

M1-4: ISOLAMENTO E CARATTERIZZAZIONE DEL POLYOMAVIRUS UMANO JC IN CAMPIONI BIOLOGICI E STUDI IN VITRO DELLA CAPACITÀ REPLICATIVA E DELLA ORGANIZZAZIONE STRUTTURALE DELLA VARIANTE ARCHETYPE CY IN MODELLI CELLULARI DI INFEZIONE LATENTE E PRODUTTIVA [V. PIETROPAOLO]

Borsista FILAS: da reclutare entro marzo 2017.

Obiettivi ed innovatività rispetto allo stato dell'arte. Il Polyomavirus umano JC (JCV) è un virus nudo di piccole dimensioni con capsida a simmetria icosaedrica che racchiude una molecola di DNA circolare a doppio filamento. JCV fu isolato per la prima volta da Padgett e collaboratori nel 1971 dal cervello di un uomo con linfoma di Hodgkin, dalle cui iniziali il virus prese il nome, che morì di Leucoencefalopatia Multifocale Progressiva (PML) (Padgett et al., 1971).

La via di ingresso di tale virus sembra essere il tratto respiratorio, ed in particolare le tonsille da cui è stato isolato il genoma del virus (Kato et al., 2004). Successivamente, infettando i PBMC, JCV si riversa nel circolo ematico raggiungendo altri organi, come il rene per o il SNC, in cui il virus instaura un'infezione persistente e latente (Pietropaolo et al., 2003; Cubitt, 2006; Zhong et al., 2007).

JCV è un virus ubiquitario, infatti il 91% della popolazione mondiale adulta presenta anticorpi JCV-specifici.

Nonostante la comparsa degli anticorpi però, il virus non viene eliminato dall'organismo, ma rimane latente nel rene e nel midollo osseo, rendendo l'ospite portatore sano fino ad un'eventuale riattivazione in seguito ad alterazioni immunologiche dell'ospite. La riattivazione è caratterizzata dall'escrezione dei virioni nelle urine e dalla migrazione del virus, attraverso il torrente circolatorio, verso il SNC dove infettando gli oligodendrociti causa la PML (Delbue et al., 2013).

La PML è una malattia demielinizzante del Sistema Nervoso Centrale (CNS), molto spesso fatale, causata dall'infezione litica degli oligodendrociti ad opera di JCV con conseguente sviluppo di disturbi cognitivi, deficit visivi e disfunzioni motorie. Nonostante l'infezione da JCV sia asintomatica e ampiamente diffusa a livello mondiale, la PML rimane a tutt'oggi una malattia rara che si manifesta principalmente in soggetti immunocompromessi. Ancora oggi, l'infezione da HIV rappresenta il maggior fattore predisponente (~80%), seguito da neoplasie ematologiche (~8%), tumori solidi (~3%), trapianto di organi e, recentemente, anche da malattie autoimmuni trattate con farmaci biologici immunomodulanti. La comparsa di nuovi casi di PML dopo l'introduzione di tali farmaci ha sollevato preoccupazioni in merito al loro profilo di sicurezza. In particolare, il Natalizumab (Tysabri®), un anticorpo monoclonale (mAb) anti-VLA-4 utilizzato per il trattamento delle forme di sclerosi multipla recidivante-remittente (MS) e il morbo di Crohn, e il Rituximab (Rituxan®), un mAb anti-CD20 impiegato nei casi di neoplasie ematologiche e artrite reumatoide, risultano tuttora i principali farmaci biologici associati allo sviluppo di PML. A gennaio 2015 sono stati riportati 514 casi di PML tra i 132.600 pazienti affetti da SM in trattamento con natalizumab in tutto il mondo, con un tasso di mortalità del 20-25% e 57 casi confermati di PML in pazienti con malattie reumatiche autoimmuni (ARD) trattati con Rituximab. Pertanto la Food and Drug Administration ha etichettato questi due farmaci con la sigla "black box warning" per richiamare l'attenzione sui rischi, potenzialmente letali, derivanti dal loro impiego (Diotti et al., 2013). L'esatto meccanismo attraverso cui questi farmaci possono indurre la PML non è ancora noto, ma è stato ipotizzato che il blocco del traffico dei linfociti verso i siti di riattivazione e/o di infezione primaria di JCV svolga un ruolo determinante nella patogenesi di questa malattia. Inoltre rimane ancora non chiaro il modello di disseminazione del virus dai siti di infezione primaria al CNS, dove si sviluppa la PML. Nonostante il largo impiego di terapie immunomodulanti, è difficile valutare ancora oggi il rischio di riattivazioni d'infezioni latenti e l'acquisizione di nuove infezioni a seguito del trattamento con questi farmaci. Pertanto, poiché JCV è ubiquitario e non esistono cure per la PML, l'obiettivo principale di questo progetto di ricerca è quello di ottenere un quadro più completo sul rapporto rischio/beneficio associato all'uso dei farmaci biologici e di individuare quelle modificazioni virali che possano essere utilizzate in futuro dai clinici come biomarcatori predittivi di PML.

