

Progetto di Ricerca

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

Responsabile: Prof.ssa Anna Linda ZIGNEGO

ABSTRACT

L'infezione da virus dell'epatite C è da considerarsi un problema di salute pubblica di primaria importanza dato che a livello globale, secondo recenti stime, i portatori di HCV sarebbero oltre 170 milioni, di cui almeno due milioni in Italia. L'infezione cronica da HCV, evento estremamente frequente nei soggetti che entrano in contatto col virus, può causare gravi patologie epatiche culminanti nella cirrosi e nel carcinoma epatocellulare. Il nostro gruppo ha precedentemente mostrato come l'HCV infetti non solo gli epatociti, ma anche cellule del sistema immunitario e preferenzialmente i linfociti B. Questo duplice tropismo si riflette anche nei risvolti patogenetici e clinici dell'infezione che infatti è caratterizzata dalla presenza di numerosi disordini autoimmuni/linfoproliferativi (DLP), tra i quali spiccano la Crioglobulinemia Mista (CM) e il linfoma non-Hodgkin (LNH) a cellule B. Le basi patogenetiche di tale stretta associazione non sono ancora chiarite in dettaglio; recenti ipotesi suggeriscono che l'espansione clonale dei linfociti B che producono fattore reumatoide (evento alla base della patogenesi della CM) sia innescata da epitopi virali, anche se non esistono ad oggi informazioni precise su quali proteine HCV siano direttamente implicate in questo processo.

In questo contesto, il programma di ricerca che sottomettiamo all'attenzione della Fondazione Istituto di Ricerche Virologiche Oretta Bartolomei Corsi prende spunto da interessanti risultati ottenuti in un precedente studio, già in parte finanziato dalla stessa Fondazione, volto all'identificazione, isolamento e coltura di linfociti B (produttori e non di FR) provenienti da soggetti con CM-HCV correlata, per arrivare alla loro completa caratterizzazione genetica e immunofenotipica nell'ottica di identificare potenziali bersagli utilizzabili per innovativi approcci terapeutici. Tale studio verrà completato dall'analisi molecolare di importanti vie di trasmissione del segnale regolanti la risposta antivirale intracellulare che sembra, da dati ottenuti in modelli diversi, possano essere compromesse dalla presenza di replicazione virale all'interno della cellula linfocitaria. I materiali e le metodologie utilizzate per il raggiungimento degli obiettivi sono all'avanguardia per l'unicità, per novità e complessità e includono l'unico sistema di produzione di particelle virali infettive in vitro (replicone JFH-1), varie linee cellulari di linfociti B immortalizzati anche secernenti fattore reumatoide ed altri reagenti di biologia molecolare specificamente creati per questo studio.

Il progetto proposto, quindi, partendo dal lavoro di almeno 2 anni di studi, garantisce ottime possibilità di raggiungere gli scopi prefissati e di apportare un significativo contributo alla definizione dei meccanismi patogenetici dei disordini linfoproliferativi associati all'infezione cronica da HCV.

BASE SCIENTIFICA

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) è diffusa in tutto il mondo con una prevalenza particolarmente elevata in alcune aree geografiche tra le quali spiccano le regioni mediterranee^{1,2}, causando gravi patologie epatiche culminanti nella cirrosi e nel carcinoma epatocellulare. Secondo recenti analisi epidemiologiche, i portatori di HCV nel mondo sarebbero oltre 170 milioni, di cui almeno due in Italia; ciò rende l'infezione da HCV uno dei principali e più urgenti problemi di salute pubblica nel nostro paese e nel mondo³⁻⁵. Il nostro gruppo ha precedentemente mostrato come l'HCV infetti non solo gli epatociti, ma anche cellule del sistema immunitario e preferenzialmente i linfociti B⁶⁻⁸. Questo duplice tropismo si riflette anche nei risvolti patogenetici e clinici dell'infezione; infatti, la presenza di markers HCV è strettamente correlata con numerosi disordini autoimmuni/linfoproliferativi (DLP), tra i quali spiccano per la Crioglobulinemia Mista (CM), il linfoma non-Hodgkin (LNH) a cellule B e le gammopatie monoclonali^{7,9-18}.

