

**Università degli Studi del Piemonte Orientale
“Amedeo Avogadro”**



**Dottorato di Ricerca
in
Medicina Molecolare
*Ciclo XXII***

Relazione 1° anno

TITOLO:

**Frequenza e significato patologico dei riarrangiamenti
genomici nella regione regolatoria virale dei Polyomavirus
umani isolati in soggetti trapiantati di rene**

Candidato: Miglio Umberto

Tutor: Prof. Renzo Boldorini

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

Le conoscenze virologiche e patogenetiche dei polyomavirus umani sono relativamente recenti: nel 1970, in un laboratorio inglese giunse un campione di urine di un paziente trapiantato di rene con stenosi ureterale da causa ignota. Indagini ultrastrutturali rivelarono la presenza di particelle virali icosaedriche, prive di envelope, del diametro di circa 45 nm, inizialmente identificate come facenti parte della famiglia delle *Papovaviridae*. Tale virus precedentemente non noto venne chiamato BK virus (BKV) dalle iniziali del nome del paziente da cui era stato isolato¹. Quasi contemporaneamente, in un altro laboratorio, si studiarono campioni cerebrali autoptici di soggetti deceduti per una patologia demielinizzante del sistema nervoso centrale, ad esordio acuto-subacuto, rapidamente progressiva, all'epoca ancora poco nota, la *leucoencefalopatia multifocale progressiva* (PML): anche in questo caso si osservò la presenza di un virus con caratteri morfologici ultrastrutturali simili a quelli di BKV, che venne chiamato JC virus (JCV) sempre utilizzando le iniziali del nome del paziente da cui venne isolato².

Attualmente, questi due virus sono stati correttamente definiti e sufficientemente caratterizzati. Entrambi hanno un diametro di 40-45 nm (variabile in relazione ai mezzi di fissazione ed inclusione utilizzati per indagine ultrastrutturale), DNA a doppia elica, super-avvolto della lunghezza di circa 5300 paia di basi (bp)³. JCV e BKV fanno parte della famiglia delle *Papovaviridae*, genere Polyomavirus (PV), di cui fa parte anche il più noto virus vacuolizzante della scimmia (simian virus 40 - SV40). Strutturalmente i PV sono costituiti da un capsid virale formato da tre proteine principali, VP (viral protein) 1, VP2 e VP3; poiché la sola proteina VP1 è esposta all'esterno del capsid, essa consente l'interazione con molecole disposte sulla superficie delle cellule bersaglio dell'infezione virale⁴.

Il genoma dei PVs è strutturalmente piuttosto semplice; si distinguono in esso regioni **codificanti** e una regione regolatoria **non codificante**⁵(Figura 1):

- regione precoce (**Early region**) codificante per una proteina tumore-associata detta **Large T** (LT) e per una proteina di significato poco noto detta **small-t** (t), che verosimilmente è anch'essa coinvolta nel processo di tumorigenesi virale .
- regione tardiva (**Late region**), codificante per le proteine capsidiche, **VP1, VP2 e VP3**, e per una proteina di significato poco noto detta **agnoproteina**, coinvolta nell'assemblaggio delle proteine capsidiche.

- regione di controllo trascrizionale (**TCR**), *non codificante*, posizionata tra le regioni precoce e tardiva. Tale regione riveste un ruolo chiave nella storia naturale della infezione virale. *Ault e Stoner*⁶, hanno schematicamente suddiviso la regione TCR di JCV in 6 blocchi, convenzionalmente definiti A, B, C, D, E, F ciascuno composto da un numero determinato di bp (**A: 25bp, B: 23bp, C: 55bp, D: 66bp, E: 18bp e F: 69bp**), e per analogia anche la regione TCR di BKV è stata suddivisa in 5 blocchi di sequenze inizialmente da *Markowitz et al.*⁷, e successivamente da *Moens et al.*⁸ (**O:124bp, P:68bp, Q:39bp, R:63bp e S:63bp**).

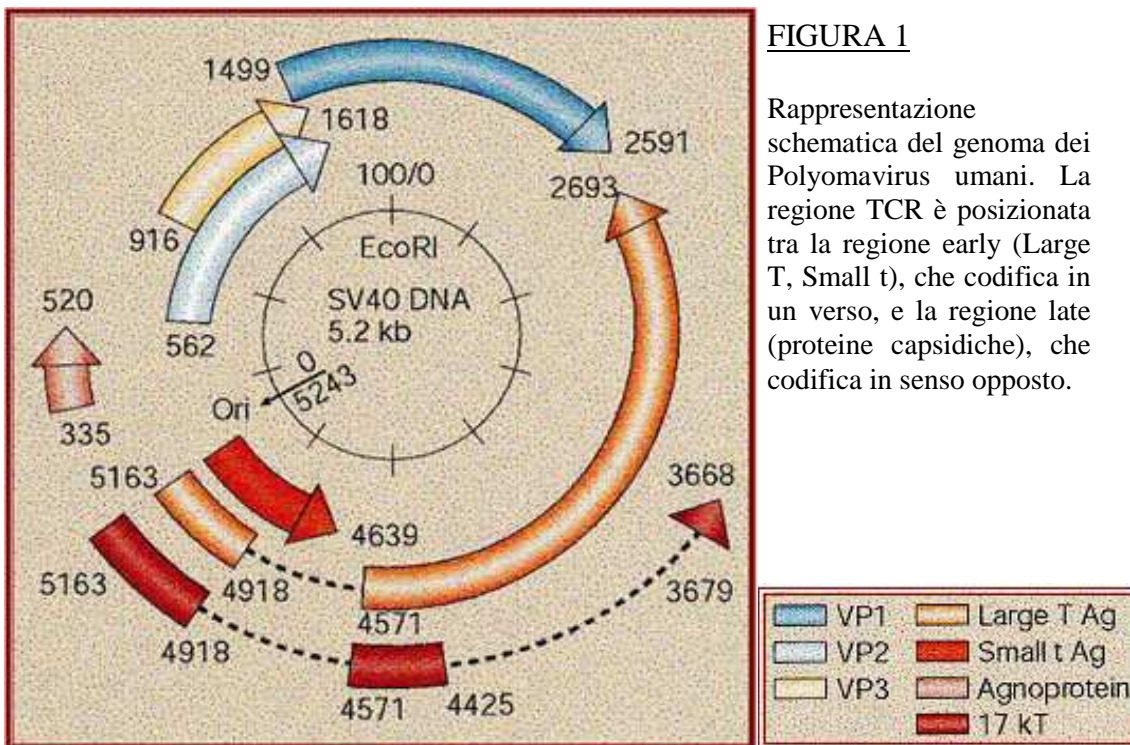


FIGURA 1

Rappresentazione schematica del genoma dei Polyomavirus umani. La regione TCR è posizionata tra la regione early (Large T, Small t), che codifica in un verso, e la regione late (proteine capsidiche), che codifica in senso opposto.

TCR di entrambi i virus si è dimostrata essere conservata nella maggior parte dei casi, mantenendo cioè una sequenza stabile, con solo occasionali mutazioni puntiformi (sostituzioni, delezioni o inserzioni di singole basi nucleotidiche); tali sequenze sono state definite da *Yogo et al*⁹ **archetipi**. L'archetipo, rappresenta il genotipo virale prevalente nella popolazione umana derivante dalla co-evoluzione con l'ospite. L'ipotesi è che dalle sequenze archetipo presenti in un individuo si originano per fenomeni di riarrangiamento genico le sequenze ricombinanti a causa dell'ipervariabilità della regione, allo scopo di adattarsi alle condizioni presenti nell'ospite (per esempio modificando tropismo cellulare, infettività, e capacità replicativa virale)¹⁰.

All'interno della regione TCR di JCV e BKV sono stati osservati siti di legame per fattori trascrizionali^{11,12}, quali:

- **Sp1**: proteina implicata nella differenziazione cellulare; sembra avere un ruolo nel mantenere libere da metilazione le isole CpG, mantenendo attiva la trascrizione.
- **Nuclear Factor-1 (NF1)**: media le reazioni infiammatorie e immunologiche in risposta a diversi stimoli; mutazioni in questo sito hanno mostrato avere conseguenze nella trascrizione dei geni tardivi.
- **Large T**: agisce con un meccanismo di controllo negativo, inibendo l'attività del promotore precoce e bloccando la sua stessa espressione.
- **Purα**: proteina implicata nel controllo della replicazione e della trascrizione del DNA, agisce promuovendo l'espressione delle proteine precoci; inibita da Large T.
- Altri fattori di trascrizione che si legano alla regione TCR sono: **GM-CSF** (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor), **PEA3**, **AP1**.

La regione TCR sembra essere determinante per la trascrizione cellulo-specifica del DNA virale, infatti è stato osservato che le regioni promotrici presenti nella TCR di JCV aumentano notevolmente la trascrizione nelle cellule gliali rispetto alle cellule non gliali in coltura, probabilmente anche grazie alla presenza in questi tipi di cellule di fattori di trascrizione più specifici per le sequenze regolatrici¹¹.

Risulta evidente quindi che significative mutazioni (come ad es. grosse delezioni, inserzioni o duplicazioni genomiche) possano, almeno teoricamente, modificare la capacità replicativa virale, l'infettività, il tropismo cellulare od anche gli effetti patogeni di tali virus.

I PVs JCV e BKV vengono distinti in genotipi differenti, in relazione alla sequenza della regione TCR, ma anche in sierotipi, in relazione alla loro antigenicità, data dalla struttura genomica della regione VP1¹³.