A tal fine il progetto di ricerca è stato suddiviso in due diversi sotto-obiettivi:

1) studi ex vivo per i quali state arruolate due coorti di pazienti affetti da patologie immuno-mediate in trattamento con mAbs (Coorte 1: pazienti affetti da sclerosi multipla recidivante-remittente (SMRR) trattati con natalizumab; Coorte 2: pazienti con malattie reumatiche infiammatorie croniche (MRIC) trattati con

anti-TNF- α) per valutare gli effetti prodotti da tale trattamento sulla replicazione di JCV e sull'organizzazione strutturale della NCCR del virus.

Su questi pazienti sono stati eseguiti a vari tempi di campionamento specifici (**follow-up tuttora in corso**) sia il monitoraggio della carica virale di JCV, mediante Real Time PCR quantitativa (Q-PCR), in campioni biologici di urine e sangue sia l'analisi di sequenza della NCCR di JCV, al fine di individuare possibili riorganizzazioni strutturali di questa regione virale altamente ipervariabile e mutazioni nei siti di legame per specifici fattori di trascrizione cellulari.

I risultati di tali studi sono stati oggetto delle seguenti pubblicazioni:

- Pietropaolo V, Bellizzi A, Anzivino E, Iannetta M, Zingaropoli MA, Rodio DM, Morreale M, Pontecorvo S, Francia A, Vullo V, Palamara AT, Ciardi MR. Human polyomavirus JC replication and non-coding control region analysis in multiple sclerosis patients under natalizumab treatment. *J Neurovirol.* 2015 Dec;21(6):653-65.

- Rodio DM, Anzivino E, Mischitelli M, Bellizzi A, Scrivo R, Scribano D, Conte G, Prezioso C, Trancassini M, Valesini G, Palamara AT, Pietropaolo V. Increased Prevalence of Human Polyomavirus JC Viruria in Chronic Inflammatory Rheumatic Diseases Patients in Treatment with Anti-TNF α : A 18 Month Follow-Up Study. *Front Microbiol.* 2016 May 10;7:672.

2) studi *in vitro* mediante infezioni di diverse linee cellulari che rappresentano potenziali siti di latenza di JCV, per valutare le variazioni delle capacità replicative e della struttura della NCCR del virus. Tali studi consentirebbero di comprendere in quali tipi di cellule il virus possa andare incontro a riarrangiamenti a livello della NCCR e di studiare l'organizzazione mutata di tale regione e la sua evoluzione nel tempo. Infatti, nonostante sia stata dimostrata l'importanza dei riarrangiamenti della NCCR nell'insorgenza della PML mediante il ritrovamento di sequenze altamente riarrangiate nei pazienti affetti da tale patologia, non si è ancora compreso né dove avvengano questi riarrangiamenti (se nelle cellule di latenza o direttamente nel cervello) né quando avvengano (se durante l'infezione primaria o durante la persistenza del virus nell'ospite) (Ferenczy et al., 2012; Hirsch et al., 2013).

Risultati del I anno di ricerca nell'ambito del progetto

Sono state trasfettate le linee cellulari immortalizzate renali (COS-7) e gliali (SVGp12) con la variante archetipa CY di JCV, comunemente isolata dalle urine dei soggetti sani, al fine di valutarne le capacità replicative e adattative. Dopo la trasfezione, prelievi di cellule e supernatante sono stati effettuati settimanalmente per 35 giorni. Su questi campioni sono state eseguite:

1. Valutazione della replicazione di JCV, mediante Real Time PCR quantitativa:

I risultati ottenuti hanno dimostrato che la quantità di DNA virale ritrovato nelle cellule trasfettate e nel supernatante, ai vari tempi di campionamento, aumentava in modo progressivo. Nel supernatante questo aumento risultava essere più marcato. Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza nel terreno di cultura sia di virioni liberi, sia di una maggiore quantità di cellule infettate che si distaccano progressivamente dalla superficie delle flask a causa di intensivo sfruttamento delle risorse cellulari da parte del virus, per il completamento del proprio ciclo vitale (Fig.1a).