Si tratta di forme di natura autoimmune e/o linfoproliferativa che coinvolgono preferibilmente il compartimento B linfocitario, di cui la CM è considerata il prototipo. Questa è di fatto la manifestazione extraepatica da HCV per la quale è disponibile il maggior numero di dati e per la quale il legame patogenetico con l'infezione è oggi praticamente indiscusso dato che la presenza di markers HCV è riscontrabile in oltre il 90% dei soggetti con CM^{7,19-22}. La CM è caratterizzata dalla presenza di immunocomplessi circolanti secondari ad un disordine linfoproliferativo che vede l'espansione oligo o monoclonale di linfociti B che producono IgM ad attività di fattore reumatoide (IgM-FR); tali immunoglobuline, infatti, hanno affinità per la regione costante delle IgG originando complessi di grosso peso molecolare che tendono a precipitare a bassa temperatura. Tali immunocomplessi, definiti crioglobuline (CG), sono alla base delle manifestazioni cliniche della CM che sono l'espressione di una vasculite sistemica coinvolgente vari organi ed apparati. Questa ha notevoli ripercussioni sulla qualità di vita dei pazienti potendo manifestarsi con quadri di gravità variabile, da un complesso di astenia, porpora declive e artalgie a forme gravemente invalidanti caratterizzate da compromissione renale e pluriorganica, ulcere cutanee e neuropatie periferiche e centrali, nonché dall'evoluzione verso forme francamente neoplastiche. Relativamente a tale ultimo punto, di fatto, la CM è considerata un disordine linfoproliferativo di natura generalmente benigna, ma, comunque, a carattere pre-linfomatoso con possibile evoluzione verso un franco LNH a cellule B in una percentuale non trascurabile di casi (8-10%)⁸. Il carattere linfoproliferativo della CM è confermato da caratteristiche quali un'espansione clonale di linfociti B IgMk+ nel sangue periferico e la presenza nel fegato e nel midollo osseo di infiltrati linfoidi con aspetti del tutto assimilabili a quelli di taluni LNH²³. L'ipotesi del potenziale linfomagenetico dell'HCV è stata avvalorata da numerose osservazioni, includenti la recente dimostrazione di una stretta associazione tra infezione HCV e il linfoma splenico a linfociti villosi (SLVL) associato alla CM²⁴.

Numerosi studi hanno cercato di caratterizzare da un punto di vista sia genetico che molecolare le cellule che producono le IgM-FR, ma con risultati soltanto parziali^{25,26}. Sembra attualmente definito che tali

molecole siano contraddistinte dalla presenza di geni per la regione variabile delle catene pesanti del tipo VH1-69, mentre per quanto riguarda la specificità della parte legante l'antigene, i dati sono frammentari e l'ipotesi che tali anticorpi mostrino affinità per epitopi virali sembra la più coerente. Questa ipotesi sembra supportata dal fatto che l'eliminazione del virus grazie ad efficace terapia antivirale è generalmente accompagnata dalla scomparsa delle CG e della sintomatologia ad esse relata. Purtroppo l'assenza, fino a pochi anni or sono, di un efficace sistema di replicazione e produzione del virus in-vitro, ha notevolmente rallentato i progressi della ricerca in tale campo. Recentemente è stato messo a punto un sistema di replicazione dell'HCV in colture di cellule di tipo epatocitario; tale modello è basato sull'uso di RNA sintetici, definiti repliconi, in cui il genoma dell'HCV è posto sotto il controllo di promotori esterni, mentre l'espressione di un gene di selezione (neomicina fosfotransferasi) è guidata dalle sequenze regolatorie virali²⁷. Tale sistema consente la produzione delle proteine virali, la replicazione dell'HCV-RNA e nelle versioni più evolute (JFH-1), anche la produzione e secrezione di virioni infettivi.

