

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



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

Relazione 3° anno

TITOLO:

**Ruolo dei riarrangiamenti genomici nella regione regolatoria virale e
delle mutazioni nella proteina capsidica di BK Virus nello sviluppo
della nefropatia associata a Polyomavirus**

Candidato: Miglio Umberto
Tutor: Prof. Renzo Boldorini

SEZIONE 1

RISULTATI SCIENTIFICI

INTRODUZIONE

I Polyomavirus sono agenti eziologici in grado di attaccare diverse specie animali, come per esempio il topo, il criceto, la scimmia e anche l'uomo. Questi virus vennero inizialmente classificati nella famiglia delle *Papovaviridae* a causa della loro struttura con capsidi icosaedrico simile ai Papillomavirus (anch'essi membri della stessa famiglia), osservata al microscopio elettronico al momento della loro scoperta (Figura 1). Successivamente vennero poi classificati come famiglia delle *Polyomaviridae*¹. Tra i Polyomavirus in grado di infettare l'uomo, i più studiati sono sicuramente i Polyomavirus hominis 1 e 2, meglio conosciuti con l'acronimo, rispettivamente, di BKV e JCV, derivante dalle iniziali dei pazienti in cui sono stati isolati per la prima volta nel 1971. BKV fu isolato per la prima volta da un laboratorio inglese in un campione di urina di un paziente portatore di trapianto di rene con stenosi ureterale da causa ignota: le indagini ultrastrutturali rivelarono la presenza di particelle virali icosaedriche, prive di envelope, del diametro di circa 45 nm². Nello stesso anno, in un altro laboratorio, furono studiati campioni cerebrali autoptici di soggetti deceduti per una malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale, ad esordio acuto-subacuto, rapidamente progressiva, chiamata *leucoencefalopatia multifocale progressiva* (PML): anche in questo caso si osservò la presenza di un virus con caratteristiche simili a quello osservato in Inghilterra³. Di recente scoperta sono invece i Polyomavirus KI (Karolinsk Institute) e WU (Washington University), strettamente correlati tra loro ed isolati da escreti respiratori e il Merkel Cell Polyomavirus descritto come probabile agente eziologico del carcinoma a cellule di Merkel⁴.

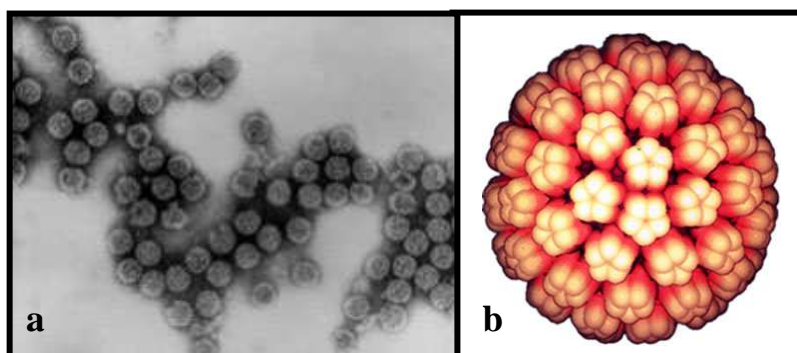


FIGURA 1

A) Fotografia al microscopio elettronico di SV40 (ingrandimento 10000).

B) Rappresentazione grafica 3D della struttura esterna dei Polyomavirus rappresentata dall' envelope formato nello strato esterno solo dalla VP.

Esiste inoltre un altro Polyomavirus il cui ospite naturale è la scimmia, ma che è stato osservato trovarsi anche nell'uomo; si tratta del virus vacuolizzante della scimmia, o SV40. SV40 è uno dei virus più studiati di cui si conosce sia l'intero genoma, sia il suo modo di interagire con la cellula ospite e sembra essere stato introdotto accidentalmente nell'uomo tramite la somministrazione di vaccini antipoliomielite contaminati tra il 1955 e il 1963; il vaccino veniva allestito in colture di cellule renali di scimmia in cui il virus era presente come contaminante e si suppone che, una volta inoculato nell'uomo, sia stato poi in grado di infettare nuovi individui⁵. Tuttavia, alcune osservazioni epidemiologiche su popolazioni accidentalmente infettate con vaccini antipoliomielite non hanno evidenziato apparenti legami del virus con l'insorgere di specifiche patologie. Recenti osservazioni hanno ipotizzato che esso possa prendere parte al processo di cancerogenesi umana soprattutto per ciò che riguarda l'insorgenza di mesoteliomi maligni^{6,7}.

Inizialmente BKV e JCV vennero classificati nella famiglia delle *Papovaviridae*, ma dopo essere stati sufficientemente caratterizzati furono classificati come famiglia delle *Polyomaviridae*. Essi sono virus privi di envelope del diametro di 40-45 nm (variabile in relazione ai mezzi di fissazione e di inclusione utilizzati per l'indagine ultrastrutturale) e DNA a doppia elica della lunghezza di circa 5300 paia di basi (bp)⁸. Strutturalmente il DNA genomico è racchiuso da un capside virale composto da 360 copie della proteina capsidica maggiore VP (viral protein) 1, che si organizza in pentameri legando le proteine capsidiche minori, VP2 e VP3⁷.

Il genoma virale è costituito da due regioni codificanti e una regione di controllo trascrizionale⁹, in dettaglio (Figura 2):

- regione precoce (Early region), codificante per una proteina tumore-associata, Large-T (LT), e una proteina dalla funzione non ancora completamente nota, small-t (t).
- regione tardiva (Late region), codificante per le proteine capsidiche VP1, VP2, VP3, e per l'agnoproteina, che si suppone essere coinvolta nell'assemblaggio del capside virale.
- regione di controllo trascrizionale (TCR), non codificante, posizionata tra le due regioni codificanti. Presenta siti di legame per fattori di trascrizione e, pertanto, riveste un ruolo chiave nella storia naturale dell'infezione.

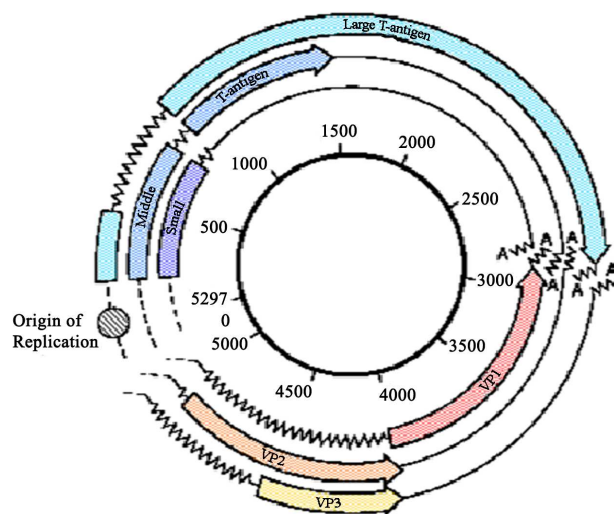


FIGURA 2

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 (VP1, VP2, VP3), che codifica in senso opposto.

La regione regolatoria di JCV è stata schematicamente suddivisa in 6 blocchi da *Ault e Stoner*¹⁰, convenzionalmente definiti A, B, C, D, E, F, ciascuno composto da un determinato numero di bp (A:25bp; B:23bp; C:55bp; D:66bp; E:18 bp; F:69bp). Analogamente *Moens et al*¹¹. Hanno suddiviso anche la regione TCR di BKV (O:124bp; P:68bp; Q:39bp; R:63bp; S:63bp).

TCR di entrambi i virus si è dimostrata essere conservata nella maggior parte dei casi, mantenendo cioè una sequenza conservata, con occasionali mutazioni puntiformi (sostituzioni, delezioni o inserzioni di singole basi nucleotidiche); queste sequenze sono state definite da *Yogo et al.*¹² 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'ospite¹³.

All'interno della regione TCR di BKV e JCV sono stati osservati siti di legame per fattori trascrizionali^{14,15} (Figura 3), 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 regolatrici¹⁴. 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.

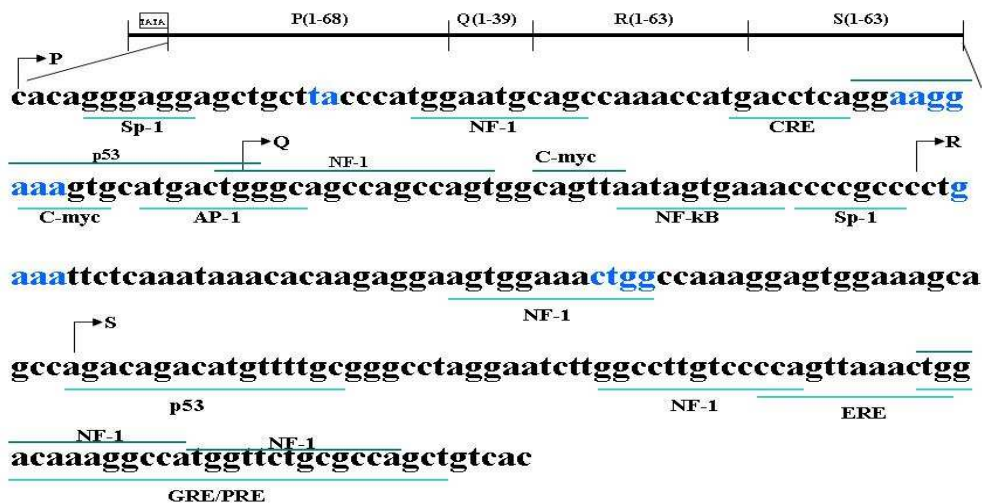


FIGURA 3

Rappresentazione schematica della regione regolatoria (TCR) BKV.

I numeri nelle parentesi indicano il numero di paia di basi presenti in ogni blocco. I nucleotidi polimorfici sono colorati in blu. I siti di legame con fattori di trascrizione sono segnati sopra la sequenza.

Similmente alla regione TCR, si suppone che anche mutazioni aminoacidiche nella sequenza proteica di VP1 potrebbero influenzare la capacità del virus di infettare con diverso tropismo le cellule bersaglio¹⁶; per questo motivo nell'ultimo decennio diversi studi si sono incentrati nel determinare e caratterizzare in dettaglio la struttura della proteina VP1, le proteine bersaglio presenti sulla cellula e il sito di legame con tali proteine^{17,18}. Le prime conoscenze riguardanti la

funzione di VP1 sono relative a SV40, il quale è stato osservato essere in grado di riconoscere le proteine del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC), presenti sulle cellule bersaglio. Successive analisi sui Polyomavirus umani hanno però evidenziato che VP1 di BKV e JCV non lega le molecole MHC, ma presenta un legame selettivo con oligosaccaridi leganti all’N-terminale una molecola di acido sialico^{18,19}.

La proteina VP1 è costituita da 362 aminoacidi, tradotti da una sequenze di circa 1086 nucleotidi presenti nella regione tardiva del genoma, e viene suddivisa in 5 loops: BC, DE, EF, GH e HI (Figura 4). La struttura terziaria di ogni monomero forma un “barile” β composto da filamenti β antiparalleli tra i quali si posizionano 3_{10} -eliche e α -eliche. Nella regione C-terminale il loop DE si inserisce in profondità nel monomero VP1 adiacente consentendo il legame con gli altri monomeri, formando infine un pentamero. La struttura capsidica viene completata attraverso l’N-terminale di ogni monomero che si inserisce in un pentamero adiacente, stabilizzando così la struttura del capside virale (Figura 5 A e B)²⁰.

