



### **Titolo del progetto**

#### **Eziopatogenesi della sclerosi sistemica: ruolo del parvovirus B19 e del cytomegalovirus**

Coordinatore: Clodoveo Ferri, Professore Ordinario di Reumatologia, Università degli studi di Modena e Reggio Emilia

Responsabili Unità di Ricerca Partecipanti: Alberta Azzi, Dipartimento di Sanità Pubblica, Università di Firenze; Giovanni Abatangelo, Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie, Università di Padova

#### **Base scientifica**

La Sclerosi Sistemica (SSc) è una malattia del tessuto connettivo ad eziologia sconosciuta, caratterizzata da fibrosi della cute e di vari organi ed apparati, a prognosi spesso molto severa. Nella patogenesi della malattia intervengono sicuramente complesse alterazioni del sistema immune responsabili delle tipiche manifestazioni anatomopatologiche, quali la microangiopatia e l'attivazione dei fibroblasti, che portano alle lesioni ischemiche e alla fibrosi, entrambe tipiche alterazioni istopatologiche osservate negli organi bersaglio: cute, articolazioni, tendini, muscoli, apparato gastroenterico, polmone, cuore, rene(1-4) I pazienti con SSc possono presentare una notevole variabilità nell'espressività, nell'evoluitività e nella gravità del quadro clinico (5). Sono stati operati vari tentativi tesi a classificare la malattia in sottogruppi differenti sul piano clinico prognostico, tutti, sostanzialmente, fondati sulla diversa estensione della sclerosi cutanea; alcuni autori hanno adottato, sulla base dei dati emergenti da casistiche reali, una classificazione in 3-4 sottogruppi considerando insieme o, rispettivamente, separando la SSc a sclerosi cutanea limitata e la SSc sine sclerodermia, la cui esistenza è stata riportata anche dal nostro gruppo (6) La classificazione da noi tradizionalmente seguita è quella in tre sottogruppi (SSc forma cutanea limitata, intermedia, diffusa) per il valore clinico-prognostico evidenziato nella pratica clinica (7). Il decorso della sclerodermia è variabile da caso a caso, soprattutto fra pazienti appartenenti a sottogruppi diversi di malattia. La sopravvivenza a 10 anni dalla diagnosi si attesta, nella nostra casistica italiana, intorno al 60%. Oltre al problema correlato alla durata della vita, la SSc altera indubbiamente la qualità di vita dei pazienti che ne sono affetti: i processi necrotico-ulcerativi delle estremità impediscono lo svolgimento di attività lavorative o addirittura di quelle quotidiane; interessamento articolare e muscolare insieme al coinvolgimento cardiaco e polmonare limitano fortemente la capacità funzionale dei soggetti colpiti. La causa o le cause che portano all'insorgere dei meccanismi patogenetici, sono però sconosciute, agenti ambientali o sostanze chimiche organiche come gli idrocarburi alifatici e aromatici, farmaci quali la pentazocina, fenfluramina, bleomicina e cocaina sono riportati come fra le poche e sporadiche cause note di sclerodermia. Sono stati ipotizzati come possibili fattori trigger nello sviluppo vari agenti infettivi, come l' Herpes virus (HV), il virus di Epstein Barr (EBV)(8) il Parvovirus B19 (PV-B19) ed il Citomegalovirus (CMV)(9). Nel caso del citomegalovirus umano l'ipotesi di un ruolo di questa infezione nella SSc si basa sulle rilevanti somiglianze tra le vasculopatie da CMV e la SSc e sull'osservazione che i