In relazione a ciò, JCV viene suddiviso nei seguenti sottotipi:

- TIPO 1 (comune in Europa, Stati Uniti e Ungheria)
- TIPO 2A (in nativi americani e nord dell'Asia)
- TIPO 2B (Europa), particolarmente implicato nella PML
- TIPO 3 (Africa e americani africani)
- TIPO 4 (Stati Uniti)
- TIPI 5, 6, 7

e BKV nei seguenti sottotipi:

- GRUPPO I : prototipo (PT), Dunlop (DUN), MM e GS
- GRUPPO II : SB
- GRUPPO III : AS
- GRUPPO IV : IV e MG

Le modalità attraverso cui il Polyomavirus infetta e si trasmette non sono ancora interamente note: la via di trasmissione principale sembra essere quella respiratoria^{14,15}, anche se sono possibili altre modalità quale quella oro-fecale¹⁶, urinaria¹⁷ e trans-placentare^{18,19}. Indipendentemente dalle modalità di trasmissione, l'infezione da PV risulta quasi sempre asintomatica od oligosintomatica ed è seguita da una fase viremica nella quale virioni o più probabilmente frammenti genomici virali, veicolati da linfociti circolanti attraverso il torrente circolatorio raggiungono gli organi bersaglio. Questi ultimi sono in parte noti, in parte non noti e differenti per JCV (encefalo, vie escrettrici urinarie) e BKV (rene, vie escrettrici urinarie). I PVs successivamente si latenziano negli organi bersaglio, in forma di DNA extracromosomico (episomiale) o di virus integrato e in questa fase sono rilevabili solo mediante metodiche di biologia molecolare^{20,21}. Condizioni di immunodeficienza di variabile grado (farmacologiche, indotte da infezione da HIV, gravidanza, deficit di immunità cellulo-mediata) determinano riattivazione virale e danno d'organo.

In relazione al tipo cellulare infettato, l'infezione da PVs può condurre a lisi cellulare (tipico esempio la lisi degli oligodendrociti del sistema nervoso centrale indotta da JCV e causa di PML), con trascrizione di tutte le proteine virali e liberazione finale di progenie virale, o trasformante (es. l'infezione degli astrociti del sistema nervoso centrale con aspetto istologico neoplastiforme), con trascrizione delle sole proteine precoci²².

L'ingresso del virus all'interno della cellula è mediato dal riconoscimento di molecole presenti sulla membrana cellulare da parte della proteina VP1 virale: SV40 è in grado di riconoscere le molecole MHC di classe I, mentre BKV e JCV riconoscono catene oligosaccaridiche terminanti con acido sialico. Avvenuto il legame il virus viene internalizzato per mezzo di vescicole endocitiche e trasportato nel nucleo dove il DNA viene liberato⁴. All'interno del nucleo ha inizio la trascrizione dei geni precoci: Large-T e small-t, derivanti da uno splicing alternativo di un singolo trascritto primario. Large-T si lega con, e inibisce attraverso degradazione, la proteina regolatrice del ciclo cellulare nota come retinoblastoma (pRB) e membri della stessa famiglia quali p107 e p130. Il legame permette la liberazione del promotore del ciclo E2F, che consente l'ingresso nella fase S, dove la cellula produce proteine utili sia per la trascrizione sia per mantenere l'infezione virale. Large-T ha una funzione di controllo per le fasi iniziali della replicazione virale, legandosi a sequenze genomiche del virus formando complessi con diverse proteine: complesso polimerasi α -primasi; proteina A replicativa; proteina che lega DNA a singola elica. Inoltre possiede un'attività elicastica che permette la distensione del DNA e lo predispone per la sintesi. Nella fase tardiva, Large-T promuove la trascrizione dei geni tardivi e la repressione di quelli precoci. I meccanismi di inibizione non sono ancora pienamente conosciuti, ma quelli di attivazione si basano sul reclutamento di proteine cellulari. I geni tardivi VP1, VP2 e VP3, sono responsabili della formazione

del capsid, coadiuvati dalla agnoproteina. La capacità del large-T di trasformare le cellule è data da tre domini: dominio J, dominio legante pRB e dominio legante p53. Quest'ultimo dominio è responsabile del legame alla proteina, inattivandola e causando la crescita incontrollata della cellula. Durante l'infezione litica, l'interazione con queste proteine consente di prolungare la vita cellulare, per poter aumentare il numero di virioni prodotti^{3,11}.

L'effetto di degradazione delle proteine oncosoppressive p53 e pRB da parte di Large T sembra essere alla base del processo di trasformazione neoplastica proposto per alcune neoplasie umane^{23,24}. Le patologie sicuramente causate da polyomavirus umani sono: leucoencefalopatia progressiva multifocale, cistiti ed uretriti emorragiche e la nefropatia da polyomavirus (PAN)^{25,26}. La PAN consiste in una infezione litica di cellule epiteliali dei tubuli renali o delle cellule epiteliali della capsula di Bowman che riveste i glomeruli renali, con conseguente nefrite tubulo-interstiziale³. Tale patologia è causata in prevalenza da infezione-riattivazione di BKV²⁷, anche se di recente è stato riportato un caso di possibile coinvolgimento di JCV²⁸. La PAN, esclusiva dei soggetti immunodepressi in corso di trapianto renale, può essere causata da una riattivazione di virus latente nel soggetto ricevente l'organo trapiantato o, in alternativa, da una nuova infezione veicolata dall'organo trapiantato. Le cause principali della riattivazione sono le terapie farmacologiche anti-rigetto²⁹ (in particolare mofetil-mycophenolato, ciclosporina A e prednisone), ma ci possono essere altri fattori di rischio come l'età avanzata (le persone anziane rispondono di più all'immunosoppressione), il sesso (i maschi sono più a rischio), il siero-stato (l'80% dei pazienti con PAN presenta BKV nel siero prima del trapianto)³. La diagnosi di PAN si basa su elementi clinici, di laboratorio e su indagini cito-istologiche effettuate su urine e biopsia renale.

I sintomi della infezione sono aspecifici e in gran parte simili a quelli che si osservano in corso di rigetto acuto interstiziale mentre gli esami di laboratorio evidenziano generalmente un incremento aspecifico della creatinina sierica. Un importante elemento diagnostico è rappresentato dalla escrezione urinaria di cosiddette "decoy cells", identificabili con esame citologico urinario sotto forma di cellule con nucleo ipercromico, con inclusioni intranucleari a vetro smerigliato, espressione morfologica di replicazione virale³⁰. Tale reperto, è costantemente presente nei soggetti con PAN, ma è scarsamente specifico, in quanto riscontrabile anche in soggetti in cui la riattivazione virale avviene nelle vie escrettrici (ad es. nelle cistiti od uretriti emorragiche) e deve essere associato ad una valutazione molecolare sulla presenza di viremia. Le attuali linee guida sulla diagnostica della PAN prevedono poi che in caso di positività citologica alle decoy cells e molecolare su sangue debba essere eseguita una biopsia renale che attualmente rappresenta il *gold standard* diagnostico per questa patologia.

In caso di PAN, la biopsia renale evidenzia un quadro di nefrite tubulo-interstiziale (Figura 2) (infiltrati mononucleari interstiziali, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale) associata alla presenza delle tipiche inclusioni virali intranucleari, dimostrabili morfologicamente e con metodiche immunoistochimiche in cellule epiteliali.

Lo sviluppo della PAN può essere diviso in stadi³:

- STADIO A: coinvolgimento focale midollare della cellule epiteliali del tubulo, inclusioni nucleari limitate
- STADIO B: estensivo coinvolgimento del rene con alterazioni citoplasmatiche diffuse o multifocali, necrosi e primi segni di fibrosi
- STADIO C: fibrosi interstiziale, i tubuli sono atrofici e appiattiti.

Dai dati della letteratura emerge che l'infezione-riattivazione di BKV nei soggetti trapiantati di rene rappresenta un evento molto frequente (nell'ordine del 70% dei pazienti) mentre la malattia conclamata si osserva in una netta minoranza (2-7%)³¹. Tale discrepanza può dipendere da vari fattori, in parte legati all'ospite (età, sesso, tipo e livello di immunodepressione, fattori geografici) e in parte legati al virus. Tra questi ultimi di particolare rilevanza sembra essere il genotipo virale, quale determinato dalle caratteristiche specifiche della regione regolatoria che, come precedentemente detto, presiede al controllo della replicazione ed infettività virale; più recentemente è emerso il possibile ruolo di JCV come co-fattore coinvolto nel danno renale da Polyomavirus.