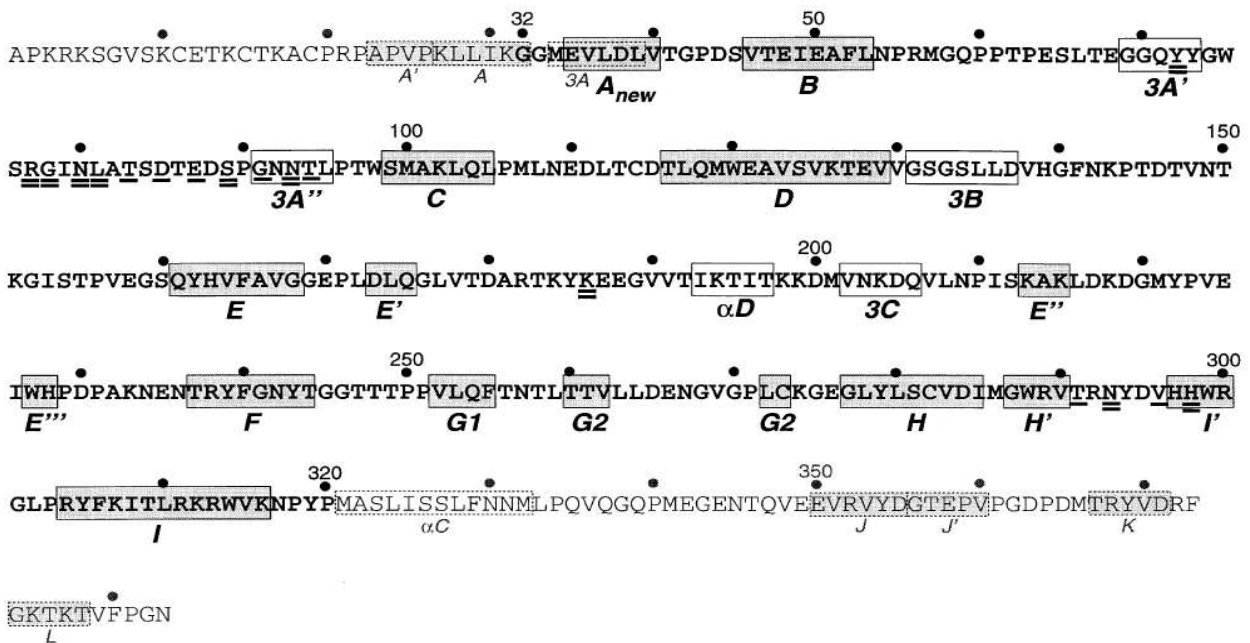
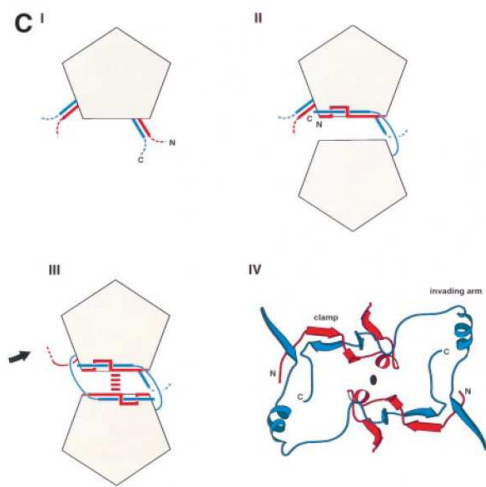
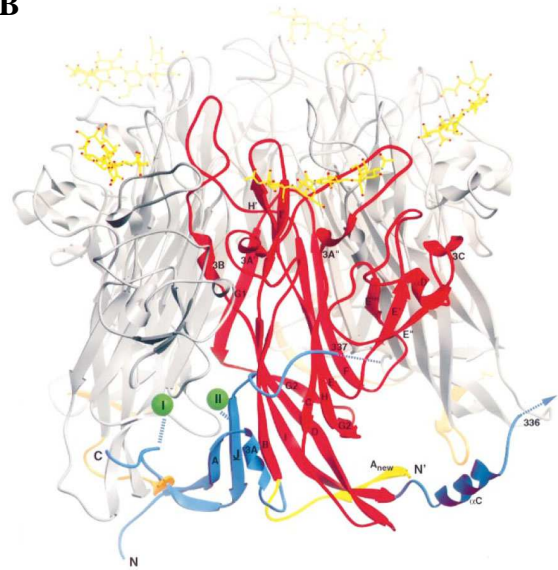
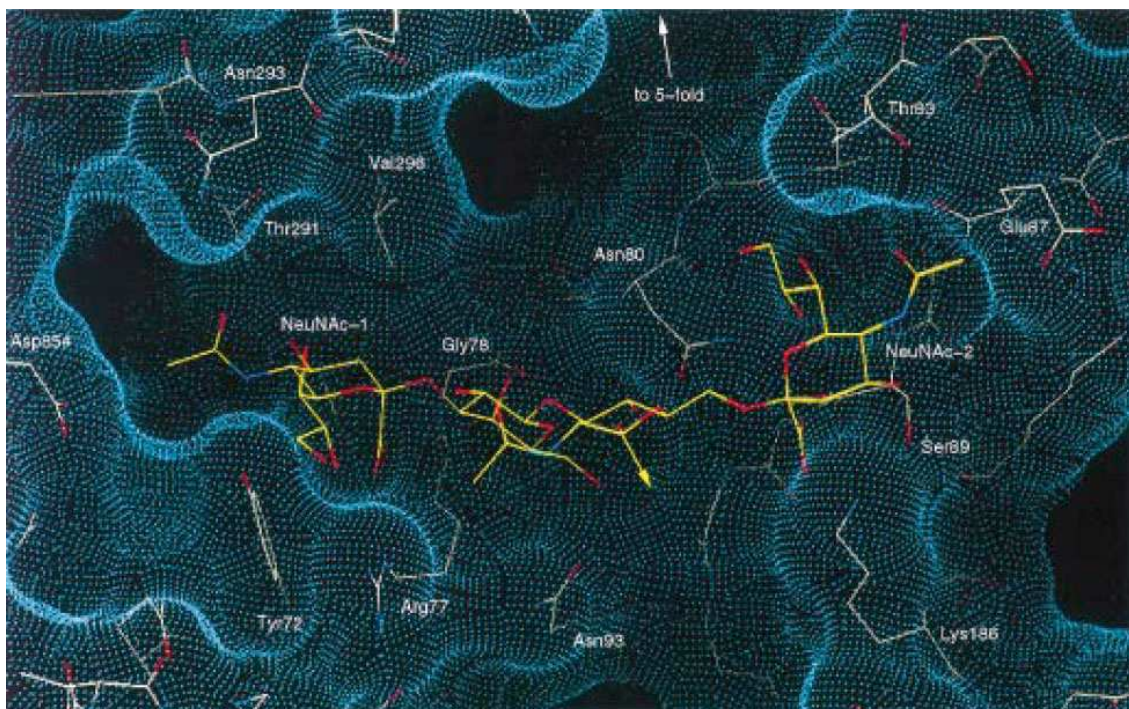


FIGURA 4

Sequenza regione VP1 con struttura secondaria determinata in relazione alla formazione dei legami idrogeno e le principali conformazioni di catena.

A**B****FIGURA 5**

- A- modello di legame tra i pentameri. I: pentamero libero; II: un braccio C-terminale (blu) invade il pentamero adiacente e si lega all’N-terminale (rosso); III: legame stabile tra due pentameri; IV: rappresentazione del legame stabile illustrato schematicamente al punto III.
- B- Pentamero completamente assemblato. In blu sono illustrati le braccia che “invadono” la molecola adiacente. Due ioni calcio (verde) aiutano a stabilizzare la particella formatasi

**FIGURA 6**

Superficie di legame della proteina VP1 in cui si lega la molecola di acido sialico (in giallo).

Studi in vitro utilizzando cellule Vero hanno dimostrato l'interazione tra VP1 e gangliosidi a cui è legata in posizione N-terminale una o più molecole di acido sialico. Low et al.²¹ hanno recentemente condotto uno studio trattando le cellule con neuroamidasi, un inibitore dell'acido sialico, e incubandole con BKV: il virus non era in grado di infettare le cellule. Successive analisi hanno confermato il legame tra la proteina VP1 e acido sialico e hanno permesso di identificare due particolare gangliosidi interessati nel legame: GD1b e GT1b. Un terzo ganglioside preso in considerazione, GM1, ha portato infezione se incubato con SV40 ma non con BKV, indicando che l'acido sialico legato in posizione α 2-8, mancante in GM1 ma presente in GD1b e GT1b, è essenziale per il legame con VP1. Il modello ad alta risoluzione proposto da Stehle et al.²⁰ ha mostrato che la superficie di legame di VP1 consiste in una tasca piana formata dai loop di foglietti β , nella quale si inserisce la molecola di acido sialico (Figura 6).

La sequenza aminoacidica di BKV interessata nel legare il ligando è compresa nella regione tra l'aminoacido 61 e l'aminoacido 83. Jin et al.²² hanno analizzato la sequenza nucleotidica di 69 bp codificante per questa regione, individuando polimorfismi nucleotidici caratteristici, che hanno permesso di classificare il virus in quattro principali gruppi sierologici, successivamente caratterizzati in sottotipi da Baksh et al.²³:

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

BKV viene anche classificato in relazione alla sequenza della regione TCR, che mostra dei siti polimorfici caratteristici e conservati tra i vari genotipi²⁴. I più rappresentati sono:

- WW
- WWT
- AS
- 128-I

I Polyomavirus sono largamente diffusi nella popolazione umana, dato rappresentato da uno studio di Shah²⁵ dove, analizzando la presenza di IgG anti-BKV e anti-JCV nel siero, si osserva che rispettivamente il 60% e 80% della popolazione mondiale risulta essere infettata da Polyomavirus.

Le modalità attraverso cui il Polyomavirus infetta e si trasmette non sono ancora interamente note: la via di trasmissione principale sembra essere quella respiratoria^{26,27}, anche se sono possibili altre modalità quale quella oro-fecale²⁸, urinaria²⁹ e trans-placentare^{30,31}, quest'ultima è stata presa in esame in un recente studio condotto dal nostro gruppo di ricerca³²: non è stata osservata trasmissione verticale madre-feto durante l'ultimo trimestre di gravidanza, tuttavia

ulteriori studi sono in corso al fine di valutare la possibile trasmissione durante tutto il corso della gestazione. 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). Raggiunta la cellula bersaglio il virus si localizza sulla membrana plasmatica in modo casuale, distribuendosi o a piccoli gruppi di copie virali oppure in gruppi di numerosi virioni; in questa sede riconosce i gangliosidi leganti acido sialico e viene veicolato all'interno della cellula mediante endocitosi³³. Sono due le vie endocitotiche con cui BKV e JCV superano la membrana plasmatica³⁴:

- JCV entra nella cellula attraverso vescicole ricoperte di molecole di clatrina;
- BKV utilizza caveole, vescicole delle dimensioni di 50-70 nm, a forma di fiasca, presenti sulla superficie di molti tipi di cellule.

Nel corso di una infiammazione matura e produttiva, le particelle virali si uniscono a formare aggregati tubulo-vescicolari all'interno della cellula, osservati mediante microscopia elettronica in continuità con il reticolo endoplasmatico rugoso e in prossimità dell'apparato di Golgi³³. Il meccanismo mediante il quale i Polyomavirus penetrano nel nucleo ancora non è chiaro, alcuni studi hanno ipotizzato che i pori nucleari siano troppo piccoli per consentire il passaggio del virione, oppure che siano presenti degli inibitori che riducano il diametro dei pori; tuttavia, altri studi hanno proposto proprio il passaggio attraverso i pori nucleari come via di ingresso nel nucleo^{35,36}.

Durante la prima infezione asintomatica, successivamente all'ingresso nella cellula, i Polyomavirus si latentizzano 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^{37,38}. Tuttavia, in condizioni di immunodeficienza di variabile grado (farmacologiche, indotte da infezione da HIV, gravidanza, deficit di immunità cellulo-mediata), il virus può andare incontro a riattivazione con conseguente infezione produttiva che porta alla produzione di nuova progenie virale, lisi cellulare e conseguente danno d'organi.

All'inizio della riattivazione il virus trasloca nel nucleo in cui 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 capsido, 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^{8,14}.

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^{39,40}.

Le patologie sicuramente causate da polyomavirus umani sono: leucoencefalopatia progressiva multifocale, cistiti ed uretriti emorragiche e la nefropatia da polyomavirus (PAN)^{41,42}. 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-interstiziale⁸. Tale patologia è causata in prevalenza da infezione-riattivazione di BKV⁴³, anche se di recente è stato riportato un caso di possibile coinvolgimento di JCV⁴⁴. 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-rigetto⁴⁵ (in particolare mophetil-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)⁸. 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 virale⁴⁶. 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 ureteriti 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 7) (infiltrati mononucleari interstiziali, atrofia tubulare e fibrosi interstiziale) associata alla presenza delle tipiche inclusioni virali intranucleari, dimostrabili morfologicamente e con metodiche immunostochimiche in cellule epiteliali.

Lo sviluppo della PAN può essere diviso in stadi⁸:

- 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%)⁴⁷. 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.

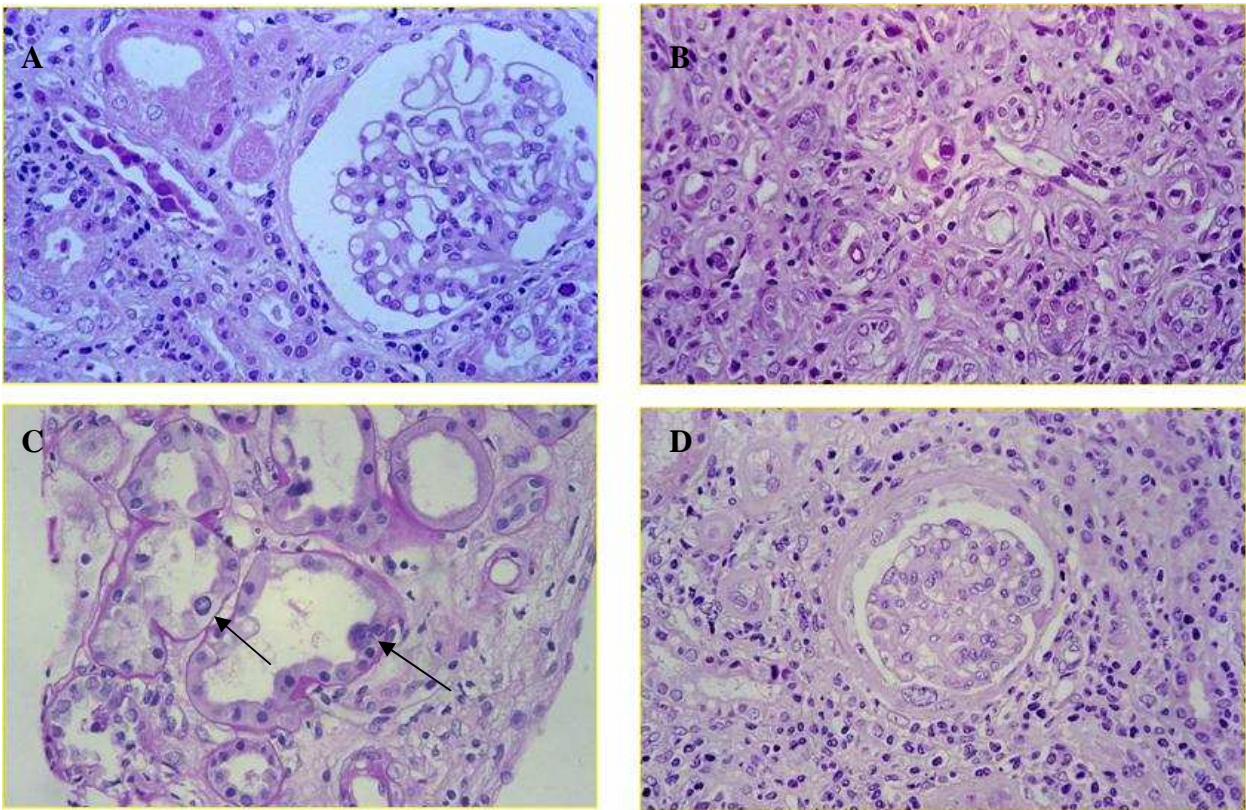


FIGURA 7

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

Lo scopo del presente lavoro è quello di valutare l'eventuale coinvolgimento nello sviluppo e nella severità della nefropatia Polyomavirus-associata dei riarrangiamenti della regione regolatoria virale e delle mutazioni nella sequenza aminoacidica della proteina capsidica di BK Virus. 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 Gennaio 2005 a Gennaio 2008 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 51 anni, mediana di 50 e range da 22 a 76.