zienti con SSc presentano livelli più elevati di anticorpi verso CMV che la popolazione normale. Inoltre dal siero dei pazienti con SSc sono stati purificati anticorpi IgG in grado di reagire con autoantigeni e con antigeni di CMV (UL94 late protein); questi anticorpi inducono apoptosi delle cellule endoteliali (9,10,11,12). Il nostro interesse già da alcuni anni si è concentrato soprattutto sul Parvovirus umano B19. Il PV-B19 fa parte della Famiglia Parvoviridae, si trasmette per via respiratoria ed è molto diffuso in tutto il mondo (la prevalenza degli anticorpi negli adulti è attorno al 60%). Il virus B19 è l'agente eziologico dell'Eritema Infettivo e della crisi aplastica transitoria in soggetti con anemie emolitiche croniche (13), ma può causare malattie diverse in gran parte in relazione alle condizioni dell'ospite e può anche essere asintomatico. Soprattutto nelle donne, è causa di artralgie e artriti acute e croniche. L'impiego della PCR, in versioni varie, per la ricerca del genoma virale, ha consentito di dimostrare che l'infezione da parvovirus può persistere, e non solo in pazienti immunodepressi, e che altre cellule, oltre ai progenitori eritroidi, possono essere infettate dal virus e possono essere sede di persistenza (14,15,16). Queste osservazioni hanno concorso ad ampliare enormemente lo spettro di patologie nelle quali il parvovirus è talvolta, o potrebbe essere, coinvolto (17,18,19,20,21,22,23,24,25,26). Recentemente, alcuni studi hanno suggerito un possibile ruolo del PV-B19 come fattore scatenante della sclerosi sistemica, in conseguenza del fatto che è già stato evidenziato un suo ruolo nella eziologia di malattie immuno-reumatologiche come l'artrite reumatoide, il lupus eritematoso sistemico e le vasculiti cutanee. A questi elementi si aggiungono alcuni dati già da noi raccolti e pubblicati (27-30). La viremia da B19 nei pazienti sclerodermici è risultata più frequente che nei controlli. (27) E' stato dimostrato che il DNA virale è presente a livello del midollo osseo (28) e della cute in una percentuale più elevata di pazienti rispetto ai controlli. Più del 70 % dei pazienti con sclerodermia ha una infezione persistente da PV-B19. DNA di parvovirus umano B19 è presente nei fibroblasti (e non nei cheratinociti) ottenuti da biopsie cutanee di pazienti con SSc e persiste nelle subcolture (27-30). In sezioni di tessuto da lesioni cutanee da pazienti con SSc la presenza di sequenze di DNA di B19 e di messaggeri virali è stata dimostrata mediante PCR in situ in fibroblasti, cellule endoteliali e in cellule infiammatorie perivascolari (31). Anche la capacità del B19 di stimolare la produzione di autoanticorpi potrebbe giocare un ruolo nella patogenesi di questa come di altre malattie autoimmuni del connettivo (32). Ray (33) ha dimostrato che l'esposizione al virus di fibroblasti ottenuti da tessuto sinoviale normale induce l'acquisizione di un fenotipo invasivo. Oltre alla individuazione di una infezione persistente del PV-B19 nell'organismo dei pazienti sclerodermici è estremamente importante confermare i possibili meccanismi patogenetici del danno da parte del virus sulle cellule. Dal momento che le alterazioni tissutali diffusamente osservabili nella SSc sono la conseguenza di un abnorme accumulo di collagene da parte dei fibroblasti sclerodermici e di una microangiopatia responsabile di lesioni ischemiche diffuse oltre ad una serie di anomalie dell'immunità anticorpo- e cellulo-mediata è necessario utilizzare colture in vitro per studiare i meccanismi di proliferazione e l'attività biosintetica di fibroblasti e di cellule endoteliali. Il limite di tali indagini è rappresentato dal fatto che le cellule coltivate si sviluppano solo come monostrato e, quindi, sono abbastanza lontane dalle condizioni originarie. Una alternativa a queste colture classiche su piastre (bidimensionali) è rappresentata dalla coltura in vitro all'interno di supporti tridimensionali. In questo caso le cellule all'interno dello "scaffold" possono proliferare e riorganizzarsi in aggregati tridimensionali che sicuramente ricordano più da vicino le condizioni naturali. In queste condizioni può essere più agevole lo studio dei fenomeni legati all'iperproduzione di particolari molecole tipiche della sclerosi sistemica da parte di fibroblasti e cellule endoteliali infette o preventivamente infettati con

il PV-B19. Sono disponibili tecnologie per la ricostruzione in vitro di tessuti per l'allestimento di co-culture tridimensionali ed in particolare di quelle di fibroblasti e cellule endoteliali (34-35). Con questo tipo di colture in vitro si vengono a creare condizioni ottimali per vari tipi di indagini biologiche, tra cui la valutazione dell'attività biosintetica di fibroblasti e di cellule endoteliali, sia in condizioni normali che dopo infezione con il PV-B19. Su questo modello di tessuto connettivo in vitro dovrebbe essere più agevole studiare la produzione delle molecole presenti normalmente nella matrice del tessuto connettivo, rilevarne la loro variazione quantitativa in relazione all'infezione, e relazionarla eventualmente anche alla presenza di molecole tipiche della sclerosi sistemica. Un progetto di ricerca di questo tipo rende sicuramente necessario un approccio multidisciplinare che coinvolge reumatologi, immunologi, virologi, istopatologi ed esperti di biologia molecolare.