Al fine di riuscire ad identificare delle misure terapeutiche efficaci nei confronti della CM-HCV correlata, una tappa fondamentale sarà rappresentata dalla caratterizzazione molecolare dei cloni B cellulari produttori delle IgM-FR (B-FR) e parallelamente dalla definizione delle regioni del virus responsabili (in circa la metà dei pazienti con infezione HCV) della stimolazione ed espansione di tali tipi cellulari. Infatti, sono stati compiuti enormi progressi nel campo delle terapie biologiche, cioè basate su anticorpi monoclonali diretti contro specifiche popolazioni cellulari responsabili di varie patologie sia degenerative che neoplastiche; si può quindi ipotizzare, una volta definiti i corretti bersagli molecolari, di applicare un simile approccio anche per il controllo dei cloni B-FR e quindi della sindrome crioglobulinemica.

PRINCIPALI OBIETTIVI E RISULTATI PRELIMINARI

Il progetto di ricerca che sottomettiamo all'attenzione della Fondazione Istituto di Ricerche Virologiche Oretta Bartolomei Corsi è la logica continuazione di un precedente studio, già in parte finanziato dalla stessa Fondazione, volto all'identificazione, isolamento e coltura delle cellule B-FR provenienti da soggetti con CM-HCV correlata, per arrivare alla loro completa caratterizzazione genetica e immunofenotipica nell'ottica di identificare potenziali bersagli utilizzabili per innovativi approcci terapeutici. Durante la precedente fase dello studio siamo giunti alla produzione di linee immortalizzate di linfociti B-FR e alla loro caratterizzazione molecolare; questo lavoro ha permesso, per la prima volta, di ottenere importanti informazioni sui meccanismi che portano all'espansione di tali cloni e ad identificare particolari combinazioni dei geni delle immunoglobuline caratteristiche di questi cloni ad attività patogena. Lo studio che proponiamo per i prossimi 12 mesi, partendo dai risultati ottenuti, va ad investigare il complesso rapporto tra il virus dell'epatite C ed i linfociti B-FR; si prevede infatti di identificare, utilizzando differenti proteine HCV ricombinanti, i possibili epitopi virali responsabili dell'espansione delle popolazioni B-FR. Tale approccio sarà affiancato dall'utilizzo di particelle virali prodotte in vitro grazie alla tecnologia di recente

acquisizione del replicone JFH-1, l'unico sistema che consenta la produzione di virioni HCV infettivi partendo da colture di cellule epatocitarie trasfettate con particolari RNA autoreplicanti. L'utilizzo del virione completo dovrebbe evitare che epitopi conformazionali o particolari *folding* delle proteine ricombinanti non vengano riconosciuti dalle IgM di superficie dei cloni B-FR.

La disponibilità sia di linee cellulari uniche che di particelle virali purificate ci ha fornito i presupposti per l'analisi di alcune vie intracellulari volte alla difesa antivirale che, in altri modelli sperimentali, sembrerebbero modificati dalla presenza del virus²⁸. In questo contesto, notevole interesse è suscitato dalla proteina MAVS (Mitochondrial Anti-Viral Signalling Protein) che riveste un ruolo chiave nell'attivazione della sintesi di citochine e mediatori solubili (ad es. IFN beta) caratteristici della risposta intracellulare all'infezione virale. L'alterazione di tale meccanismo di trasmissione del segnale consentirebbe non soltanto la persistenza del virus all'interno della cellula, ma anche la sua attiva replicazione avendo compromesso, in tal modo, anche i meccanismi di blocco della sintesi proteica e delle altre funzioni metaboliche cellulari essenziali alla moltiplicazione del virus.

L'assenza di un vaccino protettivo, la spiccata tendenza ad instaurare un'infezione cronica e indurre patologie severe nell'uomo, obbligano i ricercatori che studiano l'HCV ad utilizzare misure protettive e di contenimento di livello 3. Il presente progetto, che prevede lo svolgimento di varie fasi della ricerca a diretto contatto con virioni infettivi (vedi il dettaglio nel programma di ricerca), potrà essere effettuato grazie alla disponibilità di laboratori specificamente attrezzati a garantire un livello di sicurezza contro il rischio biologico di tipo 3, presenti presso il Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Firenze.