2. Caratterizzazione molecolare della NCCR di JCV, mediante clonaggio e sequenziamento, al fine di comprendere come evolva nel tempo la regione di regolazione della variante archetipa non patogena CY di questo virus nelle linee cellulari trasfettate:

I risultati ottenuti hanno dimostrato che l'organizzazione strutturale di questa regione è rimasta invariata durante la propagazione del virus in entrambe le linee cellulari, risultato sorprendente se si considera che la NCCR va generalmente incontro a riarrangiamenti durante la sua persistenza nell'uomo (Fig. 1b). Ciò potrebbe essere spiegato ammettendo che le cellule trasfettate siano state coltivate per un periodo di tempo più breve rispetto a quello di persistenza della variante archetipa di JCV nell'ospite.

Fig. 1 a

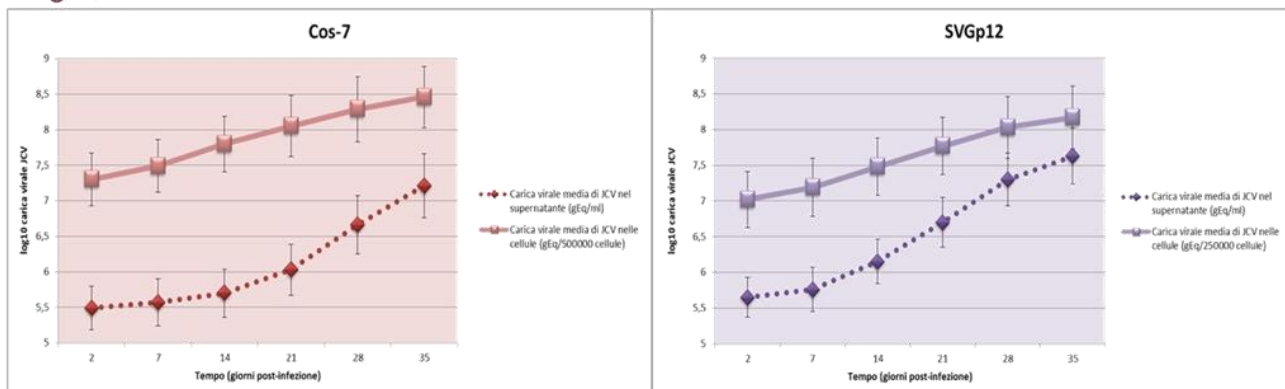
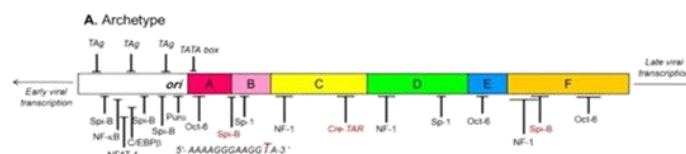


Fig. 1 b



Attività previste per il II anno del progetto

- 1) Proseguimento del follow-up sui pazienti delle coorti arruolate mediante monitoraggio della riattivazione di JCV e analisi della sequenza della NCCR virale**, dal momento che il numero di pazienti affetti da malattie immuno-mediate trattati con farmaci biologici continua ad aumentare e che il rischio di insorgenza di PML è correlato al numero di somministrazioni di mAbs.
- 2) Studio dell'organizzazione strutturale della NCCR di JCV mediante esperimenti di infezione sulle linee cellulari COS-7 ed SVGp12** al fine di valutare la capacità adattativa del virus a livello di replicazione ed espressione dei geni virali. Gli esperimenti di infezione saranno condotti utilizzando i virioni ottenuti dal supernatante dei precedenti esperimenti di trasfezione, titolati tramite reazione di emoagglutinazione ed utilizzati a diverse concentrazioni. Tali esperimenti permetteranno di valutare l'eventuale insorgenza di riarrangiamenti a carico della NCCR e se questi sono dipendenti dalla linea cellulare utilizzata.
- 3) Utilizzo del plasmide ricombinante pHRG** costruito per studiare in esperimenti di trasfezione sia il tasso di replicazione che i livelli di espressione genica regolati dalla NCCR, tramite la visualizzazione di due geni reporter codificanti la Red fluorescent protein e la Green fluorescent protein. Tale plasmide verrà utilizzato per clonare tutte le varianti della NCCR ottenute sia dai pazienti arruolati sia dagli esperimenti di infezione "in vitro". Questo tipo di esperimenti permetterà di comprendere il ruolo biologico, in termini di espressione dei geni virali, dei riarrangiamenti della NCCR.