



Università degli Studi di Firenze
Dipartimento di Sanità Pubblica
Direttore: prof. Nicola Comodo

Studio dell'espressione di fattori virali e cellulari implicati nella replicazione del Polyomavirus umano JC

Responsabile scientifico: Dr. Simone Giannecchini

PREMESSA

La leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) è una rara malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale (CNS) causata dall'infezione litica degli oligodendrociti da parte del Polyomavirus JC (JCPyV). La sua incidenza, rara fino agli anni 1980, è stimata essere del 3% in pazienti con AIDS dopo l'avvento della HAART (highly active antiretroviral therapy). Ad oggi, la PML è sempre più diagnosticata in casi di trapianto di cellule ematopoietiche o pazienti sottoposti a terapie biologiche innovative. L'uso dell'anticorpo monoclonale natalizumab, nella terapia della sclerosi multipla (SM), ha evidenziato che il prolungarsi del trattamento (in media dopo 24 dosi dell'anticorpo monoclonale) è determinante nello sviluppo della PML. Si ritiene che l'incremento in circolo di cellule ematopoietiche CD34+ e cellule pre-B contenenti JCPyV in forma latente che migrano dal midollo osseo o l'inibizione del loro homing da altri organi linfoidi, associate alla immunoregolazione in conseguenza del trattamento dell'anticorpo monoclonale siano i fattori scatenanti per la sua riattivazione e migrazione al cervello. Tuttavia, in questo contesto, i fattori virali e cellulari, la presenza o no di altri virus e il ruolo dei cambiamenti del genoma virale che possono regolare la replicazione virale non sono ancora completamente chiari.

JCPyV, virus nudo a doppia elica di DNA circolare, ha una siero prevalenza nella popolazione umana del 50-80% degli adulti. L'infezione da JCPyV si verifica durante la tarda infanzia probabilmente per via respiratoria o per via intestinale per poi diffondere attraverso linfociti infetti o attraverso virioni liberi nel sangue ad altri organi, quali rene, midollo osseo e anche il cervello, dove può persistere indefinitamente. La replicazione efficiente di JCPyV nel tessuto cerebrale con conseguente sviluppo di PML è associata a modificazioni della regione di controllo non codificante (NCCR) del genoma virale, caratterizzate da ripetizioni in tandem, delezioni e duplicazioni come anche da mutazioni nella proteina



Università degli Studi di Firenze
Dipartimento di Sanità Pubblica
Direttore: prof. Nicola Comodo

VP1 (principale proteina capsida contenente i siti di legame al recettore virale). Recentemente è stato messo in evidenza che JCPyV possiede due microRNA che possono essere utilizzati dal virus come mezzo di evasione della risposta immunitaria tramite l'attività di soppressione della espressione della proteina Large-T o tramite una soppressione di proteine cellulari (ULBP3, *stress-induced ligand*) necessarie all'attività immunologica di cellule NK ed anche linfociti T. In entrambe i casi questi microRNA virali nasconderebbero il virus alla sorveglianza immunitaria cellulare. Diversi studi della replicazione di JCPyV in vitro hanno dimostrato l'importanza del recettore di acido sialico e il co-recettore della serotonina e di fattori trascrizionali cellulari con azione attivatoria e/o inibitoria del ciclo replicativo virale in diversi substrati cellulari come le cellule gliali, ematopoietiche e linfociti B. E' ipotizzabile che in vivo la regolazione dell'espressione di questi fattori cellulari da parte di specifici microRNA cellulari possa avere un ruolo nella regolazione di JCPyV specialmente nel caso di una loro ipo- o iper-espressione indotta durante il trattamento con anticorpi monoclonali o per l'effetto dell'infezione di altri virus. In vitro, tuttavia, è da sottolineare che una efficiente replicazione virale è stata ottenuta sempre solo in cellule trasformate con la proteina Large-T del poliomavirus della scimmia SV40. La presenza di questa determinerebbe una attivazione di JCPyV grazie all'omologia di questi due virus in questa proteina che ha funzione attivatoria della replicazione virale. In recenti studi è stato anche evidenziato un effetto diretto indotto da HIV dall'attività trans-attivatoria della sua proteina Tat, interagendo con l'agnoproteina o con la sequenza Tar nell'NCCR.

SCOPO

Lo scopo dello studio è l'analisi di fattori virali e cellulari che possono regolare la riattivazione di JCPyV in pazienti immunosoppressi determinando un elevato rischio di sviluppo della PML. A tale scopo tramite l'utilizzo di PCR e RT-PCR quantitative sarà studiata in campioni ex-vivo la prevalenza di JCPyV e del Polyomavirus SV40, l'espressione dei suoi microRNA e l'espressione di alcuni microRNA cellulari che regolano fattori cellulari potenzialmente coinvolti nella regolazione della replicazione virale. Inoltre, la potenziale attività di interazione tra fattori virali e cellulari sarà valutata in esperimenti di infezione



virale in vitro con l'utilizzo di colture cellulari, cloni molecolari di JCPyV e vettori lentivirali prodotti per il silenziamento genico specifico di alcuni geni virali e cellulari.

