs Inhiben la transformación oncogén inducida por la expresión de KSHV-GPCR. A** Las células NIH3T3 fueron transfectadas con 0,5ug pCEFL-KSHV-GPCR (barras negras), 0,05ug de pCEFL-RasV12 (barras blancas) o 0,5ug de pCEFL-ME1 (barras con líneas diagonales grises) tratadas o no con el inhibidor farmacológico de p38 (SB202190) o co transfectadas con estos plásmidos y las cantidades indicadas en el gráfico de plásmidos codificantes para dominantes negativos. La cantidad de ADN total transfectada en cada experimento fue normalizada (25ug). Los focos producidos por expresión de RasV12 y MEKE fueron analizados 10 días después de que las células llegaran a confluencia, los focos inducidos por expresión de KSHV-GPCR fueron evaluados el día 21. **B** Representación esquemática de las conclusiones del experimento de la figura A.

### 3) KSHV-GPCR inmortaliza células primarias endoteliales humanas.

#### 3.1) Eficiente transducción de endotelio con retrovirus anfortrópicos reporteros

Si bien los mecanismos de transducción de señales están conservados entre las células de mamíferos es evidente que el mismo receptor expresado en distintas células y contextos celulares puede tener consecuencias bioquímicas y biológicas diferentes. Un claro ejemplo de ello es que en HEK293T KSHV-GPCR activa a p38 y JNK pero no a ERK-2 (ver figura.....), mientras que en COS7 activa ERK-1/2 y p38 pero no JNK (datos no mostrados). Adicionalmente la sobre-expresión de este receptor induce apoptosis (data not shown, Ganhem y Ethel Cesarman comunicación personal) en COS7, HEK293T y en linfocitos mientras que en NIH3T3 induce transformación (Bais et al 1998) y en ~~RAT-1~~<sup>NRK</sup> proliferación celular. (Arvanitakis et al 1997)

A pesar de que el modelo de NIH3T3 nos permitió mostrar algunos aspectos interesantes sobre las potenciales consecuencias biológicas de la expresión de KSHV-GPCR, este virus (KSHV) no infecta fibroblastos, ni células de ratón. Además para evaluar el posible efecto inmortalizante de este oncogen viral <sup>es</sup> necesario expresarlo en células primarias

Las células endoteliales juegan un rol central en la etiopatogénesis del SK. No solo son un componente importante de las lesiones, si no que también hay evidencias que sugieren que son las precursoras de las células ahusadas del SK (ver sección 1.2 de la introducción). Además como KSHV infecta células endoteliales y ahusadas, "in vivo" KSHV-GPCR se expresa en estos tipos celulares.

Por este motivo es que decidimos estudiar las consecuencias de la expresión de KSHV-GPCR en células endoteliales primarias humanas HUVECs (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*).

3

2

1

4

Cupar  
con  
esto

Simplifica este frase ... *↓ eficiencia*

Uno de los problemas a los que nos enfrentamos es la baja eficiencia y poca reproducibilidad de las transfecciones en HUVECs ( en parte debido a que el origen de las células es distinto en cada experimento). Si bien logramos transfectar células con una eficiencia variable de entre el 5 y el 20% (datos no mostrados) esto solamente era posible en pasajes muy tempranos. Además esta metodología, como consecuencia de la baja eficiencia del proceso de integración de plásmidos y del limitado número de pasajes en el que pueden vivir y seleccionarse las células primarias "in vitro", no nos permitía aislar y estudiar la biología de las células establemente transfectadas.

Una de las estrategias alternativas con la que se nos ocurrió que podíamos solucionar estos problemas experimentales es con la utilización de retrovirus recombinantes que codifiquen para KSHV-GPCR. La gran ventaja de los retrovirus para estudiar células primarias es su altísima eficiencia de transducción en células replicativas (por ejemplo se pueden transducir NIH3T3 con 100% de eficiencia). Además dado que estos virus son integrativos se pueden crear líneas celulares en cuestiones de días. *Directa infección de las células!* *(Figura)*

Para poner a punto el sistema de empaquetamiento de modo tal de obtener altos títulos virales y para usar como vector control en estos experimentos (ver figura), se utilizaron constructos reporteros que nos permitieran calcular fácilmente los títulos virales y que pudieran ser utilizados como control; el sitio múltiple de clonado del vector pLNCX se modificó como se indica en la parte de métodos creando pLNCX2 (pRVC) para luego subclonar EGFP (pRVC-EGFP) o alcalina fosfatasa ( pRVC-AP).

Sobrenadantes con altos títulos virales fueron obtenidos como se indica en las sección de métodos y las células endoteliales fueron infectadas con estos retrovirus reporteros, 48 hs después de ser transducidas las células fueron observadas al microscopio de fluorescencia (EGFP) o fijadas y teñidas(AP).

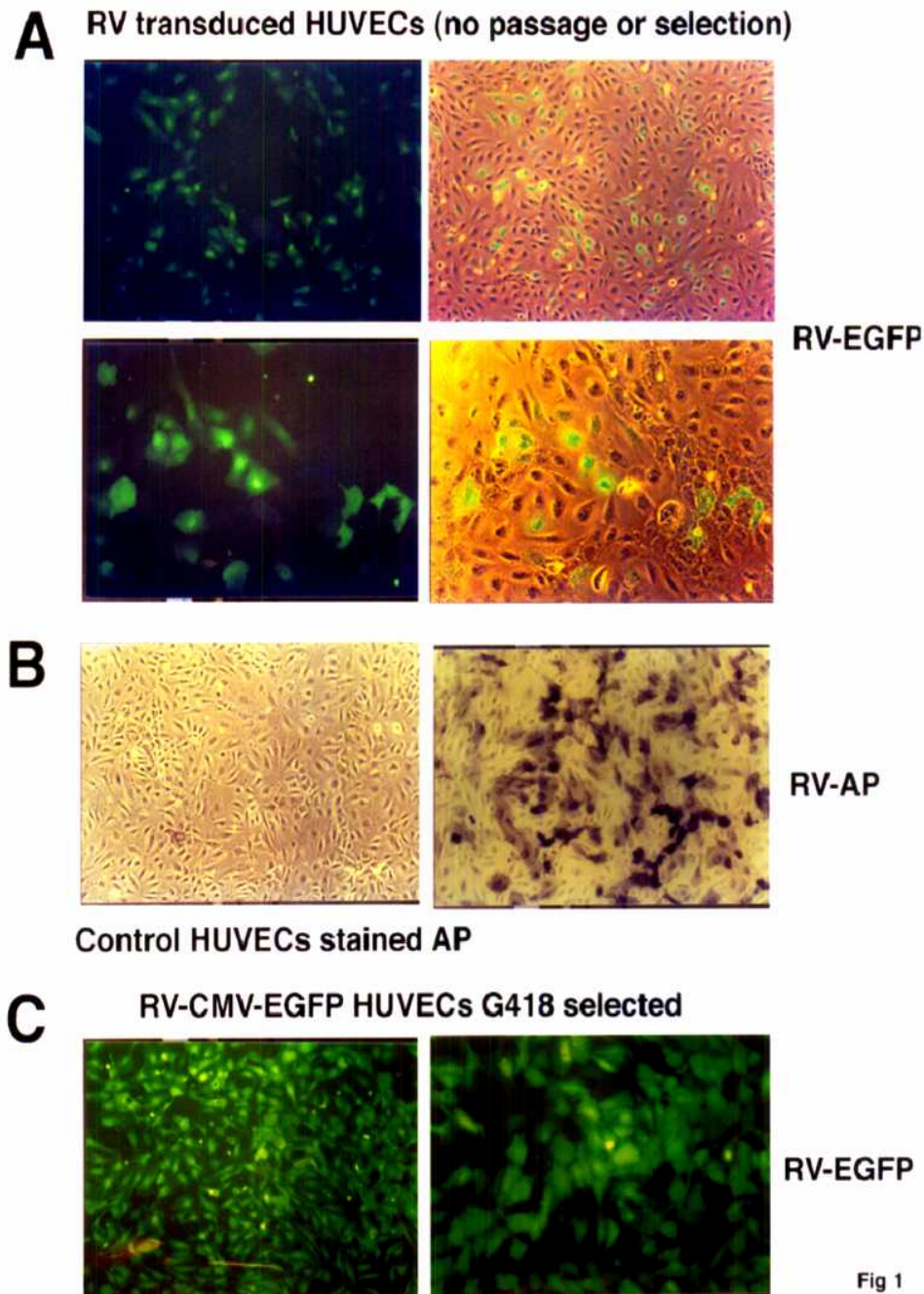
Luego las células "infectadas" fueron seleccionadas en G418 (400ug/ml) masivamente de modo que nunca fueron clonadas (se trata de poblaciones "heterogeneas"). Seis días después del inicio de la selección las células no transducidas murieron y el 100% de la población G418 resistente transducida con pRVC-EGFP expresaba EGFP.(ver figura).

Los títulos de los retrovirus recombinantes pueden variar drásticamente entre distintos constructos por ello se "tagueo" a KSHV-GPCR (HA-KSHVGPCR) en la parte N-terminal (dominio extracelular) de modo tal de que se pudieran calcular los títulos(ver

*transición*

*dominio*  
*que se*  
*para*  
*hacer*  
*biología*  
*de EC*





**Figura.: Transducción de células endoteliales primarias humanas (HUVECs) con retrovirus recombinantes:** *A* Eficiencia de de transducción de células HUVECs con un virus recombinante que codifica para EGFP, notese la integridad de las células endoteliales después de la infección. *B* HUVECs transducidas con un retrovirus que codifica para alcalina fosfatasa (AP), una ventaja de este retrovirus reportero es la sensibilidad de la reacción enzimática de AP. *C* Después de seis días de selección en G418 (400ug/ml) las células HUVECs no transducidas murieron y el 100% de las células resistentes eran verdes bajo el microscopio de UV.

métodos) de los retrovirus recombinantes que codifican para HA- KSHV-GPCR (pRVC-HA-KSHV-GPCR) utilizando FACS (Fluorescence activated cell sorted) o inmunohistoquímica..

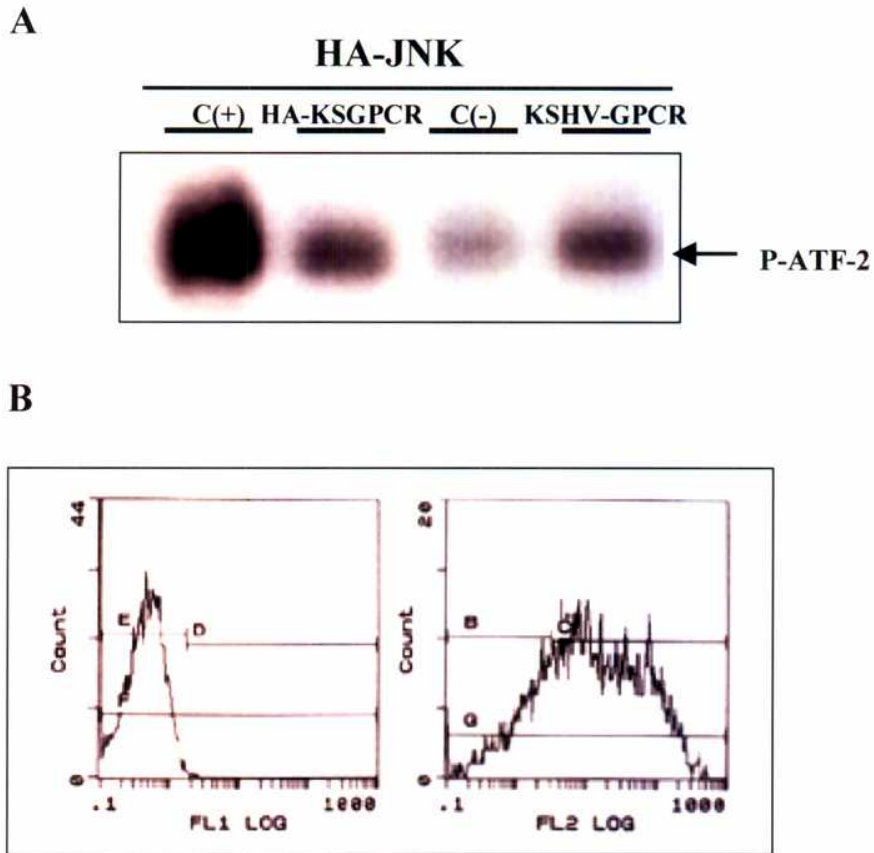
### **3.1) Caracterización de la nueva proteína de fusión HA-KSHV-GPCR**

Para testear que la proteína HA-KSHV-GPCR fuera funcional se transfectaron HEK293 con el vector pCEFL-HA-KSHV-GPCR o con los vectores control pCEFL-KSHV-GPCR, pCEFL o pCEFL-HA-ERK-2. Las células se incubaron con un primer anticuerpo anti HA11 y se “tiñeron” utilizando un segundo anticuerpo acoplado a un fluorocromo (FITC). Como se observa en la figura únicamente las células transfectadas con pCEFL-HA-KSHV-GPCR resultan positivas en el FACS indicando que la proteína esta correctamente localizada en la membrana plasmática (notar que HA-ERK que es intracelular es negativa). en paralelo y para testear funcionalidad se hizo un ensayo de quinasas in vitro donde se midió la habilidad de HA-KSHV-GPCR <sup>de</sup> activar <sup>de</sup> JNK en HEK293T ( recordar que KSHV-GPCR activa a JNK en este sistema, figura 7 y Bais et al. 1998). Como se observa en la figura... los niveles de activación de JNK por KSHV-GPCR o por HA-KSHV-GPCR son prácticamente idénticos. Estos resultados indican el agregado N-terminal del epítopo HA permite detectar la expresión de KSHV-GPCR sin alterar la localización ni las propiedades funcionales de este receptor.

### **3.1) Transducción de endotelio utilizando el retrovirus anfotrópico recombinante pRVC-HA-KSHV-GPCR.**

Con el proposito de transducir células endoteliales se utilizó el vector pRVC-HA-KSHV-GPCR para generar retrovirus recombinantes que codificaran para este receptor viral.

Sobrenadantes con altos títulos virales (ver métodos) se utilizaron par infectar células endoteliales con virus codificantes para KSHV-GPCR (o EGFP como control), la



**Figura..... El agregado N-terminal del “tag de HA” a la secuencia del KSHV-GPCR permite detectar la expresión de esta proteína viral sin alterar sus propiedades funcionales.**

**A** El ensayo de quinasas *in vitro* en HEK293T demuestra que la versión de KSHV-GPCR “taguada” es funcional ya que ambas versiones de esta proteína viral activan JNK. Brevemente, los vectores pCEFL-KSHV-GPCR o pCEFL-HAKSHV-GPCR o pCEFL fueron co-transfectados con el vector pCEFL-HA-JNK, 36hs después de la transfección las células fueron lisadas e inmunoprecipitadas con un anticuerpo HA para luego ser incubadas con un sustrato de JNK ( ATF-2) y ATP- $\gamma$  radioactivo, de este modo el grado de fosforilación de ATF-2 es proporcional al nivel de activación de HA-JNK. El c(+) de este experimento son células transfectadas con pCEFL y tratadas con anisomicina 20’ antes de la lisis. **B** El análisis de FACS demuestra que la proteína de fusión se expresa, se localiza correctamente en la membrana plasmática y que es reconocible por anticuerpos anti-HA. En breve; las células HEK293T transfectadas con pCEFL o pCEFL-RasV12 o pCEFL-HA-GPCR, 36hs después de la transfección las células fueron teñidas con un primer anticuerpo anti-HA y posteriormente con un segundo anticuerpo acoplado a un fluorocromo (FITC), luego las muestras fueron procesadas en un FACS. Como se observa en la figura **B** a la izquierda las células que expresan HA-RASV12, C(-), no son fluorescentes (E) debido a la localización citoplasmática de esta proteína (las células transfectadas con pCEFL son igualmente negativas pero no se muestran en la figura), en contraste (a la derecha) las células que expresan KSHV-GPCR son positivas (c) en el FACS indicando que esta proteína de fusión no solo se expresa si no que se localiza correctamente en la membrana.

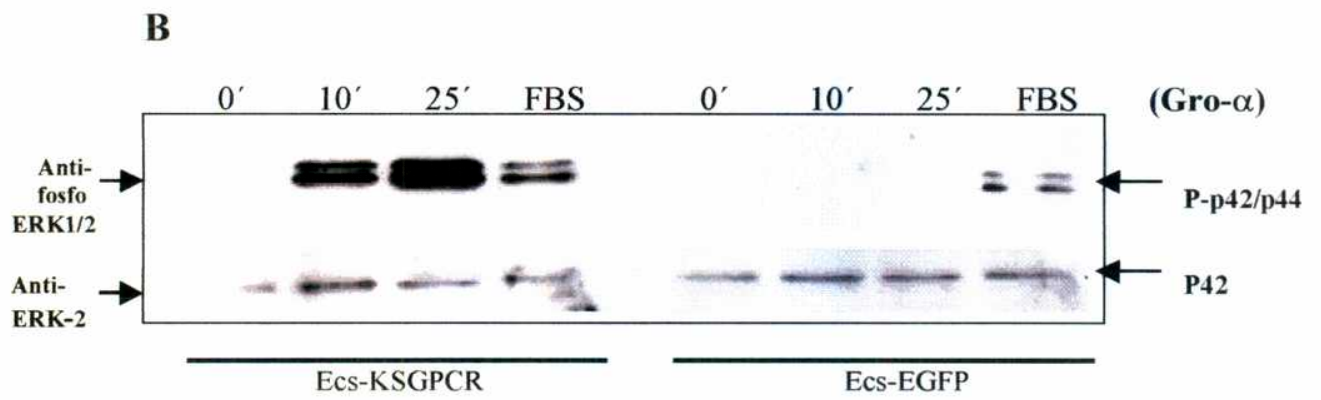


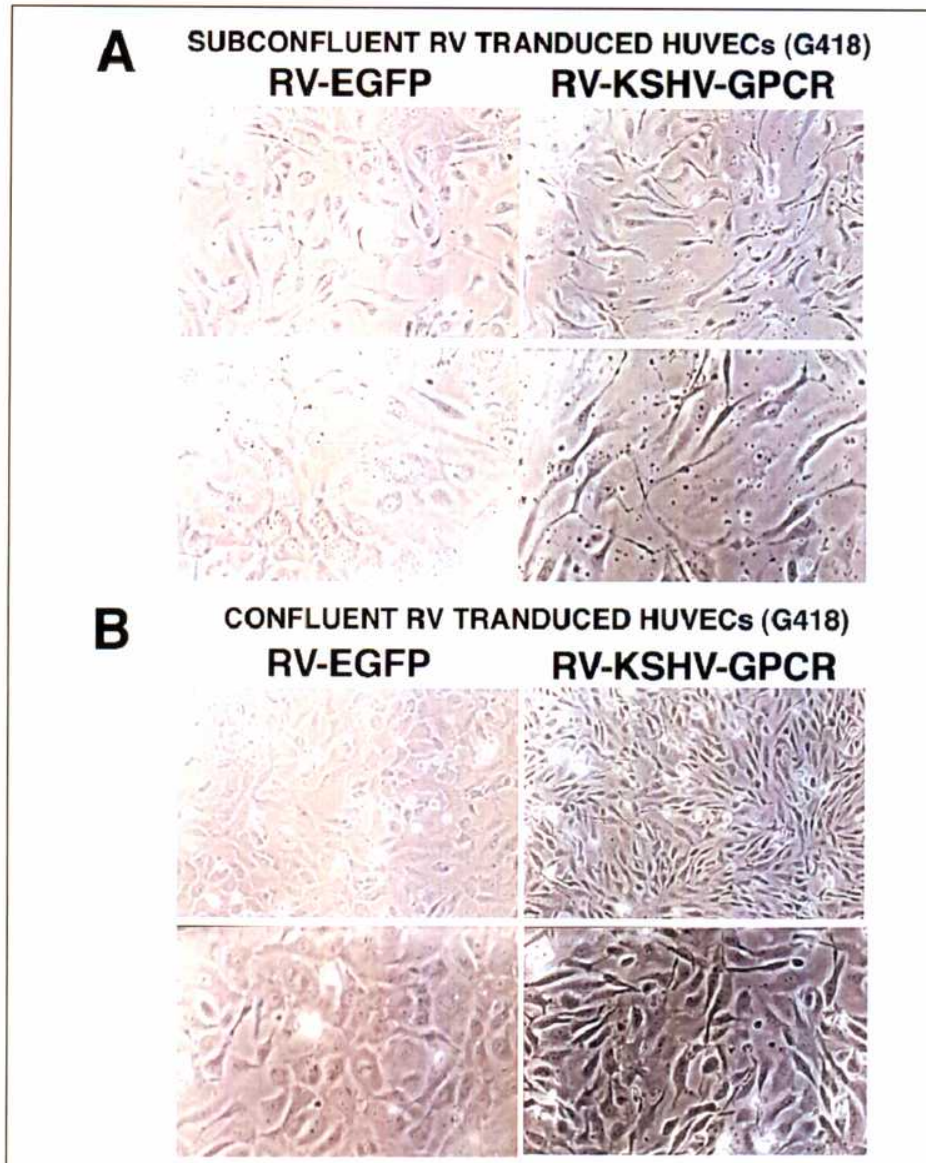
Fig A) Ha inmunohistoquímica de las Ecs-KSGPCR y figura B

inmunohistoquímica realizada con anticuerpos anti-HA muestra que las células transducidas expresan eficientemente la proteína HA-KSHV-GPCR. (ver figura...) Durante el transcurso de esta tesis dos grupos que trabajan con KSHV-GPCR han descubierto independientemente que Gro- $\alpha$  es capaz de actuar como un super-agonista para este receptor (es capaz de estimular la actividad de este receptor mas alla de su nivel constitutivo) y que IP10 actúa como un agonista inverso al inhibir reversiblemente la actividad basal de KSHV-GPCR (citas...).

Decidimos utilizar Gro- $\alpha$  como superagonista, para estimular agudamente a KSHV-GPCR (recordar la discusión de la sección 2.2) y determinar si en las células endoteliales que fueron transducidas y seleccionadas en G418 (Ecs-KSGPCR), este receptor era bioquímicamente funcional. Para ello se midió el nivel de activación de MAPKs después de estimular estas células con Gro- $\alpha$ . Como ilustra la figura... Gro- $\alpha$  activa ERK1/2 específicamente en las células que expresan KSHV-GPCR y no en las células endoteliales control. Estos resultados demuestran por primera vez que KSHV-GPCR es bioquímicamente funcional en células endoteliales humanas y que potencialmente es capaz de reclutar a la vía de ERK que está implicada en la regulación de la proliferación, la transformación y la supervivencia celular.

