

ANALISI MOLECOLARE DELLE BASI PATOGENETICHE DELLA CRIOGLOBULINEMIA MISTA ASSOCIATA ALL'INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE C

Resoconto attività di ricerca (II anno)

Responsabile scientifico: *Prof.ssa Anna Linda Zignego*

Come riportato nel resoconto delle attività di ricerca svolte durante il primo anno, sono state isolate e caratterizzate alcune linee di linfociti B isolate da pazienti con Crioglobulinemia Mista HCV-correlata. Per la successiva fase sperimentale, sono state selezionate 3 linee che mostravano i più alti livelli di secrezione di IgM ad attività di fattore reumatoide (POT, VAL e MAS). Durante il secondo anno del progetto ci siamo concentrati sulla definizione di un efficace protocollo di infezione delle linee B linfocitarie precedentemente caratterizzate. L'approccio iniziale ha visto l'utilizzo di concentrazioni crescenti di particelle virali prodotte in vitro (JFH-1) fino ad una concentrazione di 10 JFH-1/cell. Abbiamo potuto dimostrare l'effettiva infezione delle linee linfocitarie tramite real-time RT-PCR specifica per HCV RNA (sia a polarità positiva -genoma- che negativa - intermedio di replicazione-), anche se ottenuta alle più alte concentrazioni di virus e con una efficienza ridotta; è stato infatti stimato che in queste condizioni, che possiamo definire basali, solo 1 cell/10⁵ era infettata. Al fine di migliorare l'efficienza, abbiamo effettuato l'infezione utilizzando un medium di coltura arricchito con un cocktail di sostanze mitogeniche, già usato per favorire la determinazione dell'infezione delle cellule linfatiche nei pazienti cronicamente infetti (Zignego et al. J Hepatol. 1992). In tal modo, alla stessa MOI (multiplicity of infection), abbiamo potuto incrementare la percentuale di cellule positive di oltre un logaritmo.

Oltre al JFH-1, sono stati utilizzati, per l'infezione delle linee linfatiche, anche sieri altamente viremici prelevati da pazienti HCV-positivi. I risultati di tali esperimenti hanno mostrato che il virus selvaggio ha un'efficienza anche superiore a quello "sintetico" in quanto si riuscivano ad ottenere tassi di infezione paragonabili anche a concentrazioni di virus inferiori a quelle usate per il JFH-1 (MOI da 2 a 5). Abbiamo comunque preferito l'utilizzo del JFH-1 in quanto nel siero possono essere presenti numerosi fattori che rischiano di influenzare le analisi successive; nel modello del replicone, invece, le particelle virali sono secrete nel medium di coltura e quindi consentono la caratterizzazione degli effetti dell'infezione al netto di elementi confondenti.

E' stato interessante notare che, delle 3 linee utilizzate, la linea denominata POT mostrava una più spiccata propensione ad essere infettata rispetto alle altre linee (3.7×10^{-3} vs 1.5×10^{-4}). Tale risultato ci ha spinti ad investigare i possibili meccanismi di tale fenomeno, quantificando la presenza dei putativi recettori dell'HCV sulla superficie di tali cellule. L'analisi citofluorimetrica di CD81, Scavenger Receptor B1 (SRB-1), Occludina (OCLN), le molecole attualmente più accreditate da dati sperimentali come "porte di ingresso"

del virus, ha mostrato una forte ed ubiquitaria espressione di CD81 ed una debole concentrazione di SRB-1 in modo analogo per tutte le linee; la linea POT, invece, presentava livelli di espressione più alti di OCLN rispetto a VAL e MAS. Questo dato, oltre che dare una possibile giustificazione sperimentale ai risultati dell'infezione in vitro, confermava dati recenti della letteratura che sottolineano il ruolo essenziale di OCLN e CD81 per l'ingresso del virus (Ploss et al. Nature 2011).

