

## Titolo: Studio dell'effetto profibrotico e antiangiogenetico del parvovirus B19: ruolo dell'infezione nella patogenesi della sclerosi sistemica

**Referente scientifico:** Dott.ssa Gabriella Fibbi ricercatrice a tempo indeterminato della Sezione di Patologia Generale del Dipartimento di Scienze Biomediche, Sperimentali e Cliniche "Mario Serio" dell'Università di Firenze

**Team di ricerca:** Dott.ssa Francesca Margheri, Dott.ssa Rosaria Arvia, Dott.ssa Maria Stincarelli, Dott.ssa Anna Laurenzana, Prof. Mario Del Rosso, Dott.ssa Alessandra Mocali, Dott.ssa Francesca Scavone

### REFERENTE SCIENTIFICO E TEAM DI RICERCA

La Dott.ssa Fibbi si è sempre occupata di patologia reumatica, facendone uno dei suoi principali interessi, come testimoniato dal suo CV e dalle pubblicazioni sulle maggiori riviste internazionali di reumatologia, ed in particolar modo della Sclerosi Sistemica. E' stata coautrice nella stesura di reviews su invito sulle patologie infiammatorie articolari in riviste internazionali. Negli ultimi anni si è occupata anche dello studio del fenotipo proinfiammatorio secretorio associato alla senescenza (*Senescence-Associated-Secretoty Phenotype, SASP*) e del suo effetto sulla capacità angiogenetica di Progenitori di Cellule Endoteliali.

Ha partecipato come Senior Investigator in numerosi finanziamenti per ricerche in campo reumatologico, comprensive di un grant internazionale da parte della Scleroderma Foundation (uno dei due grant italiani che hanno ricevuto tale finanziamento nella storia della organizzazione), della Toscana Life Science e del Ministero della Istruzione e della Ricerca (Progetti PRIN anni 2002 e 2005).

Il team di ricerca è costituito da ricercatori con esperienza pluriennale in differenti settori di ricerca:

1. Allestimento di colture primarie e valutazione delle caratteristiche biologiche e funzionali delle stesse (Margheri, Laurenzana, Del Rosso, Scavone), 2. Studio delle alterazioni microvascolari caratteristiche della sclerosi sistemica (Margheri, Del Rosso), 3. Studio delle infezioni virali, anche da parovirus B19, sia *in vivo* che in *in vitro* (Arvia, Stincarelli); 4. Studio del fenotipo SASP (Mocali)

### Descrizione del budget

Assegno di ricerca di 1 anno	25 000
Materiale di consumo	5 000
<b>Totale</b>	<b>30 000</b>

## Basi scientifiche

La sclerosi sistemica (SSc) è una connettivite autoimmune caratterizzata da danno microvascolare e fibrosi della cute e degli organi interni. Il danno vascolare è l'evento patogenetico primario della SSc e porta al graduale rimodellamento dei vasi che culmina nella loro obliterazione dando origine ad un quadro di vaste aree avascolari ("*desert like*"). Tutto ciò determina una severa ipossia ma, benché questa sia un forte stimolo angiogenico, manca una adeguata angiogenesi nei pazienti con la SSc [1]. Abbiamo precedentemente dimostrato che uno dei meccanismi coinvolti è la perdita dell'attività pro-angiogenica del recettore dell'urochinasasi (uPAR) causata da un taglio della molecola da parte della metalloproteasi-12 (MMP12) prodotta dalle cellule endoteliali e dai fibroblasti sclerodermici [2-4].

La fibrosi segue la fase vascolare, sostituendo i tessuti in sofferenza ipossica, ed è responsabile dei principali sintomi della malattia. Si tratta fondamentalmente di fibroblasti attivati (miofibroblasti), che producono alti livelli di citochine e fattori di crescita responsabili del processo infiammatorio associato alla fibrosi e della elevata deposizione di proteine della matrice extracellulare [5]. Nonostante la SSc non sia stata generalmente considerata una patologia associata alla senescenza, negli ultimi anni numerosi studi hanno dimostrato che l'età avanzata è associata ad una prognosi peggiore e ad una aumentata mortalità dei pazienti affetti dalla SSc. Alcune caratteristiche della senescenza cellulare sembrano associate alla patogenesi della sclerodermia, come ben documentato in una importante review [6]. È stato dimostrato che nella fibrosi polmonare, complicanza molto frequente nella sclerosi sistemica, i fibroblasti attivati producono un complesso cocktail di fattori chiamato fenotipo pro-infiammatorio secretorio riconducibile a quello associato alla senescenza (*Senescence-Associated-Secretory Phenotype, SASP*) [7]. L'acquisizione di tale fenotipo può contribuire quindi allo sviluppo ed al peggioramento del processo fibrotico. La causa della sclerodermia è ancora sconosciuta. È stato ipotizzato un ruolo dei fattori ambientali, come l'esposizione a solventi organici e tossine, o agenti microbici che ne potrebbero innescare la comparsa in soggetti geneticamente predisposti. Alcune infezioni virali sembrano giocare un ruolo cruciale nell'insorgenza e/o nella progressione della SSc. Uno dei virus verosimilmente coinvolti è il parvovirus B19 (B19V), un piccolo virus nudo con il genoma a DNA a singolo filamento [8-10].