BIBLIOGRAFIA

1. Brechot C. Hepatitis B and C viruses and primary liver cancer. *Baillieres Clin Gastroenterol.* 1996;10:335-373.
2. Lauer GM, Walker BD. Hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2001;345:41-52.
3. Wasley A, Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C: geographic differences and temporal trends. *Semin Liver Dis.* 2000;20:1-16.
4. Bellentani S, Miglioli L, Masutti F, Saccoccio G, Tiribelli C. Epidemiology of hepatitis C virus infection in Italy: the slowly unraveling mystery. *Microbes Infect.* 2000;2:1757-1763.
5. Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;13:2436-2441.
6. Zignego AL, Macchia D, Monti M, et al. Infection of peripheral mononuclear blood cells by hepatitis C virus [see comments]. *J Hepatol.* 1992;15:382-386.
7. Zignego AL, Ferri C, Monti M, et al. Hepatitis C virus as a lymphotropic agent: evidence and pathogenetic implications. *Clin Exp Rheumatol.* 1995;13 S33-37.
8. Zignego AL, Brechot C. Extrahepatic manifestations of HCV infection: facts and controversies. *J Hepatol.* 1999;31:369-376.
9. Ferri C, La Civita L, Monti M, et al. Can type C hepatitis infection be complicated by malignant lymphoma? [letter; comment]. *Lancet.* 1995;346:1426-1427.

10. Ferri C, La Civita L, Zignego AL. Extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection [letter; comment]. *Ann Intern Med.* 1996;125:344; discussion 346.
11. Andreone P, Zignego AL, Cursaro C, et al. Prevalence of monoclonal gammopathies in patients with hepatitis C virus infection. *Ann Intern Med.* 1998;129:294-298.
12. Zignego AL, Ferri C, Giannini C, et al. Hepatitis C virus infection in mixed cryoglobulinemia and B-cell non-Hodgkin's lymphoma: evidence for a pathogenetic role. *Arch Virol.* 1997;142:545-555.
13. Zignego AL, Ferri C, Innocenti F, et al. Lack of preferential localization of tumoral mass in B-cell non-Hodgkin's lymphoma associated with hepatitis C virus infection [letter]. *Blood.* 1997;89:3066-3068.
14. Ferri C, La Civita L, Caracciolo F, Zignego AL. Non-Hodgkin's lymphoma: possible role of hepatitis C virus [letter]. *Jama.* 1994;272:355-356.
15. Ferri C, Pileri S, Zignego AL. Hepatitis C virus infection and non-Hodgkin's lymphoma. In: Geodert J, (NIH) NCI, eds. *Infectious causes of cancer Targets for intervention.* Totowa, New Jersey: The Human Press inc.; 2000:349-368.
16. Ferri C, Caracciolo F, La Civita L, et al. Hepatitis C virus infection and B-cell lymphomas [letter]. *Eur J Cancer.* 1994;10:1591-1592.
17. Ferri C, La Civita L, Longombardo G, Cecchetti R, Giannini C, Zignego AL. Type C chronic hepatitis complicated by B-cell lymphoma [letter]. *Am J Gastroenterol.* 1995;90:2071-2072.
18. Ferri C, La Civita L, Monti M, et al. Chronic hepatitis C and B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Qjm.* 1996;89:117-122.
19. Ferri C, La Civita L, Longombardo G, et al. Hepatitis C virus in mixed cryoglobulinemia and B cell lymphoma [letter]. *Clin Exp Rheumatol.* 1994;12:89-90.
20. Ferri C, Monti M, La Civita L, et al. Hepatitis C virus infection in non-Hodgkin's B-cell lymphoma complicating mixed cryoglobulinaemia. *Eur J Clin Invest.* 1994;24:781-784.
21. Ferri C, La Civita L, Caracciolo F, Bellesi G, Zignego AL. Hepatitis C virus and lymphoproliferative disorders [letter]. *Blood.* 1996;88:4730-4731.
22. Zignego AL, Ferri C, Giannelli F, et al. Prevalence of bcl-2 rearrangement in patients with hepatitis C virus-related mixed cryoglobulinemia with or without B-cell lymphomas. *Ann Intern Med.* 2002;137:571-580.
23. Ferri C, Zignego AL, Pileri S. Cryoglobulins. 'Clinical Hematology'. Vol. Chapter 24: Elsevier (Mosby); 2005:625-636.
24. Hermine O, Lefrere F, Bronowicki JP, et al. Regression of splenic lymphoma with villous lymphocytes after treatment of hepatitis C virus infection. *N Engl J Med.* 2002;347:89-94.
25. De Re V, De Vita S, Marzotto A, et al. Sequence analysis of the immunoglobulin antigen receptor of hepatitis C virus-associated non-Hodgkin lymphomas suggests that the malignant cells are derived from the rheumatoid factor-producing cells that occur mainly in type II cryoglobulinemia. *Blood.* 2000;96:3578-3584.
26. Agnello V, Zhang QX, Abel G, Knight GB. The association of hepatitis C virus infection with monoclonal rheumatoid factors bearing the WA cross-idiotype: implications for the etiopathogenesis and therapy of mixed cryoglobulinemia. *Clin Exp Rheumatol.* 1995;13 Suppl 13:S101-104.
27. Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med.* 2005;11:791-796.
28. Meylan E, Curran J, Hofmann K, et al. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. *Nature.* 2005;437:1167-1172.
29. Giannini C, Giannelli F, Linda Zignego A. Association between mixed cryoglobulinemia, translocation (14;18), and persistence of occult HCV lymphoid infection after treatment. *Hepatology.* 2006;43:1166-1167.
30. Giannini C, Petrarca A, Monti M, et al. Association between persistent lymphatic infection by hepatitis C virus after antiviral treatment and mixed cryoglobulinemia. *Blood.* 2008;111:2943-2945.