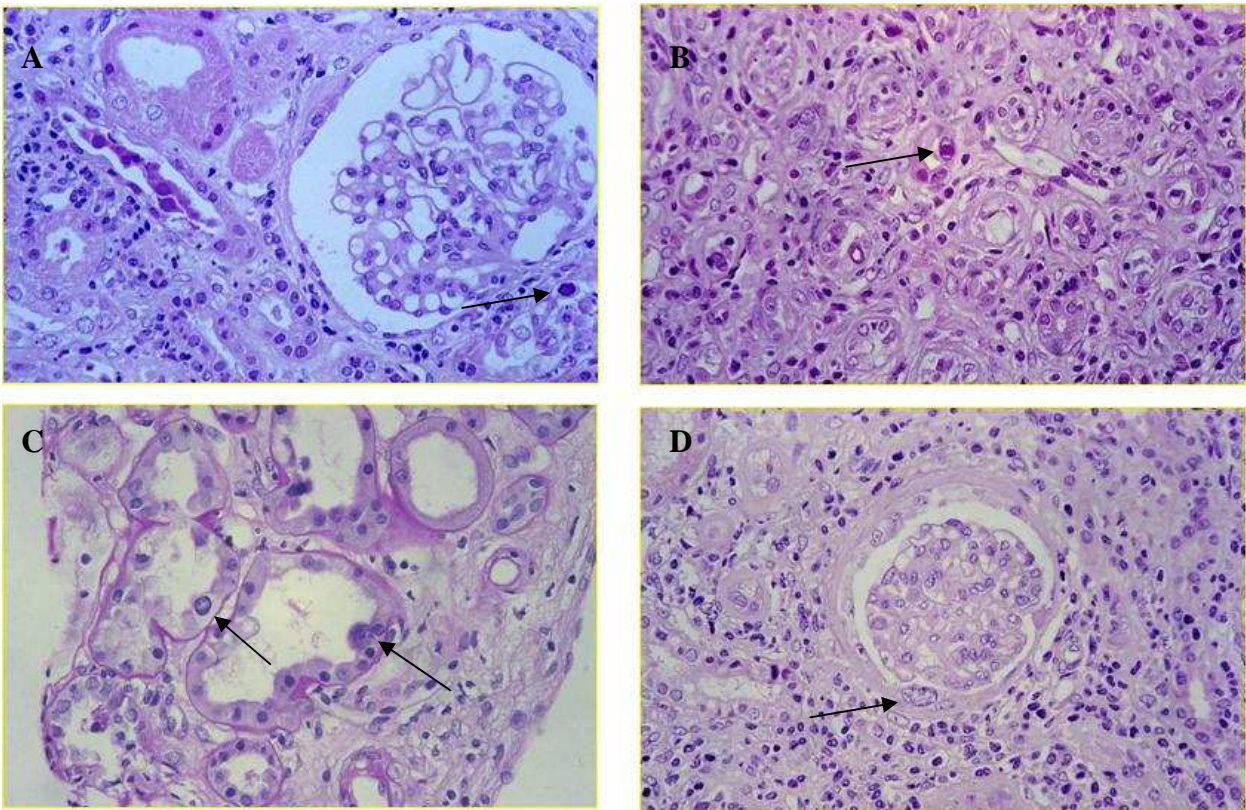


FIGURA 2

biopsie renali di soggetti con nefropatia polyomavirus-associata: A,B,C) Varie tipologie di inclusi virali in cellule tubulari renali (freccie) e D) in cellula parietale di capsula di Bowman (freccia)

Ematossilina-Eosina, Ingrandimenti originali: 250x

SCOPO DEL LAVORO

Scopo del presente lavoro è quello di valutare la frequenza ed il significato dei riarrangiamenti della regione regolatoria virale di JCV e BKV quali fattori determinanti nel condizionare lo sviluppo e la severità della nefropatia Polyomavirus-associata. Lo studio è stato condotto su una casistica di pazienti sottoposti a trapianto di rene che hanno sviluppato PAN, istologicamente dimostrata, e su pazienti trapiantati di rene con infezione da Polyomavirus che nel corso dello studio non hanno sviluppato PAN. In tutti i pazienti sono stati esaminati campioni di urine e sangue periferico prelevati ad intervalli temporali variabili e DNA estratto da biopsie renali, queste ultime eseguite in caso di incremento di creatinina sierica o di sintomi riferibili a insufficienza renale e perciò non necessariamente connessi a danno renale indotto da infezione da PVs.

MATERIALI E METODI

- ***RACCOLTA DEI CAMPIONI***

Dal 2001 al 2007 sono stati esaminati campioni di sangue, urine e biopsie renali di 226 pazienti portatori di trapianto renale, afferenti presso la Divisione di Trapianto Renale dell'Ospedale Maggiore di Novara, per i normali controlli di routine post-trapianto o per l'insorgere di problematiche cliniche o alterazioni laboratoristiche suggestive di patologie connesse al trapianto. Di questi 123 maschi e 103 femmine con età media di 50 anni, mediana di 50 e range da 21 a 74. Nel corso del periodo di osservazione 8 di questi pazienti (8/226, 3,5%) hanno sviluppato nefropatia da Polyomavirus, istologicamente dimostrata (GRUPPO A), i restanti 218 (218/226, 96,5%, GRUPPO B) hanno presentato problematiche di rigetto acuto interstiziale (25%), vascolare (5%), tossicità acuta da ciclosporina A (20%) e recidiva della glomerulopatia di base (10%) o nessuna problematica (40%).

Di ciascun paziente sono stati esaminati campioni di sangue e di urine raccolti contestualmente; nel gruppo A sono stati esaminati 70 campioni di urine (media 8,7 campioni, range da 2 a 13), 63 campioni di sangue (media 7,9 campioni, range da 2 a 10) e 19 campioni di biopsie renali (media 2,3 campioni, range da 1 a 5) mentre nel gruppo B sono stati esaminati 682 campioni di urina e 678 di sangue (media 3,1 campioni, range da 1 a 6). La biopsia renale è stata effettuata su 68 pazienti per un totale di 104 campioni (media 1,5 campioni, range da 1 a 4).

I dati clinici, epidemiologici e la patologia renale di base che ha condotto ad insufficienza renale cronica nei pazienti del gruppo A sono riportati nella tabella 1.

Paziente	Età	Sesso	Età del trapianto (mesi)	Patologia renale che ha condotto all'insufficienza renale cronica
1	65	M	24	Nefroangiosclerosi
2	54	M	60	Malattia policistica del rene
3	58	M	24	Malattia policistica del rene
4	33	F	24	Nefropatia da IgA
5	55	M	12	Sconosciuta
6	51	F	14	Nefroangiosclerosi
7	41	M	36	Danno glomerulare
8	65	F	22	Nefroangiosclerosi

TABELLA 1 – Dati clinico-patologici che hanno condotto a insufficienza renale cronica nei pazienti che hanno sviluppato PAN

Campioni di sangue periferico

I campioni di sangue periferico sono stati centrifugati a 2500 rpm per 10 min per evitare la lisi cellulare. Il siero così ottenuto è stato aliquotato in provette da 1,5 mL e stoccato a -20°C. Per effettuare l'indagine molecolare il DNA è stato estratto utilizzando un kit commerciale (Genomic DNA from Tissue, NucleoSpin® Machery-Nagel, Germania) che prevede la lisi cellulare mediante buffer di lisi, seguita dal legame del DNA alla membrana di silice. Dopo aver lavato il DNA con buffer contenente etanolo, viene eluito dalla membrana con buffer di eluizione in un volume finale di 70 µL e conservato a -20°C.

Campioni di urine

Circa 50 mL di urina sono stati inizialmente centrifugati a 2500 rpm per 10 min. Dal sedimento ottenuto sono stati ricavati: una provetta da 1,5 mL per indagini molecolari, conservata a -20°C; mediante ulteriore cito-centrifugazione a 1800 rpm per 10 min è stato ottenuto un vetrino per valutazione citologica in microscopia ottica. Il vetrino è stato fissato mediante citospray, contenente una soluzione alcolica. I preparati citologici ottenuti sono stati colorati con metodica Papanicolau e quindi esaminati citologicamente, in particolare per identificare la presenza di

decoy cells³⁰, ritenute espressione morfologica della proliferazione virale intranucleare.

Le decoy cells sono state valutate semiquantitativamente come segue:

- carica bassa (+): da 1 a 5 cellule in 5 campi microscopici ad alto ingrandimento (HPF, dove HPF corrisponde ad un ingrandimento di 400x) (Figura 3-A)
- carica intermedia (++) , da 6 a 10 cellule in 5 HPF
- alta carica (+++), più di 10 cellule in 5 HPF (Figura 3-B).

Biopsie renali

I campioni istologici sono stati prelevati tramite ago-biopsie renali e immediatamente fissati in fluido di Serra per 24 ore a temperatura ambiente e successivamente inclusi in paraffina. Sono state tagliate sezioni di 1-2 µm usando un microtomo a slitta (Micron, Type HM 440 E) e poste su vetrino (le sezioni aderiscono al vetrino per una differenza di temperatura tra il vetrino stesso e il bagnetto di distensione). Per indagine istologica al microscopio ottico sono state effettuate le seguenti colorazioni istologiche ed istochimiche: ematossilina-eosina, impregnazione argentica (metodo Metenamina Silver), tricromica di Masson, acido periodico-Reattivo di Schiff (PAS), ed ematossilina fosfotungstica (PTAH) . Per la diagnosi di nefropatia polyomavirus-associata (PAN) sono stati utilizzati i criteri proposti da Hirsch³, che prevedono anche una sottoclassificazione relativa alla entità del danno renale e alla presunta durata della patologia. In dettaglio, la PAN è stata classificata in :

- stadio precoce (A), coinvolgimento focale midollare delle cellule dell'epitelio dei tubuli, positive per l'espressione del Large T. Alterazioni citopatiche come inclusioni nucleari sono limitate. Non evidenza di necrosi e infiltrati infiammatori.
- intermedio (B), estensivo coinvolgimento renale con alterazioni citopatiche diffuse, necrosi, accompagnata da risposta infiammatoria, e primi segni di fibrosi. Gli infiltrati infiammatori includono cellule polimorfonucleate, monociti e cellule plasmacitoidi.
- tardivo (C), fibrosi interstiziale, cicatrizzante. I tubuli sono atrofici e appiattiti.

In tutti i casi inoltre è stata eseguita colorazione immunoistochimica con metodo perossidasi-antiperossidasi (PAP), utilizzando anticorpo anti-antigene T di SV40 (che cross-reagisce con antigene T di BKV e JCV), sviluppando reazione con diaminobenzidina (DAB), con controcolorazione in ematossilina di Harris.