Un ulteriore approccio che abbiamo scelto per favorire l'infezione virale, oltre che per definire i possibili meccanismi alla base della persistenza dell'HCV nelle cellule linfatiche (vedi punto 4 del progetto), è stato il bloccare la via di trasmissione del segnale di RIG-1/MAVS. Tale pathway, in concerto con i Toll-Like Receptors, è uno dei sensori della presenza di patogeni (specialmente di RNA a doppia elica) ed uno dei principali meccanismi dell'immunità innata per rispondere prontamente all'invasione della cellula da parte di virus ed altri microorganismi. Il risultato finale dell'attivazione di tale cascata è rappresentato dalla produzione di interferone di tipo I (IFN- β). Abbiamo quindi utilizzato dei small interfering RNA (siRNA) diretti contro MAVS (Mitochondrial Anti Viral System) e inibenti l'espressione di IRF-3 (Interferon Regulatory Gene-3), elementi chiave della risposta antivirale intracellulare. Stiamo attualmente verificando il livello di inibizione dell'espressione di MAVS e IRF-3 tramite western blot; i primi risultati hanno mostrato una abolizione completa del segnale nei western effettuati nella linea POT, risultato che dovrebbe essere confermato anche nelle altre linee. A breve riprenderemo gli esperimenti di infezione per valutare, in forma transitoria con siRNA, gli effetti di tale inibizione e se, come speriamo, si manifestasse un significativo incremento dell'infezione, passeremmo al knock-out stabile di tali molecole grazie a short-hairpin RNA.

Parallelamente, abbiamo ricevuto dal Dr. Alexander Ploss della Rockefeller University di New York un plasmide codificante per OCLN grazie al quale abbiamo avviato la creazione di cloni stabili ad elevata espressione del recettore virale delle 3 linee cellulari. La presenza all'estremità carbossi-terminale della YFP (yellow fluorescent protein) consentirà una facile selezione dei cloni con alte concentrazioni di OCLN che saranno utilizzati per l'infezione artificiale e confrontati con le linee originarie.

Sintesi dei principali risultati ottenuti

- Dimostrazione della possibilità di infettare artificialmente linee cellulari B-linfocitarie originate dall'immortalizzazione di linfociti prelevati da pazienti con disordini linfoproliferativi HCV-correlati.
- Messa a punto di un protocollo per l'ottimizzazione dell'infezione fino a raggiungere livelli sufficienti alle analisi ulteriori.
- Creazione, tramite tecnologie di biologia molecolare e cellulare, di cloni cellulari più facilmente supportanti l'infezione/replicazione del virus modificando il livello di espressione dei recettori HCV sulla superficie cellulare.

- Definizione dell'importanza di alcuni sistemi antivirali intracellulari (in particolar modo il sistema RIG-1/MAVS) nella difesa delle cellule linfatiche dall'infezione virale, per capire i meccanismi usati dal virus per persistere nelle cellule linfatiche dell'ospite anche in assenza di viremia o infezione epatica (infezione HCV occulta).

Pubblicazioni 2010-2011

De Re V; Caggiari L, Monti G*, Libra M, Spina M, Dolcetti R, De Zorzi M, Racanelli V, Crovatto M, Toffoli G.* ALCRI Group Of Work. HLA DR-DQ Combination Associated With The Increase Risk Of Developing Human HCV Positive Non-Hodgkin's Lymphoma Is Related To The Type II Mixed Cryoglobulinemia Tissue Antigens. 2010 Feb;75(2):127-35. (IF: 2.330)

Antonelli A, Ferri C, Ferrari SM, Colaci M, Sebastiani M, Zignego AL, Ghiri E, Goglia F, Fallahi P. High levels of circulating N-terminal pro-brain natriuretic peptide in patients with hepatitis C. J Viral Hepat. 2010 Dec;17(12):851-3 (IF: 3.348)

