

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

Resoconto dell'attività di ricerca (1 anno)

Responsabile scientifico: *Prof.ssa Anna Linda Zignego*

Il progetto di ricerca, grazie al prezioso contributo della Fondazione Istituto di Ricerche Virologiche Oretta Bartolomei Corsi, ha potuto essere svolto nei tempi e modi previsti fatta eccezione per piccole variazioni dipendenti essenzialmente dai risultati ottenuti che hanno imposto alcune correzioni sia a livello delle priorità che a livello dei tempi di attuazione del programma. Dovendo riassumere sinteticamente l'attività dei mesi passati, possiamo ritenerci soddisfatti del lavoro di preparazione di materiali e tecniche che si è completato nei termini previsti. Infatti, il reclutamento dei pazienti affetti da Crioglobulinemia Mista HCV-correlata (MC-HCV) è stato effettuato dallo staff clinico dell'Ambulatorio Epatiti Virali del Centro MaSVE che ha identificato e caratterizzato un numero congruo di tali pazienti (vedi oltre), tappa essenziale per lo svolgimento della ricerca. La MC-HCV è catalogata nel registro delle malattie rare e di conseguenza l'identificazione e reclutamento di soggetti affetti da tale patologia ha richiesto un notevole impegno, coinvolgendo anche alcuni colleghi di Centri collaboranti. Parallelamente, nel Laboratorio di Virologia Molecolare e Oncologia Virale del Centro MaSVE sono state messe a punto le tecnologie necessarie alla separazione, selezione ed immortalizzazione dei linfociti B dei soggetti con MC-HCV, la cui caratterizzazione resta l'obiettivo primario del programma di ricerca. Il lavoro di selezione dei cloni linfocitari produttori di IgM-RF si è rivelato particolarmente impegnativo ed oneroso; basti pensare che sono stati selezionati, coltivati e testati circa 6000 cloni, con l'identificazione di alcuni interessanti candidati (vedi di seguito). Tale approccio, comunque, è da considerarsi l'unica via in grado di fornire linee cellulari continue in grado di secernere IgM-RF, un risultato che non è mai stato descritto in letteratura per la MC e che ci fornisce degli strumenti unici per lo studio dei meccanismi patogenetici alla base di tale disordine. Per compensare il grande investimento di tempo e risorse impiegati nella creazione e caratterizzazione delle linee cellulari precedentemente descritte, invece di occuparci direttamente della produzione delle particelle virali in vitro (vedi progetto di ricerca, punto 5), abbiamo stabilito una collaborazione con il gruppo del Prof. Thomas Baumert dell'Università di Strasburgo che, forte dell'esperienza acquisita in vari anni di produzione ed utilizzo di tali particelle virali sintetizzate in vitro, ci fornirà le quantità necessarie per la corretta valutazione della risposta dei cloni B-RF allo stimolo costituito dalla particella HCV in toto mimando quello che effettivamente accade nel paziente infettato. E' attualmente in corso anche il lavoro di caratterizzazione

genetica dei cloni selezionati tramite sequenziamento delle regioni codificanti per le immunoglobuline; si prevede di completare tale parte del programma entro i primi mesi del 2010.

Volendo descrivere il lavoro effettuato in termini più tecnici e dettagliati, durante la prima fase del progetto di ricerca sono stati reclutati pazienti con infezione da HCV e sindrome crioglobulinemica, con alti livelli di crioglobuline (CGs) nel siero. Valori di CGs superiori al 10% (nel nostro caso il range oscillava tra il 10-85%) comportano infatti un'alta probabilità di trovare, anche a livello del sangue periferico, le cellule produttrici le CGs (cellule B-RF). Partendo da prelievi di sangue periferico (circa 30 ml) sono state inizialmente isolate le cellule mononucleate (PBMC) di 5 pazienti e quindi separati i linfociti B tramite separazione magnetica. Le popolazioni ottenute avevano un alto grado di purezza (> 95% CD14+). Durante la fase di raccolta e selezione dei casi (tutt'ora in corso), sono stati separati e crioconservati in azoto liquido, campioni di PBMC di ulteriori 21 pazienti pronti per una successiva valutazione.