MODALITÀ DI ATTUAZIONE DEL PROGETTO

Il progetto, ormai entrato nel vivo, sarà articolato in 5 punti che vedranno da un lato l'analisi fine dei meccanismi di attivazione delle cellule B da parte dell'HCV, con particolare riferimento alle cellule produttrici di FR, dall'altro, utilizzando questo prezioso modello sperimentale, l'analisi di nuove vie di trasmissione del segnale antivirale della cellula potenzialmente modificate dall'infezione virale. Questo sarà possibile grazie alla possibilità di infettare in-vitro le cellule con particelle virali purificate prodotte da particolari linee cellulari. Questi ed altri esperimenti previsti dal programma richiedono un alto livello di protezione contro il rischio biologico e specialmente per gli esperimenti descritti ai punti 2, 3, 4 e 5, si renderà necessaria l'utilizzazione del laboratorio BSL-3.

1) Analisi degli effetti di proteine virali sull'attivazione delle cellule B-FR

La prima parte dello studio sarà volta all'identificazione di antigeni virali potenzialmente coinvolti nell'espansione clonale dei linfociti B-FR; le cellule verranno coltivate in presenza di proteine ricombinanti dell'HCV (anche nella forma complessata con lipoproteine): E1, E2, il dimero E1-E2, la proteina del core. L'attivazione a seguito dello stimolo antigenico verrà quantificata tramite la valutazione della produzione di anticorpi (test ELISA) e la proliferazione cellulare determinata con test colorimetrici (Alamar Blue), incorporazione di timidina triziata, valutazione in western blot dell'espressione di marker di replicazione (PCNA, pERK, ecc). Le stesse procedure saranno effettuare su linee B cellulari stabili.

2) Caratterizzazione dell'interazione tra le cellule B-FR e le particelle HCV purificate dal sopranatante

Al fine di caratterizzare l'effetto della particella virale completa sull'attivazione delle cellule produttrici di crioglobuline, i cloni B-FR verranno coltivati in presenza di concentrazioni variabili di virioni HCV provenienti dalle colture di HuH7.5 con JFH-1. Anche in questo caso, la possibile attivazione delle cellule B-FR dovuta all'interazione con la particella virale sarà determinata, con test ELISA, per quanto riguarda la produzione di IgM-FR nel terreno di coltura e con test colorimetrici e biochimici per valutare eventuali variazioni del tasso di proliferazione. Sarà inoltre interessante valutare se il contatto con la particella virale possa attivare i meccanismi intracellulari di sopravvivenza (over-espressione di geni antiapoptotici come bcl2, bcl-xL ecc), fenomeno che sembrerebbe accordarsi con dati ottenuti precedentemente dal nostro gruppo di ricerca e che vedevano la necessità della presenza del virus per la persistenza di cellule produttrici di CG in soggetti con CM.