### **3.2) La expresión de KSHV-GPCR en HUVECs (Ecs-KSGPCR) induce cambios dramáticos en la morfología endotelial, la estructura del citoesqueleto y la secreción de metaloproteasas.**

Como puede verse en la figura... las células transducidas con pRVC-KSHV-GPCR muestran un sorprendente cambio fenotípico. A baja densidad son mucho mas refringentes y "dendríticas" que las células expresando EGFP o las HUVECs sin transducir. Una característica de las células endoteliales es que en confluencia forman un "empedrado" (*Cobblestone*) donde cada célula está extendida y unida estrechamente a las células mas próximas, como se observa en la figura las HV-KSGPCR no se unen estrechamente en confluencia y presentan una apariencia mucho mas refringente y "ahusada". Parte de este fenotipo podría ser explicado por la ausencia de expresión de



**Figura...: La expresión de KSHV-GPCR en células endoteliales humanas induce drásticos cambios fenotípicos.**

*A* A baja densidad las células transducidas con el retrovirus codificante para KSHV-GPCR son más refringentes, ahusadas y “dendríticas” que las células endoteliales transducidas con el virus codificante para EGFP (a la izquierda) o HUVECs sin transducir (no mostrado). *B* a la izquierda puede observarse que las células HUVECs transducidas con el RVC-EGFP forman el empedrado (cobblestone) característico de las células endoteliales en confluencia, note la forma chata de las células y la unión estrecha entre las células, en contraste las células transducidas con el virus RVC-HA-KS-GPCR son refringentes y no forman uniones estrechas entre sí, observe también en la fotografía de abajo a la derecha (X400) la tendencia a crecer unas por sobre otras que no se observa en las células endoteliales transducidas con RVC-EGFP (abajo a la izquierda) o en las células endoteliales no transducidas (dato no mostrado).

Una característica de las células endoteliales es que en confluencia forman un "empedrado" (*Cobblestone*) donde cada célula está extendida y unida estrechamente a las células más próximas, como se observa en la figura las HV-KSGPCR no se unen estrechamente en confluencia y presentan una apariencia mucho más refringente y "ahusada". Parte de este fenotipo podría ser explicado por la ausencia de expresión de VE-Cadherina que se observa en las HV-KSGPCR (ver figura...) que esta involucrada en las uniones adherentes entre células endoteliales. Dado que la morfología "dendrítica" es reminiscente del fenotipo quimotáctico e invasivo de las células endoteliales se decidió teñir las células con alexa-faloidina para observar los cambios en la organización de la actina. La figura ..... ilustra los dramáticos cambios en la organización del citoesqueleto que se producen como consecuencia de la expresión de KSHV-GPCR.

Como se ha indicado en la sección... otra de las características de las células transformadas es la sobre-expresión/secreción de metaloproteasas al medio ( fenotipos invasivos) como se puede ver en la figura.... las células HV-KSGPCR secretan grandes cantidades de metaloproteasas cuando se las compara con HV-EGFP.

Estos resultados indican que la expresión de KSHV-GPCR en células endoteliales es capaz de inducir dramáticos cambios morfológicos que son reminiscentes al fenotipo transformado.

### **3.3) KSHV-GPCR induce resistencia a la *apoptosis por privación de suero* en células endoteliales a través de la activación de la vía PI3K/Akt.**

Uno de los fenotipos más evidentes de las células ECs-KSGPCR es su capacidad para sobrevivir durante largos períodos en medio sin suero. Como se ha mencionado en la introducción (sección..) esta es una característica típica de las células transformadas. Para verificar si las vías de transducciones de señales activadas por KSHV-GPCR mediaban la resistencia a la apoptosis inducida por privación de suero se incubaron a las células ECs-KSGPCR o células HUVECs en medio libre de suero y en presencia o ausencia de IP10 (agonista inverso de KSHV-GPCR), además para controlar los posibles

efectos tóxicos de este ligando y comprobar que la apoptosis se debiera al "hambre" de las células se realizó en paralelo el mismo experimento en medio rico (20%FBS y 6ng/ml bFGF).

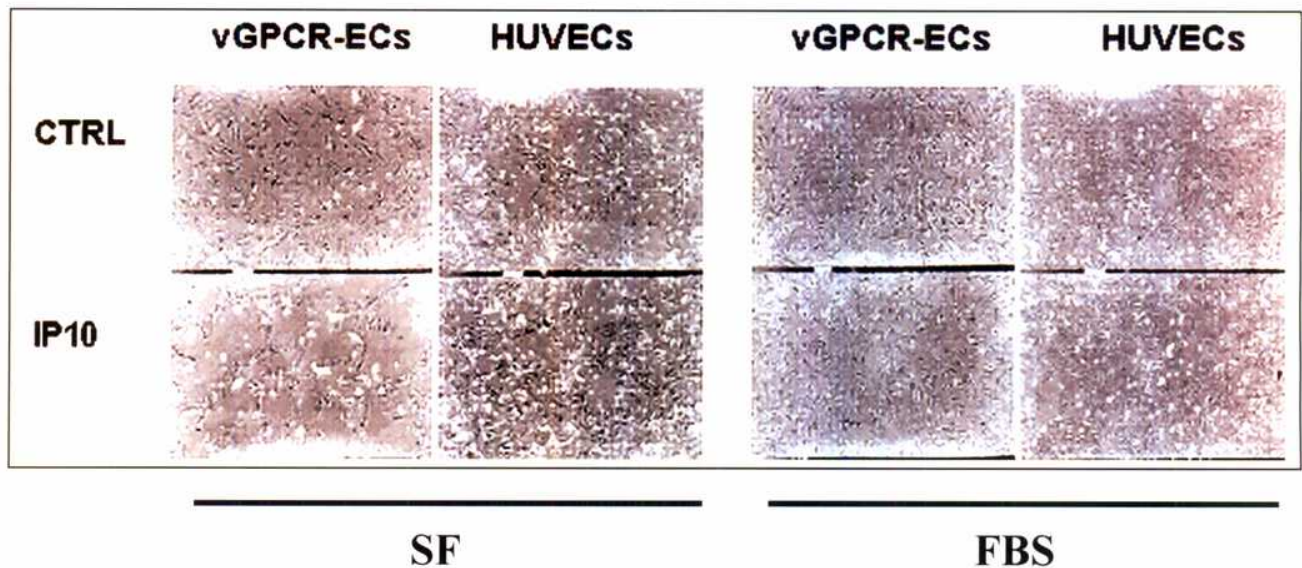
Como se puede observar en la figura.....IP10 específicamente sensibiliza específicamente a las células endoteliales que expresan KSHV-GPCR ( ECs-KSGPCR) a la apoptosis por privación de suero, en contraste esta quemoquina no produce un incremento significativo de la apoptosis de estas mismas células en medio rico o en las células HUVECs "wt" en cualquiera de las condiciones experimentales.

Estos resultados demuestran que las vías de señales activadas por este receptor son responsables de la resistencia a la apoptosis característica de las células ECs-KSGPCR. La activación de la enzima PI3K regula una de las principales vías de transducción de señales que modulan la resistencia a la apoptosis en ausencia de suero. (citas....). Además PI3K participa en la organización del citoesqueleto (citas...) y puede ser activada por GPCRs (citas.....). Dado que Akt es sustrato de la enzima PI3K y que media la mayoría de sus efectos antiapoptóticos decidimos evaluar la capacidad de KSHV-GPCR para activar esta enzima (presuntamente a través de PI3K). Por los motivos explicados en la sección 2,1 se decidió estimular agudamente con Gro-a la actividad de KSHV-GPCR y utilizar células HUVECs para controlar cualquier actividad de GRO-a que no estuviera mediada por este receptor viral.

Como se ve en la figura....Gro-a es capaz de activar la enzima Akt únicamente en las células endoteliales humanas que expresan KSHV-GPCR sugiriendo que la activación de este receptor viral es suficiente para reclutar vías de señales antiapoptóticas.

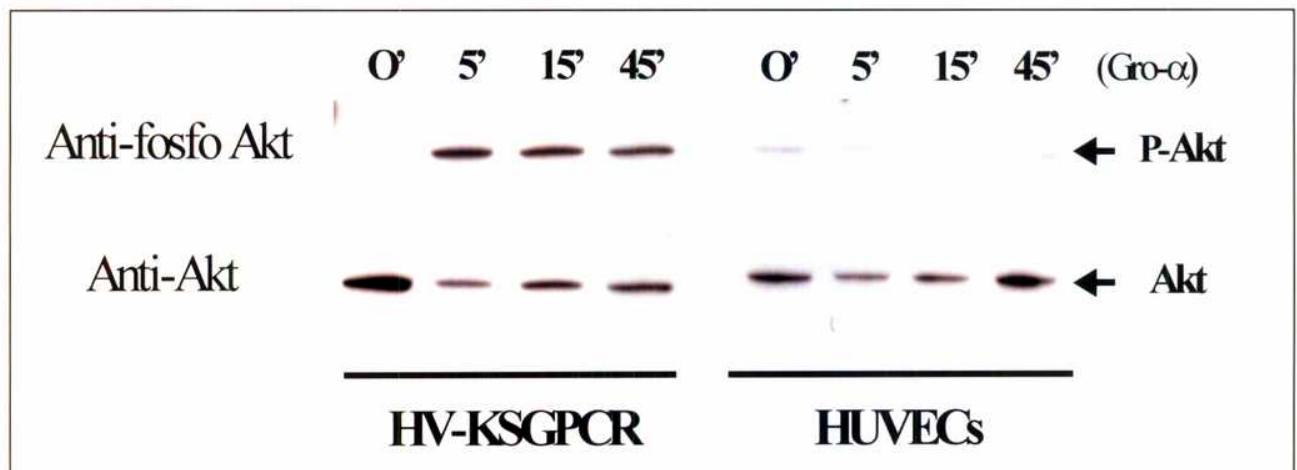
Como consecuencia de estos resultados se decidió medir el efecto de un inhibidor específico de PI3K (LY...) en la supervivencia de las células ECs-KSGPCR y en células HUVECs en medio libre de suero. Como puede verse en la figura las células ECs-KSGPCR son particularmente sensibles a bajas dosis de este inhibidor, además, la superactivación de este receptor (con Gro-a) es capaz de rescatar de la apoptosis inducida por LY específicamente a las células endoteliales que expresan KSHV-GPCR .... sugiriendo que la actividad de este receptor viral media directamente la activación de la vía PI3K/Akt y la subsecuente resistencia a la apoptosis en medio libre de suero.





**Figura...: la resistencia a la apoptosis por privación de suero observada en las células HV-KSGPCR es dependiente de la actividad constitutiva de KSHV-GPCR.**

Después de haber llegado a confluencia las células se lavaron en PBS y se aplicaron los tratamientos correspondientes. **SF ctrl.** 48hs después de ser mantenidas en ausencia de suero (SF) las células RV-KSGPCR siguen formando una "monocapa" con muy pocas figuras apoptóticas en contraste después del mismo tratamiento las células HUVECs muestran gran cantidad de figuras apoptóticas y numerosos espacios sin células (que indican que gran cantidad de estas células ya se murieron). **SF IP10** Cuando se realiza el mismo experimento en presencia de IP10 (que actúa como agonista inverso de KSHV-GPCR) las células HV-KSGPCR revierten completamente el fenotipo de resistencia a la apoptosis (de hecho quedan sensibilizadas), el hecho de que no se observe un incremento significativo en la apoptosis en las células control (HUVECs) indica que este efecto de IP10 estaría mediado por KSHV-GPCR. A la derecha se muestra un experimento realizado en paralelo en presencia de suero (FBS) que indica que IP10 no es tóxico y que la apoptosis observada se debe efectivamente al "hambre" de las células.



**Figura....: KSHV-GPCR es capaz de activar la vía de transducción de señales antiapoptóticas de Akt.**

El western-blot de la figura muestra que Gro- $\alpha$  es únicamente capaz de activar Akt en las células HV-KSGPCR y no en las HUVECs indicando que las vías de transducción de señales reclutadas por KSHV-GPCR son capaces de fosforilar esta quinasa.

### **3.4) La expresión de KSHV-GPCR induce la estabilización de la longitud de los telómeros y la inmortalización de células endoteliales humanas por un mecanismo independiente de telomerasa.**

A partir del pasaje 10-12 la morfología de las células HV-EGFP y de las HUVECs sin transducir era claramente senescente. Como se esperaba, dejaron de proliferar y se murieron después del pasaje 14 (aproximadamente cinco semanas después de ser transducidas). Sorprendentemente las células HV-KSGPCR continúan proliferando después de ser mantenidas in vitro por más de cinco meses sin significativas alteraciones morfológicas, superando claramente el límite de Hayflick e indicando que la expresión de KSHV-GPCR es suficiente para inducir la inmortalización de células endoteliales humanas.

Como se ha explicado en la introducción (sección...) el límite de Hayflick (1,2) impone una restricción al número de divisiones celulares que una célula somática puede realizar, una vez pasado este límite las células dejan de proliferar, muestran un fenotipo senescente y posteriormente comienzan a morir (esta última fase generalmente se la conoce como crisis). Genéricamente a estos mecanismos de control de la proliferación celular se los conoce como TPA (*Terminal proliferation arrest*). Como raramente una célula (1 de cada  $1 \times 10^7$ ) puede escapar al estadio de TPA se considera que la adquisición de la capacidad de dividirse ilimitadamente es un paso esencial para la transformación maligna de células normales.

El mecanismo molecular que contabiliza el número acumulativo de divisiones celulares (reloj) es el acortamiento de telómeros (que se produce después de cada división celular) y se asume que el acortamiento de telómeros más allá de un cierto límite induce la "crisis". Existen mecanismos que controlan la longitud y estabilidad telomérica que están reprimidos en las células somáticas "normales" y cuyo control regulatorio juega un rol clave en los procesos de inmortalización y por ende de transformación celular. El hecho de que KSHV-GPCR tuviera la capacidad de inmortalizar células endoteliales humanas es particularmente relevante por que la expresión de otros oncogenes

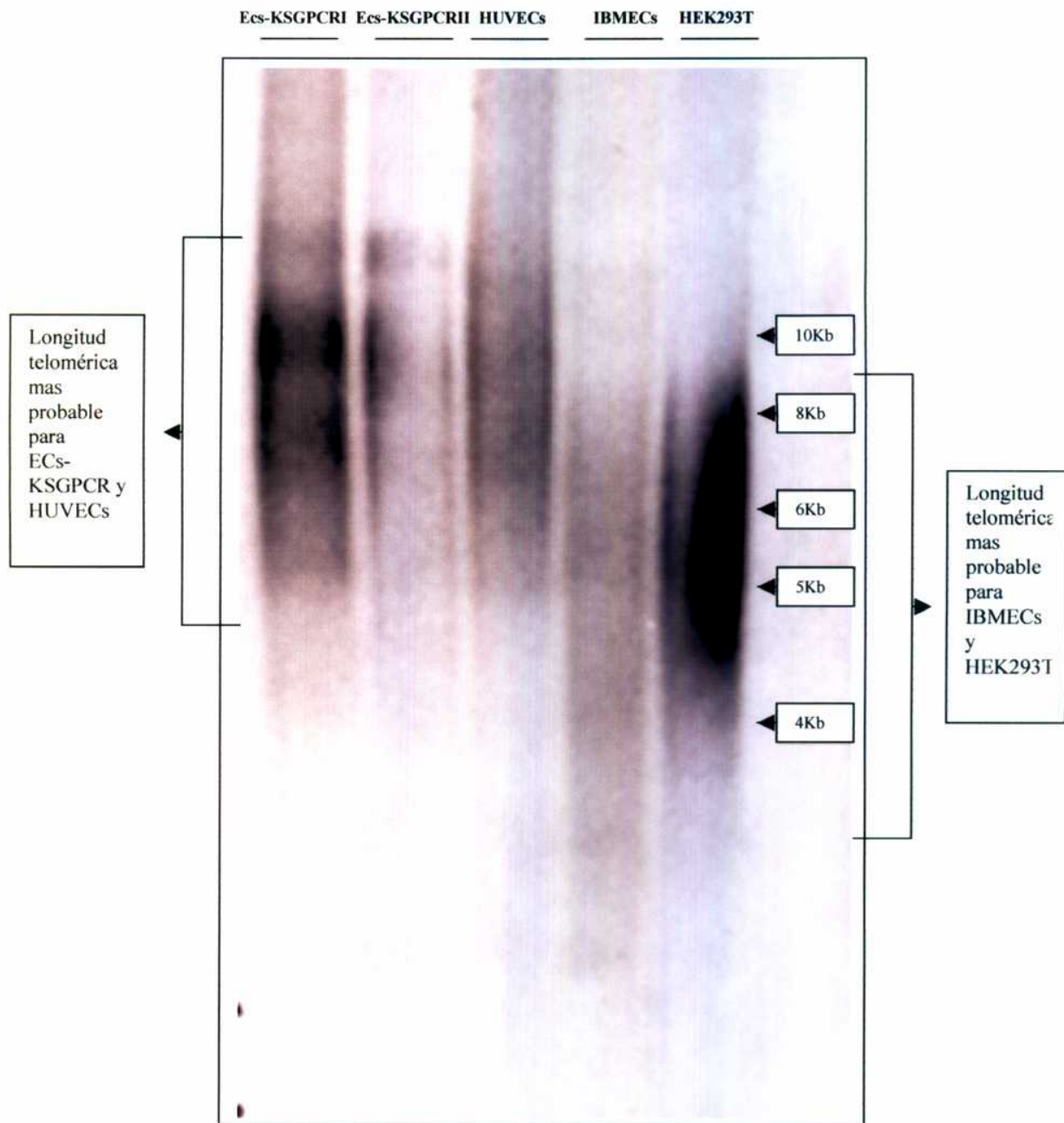
transformantes (Ras por ej.) en células primarias humanas induce senescencia y apoptosis y la expresión de proteínas inmortalizantes (SV40 y Large T por ej) produce una crisis por acortamiento de telómeros de donde emergen solo algunas células inmortalizadas no transformadas (una excepción de esta regla es la expresión ectópica de la enzima telomerasa que inmortaliza las células somáticas sin fase de crisis). Estos resultados claramente sugieren que KSHV-GPCR es capaz de activar mecanismos que controlan la estabilidad y la longitud los telómeros.

Para verificar la estabilidad y longitud de los telómeros (ver métodos) en las células endoteliales que expresaban KSHV-GPCR se extrajo ADN genómico de dos líneas celulares (seleccionadas independientemente) que fueron pasajeadas en paralelo por cinco meses en cultivo (ECs-KSGPCR I y II), de células primarias endoteliales humanas HUVECs "jóvenes" (pasaje 4), de una línea celular endotelial humana inmortalizada por expresión de SV40 (IBMECs o Immortalized Bone Marrow Endothelial Cells) y de HEK293T que es una línea celular epitelial humana inmortalizada por expresión de "large T". El southern-blot de la figura (métodos) que fue hibridizado con una sonda radioactiva que específicamente reconoce ADN telomérico muestra el rango de longitudes de los telómeros en las distintas líneas celulares. Llamativamente como se observa en la figura..... las dos líneas celulares ECs-KSGPCR tienen una longitud media de telómeros que no difiere significativamente de la de las células endoteliales primarias de bajo pasaje (HUVECs, pasaje 4), estos resultados son coherentes con lo observado ya que nunca se observó una fase de crisis durante el pasaje de las células ECs-KSGPCR. En contraste la longitud media de los telómeros de las IBMEC y de las HEK293T (dos líneas celulares que han sufrido una fase de crisis previa a la inmortalización) es mucho más corta que la de las HUVECs (p4) o ECs-KSGPCR I y II.

Estos resultados demuestran que la expresión de KSHV-GPCR induce la inmortalización células endoteliales humanas al activar tempranamente mecanismos que regulan la estabilidad y longitud telomérica (evitando de este modo la fase de crisis por acortamiento de telómeros).

En la mayoría de las líneas celulares y en el 85% de los cánceres humanos conocidos la estabilidad de la longitud de los telómeros depende de la enzima telomerasa (20, 21) y de hecho la expresión ectópica en células somáticas "normales" de la subunidad catalítica de

## ADN genómico (HinfI/RsaI)



**Fig... El proceso de inmortalización inducido por la expresión de KSHV-GPCR activa un mecanismo de estabilización que evita la crisis por acortamiento de telómeros.**

el southern-blot de la figura muestra la longitud de telómeros en las distintas líneas celulares analizadas. El ADN genómico para este experimento fue digerido por las enzimas HinfI y RsaI que no cortan las secuencias repetitivas teloméricas. Luego de correrse en un gel de agarosa (0,6%) y transferirse a un soporte sólido (Nylon) la membrana fue hibridizada con una sonda marcada radiactivamente que reconoce específicamente estas secuencias repetitivas.

Nótese que la longitud mas probable de los telómeros (obsérvese la zona donde la intensidad de las bandas es mayor) de las dos líneas Ecs-KSGPCR (I y II) seleccionadas independientemente y crecidas por 5 meses en cultivo es similar a la de células primarias endoteliales (HUVECs) de pasaje 4, en contraste el promedio de la longitud de telómeros de dos líneas celulares inmortalizadas por expresión de SV40 y "large T" (IBMEC que es de origen endotelial y HEK293T respectivamente) es mucho menor que el de las Ecs-KSGPCR o HUVECs indicando que ( como esta reportado en la literatura) estas líneas han sufrido una fase de crisis, pero han sobrevivido gracias a la estabilización de la longitud de sus telómeros por un mecanismo que es dependiente de la enzima telomerasa.

### **3.4) La expresión de KSHV-GPCR induce la estabilización de la longitud de los telómeros y la inmortalización de células endoteliales humanas por un mecanismo independiente de telomerasa.**

A partir del pasaje 10-12 la morfología de las células HV-EGFP y de las HUVECs sin transducir era claramente senescente. Como se esperaba, dejaron de proliferar y se murieron después del pasaje 14 (aproximadamente cinco semanas después de ser transducidas). Sorprendentemente las células HV-KSGPCR continúan proliferando después de ser mantenidas in vitro por más de cinco meses sin significativas alteraciones morfológicas, superando claramente el límite de Hayflick e indicando que la expresión de KSHV-GPCR es suficiente para inducir la inmortalización de células endoteliales humanas.

Como se ha explicado en la introducción (sección...) el límite de Hayflick (1,2) impone una restricción al número de divisiones celulares que una célula somática puede realizar, una vez pasado este límite las células dejan de proliferar, muestran un fenotipo senescente y posteriormente comienzan a morir (esta última fase generalmente se la conoce como crisis). Genéricamente a estos mecanismos de control de la proliferación celular se los conoce como TPA (*Terminal proliferation arrest*). Como raramente una célula (1 de cada  $1 \times 10^7$ ) puede escapar al estadio de TPA se considera que la adquisición de la capacidad de dividirse ilimitadamente es un paso esencial para la transformación maligna de células normales.