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 5 a 14), 63 campioni di sangue (media 8 campioni, range da 5 a 14) e 17 campioni di biopsie renali (media 2,1 campioni, range da 1 a 5) mentre nel gruppo B sono stati esaminati 682 campioni di urina (media 3,1 campioni, range da 1 a 11) e 677 campioni di sangue (media 3,1 campioni, range da 1 a 11). La biopsia renale è stata effettuata su 68 pazienti per un totale di 101 campioni (media 1,5 campioni, range da 1 a 5).

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.

No. caso / Sesso / Età(anni)	Età del trapianto (mesi)	Malattia renale che ha portato a danno cronico
1 / M / 61	60	Malattia policistica del rene
2 / F / 36	48	Nefropatia da IgA
3 / M / 57	60	Malattia policistica del rene
4 / M / 58	36	Sconosciuta
5 / F / 52	48	Arterioneftrosclerosi
6 / M / 41	24	Nefroangiosclerosi
7 / M / 65	12	Malattia glomerulare
8 / F / 38	12	Nefropatia da IgA

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 cells⁴⁶, 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 8 A)
- carica intermedia (++) , da 6 a 10 cellule in 5 HPF
- alta carica (+++), più di 10 cellule in 5 HPF (Figura 8 B).

Per eseguire il saggio di Real-Time PCR è stato estratto DNA dal campione di urine utilizzando il kit commerciale precedentemente descritto (Genomic DNA from Tissue, NucleoSpin® Machery-Nagel, Germania). Il DNA viene poi conservato a -20°C.

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 Hirsch⁸, 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 :

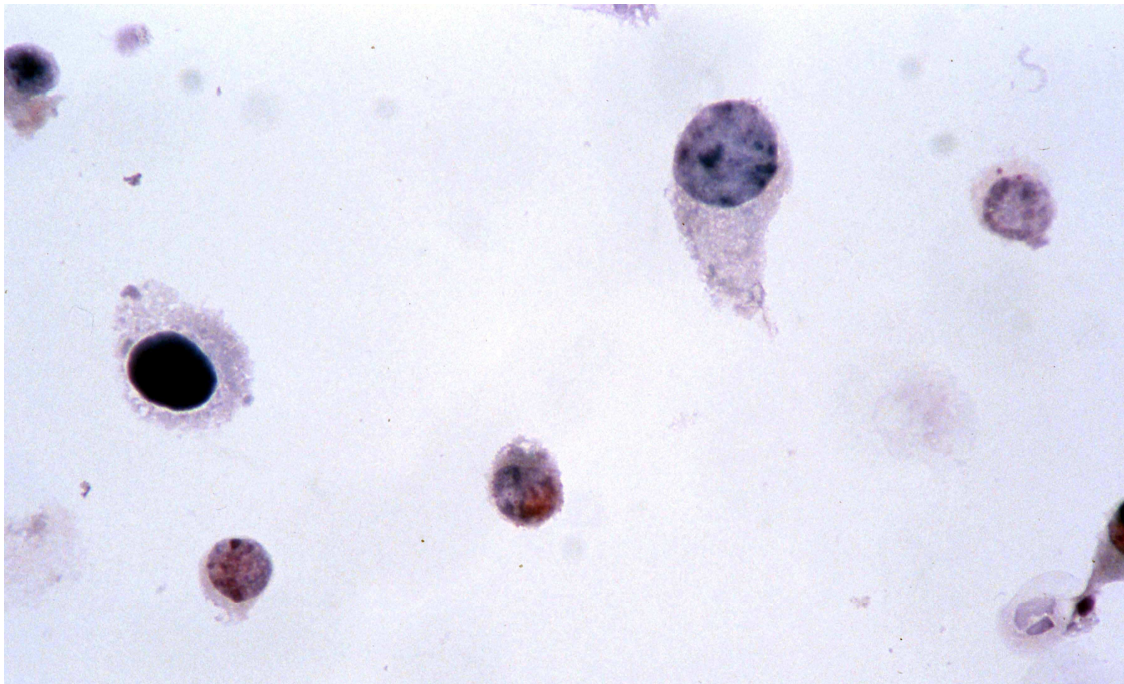
- stadio precoce (A), coinvolgimento focale midollare delle cellule dell'epitelio dei tubuli, positive per l'espressione del Large T. Alterazioni citopatiche come inclusioni nucleari sono limitate. Non evidenza di necrosi e infiltrati infiammatori.
- intermedio (B), estensivo coinvolgimento renale con 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 µL di proteinasi K e 450 µL 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 (Biotecx Labs, Houston, USA) in un volume finale di 30 µL e conservato a -20°C.

A



B

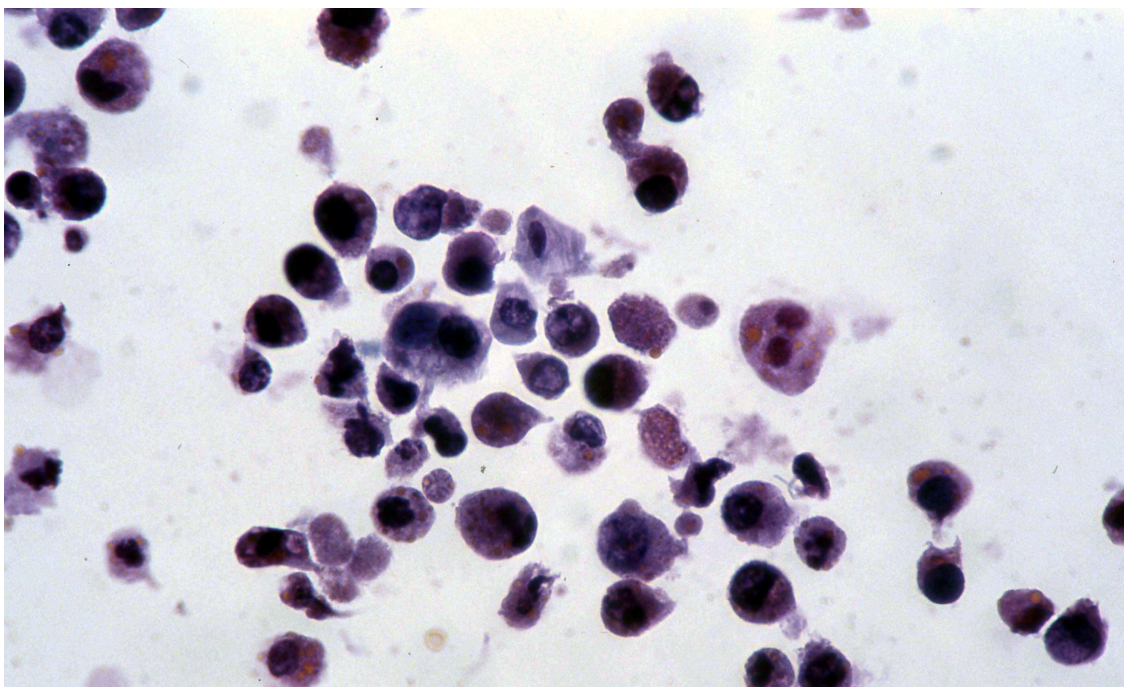


FIGURA 8

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

Colorazione Papanicolau, Ingrandimenti originali: 400x

- **Polymerase chain reaction**

Regione LT

Al fine di amplificare la regione del large-T (LT), è stata eseguita una multiplex/nested PCR (nPCR) sulle urine³⁶ 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 (Tabella 2). I campioni sono stati amplificati in un volume totale di 25 µL, 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/µL di ogni primers (Roche Diagnostic, Milano, Italia), 0,2mM di dNTPs (Roche Diagnostic, Milano, Italia) e 10 µL di DNA estratto da sangue periferico e biopsia renale, e 2,5 µL di urine; per il secondo step è stato usato 1 µL di templat. 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.

Regione TCR

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) (Tabella 2). L'amplificazione è stata eseguita in un volume finale di 25µL contenente: 10 pmol/µl 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 µL di DNA estratto da siero e da biopsia renale, e 5 µL di urine. Nel secondo step sono stati invece usati 2,5 µL di templat. 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.

Regione VP1

I campioni positivi alla regione LT per BKV furono sottoposti ad amplificazione della regione VP1, utilizzando VP1-7 e VP1-2R come primers esterni, e 327-1 e 327-2 come primers interni¹⁸ (Tabella 2). La reazione amplifica la sequenza nucleotica compresa tra il nucleotide 1744 e il nucleotide 1812; in tutti i casi è stato ottenuto un frammento di 327 bp. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 25 µL contenenti 10 pmol/µL (10 pmol/µL per la PCR interna) di ogni primer, 0,2 mM di dNTPs, 1,5 mM di MgCl₂, 2 U di BioTaq, in presenza di appropriato buffer di reazione (Tris-HCl 100 mM, pH 8.3, KCl 500 mM). Nel primo step sono stati usati 5 µL di urina e di DNA estratto da siero e da biopsia renale, mentre nel secondo step sono stati aggiunti alla mix di reazione 2,5 µL di templat. La reazione è stata eseguita con Eppendorf Mastercycler gradient e dopo una prima denaturazione a 95°C per 5 min, fanno seguito 35 cicli (30 per la PCR interna) composti da: denaturazione a 95°C per 40 sec; appaiamento per 40 sec a 55°C; estensione a 72°C per 40sec. I cicli sono terminati con un'estensione finale di 5 min a 72°C.

Al fine di amplificare la regione genomica dei cinque loops esterni della regione VP1, sono state eseguite due reazioni di PCR con due differenti set di primers: BK-1F – BK-1R e BK-2F – BK-2R (Tabella 2). Come mostrato in figura 9 queste coppie di primers amplificano due regioni che parzialmente si sovrappongono, in particolare il frammento amplificato dalla coppia BK-1F e BK-1R è lungo 489 bp, mentre BK-2F e BK-2R amplificano un frammento di 482 bp. La reazione è stata eseguita in un volume finale di 50 µL contenenti 20 pmol/µL di ogni primer, 0,6 mM di dNTPs, 1,5 mM di MgCl₂, 2 U di BioTaq, in presenza di appropriato buffer di reazione 1X (Promega, Milano, Italia). Nella reazione vennero inseriti 2, 5 o 7 µL di DNA. Le due reazioni vennero eseguite con Eppendorf Mastercycler gradient e dopo una prima denaturazione a 94°C per 5 min, fanno seguito 30 cicli composti da: denaturazione a 94°C per 30 sec; appaiamento per 30 sec a 58°C; estensione a 72°C per 30sec. I cicli sono terminati con un'estensione finale di 7 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.

La sensibilità della reazione di PCR è stata valutata amplificando diluizioni seriali di campioni positivi per BKV (dati non mostrati).

Real-Time PCR

La carica virale è stata valutata amplificando la regione VP1 tramite saggio quantitativo Real-Time PCR. La metodica prevede quantificazione con saggio TaqMan® di tipo assoluto, mediante comparazione con una curva standard costruita utilizzando diluizioni seriali di un campione a concentrazione nota per determinare il ciclo threshold. Come standard di quantificazione è stato utilizzato un plasmide [1.5×10^5 copie/ μL], codificante l'intero genoma di BKV appartenente al ceppo MM (Tebu-bio, Milano, Italia) (Figura 10). L'analisi viene condotta in un volume finale di 25 μL contenente: 1X di TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystem, Monza, Italia), 0,4 μM di primer BKVPf e 0,9 μM di primer BKVPr, 200 nM di sonda specifica (Applied Biosystem, Monza, Italia) e 5 μL di DNA. Amplificazione e quantificazione sono state eseguite utilizzando lo strumento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystem, Monza, Italia), secondo le seguenti condizioni: iniziale denaturazione a 95°C per 10 min, 40 cicli a 95°C per 15s e 60°C per 1 min. La fluorescenza è stata letta alla fine dell'ultimo step.

Ogni campione è stato analizzato in triplicato e ogni piastra conteneva un controllo negativo contenente mix di reazione priva di DNA.

• **Clonaggio**

I prodotti di amplificazione dei loops esterni della regione VP1 sono stati clonati in cellule INV α 'F di *Escherichia Coli* utilizzando il kit commerciale TA cloning kit (Invitrogen, Oregon, USA). Dopo il processo di trasformazione il plasmide è stato estratto mediante QIAGEN plasmid minikit (QIAGEN, Amburgo, Germania). Successivamente venne eseguita la digestione del frammento clonato usando gli enzimi *HindIII* e *XbaI* (Roche Research, Milano, Italia).

Per ogni frammento di PCR vennero presi un minimo di cinque cloni rappresentativi.

• **Sequenziamento**

I frammenti amplificati risultati positivi per le regioni indagate sono stati separati tramite corsa elettroforetica su gel di agarosio al 3%; le bande comprese tra le 200 e le 500 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).

La reazione di sequenza sulle regioni TCR e VP1 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) e successivamente risospesi in 10 μ L di formamide.

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

Le sequenze della regione TCR 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>). La struttura della TCR di BKV fu comparata con la sequenza archetipo BKV WW e BKV WWT, come proposto da Sundsfjord et al.⁵³, e con BKV 128-I (GenBank accession number: AF218446).

Le sequenze della regione VP1 sono state invece lette manualmente, comparate con prototipo BKV Dunlop e classificate secondo i criteri proposti da Jin et al.²² (Tabella 3). Nel caso in cui nell'elettroferogramma si osservarono due picchi alla stessa altezza, questi furono considerati come due sequenze distinte. I cambiamenti in uno o più aminoacidi furono predetti mediante il software EXPASY Program Server (<http://www.expasy.org>), e la variazione aminoacidica fu confrontata con quella del prototipo, al fine di identificare i possibili cambiamenti chimici del frammento preso in esame.