1. Medsger TA Jr. Systemic sclerosis (scleroderma) , localized scleroderma, eosinophilic fasciitis, and calcinosis. In: Mc Carty DJ, ed. Arthritis and al lied conditions. 11th Ed. Philadelphia: Lea&Febiger,1118-1165.
2. Le Roy EC.Systemic sclerosis. In:Wyngaarden JB,Smith LHjr, eds. Cecil textbook of medicine. Philadelphia:WB Saunders,1988.
3. Masi AT. Classification of systemic sclerosis (scleroderma). In: Black CM, Myers AR, eds. Systemic sclerosis (scleroderma). New York, 1985:7-15.
4. Subcommittee for scleroderma criteria of the american rheumatism association diagnostic and therapeutic criteria comittee: preliminary criteria for the classification of systemic sclerosis (scleroderma). Arthritis Rheum 1980; 23:581-590.
5. Le Roy EC, Black C, Fleischemeier R et al : Scleroderma (systemic sclerosis) : classification, subset and pathogenesis. J Rheumatol 1988;15:202-205.
6. Masi AT. Classification of systemic sclerosis (scleroderma): relationship of cutaneous subgroups in early disease to outcome and serological reactivity. J Rheumatol 1988;15:894-898.
7. Ferri C, Bernini L, Cecchetti R, et al: Cutaneous and serological subset of systemic sclerosis. Their relevance in diagnosis, severity and prognosis of the disease. J Rheumatol 1991;18:26-1832
8. Vaughan JH, Shaw PX, Nguyen MD, Medsger TA Jr, Wright TM, Metcalf, Leroy EC : Evidence of activation of 2 herpesviruses, Epstein-Bar, virus and cytomegalovirus, in systemic sclerosis andnormal skins.J Rheumatol 2000 Mar;27(3):821-3
9. Ferri C, Cazzato M, Giuggioli D, Sebastiani M, Magro C: Systemic sclerosis following human cytomegalovirus infection. Ann Rheum Dis 2002;61:937-85
10. . Hamamdziec D, Kasman L, LeRoy EC. Role of infectious agents in the pathogenesis of systemic sclerosis. Current Opin in Rheumatol. 2002; 14: 694-698
11. Khaleh MB, LeRoy EC. Autoimmunity an vascular involvement ib systemic sclerosis (SSc). Autoimmunity 1999;31:195-214
12. Lunardi C, Bason C, Navone R et al. Systemic sclerosis immunoglobulin G autoantibodies bind the human cytomegalovirus late protein UL94 and induce apoptosis in human endothelial cells. Nature Med. 2000; 6: 1183.118610.
13. Brown KE, Young NS, Johnson ML. Molecular, cellular and clinical aspects of parvovirus B19 infection. Crit.Rev.Oncol/Hematol., 16 (1994) 1-31

14. Cassinotti P., Burtonoboy G., Fopp M. et al. Evidence of persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. *J. Med. Virol.*, 53 (1997) 229-232
15. Soderlund M., von Essen R., Haapasaari U. et al. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovial membranes of young patients with and without chronic arthropathy. *Lancet*, 349 (1997) 1063-1065.
16. Wong S, Young NS, Brown KE. Prevalence of parvovirus B19 in liver tissue: no association with fulminant hepatitis or hepatitis-associated aplastic anemia. *J Infect. Dis.* 2003; 187: 1581-1586
17. Nigro G, Bastianon V, Colloridi V et al. Human parvovirus B19 infection in infancy associated with acute and chronic lymphocytic myocarditis and high cytokine levels: report of 3 cases and review. *Clin Infect Dis.* 2000; 31: 65-69
18. Saint-Martin J, Choulot J, Bonnaud E et al. Myocarditis caused by parvovirus. *J Pediatr.* 1990; 116: 1007-1008
19. Nigro G., Zerbini M., Krzysztofiak A. et al. Active or recent parvovirus B19 infection in children with Kawasaki disease. *Lancet*, 343 (1994) 1260-1261.
20. Cope A.P., Jones A., Brozovic M. et al. Possible induction of systemic lupus erythematosus by human parvovirus. *Ann. Rheum. Dis.*, 51 (1992) 803-804
21. Watanabe T., Satoh M., Oda Y. Human parvovirus B19 encephalopathy. *Arch. Dis. Child.*, 70 (1994) 71
22. Martinelli M., Azzi A., Buffini G. et al. Cutaneous vasculitis due to human parvovirus B19 in an HIV-infected patient: report of a case. *AIDS* 11(1997) 1981-1983.
23. Lefrere J.J., Courouce A.M., Soulier J.P. et al. Henoch Schonlein purpura and human parvovirus infection. *Pediatrics* 78 (1986) 183-184
24. Langnas A.N., Markin R.S., Catral M.S. et al. Parvovirus B19 as a possible causative agent of fulminant liver failure and associated aplastic anemia. *Hepatology*, 22 (1995) 1661-1665
25. Zakrzewska K., Azzi A., De Blasi E., et al. Persistence of parvovirus B19 DNA in synovium of patients with haemophilic arthritis. *J. Med.Virol.* 2001 ; 65: 402-407
26. Naides SJ. Rheumatic manifestations of parvovirus B19 infection. *Rheum Dis Clin North Am* 1998; 24: 375
27. Ferri C, Zakrzewska K, Longombardo G, Giuggioli D, Storino FAA, Pasero G, Azzi A,; Parvovirus B19 infection of bone marrow in systemic sclerosis patients. *Clin Exp Rheumatol* 1999;17:401-403.
28. Ferri C, Longombardo G, Azzi A, Zakrzewska K: Parvovirus B19 and systemic sclerosis. *Clin Exp Rheumatol* 1999, 17(2):267-8
29. C Ferri, K Zakrzewska, D Giuggioli, et al. Parvovirus B19 infection in the skin and bone marrow of systemic sclerosis patients. *Arthritis & Rheumatism* 2000; 43 (supplement); F315: 1491.
30. Ferri C, Giuggioli D, Sebastiani M, Panfilo S, Abatangelo G et al. Parvovirus B19 infection of cultured skin fibroblasts from systemic sclerosis patients:comment on the article by Ray et al. *Arthrit Rheum* 2002, 46 8:2262-3
31. . Magro C, Nuovo G, Ferri C et al. Parvoviral infection of endothelial cells and stromal fibroblasts: a possible pathogenetic role in scleroderma. *J. Cutan.Patghol.* 2004; 31:43-50