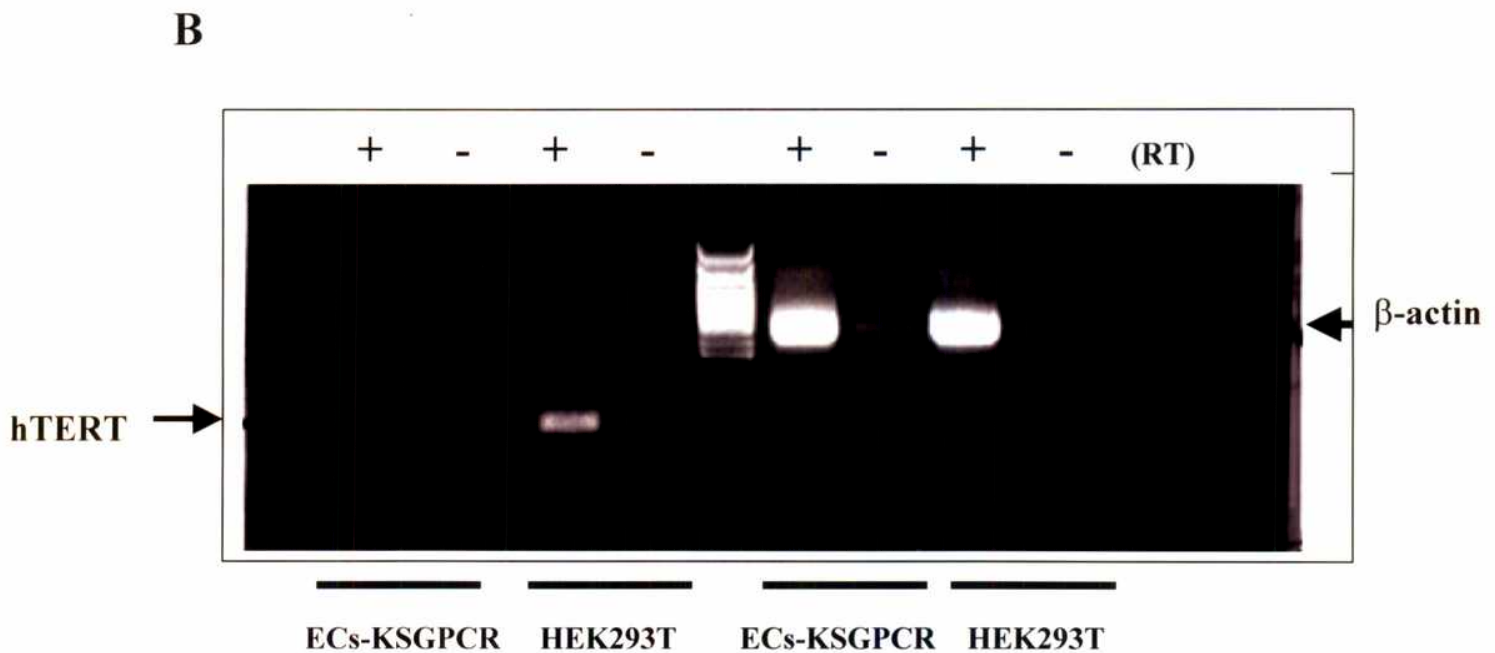
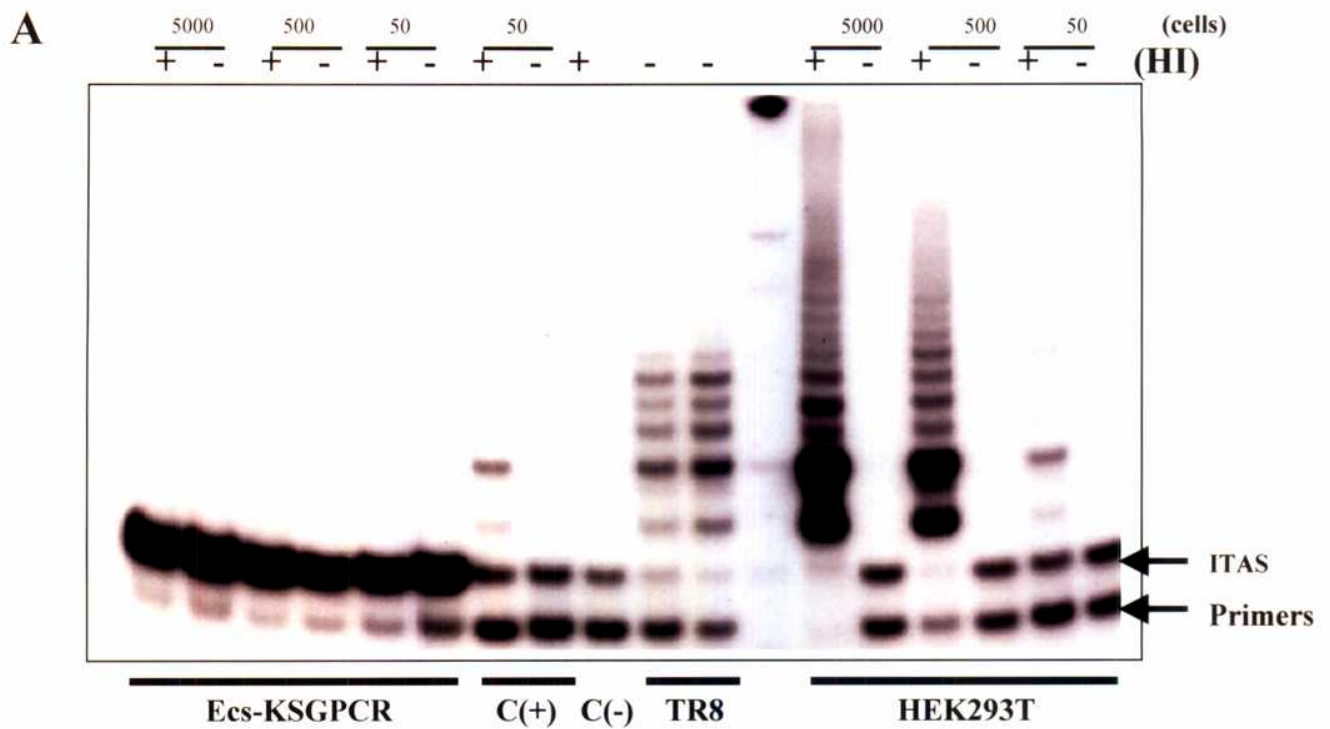
El mecanismo molecular que contabiliza el número acumulativo de divisiones celulares (reloj) es el acortamiento de telómeros (que se produce después de cada división celular) y se asume que el acortamiento de telómeros más allá de un cierto límite induce la "crisis". Existen mecanismos que controlan la longitud y estabilidad telomérica que están reprimidos en las células somáticas "normales" y cuyo control regulatorio juega un rol clave en los procesos de inmortalización y por ende de transformación celular. El hecho de que KSHV-GPCR tuviera la capacidad de inmortalizar células endoteliales humanas es particularmente relevante por que la expresión de otros oncogenes

la enzima telomerasa (TERT), que de otro modo únicamente se transcribe en las células inmortalizadas "positivas para telomerasa", es suficiente para inmortalizar células primarias humanas. A pesar de ello algunas líneas y células tumorales "telomerasa negativas" tienen una actividad alternativa de mantención de longitud de los telómeros llamado ALT (*Alternative lengthening of telomeres*) cuyo mecanismo molecular en células de mamífero se desconoce, pero que en levaduras involucra a proteínas que participan del mecanismo de recombinación del ADN (17, 22, 23). Las células somáticas de mamífero "normales" y algunas líneas celulares que son "positivas para telomerasa" contienen un represor de la actividad ALT (34), recíprocamente las células "normales" y algunas líneas "positivas para ALT" contienen represores de la telomerasa (18 y 35).

Dado que las células EC-KSGPCR están inmortalizadas y expresan una actividad estabilizadora de la longitud de los telómeros y de que la mayoría de las líneas celulares inmortalizadas expresan telomerasa decidimos medir la actividad de esta enzima en extractos celulares provenientes de las células endoteliales que expresan KSHV-GPCR utilizando la técnica de TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol). En breve este ensayo se basa en la capacidad de la telomerasa para catalizar la adición de secuencias repetitivas (AGGGTTAG) a oligos que contengan estas secuencias teloméricas. Como esta enzima es sumamente poco procesiva genera una "escalera" de oligos de distinta longitud (de 6 pares de bases de diferencia uno con otro) que se amplifica por PCR a fines de ser detectado y se resuelve en un gel de acrilamida.

Como puede verse en la figura... no fue posible detectar actividad de la enzima telomerasa en los extractos provenientes de ECs-KSGPCR, en contraste la actividad de la enzima telomerasa puede detectarse (como era de esperarse) en los extractos que provienen de las células HEK293T (control positivo).

Para corroborar este resultado negativo se extrajo ARN de ECs-KSGPCR y HEK293T que se utilizó luego como templado para la RT-PCR. Como puede verse en la figura... hTERT se transcribe únicamente en la línea HEK293T y no en la línea EC-KSGPCR. En conjunto estos resultados implican que la estabilización de la longitud de los telómeros (figura) y la inmortalización y inducida por la expresión de KSHV-GPCR en



**Figura...: KSHV-GPCR immortaliza células endoteliales por un mecanismo alternativo de estabilización de telómeros (ALT) que es independiente de la actividad de la enzima telomerasa.**

**A** Ensayo de TRAP (telomeric Repeat Amplification Protocol) utilizado para medir la actividad de la enzima telomerasa. El experimento demuestra que no hay actividad detectable de telomerasa en los lisados provenientes de la línea celular immortalizada Ecs-KSGPCR, en contraste esta actividad es detectable en los lisados que provienen de la línea celular HEK293T (telomerasa positivos). Brevemente la enzima telomerasa se extrajo de células creciendo exponencialmente como se indica en la sección de métodos, si la enzima está presente se espera la adición de la secuencia hexonucleotídica telomérica (AGGGTTAG) al primer "telomérico" TS marcado radioactivamente. Como la telomerasa es muy poco procesiva se genera una escalera de fragmentos de distintos tamaños (que tienen una diferencia de tamaño entre sí de 6 pares de bases). Luego estos oligos elongados por la telomerasa se amplifican por PCR y el producto se resuelve en un gel de acrilamida/TBE 15%. Dado que se están amplificando secuencias repetitivas este ensayo suele producir muchos artefactos experimentales por lo cual el diseño experimental debe ser cuidadoso. Como la telomerasa es sumamente sensible al calor se puede controlar la especificidad de la reacción en un experimento en paralelo donde se inactivan los lisados por calor (HI). C(+) es un lisado que se ha utilizado previamente y se sabe que es positivo para telomerasa. Las células HEK293T fueron crecidas y procesadas en paralelo con las Ecs-KSGPCR de modo que son utilizadas como control de los métodos de lisis y extracción de la enzima. ITAS (Internal Template Amplification Sequence) es un control interno de PCR. C(-) sirve para controlar artefactos debidos a formación de dímeros de primers y contaminación. TR8 es un oligonucleótido sintético con 8 repeticiones teloméricas que sirve como un standard para cuantificar la actividad positiva de la telomerasa en los extractos. Las diluciones seriadas de los extractos celulares sirven para "eliminar" potenciales inhibidores de la telomerasa. **B** RT-PCR que corrobora que la hTERT (la subunidad catalítica

células endoteliales humanas están mediadas por un mecanismo alternativo (ALT) de estabilización de telómeros que es independiente de la actividad de la enzima telomerasa. Esta es la primera evidencia que un gen codificado por el Virus asociado al Sarcoma de Kaposi (KSHV) tiene la capacidad de inmortalizar células endoteliales humanas.

### **3,3) La expresión de KSHV-GPCR en células endoteliales mantiene elevada la expresión de KDR/VEGFR-2 .**

Como se ha mencionado anteriormente (ver sección intro) el control de la expresión del receptor KDR/VEGFR-2 juega un rol central en la supervivencia y proliferación de células endoteliales. Además de ser una molécula clave en angiogénesis, KDR se encuentra sobreexpresada en las células ahusadas y endoteliales de SK y en HUVECs infectadas *in vitro* por KSHV (citas.....Flore 1998.).

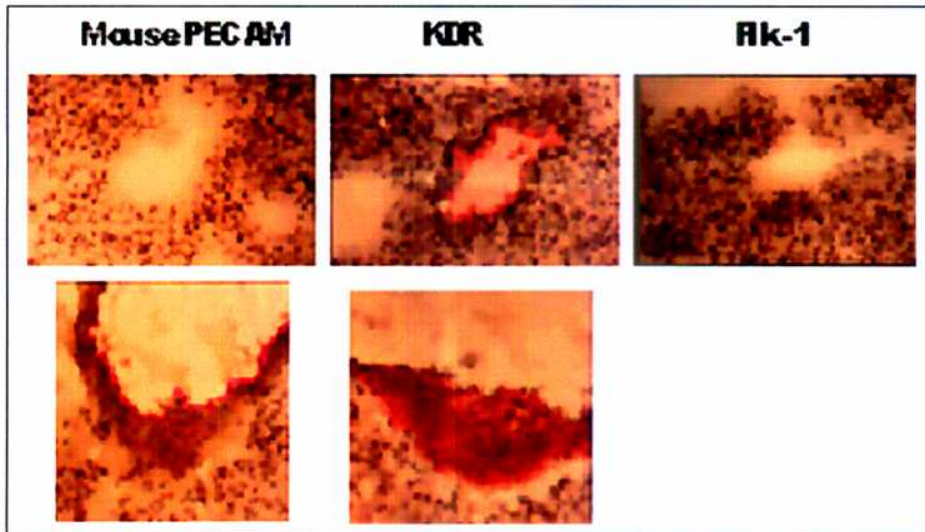
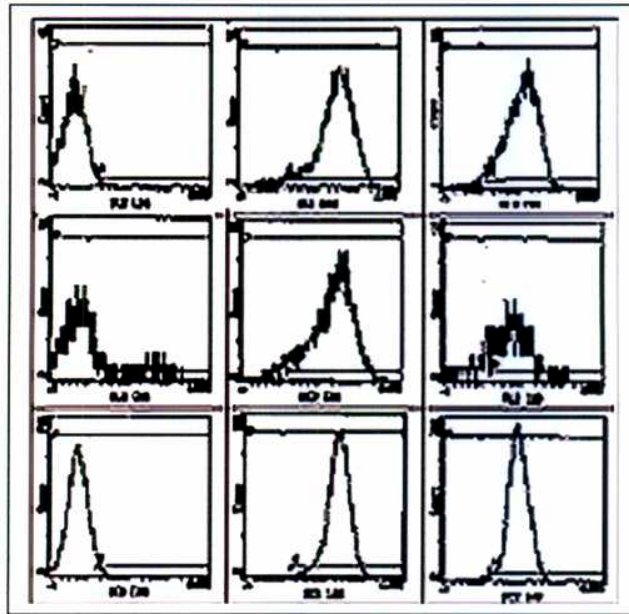
Después de varios pasajes (pasaje 10) se decidió medir la expresión de KDR en las células control (ECs-EGFP) y en las células HV-KSGPCR. Normalmente las células Huvecs pierden gradualmente la expresión de KDR después de unos pocos pasajes *in vitro* y se piensa que esta es una de las razones por las cuales las células endoteliales senescen al ser "pasajeadas" *in vitro* .

Como se ve en la figura..... las células HV-KSGPCR (pasaje 10) muestran altos niveles de expresión de KDR (comparables a los niveles de expresión de este receptor en HUVECs "jóvenes"). En contraste y como era esperado las células HV-EGFP muestran muy bajos niveles de expresión de este receptor.

Estos resultados sugieren fuertemente que los altos niveles de expresión de KDR observados después de numerosos pasajes de las células HV-KSGPCR *in vitro* se deben a la expresión ectópica de KSHV-GPCR en estas células.

Esta evidencia experimental sugiere que un gen codificado por KSHV/HHV-8 puede inducir la sobre-expresión de KDR/VEGFR-2 que se produce en células endoteliales infectadas con KSHV *in vitro* (Flore 1998) e *in vivo* (en las lesiones de SK). Estos datos indicarían que este oncogen viral tiene la habilidad de inducir angiogenicidad tanto en





# **DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES**

## **Discusión:**

# **KSHV-GPCR es una oncoproteína viral y un activador angiogénico.**

KSHV es un  $\gamma$  herpesvirus oncogénico que está implicado en la patogénesis del sarcoma de Kaposi. Este virus codifica en su genoma para un número inédito de genes con homología a genes regulatorios celulares. Dada la ausencia de modelos animales para estudiar el rol de KSHV en la patogénesis del sarcoma de Kaposi nosotros decidimos utilizar una estrategia de genes candidatos para evaluar si la expresión ectópica de alguna de estas proteínas virales era capaz de inducir fenotipos relevantes a esta patología.

El marco de lectura 74 (ORF74) de KSHV codifica para un receptor acoplado a proteína G (KSHV-GPCR) que es activo constitutivamente ( es ligando independiente). Dado que previamente se ha demostrado que GPCRs constitutivamente activados pueden ser oncogénicos y de que KSHV-GPCR es sumamente homologo al receptor humano de IL-8 (una quemoquina angiogénica) nosotros pensamos que este gen viral era un excelente gen candidato para inducir dos de los fenotipos, transformación celular y angiogénesis, que podrían ser relevantes en el contexto de la patogénesis del sarcoma de Kaposi.

### **KSHV-GPCR y transformación celular en NIH3T3:**

Para evaluar el potencial oncogénico de KSHV-GPCR decidimos expresar este receptor en células inmortalizadas de ratón (NIH3T3) y realizar el ensayo clásico de formación de focos de transformación celular. Mediante este ensayo pudimos demostrar que KSHV-GPCR induce reproduciblemente focos de transformación celular exactamente tres semanas después de que las células lleguen a confluencia. Cuando estas células transformadas que expresan KSHV-GPCR se inyectan en el flanco de ratones desnudos son capaces de producir tumores indicando que las consecuencias de la expresión de este receptor viral son mucho mas diversas y complejas que la simple pérdida de el mecanismo de inhibición por contacto.

A pesar de que estos resultados no implican necesariamente que el potencial oncogénico de esta proteína se manifieste en el contexto de la patogénesis del SK o de otras enfermedades asociadas a KSHV, estos experimentos definen a KSHV-GPCR como a un oncogen viral y muestran que el potencial patogénico de este y otros genes codificados por KSHV pueden ser utilizados para desarrollar modelos de patogenicidad que son testeables experimentalmente.

### **Oncogenes líticos tempranos, KSHV, KSHV-GPCR y sarcoma de Kaposi**

Durante el transcurso de estas tesis se han descrito otros tres genes codificados por KSHV (ORFK9 o vIRF, ORFK1 y ORFK12 o Kaposina) que pueden ser transformantes cuando son expresados en células inmortalizadas de roedores y/o causar tumores en modelos animales. De estos genes ORFK12 y ORFK9 son transcritos latentes en las líneas celulares derivadas de las PELs (82-84)

El hecho de que el ORF74 sea un gen lítico-temprano impone ciertas restricciones a los escenarios donde este receptor viral podría actuar como oncogen ya que teóricamente las células que expresan KSHV-GPCR están destinadas a morir en cuanto se alcance la fase lítica tardía del ciclo viral. De cualquier modo es importante subrayar que la definición de los patrones de expresión de las proteínas "pirateadas" es bastante difuso y varía entre los distintos tipos celulares infectados (por ejemplo vIL-6 es latente en células B y lítico en células ahusadas, Moore 1996) y que el patrón de expresión viral previo al establecimiento de las lesiones de SK, en el progenitor circulante, y en las infecciones "de novo" se desconoce.

Como se ha explicado en la sección ... de la introducción existen dos principales paradigmas para la transformación celular inducida por virus oncogénicos de ADN:

- En los pequeños virus de ADN los oncogenes siempre tienen un patrón viral de expresión lítico temprano, pero únicamente manifiestan su potencial oncogénico cuando accidentalmente se expresan durante ciclos líticos abortivos.
- En el modelo de EBV las proteínas oncogénicas tienen un patrón latente de expresión viral (latencia III) y el potencial oncogénico-proliferativo de este virus es controlado por el sistema inmune (ver sección intro..). Es por ello que EBV es un potente agente inmortalizante de células B in vitro a pesar de que in vivo la incidencia de las enfermedades asociadas a EBV es muy baja. Mas allá de las obvias homologías de

secuencia genómica entre KSHV y EBV no hay ninguna evidencia experimental ni epidemiológica que soporte la idea de que los mecanismos de patogénesis entre ambos virus sean similares (ver sección).

En síntesis en el primer modelo la contribución viral al proceso oncogénico es un "accidente" que no está relacionado con los patrones "normales" de expresión genética viral ni con las estrategias directas de supervivencia del virus e ilustra algunos de los mecanismos de oncogénesis que involucran genes con patrones de expresión lítica temprana. en el segundo caso la oncogenicidad viral es una consecuencia "normal" de la infección persistente viral ya que forma parte una estrategia de adaptación viral que amplifica el número de células del huésped infectadas asegurando la supervivencia viral dentro de individuos inmunocompetentes.

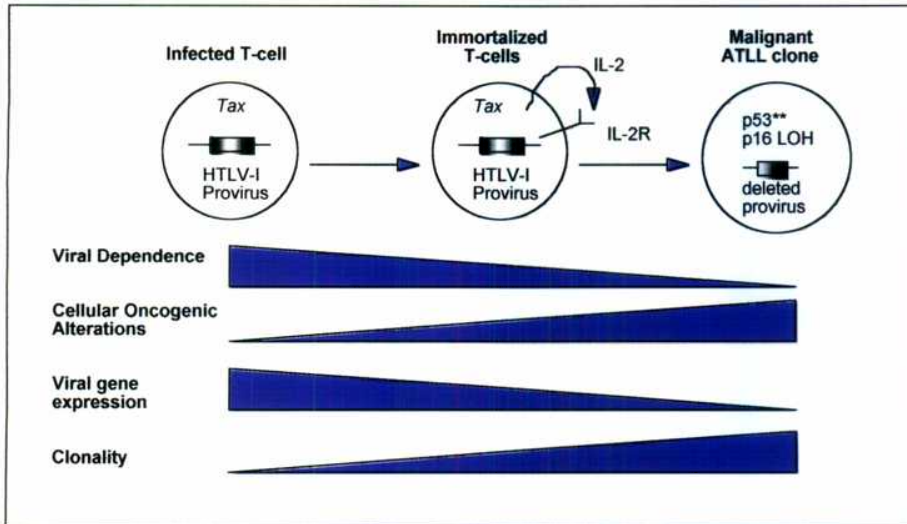
Existen otros mecanismos oncogénicos virales que pueden explicar la capacidad transformante de genes tempranamente líticos, como por ejemplo a expresión de genes que inducen un "mutator phenotype", inestabilidad genómica y/o "loops autócrinos" que pueden transforman células por un mecanismo de "hit and run" de modo tal que en los estadios finales de la progresión oncogénica (en las células tumorales) las oncoproteínas virales no necesariamente se expresan (ver el modelo de la figura 1).