- **Analisi statistica**

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 (intervallo di confidenza: 95%).

<i>Regione</i>		<i>Nome</i>	<i>Posizione</i>	<i>Sequenza</i>	
LT	<i>Esterni</i>	PM1+	*4022-4045	5'-TCT TCT GGR YTA AAR TCA TGC TCC-3'	
		PM1-	*4550-4572	5'-TTW TAG RTK CCA ACC TAT GGA AC-3'	
	<i>Interni</i>	PM2-	*4388-4411	5'-GGT AGA AGA CCC YAA RGA CTT TCC-3'	
		JC+	†4086-4108	5'-ATA TTA TGA CCC CCA AAA CCA TG-3'	
		SV+	‡4291-4314	5'-ATA ATT TTC TTG TAT AGC AGT GCA-3'	
		BK+	*4059-4085	5'-GAA TGC TTT CTT CTA TAG TAT GGT ATG-3'	
TCR BKV	<i>Esterni</i>	BKTT1	*5106-5133	5'-AAG GTC CAT GAG CTC CAT GGA TTC TTC C- 3'	
		BKTT2	*630-657	5' -CTA GGT CCC CCA AAA GTG CTA GAG CAG C- 3'	
	<i>Interni</i>	BRP1	*82-101	5' -TTG AGA GAA AGG GTG GAG GC- 3'	
		BRP2	*339-358	5' -GCC AAG ATT CCT AGG CTC GC- 3'	
VP1 BKV	<i>Esterni</i>	VP1-7	*1480-1500	5'-ATC AAA GAA CTG CTC CTC AAT- 3'	
		VP1-2R	*2038-2059	5' -GCA CTC CCT GCA TTT CCA AGG G- 3'	
	<i>Interni</i>	327-1	*1629-1649	5' -CAA GTG CCA AAA CTA CTA AT- 3'	
		327-2	*1937-1956	5' -TGC ATG AAG GTT AAG CAT GC- 3'	
	<i>Frammento 1</i>	BK-1F	*1632-1654	5'-AGT GCC AAA ACT ACT AAT AAA AG- 3'	
		BK-1R	*2121-2102	5'-CTG GGC TGT TGG GTT TTT AG-3'	
		<i>Frammento 2</i>	BK-2F	*1988-2009	5'-GAA AAC CTA TTC AAG GCA GTA A-3'
			BK-2R	*2470-2448	5'-AAA TTG GGT AAG GAT TCT TTA CA-3'
Real-Time PCR	BKVPf	*2511-2531	5' -AGT GGA TGG GCA GCC TAT GTA - 3'		
	BKVPr	*2605-2586	5'-TCATATCTGGGTCCCCTGGA-3'		
	BKVpp	*2578-2546	5'FAM- AGGTAGAAGAGGTTAGGGTGTGTTGATGGCACAG - 3'MGB		

TABELLA 2

Sequenza genomica e posizione dei primers utilizzati per l'amplificazione delle regioni LT, TCR e VP1 dei Polyomavirus umani.

A

	1744-1746	1747-1749	1750-1752	1753-1755	1756-1758	1759-1761	1762-1764	1765-1767	1768-1770	1771-1773	1774-1776	1777-1779	1780-1782	1783-1785	1786-1788	1789-1791	1792-1794	1795-1797	1798-1800	1801-1803	1804-1806	1807-1809	1810-1812
I(DUN)	GAA	AAC	CTT	AGG	GGC	TTT	AGT	CTA	AAG	CTA	AGT	GCT	GAA	AAT	GAC	TTT	AGC	AGT	GAT	AGC	CCA	GAG	AGA
I(PT)																				AGT			
I(MM)																						GAA	
I(GS)																						GAC	
II(SE)	GAT					TAT					ACT				GCC		GAC					GAC	AAA
III(AS)	GAT					TAT		CAG	CAC						GCC		GAG					GAC	
IV(IV)	AAT	GAC				TAT			AGA		ACT			ACT	GCC		GAG					GAC	
IV(MG)	AAT	GAC				TAT			AGA		ACT			ACT	GCC		GAC					GAC	

B

	1744-1746	1747-1749	1750-1752	1753-1755	1756-1758	1759-1761	1762-1764	1765-1767	1768-1770	1771-1773	1774-1776	1777-1779	1780-1782	1783-1785	1786-1788	1789-1791	1792-1794	1795-1797	1798-1800	1801-1803	1804-1806	1807-1809	1810-1812
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83
I(DUN-PT-MM)	Glu	Asn	Leu	Arg	Gly	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Ala	Glu	Asn	Asp	Phe	Ser	Ser	Asp	Ser	Pro	Glu	Arg
I(GS)																						Asp	
II(SE)	Asp					Tyr					Thr			Ala		Asp					Asp	Lys	
III(AS)	Asp					Tyr		Gln	His					Ala		Glu					Asp		
IV(IV)	Asn	Asp				Tyr			Arg		Thr			Thr	Ala		Glu				Asp		
IV(MG)	Asn	Asp				Tyr			Arg		Thr			Thr	Ala		Asp				Asp		

TABELLA 3

Sequenza nucleotidica regione VP1 dal nucleotide 1744 al nucleotide 1812, utilizzata per assegnare i gruppi e i sottotipi di BKV secondo Jin et al. (A), e relativa sequenza aminoacidica (B).

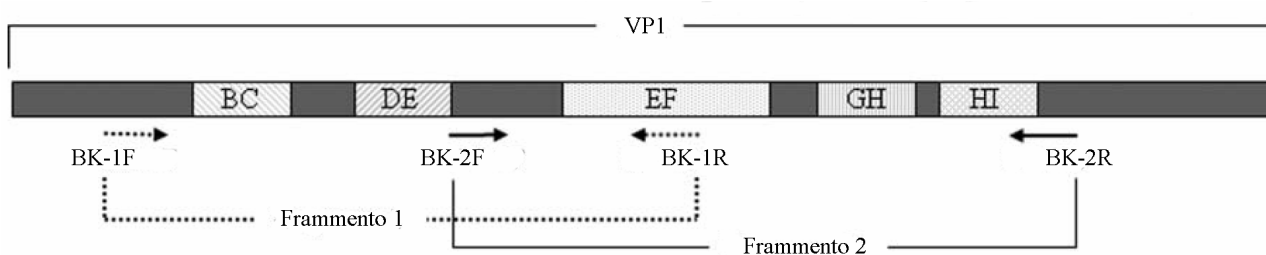


FIGURA 9

Rappresentazione grafica dell'appaiamento dei primers BK-1F, BK-1R, BK-2F, BK-2R per l'amplificazione dei loop esterni della regione VP1 di BKV.

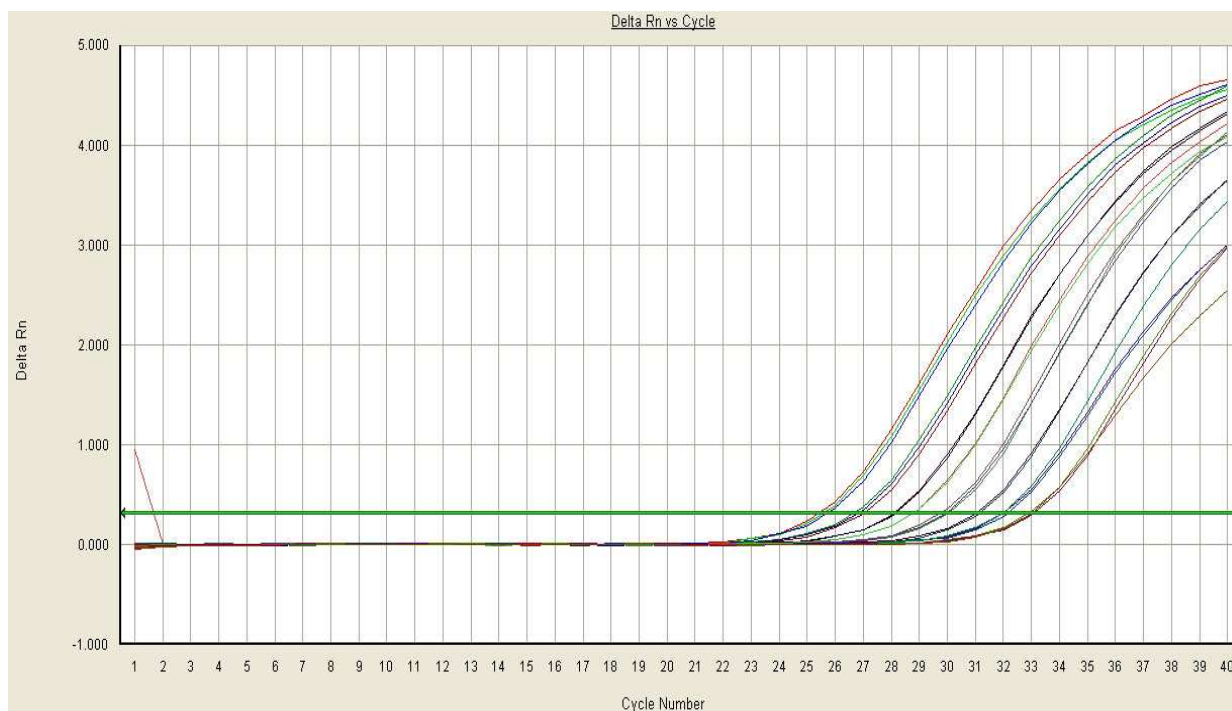


FIGURA 10

Rappresentazione grafica delle curve di amplificazione del campione standard in diluizioni seriali
Soluzione iniziale concentrata 12500 copie/ μ l, diluizioni seriali 1:2.

RISULTATI

Nel corso dello studio, otto (3,5%) di 226 pazienti portatori di trapianto renale hanno sviluppato PAN, diagnosticata in base a criteri istologici, riscontro di tipiche inclusioni virali nel nucleo come riportato da Nickleit et al.⁴⁷, e a criteri immunoistochimici.

L'indagine molecolare mediante multiplex-nested PCR, eseguita sui campioni del gruppo A, ha identificato il genoma di Polyomavirus in 68 (97,1%) di 70 campioni di urina, 36 (57,1%) di 63 campioni di sangue e in 13 (76,5%) di 17 campioni biopsie renali. Nel gruppo B il genoma di Polyomavirus è stato identificato in 242 (35,5%) di 682 campioni urinari, in 24 (3,5%) di 677 campioni di sangue e in 5 (5%) di 101 campioni biopsie.

In dettaglio si è potuto osservare che nei pazienti del gruppo A, JCV è sempre associato a coinfezione con BKV, mentre risulta essere il Polyomavirus prevalente nei campioni di urina del gruppo B (19,4% vs. 8,6%, 7,5% coinfezione JCV-BKV; $P < .001$). In tutti i campioni appartenenti al gruppo A è stata osservata infezione da BKV o coinfezione BKV-JCV, non è mai stata osservata singola infezione da JCV (Grafico 1).

Indagine molecolare regione TCR

L'analisi di sequenza ha mostrato che soltanto due ceppi virali di BKV sono stati riscontrati nei campioni del gruppo A: WWT e 128-I (Grafico 2); WWT è risultato il ceppo prevalente nei campioni urinari, di sangue ($P < .001$) e di biopsie renali ($P = .063$) quando trovato da solo. Mentre è interessante notare che, in presenza di coinfezione, l'unico ceppo virale trovato in tutti i campioni di urina, sangue e in 4 (80%) di 5 biopsie renali, è stato BKV 128-I. La prevalenza del genotipo 128-I nei campioni confetti è stata significativamente più alta di quella riscontrata nei casi di infezione da BKV in campioni di urina e sangue ($P < .001$), e anche rispetto ai campioni di biopsie renali, però non statisticamente significativa ($P = .0063$).

I pazienti del gruppo B, hanno mostrato presenza di diversi ceppi di BKV: oltre a WWT e a 128-I, sono stati trovati anche i ceppi WW e AS (Grafico 2). In presenza di singola infezione da BKV, il ceppo più frequentemente isolato in campioni di urina è stato WW ($P < .001$); mentre nel caso di coinfezione con JCV, anche nel gruppo B il genotipo più frequente è stato 128-I, sia nei campioni urinari, di sangue che di biopsie renali ($P < .001$).

Il confronto dei ceppi virali riscontrati tra i due gruppi ha mostrato che WWT è significativamente più frequente nei campioni di urine e sangue prelevati dai pazienti del gruppo A ($P < .001$), e questa differenza è stata molto più significativa nei campioni di biopsie renali: BKV 128-I non è mai stato trovato nei campioni prelevati dal gruppo B. WW e AS sono stati trovati

solamente nel gruppo di pazienti senza PAN. Infine 128-I è il genotipo prevalente in tutti i campioni che hanno mostrato coinfezione BKV-JCV, in entrambi i gruppi.

Nelle tabelle da 4 a 7 viene mostrata una analisi dettagliata della sequenza della regione TCR dei differenti ceppi virali trovati. Nei pazienti del gruppo A è stata osservata una sequenza archetipo (BKV WWT) in un solo campione di sangue, mentre le altre sequenze hanno mostrato riarrangiamenti: tra questi il più frequente è una sostituzione di una singola base nucleotidica (g→a, nel blocco S, posizione 18) nel genotipo WWT, trovata nel 59,3% dei campioni di urina, 65,2% dei campioni di sangue e nella totalità delle biopsie renali analizzate. Duplicazioni e delezioni nel blocco P sono state riscontrate nel 29,6% dei ceppi WWT dei campioni urinari, nel 30,4% dei campioni di sangue e in una biopsia renale presentante coinfezione BKV-JCV. Maggiori riarrangiamenti sono stati trovati in tutti i ceppi 128-I analizzati: è stata costantemente trovata una inserzione di 18 bp in posizione 41 nel blocco P, associata saltuariamente a più complesse variazioni nell'anatomia della regione TCR, o a singole sostituzioni aminoacidiche.