32. Lunardi C., Tiso M., Borgato L. et al. Chronic parvovirus B19 infection induces the production of anti-virus antibodies with autoantigen binding properties. *Eur.J.Immunol.*, 28 (1998) 936-949.
33. Ray BN, Nieva DRC, Seftor EA et al. Induction of invasive phenotype by human parvovirus B19 in normal human synovial fibroblast. *Arthritis and Rheumatism* 2001; 44: 1582-1586
34. Brun P, Cortivo R, Radice M., Abatangelo G Hyaluronan-based Biomaterials in tissue engineering. In " New Frontiers in Medical Sciences: Redefining hyaluronan" eds Abatangelo G and Wiegel PH. Elsevier Science. 2000 pp 269-278
35. Tonello C, Zavan B, Cortivo R, Brun P, Panfilo S, Abatangelo G. (2003). In vitro reconstruction of microcapillary network into a tissue-engineered human dermal equivalent biomaterials. (vol. 24 (7) pp. 1205-1211) if 2,49.

### **Descrizione del progetto**

Partendo dall'ampia casistica di soggetti sclerodermici che afferiscono al nostro Servizio (oltre 300), il protocollo di studio prevede:

1. selezione di pazienti con malattia all'esordio o comunque con durata di malattia inferiore a 5 anni, di cui 30 con sierologia positiva per anticorpi anti-PV-B19 (IgG-positivi) e 15-20 soggetti con assenza di anti-PV-B19 (IgG-negativi)- i soggetti negativi per IgG saranno sicuramente in minor numero in quanto l'infezione è molto diffusa nella popolazione generale
2. i pazienti verranno sottoposti a stadiazione completa per valutare l'interessamento dei vari organi ed apparati (valutazione dell'impegno cutaneo con score della fibrosi mediante Rodnan modificato, presenza di fibrosi polmonare con prove di funzionalità respiratoria e Dico, HRTC, ECG, ecocardiografia con esame Doppler, scintigrafia esofagea, capillaroscopia) e caratterizzati per quanto riguarda l'autoimmunità mediante la ricerca dei vari autoanticorpi -ANA, ENA, compresi anticentromero, anti Scl70 e antinucleolo.
3. Dal punto di vista virologico i pazienti verranno inoltre indagati per verificare la presenza di anticorpi IgG e IgM diretti verso Cytomegalovirus, EBV, adenovirus, HCV, HBV, herpesvirus, HIV.
4. Dopo consenso informato, i soggetti verranno sottoposti a prelievo di un campione di sangue ed a biopsia cutanea- 2 punch da 4 mm su cute dell'avambraccio.
5. Raccolta di campioni di sangue e biopsia cutanea da soggetti normali di controllo (reperiti presso il Servizio di Dermatologia e Chirurgia generale in occasione di interventi chirurgici per cause varie): almeno 30 soggetti in modo da avere presumibilmente 20 casi PV-B19+ e 10 PV-B19- (dati della letteratura riportano la presenza di infezione persistente nella cute in un 20-30% dei soggetti normali).
6. I campioni di cute di pazienti e controlli saranno in parte trattati nel nostro laboratorio ed in parte inviati al laboratorio dell'Unità di Ricerca di Padova (per colture tridimensionali di fibroblasti e cellule endoteliali, isolamento dei fibroblasti PV-B19- per il laboratorio di Microbiologia di Firenze) e all'Istituto di Microbiologia di Firenze (per ricerca del PV-B19 DNA tramite RT-PCR e immunoistochimica, immunità cellulare per il PV-B19, ricerca genomica del CMV).

Presso il nostro laboratorio sarà effettuata

1. La ricerca delle alterazioni morfologiche e funzionali dei fibroblasti isolati dalla cute dei pazienti e controlli.
2. la caratterizzazione della matrice extracellulare prodotta dai fibroblasti dermici di pazienti e controlli Tale caratterizzazione valuterà l'espressione di mRNA dopo estrazione di RNA totale da colture di fibroblasti mediante reagente TRIzol (Life Technologies) e successiva purificazione dell'mRNA con il sistema Oligotex beads (Qiagen); i cambiamenti di espressione degli mRNA per le principali molecole della matrice e/o delle integrine che regolano le interazioni cellula-matrice valutate mediante RT-PCR che utilizza primers già presenti in laboratorio o commercialmente disponibili. :

Nel laboratorio di Microbiologia di Firenze verranno condotte le ricerche virologiche.