Morisco F, Stroffolini T, Emanuela M, Amoroso DC, Almasio P, Villa E, Zuin M, Paris B, Stanzione M, Caporaso N, and NADIR Study Group: Aceti A,...Zignego AL et al. Retrospective, Observational, Multicenter Study on an Italian population affected by chronic hepatitis C who failed to clear HCV-RNA after the combined therapy of (PEG-IFN and Ribavirin): NADIR study J Viral Hepat. 2010 Jun;17(6):427-34 (IF: 3.348)

Petrarca A, Rigacci L, Caini P, Colagrande S, Romagnoli P, Vizzutti F, Arena U, Giannini C, Monica M, Montalto P, Matucci-Cerinic M, Bosi A, Laffi G, Zignego AL. Safety and Efficacy of Rituximab in Patients with Hepatitis C Virus Related Mixed Cryoglobulinemia and Severe Liver Disease. Blood. 2010 Jul 22;116(3):335-42. (IF: 10.555).

Boddi M, Abbate R, Chellini B, Giusti B, Giannini C, Pratesi G, Rossi L, Pratesi C, Gensini GF, Paperetti L, Zignego AL. Hepatitis C virus RNA localization in human carotid plaque. J Clin Virol. 2010 Jan;47(1):72-5 (IF: 3.124)

Quartuccio L, Petrarca A, Mansutti E, Pieroni S, Calcabrini L, Avellini C, Zignego A, De Vita S. Efficacy of rituximab in severe and mild abdominal vasculitis in the course of mixed cryoglobulinemia. Clin Exp Rheumatol. 2010;28(1):84-7 (IF: 2.396)

Pietrogrande M, Devita S, Zignego A, Pioltelli P, Sansonno D, Sollima S, Atzeni F, et al.. Recommendations for the management of mixed cryoglobulinemia syndrome in hepatitis C virus-infected patients Autoimmun Rev. 2011 Feb 14. [Accepted November 2010] (IF: 6.368)

Antonelli A, Ferri C, Ferrari SM, Di Domenicantonio A, Ferrari P, Pupilli C, Nicolini A, Zignego AL, Marchi S, Fallahi P. The presence of autoimmune thyroiditis in mixed cryoglobulinemia patients is associated with high levels of circulating Interleukin-6, but not of tumor necrosis factor-alpha. Clin Exp Rheumatol. 2011 Feb 1 [Accepted November 2010] (IF: 2.396)

Stasi C., Zignego A. L., Laffi G., Rosselli M The liver-cytokine-brain circuit in interferon-based treatment of patients with chronic viral hepatitis. J Viral Hepat. 2010 Dec;17(12):851-3 (IF: 3.348)

L. Gagnani, A. Piluso, C. Giannini, P. Caini, E. Fognani, M. Monti, A. Petrarca, J. Ranieri, G. Razzolini, V. Froio, G. Laffi, and A.L. Zignego. Genetic Determinants in Hepatitis C Virus-Associated Mixed Cryoglobulinemia: Role of Polymorphic Variants of BAFF Promoter and Fcγ Receptors. Arthritis and Rheumatism 2011; 63(5):1446-51 (IF: 7.33).

Bacon BR, Gordon SC, Lawitz E, Marcellin P, Vierling JM, Zeuzem S, Poordad F, Goodman ZD, Sings HL, Boparai N, Burroughs M, Brass CA, Albrecht JK, Esteban R; HCV RESPOND-2 Investigators Delwaide J, Horsmans Y, Van Vlierberghe H, Anderson F, Feinman SV, Heathcote J, Marotta P, Ramji A, Wong F, Peltakian K, Kaita K, Alric L, Ben Ali S, Bigard MA, Bourliere M, Boyer-Darrigrand N, Bronowicki JP, De Ledinghen V, Hezode C, Lebray P, Marcellin P, Maynard-Muet M, Pol S, Poynard T, Tran A, Trepo C, Truchi R, Vallet-Pichard A, Berg T, Guenther R, Lohse AW, Manns MP, Niederau C, Schmidt WE, Spengler U, Wedemeyer H, Zeuzem S, Carosi G, Colombo M, Craxi A, Rizzetto M, Zignego AL, et al Boceprevir for previously treated chronic HCV genotype 1 infection. N Engl J Med. 2011 Mar 31;364(13):1207-17. [Accepted December 2010] (IF: 47.050)