La procedura di immortalizzazione è stata effettuata sui 5 casi precedentemente descritti; i linfociti B, isolati tramite separazione immuno-magnetica, sono stati incubati in presenza di medium condizionato delle cellule B95-8 in un rapporto di 1:1 con medium normale. Tali cellule producono particelle di EBV nel medium di cultura e quindi consentono l'infezione della popolazione linfocitaria B inducendone l'immortalizzazione grazie alle proteine EBNA 1-6 e LMP 1-2 prodotte dal virus. Dopo 24 ore di incubazione in presenza di EBV le cellule sono state incubate per circa 48 in un particolare medium stimolante comprensivo di attivatori pleiotropici della proliferazione (PHA e PMA), stimolatori dei TLR (CpG 2006), citochine specifiche per i linfociti B (CD40L, BAFF e APRIL). Le cellule sono state quindi coltivate per 2 settimane, in presenza di PBMC irradiate di donatori sani e mantenendo il cocktail di stimolanti, ad una densità di 5 cellule per pozzetto in piastre da 384 pozzetti; ogni coltura derivante da un singolo paziente è stata distribuita in 4 piastre per un totale di oltre 1100 pozzetti per paziente corrispondenti ad altrettanti cloni B-linfocitari. La percentuale di cellule immortalizzate è stata di circa il 30-35% ed i cloni proliferanti sono stati successivamente amplificati ed espansi. Per selezionare i cloni produttori di IgM ad azione di FR, è stato messo a punto un test ELISA che prevede il coating delle piastre con IgG policlonali umane e l'utilizzo di anticorpi anti-IgM umane coniugate con fosfatasi alcalina per la rivelazione. Da tale screening sono stati identificati 11 cloni autoreattivi (3 per il paz.1, 3 per il paz.2, 1 per il paz.3, 4 per il paz.4 e nessuno per il paz. 5) con diversa affinità per le IgG umane (vedi fig.1).

La fase successiva, tutt'ora in corso di completamento, ha visto l'analisi molecolare dei cloni a maggior affinità tramite analisi della sequenza dei geni delle Ig (catene pesanti e leggere), al fine di dedurre la specificità anticorpale tramite confronto con banche dati di anticorpi a specificità nota.

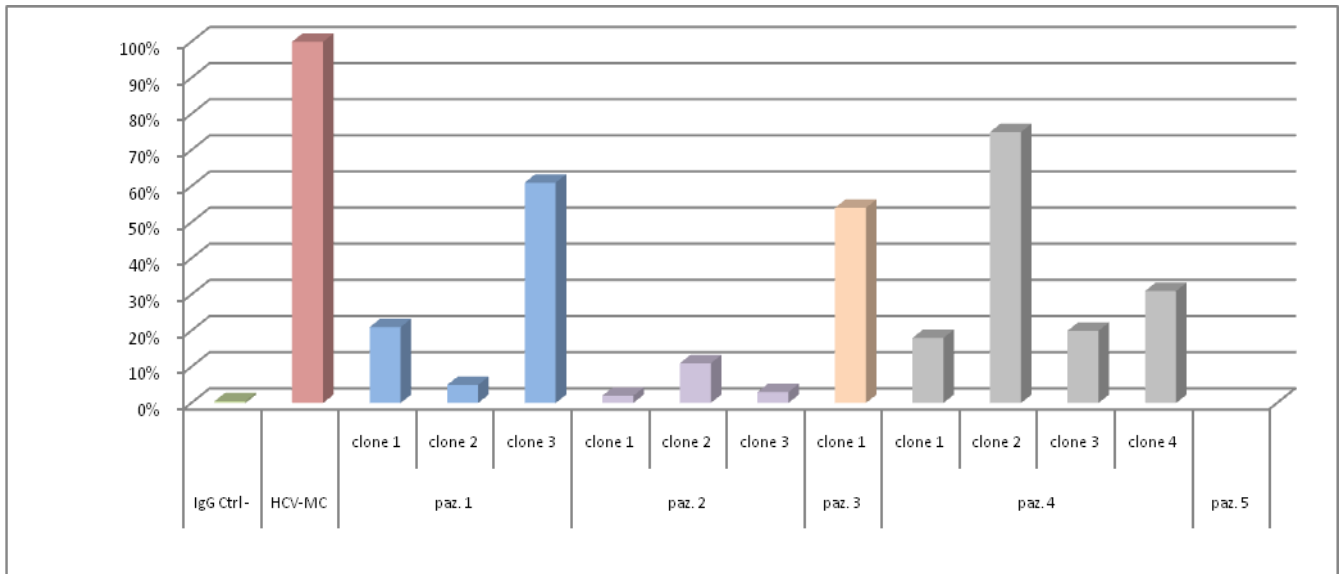


Figura 1: Valutazione dell'affinità delle IgM-RF prodotte dai cloni B-linfocitari selezionati dopo immortalizzazione per il frammento Fc delle IgG umane.

Come anticipato, la produzione delle particelle virali in vitro viene effettuata presso il laboratorio del Prof. Baumert, Università di Strasburgo; la collaborazione con il gruppo francese ha permesso di velocizzare i tempi di attuazione del progetto evitando la messa a punto delle tecniche di coltura delle cellule produttrici del virus. Riceveremo entro la fine di questo anno i primi lotti di particelle HCV prodotte in vitro e potremo quindi iniziare gli esperimenti di interazione tra HCV e cloni B-RF. Tali esperimenti, come descritto nel programma di ricerca, saranno effettuati nel laboratorio BSL-3 presso il Dipartimento di Sanità Pubblica dell'Università degli Studi di Firenze.

Firenze, 04/12/2009