1. Nel siero dei pazienti con SSc, verrà confermata la ricerca di anticorpi anti-parvovirus utilizzando dei saggi immunoenzimatici commerciali (Seiken). I sieri positivi verranno analizzati mediante Western blot (Mikrogen) per la ricerca di anticorpi anti-NS1 e verso epitopi diversi di VP1 e VP2.
2. Nei pazienti positivi per anticorpi anti-B19 si procederà alla ricerca delle sequenze di genoma virale mediante amplificazione della sequenza del promotore, della sequenza codificante per NS1 e di quella codificante per le proteine strutturali VP1 e VP2. In questo modo verrà stabilita la presenza dell'intero genoma nel tessuto.
3. Verrà anche determinato il numero di copie di genoma presenti nel campione esaminato (mediante una Sybr Green real-time PCR, già in uso nel nostro laboratorio).
4. Nei tessuti positivi per il DNA di B19 si procederà ulteriormente alla ricerca degli mRNA per la proteina NS1 e per le proteine VP1 e VP2. Per gli mRNA per le proteine strutturali verrà impiegata una RT-PCR, già in uso nel laboratorio, che amplifica, tramite l'uso di primers opportunamente scelti, l'RNA "spliced" con la sintesi di prodotti di caratteristiche dimensioni. Per l'mRNA della proteina NS1 verrà impiegata una RT-PCR dopo trattamento dei campioni con DNasi.
5. Sia nel siero che nelle biopsie cutanee di pazienti con SSc e controlli verrà ricercata, oltre alla presenza del DNA di B19, anche quella della variante K71, utilizzando la PCR descritta in letteratura e già messa a punto nel laboratorio.
6. Su sezioni di tessuto si procederà, mediante ibridazione in situ con sonde specifiche marcate con digossigenina, alla ricerca del genoma virale per stabilire la natura delle cellule infettate.

Inoltre, al fine di precisare la/le cellule bersaglio dell'infezione nel tessuto colpito, dal materiale biotico verranno allestite colture in vitro. Questa parte verrà sviluppata in stretta collaborazione fra il Laboratorio dell'Unità di ricerca di Padova (preparazione di colture di fibroblasti e cellule endoteliali ed invio a Firenze) e l' Istituto di Microbiologia di Firenze (infezione delle colture e successivo controllo dei marcatori di infezione ) Per individuare possibili meccanismi patogenetici legati all'infezione virale, verrà studiata l'infezione da parvovirus B19 in due modelli sperimentali in vitro: in colture primarie di fibroblasti cutanei e di fibroblasti più cellule endoteliali, dato il ruolo che tali cellule rivestono nella patogenesi della malattia.

**PADOVA :**1. Allestimento di colture di fibroblasti delle biopsie cutanee secondo il protocollo modificato di Rheinwald & Green . A seguito della rimozione del foglietto epidermico mediante digestione con dispase, il derma verrà tagliato in piccoli frammenti (2-3 mm<sup>2</sup>) e sottoposto a digestione con tripsina e collagenasi al fine di isolare i fibroblasti. Le cellule così ottenute verranno

coltivate con DMEM contenente 10% di siero fetale bovino (FBS) e addizionato di Glutammina 2 mM e [100U/ml]/[100\*g/ml] Pennicillina/Streptomicina (cDMEM). Il terreno verrà cambiato due volte a settimana e le cellule verranno staccate mediante digestione con tripsina. 2. Quando possibile, in relazione al materiale disponibile, dallo stesso campione, dal tessuto sottocutaneo, più ricco di tessuto adiposo, si separeranno anche le cellule endoteliali. 3. Allestimento delle colture tridimensionali I biomateriali utilizzati nel presente studio derivano dalla totale esterificazione dell'acido ialuronico con alcool benzilico: materiale HYAFF-11TM. La molecola è sintetizzata partendo da 80-200 kDa di ialuronato di sodio. Il prodotto finale è un polimero lineare non crosslinkato con peso molecolare indeterminato, insolubile in solventi acquosi sebbene idrolizzi spontaneamente nel tempo rilasciando alcool benzilico e acido ialuronico. HYAFF-11TM verrà utilizzato in forma di non tessuto (non woven) costituito da fibre con diametro di 50 µm aventi peso di 100g/m<sup>2</sup>. Tale biomateriale verrà fornito dalla Fidia Advanced Biopolymers (FAB, Abano T., Italy).