Ulteriori cinque sezioni dello spessore di 5 µm sono state poste in una provetta da 1,5 mL al fine di estrarre il DNA da tessuto paraffinato utilizzando il metodo del fenolo-cloroformio. Per deparaffinare si eseguono lavaggi in Xilolo, seguiti da un passaggio in etanolo 100%, per disidratare i campioni. Il pellet è stato asciugato, per evitare possibili inibizioni delle successive

reazioni, e digerito con 25 μ L di proteinasi K e 450 μ L di soluzione di lisi (SDS 1%, EDTA 20mM, Tris HCl pH 7,5 20mM). La completa digestione è stata ottenuta incubando overnight a 55°C. L'estrazione e purificazione del DNA è stata eseguita in un volume di cloroformio (M-medical, Milano, Italia) e in un volume di fenolo (CELBIO, Milano, Italia) tamponato con Tris-EDTA a pH 7,5-7,6 (in questo modo non ha affinità con il DNA). Dopo centrifugazione a 3500 rpm per 10 min è stata ottenuta una fase acquosa contenente il DNA e una organica più pesante. Al DNA, trasferito in una provetta da 1,5 mL, è stato aggiunto etanolo 100% e posto a -20°C per almeno un'ora e mezza; il pellet è stato ottenuto mediante centrifugazione a 14000 rpm per 10 min. Per eliminare i sali residui, il DNA viene trattato con etanolo 70% e fatto asciugare; successivamente viene risospeso in acqua DEPC-Treated RNase free (Biotech Labs, Houston, USA) in un volume finale di 30 μ L e conservato a -20°C.

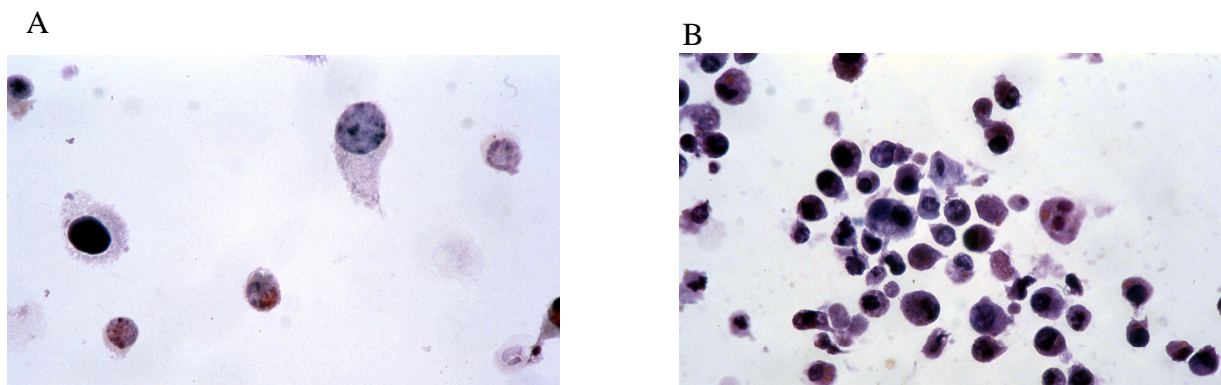


FIGURA 3

Esame citologico urinario: A) Rare (+) e B) tappeto di decoy cells in campioni urinari.

Colorazione Papanicolau, Ingrandimenti originali: 400x

- ***POLYMERASE CHAIN REACTION***

Al fine di amplificare la regione del large-T (LT), è stata eseguita una multiplex/nested PCR (nPCR) sulle urine³² e sul DNA estratto da siero e da biopsie renali. Il primo step prevede l'utilizzo di primers comuni a tutti i tipi di PV: PM1+ e PM1-. Nel secondo step è stato invece usato PM2- comune a tutti i PV, e JC+ (che amplifica un frammento di 189 bp), BK+ (che amplifica un frammento di 353 bp) e SV+ (che amplifica un frammento di 135 bp), specifici in modo da distinguere i differenti virus. I campioni sono stati amplificati in un volume totale di 25 μ L, contenente: 2U di BioTaq DNA polymerase (Bioline, London, UK) in presenza di Bioline buffer NH₄ 1x, 2mM MgCl₂ (1mM per il secondo step di PCR), 5 pmol/ μ L di ogni primers (Roche Diagnostic, Milano, Italia), 0,2mM di dNTPs (Roche Diagnostic, Milano, Italia) e 10 μ L

di DNA estratto da sangue periferico e biopsia renale, e 2,5 μ L di urine; per il secondo step è stato usato 1 μ L di template. La reazione è stata eseguita su Eppendorf Mastercycler gradient (Eppendorf, Amburgo, Germania). Dopo una prima denaturazione a 95°C della durata di 5 min, fanno seguito 40 cicli di: denaturazione 95°C per 40 sec, appaiamento a 61°C (55°C per i primers interni) per 40 sec e estensione di 72°C per 40 sec. Infine si ha un'estensione finale di 5 min a 72°C; per i primers interni i cicli di reazione sono stati ridotti a 35. Come controllo negativo è stata usata acqua DEPC-Treated RNase free (Biotecx Labs, Houston, USA), e come positivo tessuto renale da un soggetto con nefropatia istologicamente dimostrata per BKV, tessuto cerebrale proveniente da un soggetto con PML per JCV e linee cellulari infettate con SV40.

I campioni risultati positivi per la regione LT di BKV sono stati sottoposti ad una ulteriore amplificazione della regione TCR, usando BKTT1 e BKTT2 come primers esterni e BRP1 e BRP2 come primers interni (amplificano un frammento di 356 bp). L'amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25 μ L contenente: 10 pmol/ μ l di ogni primer, 0,2mM dNTPs, 1,5mM MgCl₂ e 2U di BioTaq con un appropriato buffer di reazione (Tris-HCl 100 mM, pH 8.3, KCl 500 mM). Nel primo step sono stati usati 5 μ L di DNA estratto da siero e da biopsia renale, e 5 μ L di urine. Nel secondo step sono stati invece usati 2,5 μ L di template. La reazione è stata eseguita con Eppendorf Mastercycler gradient e dopo una prima denaturazione a 95°C per 5 min, fanno seguito 35 cicli composti da: denaturazione a 95°C per 40 sec; appaiamento per 40 sec a 55°C nel primo step e 50°C nel secondo step; estensione a 72°C per 40sec. I cicli sono terminati con un'estensione finale di 5 min a 72°C.

I campioni positivi per la regione LT di JCV sono stati sottoposti all'amplificazione della regione TCR usando JRE1 e LP2 come primers esterni e RFOR e RREV come primers interni (amplificano un frammento di 358 bp). L'amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25 μ L contenenti: 10 pmol/ μ l di ogni primer, 0,2mM dNTPs, 1,5mM MgCl₂ e 2U di BioTaq con un appropriato buffer di reazione (Tris-HCl 100 mM, pH 8.3, KCl 500 mM). Nel primo step sono stati usati 5 μ L di DNA estratto da siero e da biopsia renale, e 5 μ L di urine. Nel secondo step sono stati invece usati 2,5 μ L di template. La reazione è stata eseguita con un Eppendorf Mastercycler gradient e dopo una prima denaturazione a 95°C per 5 min, fanno seguito 35 cicli composti da: denaturazione a 95°C per 40 sec; appaiamento per 40 sec a 61°C nel primo step e 58°C nel secondo step; estensione a 72°C per 40sec. I cicli sono terminati con un'estensione finale di 5 min a 72°C.

Tutti i DNA amplificati sono stati analizzati per corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%, e visualizzati usando la colorazione con etidio bromuro.

- **SEQUENZIAMENTO**

I frammenti amplificati risultati positivi per la regione TCR sono stati separati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3%; le bande comprese tra le 200 e le 400 bp sono state tagliate e raccolte. L'estrazione e la purificazione del DNA amplificato è stata eseguita con un kit commerciale (PCR clean-up gel extraction, NucleoSpin® Macherey-Nagel, Germania), basato sullo scioglimento dell'agar che racchiude il DNA mediante opportuno reagente di dissolvimento, seguito dal legame del DNA alla membrana di silice mediante centrifugazione a 14000 rpm per 1 minuto. Il DNA viene successivamente lavato con buffer di lavaggio ed eluito dalla membrana con buffer di eluizione in un volume finale di 30 µL e conservato a -20°C.

La reazione di sequenza sulla TCR è stata preparata utilizzando il Big Dye Version 2.0 Terminator cycle sequencing kit (Applied Biosystems, Monza, Italia), con il primer a una concentrazione finale di 3,2 pmol/µL, in un volume totale di 20 µL. La reazione prevede 25 cicli di 10 sec ciascuno a 96°C, 5 sec a 50°C e 4 min a 60°C. I prodotti di reazione sono stati purificati usando Centri-Sep Spin Columns (Princeton Separation, Adelphia, NJ, USA): è un sistema basato sulla reidratazione mediante acqua DNasi free e RNasi free delle colonnine almeno 1 h prima del loro impiego, una prima centrifugazione a 3200 RPM per 2 minuti rimuove l'acqua in eccesso, la sequenza viene posta sulla colonna e centrifugata per 3200 rpm per 2 minuti, l'utilizzo del concentratore (Concentrator 5301, Eppendorf) permette la liofilizzazione della sequenza purificata e la sua risospensione in 10 µL di formamide.

Il DNA è stato sequenziato usando un autocampionatore a 16 capillari (ABI-Prism 3100, Applied Biosystems, Monza, Italia).

Le sequenze sono state analizzate tramite Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponibile sul sito della National Centre of Biotechnology Information degli Stati Uniti (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

- **TEST STATISTICO**

L'analisi statistica è stata eseguita utilizzando il test esatto di Fisher, in quanto i valori ottenuti risultano troppo bassi per eseguire un test del χ^2 . Valori <0,05 sono considerati significativi.