Si KSHV-GPCR participa en la patogénesis del SK transformando células endoteliales y/o ahusadas por alguno de estos mecanismos (figura 2) es materia de especulación (aunque es posible testear experimentalmente si por ejemplo la expresión de KSHV causa inestabilidad genómica).

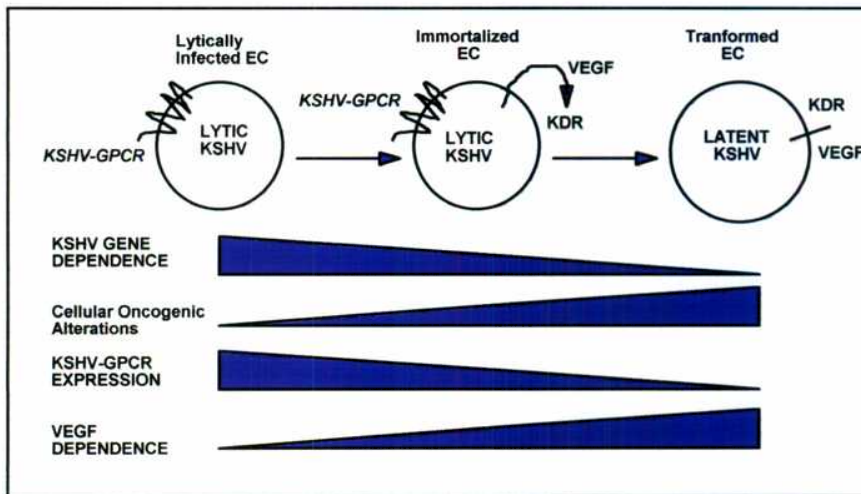
La particular epidemiología, la compleja histología y el patrón de expresión de las proteínas de KSHV en las lesiones del SK indican que el modelo de tumorigénesis probablemente sea diferente al de el resto de los virus oncogénicos conocidos.

Paradójicamente, a pesar de la cantidad de genes potencialmente oncogénicos que este virus posee, todavía nadie ha sido capaz de demostrar consistentemente que este virus sea capaz de transformar células in vitro ni explicar por que solo una fracción de los pacientes inmunocompetentes infectados desarrollara alguno de los tumores asociados a este virus (Boshoff 1998).

**Efectos parácrinos de KSHV-GPCR: implicancia para la patogénesis del SK.**



**Figura 1: HTLV-1 como modelo de transformación oncogénica por “hit and run”.** HTLV-1 es el agente etiológico de la leucemia/linfoma de células T en adultos (ATLL). Una vez que HTLV-1 infecta a una población de células T comienzan a expresarse las proteínas de este retrovirus, una de ellas, Tax, es un transactivador que regula la expresión de IL-2 y el receptor de IL-2 (entre otros genes) de modo que se crea un “loop autócrino” que genera la expansión policlonal de células T que finalmente se immortalizan. Estas células immortalizadas acumulan mutaciones rápidamente por que Tax induce inestabilidad genómica. Sorprendentemente en las células tumorales de ATLL no expresan proteínas virales ya que las secuencias virales han sido seriamente delesionadas, además estas células usualmente presentan anomalías citogenéticas y alteraciones oncogénicas como la inactivación de p53 y la pérdida de heterocigosis de p16 (LOH). (tomado de Cesarman E. y Mesri E, 1999)



**Figura 2: KSHV-GPCR podría transformar células endoteliales humanas por un modelo de “hit and run” análogo al de HTLV-1:** KSHV-GPCR podría ser expresado transientemente en las infecciones “de novo” o alternativamente expresarse en el contexto de ciclos líticos abortivos. Dos consecuencias de la expresión de esta proteína viral en células endoteliales son la immortalización y la expresión sostenida de proteínas que juegan roles clave en la proliferación y la supervivencia de células endoteliales como VEGF-R2/KDR y Tie-2 que podrían formar loops autócrinos con VEGF. Si KSHV-GPCR induce inestabilidad genómica, al igual que en el modelo de Tax, KSHV-GPCR no necesariamente tiene que expresarse en las lesiones del SK.

Como se ha mencionado en la introducción es todavía objeto de discusión si el origen de las lesiones del SK es neoplásico o se trata simplemente de una hiperplasia reactiva, lo cual plantea también un interrogante sobre el impacto de los paradigmas clásicos de transformación oncogénica viral en la comprensión de los mecanismos de patogénesis del SK. De cualquier modo es claro que las citoquinas y factores angiogénicos juegan un rol fundamental en desarrollo de esta patología. En este sentido los posibles efectos parácrinos de los genes tempranamente líticos codificados por KSHV podrían ser particularmente relevantes ya que un pequeño número de células infectadas productivamente podría estimular paracrinamente al resto de las células de la lesión (ver modelo y sección de discusión.).

Dado que los factores angiogénicos son especialmente importantes en el desarrollo y mantenimiento de estas lesiones decidimos investigar si la expresión de KSHV-GPCR era capaz de inducir la secreción de factores angiogénicos.

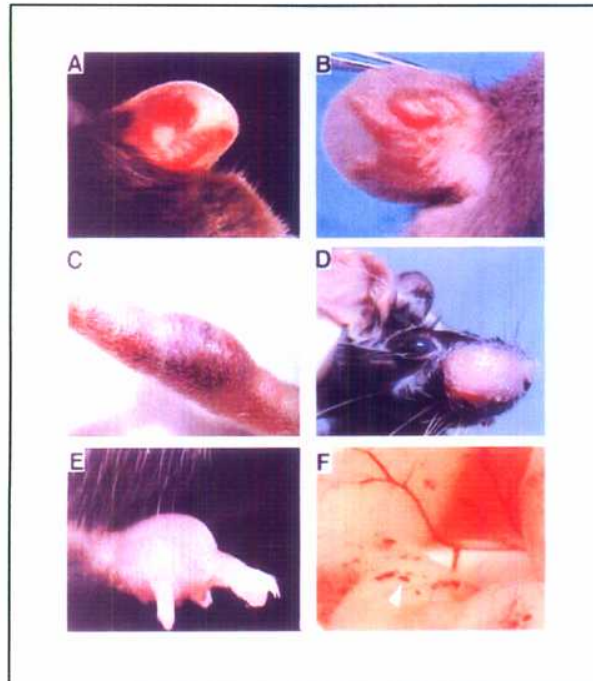
Como se ha demostrado en la figura... de resultados los medios condicionados provenientes de las células NIH3T3 que expresan KSHV-GPCR son angiogénicos y su angiogenicidad está mediada por VEGF. Estos resultados son particularmente relevantes en el contexto de las lesiones de sarcoma de Kaposi ya que VEGF es un factor de crecimiento para células ahusadas y endoteliales y además es uno de los principales factores angiogénicos conocidos.

*Ver angiogenesis, cancer KSHV como factor de crecimiento*

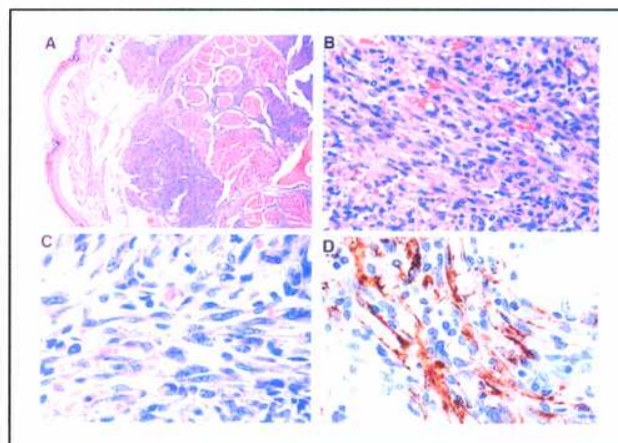
El sorprendente hecho de que una única proteína viral sea capaz de producir transformación oncogénica y angiogénesis sugiere una conexión causal entre la infección viral por KSHV y el desarrollo del SK, sin embargo estos resultados no prueban que KSHV sea necesario para el desarrollo de esta patología ni definen conclusivamente el rol de KSHV-GPCR en el proceso patogénico.

Alentados por estos interesantes resultados el año pasado Yang T (Yang T, 2000) construyó un ratón transgénico que expresaba KSHV-GPCR bajo el control del promotor de CD2 (Yang T. , 2000). Este ratón desarrolló lesiones angioproliferativas sorprendentemente similares al SK. Las lesiones comienzan como placas eritromatosas y evolucionan como nódulos púrpuras o tumores que se desarrollan principalmente en la piel y de manera menos extensa en el intestino, corazón y músculo esquelético.

Histológicamente y al igual que en el SK los tumores angioproliferativos nodulares que se ven en estos ratones forman espacios vasculares en forma de hendiduras que están rodeados por células ahusadas e inflamatorias y donde se evidencia la extravasación de eritrocitos. También al igual que en el SK las lesiones son positivas para, VEGF y el



**Figura 3: Las expresión transgénica de KSHV-GPCR en ratones causa lesiones similares a las del sarcoma de Kaposi.** (A) placa eritromatosa en la oreja de estos ratones, posteriormente cuando estas lesiones evolucionan se vuelven purpuras (B) y forman nódulos eritromatosos y tumores en las orejas. (C) Cola, (D) nariz, (E) pata, (F) nódulos eritromatosos en la pared del intestino delgado (uno de ellos es indicado con una punta de flecha blanca). (imágenes extraídas de Yaang T, 2000)



**Figura 4: Imágenes microscópicas de las lesiones de los ratones transgénicos para KSHV-GPCR.** (A) Cola. Múltiples tumores angioproliferativos localizados en el compartimento dérmico de la piel. (B) Cola. numerosos vasos que están rodeados por estructuras compuestas por células endoteliales ahusadas (C) Oreja. Se observan numerosos espacios vasculares irregulares que contienen eritrocitos. (D) inmunohistoquímica con anti CD34 de una típica lesión linfoproliferativa de estos ratones, notese la gran cantidad de células positivas para este marcador que están presentes en las lesiones. (Imágenes tomadas de Yang T, 2000)



marcador CD34 (que es un marcador de células hematopoiéticas presente en células endoteliales y ahusadas); llamativamente muy pocas de las células presentes en las lesiones expresan KSHV-GPCR sugiriendo un modelo parácrino indirecto de proliferación de células endoteliales. Además las lesiones angiolinfoproliferativas observadas en estos ratones posiblemente sean de origen hematopoiético ya que si se transplanta la médula ósea de los ratones que expresan KSHV-GPCR a ratones control estos últimos desarrollan la enfermedad, sin embargo este grupo no ha podido determinar aun si la célula precursora es una célula hematopoiética común o si alternativamente se trata de una célula rara o inmadura como podría serlo un precursor endotelial. Por razones desconocidas, pero relacionadas con la expresión de este transgen. estos ratones no tienen células T, de este modo y al igual que en el SK estas lesiones se desarrollan (al menos inicialmente) en un contexto de inmunosupresión. Estos fenotipos validan en un modelo animal los resultados que se habían obtenido previamente en sistemas de cultivo de células (Bais, 1998) y muestran como la expresión KSHV-GPCR es suficiente para inducir enfermedades angioproliferativas sorprendentemente similares al SK, además ilustran algunos de los mecanismos parácrinos por los cuales la expresión de un gen lítico temprano, en un porcentaje minoritario de las células de las lesiones, puede ser patogénico.

### **KSHV-GPCR, MAPKs y transformación oncogénica**

Como se puede observar en la figura... la expresión de KSHV-GPCR en HEK293T activa JNK y p38 que son dos quinasas que típicamente responden a estímulos inflamatorios, pero no ERK1/2 una quinasa que normalmente responde a estímulos mitogénicos. Estos resultados sugerían que KSHV-GPCR, una oncoproteína viral y un activador angiogénico, podía reclutar vías de transducción de señales normalmente activadas por citoquinas inflamatorias que son factores de crecimiento de células endoteliales y del SK.

Sin embargo estas observaciones, son simplemente una correlación y no implican que la activación de las MAPKs (observada en HEK293T) este causalmente relacionada con los fenotipos previamente observados como consecuencia de la expresión de KSHV-GPCR en NIH3T3.

De hecho experimentos posteriores permitieron demostrar que las vías de transducción de señales activadas por KSHV-GPCR son dependientes del tipo celular donde se

expresa este receptor viral por ejemplo en COS7 KSHV-GPCR activa a ERK1/2 y a p38 pero no a JNK (Akrit 2000 y datos no mostrados) y en células endoteliales activa a ERK1/2 (ver mas adelante) pero no a p38 (datos no mostrados).

Del mismo modo los fenotipos que son consecuencia de la expresión de este vGPCR también varían según el tipo celular ya que induce transformación celular en NIH3T3 (Bais 1998) y proliferación celular en NRK-49F (Arvanitakis 1997), pero induce apoptosis en células B (E. Cesarman , comunicación personal), COS7 (Ganem) y también, si se sobreexpresa, en HEK293T (datos no mostrados).

Estos resultados ponen en evidencia limitaciones que son inherentes a los sistemas de modelización in vitro que estamos utilizando ( transcripción regulada por promotores constitutivos, expresión ectópica de las proteínas en células no infectables por KSHV, análisis de fenotipo fuera del contexto virus-huésped, expresión de proteínas virales en células de ratón inmortalizadas etc.). A pesar de ello nuestros experimentos preliminares en NIH3T3 son "parcialmente validados" por la potencial relevancia patogénica de los fenotipos expresados en estas células y su coherencia con el fenotipo que se desarrollan de los ratones transgénicos para KSHV-GPCR.

Por estos motivos se decidió utilizar NIH3T3 como modelo unificado en donde estudiar el rol de las MAPKs en el mecanismo de transformación oncogénica.

Los experimentos de activación de MAPKs por co-transfección transiente de KSHV-GPCR y versiones tagueadas de las quinasas en NIH3T3 fallaron sistemáticamente en activar estas enzimas a pesar de que los controles positivos de estos experimentos funcionaron (ver figura).

Como se ha comentado en la sección de intro, nuestra interpretación de estos resultados es que la actividad constitutiva a nivel de acumulación de IP3 no necesariamente implica que las MAPKs estén constitutivamente activadas, como las MAPKs forman parte de un sistema de respuesta aguda a estímulos extracelulares, nuestra hipótesis es que los mecanismos de regulación negativa de estas quinasas impiden que permanezcan activadas por largos periodos de tiempo, por lo tanto su activación se hace evidente solamente cuando uno es capaz de activar agudamente a los efectores río arriba de las MAPKs(receptores por ejemplo). El hecho de que uno pueda observar activación crónica de quinasas en células transformadas con large T (HEK293T y Cos7) probablemente sea una consecuencia de la saturación de los mecanismos regulatorios debida a la sobreexpresión de las proteínas en estudio por la gran amplificación de los plásmidos utilizados (que contienen un origen de replicación de SV40). Esta hipótesis

En esta serie de experimentos se demostró que JNK y p38 tienen un importante rol y que la vía de ERK1/2 tiene una participación menor en la transformación oncogénica inducida por la expresión de KSHV-GPCR en NIH3T3.

Estos resultados sugieren por primera vez que p38 una quinasa que normalmente responde a estímulos inflamatorios, podría en ciertos contextos participar de procesos oncogénicos.

Como se discutió en la sección de resultados estos experimentos son bastante complejos debido a varios factores, entre ellos que la sobre-expresión de dominantes negativos tiene efectos inespecíficos, que además existe considerable cross-talk entre los distintos caminos de transducción de señales y que a pesar de que las tendencias de los resultados se mantienen entre distintos experimentos, los porcentajes de inhibición varían considerablemente por motivos que no pudimos determinar experimentalmente.

Debido a ello el diseño experimental fue sumamente cuidadoso, sin embargo estos resultados deben analizarse en el contexto de las restricciones que el uso de dominantes negativos y este diseño experimental imponen.

### **Expresión de KSHV-GPCR en células endoteliales primarias humanas (HUVECs).**

KSHV-GPCR *in vivo* se expresa en endotelio ya que KSHV infecta células endoteliales y que el precursor de las células ahusadas del sarcoma de Kaposi supuestamente es de origen endotelial. En este sentido una de las mayores limitaciones del modelo transgénico de KSHV-GPCR es que el mini promotor de CD2 utilizado en estos experimentos restringe la expresión de KSHV-GPCR a células T y NK, excluyendo al precursor hematopoiético endotelial y de las células ahusadas de Kaposi que son infectadas por KSHV, aunque existe la posibilidad de que CD2 se exprese transientemente durante la maduración de los angioblastos. Además algunos de los mecanismos claves de control que impiden la transformación celular no están conservados entre las células de ratón y las células humanas (ver mas adelante).

Por estos motivos decidimos estudiar el efecto de la expresión del GPCR viral en células endoteliales primarias humanas. Con este propósito construimos un retrovirus recombinante que codifica para una versión tagueada de KSHV-GPCR (HA-KSGPCR) con el que fuimos capaces de transducir y posteriormente seleccionar eficientemente

células HUVECs que expresaban establemente HA-KSHV-GPCR, creando de este modo la línea celular ECs-KSHV-GPCR.

Utilizando el súper-agonista Gro- $\alpha$  fuimos capaces de demostrar que esta quemoquina es capaz de activar ERK1/2 específicamente en las células endoteliales que expresan HA-KSHV-GPCR y no en las células transducidas con EGFP o sin transducir, demostrando que KSHV-GPCR es capaz de activar en células endoteliales a esta MAPK.

### **Fenotipo de las Células Ecs-KSGPCR**

Las células ECs-KSGPCR sufren drásticos cambios fenotípicos que se evidencian morfológicamente (forma más ahusada y dendrítica, mayor refringencia) y molecularmente (cambios en la estructura del citoesqueleto y secreción de metaloproteasas). Además estas células no forman la monocapa en forma de empedrado característica de las células endoteliales ya que no establecen uniones adherentes entre sí. Es interesante resaltar que las células transducidas expresaban PECAM indicando que se trataba realmente de células endoteliales, a pesar de ello no pudo detectarse VE-caderina en las células ECs-KSGPCR sugiriendo una explicación molecular para la falta de uniones adherentes entre estas células.

Otra característica de las células ECs-KSGPCR es la resistencia a la apoptosis por privación de suero. Llamativamente este fenotipo puede ser inhibido específicamente cuando se incuban estas células en presencia de IP-10 (que actúa como agonista inverso de KSHV-GPCR).

Estos resultados demuestran que KSHV-GPCR media este efecto antiapoptótico.

Como PI3K/Akt es una de las principales vías antiapoptóticas y se ha demostrado que otros GPCRs tienen la capacidad de activar a PI3K/Akt decidimos ver si KSHV-GPCR era capaz de activar a Akt.

Utilizando Gro- $\alpha$  como superagonista se demostró que KSHV-GPCR es capaz de activar la vía anti-apoptótica de transducción de señales de Akt.

Para demostrar que la activación de esta vía estaba causalmente relacionada con el fenotipo de resistencia a la apoptosis por privación de suero se incubaron las células ECs-KSGPCR (o controles apropiados) en presencia del inhibidor farmacológico de PI3K LY..... que inhibió dramáticamente el fenotipo antiapoptótico de las células endoteliales que expresaban el receptor viral, notablemente este fenotipo puede ser parcialmente rescatado (a bajas dosis de LY) en presencia de Gro- $\alpha$ .

Estos experimentos demuestran que KSHV-GPCR es capaz de activar la vía antiapoptótica PI3K/AKT.

Es interesante resaltar el rol regulatorio que tiene PI3K en la estructura del citoesqueleto, sin embargo es necesario realizar experimentos adicionales para determinar el rol de esta quinasa en las alteraciones en la estructura de actina observadas en las ECs-KSGPCR. La vía PI3K/Akt juega también un rol sumamente importante en la biología endotelial, no solo está implicada en la diferenciación de células endoteliales durante los procesos angiogénicos si no que también es uno de los mecanismos por los cuales VEGF induce la supervivencia de células endoteliales. Normalmente la activación de Akt por VEGF ocurre cuando el receptor de VEGF activado recluta a VE-Caderina, remarcablemente en las ECs-KSGPCR, donde VE-caderina no se expresa, la vía PI3K/AKT es también activada, pero como consecuencia de expresión de KSHV-GPCR.

Todas las características de las ECs-KSGPCR mencionadas anteriormente son reminiscentes del fenotipo transformado, sin embargo será necesario realizar el experimento de *anchorage independent growth* o la *formación de tumores en ratones inmunodeficientes* para poder definir si estas células están realmente transformadas y si eventualmente son tumorigénicas.

### **Modelando el rol de KSHV en la patogénesis del SK : Inmortalización de células endoteliales primarias humanas por expresión de KSHV-GPCR.**

Como se ha discutido en la sección de resultados la expresión de KSHV-GPCR induce la estabilización de la longitud de los telómeros por un mecanismo alternativo (ALT) que es independiente de la enzima telomerasa y también la inmortalización de células endoteliales.

En nuestro conocimiento, el ORF74 es el primer gen descrito de KSHV cuyo producto es una proteína inmortalizante. Dada la importancia central que tiene la inmortalización en los procesos oncogénicos (ver sección... de resultados y mas adelante) y que estos experimentos fueron realizados en células endoteliales primarias humanas estas

observaciones podrían ser relevantes en el contexto de la patogénesis del SK ya que sugieren uno de los mecanismos por los cuales KSHV, a través de la expresión de KSHV-GPCR, podría estar afectando dramáticamente la biología endotelial contribuyendo de este modo al desarrollo de las lesiones del SK.