Su tali biomateriali saranno allestite le seguenti colture:

- fibroblasti di derma umano, - cellule endoteliali e fibroblasti, - cellule endoteliali infettate su matrici connettivali ottenute dalla semina preventiva di fibroblasti umani. In alcuni campioni, prima della semina delle endoteliali, i fibroblasti verranno eliminati mediante induzione di shock osmotico con acqua distillata per 60 minuti a 37 °C

FIRENZE :cellule verranno inoculate con una sospensione di virus infettante allo scopo di verificare se e con quali caratteristiche può stabilirsi un rapporto virus B19 –fibroblasti o -cellule endoteliali in vitro. Data la non coltivabilità del parvovirus in linee cellulari, verrà usato a questo scopo un siero ottenuto da un paziente in fase viremica, già titolato nel Laboratorio di Microbiologia di Firenze per l'infettività in cellule UT7 Epo. E' stato anche preliminarmente verificato che deve essere utilizzata una diluizione del siero scelto per le prove contenente 350 genomi per cellula. L'infezione verrà condotta a 4°C per 2 ore. L'inoculo verrà quindi rimosso e, dopo almeno tre lavaggi, verrà aggiunto il terreno di mantenimento. Verranno ricercati diversi marcatori di infezione a vari tempi (tempo 0, 24 e 48 ore, 7 giorni, 14 giorni) : aumento significativo del DNA virale e presenza di forme replicative (mediante l'impiego dell'enzima Mug Bean endonuclease, che degrada l'acido nucleico a singolo filamento, secondo una procedura descritta in letteratura e già messa a punto nel nostro laboratorio); sintesi di mRNA virali e, con anticorpi monoclonali, verrà determinata la produzione delle proteine virali nelle cellule. Le colture infettate (e per controllo quelle non infettate) verranno sottoposte anche ad ibridazione in situ nel tentativo di valutare la percentuale di cellule infettate. I supernatanti delle colture di fibroblasti e di cellule endoteliali infettate verranno inoculati nella linea cellulare UT7 EpoS1, selezionata per la sua suscettibilità all'infezione da parvovirus, al fine di determinare la produzione di virus infettante nelle colture primarie infettate.

PADOVA Analogamente ad intervalli di tempo di 1, 3, 7 e 14 giorni dalla semina le colture saranno analizzate dal punto di vista biochimico e molecolare per controllare il fenotipo delle cellule e la matrice da loro prodotta. L'espressione genica relativa ai collagene I, III, VI e alle citochine TGF beta, CTGF e IL4 verrà analizzata tramite RT-PCR e la loro produzione verrà rilevata con reazione immunostochimica. Le cellule endoteliali verranno immunocolorate con anticorpi anti CD31 ed analizzate per la loro morfologia e organizzazione eventuale in microcapillari, tramite indagini di microscopia ottica ed elettronica a trasmissione. Verranno valutate eventuali alterazioni o modificazioni dell'attività cellulare in seguito all'infezione da B19, che potrebbero essere correlate

con i meccanismi patogenetici alla base della SSc aumento dell'apoptosi nelle cellule endoteliali, aumento della proliferazione dei fibroblasti, aumento dell'espressione di IL-6, aumento del livello di espressione dei geni della matrice, aumento dell'espressione di connective tissue growth factor (CTGF) e di TGF-beta). I risultati preliminari ottenuti finora sembrano indicare che tali cellule si infettano in vitro, ma la percentuale di cellule infettate, nelle condizioni sperimentali usate, sembrerebbe molto bassa. Poiché è noto che il parvovirus ha bisogno per moltiplicarsi di cellule in fase di intensa proliferazione, che esprimano i fattori necessari a questo scopo, le colture di fibroblasti e di cellule endoteliali verranno preliminarmente stimulate con fattori di crescita.

Per quanto riguarda i particolari tecnici al fine di determinare il tasso di proliferazione cellulare all'interno del biomateriale verrà effettuato il saggio MTT (4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-dipheniltetrazolium bromide) secondo il metodo di Denizot e Lang (Denizot, 1986) a cui sono state apportate alcune minori modifiche. Il saggio MTT misura in modo quantitativo la presenza di attività succinico-deidrogenasica presente nelle cellule in coltura. L'attività di questo enzima, presente nei mitocondri delle cellule vitali, viene normalmente utilizzata quale marker per verificare l'attività metabolica, la vitalità e/o la crescita delle cellule in coltura. Il test si basa sulla conversione del composto chimico MTT, un colorante azolico di colore giallo, in sali di formazano, di colore blu, ad opera della succinico-deidrogenasi mitocondriale. La quantità di formazano viene poi determinata spettrofotometricamente ed è proporzionale alla presenza di tale enzima nella coltura, quindi, indirettamente, al numero delle cellule vitali. Ad intervalli di tempo regolari su matrici con cellule in coltura viene aggiunta una soluzione di MTT (0,5ml). Il tutto viene lasciato ad incubare per 3 ore a 37°C. La soluzione di MTT viene quindi rimossa dai pozzetti e sostituita con 0,5 ml di soluzione estraente, che viene lasciata agire per 15' a temperatura ambiente. Dopo accurata risospensione si provvede alla lettura spettrofotometrica a 534 nm e 630 nm.