RISULTATI

CAMPIONI DI URINE

ESAME CITOLOGICO

L'esame citologico di campioni urinari ha evidenziato presenza di decoy cells in 48 campioni (48/70, 68,5%) nel gruppo A e in 104 campioni (104/682, 15,2%) nel gruppo B. Il numero di campioni positivi per ciascun paziente variava da 1 (caso 1) a 8 (caso 2) nel gruppo A e da 1 a 3 nel gruppo B. Un alto numero di decoy cells (+++) è stato identificato in 21 campioni (21/48, 44%) nel gruppo A e in 19 campioni (19/104, 18%) nel gruppo B; un basso numero (+) in 17 campioni (17/48, 35%) del gruppo A e in 63 (70/104, 61%) del gruppo B; una carica intermedia (++) è stata identificata in 10 campioni (10/48, 21%) del gruppo A e in 22 campioni (22/104, 21%) nel gruppo B (tabella 2).

	+	++	+++
gruppo A	17 (35%)	10 (21%)	21 (44%)
gruppo B	63 (61%)	22 (21%)	19 (18%)
p*	p=0,005	NS	p<0,001

TABELLA 2 – Esame citologico dei campioni di urina dei gruppi A e B, con relativi valori di presenza di decoy cells
* test di Fisher

INDAGINE MOLECOLARE

- Nested PCR

L'amplificazione della regione LT di PVs mediante nPCR, ha consentito di identificare DNA virale in 68 campioni (68/70, 97,1%) nel gruppo A e in 242 campioni (242/682, 35,5%) nel gruppo B; la diagnosi citologica di infezione da PV è stata confermata in 48 (48/48, 100%) e in 89 (89/104, 86%) campioni contenenti decoy cells rispettivamente nel gruppo A e nel gruppo B, solo in 15 (15/104, 14%) campioni appartenenti al gruppo B presentanti bassa carica di decoy cells non hanno mostrato infezione da Polyomavirus; inoltre sequenze genomiche di PV sono state identificate in 19 campioni decoy cells negativi nel gruppo A e in 153 campioni nel gruppo B. Per quanto riguarda i virus identificati, nel gruppo A, 46 campioni sono risultati BKV positivi (46/68,

67,6%) e inoltre sono state identificate 22 coinfezioni BKV-JCV (22/68, 32,4%); in nessun caso è stato identificato JCV (0/68, 0%). Nel gruppo B, 59 campioni sono risultati BKV positivi (59/242, 24,4%), 132 JCV (132/242, 54,5%) e 48 coinfezioni BKV-JCV (48/242, 19,9%) (tabella 3). Da segnalare inoltre che un paziente mostrava coinfezione JCV-BKV-SV40 in 3 campioni urinari (3/242, 1,2%) (Figura 4).

TCR è stata amplificata in tutti campioni positivi alla regione LT di entrambi i gruppi. Successivamente è stata eseguita analisi di sequenza su tutti gli isolati con lunghezza compresa tra 200 e 400 bp allo scopo di includere possibili grosse delezioni o duplicazioni in relazione alla lunghezza dell'archetipo (356 bp). Pertanto sono stati sequenziati complessivamente 107 frammenti di DNA virale nel gruppo A e 610 nel gruppo B.

	BKV	JCV	BKV-JCV
gruppo A	46 (67,6%)	0	22 (32,4%)
gruppo B	59 (24,4%)	132 (54,5%)	48 (19,9%)
p*	p=0,001	NS	NS

TABELLA 3 – Genotipi dei Polyomavirus identificati nei campioni di urina mediante nPCR

*test di Fisher

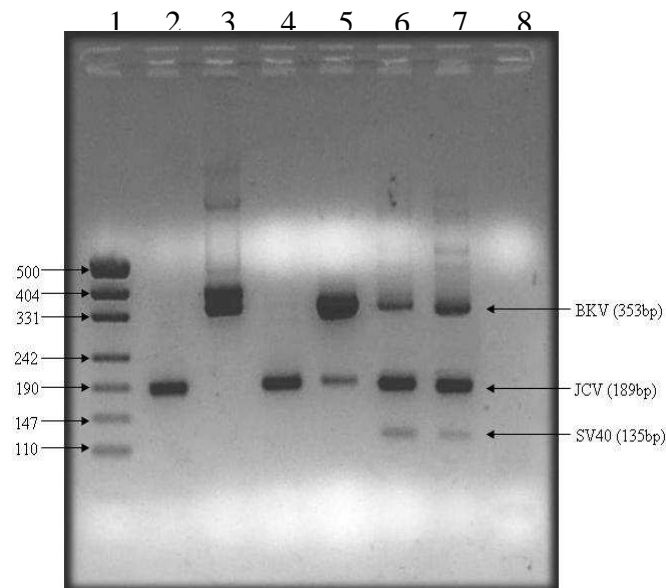


FIGURA 4

Corsa elettroforetica su gel di agarosio della regione LT di polyomavirus effettuata su campioni di urina.

Lane 1: marker di peso molecolare

Lane 2-3-4-5-6-7: campioni di urina

Lane 8: controllo negativo di PCR

- Analisi di sequenza

L'analisi di sequenza di TCR dei campioni appartenenti al gruppo A ha consentito di identificare 0 isolati (0/107, 0%) con sequenze TCR non riarrangiate e 85 con varie tipologie di riarrangiamento genomico (85/107, 79,4%) .

Più in dettaglio sono state osservate sostituzioni di singole basi nucleotidiche (38/85, 44,7%) e i seguenti grossi riarrangiamenti (47/85, 55,3%):

- completa delezione del blocco S
- parziale delezione del blocco P
- parziale delezione del blocco Q
- parziale delezione del blocco P, parziale duplicazione del blocco P e completa duplicazione del blocco Q
- parziali o complete delezioni e duplicazioni di tutti i blocchi
- inserzione di 8 paia di basi nel blocco P in BKV 128-1

Le caratteristiche citologiche (ovvero presenza-assenza di DC e loro carica) sono state correlate con la presenza di riarrangiamenti genomici: le variazioni di sequenza si sono dimostrate indipendenti dalla presenza/assenza di decoy cells e dal loro numero cioè dal livello di replicazione virale.

L'analisi di sequenza di TCR relativa ai 610 frammenti di DNA virale appartenenti al gruppo B, ha consentito l'identificazione di 89 sequenze archetipo (89/610, 14,6%), 87 sostituzioni o delezioni di singole basi nucleotidiche (87/610, 14,3%), e 69 riarrangiamenti genomici (69/610, 11,3%).

Più precisamente sono stati identificati: gli archetipi BKV WW in 22 campioni e BKV AS in 9 campioni. e 58 archetipi JCV CY.

Le sostituzioni e le delezioni di singole basi nucleotidiche appartengono a 6 campioni BKV WW e 13 BKV WWT, a 4 campioni BKV 128-1 risultati confetti BKV-JCV e a 65 campioni JCV positivi.

I riarrangiamenti che interessano la regione TCR di BKV hanno evidenziato due tipologie di "alterazioni": parziale delezione del blocco P, parziale ripetizione dei blocchi P e Q e, in particolare, inserzione di 8 paia di basi nel blocco P per i campioni BKV 128-1. Per quanto riguarda JCV, sono stati osservati:

- ripetizione parziale del blocco F
- ripetizione parziale dei blocchi D e E
- ripetizione del blocco C
- ripetizione del blocco D

- ripetizioni parziali e separate del blocco C, inserzioni (nel blocco B e C) e una sostituzione di una singola base nucleotidica

I 5 frammenti isolati (5/610, 0,9%) del paziente presentante coinfezione BKV-JCV-SV40 hanno identificato presenza di sostituzioni e delezioni di singole basi nucleotidiche.

Sui restanti 360 frammenti isolati non è stato possibile eseguire l'amplificazione della regione TCR (360/610, 59,0%)³³.

Anche nel caso dei pazienti appartenenti al gruppo B, le caratteristiche citologiche di ogni campione sono state correlate con i riarrangiamenti genomici e le variazioni di sequenza si sono dimostrate indipendenti dalla presenza/assenza di decoy cells e dal loro numero.

CAMPIONI DI SIERO

Indagine molecolare

- Nested PCR

La regione LT di PVs è stata amplificata in 36 campioni di siero nel gruppo A (36/63, 57,1%), e in 24 nel gruppo B (24/678, 3,5%). Nel gruppo A sono stati identificati 19 BKV (19/36, 52,8%) e 17 coinfezioni BKV-JCV (17/36, 47,2%) mentre nel gruppo B 10 BKV (10/24, 41,7%), 3 JCV (3/24, 12,5%) e 11 coinfezioni BKV-JCV (11/24, 45,8%) (tabella 4).

Nei campioni del gruppo A, la regione TCR di BKV è stata amplificata in 36 (36/36, 100%) dei casi LT positivi, per un totale di 50 frammenti sequenziati, mentre nei campioni del gruppo B è stata amplificata BKV in 19 (19/24, 79,2%) e JCV in 3 (3/24, 12,5%); Per il gruppo B sono stati isolati un totale di 30 frammenti.

	BKV	JCV	BKV-JCV
gruppo A	19 (52,8%)	0	17 (47,2%)
gruppo B	10 (41,7%)	3 (12,5%)	11 (45,8%)
p*	NS	NS	NS

TABELLA 4 - Genotipi dei Polyomavirus identificati nei campioni di siero mediante nPCR

* test di Fisher

- **Analisi di sequenza**

Nel gruppo A l'analisi di sequenza ha evidenziato 1 sequenza archetipo (1/50, 2%), WWT. Trenta campioni hanno mostrato riarrangiamenti complessi (30/50, 60%), mentre 15 campioni hanno presentato singole mutazioni puntiformi (15/50, 30%). Riarrangiamenti più frequenti sono stati: parziale delezione dei blocchi Q e R; parziale delezione del blocco P; parziale ripetizione del blocco S; parziale delezione del blocco R, parziale duplicazione dei blocchi P e Q; inserzione di 8 paia di basi nel blocco P per i genotipi BKV 128-1.