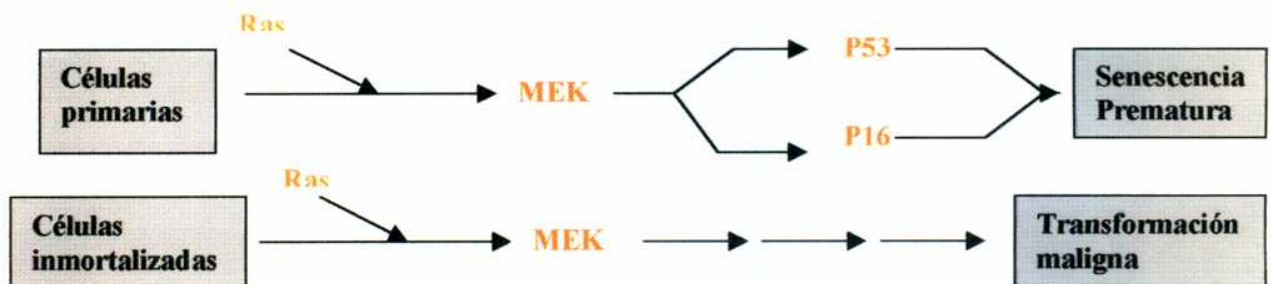
Dado que las células HUVECs utilizadas en estos experimentos fueron transducidas con retrovirus cabe la posibilidad de que los fenotipos observados sean una consecuencia de mutaciones originadas estocásticamente por la inserción retroviral en el genoma celular y que no estén relacionados con la expresión de KSHV-GPCR. Varias líneas de evidencia sugieren que este no es el caso ya que:

- Nunca se observó inmortalización de las células HUVECs transducidas con retrovirus que codificaban para EGFP o AP y que fueron pasajeadas y seleccionadas en paralelo.
- El fenotipo de las ECs-KSGPCR es reproducible: Si se transducen nuevamente células endoteliales con el retrovirus que codifica para KSHV-GPCR se observa el mismo fenotipo que el de las ECs-KSGPCR (aunque nunca se determinó si estas nuevas células estaban también inmortalizadas)
- Varios de los fenotipos anteriormente descritos son incrementados por Gro-a e inhibidos por IP10 indicando que KSHV-GPCR tiene un rol activo en el mantenimiento del fenotipo de las ECs-KSGPCR.
- Si la inmortalización fuera consecuencia de una mutación insercional se esperaría que las células ECs-KSGPCR fueran clonales y nunca se ha observado la formación de un "cuello de botella" y la consecuente formación de focos clonales resistentes a G418 durante el proceso selectivo.

Para determinar si el origen de las ECs-KSGPCR inmortalizadas era clonal o oligoclonal ( en general, por motivos que no se discuten en este texto, cuando se transduce con retrovirus las poblaciones son oligoclonales como puede verse por ejemplo en Hahn W. 2000) se purificó ADN genómico de células que habían sido pasajeadas por más de cuatro meses en cultivo, se digirió con una enzima que corta el vector retroviral en un único sitio (o en dos para controlar el proceso de hibridación y la calidad de la sonda) y luego se realizó un Southern-blot utilizando como sonda una corta secuencia específica de KSHV-GPCR.

Como se ve en la figura la y como se esperaba la población de ECs-GPCR es oligoclonal, sin embargo únicamente se observan dos bandas principales y tres bandas

mas tenues indicando que posiblemente exista un proceso de selección que favorece a las subpoblaciones mayoritarias. Se desconoce si ello se debe a efectos transcripcionales posicionales o a que otras mutaciones de origen desconocido favorecen selectivamente a estas subpoblaciones. Se necesitan mas experimentos para determinar certeramente la evolución de la oligoclonalidad en función del tiempo, pero el hecho de que nunca se halla observado un cuello de botella durante la selección indica que este reemplazo es gradual. Dado que fuimos aumentando gradualmente la dosis de G418 a la que seleccionamos las células endoteliales (desde 200ug/ml hasta 400ug/ml) una posibilidad obvia es que hayamos seleccionado gradualmente las células en donde el sitio insercional permitía una mayor actividad transcripcional de el gen que confiere resistencia a G418. Otra posibilidad sumamente interesante es que la selección de determinadas subpoblaciones este relacionada con el proceso de immortalización (y posiblemente de transformación) inducido por la expresión de KSHV-GPCR ya que normalmente la expresión de oncogenes en células primarias activa p53 y p16 (que está en la vía de Rb) los cuales inducen la senescencia prematura y eventualmente la muerte de estas células (ver figura, Lin A, 1998).



**Figura.. Los oncogenes transformantes usualmente inducen senescencia prematura cuando se expresan en células primarias.**

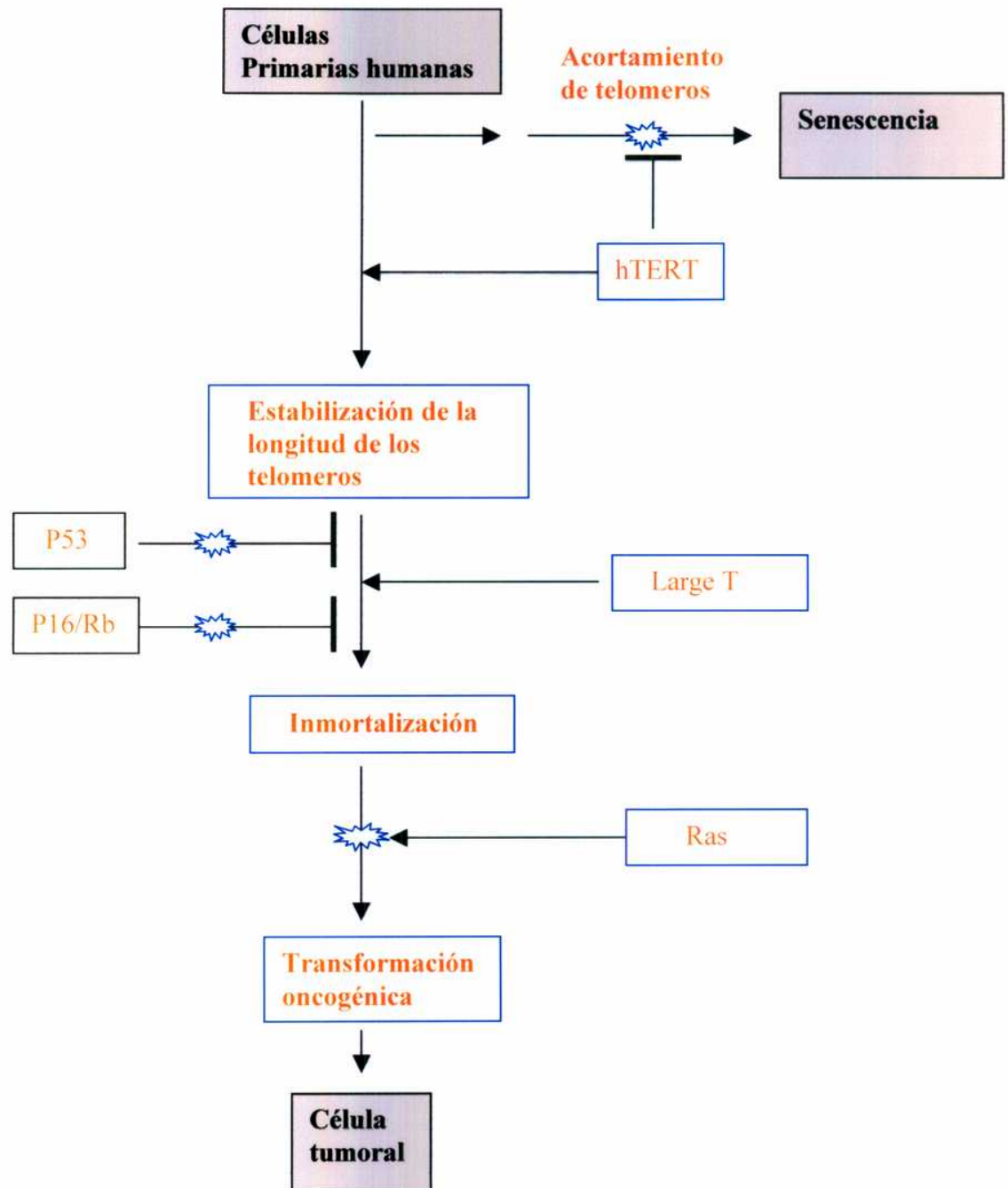
¿Son ,tal vez, las subpoblaciones prevalentes clones con mutaciones secundarias capaces de controlar la eventual activación de p53 y p16 que se produce como consecuencia de la expresión de KSHV-GPCR?

Para intentar responder esta pregunta hicimos experimentos preliminares de Western-blot con la idea de medir los niveles intracelulares de p53 y p16 en las Ecs-KSGPCR.

Como puede verse en la figura los niveles de p53 son llamativamente menores que los de las células control y además no se incrementan cuando se hambrea a las células sugiriendo que de algún modo las células ECs-KSGPCR controlan los niveles de p53. Sin embargo los niveles de p16 son sorprendentemente altos y pueden ser incrementados si se estimula a las células con Gro- $\alpha$  sugiriendo que las vías reclutadas por KSHV-GPCR de algún modo activan la expresión de p16. A pesar de que p16 es un marcador de senescencia, las ECs-KSGPCR están inmortalizadas, proliferan y muestran características que son reminiscentes al fenotipo transformado. Estos resultados sugieren que KSHV-GPCR, al igual que el resto de los oncogenes, es capaz de controlar solo parcialmente los mecanismos de TPA (Terminal Proliferation arrest) ya que a pesar de que las EC-KSGPCR están inmortalizadas y la longitud de sus telómeros está estabilizada, expresan altos niveles de p16, un porcentaje importante de ellas tiene actividad endógena de  $\beta$ -galactosidasa, que es otro marcador de senescencia (datos no mostrados), y proliferan más lentamente que células HUVECs de bajo pasaje (Datos no mostrados).

Weinberg y otros demostraron hace casi dos décadas que las células de ratón necesitan un mínimo de dos eventos oncogénicos para transformarse (Land H, 1983), estos resultados sugerían que las alteraciones genéticas actúan cooperativamente en la transformación oncogénica. Sin embargo cuando se intentaron realizar experimentos similares con células humanas estos fallaron sistemáticamente, indicando que existen importantes diferencias en los mecanismos de control de la transformación celular entre roedores y humanos. Experimentos recientes han puesto en evidencia que estas diferencias se deben mayormente a los mecanismos de control de la longitud de los telómeros. Este año (Hahn W. 2000) el grupo dirigido por Weinberg R. pudo transformar por primera vez una célula primaria humana utilizando elementos genéticos





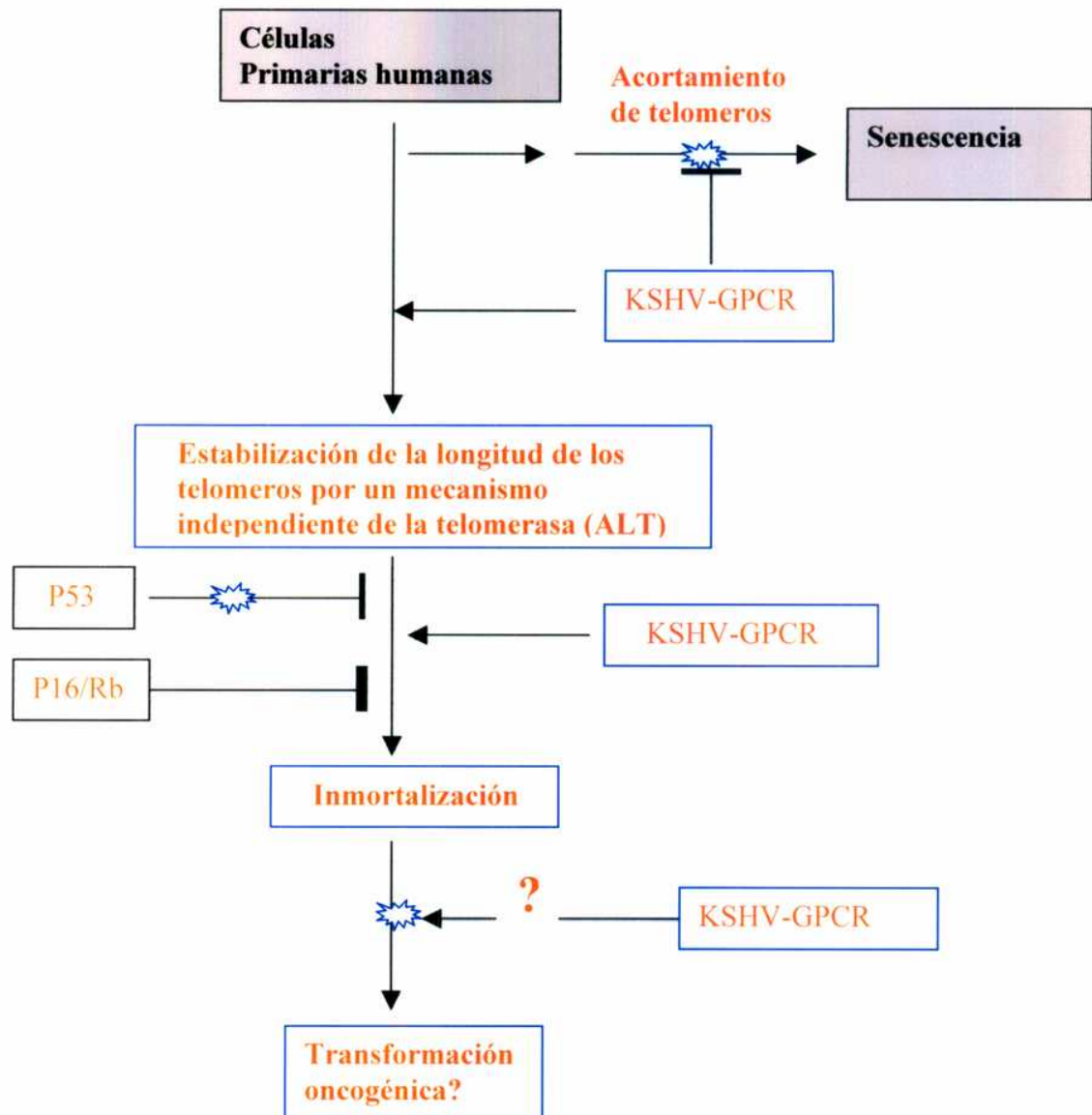
**Figura 4: Eventos genéticos mínimos necesarios para transformar una célula primaria humana en una célula tumoral.** La figura muestra que al menos cuatro vías distintas están involucradas (Weitzman J, 2000 y Hahn W, 2000)

definidos. En este trabajo se demostró que el número de eventos mínimo para transformar una célula humana son tres ya que fue necesario expresar hTERT para estabilizar la longitud de los telómeros y evitar la fase de crisis, el antígeno "large T" para anular a p53 y Rb (inmortalización) y Ras como oncogen transformante para que células humanas "normales" se vuelvan tumorigénicas (ver figura).

El hecho de que la expresión de KSHV-GPCR tenga distintos efectos bioquímicos y biológicos dependiendo el tipo celular en donde se expresa y de que algunos de los mecanismos básicos de transformación oncogénica sean diferentes entre las células humanas y las de ratón subraya la importancia de la experimentación en células endoteliales primarias humanas.

Un aspecto interesante de KSHV-GPCR es que puede actuar como un oncogen transformante (experimentos en NIH3T3 y resultados preliminares en ECs) pero también actúa como oncogen inmortalizante (experimentos en células endoteliales) lo cual posiblemente disminuya el número de eventos oncogénicos necesarios para transformar una célula humana primaria (ver figura 5). Experimentos adicionales de cooperatividad oncogénica entre KSHV-GPCR y los oncogenes previamente mencionados serán necesarios para determinar si este es el caso.

Como se ha mencionado anteriormente, KSHV posee un número importante de genes capaces de interactuar con p53 y la vía p16/Rb ( figura 13) que podrían cooperar oncogénicamente con KSHV-GPCR en la transformación de células primarias endoteliales humanas, algunos de ellos, al ser latentes, están constitutivamente expresados en las células que KSHV infecta de modo que se co-expresan con KSHV-GPCR, nosotros pensamos que sería sumamente relevante evaluar el efecto de vGPCR en células endoteliales que expresen por ejemplo vCycD o alternativamente el cluster completo de genes latentes de KSHV. Nuestros experimentos utilizando retrovirus recombinantes anfotrópicos demuestran que es posible estudiar la biología de células



**Figura 5: Efectos oncogénicos de la expresión de KSHV-GPCR en células endoteliales primarias humanas.** La expresión de KSHV-GPCR estabiliza la longitud de los telómeros por un mecanismo alternativo (ALT) que no implica la activación de la enzima telomerasa., posteriormente y por un mecanismo aun no caracterizado, pero que implicaría la regulación de los niveles de p53, estas células se immortalizan. Experimentos preliminares sugieren que estas células podrían estar transformadas; a pesar de ello las Ecs-KSGPCR proliferan mas lentamente que las HUVECs de bajo pasaje y muestran algunos marcadores de senescencia como ser altos niveles de p16 y actividad endógena de  $\beta$ -galactosidasa alcalina. Se desconoce actualmente cuales de los otros genes de KSHV que se co-expresan con KSHV-GPCR en las células infectadas por este virus pueden actuar cooperativamente en la transformación oncogénica de células endoteliales primarias.

primarias endoteliales humanas transducidas con genes de KSHV y de este modo proponen una metodología para modelizar la patogénesis del SK "reconstruyendo" paso por paso utilizando elementos genéticos definido el genoma de KSHV en células endoteliales primarias (que son infectadas por este virus en las lesiones del SK). Una interesante variante "in vivo" de este mismo experimento consiste en transducir células hematopoiéticas (humanas o de ratón) con estos retrovirus que codifican para genes de KSHV candidatos y "reconstituir" mediante el trasplante de medula ósea "infectada" el sistema inmune de ratones "huésped" previamente irradiados, para ver si de este modo podemos recapitular "in vivo" la patogénesis de las lesiones del SK.

Como se ha mencionado en la introducción, a pesar de la abrumadora evidencia que soporta la idea de que KSHV es el agente etiológico del SK, la demostración formal del rol causal de KSHV en el desarrollo del SK depende de la creación de modelos animales de patogenia y de infección. A pesar de ello es importante resaltar que KSHV es un virus que infecta específicamente células humanas y que no se conocen enfermedades similares al SK en animales: es factible que la patología del SK dependa de características biológicas que son inherentes a los humanos y la modelización en animales de los patologías asociadas a KSHV no sea posible. Alternativamente los sistemas experimentales que proponemos en este trabajo, no permiten probar causalidad, pero han demostrado ser una poderosa herramienta en la comprensión de los potenciales mecanismos moleculares de patogénesis de este virus y tal vez contribuyan a la entendimiento de los proceso linfoproliferativos y angiogénicos en general y en particular al desarrollo de terapias mas racionales para el tratamiento de las enfermedades asociadas a la infección a la infección con KSHV.

## Conclusiones:

KSHV (Kaposi Sarcoma associated Herpes Virus) es un  $\gamma$  herpesvirus oncogénico que está implicado en la patogénesis del sarcoma de Kaposi. Este virus codifica en su genoma para un número inédito de genes con homología a genes regulatorios celulares que podrían ser oncogénicos y/o angiogénicos. Dada la ausencia de modelos animales para estudiar el rol de KSHV en la patogénesis del sarcoma de Kaposi se decidió utilizar una estrategia de genes candidatos para evaluar si la expresión ectópica de alguna de estas proteínas virales era capaz de inducir fenotipos relevantes a esta patología.

El marco de lectura 74 (ORF74) de KSHV codifica para un receptor acoplado a proteína G (KSHV-GPCR) que es activo constitutivamente (es ligando independiente). Anteriormente se había demostrado que GPCRs constitutivamente activados pueden ser oncogénicos y de que KSHV-GPCR es sumamente homólogo al receptor humano de IL-8 (una quemoquina angiogénica). Las evidencias anteriormente mencionadas sugerían que este gen viral era un excelente gen candidato para inducir dos de los fenotipos, transformación celular y angiogénesis, que podrían ser relevantes en el contexto de la patogénesis del sarcoma de Kaposi.

En este trabajo, mediante el ensayo de formación de focos (FFA), se demostró que, en fibroblastos inmortalizados de ratón (NIH3T3), KSHV-GPCR induce reproduciblemente focos de transformación celular exactamente tres semanas después de que las células lleguen a confluencia. Cuando estas células transformadas por KSHV-GPCR se inyectan en ratones "nude" causan tumores indicando que las consecuencias de la expresión de este receptor viral son mucho más diversas y complejas que la simple pérdida de el mecanismo de inhibición por contacto y que son capaces de formar tumores "in vivo".

Estos resultados demuestran inequívocamente la actividad oncogénica de KSHV-GPCR en las células NIH3T3. El potencial patogénico de esta proteína viral sugiere que podría participar en los procesos de transformación celular mediados por KSHV.

La angiogénesis juega un importante rol en la patogénesis del sarcoma de Kaposi.

Las lesiones de SK se forman como consecuencia de la activa proliferación de células endoteliales y ahusadas (supuestamente de origen endotelial) que según algunos experimentos y análisis de las lesiones, en los estadios iniciales de la enfermedad, no estarían completamente transformadas pero que serían sumamente angiogénicas.

En los mamíferos adultos las células endoteliales son normalmente quiescentes y solo se activan angiogénicamente en situaciones muy definidas como el ciclo menstrual de las hembras o en situaciones patológicas ( cura de heridas, regeneración de órganos, oncogénesis).

El "switch angiogénico" en un tejido o tumor está controlado por el balance relativo entre inhibidores y activadores de la angiogénesis que se hallan presentes sistémicamente y en el micro ambiente donde estas células se encuentran. Se trata pues de un mecanismo sujeto a estrictos controles regulatorios.

KSHV-GPCR es una proteína viral candidata a ser un activador angiogénico ya que tiene un alto grado de homología con el receptor de la quemoquina angiogénica IL-8 (Kolch 1992) e induce actividades transcripcionales que podrían regular la expresión de factores angiogénicos como VEGF y bFGF (Arvanitakis 1997).

Utilizando los ensayos de proliferación de células endoteliales y el de morfogénesis vascular "in vitro" se demostró que los medios condicionados provenientes de las células NIH3T3 (no transformadas y transformadas) que expresan KSHV-GPCR son angiogénicos y que la angiogenicidad está mediada por VEGF. Estos resultados demuestran que la expresión de KSHV-GPCR es suficiente para inducir un desbalance entre los activadores e inhibidores de la angiogénesis activando de este modo un switch angiogénico ( Hanahan D y Folkman J. 1996) mediado por VEGF que podría parácrina y/o autócrinamente incrementar la proliferación de células endoteliales y la formación de vasos en las lesiones del sarcoma de Kaposi.

A pesar de la abrumadora evidencia que señala al virus KSHV como agente etiológico del sarcoma de Kaposi no se ha podido hasta la fecha demostrar formalmente causalidad. Los experimentos previamente mencionados representan una de las primeras evidencias experimentales que muestran que el virus KSHV posee la maquinaria molecular capaz de causar los fenotipos patológicos más característicos del sarcoma de Kaposi.