Analisi morfologica -analisi morfologica delle colture su biomateriali per determinarne il fenotipo e la capacità di formare strutture capillari, verrà monitorata mediante osservazione al microscopio ottico, dopo colorazioni istologiche standard ed immunoistochimiche e analisi ultramicroscopiche (microscopia elettronica a trasmissione). L'analisi istologica dei campioni fissati in formalina al 4% e inclusi in paraffina, verrà fatta con fette dello spessore di circa 5 µm e colorate con ematossilina ed eosina. PADOVA -Per l'analisi immunoistochimica i campioni saranno invece inclusi in OCT e congelati a -80°C. I campioni verranno tagliati al criostato in fette di 7µm di spessore che verranno poste su vetrini portaoggetti gelatinati. Prima dell'utilizzo si procederà alla fissazione per 10 minuti in acetone a temperatura ambiente. Mediante la tecnica APAAP (Acid Phosphatase Anti Acid Phosphatase) si procederà a rilevare la presenza dei seguenti antigeni: CD 31 (per la presenza di cellule endoteliali); Coll I; Coll III, VI; IL 4; TGF-beta; CTGF La reazione verrà condotta in una cameretta umida a temperatura ambiente. Brevemente, dopo la saturazione degli antigeni aspecifici mediante siero di coniglio 1:20 in 0,05M Maleate TRIZMA (Sigma) pH 7,6 per 20', si procede all'aggiunta dell'anticorpo primario Dopo 2 ore di incubazione i campioni verranno lavati nel tampone e si procederà all'aggiunta dell'anticorpo secondario (Link Ab -DAKO-, rabbit anti-mouse) che verrà incubato per 30 minuti. Dopo successivo lavaggio le sezioni vengono incubate per 30' in presenza di mouse APAAP Ab -DAKO-1:50, si procede ad un ulteriore lavaggio, ed infine si incubano per 20' con Fast Red Substrate (Sigma). La controcolorazione viene condotta con (Sigma). Valutazione dell'espressione genica mediante RT-PCR. L'RNA totale verrà estratto dalle cellule coltivate mediante l'utilizzo del metodo che prevede l'uso della soluzione mono fasica di fenolo e guanidina isothiocianato (TRIZOL LIFE Technologies, GIBCO BRL). Brevemente, le cellule



vengono lisate mediante aggiunta di 1.0 ml of TRIzol reagent e l'RNA totale verrà successivamente isolato secondo le istruzioni della ditta fornitrice. Il cDNA viene sintetizzato partendo da 500 ng di RNA totale per campione, mediante incubazione di 50 min a 37°C, con Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Life Technologies, Gibco BRL) e con primer oligo(dT). L'amplificazione verrà condotta con PTC-100, Programmable Thermal Controller, MJ Research Inc., mediante l'utilizzo di Taq DNA Polimerase (Perkin Elmer) e le specifiche coppie di primer. L'amplificazione parallela del cDNA per l'enzima house keeping glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) verrà utilizzata come controllo interno. Per effettuare il confronto semiquantitativo tra i campioni, verranno effettuate 3 diluizioni seriali del cDNA (corrispondenti a 100-1.2 ng del totale) e sottoposte a differenti cicli di PCR (23-40) al fine di stabilire il range di amplificazione per ogni set di primer. Tutti i campioni di cDNA vengono amplificati con il numero ottimale di cicli per ogni gene di interesse, con una preventiva denaturazione a 94°C per 10 min, ed una fase terminale di elongazione a 72°C per 5 min. Le bande risultanti verranno individuate in un gel all' 1% di agarosio contenente etidio bromuro. Tali bande verranno confrontate con quelle relative al Hind III lambda DNA per confermare l'esatta lunghezza dell'amplificato. I risultati verranno espressi in rapporto al segnale ottenuto dall'amplificazione parallela per GAPDH nello stesso prodotto RT.

Verranno anche allestite colture di fibroblasti e di cellule endoteliali da pazienti con SSc B19 negativi al fine di valutare l'andamento dell'infezione da B19 in questo particolare contesto e confrontarlo con i risultati ottenuti con fibroblasti e cellule endoteliali normali.