In uno studio precedente abbiamo dimostrato che il B19V attiva i fibroblasti dermici inducendo un fenotipo *SASP-like* (Arvia R. et al, submitted). Inoltre, esperimenti preliminari mostrano che il B19V inibisce la morfogenesi capillare di una sottopopolazione di progenitori di cellule endoteliali chiamate *Endothelial Colony Forming Cells* (ECFC). Questi dati suggeriscono che il virus potrebbe essere coinvolto nella patogenesi della SSc sia interferendo con l'angiogenesi che favorendo la fibrosi. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per definire meglio gli effetti dell'infezione su queste cellule e definire i meccanismi alla loro base.

## Scopo

L'obiettivo del presente progetto è quello di approfondire il ruolo dell'infezione da B19V nella patogenesi della SSc valutando l'induzione del danno vascolare e del fenotipo SASP dei fibroblasti cutanei infettati *in vitro*.

## Metodologie

### Allestimento di colture cellulari primarie

Le ECFC saranno isolate da sangue di cordone ombelicale umano mentre le HMVEC (*human microvascular vein endothelial cells*) e le HDNF (*human dermal normal fibroblast*) da biopsie di cute sana seguendo metodiche già usate nel nostro laboratorio [11]. Le cellule saranno poi coltivate e caratterizzate per l'espressione di marcatori specifici mediante citofluorimetria.

## **Infezione con B19V**

Le colture cellulari verranno infettate con un siero viremico contenente un alto titolo del virus ( $1 \times 10^{12}$  equivalenti genomici/ml) e con un virus ricombinante, il B19V-EC (GenBank: KY940273), come precedentemente descritto [10].

### **Valutazione dell'attività angiogenica nelle cellule infettate**

La capacità angiogenetica delle ECFC e delle HMVEC, prima e dopo l'infezione, sarà valutata mediante l'invasività spontanea su filtri rivestiti di Matrigel utilizzando le camere di Boyden e la formazione di strutture simil-capillari in Matrigel, come descritto precedentemente [11]. Mediante RT-PCR comparativa verranno confrontati i livelli di mRNAs per la MMP12 nelle cellule infettate e in cellule di controllo non infettate.

### **Valutazione del fenotipo attivato SASP-like dei fibroblasti**

Nei fibroblasti, prima e dopo l'infezione, saranno valutati marcatori di attivazione mesenchimale valutando i livelli dell'espressione a livello trascrizionale (mediante RT-PCR quantitativa) e traduzionale (mediante western-blot), la capacità proliferativa, l'invasività e la produzione di collagene. Saranno quindi analizzati i tipici marcatori di senescenza cellulare ed i fattori riconducibili al fenotipo SASP.

## **Risultati attesi e sviluppi applicativi**

Il picco di insorgenza della sclerodermia si colloca tra i 45 e 65 anni e, come spesso accade per le patologie autoimmuni, sono colpite più frequentemente le donne. L'incidenza della malattia è compresa tra 10 a 20 casi per 1000 000 soggetti adulti. Non vi sono ancora farmaci in grado di curare la sclerodermia. I trattamenti utilizzati, pertanto, puntano a contenere i sintomi e ad evitare o ritardare le complicanze della malattia.

Questo studio ci permetterà di definire il ruolo del B19V in due fenomeni importanti della patogenesi della sclerosi sistemica: l'inibizione dell'angiogenesi e l'induzione della fibrosi, e di studiarne i meccanismi.

Tali conoscenze permetteranno, in futuro, di utilizzare le colture B19V-infettate come modello per studiare il controllo terapeutico dell'angiogenesi (mediante editing genetico, come sotto descritto) e della fibrosi/SASP (farmaci senolitici e anticorpi antivirus). A tale proposito, poiché l'angiogenesi è strettamente dipendente dalla presenza della forma non troncata di uPAR, abbiamo già preparato cellule ECFC che producono un uPAR modificato, mediante editing genetico, in modo da non poter essere troncato dalla MMP12 prodotta dalle cellule endoteliali e dai fibroblasti sclerodermici presenti nel tessuto ipossico tipico della sclerosi sistemica. Queste ECFC geneticamente modificate potranno formare nuovi vasi *in vivo* determinando una rivascularizzazione nella sclerosi sistemica quindi essere utilizzate a scopo terapeutico.

## **Bibliografia**

1. Le Roy EC. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennett JC, editors. Cecil textbook of medicine. 19th ed. Philadelphia: WB Saunders 1992; 1530-5.
2. D'Alessio S, Fibbi G, Cinelli M, et al. Arthritis Rheum 2004;50:3275-85.
3. Margheri F, Manetti M, Serrati S, et al. Arthritis Rheum 2006;54:3926-38.
4. Serrati S, Cinelli M, Margheri F et al. J Pathol 2006;210(2):240-8.
5. Varga J, Abraham D. J Clin Invest 2007;117:557-67.
6. Luckhardt et al., 2015
7. Ferri C, Longombardo G, Azzi A, Zakrzewska K. Clin Exp Rheumatol 1999;17:267-8.
8. Ferri C, Zakrzewska K, Giuggioli D et al. Arthritis Rheum 2000;43 (Suppl. 9):315.
9. Magro CM, Nuovo G, Ferri C et al., J Cutan Pathol 2004;31:43-50.
10. Zakrzewska K, Arvia R, Torcia MG et al J Invest Dermatol 2019;139(10):2125-33.

11. Margheri F, Chillà A, Laurenzana A, et al. *Blood*. 2011;118:3743–3755.