Nel gruppo B l'analisi di sequenza ha evidenziato la presenza di 5 genotipi archetipi di BKV (3 WWT e 2 BKV AS) (5/30, 16,6%) e di un archetipo JCV CY (1/30, 3,3%). Inoltre riarrangiamenti della regione TCR di BKV sono stati evidenziati in 11 frammenti isolati (11/30, 36,6%) e 5 sostituzioni nucleotidiche (5/30, 16,6%). L'analisi di sequenza sui frammenti di JCV ha mostrato 2 grossi riarrangiamenti (2/30, 6,7%).

Per i restanti frammenti isolati non è stato possibile eseguire l'analisi di sequenza (6/30, 20%)³³.

BIOPSIE RENALI

Istologia ed immunoistochimica

Durante il periodo di studio nel gruppo A sono state eseguite 19 biopsie renali, 11 delle quali presentavano criteri istologici ed immunoistochimici di PAN (11/19, 57,9%). Sulla base dei criteri proposti da Hirsch³, 2 biopsie sono state classificate come PAN stadio A, 6 stadio B e 3 in stadio C. In particolare, il caso 2 presentava un danno renale progressivo: le prime due biopsie sono state classificate come stadio B, mentre la terza (ottenuta 7 mesi dopo) risultava in stadio C a seguito del danno tubulo-interstiziale progressivo e della successiva fibrosi cicatriziale.

Le 8 biopsie senza evidenza di PAN mostravano problematiche connesse a patologie da trapianto: rigetto acuto interstiziale (3 campioni) e tossicità acuta da farmaci (5 campioni).

Nello stesso periodo di studio sono state eseguite nel gruppo B 104 biopsie renali che hanno evidenziato condizioni di normalità in 8 campioni (8/104, 7,7%) e i restanti 96 hanno mostrato condizioni patologiche, quali: rigetto cronico, rigetto acuto interstiziale, rigetto acuto vascolare, tossicità da farmaci, aterosclerosi, necrosi tubulare acuta e altre ancora (tabella 5).

Indagine molecolare

L'indagine molecolare su DNA estratto da tessuto renale è stata eseguita nei soli pazienti con PAN.

L'amplificazione della regione LT ha evidenziato DNA di PV in 13 campioni, 11 dei quali appartenenti a biopsie renali con PAN e 2 corrispondente a biopsia renale con tossicità acuta da farmaci.

Per quanto riguarda i genotipi, BKV è stato identificato in 8 campioni (8/13, 61,5%) e coinfezione BKV-JCV in 5 (5/13, 38,5%).

La regione TCR di BKV è stata amplificata in 13 campioni (13/13, 100%) e un totale di 17 frammenti sono stati sequenziali.

L'analisi di sequenza non ha rivelato BKV archetipi (0/17, 0%). Sono stati identificati 6 frammenti di DNA riarrangiati (6/17, 35,3%); il riarrangiamento più frequente è risultato essere una inserzione di 8 paia di basi nel blocco P nei campioni BKV 128-1. Sono state inoltre trovate sostituzioni nucleotidiche in 7 frammenti (7/17, 41,2%). Sui restanti frammenti isolati non è stato possibile eseguire analisi di sequenza (4/17, 23,5%)³³.

N°campioni	Condizione patologica
8	normale
7	rigetto cronico
7+1*	rigetto acuto interstiziale
1*+1**	rigetto acuto vascolare
35	tossicità da farmaci
9+15*+2**	aterosclerosi
9+2*	necrosi tubolare acuta
8+1*	altro

Legenda: *=un'altra patologia elencata
**=altre due patologie elencate

TABELLA 5 – Condizione patologica dei pazienti che non hanno sviluppato PAN

DISCUSSIONE

La nefropatia da Polyomavirus (PAN), istologicamente definita da una infezione selettiva delle cellule tubulari renali e/o di cellule epiteliali embriologicamente connesse (cellule parietali della capsula di Bowman), associata a un infiltrato linfoide e plasmacellulare interstiziale di grado variabile, è recentemente emersa come importante complicanza in soggetti portatori di trapianto renale. La frequenza di tale patologia varia a seconda degli studi tra il 2 e il 7%, e l'importanza del

suo riconoscimento risiede nel fatto che i segni e i sintomi di tale patologia non sono specifici ma sovrapponibili a quelli del rigetto acuto interstiziale, e richiedono un approccio terapeutico opposto (riduzione della immunosoppressione nel caso della PAN, aumento nel caso del rigetto interstiziale). La storia naturale della infezione da PV è sufficientemente nota: JC e BK virus infettano la popolazione umana con frequenza molto elevata, quindi dopo una fase viremica si latentizzano in organi bersaglio (sistema nervoso centrale, rene e vie escretrici urinarie) per riattivarsi in seguito a condizioni immunosoppressive. A seconda del grado e della tipologia dell'immunosoppressione si possono avere varie condizioni patologiche legate alla riattivazione dell'infezione e al conseguente danno litico prodotto sulle cellule bersaglio: nella sindrome da immunodeficienza acquisita frequente è la riattivazione a livello del sistema nervoso centrale con conseguente leucoencefalopatia progressiva multifocale (PML), nella gravidanza e in altre condizioni di immunosoppressione minore si osserva generalmente un quadro di cistite o ureterite auto-limitante con eliminazione urinaria intermittente di decoy cells. Del tutto peculiare è il danno renale indotto dalla riattivazione-prevalentemente anche se non esclusivamente di BK virus- in corso di terapia immunosoppressiva per trapianto renale. Nei soggetti trapiantati di rene, infatti, a differenza che in altre patologie questi virus, come detto, inducono un danno selettivo a carico del microambiente tubulo-interstiziale, ma mentre tale condizione patologica è relativamente rara la riattivazione dell'infezione virale nel distretto escretore urinario è assai più frequente. La diagnosi di PAN richiede necessariamente una biopsia renale sulla quale sia gli effetti citopatici indotti dal virus (rilevabili morfologicamente), sia tecniche immunoistochimiche, ultrastrutturali o di ibridizzazione in situ, consentono una sicura definizione diagnostica. Molto importante, tuttavia, è la identificazione di PAN in stadio precoce, cioè prima che si instauri un danno tubulo-interstiziale irreversibile e per tale motivo sono state proposte metodiche di screening non invasive, quali l'esame citologico delle urine per la ricerca di decoy cells, e la ricerca mediante PCR di genoma virale su urine e sangue. L'utilizzo di queste ultime metodiche si è dimostrato molto sensibile ma scarsamente specifico di PAN in quanto la riattivazione di PV nei trapiantati di rene è risultata essere un evento molto frequente: alcune casistiche riportano una frequenza di riattivazione nelle vie escretrici urinarie fino al 70% della popolazione dei soggetti trapiantati di rene.

Un numero di fattori di rischio è stato suggerito per giustificare la discrepanza tra frequenza di PAN e frequenza di riattivazione virale. Essi includono fattori ospite-specifici (età avanzata, sesso maschile, presenza di anticorpi anti-BKV prima del trapianto), tipologia di farmaci immunosoppressori, fattori intrinseci all'organo trapiantato (ischemia, danno tossico o ripetuti episodi di ischemia), infezioni concomitanti (come HIV, CMV, JCV, SV40) e, finalmente, fattori legati all'assetto genomico di BK virus, capaci di condizionarne la capacità replicativa.

Quest'ultima è legata alla struttura genomica della sua regione regolatoria (TCR): questa regione è altamente variabile in tutti i membri della famiglia dei PV ma in particolare nei tipi umani BKV e JCV, nei quali possono essere dimostrati multipli riarrangiamenti a seconda dell'organo bersaglio dell'infezione. Convenzionalmente, la struttura genomica non riarrangiata di BKV e JCV è stata definita *archetipo*, vari riarrangiamenti rispetto a questa struttura sono stati osservati in isolati virali da encefali, reni, sangue e tonsille umane indicando che peculiari riarrangiamenti organo o cellula specifici possono essere richiesti per consentire la crescita virale in differenti tessuti. Inoltre, come già riportato da vari autori^{9,12,34}, alcune sequenze genomiche contenute nella regione TCR (Sp1, NF1, GM-CSF, Ap1) sono fondamentali per la replicazione del DNA virale e per il controllo della trascrizione sia dei geni precoci sia di quelli tardivi virali. Inoltre alcuni studi^{35,36} hanno evidenziato che riarrangiamenti di questi siti possono modificare l'efficienza della replicazione virale. Tuttavia, ad eccezione di pochi lavori, per lo più in forma di "case-report" o effettuati su casistiche molto limitate di soggetti portatori di trapianto di rene, la quasi totalità di questi studi è stata effettuata in vitro e pertanto non è attualmente noto se specifiche alterazioni della sequenza di tali regioni genomiche possano in qualche modo modificare la patogenesi o la gravità della PAN.

Nel nostro studio abbiamo analizzato campioni di sangue, urine e di tessuto renale in soggetti portatori di trapianto di rene, studiando complessivamente 226 pazienti.