METODICHE

Per raggiungere gli obiettivi prefissi lo studio comprenderà due parti sperimentali:

1) Studio ex vivo.

A- Selezione dei campioni per lo studio: I campioni da analizzare saranno ottenuti da pazienti con infezione da HIV, pazienti con sclerosi multipla (SM) trattati o meno con natalizumab a differenti tempi (da 1 a più di 24 dosi) e donatori sani come controllo. Nello specifico saranno prelevati campioni di sangue (linfociti e plasma) e urine. Da ciascun campione saranno estratti acidi nucleici, DNA ed RNA separatamente tramite kit commerciali specifici per l'estrazione di DNA e microRNA.

B- Ricerca del DNA di JCPyV e di altri Polyomavirus. I campioni di sangue (linfociti e plasma) e urine ottenuti serviranno per la ricerca del DNA di JCPyV tramite l'utilizzo di una PCR quantitativa real-time specifica per la sequenza del Large-T virale messa a punto nel nostro laboratorio. Inoltre, sarà anche analizzata la presenza del DNA di altri polyomavirus che potrebbero avere rilevanza nella attivazione di JCPyV. In particolare, per la capacità della sua proteina Large-T di rendere possibile la replicazione in vitro di JCPyV e poiché può essere presente nell'uomo (sieroprevalenza di circa 2% nella popolazione adulta), sarà ricercato il DNA del Polyomavirus della scimmia SV40 allestendo una real-time PCR quantitativa specifica per il Large-T dell'SV40.

C- Analisi dell'evoluzione molecolare della regione di controllo noncodificante (NCCR) e la proteina capsidica VP1 di JCPyV. Questa analisi sarà condotta su i campioni positivi di DNA ottenuti sia dal sangue che dall'urina tramite una PCR nested specifiche per le regioni NCCR e VP1 già in uso nel nostro laboratorio. I prodotti così amplificati saranno utilizzati per il loro sequenziamento. Le sequenze ottenute verranno analizzate tramite il programma BIOEDIT e confrontate con quelle dei virus JCPyV disponibili in banca dati ottenute da pazienti con o senza PML.



Università degli Studi di Firenze
Dipartimento di Sanità Pubblica
Direttore: prof. Nicola Comodo

D- Analisi dell'espressione di microRNA virali e cellulari. L'analisi sarà condotta sui linfociti risultati positivi a JCPyV tramite l'utilizzo di RT-PCR quantitative real-time commerciali specifiche per valutare l'espressione dei due microRNA di JCPyV e l'espressione di microRNA cellulari implicati nella regolazione di fattori cellulari che potenzialmente possono attivare o inibire il virus (microRNA-146 e 155 implicati nella regolazione del NF κ B che può attivare il virus, e microRNA-let7 implicato nella regolazione del fattore SF2/ASF che ha azione inibitoria del virus).

2) Studio in vitro.

A- Esperimenti di infezione di substrati cellulari in vitro con JCPyV. In questi esperimenti in vitro saranno utilizzate cellule ematopoietiche CD34 + (KG-1), e sia la linea cellulare cerebrali fetale umana SVG e le COS-7 entrambe substrati cellulari altamente suscettibili all'infezione con JCPyV per la presenza del Large-T antigene di SV40. Queste cellule saranno infettate con particelle di JCPyV ottenute con cloni molecolari.

B- Analisi della replicazione virale. La replicazione virale sarà analizzata andando a ricercare il DNA di JCPyV a differenti tempi dell'infezione tramite real-time PCR quantitativa specifica per il Large-T. Inoltre la produzione di particelle virali sarà valutata mediante saggi di emoagglutinazione compiuti con i lisati cellulari.

C- Analisi dell'espressione di fattori cellulari e virali. In questi esperimenti sarà analizzata l'espressione virale di microRNA di JCPyV e quelli cellulari esattamente con le metodiche di RT-PCR quantitative descritte in precedenza. Inoltre sarà anche analizzata l'espressione del Large-T, dell'agnoproteina di JCPyV e di fattori cellulari come l' SF2/ASF implicati nella regolazione della replicazione virale. Esperimenti con RNA interferenti sintetici o espressi tramite vettori lentivirali saranno eseguiti per inibire l'espressione dei più rilevanti fattori cellulari e/o virali che saranno stati identificati nei precedenti esperimenti. Questi esperimenti serviranno a valutare l'effetto di questi fattori sulla replicazione virale.