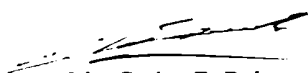
El trabajo realizado anteriormente en esta tesis también sugiere que KSHV-GPCR es un oncogen viral que tiene la capacidad de activar vías de transducción de señales, que en células de mamífero como las NIH3T3, son capaces de desencadenar procesos de transformación y tumorigenicidad.

En consecuencia, Se realizaron una serie de experimentos para poder estudiar las cascadas de señalización que resultaban activadas por KSHV-GPCR en células de mamífero y en particular en las células NIH3T3. Utilizando el ensayo de quinasas "in vitro" se demostró que KSHV-GPCR activa en las células HEK293T a p38 y JNK, dos miembros de la familia de las

MAPK que son activados por estímulos inflamatorios y de Stress. Sorprendentemente la MAPK ERK-2 que resulta activada por estímulos proliferativos y que interviene en el mecanismo de transformación de numerosos oncogenes no resultó activada en este ensayo. En este trabajo también se demostró que, en las células NIH3T3, KSHV-GPCR activa miembros de la familia de las MAPK y como consecuencia de ello es capaz de regular elementos transcripcionales relacionados con la proliferación celular (SRE) y la inflamación. Experimentos realizados con dominantes negativos demuestran la importancia de la activación de las cascadas pro-inflamatorias en el mecanismo de transformación celular inducido por expresión de KSHV-GPCR.

En la parte final de esta tesis se construyó un sistema de transducción retroviral mediante el cual se pudo expresar KSHV-GPCR en células endoteliales primarias humanas, que son células blanco del virus KSHV. La expresión de esta proteína altera dramáticamente la morfología endotelial, induce rearrreglos en el citoesqueleto e incrementa la secreción de metaloproteasas.. Notablemente las células endoteliales mantienen constante la longitud de sus telómeros por un mecanismo alternativo que es telomerasa independiente (ALT) y se immortalizan como consecuencia de la expresión de KSHV-GPCR . Los mecanismos moleculares que permiten incrementar la supervivencia de estas células incluyen la activación de la vía anti-apoptótica AKT/PKB y la expresión sostenida de receptores angiogénicos (algo que nunca se había logrado anteriormente en cultivo de células endoteliales humanas “in vitro”).

Estos resultados tienen implicancias que conciernen al rol de KSHV en la patogénesis del sarcoma de Kaposi ya que muestran que KSHV-GPCR puede ser un determinante patogénico de este virus involucrado en procesos de transformación y activación angiogénica en las células endoteliales y tumorales de las lesiones.



Lic. Carlos E. Bais



Dr. Enrique A. Mesri



# **MATERIALES Y MÉTODOS**



# Materiales y métodos:

## Medios de cultivo:

### **Células endoteliales ( HUVECs e IBMECs):**

- Crecimiento: M199, 20% FBS, 4ng/ml bFGF, P/S 1%
- Ensayos de proliferación: M199, 10% CS, P/S 1%
- Hambreado (medio libre de suero): medio X-Vivo

### **Células NIH3T3:**

- Crecimiento: DMEM, CS10%, P/S 1%
- Hambreado: DMEM, HEPES 10mM

### **Células HEK293T, Fenix, y Cos7**

- Crecimiento: DMEM, FBS10% HI, P/S 1%
- Hambreado: DMEM, HEPES 10mM.

## Mantenimiento de células:

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en una incubadora a 37°C y a una presión de CO<sub>2</sub> del 5%.

Como regla general nunca se dejó que las líneas celulares lleguen a confluencia (ya que esto disminuye la eficiencia de transfección y que en el caso de las NIH3T3 aumenta el porcentaje de transformantes espontáneas)

Las células se pasajearon regularmente utilizando Tripsina/EDTA para despegarlas.

Las células endoteliales fueron cultivadas en placas primarias o recubiertas con gelatina.

## Ensayos Angiogenicos:

- **Ensayo de proliferación/supervivencia:**

Para el ensayo de proliferación se plaquearon 10.000 Huvecs por well (12 well plate) en placas sin gelatina utilizando como medio DMEM/CS10% más 10% de medio condicionado o dosis crecientes de VEGF para los controles positivos. 5 días después las células fueron tripsinizadas y contadas utilizando un contador de células (coulter counter).

- **Ensayo endotelial de formación de estructuras tubulares:**

Para estos ensayos se cubrieron las placas con matrigel (collaborative Biomedical Products). Este material es líquido a 0 C pero se solidifica a temperatura ambiente de modo que se mantiene fundido en hielo y

se vuelca sobre las placas en estado líquido. Se incuban las placas a 37C (para solidificar el matrigel) y luego se plaquean 10.000 células endoteliales en DMEM/CS10% por 18-24hs.

## **Transfección de células NIH3T3 con Lipofectamina (GIBCO BRL)**

Este protocolo es para transfectar células creciendo en placas de 30mm de diámetro (típicos six well plates) si se cambia el número de células a transfectar el protocolo debe ajustarse proporcionalmente de acuerdo con la superficie de la placa en donde se va a realizar el experimento.

1. El día anterior a la transfección se deben plaquear aproximadamente 120.000 células por placa (la idea es que esten al 60-80% de confluencia en el momento de la transfección).
2. 18/24hs despues se mezclan N x 100ul de DMEM SF (sin agregado de suero) con N x 2ug del ADN que se desea para transfectar N placas con ese particular ADN(Sc. A)
3. simultáneamente se prepara una solución que contiene N x 100ul de DMEM SF con N x 6ul de lipofectamina para transfectar N placas.(SC. B)
4. Se mezclan Nx100ul de SC. A con Nx100ul de SC B (200ul totales por placa) y se incuba a temperatura ambiente durante 30-45' hasta que los complejos de liposoma y ADN se formen.
5. Mientras tanto se lavan las células en las que se va a realizar la transfección descartando el medio de cultivo y remplazandolo por 2ml de DMEM
6. Despues de los 45' de incubación de los complejos se agregan Nx800ul de DMEM SF (SC. C)
7. Sacar las placas del incubador de 37C , descartar el medio que tienen (DMEM) y remplazarlo por 1ml de la (Sc. C)
8. Incubar durante 5hs (la lipofectaminay luego agregar 1ml de DMEM/CS 20% (esto es para que las ceelulas se recuperen)por placa incubar hasta el día siguiente (O/N)
9. Remplazar el medio de transfección por 2ml de DMEM/CS 10% fresco

Eficiencia de transfección: aproximadamente 50%

DMEM=DMEM sin suero (el suero inhibe la transfección con lipofectamina)

## **Estudios de genes reporteros:**

1. 120.000 células NIH3T3 fueron plaqueadas por well (six well plate) 18-24hs antes de la transfección.

2. Las células fueron transfectadas a aproximadamente a 65% de confluencia con lipofectamina siguiendo el protocolo especificado previamente.
3. A la mañana siguiente se reemplaza el medio por DMEM/ HEPES 10mM y se deja a las células hambreadose por 24-36hs (esto se hace por que varios ligandos presentes en el suero son capaces de activar las mismas vías de transducción que uno esta midiendo disminuyendo de este modo considerablemente la sensibilidad de este sistema para detectar activaciones específicas).
4. Se cosechan las células lisandolas con el buffer de lisis pasiva de Promega y se procede a la medición luminométrica de la actividad enzimática siguiendo el protocolo provisto para el sistema Dual renila/luciferasa de Promega.
5. Los niveles de activación son el promedio de varios experimentos repetidos por triplicado y se obtienen de la proporción entre la actividad de luciferasa (que refleja la actividad del gen reportero) normalizada por la eficiencia de transfección de cada ensayo ( cuantificada a través de la actividad transcripcional de el vector constitutivamente activo CMV/renila).

## **Producción de retrovirus en las líneas empaquetadoras fenix**

### **Día 0:**

El día anterior de la transfección se plaquean aproximadamente 1.800.000 células empaquetadoras "de pasajes tempranos" por placa de 6cm (el número de células que produce el mayor título viral varia para cada diferente constructo). Es muy importante agitar la placa "en cruz" para que la distribución de las células sea homogenea.

### **Día 1: Transfección de células empaquetadoras**

1. Delicadamente (este tipo de células se adhieren muy debilmente a las placas) se reemplaza el medio por 3ml de medio nuevo y 5' antes de agregar la mezcla de transfección se agregan a cada placa 25uM final de cloroquina (la cloroquina inhibe las DNAsas lisosomales duplicando de este modo el título viral. Si no se necesitan alcanzar muy altos títulos virales o si el constructo a utilizar es tóxico no se recomienda utilizar cloroquina, por ejemplo para la producción de partículas retrovirales que codificaban para KSHV-GPCR no se utilizó cloroquina).
2. Usando el protocolo standar de transfección por CaCl<sub>2</sub> se transfectan las células con aproximadamente 5-8ug de plásmido (nuevamente la cantidad optima de plásmido tiene que ser optimizada para cada constructo, en el caso de KSHV-GPCR fue de 4,5ug). Si el vector retroviral que se esta utilizando no codifica para un gen reportero mezclar 0.5ug de un plásmido de expresión que incluya el gen de  $\beta$ -gal (u otro gen reportero) con la mezcla de transfección para cuantificar la eficiencia de transfección.

3. 10hs mas tarde ( la cloroquina empieza a ser tóxica despues de 10-12hs) se cambia el medio por 3ml de medio fresco y se incuba por 24hs a 32C (las particulas virales son mas estables a esta temperatura, si no se tiene una incubadora a esta temperatura se puede incubar a 37C).
4. iv) Si se desea calcular el título viral plaquear unas 100.000 NIH3T3/ por placa de 6cm

### **Día 2-3: Colección de particulas virales, determinación de la eficiencia de transfección e Infección con retrovirus .**

24 después de la transfección las células empaquetadoras deben estar prácticamente en confluencia. Si las células están a menos de 80% de confluencia probablemente la proteína codificada en el retrovirus recombinante sea tóxica para estas células, si este es el caso se recomienda empezar el experimento de vuelta aumentando el número de células plaqueadas inicialmente, disminuyendo la cantidad de plásmido transfectado y/o eliminando la cloroquina.

1. Reemplazar el medio por 3ml de medio fresco (opcional) e incubar las células a 37C
2. Entre 36hs 72hs después de la transfección se colectan los retrovirus (generalmente el pico es a las 48hs aunque se pueden recoger virus cada 12hs (a partir de las 36hs y hasta las 72hs) sin considerables diferencias de título.
3. Para coleccionar el virus se recoge el medio, se centrifuga a 1300g 5' o alternativamente se puede filtrar (filtros de 0.45um con baja afinidad por proteínas) y se guarda el sobrenadante viral del siguiente modo:
  - a. a 4°C si se va a infectar en ese o en los próximos días.
  - b. Se congela rápidamente en hielo seco o nitrógeno líquido (snap shot) y se guarda a -70C hasta que se utilice (en cada ciclo de congelamiento-descongelamiento se pierde aproximadamente la mitad del título viral)
4. Teñir las células empaquetadoras para "cuantificar" la eficiencia de transfección (esto es para estar seguro que las diferencias de títulos virales no se deben a distintas eficiencias de transfección)
5. Para calcular los títulos virales cambiar el medio de las NIH3T3 y agregar 2ml de medio y agregar 5ug/ml de polibreno 5' antes de la infección. Si el marcador es  $\beta$ -gal o AP diluir seriadamente el sobrenadante viral (1/10 hasta 1/10000000) y agregar 1ml de cada sobrenadante viral en cada placa. Para EGFP o cualquier gen detectable por FACS infectar con 1ml, 100ul, 10ul o 1ul.000

## **Protocolo general de Western-blot**

Protocolo general para 200.000 células endoteliales plaqueadas en multiplacas de 30mm de diametro ( "6 well plate" )

### **A) Blotteeo de proteínas:**

**i)Plaqueo:** Las células fueron plaqueadas en placas primarias o alternativamente en placas previamente recubiertas en gelatina (2%) Usualmente se dejó que las células se adhieran O/N y a la mañana siguiente, en el caso de los experimentos de quinasas, después de lavar con PBS se cambió el medio por medio libre de suero (X-Vivo) en donde se incubaron a las células 24hs mas (esto es para disminuir los niveles basales de activación de las quinasas).

**ii)Lisis:** Las células se estimularon con los tratamientos correspondientes y fueron lisadas directamente en 100ul de "cracking buffer" 1X con ayuda de un "scaper", estos lisados fueron luego colectados en tubos eppendorf previamente enfriados en hielo, que se vortexearon por 10' (para facilitar la lisis y para romper el ADN genómico), luego calentados a 95°C por 5' y enfriados en hielo nuevamente.

### **iii) SDS-PAGE y transferencia:**

Aproximadamente 20ul de cada muestra fueron utilizados para sembrar en un gel chico (10cm x10cm) de poliacridamida (12.5%) y 50ul para uno grande. La membrana de transferencia, PVDF, fue activada en MEOH por 20'' y lavada por 20'' en agua. Luego se realizó la transferencia (1,5hs a 100V o 25V O/N) después de lo cual la membrana de PVDF fue secada en papel 3MM

### **B) Bloqueo de membrana e incubación con anticuerpos (volumenes para 100cm<sup>2</sup> de membrana).**

1. Reactivar la membrana (20'' MEOH y 20'' agua)
2. Bloquear en 10% de TBST/leche por 1 h.
3. Lavar la membrana 5' (X3) en 15ml de TBST.
4. Diluir el anticuerpo primario en la proporción adecuada (ver mas abajo) en 10ml de 5% TBST/leche e incubar la membrana en esta solución (O/N a 4°C)
5. Recuperar la solución con el primer anticuerpo (puede guardarse a -20°C y reutilizarse hasta 3 veces) y hacer dos lavados rápidos en 15ml de TBST, uno de 15' y dos de 5'.

6. Incubar la membrana con 10 ml de la dilución anticuerpo anti-HRP (1:2000 en 5% de TBST/leche) por 1h.
7. Lavar como en 5.

**C) Detección de proteínas:**

- Se utilizó la técnica de ECL ( Amersham. Cat #..) según se indica en el manual de instrucciones.

**Diluciones de primeros anticuerpos para WB:**

**Anticuerpos fosfoespecificos ( dilución 1:1000):**

- Phospho-p44/p42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204) Antibody. New England BioLabs. Cat. # 9101S
- PhosphoPlus Akt (Ser473) Antibody Kit (incluye anticuerpo general anti- Akt) .Cell signaling.Cat #9270
- PhosphoPlus p38 MAPK (Thr180/Tyr182) Antibody kit (incluye anticuerpo general anti- p38) Cell signaling. Cat.# 9210

**Anticuerpos anti MAPKs (dilución 1:500)**

- ERK-2 (C-14). Santa cruz. Cat.# sc-154
- P38 (C-20)-G. Santa Cruz. Cat. # SC-535-G
- Purified Mouse Anti-Human JNK1. PharMingen. G151-333

**Anticuerpos anti-“Gatekeepers” (2ug/ml)**

- Purified Anti-Human p16/ink4 monoclonal antibody. Pharmingen.Cat#13381A
- Purified Anti-Human p53 monoclonal antibody. Pharmingen.Cat#15791A

**Anticuerpos Anti-HA.11 (1:1000):**

- Monoclonal antibody, HA.11. Babco/COVANCE. Catalog # MMS-101R

**Soluciones (WB):**

- **TBS 1X:** 20mM Tris pH 7,4  
500mM NaCl
- **TBST:** TBS + 0.1% Tween 20
- **TBST/leche:** TBST con 5 o 10% (segun indique el protocolo) de leche en polvo deshidratada y descremada.

- **SDS-Sample buffer:**  
62.5mM Tris HCl  
2% W/V SDS  
10% glicerol  
50mM DTT  
0.1% azul de bromofenol
- **Buffer de transferencia:**  
Tris-gly buffer (BioRad)  
20% MEOH
- **Buffer de corrida:**  
Tris-gly-SDS (BioRad)

## **“Stripping” de los inmunoblots en membranas de PVDF**

Para poder reutilizar la membrana “blotteada “ es muy importante no dejar que se seque nunca entre los ciclos de inmunodetección ya que los anticuerpos quedaran permanentemente fijados si la membrana accidentalmente se seca. Se recomienda guardar las membranas en bolsas de nylon selladas que contengan TBST.

1. Sumerga el blot 30' en una solución a 50°C de: 100mM 2-mercaptoetanol ( $\beta$ -MSH), 2%SDS, 62,5mM de Tris-HCl a pH 6,7.
2. Lave la membrana profusamente en TBST hasta uqe no quede olor a  $\beta$ -MSH.
3. Proceder al bloqueo de la membrana y luego continúe con el protocolo “standard” de WB.

## **TRAP (Telomerase Repeat Amplification Protocol)**

Para el experimento de TRAP se utilizó el kit de TRAPeze Telomerase detection kit ( Intergen Company; Catalog # S7700) según el protocolo que recomienda la compañía que lo manufactura, con la única modificación de que se utilizaron 26 ciclos de PCR en vez de 27.

Los productos de amplificación radioactivos fueron resueltos en un gel de poliacrilamida 12,5% (acrilamida/bisacrilamida 19:1) no desnaturalizante (sin urea) en 0.5X TBE. Una vez que el Xylene cyanol recorrió el 75% del gel, la corrida fue detenida, el gel secado y luego visualizado por autorradiografía.

## **Ensayo de quinasas “in vitro”**

### **Plaqueo de Células (día 0):**

El día anterior a la transfección se toma N placas de células de 10cm de diámetro a 80% de confluencia y se replaquean en la siguiente proporción:

Cos 7: en 5-8 placas de 6cm

HEK293T: en 10-15 placas de 6cm

NIH3T3: Usar placas de 10cm según el protocolo de transfección con lipofectamina (el protocolo es para placas de 35mm ajustar en proporción a la superficie).

### **Transfección (día 1):**

Transfectar según los protocolos de DEAE Dextran para Cos7, CaCl<sub>2</sub> para HEK293T y lipofectamina para NIH3T3.

Para HEK 293T y Cos7 usualmente 0,5ug del plásmido codificante para la quinasa tagueada y 1ug de plásmido “inductor” son suficientes. Para NIH3T3 agregar la cantidad máxima de ADN posible en la proporción “vector quinasa”1:2 “inductor”.

### **Hambreado (día 2-3):**

Usualmente 24-36hs después de la transfección se hambrean las células de 4-12hs para bajar al mínimo los niveles de activación endógena de las quinasas. También es importante para el ensayo de JNK que las células no alcancen la confluencia antes de ser lisadas ya que esto aumenta dramáticamente el background.

### **Lisis, IP y ensayo de quinasas in vitro (día 3-4):**

Como p38 y JNK son enzimas que son activadas por stress es conveniente ser extremadamente cuidadoso en la manipulación de las placas con las que se piensa hacer experimentos con estas quinasas. Se recomienda no manipular mas de dos placas a la vez y ponerlas en hielo inmediatamente después de sacarlas del incubador. En los experimentos donde se indica las células fueron incubadas por 20' antes de ser cosechadas con 10ug/ml de anisomicina (controles positivos de JNK y p38)

Si se usan células HEK293T hay que ser especialmente cuidadoso en los procedimientos de lavado por que se adhieren muy debilmente a la placa (se recomienda agregar el PBS contra el borde de la placa).

- 2) Descartar el medio y lavar una vez con PBS (previamente enfriado en hielo)
- 3) Agregar inmediatamente 600ul de lisis buffer (a 4°C) por placa de 6cm o 1ml por placa de 10cm.
- 4) “scrapear” y transferir los lisados a tubos eppendorf previamente enfriados y rotulados.
- 5) Agitar 10' a 4°C



- 6) Centrifugar 10' a 12000g (4°C)
- 7) Transferir los sobrenadantes a nuevos eppendorf (previamente enfriados y rotulados). Si se desea en este momento se pueden congelar los lisados a -70°C para ser utilizados cuando sea conveniente. Agregar 1ul de anticuerpo anti- HA.11 (Babco/COVANCE catalog # MMS-101R) o alternativamente 2ul del anticuerpo anti-quinasa endógena que se intenta medir.
- 8) Incubar por 2hs en un agitador orbital a 4°C.
- 9) Agregar 25ul de una suspensión de "gamma binding beads" (Pharmacia).
- 10) Agitar (fuerte) 1h a 4°C
- 11) Centrifugar a 12000g 15' y descartar el sobrenadante usando una pipeta pasteur y una bomba de vacío para succionarlo.
- 12) Lavar 3 veces con 1ml de lisis buffer frío (hacer un spin down entre cada lavado).
- 13) Lavar 1 vez con 1ml de agua fría
- 14) Lavar una vez más con 1ml de buffer de quinasa y succionar cuidadosamente todo el líquido
- 15) Agregar 30ul de buffer de quinasa radioactivo
- 16) Incubar por 30' a 30°C si es posible con agitación y atrás de una pantalla protectora de acrílico.
- 17) Terminar la reacción agregando 6ul de "protein loading buffer" 5X y luego calentar las muestras por 5' a 95°C. Opcional: congelar las muestras si se desea seguir con el experimento en otro momento (Dada la corta vida media del P32 no se recomienda congelar las muestras por más de 15 días).
- 18) Sembrar el contenido total de cada eppendorf (incluyendo las beads) cuidadosamente en las calles del gel y también MWM apropiados.
- 19) Resolver en un SDS-PAGE 10 o 15% según corresponda
- 20) Los niveles de fosforilación del sustrato se visualizan por autorradiografía y los niveles de expresión de las quinasa por Western-Blot

### Soluciones:

Buffer de l	500ml	50ml
1% Triton x-100	5ml 100%	
10% glicerol	50ml 97%	
137mM NaCl	13.7ml 5M	
20mM Tris-HCl pH7.5	10ml 1M pH 7.5	
1ug/ml aprotinina y leupeptina		Stock 1000X: 1mg/ml 50ul
1mM PMSF		Stock 100X: 100mM 500ul
20mM NaF		Stock 50X: 1M 1ml
1mM NaPPi		Stock 100X: 0,1M 500ul
1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>		Stock 1000X: 1M 50ul

Stock a  
-20°C

Agregar a  
último  
momento

**Buffer de reacción de quinasas**

12,5mM MOPS pH 7,5  
 12,5mM  $\beta$ -glicerolfosfato  
 7,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
 0,5 mM EGTA  
 0,5mM NaF  
 0,5mM Vanadato

**Buffer de quinasas radioactivo (por cada 30ul de reacción):**

1uCi de ATP  $\gamma$ -<sup>32</sup>  
 20uM ATP ("frio")  
 3,3 mM DTT  
 2ug de GST-ATF-2 para los ensayos de JNK y p38 y para medir la actividad de ERK usar 10ug de MBP por reacción  
 Completar hasta 30ul con el buffer de reacción de quinasas

**Tinción X-Gal**

1. Remover el medio de las placas y lavar las células en PBS.
2. Fijar las células en PBS/glutaraldehido 1% por 5'
3. Lavar cuidadosamente 3 veces con PBS y un último lavado de 5'
4. Agregar 2ml/placa de 30mm del buffer de tinción X-Gal. Usualmente las células azules comienzan a verse unas horas después del inicio de la tinción y optimamente después de 12-24hs.