La frequenza di PAN nella nostra casistica è risultata del 3,5%, sovrapponibile quindi a quella delle casistiche più numerose³⁷. Confrontando i risultati dell'esame citologico tra le due popolazioni (gruppo A, PAN; gruppo B, non PAN) si conferma - in ciò avvalorati da evidenze statistiche- che i pazienti che hanno sviluppato PAN presentano un più elevato numero di decoy cells nelle urine - e quindi indirettamente una più elevata viruria - e un più frequente genotipo BKV ($p=0.001$). Per quanto riguarda il confronto tra i dati sierologici, appare evidente che la frequenza di identificazione di PV nel sangue è molto maggiore nei soggetti che hanno sviluppato PAN ($p=0.002$), rispetto al gruppo non PAN anche se in questo caso non sussiste una differenza statisticamente significativa tra i genotipi virali identificati. Anche questi dati confermano quanto riportato in letteratura e cioè che il danno renale da PV si associa a elevata escrezione urinaria di decoy cells - interpretabili quindi come cellule di origine tubulare infettate dai virus e di conseguenza eliminate nelle vie urinarie - e viremia da PV. Quest'ultimo dato è di più dubbia interpretazione in quanto nella PAN la riattivazione virale rappresenta comunque un fattore locale, limitato a un organo; si presume che la viremia sia causata da un danno microvascolare renale e dalla messa in circolo di particelle virali eliminate da cellule epiteliali liticamente infettate³⁸.

Nel nostro studio sono state dettagliatamente esaminate le sequenze genomiche della regione TCR di tutti i PV isolati da campioni di urine, sangue e tessuto renale (questi ultimi nel solo gruppo dei soggetti PAN), per identificare se la presenza e/o specifiche alterazioni della sequenza genomica virale possano modificare la capacità replicativa virale e determinare una maggiore patogenicità con conseguente danno renale.

Il primo dato che emerge è che modificazioni più o meno rilevanti nella sequenza genomica rappresentano eventi relativamente frequenti essendo state riscontrate in percentuale variabile nel sangue, urine e nel tessuto renale. Tali modificazioni consistono in sostituzioni o delezioni di singole basi nucleotidiche o, in una discreta percentuale dei casi, in significativi riarrangiamenti rispetto alla sequenza archetipo.

Nel nostro studio abbiamo correlato la presenza e la tipologia di riarrangiamenti genomici nelle urine di JCV e BKV con segni morfologici e livelli di replicazione virale (cioè con la presenza e il numero di decoy cells nelle urine) e questo sia all'interno dei singoli gruppi che come confronto tra le due popolazioni.

I risultati sembrano indicare che non sussistono relazioni tra presenza e tipo di riarrangiamento e livelli di replicazione virale. Ad esempio i casi numero 3 e 4 dei soggetti con PAN (nei quali sono stati identificati solo archetipi) mostravano una massiva escrezione di decoy cells. Inoltre la presenza di riarrangiamenti in campioni negativi per decoy cells e in soggetti che non hanno sviluppato PAN indicano che in questi casi tali riarrangiamenti incorrono in caso di infezione delle basse vie urinarie.

L'analisi della regione regolatoria su DNA estratto da biopsie renali in soggetti PAN ha evidenziato una elevata frequenza complessiva di sequenze riarrangiate, tuttavia nei casi numero 2,3,4 e 6 sono state identificate solo sequenze archetipo pure in presenza di segni istologici di PAN. Inoltre nel nostro studio gli stadi istologici di PAN (che valutano indirettamente l'intensità replicativa virale nel microambiente renale) non mostrano correlazione con presenza e tipo di riarrangiamenti genomici. Questi ultimi dati riflettono quelli riportati da Randhawa e collaboratori¹² che, in uno studio recente, comparando la carica virale nel sangue, urine e tessuto renale, con le variazioni di sequenza di TCR di BKV in 26 biopsie renali trovarono che le più comuni variazioni furono sostituzioni nucleotidiche in siti di legame per fattori di trascrizione, mentre riarrangiamenti più consistenti furono osservati solo in cinque casi. Gli Autori conclusero che le variazioni architetturali della regione TCR non rappresentano un requisito fondamentale per lo sviluppo di PAN.

Nei campioni di sangue i riarrangiamenti genomici virali sono stati identificati con elevata frequenza nei soggetti del gruppo A, maggiore rispetto a quanto osservato nelle urine. L'analisi

dei dati di letteratura non evidenzia studi analoghi su popolazioni di soggetti trapiantati di rene; Dolei e collaboratori³⁹ hanno effettuato una simile valutazione su soggetti sani, donatori di sangue, rilevando la presenza di BKV archetipo nel 22% dei casi, mentre Dorries et al.⁴⁰, Chatterjee et al.⁴¹ hanno documentato la presenza di modificazioni di singole basi nucleotidiche e di piccole delezioni di sequenza nel sangue periferico in una popolazione di soggetti donatori di sangue suggerendo che tali modificazioni potrebbero essere correlate con un'eterogenità intrinseca del virus circolante nella popolazione. L'evidenza di riarrangiamenti significativi nei nostri campioni potrebbe suggerire due spiegazioni alternative: ceppi virali altamente riarrangiati potrebbero passare dal tessuto renale al sangue periferico indicando una elevata capacità infettiva virale o un più severo danno renale causato da replicazione virale potrebbe essere seguito da un passaggio del virus nel torrente circolatorio. La comparazione tra i genotipi isolati nel rene e i corrispondenti isolati nel sangue degli stessi pazienti non confermano quest'ultima ipotesi; tuttavia il nostro metodo (nPCR), che identifica solo i ceppi virali prevalenti, non consente di escludere che ceppi meno rappresentativi (possibilmente correlati a un danno renale più severo, ma identificabili solo con tecniche di clonaggio) potrebbero essere non ancora identificati. A tale scopo sarebbe necessario effettuare tecniche di clonaggio genico che consentirebbero la identificazione di tutti i frammenti virali presenti in un determinato campione.

Nella nostra casistica emerge inoltre, che la PAN è associata in maniera pressoché esclusiva alla infezione da BKV: infatti in nessun campione di tali soggetti è stata osservata la presenza di JCV in forma isolata e raramente associata a coinfezione con BKV. Al contrario, JCV è stato frequentemente isolato nei campioni di sangue e di urine dei soggetti che non avevano sviluppato PAN.

Il ruolo di JCV nello sviluppo della PAN è tuttora controverso: Wen et al.⁴² hanno riportato un caso di PAN in cui JCV è stato isolato da una biopsia renale; tale risultato non è stato confermato da altri autori. La presenza di tale virus nella nostra e in altre casistiche associato a coinfezione con BKV potrebbe suggerire un suo ruolo come cofattore nello sviluppo di PAN anche se tale ipotesi va confermata su casistiche più ampie. L'analisi di sequenza di JCV isolati dal gruppo B evidenzia una discreta frequenza di riarrangiamenti nei campioni di urine e sangue senza che tuttavia questo si associ ad un incremento della capacità replicativa virale. Analoghi studi effettuati su pazienti con PML hanno invece evidenziato che ceppi di JCV isolati da tessuto cerebrale mostrano specifici riarrangiamenti della regione regolatoria (così detti ceppi PML-like) indicando che queste variazioni di sequenza sono necessarie per lo sviluppo della patologia. Questo suggerisce che la patogenesi della PAN è differente rispetto a quella della PML nella quale

il riarrangiamento genomico virale rappresenta un evento di importanza critica o per il tropismo cellulare o per la capacità replicativa virale.

Un altro dato che ci sembra importante sottolineare, che da un'analisi dettagliata della letteratura non sembra essere precedentemente riportato, è la presenza di sequenze genomiche di SV40 associate a coinfezione JCV-BKV osservate in due campioni di urina appartenenti allo stesso paziente. Come noto, SV40 rappresenta l'analogo nella scimmia di JCV e BKV e di esso è noto il potere trasformante negli animali da laboratorio e il suo presunto coinvolgimento in alcuni tumori umani, tra i quali il mesotelioma. Se tale virus possa giocare un qualche ruolo nel danno renale nei soggetti trapiantati o essere coinvolto nello sviluppo di neoplasie delle vie urinarie non è ovviamente possibile determinarsi nei limiti del nostro studio.

CONCLUSIONE

I risultati del nostro lavoro, quindi, confermano che BKV rappresenta l'agente eziologico fondamentale nella PAN, un'elevata carica di decoy cells, associata a presenza di viremia, costituisce un elemento prognosticamente significativo per lo sviluppo della PAN e, infine, la presenza e il tipo di riarrangiamenti genomici della regione regolatoria non sembrano influenzare in maniera rilevante la capacità replicativa virale e l'entità del danno renale in corso di PAN.

Va considerato comunque che le metodologie utilizzate nel nostro studio consentono la identificazione di isolati virali prevalenti e che quindi non può essere completamente escluso che isolati virali meno rappresentati e con riarrangiamenti genomici più specifici possano essere associati a una più efficiente capacità replicativa. L'ulteriore progetto di questo studio prevede l'utilizzo di tecniche di clonaggio genico da effettuarsi in prima istanza sugli isolati virali estratti da biopsie mostranti segni istologici di PAN.