Nel gruppo B, il genotipo WWT ha mostrato, in tutti i casi trovati, la stessa sostituzione aminoacidica descritta per il gruppo A (g→a, nel blocco S, posizione 18), mentre WWT archetipo è stato trovato solo in due campioni di urina presentanti coinfezione. Similmente al gruppo A, anche in questi pazienti non è stato trovato 128-I archetipo in nessun campione, il genotipo 128-I ha mostrato sempre l'inserzione di 8 bp in posizione 41 nel blocco P da sola o associata a riarrangiamenti maggiori o a sostituzioni nucleotidiche.

I genotipi WW e AS sono stati trovati solamente nei campioni del gruppo B, mostrando sequenze archetipo in tutte le biopsie renali e nella maggior parte dei campioni di urina; i casi presentanti riarrangiamenti consistevano in delezioni (WW e AS), duplicazioni del blocco P (WW) e sostituzioni di singole basi nucleotidiche (WW). Nei campioni di sangue il genotipo WW ha sempre mostrato una sequenza archetipo, mentre AS ha mostrato struttura archetipo (40%), sostituzioni nucleotidiche (20%) e delezioni nel blocco P (40%).

I campioni prelevati dai singoli pazienti del gruppo A nell'arco della durata dello studio (prima, durante e dopo la diagnosi di PAN) hanno mostrato un'alta conservazione della struttura della regione TCR, non sono infatti stati riscontrati cambiamenti nei genotipi virali o variazioni di sequenza durante il periodo di studio.

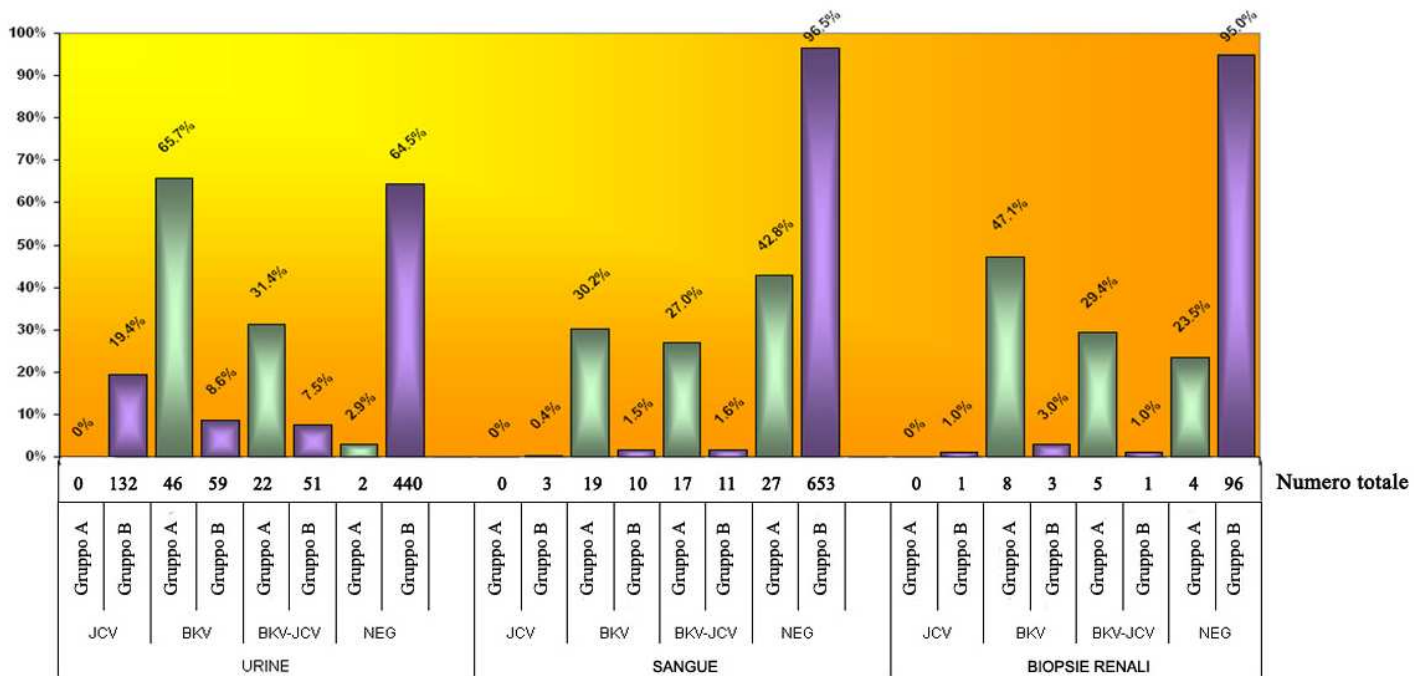
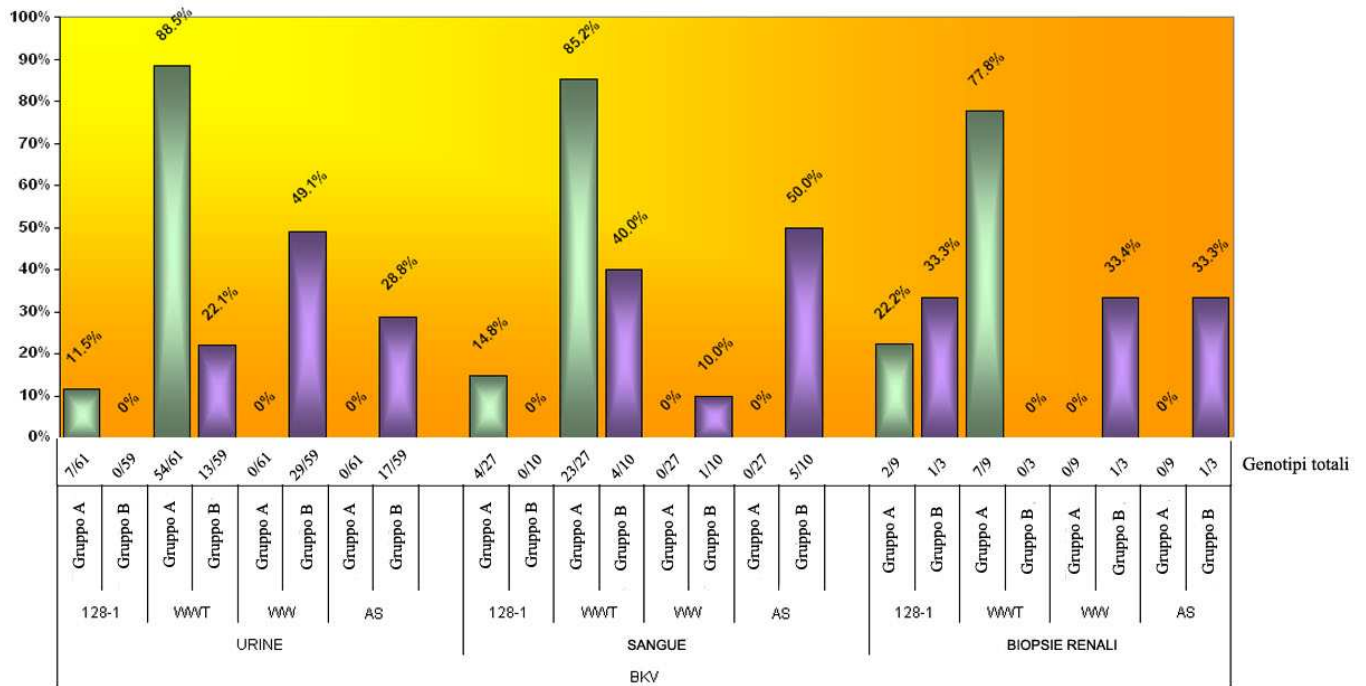


GRAFICO 1

Distribuzione dei Polyomavirus umani in campioni di urina, sangue e biopsia renale prelevati da pazienti con e senza nefropatia associata a Polyomavirus

A



B

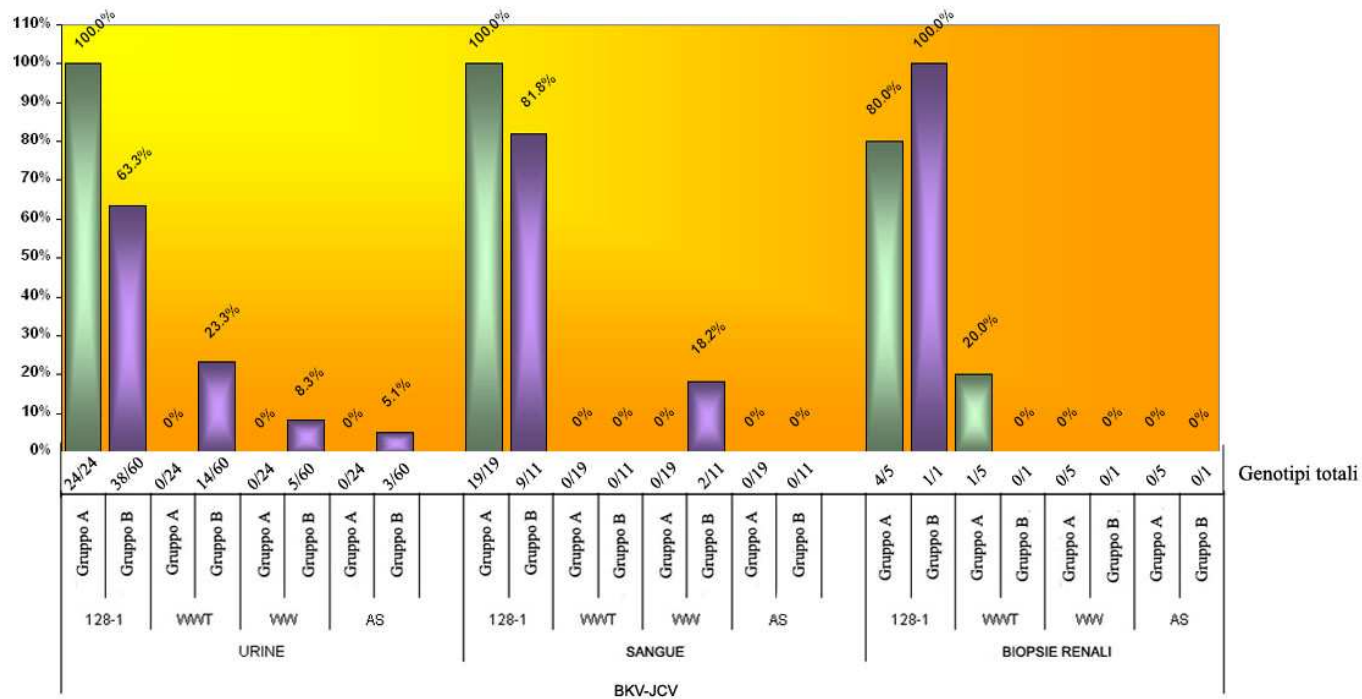


GRAFICO 2

Distribuzione dei genotipi di BKV in campioni di urina, sangue e biopsia renale, in singole infezioni da BKV (A) e in coinfezioni BKV-JCV (B).

No. campioni (%)	Riarrangiamenti
Urine	
BKV WWT (N = 54)	
0	Archetipo
32 (59.3)	g→a (S18)
11 (20.5)	Δ(P32-P49); g→a (S18)
1 (1.8)	rep (P51-Q26); g→a (S18)
6 (11.1)	g→a (S5); g→a (S18)
2 (3.7)	Δ(P41-P60); g→a (S18)
1 (1.8)	rep (P48-P50); g→a (S18)
1 (1.8)	rep (P48-P50); g→t (Q29); g→a (S18)
BKV 128-1 (N = 7)	
0	Archetipo
1 (14.3)	ins 8 bp (P41)
5 (71.4)	ins 8 bp (P41); g→t (S22)
1 (14.3)	rep (P15-P40); ins 8 bp (P41); g→t (S22)
Sangue	
BKV WWT (N = 23)	
1 (4.3)	Archetipo
15 (65.3)	g→a (S18)
5 (21.8)	Δ(P32-P49); g→a (S18)
1 (4.3)	rep (P66-Q20)
1 (4.3)	Δ(P60-Q26); g→a (S18)
BKV 128-1 (N = 4)	
0	Archetipo
4 (100)	ins 8 bp (P41); g→t (S22)
Biopsie renali	
BKV WWT (N = 7)	
0	Archetipo
7 (100)	g→a (S18)
BKV 128-1 (N = 2)	
0	Archetipo
1 (50)	ins 8 bp (P41); g→t (S22)
1 (50)	ins 8 bp (P41); g→t (S22); rep (P56-S35)

TABELLA 4

Riarrangiamenti della regione regolatoria virale in campioni di urina, sangue e biopsia renale, prelevati da pazienti con PAN: singola infezione da BKV.

→ indica sostituzione

bp, paia di basi

ins, inserzione

rep, ripetizione

Δ, delezione

No. campioni (%)	Riarrangiamenti
Urine	
BKV 128-1 (N = 24)	
0	Archetipo
3 (12.5)	ins 8 bp (P41)
16 (66.6)	ins 8 bp (P41); g→t (S22)
2 (8.3)	Δ(P39-P41)
1 (4.2)	ins 8 bp (P41); g→t (S22); c→t (Q39); rep (P13-Q26)
1 (4.2)	ins 8 bp (P41); rep (P24-R2); g→t (S22)
1 (4.2)	ins 8 bp (P41); rep (P17-Q35); Δ(R24-S63)
Sangue	
BKV 128-1 (N = 19)	
0	Archetipo
13 (68.3)	ins 8 bp (P41); g→t (S22)
1 (5.3)	ins 8 bp (P41); g→t (S22); a→t (S27)
1 (5.3)	ins 8 bp (P41); Δ(R1-R47); g→t (S22)
1 (5.3)	ins 8 bp (P41); Δ(Q38-R52); g→t (S22)
1 (5.3)	ins 8 bp (P41); rep (P25-R4); g→t (S22)
2 (10.5)	ins 8 bp (P41); a→t (Q31); g→t (S22); rep (P16-Q33)
Biopsie renali	
BKV WWT (N = 1)	
0	Archetipo
1 (100)	Δ(P32-P49); g→a (S18)
BKV 128-1 (N = 4)	
0	Archetipo
4 (100)	ins 8 bp (P41); g→t (S22)

TABELLA 5

Riarrangiamenti della regione regolatoria virale in campioni di urina, sangue e biopsia renale, prelevati da pazienti con PAN: coinfezione da BKV-JCV.