Lo studio dell'immunità cellulare anti-parvovirus verrà condotto presso il Laboratorio Sperimentale di Trapianto di Midollo Osseo e Oncoematologia (IRCCS, Policlinico S. Matteo di Pavia) dalla Dr.ssa Comoli, afferente a questa Unità di Ricerca. Al fine di individuare un possibile ruolo della risposta immune cellulo-mediata, indotta dall'infezione da parvovirus B19, nella patogenesi della SSc, si procederà alla valutazione delle funzioni effettrici T cellulari di popolazioni CD8+ e CD4+ in soggetti con SSc. CTL specifici per parvovirus B19 verranno riattivati dal sangue periferico dei pazienti arruolati nel protocollo, secondo una metodica messa a punto presso il Laboratorio Sperimentale di Trapianto di Midollo Osseo e Oncoematologia Pediatrica. Verranno utilizzati, per questi studi, antigeni strutturali ricombinanti (capsidi vuoti, ottenuti con l'espressione della VP2 nel sistema baculovirus-cellule di insetto, in collaborazione con la DIESSE di Siena) e peptidi virali rappresentativi di epitopi diversi anche della VP1 e della NS1. Il metodo descritto è stato sviluppato a partire da pregresse esperienze riportate in letteratura (Smith CA et al J Virol 1996; 70:6733-40; R Hong et al Clin Immunol 2001; 98:54-61; Tolfvenstam T, et al. J Virol 2001; 75: 540-3). In breve, PBMC ottenute mediante separazione su gradiente di Ficoll-Hypaque, verranno piastrate ad una concentrazione di  $2 \times 10^6$  cellule per pozzetto da 2ml, in presenza di  $5 \times 10^4$  cellule autologhe pulsate con antigeni virali, in terreno di coltura RPMI addizionato del 10% di FCS, ed incubate in termostato a 37°C, in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub> per 7 giorni. In giornata +7 e +14, i CTL verranno contati e ristimolati con l'antigene virale in presenza di  $5 \times 10^5$  PBMC autologhe irradiate. Dalla giornata +14, i CTL verranno ristimolati settimanalmente in presenza di 20U/mL di r-IL2. I CTL verranno poi testati in un saggio di citotossicità standard a 5 ore contro BLCL autologhe pulsate o non pulsate con l'antigene virale, ed eventualmente, quando possibile, contro fibroblasti autologhi provenienti da biopsia cutanea o da tessuto sinoviale, marcati con Cr51. I risultati ottenuti verranno confrontati con dati osservati in soggetti sani di controllo. Inoltre, cellule memoria T specifiche per l'antigene potranno essere quantificate mediante enzyme linked immunospot

(ELISPOT) assay, attraverso la visualizzazione della secrezione di citochine, quale ad esempio IFN $\gamma$ , dopo appropriata stimolazione in vitro (Schirren CA, et al. Hepatology 2000; 32: 597). G.

Inoltre, poiché il cytomegalovirus (CMV) è incluso tra i possibili agenti virali implicati nello sviluppo della malattia, nei pazienti con SSc e nei controlli verrà valutata la presenza e il livello di anticorpi verso CMV e la presenza di sequenze di DNA virale (anche in senso quantitativo) nelle biopsie cutanee, utilizzando saggi di amplificazione in commercio e anche tramite ibridazione in situ.

La ricerca verrà sviluppata in 24 mesi durante i quali si procederà all'arruolamento dei pazienti con SSc e dei controlli. Verrà ricercata la presenza di anticorpi e del DNA virale del PV-B19 e del Cytomegalovirus nel siero e nei tessuti e, in questi ultimi campioni, anche dei messaggeri virali. Nei pazienti arruolati, e in opportuni controlli, verrà studiata più approfonditamente la risposta immunitaria di tipo umorale e cellulare, nei confronti sia delle proteine strutturali VP1 e VP2 che della NS1 del PV-B19. Per alcuni pazienti con SSc (e in opportuni controlli) verranno anche analizzate per l'infezione da B19 le colture di fibroblasti e le cellule endoteliali ottenute dalle biopsie cutanee. Si proseguirà fino al raggiungimento dello studio di un numero significativo di pazienti e di controlli. Verrà affrontato lo studio dell'infezione da B19 nei modelli di colture di fibroblasti prima e successivamente nelle colture tridimensionali di fibroblasti e cellule endoteliali in vitro, sia da soggetti sani che da pazienti con SSc B19 negativi.

#### **Risultati parziali attesi**

1. Valutare la prevalenza dell'infezione da parvovirus in un numero adeguato di pazienti e di controlli al fine di dimostrare con maggior significatività statistica l'ipotesi iniziale di un ruolo patogenetico del PV-B19 e/o del CMV nella SSc.
2. Ricercare la localizzazione del PV-B19 a livello delle componenti cellulari cutanee mediante ISH.
3. Verificare le probabili correlazioni fra la presenza di infezione da PV-B19 o CMV e manifestazioni cliniche e parametri prognostici della malattia.
4. Valutare la capacità del PV-B19 di infettare i fibroblasti e cellule endoteliali dei soggetti di controllo.
5. Valutare la persistenza dell'infezione da PV-B19 in colture di fibroblasti ed endoteli provenienti da soggetti di controllo.
6. Studio dell'infezione in vitro su modelli monostrato e tridimensionali al fine di valutare le variazioni fenotipiche di fibroblasti ed endoteli infettati in cultura.

Come risultato avanzato lo studio dei modelli di infezione in vitro consentirà di chiarire se l'infezione virale da B19 nei fibroblasti e nelle cellule endoteliali possa rappresentare un meccanismo patogenetico nello sviluppo della malattia mediante le variazioni fenotipiche di fibroblasti ed endoteli infettati in cultura. A questo riguardo il modello di colture tridimensionali dovrebbe consentire di valutare il comportamento delle cellule in risposta all'infezione in condizioni più vicine a quelle dell'infezione naturale. Infine, la conoscenza del ruolo del parvovirus (e/o del CMV) e dei meccanismi patogenetici innescati dall'infezione potrebbe avere anche importanti risvolti terapeutici e profilattici.