3) Infezione artificiale delle linee cellulari B-FR con virioni HCV prodotti in-vitro

La valutazione del possibile ruolo di proteine HCV nel modificare la via di difesa antivirale mediata dalle proteine MAVS e RIG-1 sarà effettuata in linee linfocitarie B immortalizzate infettate artificialmente e non

con HCV prodotto dalle cellule trasfettate con il replicone JFH-1. Si è deciso questo tipo di approccio di infezione in vitro rispetto all'utilizzo di sieri di pazienti altamente viremici 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.

La fase di infezione seguirà un protocollo definito da studi precedenti effettuati nel nostro laboratorio e che prevede l'utilizzo di alcuni stimolanti la replicazione cellulare al fine di favorire anche la moltiplicazione virale.

4) Analisi dei livelli proteici di MAVS in linee linfocitarie immortalizzate infettate artificialmente da HCV

Una volta definito il livello di infezione nelle linee linfocitarie precedentemente descritte, si passerà all'analisi molecolare vera e propria; verranno inizialmente valutati i livelli di espressione della proteina MAVS tramite western blot con anticorpi specifici. Verrà quindi valutata la corretta compartimentalizzazione della proteina che si trova nella membrana mitocondriale, ma che, a seguito dell'azione di una particolare proteina HCV (NS3/4A), sembra essere delocalizzata dalla sua sede fisiologica tramite un clivaggio da parte della proteina virale, evento che ne causerebbe la perdita della funzionalità interrompendo la via di trasmissione del segnale che culmina con la produzione di citochine antivirali (IFN-beta) come descritto in linee cellulari di natura epatocitaria²⁸. Questa analisi sarà effettuata sottoponendo il lisato cellulare ad una separazione su gradiente al fine di ottenere la frazione citoplasmatica e quella mitocondriale. Tale modello sperimentale acquista un'importanza ancora superiore considerando i risultati ottenuti negli ultimi anni riguardo all'esistenza di una forma occulta di infezione da HCV^{29,30}; infatti, abbiamo dimostrato che l'HCV può permanere anche per anni nelle cellule linfatiche (prevalentemente nei linfociti B) di soggetti che, a seguito di terapia antivirale, avevano eliminato il virus dal sangue e dal fegato. E' quindi ipotizzabile che in tali soggetti l'instaurarsi di un'infezione occulta possa essere dovuto alla compromissione dei meccanismi di difesa intracellulari e specificamente della via RIG-1/MAVS/IFN-beta.

5) Valutazione della funzionalità della via di segnalazione di MAVS in linee linfocitarie infettate da HCV

Oltre alla modificazione dell'espressione e della localizzazione della proteina MAVS, si procederà ad esplorare le varie tappe della cascata di segnalazione innescata dalla presenza di RNA a doppio filamento (dsRNA), caratteristico della presenza di HCV in corso di replicazione, riconosciuto dalla proteina RIG-1. A valle di MAVS si situano le vie di signalling di NF-kB che una volta attivate portano alla trascrizione di numerose citochine tra cui anche l'IFN-beta. Tali proteine saranno quantificate tramite test ELISA nel sovranatante delle colture e la loro espressione sarà monitorata tramite real-time PCR sulle cellule stesse. Sono a disposizione anche dei reporter luciferasi della via di NF-kB (kB-luc) e interferone (IFN-beta-luc, IRF3-luc), utilizzabili per creare linee stabili esprimenti questi reporters da infettare artificialmente con i virioni

prodotti in vitro al fine di avere un sistema di costante monitoraggio degli effetti dell'infezione virale sulla via di RIG-1/MAVS.