→ indica sostituzione

bp, paia di basi

ins, inserzione

rep, ripetizione

Δ, delezione

TABELLA 6

Riarrangiamenti della regione regolatoria virale in campioni di urina, sangue e biopsia renale, prelevati da pazienti senza PAN: singola infezione da BKV.

→ indica sostituzione

bp, paia di basi

ins, inserzione

rep, ripetizione

Δ, delezione

No. campioni (%)	Riarrangiamenti
Urine	
BKV WWT (N = 14)	
2 (14.3)	Archetipo
11 (78.6)	g→a (S18)
1 (7.1)	Δ(P41-P49)
BKV 128-1 (N = 38)	
0	Archetipo
26 (68.4)	ins 8 bp (P41); g→t (S22)
1 (2.6)	ins 8 bp (P41); g→a (P42); g→t (S22)
2 (5.4)	g→t (S22)
1 (2.6)	c→a (R12); g→t (S22)
1 (2.6)	a→t (S27)
2 (5.4)	Δ(P20-P26); ins 8 bp (P41); g→t (S22)
1 (2.6)	ins 8 bp (P41)
1 (2.6)	Δ(P42-P55); ins ctca(P60); rep (P51-S35); g→t (S22)
1 (2.6)	Δ(P42-P55); ins ctca(P60); rep (P51-S35); g→t (S22); Δ(R6-R10)
1 (2.6)	ins 8 bp (P41); Δ(P42-P51); g→t (S22); a→t (S27)
1 (2.6)	ins 8 bp (P41); Δ(P42-P51); g→t (S22); Δ(R6-R10)
BKV WW (N = 5)	
4 (80)	Archetipo
1 (20)	Δ(P8-P26)
BKV AS (N = 3)	
3 (100)	Archetipo
0	Rearrangement
Sangue	
BKV WW (N = 2)	
2 (100)	Archetipo
BKV 128-1 (N = 9)	
0	Archetipo
7 (77.8)	ins 8 bp (P41); g→t (S22)
1 (11.1)	ins 8 bp (P41)
1 (11.1)	ins 8 bp (P41); g→t (S22); rep (P15-P40)
Biopsie renali	
BKV 128-1 (N = 1)	
0	Archetipo
1 (100)	ins 8 bp (P41); g→t (S22)

No. campioni (%)	Riarrangiamenti
Urine	
BKV WWT (N = 13)	
0	Archetipo
13 (100)	g→a (S18)
BKV WW (N = 29)	
22 (75.9)	Archetipo
1 (3.4)	rep (P31-Q7)
1 (3.4)	Δ(P8-P26)
4 (13.9)	c→t (Q8)
1 (3.4)	c→t (P31)
BKV AS (N = 17)	
9 (53)	Archetipo
8 (47)	Δ(P42-P49)
Sangue	
BKV WWT (N = 4)	
0	Archetipo
4 (100)	g→a (S18)
BKV WW (N = 1)	
1 (100)	Archetipo
BKV AS (N = 5)	
2 (40)	Archetipo
2 (40)	Δ(P42-P49)
1 (20)	g→a (S25)
Biopsie renali	
BKV 128-1 (N = 1)	
0	Archetipo
1 (100)	ins 8 bp (P41); rep (P19-P52); g→t (S22)
BKV WW (N = 1)	
1 (100)	Archetipo
BKV AS (N = 1)	
1 (100)	Archetipo

TABELLA 7

Riarrangiamenti della regione regolatoria virale in campioni di urina, sangue e biopsia renale, prelevati da pazienti senza PAN: coinfezione da BKV-JCV.

→ indica sostituzione

bp, paia di basi

ins, inserzione

rep, ripetizione

Δ, delezione

Indagine molecolare regione VP1

La regione VP1 è stata amplificata in tutti i 68 campioni di urina (100%), in 28 di 36 campioni di sangue (77,7%) e in 12 delle 13 biopsie renali (92,3%) prelevate dai pazienti del gruppo A e positive per la presenza di Polyomavirus; nei pazienti del gruppo B, la regione VP1 è stata invece amplificata in 100 delle 110 urine (91%), in 17 dei 20 campioni di sangue (85%) e in tutte le biopsie renali (100%).

Nella tabella 8 è riportata la distribuzione dei gruppi e sottotipi di BKV isolati nei vari campioni di entrambi i gruppi. Differenze statisticamente significative sono state principalmente trovate nei campioni di urina e in alcuni campioni di sangue: i sottotipi prevalenti sono stati GS (gruppo I) e IV (gruppo IV) nei pazienti del gruppo A, mentre MM (gruppo I) in quelli del gruppo B ($P < .001$); inoltre, nei campioni prelevati dai pazienti del gruppo A non sono mai stati trovati BKV appartenenti ai gruppi II e III, raramente trovati in campioni di urina del gruppo B. Nei campioni di sangue dei pazienti con nefropatia, soltanto la frequenza del sottotipo GS è stata statisticamente significativa ($P = .047$). A causa dell'esiguità dei campioni di biopsie renali, i risultati non possono essere confrontati statisticamente.

L'analisi di sequenza della regione VP1 (Grafico 3) ha mostrato che mutazioni in singole basi sono state più frequenti nei campioni di urina dei pazienti del gruppo A (52%), rispetto ai campioni di sangue e di biopsie renali (21,2% e 29,4%, rispettivamente), mentre sono state trovate nel 16,4% dei campioni di urina del gruppo B e mai nel sangue e nelle biopsie renali di questi pazienti. Nella tabella 9 sono illustrati i cambiamenti aminoacidici derivati dalle mutazioni riscontrate nei frammenti analizzati. Sono stati osservati tre "hot spots" nel gene della VP1 in entrambi i gruppi: in posizione 62, 73 e 77 per quanto riguarda i campioni del gruppo A, e in posizione 69, 73 e 77 nei campioni del gruppo B. Cambiamenti aminoacidici nei campioni del gruppo A sembrano non essere casualmente distribuiti, per esempio la sostituzione più frequente (da acido aspartico a asparagina al residuo 75) è stata trovata nel 27,5% dei campioni urinari, in 3 di 7 campioni di sangue e in 3 di 5 biopsie renali. Tuttavia nel gruppo B non è stata osservata nessuna prevalenza di specifici cambiamenti.

Analisi più approfondite riguardo i cambiamenti chimici degli aminoacidi hanno mostrato che il più frequente cambiamento in entrambi i gruppi è la sostituzione da aminoacido acido a uno idrofilico; ma è stata anche osservata la sostituzione in posizione 78 di una serina idrofilica a isoleucina idrofobica in due campioni di urina del gruppo B. Infine è stata trovata una delezione di un residuo di alanina in tre casi del gruppo A.

Nella tabella 10 sono mostrati i genotipi di BKV e le sostituzioni aminoacidiche dei campioni prelevati prima e dopo la diagnosi di PAN nei pazienti del gruppo A. I genotipi e i

sottotipi si è osservato essere stabili in tutti i campioni, mentre cambiamenti temporali di uno o più nucleotidi sono stati trovati in 5 pazienti; al contrario, i restanti tre pazienti hanno mostrato soltanto sequenze archetipo nei campioni prelevati nei diversi intervalli temporali.

Nel gruppo B, la sequenza di VP1 è sempre stata stabile e cambiamenti nucleotidici sono stati trovati in campioni provenienti dallo stesso paziente.

	<u>Gruppo</u>	<u>Sottotipo</u>	<u>Gruppo A</u>	<u>Gruppo B</u>	<u>Analisi statistica</u>
<u>URINE</u>	I	MM	17,3% (17/98)	44,6% (49/110)	P<.001
		GS	37,8% (37/98)	12,7% (14/110)	P<.001
	II	SB	0% (0/98)	14,5% (16/110)	P<.001
	III	AS	0% (0/98)	0,9% (1/110)	P>.99
	IV	IV	24,5% (24/98)	9,1% (10/110)	P=.004
		MG	20,4% (20/98)	18,2% (20/110)	P=.72
		TOT.	98	110	
<u>SANGUE</u>	I	MM	15,1% (5/33)	35,3% (6/17)	P=.15
		GS	30,3% (10/33)	5,9% (1/17)	P=.047
	II	SB	0% (0/33)	11,8% (2/17)	P=.111
	III	AS	0% (0/33)	0% (0/17)	P>.99
	IV	IV	18,2% (6/33)	29,4% (5/17)	P=.475
		MG	36,4% (12/33)	17,6% (3/17)	P=.209
		TOT.	33	17	
<u>BIOPSIE RENALI</u>	I	MM	23,6% (4/17)	33,3% (1/3)	P>.99
		GS	41,2% (7/17)	0% (0/3)	P>.510
	II	SB	0% (0/17)	33,3% (1/3)	P>.15
	III	AS	0% (0/17)	0% (0/3)	P>.99
	IV	IV	17,6% (3/17)	33,3% (1/3)	P=.508
		MG	17,6% (3/17)	0% (0/3)	P>.99
		TOT.	17	3	

TABELLA 8

Distribuzione dei gruppi e dei sottotipi di BKV nei campioni prelevati dai pazienti con e senza PAN.

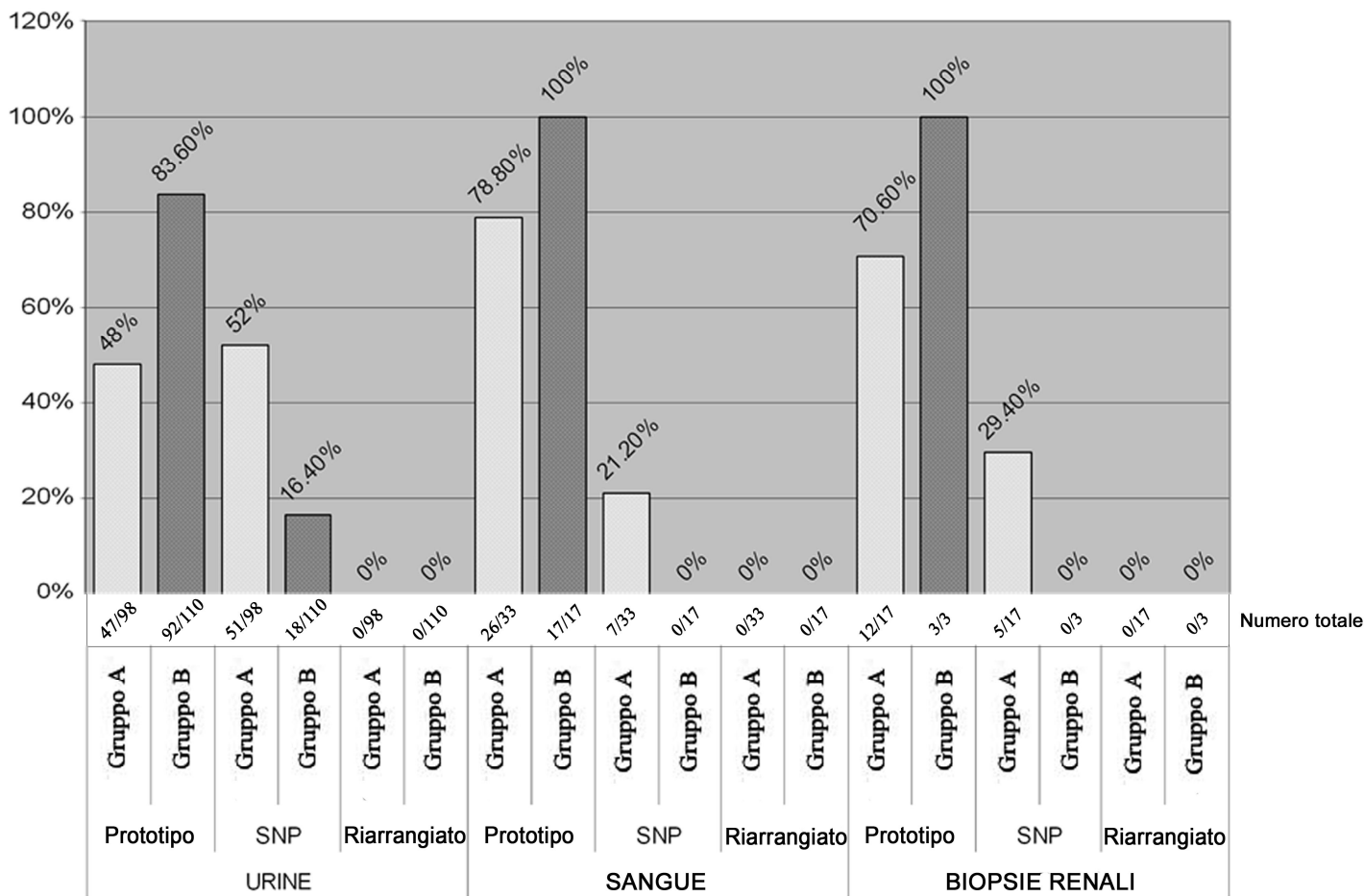


GRAFICO 3

Rappresentazione grafica delle mutazioni nella regione VP1 in campioni di urina, sangue e biopsie renali prelevate da pazienti con e senza PAN.