**Solucion: Buffer de tinción X-Gal**

\*Stock (1X): 5mM K+ Ferricianuro  
 5mM K+ Ferrocianuro  
 2mM MgCl<sub>2</sub>  
 1mg/ml X-Gal (agregar a último momento diluyendo el X-Gal en DMSO a razón de 1mg/20ulDMSO)

**Precalentar a 37°C la Sc.  
 antes de utilizarla**

\*Estable a 4°C por mas de 1 año

## **Tinción reveladora de la actividad enzimática de fosfatasa alcalina (AP):**

1. Preparar fresco 66ul NBT/10ml AP buffer y agregar 33ul de BCIP.
2. Remover el medio de las placas y lavar las células en PBS.
3. Fijar las células en PBS/glutaraldehído 1% por 5'.  
Lavar cuidadosamente 3 veces con PBS y un último lavado de 5'.
4. Agregar 2ml por placa, agitar suavemente a RT e incubar hasta que este suficientemente obscuro (30'-1h).
5. Parar la reacción cambiando la SC. Por PBS/EDTA 20mM y guardar indefinidamente a 4°C.

Soluciones stock (guardar por mas de 1 año a 4°C)

- **NBT:** 500mg NBT (BioRad) en 10ml 70% dimetilformamida
- **BCIP:** 500mg BCIP (BioRad) en 10ml 100% dimetilformamida
- **AP buffer:** 100mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM Tris (pH 9.5)

## **Plásmidos y constructos:**

El vector pCDNA3/KSHV-GPCR se digirió con las enzimas de restricción HindIII y NotI y luego el inserto (KSHV-GPCR) fue subclonado en pCEFL obteniéndose el plasmido pCEFL-KSHV-GPCR.

PCEFL-HA-KSHV-GPCR y pCEFL, AU5-KSHV-GPCR fueron construidos amplificando por PCR(\*) la secuencia de KSHV-GPCR y clonandolas en el sitio BglII de HA-pCEFL y de AU5-pCEFL.

Los primers utilizados (GGAATTCTGGAGATCTATGGCGGCCGAGGATTC Y CACTAAACAGATCTTTTGGGATCAGACCCCTCAT) fueron diseñados de modo tal que los extremos de los productos de amplificación contuvieran sitios BglII y de que este inserto clonado en el sitio BglII de pCEFL-HA estuviera en el marco de lectura correcto, es decir que al traducirse generara proteínas de fusión que estuvieran "tagueadas" en el extremo N-terminal de KSHV-GPCR. La orientación de los insertos se determinó primero por mapeo de restricción y luego se verificó cuando tres clones independientes que contenían insertos en la orientación adecuada se mandaron a secuenciar.

El vector pCLXSN2 se construyó hibridizando dos oligos fosforilados (pCGATAGATCTCGAGTCGACCCGGGCGGCCGCAT y pCGATGCGGCCGCCGGTTCGACTCGAGATCTAT) creando de este modo un polilinker sintético con extremos ClaI-ClaI que fue ligado en el sitio ClaI de pCLNCX (Clontech) creando el vector pCLNCX2.

El vector pEF2 se construyó remplazando el promotor CMV de pCLNCX2 por el promotor EF obtenido por PCR apartir de pCEFL.

Los primers utilizados (GACGTGACGGATCCGGGAGATCGAT Y TGATGGATATCTGCAGAATTCCAG) fueron diseñados de modo tal que contenían sitios HINDIII y BAMHI en los extremos por lo que el producto de PCR se digirió con estas enzimas y luego fue subclonado en los correspondientes sitios de pCLNCX2 reemplazando de este modo al promotor de CMV por el de EF y creando el vector retroviral pEF2.

pCLNCX2-KSHV-GPCR, pCLNCX2-HA-KSHV-GPCR y pEF2-KSHV-GPCR, pEF2-HA-KSHV-GPCR fueron construidos digiriendo los vectores pCEFL/KSHV-GPCR y pCEFL-HA-KSHV-GPCR con HindIII-NotI y luego subclonando los respectivos insertos en los vectores retrovirales adecuados.

pCLNCX2-EGFP y pEF2-EGFP se construyeron digiriendo el vector comercial p-N1-EGFP (de Clontech) con HindIII y NotI y subclonando el inserto codificante para EGFP en pCLNCX2 y pEF2 .

Para los experimentos con retrovirus en ratones se construyó el vector KBO1-KSHV-GPCR para lo cual se subclonó el inserto BglII-BglII de pCEFL-HA-KSHV-GPCR en el sitio BglII de KBO1 (cedido gentilmente por Ren Ribowt) verificándose luego la orientación del inserto .

Para la construcción de vectores retrovirales que coexpresan KSHV-GPCR y DN se creó primero una variante de pCEFL llamado pCEFL2.0 que tiene un polilinker sintético modificado compatible con KBO1, después de subclonarse los dominantes negativos en este vector se subclonaron nuevamente en KBO1-KSHV/GPCR inmediatamente después del IRES (Intra Ribosomal Entry Site) posteriormente se subclonó un inserto codificante para una proteína de fusión EGFP-Puromicine resistance gene bajo el control de un minipromotor de CMV.

Los vectores que codifican para los dominantes negativos utilizados en este trabajo fueron gentilmente cedidos por S. J. Gutschind con excepción de pCDNA3-JIP-1 que fue cedido por Roger Davis.

Los vectores que codifican para GRK5 y GRK2 fueron cedidos por M. Gerenshor

Los vectores utilizados en los experimentos reporteros fueron comercialmente adquiridos a la compañía Invitrogen.

(\*)En todos los subclonados en los que el inserto es un producto de PCR el protocolo de amplificación se modificó ligeramente para reducir el número de insertos que contuvieran mutaciones: la mezcla de reacción contenía al menos 10ng del templado y la enzima pFU, además se hicieron únicamente 20 ciclos de amplificación. Luego el nuevo inserto, después de ser subclonado en el vector apropiado, fue secuenciado.

# **BIBLIOGRAFÍA**

**Albini A., Paglieri I., Orenco G., Carlone S., Aluigi M., De Marchi R. et al., (1997)** "The beta-core of human chorionic gonadotrophin inhibits growth of Kaposi's Sarcoma cells and a new immortalized Kaposi's Sarcoma cell line" *AIDS*, **11**, 713-21

**Ansari M., Dawson D., Nador R., Rutherford C., Shneider N., Latimer M., Picker L., Knowles D., Mckenna R (1996)** "Primary body cavity-based AIDS-related lymphomas." *Am- J. Clin. Pathol.* Feb, **105(2)**: 221-9

**Aoki Y, Jaffe ES, Chang Y, Jones K, Teruya-Feldstein J, Moore PS and Tosato G (1999).** "Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6 [see comments]." *Blood* **93(12)**: 4034-43.

**Arbiser JL, Moses MA, Fernandez CA, Ghiso N, Cao Y, Klauber N, Frank D, Brownlee M, Flynn E, Parangi S, et al. (1997).** "Oncogenic H-ras stimulates tumor angiogenesis by two distinct pathways." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94(3)**: 861-6.

**Arvanitakis L, Geras-Raaka E, Varma A, Gershengorn MC and Cesarman E (1997).** "Human herpesvirus KSHV encodes a constitutively active G-protein-coupled receptor linked to cell proliferation [see comments]." *Nature* **385(6614)**: 347-50.

**Arvanitakis L, Mesri EA, Nador RG, Said JW, Asch AS, Knowles DM and Cesarman E (1996).** "Establishment and characterization of a primary effusion (body cavity-based) lymphoma cell line (BC-3) harboring kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV/HHV-8) in the absence of Epstein-Barr virus." *Blood* **88(7)**: 2648-54.

**Bais C, Santomasso B, Coso O, Arvanitakis L, Raaka EG, Gutkind JS, Asch AS, Cesarman E, Gershengorn MC, Mesri EA, et al. (1998).** "G-protein-coupled receptor of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a viral oncogene and angiogenesis activator [see comments] [published erratum appears in Nature 1998 Mar 12;392(6672):210]." *Nature* **391(6662)**: 86-9.

**Ben-Av P, Crofford LJ, Wilder RL and Hla T (1995).** "Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis." *Lebs Letters* **372(1)**: 83-7.

**Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D and Keshet E (1999).** "Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal [see comments]." *Journal of Clinical Investigation* **103(2)**: 159-65.

**Beral V and Newton R (1998).** "Overview of the epidemiology of immunodeficiency-associated cancers. [Review] [40 refs]." *Journal of the National Cancer Institute. Monographs* **23**: 1-6.

**Beyaert R, Cuenda A, Vanden Berghe W, Plaisance S, Lee JC, Haegeman G, Cohen P and Fiers W (1996).** "The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor." *Embo Journal* 15(8): 1914-23.

**Boehm T, Folkman J, Browder T and O'Reilly MS (1997).** "Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance [see comments]." *Nature* 390(6658): 404-7.

**Bos JL (1995).** "A target for phosphoinositide 3-kinase: Akt/PKB." *Trends Biochem Sci* 20(11): 441-2.

**Boshoff C (1998).** "Kaposi's sarcoma. Coupling herpesvirus to angiogenesis [news; comment]." *Nature* 391(6662): 24-5.

**Boshoff C, Endo Y, Collins PD, Takeuchi Y, Reeves JD, Schweickart VL, Siani MA, Sasaki T, Williams TJ, Gray PW, et al. (1997).** "Angiogenic and HIV-inhibitory functions of KSHV-encoded chemokines [see comments]." *Science* 278(5336): 290-4.

**Boshoff C and Weiss RA (1998).** "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Adv Cancer Res* 75: 57-86.

**Boshoff C and Weiss RA (1998).** "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus. [Review] [175 refs]." *Advances in Cancer Research* 75: 57-86.

**Brown LF, Detmar M, Claffey K, Nagy JA, Feng D, Dvorak AM and Dvorak HF (1997).** "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. [Review] [133 refs]." *Exs* 79: 233-69.

**Browning PJ, Sechler JMG, Kaplan M, Washington RH, Gendelman R, Yarchoan R, Ensoli B and Gallo RC (1994).** "Identification and Culture of Kaposi's Sarcoma-Like Spindle Cells from the Peripheral Blood of Human Immunodeficiency Virus-1 Individuals and Normal Controls." *Blood* 84: 2711-2720.

**Bulavin DV, Saito S, Hollander MC, Sakaguchi K, Anderson CW, Appella E and Fornace A Jr. (1999).** "Phosphorylation of human p53 by p38 kinase coordinates N-terminal phosphorylation and apoptosis in response to UV radiation." *Embo Journal* 18(23): 6845-54.

**Burger M, Burger JA, Hoch RC, Oades Z, Takamori H and Schraufstatter IU (1999).** "Point mutation causing constitutive signaling of CXCR2 leads to transforming activity similar to Kaposi's sarcoma herpesvirus-G protein-coupled receptor." *Journal of Immunology* 163(4): 2017-22.

**Bussolino F, Mantovani A and Persico G (1997).** "Molecular mechanisms of blood vessel formation." *Trends Biochem Sci* 22(7): 251-6.

- Cannell E and Mittnacht S (1999).** "Viral encoded cyclins. [Review] [94 refs]." *Seminars in Cancer Biology* 9(3): 221-9.
- Carbone A., Gloghini A., Vaccer E, Gaidano G., et al. (1996)** "Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus DNA in AIDS-related and AIDS-unrelated lymphomatous effusions" *Br. J. Haematol. Sep*, 94(3): 533-43
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, et al. (1998).** "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." *Nature* 394(6692): 485-90.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, et al. (1999).** "Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis." *Cell* 98(2): 147-57.
- Castleman B., Iverson I., and Menendez V. (1956)** *Cancer*, 9: 822-830
- Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW and Knowles DM (1995a).** "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus-like DNA sequences are present in AIDS-Related Body cavity B-cell lymphomas." *N. Engl. J. Med* 332: 1186-1191.
- Cesarman E, Moore PS, Ingharami G, Knowles DM and Chang Y (1995b).** "In vitro establishment and characterization of two AIDS-related body cavity based lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing the Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences." *Blood*, Oct 1; 86(7): 2708-14
- Cesarman E., Nador R., Aosasa K., Delsoi G., Said J., Knowles D (1996)** "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in non-AIDS related lymphoma occurring in body cavities." *Am. J. Pathol.* Jul, 149(1): 53-7
- Cesarman E, Nador RG, Bai F, Bohenzky RA, Russo JJ, Moore PS, Chang Y and Knowles DM (1996).** "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma." *Journal of Virology* 70(11): 8218-23.
- Cesarman E. and Mesri E.A. (1999)**"Virus Induced Lymphomas: EBV, KSHV and HTLV-1. 1999 Current Opinion in Oncology. (Review) 11: 322-332.
- Cesarman E, Mesri EA and Gershengorn MC. (2000)** Viral G-protein coupled receptor and Kaposi's sarcoma: a paracrine model of neoplasia?. 2000 Journal of Experimental Medicine In press



- Cannell E and Mitnacht S (1999).** "Viral encoded cyclins. [Review] [94 refs]." *Seminars in Cancer Biology* 9(3): 221-9.
- Carbone A., Gloghini A., Vaccer E, Gaidano G., et al. (1996)** "Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus DNA in AIDS-related and AIDS-unrelated lymphomatous effusions" *Br. J. Haematol. Sep*, 94(3): 533-43
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, et al. (1998).** "Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis." *Nature* 394(6692): 485-90.
- Carmeliet P, Lampugnani MG, Moons L, Breviario F, Compernelle V, Bono F, Balconi G, Spagnuolo R, Oostuyse B, Dewerchin M, et al. (1999).** "Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis." *Cell* 98(2): 147-57.
- Castleman B., Iverson I., and Menendez V. (1956)** *Cancer*, 9: 822-830
- Cesarman E, Chang Y, Moore PS, Said JW and Knowles DM (1995a).** "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpes Virus-like DNA sequences are present in AIDS-Related Body cavity B-cell lymphomas." *N. Engl. J. Med* 332: 1186-1191.
- Cesarman E, Moore PS, Ingharami G, Knowles DM and Chang Y (1995b).** "In vitro establishment and characterization of two AIDS-related body cavity based lymphoma cell lines (BC-1 and BC-2) containing the Kaposi's Sarcoma-associated herpesvirus-like (KSHV) DNA sequences." *Blood*, Oct 1; 86(7): 2708-14
- Cesarman E., Nador R., Aosasa K., Delsoi G., Said J., Knowles D (1996)** "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus in non-AIDS related lymphoma occurring in body cavities." *Am. J. Pathol.* Jul, 149(1): 53-7
- Cesarman E, Nador RG, Bai F, Bohenzky RA, Russo JJ, Moore PS, Chang Y and Knowles DM (1996).** "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus contains G protein-coupled receptor and cyclin D homologs which are expressed in Kaposi's sarcoma and malignant lymphoma." *Journal of Virology* 70(11): 8218-23.
- Cesarman E. and Mesri E.A. (1999)**"Virus Induced Lymphomas: EBV, KSHV and HTLV-1. 1999 Current Opinion in Oncology. (Review) 11: 322-332.
- Cesarman E, Mesri EA and Gershengorn MC. (2000)** Viral G-protein coupled receptor and Kaposi's sarcoma: a paracrine model of neoplasia?.2000 Journal of Experimental Medicine In press

**Chang Y, Cesarman E, Pessin MS, Lee F, Culpepper J, Knowles D and Moore P (1994).** "Identification of Herpesvirus-Like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's Sarcoma." *Science* **266**: 1865-1869.

**Chee M., Barrell B., (1990)** "Herpesviruses: a study of parts" *Trends in Genetics*, vol **6**, 3, 86-91

**Cheng EH, Nicholas J, Bellows DS, Hayward GS, Guo HG, Reitz MS and Hardwick JM (1997).** "A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(2): 690-4.

**Claffey KP and Robinson GS (1996).** "Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis." *Cancer Metastasis Rev* **15**(2): 165-76.

**Cohen T, Nahari D, Cerem LW, Neufeld G and Levi BZ (1996).** "Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor." *Journal of Biological Chemistry* **271**(2): 736-41.

**Cornali E, Zietz C, Benelli R, Weninger W, Masiello L, Breier G, Tschachler E, Albin A and Sturzl M (1996).** "Vascular endothelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in kaposi sarcoma." *American Journal of Pathology* **149**(6): 1851-1869.

**Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR and Lee JC (1995).** "SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1." *Febs Lett* **364**(2): 229

**Davis MA, Sturzl MA, Blasig C, Schreier A, Guo HG, Reitz M, Opalenik SR and Browning PJ (1997).** "Expression of human herpesvirus 8-encoded cyclin D in Kaposi's sarcoma spindle cells [see comments]." *Journal of the National Cancer Institute* **89**(24): 1868-74.

**Davis RJ (1994).** "MAPKs: new JNK expands the group." *Trends Biochem Sci* **19**(11): 470-3.

**Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu HA, Gotoh Y and Greenberg ME (1997).** "Akt phosphorylation of bad couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." *Cell* **91**(2): 231-241.

**Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B, Deng T, Karin M and Davis RJ (1994).** "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." *Cell* **76**(6): 1025-37.

**Dietrich WF, Radany EH, Smith JS, Bishop JM, Hanahan D and Lander ES (1994).** "Genome-wide search for loss of heterozygosity in transgenic mouse tumors reveals candidate tumor suppressor genes on chromosomes 9 and 16." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(20): 9451-5.

**Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995).** "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**(20): 9363-7.

**Dupin N., Gorin I., Deleuze J., Agut H., Huraux J and Escande J. (1995a)** *N. Engl. J. Med.* **333**, 798-799

**Dupin N., Grandalam M., and Calvez V. (1995b).** *Lancet* **345**, 761-62

**Dupin N., Boshoff C., et al. (1999)** " Distribution of human herpesvirus-8 latently infected cells in Kaposi's sarcoma, multicentric Castleman's disease, and primary effusion lymphoma." *PNAS*. Vol **96** (8): 4546-4551

**Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L and Fujii-Kuriyama Y (1999).** "Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300." *Embo Journal* **18**(7): 1905-14.

**Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y and Fujii-Kuriyama Y (1997).** "A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(9): 4273-8.

**Ensoli B., Nakamura S., Salahuddin S., Biberfeld P., Larsson L., Beaver B., et al. (1989)** "AIDS-Kaposi's sarcoma-derived cells express cytokines with autocrine and paracrine growth effects" *Science.*, **243**, 223-6

**Ensoli B, Barillari G and Gallo RC (1992).** "Cytokines and Growth Factors in the Pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's Sarcoma." *Immunol. Rev.* **127**: 147-155.

**Ensoli B, Gendelman R, Markham P, Fiorelli V, Colombini S, Raffeld M, Cafaro A, Chang H-K, Brady JN and Gallo RC (1994).** "Synergy Between Basic Fibroblast Growth Factor and HIV-1 Tat Protein in Induction of Kaposi's Sarcoma." *Nature* **371**: 674-680.

**Ensoli B and Sirianni MC (1998).** "Kaposi's sarcoma pathogenesis: a link between immunology and tumor biology. [Review] [130 refs]." *Critical Reviews in Oncogenesis* **9**(2): 107-24.

- Ensoli B and Sturzl M (1998).** "Kaposi's sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents. [Review] [215 refs]." *Cytokine & Growth Factor Reviews* 9(1): 63-83.
- Ferrara N (1996).** "VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR [Review]." *European Journal of Cancer* 14: 2413-2422.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ and Moore MW (1996b).** "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." *Nature* 380(6573): 439-42.
- Ferrara N and Davissmyth T (1997).** "THE BIOLOGY OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR [Review]." *Endocrine Reviews* 18(1): 4-25.
- Fields B., Knipe M., Howley P., et al., (1996)** "Fields Virology", Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia.
- Flamme I, Frohlich T, von Reutern M, Kappel A, Damert A and Risau W (1997).** "HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 alpha and developmentally expressed in blood vessels." *Mechanisms of Development* 63(1): 51-60.
- Flore O, Rafii S, Ely S, O'Leary JJ, Hyjek EM and Cesarman E (1998).** "Transformation of primary human endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Nature* 394(6693): 588-92.
- Folkman J (1995).** "Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease." *Nat Med* 1(1): 27-31.
- Foreman KE, Friborg J Jr., Kong WP, Woffendin C, Poverini PJ, Nickoloff BJ and Nabel GJ (1997).** "Propagation of a human herpesvirus from AIDS-associated Kaposi's sarcoma [see comments]." *New England Journal of Medicine* 336(3): 163-71.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD and Semenza GL (1996).** "Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1." *Molecular & Cellular Biology* 16(9): 4604-13.
- Franke TF, Kaplan D and Cantley LC (1997).** "PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis." *Cell* : 435-437.
- Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Huan J and Saklatvala J (1994).** "Interleukin-1 Activates a novel protein kinase cascade that results in phosphorylation of Hsp27." *Cell* 78: 1039-1049.
- Friedman-Kien AE( (1981).** "Disseminated Kaposi's Sarcoma Syndrome in Young Homosexual Men." *J. Am. Acad. Dermatol.* 5: 468.

- Gallo RC (1998).** "The enigmas of Kaposi's sarcoma. [Review] [25 refs]." *Science* **282**(5395): 1837-9.
- Ganem D (1997).** "KSHV and Kaposi's sarcoma: the end of the beginning?. [Review] [20 refs]." *Cell* **91**(2): 157-60.
- Ganem D (1998).** "Human herpesvirus 8 and its role in the genesis of Kaposi's sarcoma. [Review] [86 refs]." *Current Clinical Topics in Infectious Diseases* **18**: 237-51.
- Gao SJ, Boshoff C, Jayachandra S, Weiss RA, Chang Y and Moore PS (1997).** "KSHV ORF K9 (vIRF) is an oncogene which inhibits the interferon signaling pathway." *Oncogene* **15**(16): 1979-85.
- Gao SJ, Kingsley L, Hoover DR, Spira TJ, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, Detels R, Parry P, Chang Y, et al. (1996).** "Seroconversion to antibodies against Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-related latent nuclear antigens before the development of Kaposi's sarcoma." *New England Journal of Medicine* **335**(4): 233-41.
- Gao SJ, Kingsley L, Li M, Zheng W, Parravicini C, Ziegler J, Newton R, Rinaldo CR, Saah A, Phair J, et al. (1996).** "KSHV antibodies among Americans, Italians and Ugandans with and without Kaposi's sarcoma [see comments]." *Nature Medicine* **2**(8): 925-8.
- Geras-Raaka E, Arvanitakis L, Bais C, Cesarman E, Mesri EA and Gershengorn MC (1998).** "Inhibition of constitutive signaling of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor by protein kinases in mammalian cells in culture." *Journal of Experimental Medicine* **187**(5): 801-6.
- Geras-Raaka E, Varma A, Ho H, Clark-Lewis I and Gershengorn MC (1998b).** "Human interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) inhibits constitutive signaling of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor." *Journal of Experimental Medicine* **188**(2): 405-8.
- Gerber HP, Condorelli F, Park J and Ferrara N (1997).** "Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia." *Journal of Biological Chemistry* **272**(38): 23659-67.
- Gershengorn MC, Geras-Raaka E, Varma A and Clark-Lewis I (1998).** "Chemokines activate Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor in mammalian cells in culture" *Journal of Clinical Investigation* **102**(8): 1469-72.
- Gill P (1991).** "Pathogenesis of HIV-related malignancies." *Curr. Op. Oncol.* **3**: 867-871.