Poordad F, mccone J Jr, Bacon BR, Bruno S, Manns MP, Sulkowski MS, Jacobson IM, Reddy KR, Goodman ZD, Boparai N, dinubile MJ, Sniukiene V, Brass CA, Albrecht JK, Bronowicki JP; SPRINT-2 Investigators. Colombato L, Curciarello J, Silva M, Tanno H, Terg R, Adler M, Langlet P, Lasser L, Nevens F, Anderson F, Bailey R, Bilodeau M, Cooper C, Feinman SV, Heathcote J, Levstik M, Ramji A, Sherman M, Shafran S, Yoshida E, Achim A, Ben Ali S, Bigard MA, Bonny C, Bourliere M, Boyer-Darrigrand N, Bronowicki JP, Canva V, Couzigou P, De Ledinghen V, Guyader D, Hezode C, Larrey D, Latournerie M, Marcellin P, Mathurin P, Maynard-Muet M, Moussalli J, Poupon R, Poynard T, Serfaty L, Tran A, Trepo C, Truchi R, Zarski JP, Berg T, Dikopoulos N, Eisenbach C, Galle PR, Gerken G, Goeser T, Gregor M, Klass D, Kraus MR, Niederau C,

Schlaak JF, Schmid R, Thies P, Schmidt K, Thimme R, Weidenbach H, Zeuzem S, Angelico M, Bruno S, Carosi G, Craxì A, Mangia A, Pirisi M, Rizzetto M, Taliani G, Zignego AL et al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*. 2011 Mar 31;364(13):1195-206. (IF: 47.050)

S. De Vita, F. Soldano, M. Isola, G. Monti, A. Gabrielli, A. Tzioufas, C. Ferri, G.F. Ferraccioli, L. Quartuccio, L. Corazza, G. De Marchi, M. Ramos Casals, M. Voulgarelis, M Lenzi, F. Saccardo, P. Fraticelli, M.T. Mascia, D. Sansonno, P. Cacoub, M. Tomsic, A. Tavoni, M. Pietrogrande, A.L. Zignego, et al. Preliminary classification criteria for the cryoglobulinemic syndrome. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2011; 70(7):1183-90. (IF: 8.111)

Stasi C, Zignego AL, Laffi G, Rosselli M. The liver-cytokine-brain circuit in interferon-based treatment of patients with chronic viral hepatitis. *J Viral Hepat*. 2011 Aug;18(8):525-32 (IF: 3.348)

Ferri C, Cacoub P, Mazzaro C, Roccatello D, Scaini P, Sebastiani M, Tavoni A, Zignego AL, De Vita S. Treatment with rituximab in patients with mixed cryoglobulinemia syndrome: results of multicenter cohort study and review of the literature. *Autoimmun Rev*. 2011 Nov;11(1):48-55 (IF: 6.368)

De Vita S, Quartuccio L, Isola M, Mazzaro C, Scaini P, Lenzi M, Campanini M, Naclerio C, A T, Pietrogrande M, Ferri C, Mascia M, Masolini P, Zabotti A, Maset M, Roccatello D, Zignego A, Pioltelli P, Gabrielli A, Filippini D, Perrella O, Migliaresi S, Galli M, Bombardieri S, Monti G.A randomized, controlled, trial of rituximab for treatment of severe cryoglobulinemic vasculitis. *Arthritis Rheum*. 2011 Dec [Epub ahead of print] (IF: 7.33).