Proteina	Posizione aminoacidica											Numero di isolati e percentuale				
	62	63	68	69	73	74	75	77	78	80	82	Urine	Sangue	Biopsie renali		
Gruppo A	GS	Asn → Lys										Ser → Arg		4 (7,8%)	1 (4,3%)	0
	GS	Asn → Lys										Ser → Arg		2 (3,9%)	0	0
	GS											Ser → Arg		5 (9,8%)	0	0
	GS											Ser → Lys		1 (1,9%)	0	0
	GS							Asp → Asn				Asp → Asn		14 (27,5%)	3 (42,8%)	3 (60%)
	GS						Glu → Thr		Asp → Asn					3 (6%)	0	0
	MM				Lys → Arg	Glu → Ala								3 (6%)	1 (14,3%)	0
	MM				Lys → Arg									1 (1,9%)	0	1 (20%)
	IV													5 (9,8%)	0	0
	IV	Asp → Asn				Glu → Glu			Glu → Glu					6 (11,8%)	1 (14,3%)	0
	IV					Glu → Glu			Glu → Glu					0	0	1 (20%)
	MG	Asp → Asn					Trp → Ser							1 (1,9%)	0	0
	MG	Asp → Asn												1 (1,9%)	0	0
MG	Asp → Asn												3 (6%)	0	0	
MG	Asp → Asn				Glu → Lys								1 (1,9%)	0	0	
MG	Asp → Asn	Leu → Pro			Glu → Lys								1 (1,9%)	0	0	
MG	Asp → Asn				Glu → Arg								0	1 (14,3%)	0	
TOT.													51 (100%)	7 (100%)	5 (100%)	
Gruppo B	SB													Asp → Glu		0
	SB	Asp → Asn												Asp → Glu		0
	MM													Ser → Ile		0
	MM													Ser → Ile		0
	MM													Glu → Glu		0
	MM													Ser → Arg		0
	MM													Asp → Asn		0
	MM													3 (16,6%)	0	0
	IV	Asn → Lys	Asp → Asn			Glu → Lys								2 (11,1%)	0	0
	IV				Arg → Lys	Glu → Glu			Δ Ala					1 (5,5%)	0	0
	IV		Asp → Asn			Glu → Glu			Δ Ala					1 (5,5%)	0	0
	MG				Arg → Lys	Glu → Glu								1 (5,5%)	0	0
	MG				Arg → Lys	Glu → Glu								1 (5,5%)	0	0
MG				Arg → Lys	Glu → Glu								1 (5,5%)	0	0	
MG				Arg → Lys	Glu → Glu								1 (5,5%)	0	0	
GS					Glu → Glu	Asn → Lys							1 (5,5%)	0	0	
TOT.													18 (100%)	0	0	

TABELLA 9

Sostituzioni aminoacidiche nella proteina VP1 di campioni prelevati da pazienti con e senza PAN.

Legenda: acido → idrofilico acido → idrofobico idrofilico → basico
 acido → basico idrofilico → idrofobico Δ = delezione

No.	Prototipo	Stadio PAN	Urine	Sangue	Biopsia renale
1	Gruppo I (MM)	Prima	1 Prototipo	0	1 neg
		PAN	1 Prototipo	1 neg	1 Prototipo
		Dopo	2 neg 4 Prototipo	6 neg	2 neg
2	Gruppo IV (IV)	Prima	1 SNP 1792	1 Prototipo	
		PAN	1 Prototipo 1 SNP 1747;1780;1792	1 Prototipo 1 SNP 1747;1780;1792	1 Prototipo 1 SNP 1780;1792
		Dopo	7 Prototipo 3 SNP 1792 6 SNP 1747;1780;1792	2 Prototipo 1 neg	0
3	Gruppo I (GS)	Prima	1 SNP 1786	0	0
		PAN	1 SNP 1786	1 SNP 1786	1 Prototipo 1 SNP 1786
		Dopo	1 Prototipo 12 SNP 1786 3 SNP 1780;1781;1786	2 Prototipo 2 SNP 1786 7 neg	2 Prototipo 2 SNP 1786
4	Gruppo IV (MG)	Prima	1 Prototipo 1 SNP 1747;1751	1 Prototipo	0
		PAN	1 Prototipo 1 SNP 1747;1780	1 Prototipo	1 Prototipo
		Dopo	6 Prototipo 1 SNP 1747;1780;1792 1 SNP 1747 2 SNP 1747;1780 1 SNP 1747;1784	4 Prototipo 2 neg	1 Prototipo
5	Gruppo I (GS)	Prima	2 Prototipo	2 Prototipo	0
		PAN	1 Prototipo 1 SNP 1749;1794;1807	0	1 Prototipo
		Dopo	4 Prototipo 3 SNP 1749;1794;1807 2 SNP 1749 5 SNP 1794 1 SNP 1793;1794	2 Prototipo 1 SNP 1794;1807 6 neg	0
6	Gruppo I (MM)	Prima	2 Prototipo 1 SNP 1769	2 Prototipo 1 SNP 1769;1781	1 Prototipo 1 neg
		PAN	1 Prototipo 1 SNP 1769;1781	1 neg	1 Prototipo 1 SNP 1769
		Dopo	4 Prototipo 2 SNP 1769;1781	2 Prototipo 1 neg	0
7	Gruppo IV (IV)	Prima	1 Prototipo	1 Prototipo	0
		PAN	1 Prototipo	0	1 Prototipo
		Dopo	3 Prototipo	2 neg	0
8	Gruppo IV (MG)	Prima	2 Prototipo	2 Prototipo 1 SNP 1781	0
		PAN	1 Prototipo	1 Prototipo	1 Prototipo
		Dopo	2 Prototipo	2 Prototipo	0

TABELLA 10

Gruppi, sottotipi e cambiamenti nucleotidici nella sequenza della regione VP1 in campioni sequenziali di urine, sangue e biopsie renali prelevati prima, durante e dopo lo sviluppo di PAN.

Quantificazione virale e analisi dei loop esterni della proteina VP1

Per approfondire l'indagine sulla proteina VP1, tutti gli 8 pazienti del gruppo A sono stati analizzati e confrontati con 7 pazienti del gruppo B. I criteri di selezione sono stati i seguenti: età (media età al tempo del trapianto 55 anni; range 39-72), sesso (4 maschi e 3 femmine) e prelievo di almeno una biopsia renale durante lo studio.

I 15 campioni di urina sottoposti a indagine di Real-Time PCR (Tabelle 11 e 12) hanno mostrato un valore medio di infezione virale di $6,26 \times 10^8$ copie/mL nei campioni del gruppo A (range $1,25 \times 10^6 - 7,93 \times 10^9$), e un valore medio di $5,87 \times 10^6$ copie/mL nei pazienti del gruppo B (range $3,95 \times 10^4 - 2,97 \times 10^{10}$) (P=0,5).

Clonaggio e successivo sequenziamento hanno evidenziato la presenza di mutazioni nella regione VP1 in entrambi i gruppi, in particolare 6 di 8 campioni del gruppo A (75%) e 6 di 7 campioni del gruppo B (86%). Tutte le mutazioni osservate portavano a un cambiamento aminoacidico in alcuni dei loop di VP1 (BC, DE, EF), ma anche nei foglietti β che uniscono due loop (β -C, β -D, β -E, β -F). Le regioni dei loop BC e EF sono state maggiormente soggette a mutazioni (Tabella 13), mentre non sono state ritrovate mutazioni nei loop GH e HI. Tra i cambiamenti aminoacidici osservati, 6 presentavano un cambiamento di carica: 3 nel gruppo A e 3 nel gruppo B (Tabelle 11 e 12).

Nei pazienti del gruppo A sono state evidenziate un totale di 8 mutazioni, e 18 nel gruppo B. I due gruppi hanno presentato alcuni cambiamenti aminoacidici in comune, nel dettaglio: Asp→Glu in posizione 77 e Glu→Asp in posizione 82 per quanto riguarda il loop BC, Asp→Glu in posizione 175 e Val→Ile in posizione 210 nel loop EF. La frequenza di mutazioni variava da 1 a 4 nel gruppo A e da 1 a 2 nel gruppo B, le mutazioni più frequenti nel gruppo dei pazienti con nefropatia sono risultate essere quella in posizione 175 (Asp→Glu) e quella in posizione 210 (Val→Ile), mentre non è stato osservato un cambiamento aminoacidico maggiormente rappresentato nei campioni del gruppo B.

Paziente	Genotipo	Carica virale ^a	Sostituzioni aminoacidiche		
			Loop BC	Loop DE	Loop EF
1	I	6,06x10 ⁷	K69R	-	D175E, V210I
2	I	6,26x10 ⁸	E82D	<u>H139N</u>	D175E, V210I
3	I	7,20x10 ⁸	<u>D75N</u> , E82D	<u>H139N</u>	D175E, V210I
4	IV	1,78x10 ⁶	D77E	-	-
5	IV	6,30x10 ⁸	-	-	-
6	IV	n.d.	D77E, <u>E73Q</u>	-	-
7	I	7,93x10 ⁹	-	-	D175E, V210I
8	IV	1,25x10 ⁶	-	-	-

TABELLA 11

Genotipi, carica virale e sostituzioni aminoacidiche nella regione VP1 di BKV isolato nelle urine di pazienti con nefropatia associata a Polyomavirus.

Le sostituzioni aminoacidiche che portano a cambiamento di carica sono sottolineate.

n.d. = non determinato

a: copie/mL

Paziente	Genotipo	Carica virale ^a	Sostituzioni aminoacidiche						
			Loop BC	β -C	β -D	Loop DE	β -E	Loop EF	β -F
1	I	3,95x10 ⁵	-	-	-	-	-	D175E V210I	-
2	II	3,54x10 ⁸	-	-	-	E138Q	-	-	-
3	I	2,97x10 ¹⁰	-	-	-	-	-	-	-
4	IV	6,93x10 ⁵	N61D D62N D77G	-	-	-	V155I	E175D V178I I210V	Y225F
5	IV	3,24x10 ⁷	D77E	-	-	-	-	-	-
6	I	5,87x10 ⁶	E82D	-	-	-	-	D175E V210I	-
7	II	3,95x10 ⁴	-	L96P	K117Q	N139H V145I	-	Q175D I201V	Y225F

TABELLA 12

Genotipi, carica virale e sostituzioni aminoacidiche nella regione VP1 di BKV isolato nelle urine di pazienti non affetti da nefropatia associata a Polyomavirus.

Le sostituzioni aminoacidiche che portano a cambiamento di carica sono sottolineate.

n.d. = non determinato

a: copie/mL

Sostituzioni aminoacidiche	Loop	Frequenza
Gruppo A		
K69R, E73Q, D75N	BC	1/8
D77E, E82D	BC	2/8
H139N	DE	2/8
D175E, V210I	EF	4/8
Gruppo B		
N61D, D62N, D77G, D77E, E82D	BC	1/7
L96P	β -C	1/7
K117Q	β -D	1/7
E138Q, N139H, V145I	DE	1/7
V155I	β -E	1/7
D175E, V210I, I210V	EF	2/7
E175D, Q175D, V178I	EF	1/7
Y225F	β -F	2/7

TABELLA 13

Frequenza della distribuzione delle sostituzioni aminoacidiche osservate nella regione VP1 di BKV isolato in urine di pazienti del gruppo A e B

DISCUSSIONE

Regione regolatoria TCR

La regione regolatoria di BKV, localizzata tra l'origine di replicazione del DNA e il gene dell'agnoproteina, svolge importanti funzioni: prima fra tutte la regolazione della trascrizione delle regioni early e late, controllo della replicazione virale mediante sequenze promotrici e regolazione degli oncogeni (*c-myc*) e oncosoppressori (*p53* e *pRB*) della cellula ospite⁴⁸.

Sequenziando il DNA di differenti BKV è stato possibile osservare che le sequenze codificanti (Large-T, Small-t, agnoproteina e proteine capsidiche), presentano sequenze altamente conservate²², mentre la regione TCR è soggetta a considerevoli variazioni nella sequenza. Dopo che questi risultati furono per la prima volta osservati in cellule in vitro infettate con Polyomavirus, l'ipervariabilità della regione regolatoria è stata inizialmente interpretata come adattamento del virus alla situazione della coltura cellulare⁴⁹, tuttavia è stato osservato che, su sequenze di BKV isolato da individui sani o portatori di differenti patologie, le variazioni di sequenza possono incorrere naturalmente⁵⁰. Pertanto i meccanismi e il significato patologico di tali modificazioni geniche deve essere ancora chiarito: in un precedente studio abbiamo analizzato la frequenza delle variazioni di sequenze nella TCR di BKV in pazienti portatori di trapianto renale che hanno sviluppato PAN³⁷. È stata investigata la possibile correlazione tra le variazioni genomiche e la patogenesi del danno renale, ma, alla luce dei risultati ottenuti, non è stato possibile determinare la correlazione tra i due fattori.

Un punto cruciale nella diagnosi di PAN è il riconoscimento da campioni biotici di inclusi virali di BKV nelle cellule dell'epitelio tubulare renale o nelle cellule parietali della capsula di Bowman⁵¹. Metodi non invasivi, come l'analisi citologica di campioni di urine per la ricerca di decoy cells o PCR quantitativa su campioni di urine e sangue, sono utili per pazienti selezionati portatori di trapianto e a rischio di sviluppo di nefropatia, ma non permettono di dare una diagnosi definitiva della patologia⁵². Ciononostante, l'identificazione di ceppi di BKV nefritogenici o specifiche variazioni di sequenza nella regione TCR in campioni di urina o sangue di soggetti portatori di trapianto o con già diagnosi di PAN, mediante metodiche molecolari di PCR e analisi di sequenza, potrebbero avere un importante risvolto pratico nel diagnosticare la malattia senza la necessità di un esame invasivo come è la biopsia renale. Questo risultato è stato ottenuto, per esempio, nel caso di JCV associato a PML, sono stati infatti identificati nel liquido cerebrospinale ceppi virali detti propriamente PML-like, che hanno permesso l'identificazione e la corretta diagnosi della patologia senza ausilio di metodiche invasive.

Sulla base di queste considerazioni, è stato amplificata e successivamente sequenziata la

regione regolatoria virale isolata da campioni di urina, sangue e biopsie renali al fine di: 1) verificare possibili differenze di sequenza tra i pazienti con PAN e i portatori di trapianto che non hanno sviluppato la malattia; 2) identificare le variazioni di sequenza che possano essere caratteristiche dei soli pazienti con nefropatia; 3) stabile se l'analisi di sequenza della TCR di BKV possa essere di utilità nella definizione della diagnosi di PAN.