**Giraud E, Primo L, Audero E, Gerber HP, Koolwijk P, Soker S, Klagsbrun M, Ferrara N and Bussolino F (1998).** "Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells." *Journal of Biological Chemistry* **273**(34): 22128-22135.

**Godden-Kent D, Talbot SJ, Boshoff C, Chang Y, Moore P, Weiss RA and Mittnacht S (1997).** "The cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus stimulates cdk6 to phosphorylate the retinoblastoma protein and histone H1." *Journal of Virology* **71**(6): 4193-8.

**Grugel S, Finkenzeller G, Weindel K, Barleon B and Marme D (1995).** "Both v-Ha-Ras and v-Raf stimulate expression of the vascular endothelial growth factor in NIH 3T3 cells." *Journal of Biological Chemistry* **270**(43): 25915-9.

**Guo HG, Browning P, Nicholas J, Hayward GS, Tschachler E, Jiang YW, Sadowska M, Raffeld M, Colombini S, Gallo RC, et al. (1997).** "Characterization of a chemokine receptor-related gene in human herpesvirus 8 and its expression in Kaposi's sarcoma." *Virology* **228**(2): 371-8.

**Gutkind JS (1998).** "The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades." *J Biol Chem* **273**(4): 1839-42.

**Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW and Weinberg RA (1999).** "Creation of human tumour cells with defined genetic elements [see comments]." *Nature* **400**(6743): 464-8.

**Hanahan D and Folkman J (1996).** "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." *Cell* **86**: 356-364.

**Hata Y, Duh E, Zhang K, Robinson GS and Aiello LP (1998).** "Transcription factors sp1 and sp3 alter vascular endothelial growth factor receptor expression through a novel recognition sequence." *Journal of Biological Chemistry* **273**(30): 19294-19303.

**Hata Y, Rook SL and Aiello LP (1999).** "Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway." *Diabetes* **48**(5): 1145-55.

**Hellwig-Burgel T, Rutkowski K, Metzen E, Fandrey J and Jelkmann W (1999).** "Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha stimulate DNA binding of hypoxia-inducible factor-1." *Blood* **94**(5): 1561-1567.

**Henle G., Henle W., Diehl V. (1968)** *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **59**, 94-101

**Ho HH, Du D and Gershengorn MC (1999).** "The N terminus of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus G protein-coupled receptor is necessary for high affinity chemokine binding but not for constitutive activity." *Journal of Biological Chemistry* 274(44): 31327-32.

**Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y and Dong Z (1999).** "p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389." *Journal of Biological Chemistry* 274(18): 12229-35.

**Jain S, Maltepe E, Lu MM, Simon C and Bradfield CA (1998).** "Expression of ARNT, ARNT2, HIF1 alpha, HIF2 alpha and Ah receptor mRNAs in the developing mouse." *Mechanisms of Development* 73(1): 117-23.

**Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL and Bouck N** "Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1." *Nature Medicine* 6(1): 41-8.

**Kaposi M. (1872)** *Arch. Dermatol Syphillis* 4, 265-273

**Kappel A, Ronicke V, Damert A, Flamme I, Risau W and Breier G (1999).** "Identification of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 (Flk-1) promoter/enhancer sequences sufficient for angioblast and endothelial cell-specific transcription in transgenic mice." *Blood* 93(12): 4284-92.

**Karcher D., Dawkins F., and Garret C. (1992)** *Lab. Invest.* 92, 80a

**Karin M, Liu Z and Zandi E (1997).** "AP-1 function and regulation." *Curr Opin Cell Biol* 9(2): 240-6.

**Kedes DH, Operskalski E, Busch M, Kohn R, Flood J and Ganem D (1996).** "The seroepidemiology of human herpesvirus 8 (Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus): distribution of infection in KS risk groups and evidence for sexual transmission [see comments] [published erratum appears in Nat Med 1996 Sep;2(9):1041]." *Nature Medicine* 2(8): 918-24.

**Kerbel RS, Viloripetit A, Okada F and Rak J (1998).** "ESTABLISHING A LINK BETWEEN ONCOGENES AND TUMOR ANGIOGENESIS [Review]." *Molecular Medicine* 4(5): 286-295.

**Kirshner JR, Staskus K, Haase A, Lagunoff M and Ganem D (1999).** "Expression of the open reading frame 74 (G-protein-coupled receptor) gene of Kaposi's sarcoma (KS)-associated herpesvirus: implications for KS pathogenesis." *Journal of Virology* 73(7): 6006-14

**Knowles D., Inhirami G., Ubriaco A., Dalla-Favera R. (1989)** *Blood*, 73: 792-799

**Koch AE, Polverini PJ, Kunkel S, Harlow L, DiPietro L, Elnor V, Elnor SG and Strieter RM (1992).** "Interleukin-8 as a macrophage mediator of angiogenesis." *Science* **258**: 1798-1801.

**Komanduri K., Luce J., Mc Grath M., Herndier B., Ng V. (1996)** "The natural history and molecular heterogeneity of HIV-associated primary malignant lymphomatous effusions." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* Nov 1;**13(3)**:215-26.

**Kyriakis JM and Avruch J (1996).** "Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. [Review] [70 refs]." *Bioessays* **18(7)**: 567-77.

**Lebbe C., de Cremoux P., Millot G., Podgorniak M., Verola O., Berger R., et al., (1997)** "Characterization of in vitro culture of HIV-negative Kaposi's Sarcoma-derived-cells. In vitro responses to alfa interferon" *Arch Dermatol. Res.* **289**, 421-8

**Ladoux A and Frelin C (1997).** "Cardiac expressions of HIF-1 alpha and HLF/EPAS, two basic loop helix/PAS domain transcription factors involved in adaptative responses to hypoxic stresses." *Biochemical & Biophysical Research Communications* **240(3)**: 552-6.

**Lagunoff M, Majeti R, Weiss A and Ganem D (1999).** "Deregulated signal transduction by the K1 gene product of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96(10)**: 5704-9.

**Lee FS, Hagler J, Chen ZJ and Maniatis T (1997).** "Activation of the IkappaB alpha kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway." *Cell* **88(2)**: 213-22.

**Lee H, Guo J, Li M, Choi JK, DeMaria M, Rosenzweig M and Jung JU (1998).** "Identification of an immunoreceptor tyrosine-based activation motif of K1 transforming protein of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Molecular & Cellular Biology* **18(9)**: 5219-28.

**Lee H, Veazey R, Williams K, Li M, Guo J, Neipel F, Fleckenstein B, Lackner A, Desrosiers RC and Jung JU (1998).** "Deregulation of cell growth by the K1 gene of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Nature Medicine* **4(4)**: 435-40.

**Lennette ET, Blackbourn DJ and Levy JA (1996).** "Antibodies to human herpesvirus type 8 in the general population and in Kaposi's sarcoma patients [see comments]." *Lancet* **348(9031)**: 858-61.

**Levine AJ (1997).** "p53, the cellular gatekeeper for growth and division. [Review] [55 refs]." *Cell* **88(3)**: 323-31.



- Li M, Lee H, Guo J, Neipel F, Fleckenstein B, Ozato K and Jung JU (1998).** "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus viral interferon regulatory factor." *Journal of Virology* 72(7): 5433-40.
- Li M, Lee H, Yoon DW, Albrecht JC, Fleckenstein B, Neipel F and Jung JU (1997).** "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional cyclin." *Journal of Virology* 71(3): 1984-91.
- Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M and Lowe SW (1998).** "Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling." *Genes & Development* 12(19): 3008-19.
- Lunardi-Iskandar Y., Gill p., Lam V., Zerman R., Michaels F., Mann D., et al., (1995)** "Isolation and characterization of an immortal neoplastic cell line (KS Y-1) from AIDS-associated Kaposi's sarcoma". *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 974-81
- Maemura K, Hsieh CM, Jain MK, Fukumoto S, Layne MD, Liu YX, Kourembanas S, Yet SF, Perrella MA and Lee ME (1999).** "Generation of a dominant-negative mutant of endothelial PAS domain protein 1 by deletion of a potent C-terminal transactivation domain." *Journal of Biological Chemistry* 274(44): 31565-31570.
- Mann DJ, Child ES, Swanton C, Laman H and Jones N (1999).** "Modulation of p27(Kip1) levels by the cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Embo Journal* 18(3): 654-63.
- Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D and Kedes DH (1998).** "Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection." *New England Journal of Medicine* 338(14): 948-54.
- Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Naidu Y and Gill PS (1997).** "Vascular endothelial growth factor vascular permeability factor is an autocrine growth factor for aids-kaposi sarcoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(3): 979-984.
- Masucci M., Ernberg I., (1994)** "Epstein-Barr virus: adaptation to a life within the immune system" *Trends in Microbiology*, vol 2, No 4, 126-130
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER and Ratcliffe PJ (1999).** "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." *Nature* 399(6733): 271-275.
- Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR and Giaccia AJ (1997).** "Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase akt signaling pathway in ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element." *Blood* 90(9): 3322-3331.

**Mazure NM, Chen EY, Yeh P, Laderoute KR and Giaccia AJ (1996).** "Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression." *Cancer Research* **56**(15): 3436-40.

**Mesri EA (1999).** "Inflammatory reactivation and angiogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/HHV8: a missing link in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome-associated Kaposi's sarcoma [comment]. [Review] [18 refs]." *Blood* **93**(12): 4031-3.

**Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L, Rafii S, Moore MA, Posnett DN, Knowles DM and Asch AS (1995).** "Isolation of the Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) and transmission to B-cells." *Blood* **86**(S1): 124.

**Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L, Rafii S, Moore MA, Posnett DN, Knowles DM and Asch AS (1996).** "Human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells." *Journal of Experimental Medicine* **183**(5): 2385-90.

**Mesri EA, Federoff HJ and Brownlee M (1995b).** "Expression of Vascular Endothelial Growth Factor from a Defective Herpes Simplex Virus Type 1 Amplicon Vector Induces Angiogenesis in Mice." *Circ. Res.* **76**: 161-167.

**Miles SA, Rezar AR, Salazar Gonzalez JF, Steven RH, Vander A, Meyden M, Mitsuyasu RT, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, et al. (1990).** "AIDS-Kaposi's Sarcoma Derived Cells produce and respond to Interleukin-6." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4068-4072.

**Monini P, Colombini S, Sturzl M, Goletti D, Cafaro A, Sgadari C, Butto S, Franco M, Leone P, Fais S, et al. (1999).** "Reactivation and persistence of human herpesvirus-8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma [see comments]." *Blood* **93**(12): 4044-58.

**Moore PS, Boshoff C, Weiss RA and Chang Y (1996).** "Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by kshv." *Science* **274**(5293): 1739-1744.

**Maemura K, Hsieh CM, Jain MK, Fukumoto S, Layne MD, Liu YX, Kourembanas S, Yet SF, Perrella MA and Lee ME (1999).** "Generation of a dominant-negative mutant of endothelial PAS domain protein 1 by deletion of a potent C-terminal transactivation domain." *Journal of Biological Chemistry* **274**(44): 31565-31570.

**Mann DJ, Child ES, Swanton C, Laman H and Jones N (1999).** "Modulation of p27(Kip1) levels by the cyclin encoded by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus." *Embo Journal* **18**(3): 654-63.

- Martin JN, Ganem DE, Osmond DH, Page-Shafer KA, Macrae D and Kedes DH (1998).** "Sexual transmission and the natural history of human herpesvirus 8 infection." *New England Journal of Medicine* **338**(14): 948-54.
- Masood R, Cai J, Zheng T, Smith DL, Naidu Y and Gill PS (1997).** "Vascular endothelial growth factor vascular permeability factor is an autocrine growth factor for aids-kaposi sarcoma." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(3): 979-984.
- Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER and Ratcliffe PJ (1999).** "The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis." *Nature* **399**(6733): 271-275.
- Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR and Giaccia AJ (1997).** "Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase akt signaling pathway in ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element." *Blood* **90**(9): 3322-3331.
- Mazure NM, Chen EY, Yeh P, Laderoute KR and Giaccia AJ (1996).** "Oncogenic transformation and hypoxia synergistically act to modulate vascular endothelial growth factor expression." *Cancer Research* **56**(15): 3436-40.
- Mesri EA (1999).** "Inflammatory reactivation and angiogenicity of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/HHV8: a missing link in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome-associated Kaposi's sarcoma [comment]. [Review] [18 refs]." *Blood* **93**(12): 4031-3.
- Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L, Rafii S, Moore MA, Posnett DN, Knowles DM and Asch AS (1995).** "Isolation of the Kaposi's sarcoma herpesvirus (KSHV) and transmission to B-cells." *Blood* **86**(S1): 124.
- Mesri EA, Cesarman E, Arvanitakis L, Rafii S, Moore MA, Posnett DN, Knowles DM and Asch AS (1996).** "Human herpesvirus-8/Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus is a new transmissible virus that infects B cells." *Journal of Experimental Medicine* **183**(5): 2385-90.
- Mesri EA, Federoff HJ and Brownlee M (1995b).** "Expression of Vascular Endothelial Growth Factor from a Defective Herpes Simplex Virus Type 1 Amplicon Vector Induces Angiogenesis in Mice." *Circ. Res.* **76**: 161-167.
- Miles SA, Rezar AR, Salazar Gonzalez JF, Steven RH, Vander A, Meyden M, Mitsuyasu RT, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, et al. (1990).** "AIDS-Kaposi's Sarcoma Derived Cells produce and respond to Interleukin-6." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4068-4072.

**Monini P, Colombini S, Sturzl M, Goletti D, Cafaro A, Sgadari C, Butto S, Franco M, Leone P, Fais S, et al. (1999).** "Reactivation and persistence of human herpesvirus-8 infection in B cells and monocytes by Th-1 cytokines increased in Kaposi's sarcoma [see comments]." *Blood* 93(12): 4044-58.

**Moore PS, Boshoff C, Weiss RA and Chang Y (1996).** "Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV." *Science* 274(5293): 1739-1744.

**Nador R., Cesarman E., Chadburn A., Dawson D., Ansari M., Said J., Knowles D. (1996)** "Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus". *Blood* Jul 15, 88(2):645-56

**Nair B., de Vico A., Nakamura S., Copeland T., Chen Y., Patel A., et al. (1992)** "Identification of a major growth factor for AIDS-kaposi's sarcoma cells as oncostatin M". *Science*, 255:1430-2

**Neipel F., Albrecht J and Fleckenstein B. (1998)** "Human Herpesvirus 8- the First Human Rhadinovirus." *J. of the National Cancer Institute Monographs*, 23:73-77

**Nickoloff, B. J., and Griffiths, C. E. (1989)** *Am. J. Pathol.* 135, 793-800

**Peichev M, Naiyer AJ, Hicklin D, Witte L and Rafii S (2000).** "Expression of AC133 and VEGFR-2 (KDR) by Human CD34+ cells Identifies a Population of Endothelial Cell Progenitors." *Blood* In press:

**Peterson B. (1993).** *Semin. Oncol.* 20, 636-647

**Rabkin C., Bedi G., Musaba E., Sunkutu R., Mwansa N., Sindranski D., et al., (1995)** "AIDS-related Kaposi's sarcoma is a clonal neoplasm" *Clin Cancer Res*, 1, 257-60

**Rabkin C. Janz S., Lash A., Coleman A., Musaba E., Liotta L., et al., (1997)** "Monoclonal origin of multicentric Kaposi's sarcoma lesions". *N England J Med.*, 336, 988-93

**Rak J, Filmus J, Finkenzeller G, Grugel S, Marme D and Kerbel RS (1995).** "Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis." *Cancer Metastasis Rev* 14(4): 263-77.

**Reddel RR (2000)** "The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. [Review] [83 refs]." *Carcinogenesis* 21(3): 477-84.

**Reitz M Jr., Nerurkar LS and Gallo RC (1999).** "Perspective on Kaposi's sarcoma: facts, concepts, and conjectures. [Review] [100 refs]." *Journal of the National Cancer Institute* 91(17): 1453-8.

**Renne R, Zhong W, Herndier B, McGrath M, Abbey N, Kedes D and Ganem D (1996).** "Lytic growth of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) in culture." *Nature Medicine* **2**(3): 342-6.

**Risau W. (1997)** *Nature* **386**, 671-4

**Robinson MJ and Cobb MH (1997).** "Mitogen-activated protein kinase pathways." *Curr Opin Cell Biol* **9**(2): 180-6.

**Roizman (1993).** "The Family Herpesviridae." *The Human Herpesviruses* Eds. Roizman, B., Whitley, R. J. and Lopez, C. New York, Raven press. ppl.

**Russo JJ, Bohenzky RA, Chien MC, Chen J, Yan M, Maddalena D, Parry JP, Peruzzi D, Edelman IS, Chang Y, et al. (1996).** "Nucleotide sequence of the Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (HHV8)." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**(25): 14862-7.

**Rutgers JL, Wiczorek R, Bonneti F, Kaplan KL, Posnett DN, Friedman-Kien AE and Knowles DM (1986).** "The Expression of Endothelial Cell surface antigens by AIDS associated Kaposi's Sarcoma. Evidence for a vascular endothelial cell origin." *Am. J. Pathol.* **122**: 493-499.

**Ryan HE, Lo J and Johnson RS (1998).** "HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization." *Embo Journal* **17**(11): 3005-15.

**Safai B, Johnson KG, Myskowski PL, Koziner B, Yang SY, Wittingham-Ruddles S, Godbold JH and Dupont B (1985).** "The Natural History of Kaposi's Sarcoma in Acquired Immuno Deficiency Syndrome." *Ann. Int. Med.* **103**: 744-750.

**Said J., Tasaka T., Takeuchi S., Asou H de Vos S., Cesarman E., Knowles D., Koeffler H. (1996)** "Primary effusion lymphomas in women: report of two cases of Kaposi's sarcoma-associated effusion-based lymphoma in human immunodeficiency virus-negative women." *Blood* Oct 15, **88**(8):3124-28

**Salahuddin S., Nakamura S., Biberfeld P., Kaplan M., Markham P., Larson L et al. (1998)** "Angiogenic properties of Kaposi's Sarcoma-derived cells after long term culture *in vitro*" *Science* **242**, 430-3

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

**Samaniego F., Markham P., Gendelman H., Gallo R., Ensoli B. (1997)** "Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast

growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in the skin". *J Immunol.* , **158**, 1887-94

**Sarid R, Sato T, Bohenzky RA, Russo JJ and Chang Y (1997).** "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional bcl-2 homologue." *Nature Medicine* **3(3)**: 293-8.

**Schulz TF (1999).** "Epidemiology of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus/human herpesvirus 8. [Review] [172 refs]." *Advances in Cancer Research* **76**: 121-60.

**Serrano M, Lin AW, McCurrach ME, Beach D and Lowe SW (1997).** "Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a." *Cell* **88(5)**: 593-602.

**Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E (1992).** "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis." *Nature* **359(6398)**: 843-5.

**Siegel B, Leventon-Kriss F., Shiffer A., Sayar J., Engelberg I., Vonsover A., et al. (1990)** "Kaposi's Sarcoma in immunosuppression. Possibly the result of a dual viral infection". *Cancer* **65**, 492-8

**Sirianni A., Uccini S., Angeloni A., Faggioni A., Cottoni F., Ensoli B. (1997)** *Lancet* **349**, 255 (letter)

**Soulier J, Grollet L, Okenhender E, Cacoub P, Cazals Hatem D, Babinet P, D'Agay M, Clauvet J, Raphael M, Degos L, et al. (1995).** "Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Like DNA Sequences in Multicentric Castleman's Disease." *Blood* **86**: 1276-1280.

**Staskus KA, Zhong W, Gebhard K, Herndier B, Wang H, Renne R, Beneke J, Pudney J, Anderson DJ, Ganem D, et al. (1997).** "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells." *Journal of Virology* **71(1)**: 715-9.

**Strauchen j., Hauser A., Burstein D., Jimenez R., Moore P., and Chang Y(1997)** "Body cavity-based malignant lymphoma containing Kaposi sarcoma-associated herpesvirus in an HIV-negative man with previous Kaposi sarcoma." *Ann Intern Med.* **Nov 15;125(10)**:822-5.

**Sturtz M., Brandstetter H, Roth W, (1992),** *AIDS Res. Human Retroviruses* **8**, 1753-1764

**Sun R, Lin SF, Staskus K, Gradoville L, Grogan E, Haase A and Miller G (1999).** "Kinetics of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression." *Journal of Virology* **73**(3): 2232-2242.

**Tian H, McKnight SL and Russell DW (1997).** "Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells." *Genes & Development* **11**(1): 72-82.

**Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC and Abraham JA (1991).** "The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing." *J Biol Chem* **266**(18): 11947-54.

**Treisman R (1996).** "Regulation of transcription by MAP kinase cascades." *Curr Opin Cell Biol* **8**(2): 205-15..

**Walts A., Shintaku P., and Said J. (1990).** *Am. J. Clin. Pathol.* **194**: 170-175

**Watanabe Y, Lee SW, Detmar M, Ajioka I and Dvorak HF (1997).** "Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) delays and induces escape from senescence in human dermal microvascular endothelial cells." *Oncogene* **14**(17): 2025-32.

**Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, Talks KL, Wood SM, Gatter KC, Harris AL, Pugh CW, et al. (1998).** "Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha." *Blood* **92**(7): 2260-8.

**Yang T, Chen S, Leach MW, Manfra D, Homey B, Wiekowski M, Sullivan L, Jenh C, Narula S, Chensue S, et al. (2000).** "Transgenic expression of the chemokine receptor encoded by HHV8 induces an angioproliferative disease resembling Kaposi' s sarcoma." *J. Exp. Med.* **In press**:

**Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H and Kuwano M (1997).** "Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis." *Molecular & Cellular Biology* **17**(7): 4015-4023.