BIBLIOGRAFIA

1. Knowles, W.A. (2001) *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspectives*, 1st Ed., Wiley-Liss, New York, NY 45-51
2. Zu Rhein, G.M. (2001) *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspectives*, 1st Ed., Wiley-Liss, New York, NY 11-23
3. Hirsch, H.H. and Steiger J. (2003) *Lancet Infect.* **3**, 611-623
4. Cole, C.N. and Cozen, S.D. (2001) *Fields Virology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, PA 2141-2166

5. Shah, K.V. (2001) *Fields Virology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, PA 2175-2196
6. Ault, G.S. and Stoner, G.L. (1993) *J. Gen. Virol.* **74**, 1499-1507
7. Markowitz, R.B. and Dyan, W.S. (1988) *J. Virol.* **62**, 3388-3398
8. Moens, U., Johansen, T., Johnsen, J.I., Seternes, O.M., and Traavik, T. (1995) *Virus Gen.* **10**, 261-275
9. Yogo, Y., Yitamura, T., Sugimoto, C., Ueki, T., Aso, Y., Hara, K. and Taguchi, F. (1990) *J. Virol.* **64**, 3139-3143
10. Yogo, Y. and Sugimoto, C. (2001) *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspectives*, 1st Ed., Wiley-Liss, New York, NY 127-148
11. Kim, H.S., Henson, Henson, J.W. and Frisque, R.J. (2001) *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspectives*, 1st Ed., Wiley-Liss, New York, NY 73-114
12. Randhawa, P., Zygmunt, D., Shapiro, R., Vats, A., Weck, K., Swalsky, P. and Finkelstein, S. (2003) *Kidney Int.* **64**, 743-747
13. Barksh, F.K., Finkelstein, S.D., Swalsky, P.A., Stoner, G.L., Ryschkewitsch, C.F. and Randhawa, P. (2001) *Am. J. Kid. Dis.* **38**, 354-365
14. Goudsmit, J., Wertheim-van Dillen, P., Van Strien, A. and Van der Noordaa, J. (1982) *J. Med. Virol.* **10**, 91-99
15. Monaco, M.C.G., Jensen, P.N., Hou, J., Durham, L.C. and Major, E.O. (1998) *J. Virol.* **72**, 9918-9923
16. Posatti, L., Bartolotta, E. (1981) *Acta Virol* **25**, 254-255
17. Brown, P., Tsasi, T., Gajdusek, D.C. (1975) *Am J Epidemiol* **102**, 331-340
18. Pietropaolo, V., Di Taranto, C., Degener, A.M., Jin, L., Sinibaldi, L., Baiocchini, A., Melis, M. and Orsi, N. (1998) *J. Med. Virol.* **56**, 372-376
19. Rziha, H.J., Bornkamm, G.W. and Zur Hausen, H. (1978) *Med. Microbiol. Immunol.* **165**, 73-81
20. Boldorini, R., Veggiani, C., Barco, D. and Monga, G. (2005) *Arch. Patol. Lab. Med.* **129**, 69-73
21. Ferrante, P., Caldarelli-Stefano, R., Omodeo-Zorini, E., Vago, L., Boldorini, R. and Costanzi, G. (1995) *J. Med. Virol.* **47**, 219-225
22. Dorrei, K. (2001) *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspectives*, 1st Ed., Wiley-Liss, New York, NY 197-222
23. Delbue, S., Pagani, E., Guerini, F.R., Agliardi, C., Mancuso, R., Borghi, E., Rossi, F., Boldorini, R., Veggiani, C., Car, P.G. and Ferrante, P. (2005) *J. Med. Virol.* **77**, 447-454

24. White, K.M. and Khalili, K. (2004) *Virology* **324**, 1-16
25. Binet, I., Nickeleit, V., Hirsch, H.H., Prince, O., Dalqueen, P., Gudat, R., Mihatsch, J.M., Tiel, G. (1999) *Transplantation* **67**, 918-922
26. Boubenider, S., Hiesse, C., Marchand, S., Hafi, A., Kriaa, F. and Charpentier, B. (1999) *J. Nephrol.* **12**, 24-29
27. Nickeleit, V., Hirsch, H.H., Binet, I., Gudat, F., Prince, O., Dalquen, P., Thiel, G., Mihatsch, M.J. (1999) *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**, 1080-1089
28. Randhawa, P., Baksh, F., Aoki, N., Tschirhart, D., Finkelstein, S. (2001) *Transplantation* **9**, 1300-1303
29. Ahuja, M., Cohen, E.P., Dayer, A.M., Kampalath, B., Chang, C.C., Bresnahn, B.A. and Hariharan, S. (2001) *Transplantation* **71**, 896-899
30. Koss, L. (1979) *Diagnostic cytology and its histopathologic bases*, 3rd Ed., Lippincott JB, Philadelphia, PA 711-741
31. Nickeleit, V., Singh, H.K., Mihatsch M.J. (2006) *Adv Exp Med Biol* **577**, 190-200
32. Agostini, H.T., Brubaker, G.R., Shao, J., Levin, A., Ryschkewitsch, C.F., Blattner, W.A., Stoner, G.L. (1995) *Arch Virol* **140**, 1919-1934
33. Bressollette-Bodin, C., Coste-Burel, M., Hourmant, M., Sibille, V., Andre-Garnier, E., Imbert-Marcille, M. (2005) *Am J Transplant* **5**, 1926-33
34. Moens, U. And Rekvig, O.P. (2001) *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspectives*, 1st Ed., Wiley-Liss, New York, NY 359-408
35. Beckmann, A.M., Shan, K.V., Mounts, P. (1985) *J Med Virol* **15**, 239-250
36. Chen, C.H., Wen, M.C., Wang, M., Lian, J.D., Wu, M.J., Cheng, C.H., Shu, K.H., Chang, D. (2001) *J Med Virol* **64**, 82-88
37. Randhawa, P., Zygmunt, D., Shapiro, R., Vats, A., Weck, K., Swalsky, P., Finkelstein, S. (2003) *Kidney International* **64**, 743-747
38. Drachenberg, C.B., Papadimitriou, J.C., Wali, R., Cubitt, C.L., Ramos, E. (2003) *Am J Transplant* **3**, 1383-1392
39. Dolei, A., Pietropaolo, V., Gomes, E., Di Taranto, C., Ziccheddu, M., Spanu, M.A., Lavorino, C., Manca, M., Degener, A.M. (2000) *J Gen Virol* **81**, 1967-1973
40. Dorries, K., Vogel, E., Gunther, S., Czub, S. (1994) *Virology* **198**, 59-70
41. Chatterjee, M., Weyandt, T.B., Frisque, R.J. (2000) *J Med Virol* **60**, 353-362
42. Wen, M.C., Wang, C.L., Wang, M., Cheng, C.H., Wu, M.J., Chen, C.H., Shu, K.H., Chang, D. (2004) *J Med Virol* **72**, 675-678

ATTIVITA'FORMATIVA

- 10/01/2007, *Silenziamento genico mediante espressione di shRNA* – Prof.ssa P. DeFilippi
- 12/01/2007, *Autoantibodies in systemic sclerosis: from clinical subset to pathogenetic* – Prof. Chizzolini
- 17/01/2007, *Detection di mRNA mediante analisi statistica* – Prof. Caselle
- 19/01/2007, *Genetica e prevenzione dei tumori eredo-familiari di mammella e ovaio*, Ospedale Maggiore della Carità, Novara
- 24/01/2007, *Imaging mass spectrometry*, Ospedale Maggiore della Carità, Novara
- 01/02/2007, *Gene therapy strategies for phenylketonuria* – Prof. B. Thony
- 09/02/2007, *Vita, opere e miracoli dell'epatocita* – Prof. M. Tripodi
- 15/02/2007, *The long hand of the small RNAs reaches into several levels of gene regulation* – Prof. C. Cogoni
- 14/03/2007, *Protein microarrays development of new supports for improved sensitivity* - Dr. M. Cretich
- 16/03/2007, *Microarrays di tessuti: una strategia per identificare nuovi biomarcatori tumorali* – Dott.ssa M. Capra
- 16/03/2007, *Drosophila as a model for aging and cancer* – Dott. Bohmann
- 12/04/2007, *Relazione tra struttura e funzione delle proteine mediante analisi del protein data base* – Prof. Milanesio
- 19/04/2007, *Pathogenic viruses: smart manipulators of the interferon system* – Prof. O. Haller
- 16/05/2007, *Difetti genetici del pre-b cell receptor* – Prof. Ferrari
- 25/05/2007, *The regulation of hematopoietic stem cells by smad signalling* – Dott. Karlsson
- 28/05/2007, *Translating basic science into therapeutic strategies for shwachman diamond syndrome* – Dott. Ellis
- 01/06/2007, *Tumori gliali*, università di torino, torino
- 04/06/2007, *Sindromi autoinfiammatorie* – Prof. A. Martini
- 14/06/2007, *La genesi dei gliomi e i suoi risvolti prognostici e terapeutici* – Prof. Schiffer
- 21/06/2007, *Bioinformatics tools for the analyses of utrs and for the production of alternative splice site* – Prof. E. Mignone

SEZIONE 2:

CORSI FREQUENTATI (per ciascun anno del corso)

- Corso di statistica medica tenuto dal Prof. Corrado Magnani
- Corso di inglese tenuto dal Prof. Colin Erwing-Bell

CONGRESSI FREQUENTATI (elenco completo: denominazione congresso, sede, data)

- MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY OF CANCER, University of Birmingham, Department of Pathology, Division of Cancer Studies, Birmingham (UK), 19/02/2007 – 23/02/2007
- DIAGNOSTICA CITOLOGICA E MOLECOLARE NEL PERCORSO CLINICO DEI PAZIENTI CON CARCINOMA UROTELIALE, Università di Ferrara, Ferrara (IT), 10/05/2007
- PRIMO CONGRESSO INTERNAZIONALE SULLA RICERCA TRASLAZIONALE IN MEDICINA, Villa Contarini, Fondazione Ghirardi, Padova (IT), 10/06/2007 – 12/06/2007

COMUNICAZIONI A CONGRESSI (elenco completo: autori, titolo, denominazione congresso, sede, data)

A) *Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)*

B) *Altre comunicazioni*

ARTICOLI SCIENTIFICI PUBBLICATI NEL CORSO DEL DOTTORATO (elenco completo)

“Latent Human Polyomavirus Infection In Pregnancy: Investigation Of Possible Transplacental Transmission”, Amoruso E., Ribaldone R., Boldorini R., Veggiani C., Allegrini S., Miglio U., Surico N., Monga G. **Pathology**, in stampa.