Per quanto riguarda il primo punto, i nostri risultati hanno mostrato che il genotipo BKV WWT è significativamente più frequente nei campioni di urine e sangue prelevati da pazienti del gruppo A e, dato interessante, WWT è stato isolato nei campioni di biopsie renali di pazienti con PAN, ma mai trovato nei campioni prelevati a pazienti del gruppo B. Inoltre WW e AS non furono mai isolati in pazienti del gruppo A, mentre furono frequentemente trovati nei campioni appartenenti al gruppo B.

Dato il largo numero di campioni di urina e sangue esaminati, è possibile ipotizzare che i genotipi di BKV non sono distribuiti casualmente tra le due popolazioni, anche se un legame preciso tra un particolare genotipo virale e il danno renale non può essere dimostrato con certezza. BKV WWT è stato per la prima volta isolato in Norvegia dal gruppo di Sundsfjord et al.⁵³ e venne considerato una variante dell'archetipo WW, che permetteva una attività di replicazione virale più efficiente nelle cellule ospiti. Olsen et al.⁵⁴ hanno recentemente riportato che WWT è stato il genotipo virale più frequentemente identificato in 11 pazienti portatori di trapianto renale (tra i quali 7 hanno sviluppato PAN), ma l'esiguo numero di campioni da loro analizzati e il ristretto gruppo di pazienti senza malattia, rende questo studio poco paragonabile al nostro.

L'analisi di sequenza della regione TCR dei BKV isolati in questo studio ha mostrato un buon numero di variazioni di sequenza, molte delle quali furono sostituzioni di singole basi nucleotidiche, ma sono stati trovati anche grossi riarrangiamenti, come per esempio delezione o duplicazione di blocchi di sequenza. Variazioni di sequenza sono state osservate in tutti i genotipi 128-I e in tutti tranne due WWT (isolati in campioni di urina del gruppo B), mentre AS e WW, che sono stati isolati solo nei pazienti del gruppo B, hanno mostrato una architettura archetipo in tutte le biopsie renali e nella maggioranza dei campioni di urine e sangue.

L'analisi di questi dati sembra escludere la possibilità che specifiche sostituzioni di paia di basi o grossi riarrangiamenti possano essere richiesti per lo sviluppo di PAN, ma il loro significato rimane controverso. Una review di Moens et al.⁵⁵ ha confermato che variazioni di sequenza possono essere osservate in campioni di vari tessuti provenienti da soggetti sani, portatori di trapianto con e senza PAN, pazienti immunocompromessi o immunocompetenti, pazienti con neoplasie o malattie autoimmuni; quindi, l'analisi di sequenza della regione TCR non è in grado di predire il tropismo cellulare o la malattia mediante uno specifico genotipo. Anche Sharma et al.⁵⁰

sono giunti a una simile conclusione. Essi hanno condotto una meta-analisi di 507 sequenze di TCR: nonostante le variazioni della sequenza furono molto frequenti in campioni prelevati da pazienti con PAN rispetto a quelli presentanti viruria ma asintomatici, non è stato possibile determinare una associazione causa-effetto nella patogenesi del danno renale causato da Polyomavirus. Una possibile spiegazione (fornita da Moens et al.⁵⁵) è che il danno renale è associato a una elevata attività virale e a un gran numero di copie virali, portando così ad aumentare la probabilità di ricombinazione del genoma del virus. Tuttavia, quando in un precedente lavoro³⁷ abbiamo paragonato le variazioni di sequenza con la carica virale (valutata come numero di decoy cells), non è stata osservata nessuna relazione poiché variazioni di sequenza furono trovate sia in presenza che in assenza di decoy cells.

Un altro punto interessante del presente studio è che il genotipo WWT isolato da biopsie renali dei pazienti del gruppo A ha mostrato sempre singole sostituzioni di basi nucleotidiche quando identificato da solo (senza coinfezione con JCV), tale risultato avvalorava il lavoro di Randhawa et al.¹⁵, i quali hanno osservato che singole sostituzioni di basi furono il più frequente riarrangiamento in campioni di 26 biopsie renali prelevate da 15 pazienti con PAN.

Infine, molti pazienti con coinfezione BKV-JCV in entrambi i gruppi hanno mostrato un genotipo 128-I riarrangiato. Il significato di questa osservazione non è ben chiaro, ma può essere ipotizzato che 128-I necessiti della coinfezione con JCV per persistere nel paziente con trapianto renale, oppure che ci sia reciproca interazione tra i due Polyomavirus, come già riportato per altri virus⁵⁶.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che le variazioni di sequenza nella regione TCR di BKV sono frequenti in pazienti portatori di trapianto renale indipendentemente dallo sviluppo di PAN; inoltre, nonostante l'esiguo numero di pazienti che hanno sviluppato PAN non consenta di giungere a conclusioni definitive, la prevalenza del genotipo WWT nel tessuto renale dei pazienti del gruppo A suggerisce una associazione tra il genotipo e lo sviluppo della patologia. Analisi di sequenza della TCR di BKV isolati da pazienti portatori di trapianto potrebbe essere utile per predire lo sviluppo di danno renale ma non sembra essere essenziale per una definitiva diagnosi di PAN.

Regione proteina capsidica VP1

La regione VP1 di BKV codifica per la proteina capsidica maggiore, che gioca un ruolo strutturale nell'architettura virale e presenta diversi epitopi antigenici cruciali per il riconoscimento della cellula bersaglio. Polimorfismi nucleotidici nella sequenza genomica compresa tra il nucleotide 1744 e il 1812, vengono usati per identificare i gruppi (I-IV) e i

sottotipi (DUN, PT, MM, GS, SB, AS, IV, MG) di BKV²². Il gruppo I è il più rappresentato nella popolazione umana, seguito dal II, IV e III; ci sono significative differenze geografiche, come anche differenze tra trapiantati renali e di midollo osseo, ma non ci sono abbastanza evidenze che mettano in relazione il gruppo o il sottotipo di BKV con la sua riattivazione, con una particolare malattia o particolari gruppi di pazienti immunodepressi²².

In questo studio è stata esaminata la distribuzione dei gruppi e dei sottotipi di BKV in 8 pazienti con PAN e comparati con 218 pazienti portatori di trapianto renale ma che non hanno sviluppato nefropatia. Sono state evidenziate differenze statisticamente significative nei BKV isolati dai campioni di urina (prevalenza di GS e IV nel gruppo A, e prevalenza di MM nel gruppo B) e dai campioni di sangue (GS nel gruppo A). Tuttavia, sebbene i sottotipi di BKV si sono rivelati costanti nei campioni prelevati in tempi diversi dallo stesso paziente, il ridotto numero (N=8) di pazienti affetti da PAN osservati nel nostro studio, potrebbe indicare che queste differenze possano semplicemente riflettere la variabilità geografica dei BKV circolanti nella popolazione, come evidenziato anche da studi epidemiologici⁵⁷.

Analisi di sequenze del gene della VP1 hanno mostrato che mutazioni di basi nucleotidiche sono frequenti in campioni di urina di entrambi i gruppi, ma sono rari in campioni di sangue e biopsie renali dei pazienti del gruppo A, e mai trovati in campioni prelevati dai pazienti del gruppo B. Occorre sottolineare che cambiamenti aminoacidici sono casualmente distribuiti nei pazienti senza PAN, mentre la mutazione da acido aspartico in asparagina al residuo 75 è il cambiamento più frequentemente trovato nei campioni di urina, sangue e biopsia renale prelevati dai pazienti con PAN. Sono stati inoltre osservati delle particolari posizioni sul gene della VP1 che possono essere definite "hot spots": le posizioni 62, 73 e 77 nei pazienti del gruppo A, e le posizioni 69, 73 e 77 nei pazienti del gruppo B.

A causa dei pochi dati presenti in letteratura che comparino la sequenza della regione VP1 in campioni di urine, sangue e biopsie renali prelevati da pazienti con e senza nefropatia associata a Polyomavirus in un determinato arco di tempo, i risultati ottenuti in questo lavoro sono poco confrontabili con quelli di altri autori; Zheng et al.⁵⁸ hanno studiato il significato di mutazioni nella regione VP1 di un altro polyomavirus umano - JCV - in pazienti affetti da leucoencefalopatia progressiva multifocale, osservando mutazioni più frequenti nei casi a lunga sopravvivenza, suggerendo una associazione per alcune di queste mutazioni con la progressione della malattia.

Randhawa et al.⁵⁹ hanno invece sequenziato la regione VP1 di BKV isolato da 49 biopsie renali prelevate a 24 pazienti affetti da PAN, raccolte in tempi diversi durante lo sviluppo della patologia (non sono stati riportati dati relativi a urine e sangue), e hanno osservato frequenti mutazioni di basi nucleotidiche e cambiamenti aminoacidici; inoltre, l'esame dei dati in tempi

differenti ha mostrato che la struttura genetica del virus è in continua evoluzione in relazione allo sviluppo della malattia. Hanno quindi ipotizzato che l'instabilità genetica e proteica della VP1 potrebbe avere implicazioni nel superare l'autoimmunità dell'ospite e sviluppare resistenza ai farmaci antivirali. I nostri risultati hanno mostrato che cambiamenti genomici spesso portano a cambiamenti nella sequenza aminoacidica, ma i più importanti cambiamenti (sostituzione di una serina idrofilica in una isoleucina idrofobica, e delezione di una alanina) sono stati trovati solamente nei pazienti senza nefropatia.

A tuttora non siamo in grado di spiegare il reale significato dei cambiamenti aminoacidici descritti in questo studio, ma Freund et al.¹⁶ hanno osservato che cambiamenti nella sequenza della proteina incorrono in specifiche posizioni nel gene VP1, portando a formazione di placche in vitro e emoagglutinazione. Quindi ancora non è chiaro se simili cambiamenti nella regione VP1 di BKV isolati da pazienti portatori di trapianto renale, possano aver un ruolo nello sviluppo della nefropatia associata a Polyomavirus, inoltre, sebbene siano state osservate alcune differenze nella distribuzione delle mutazioni di basi nucleotidiche e sostituzioni aminoacidiche tra i due gruppi di pazienti analizzati, non ci sono chiare evidenze che mettano in relazione specifiche mutazioni o cambiamenti con il rischio di sviluppare la patologia.

Analisi dei loops esterni della proteina VP1

Per approfondire l'indagine sulla regione VP1, sono stati analizzati i loops esterni della proteina in 8 campioni di urina dei pazienti affetti da nefropatia associata a Polyomavirus, e in 7 di pazienti controllo senza evidenza di nefropatia. Tra tutti i campioni di urina prelevati durante i controlli periodici, sono stati selezionati soltanto quelli concomitanti alla biopsia renale che, nel caso dei pazienti del gruppo A, aveva diagnosticato la patologia.

Queste ulteriori indagini hanno evidenziato la presenza dei gruppi I e IV nei campioni di urina di entrambi i gruppi. I dati relativi ai pazienti con nefropatia corrispondono a quanto precedentemente riportato in letteratura da Baksh et al.²³ e da Randhawa et al.⁵⁹, i quali hanno descritto una maggiore frequenza dei gruppi I e IV in pazienti affetti da PAN. Tuttavia, per quanto riguarda i pazienti del gruppo B i dati ottenuti in questo studio sono in contrasto da quelli precedentemente riportati da Di Taranto et al.⁶⁰, che hanno analizzato la frequenza di distribuzione di BKV in bambini italiani sani e infetti da HIV, evidenziando che il gruppo più frequentemente rappresentato è il gruppo I, seguito dai gruppi III e IV. Ciononostante la differenza tra i dati ottenuti nel presente lavoro e quelli presenti in letteratura può essere dovuta al basso numero di campioni arruolati in questo studio.

L'analisi mutazione della sequenza dei loops esterni della proteina VP1 ha evidenziato diversi siti di mutazione, prevalentemente associati ai loops BC, DE e EF in entrambi i gruppi di

pazienti. Rare eccezioni sono state delle mutazioni osservate nelle regioni a foglietti β in campioni di pazienti senza nefropatia.

Le mutazioni riscontrate nei campioni appartenenti al gruppo B sono più numerose rispetto ai pazienti affetti da PAN, ma allo stesso tempo più sporadiche. Le mutazioni riscontrate più frequentemente sono state D175E e V210I. Questi dati rispecchiano altri studi in letteratura⁶¹ che identificano gli stessi siti di mutazione, suggerendo che le posizioni 175 e 210 possano essere considerate degli “hot spot” soggette ad alta variabilità tra i differenti isolati di BKV. Due mutazioni osservate nei pazienti del gruppo A (K69R e D75N) sono già state precedentemente riportate in letteratura^{23,59}. Recenti studi in vitro hanno dimostrato che il residuo 69 risulta importante per la sopravvivenza virale, in quanto sembra che una sostituzione aminoacidica in tale posizione riduca la diffusione virale e la capacità del virus di legare il recettore⁶².

Ad oggi in letteratura non si sono potuti osservare lavori che analizzino lo stato mutazionale dei loops di VP1 comparando due gruppi di pazienti. E' stato interessante osservare che molte mutazioni riscontrate nel nostro studio in pazienti affetti da PAN erano state già precedentemente riportate in letteratura^{23,59,63}, tuttavia non è stato possibile determinare un'associazione tra specifiche mutazioni e sviluppo di nefropatia associata a Polyomavirus.

Quantificazione delle copie virali

L'analisi di quantificazione delle copie virali mediante Real-Time PCR ha evidenziato che la media della carica virale nei campioni di urine dei pazienti del gruppo A risultava essere maggiore, anche se non statisticamente significativa, dei campioni del gruppo B. Precedenti studi hanno proposto di utilizzare la carica virale in campioni di urina come marcatore predittivo per lo sviluppo di nefropatia associata a Polyomavirus, determinando un cut-off di 10^7 copie/mL⁶⁴. Tuttavia nel presente lavoro sono stati trovati valori superiori alle 10^7 copie/mL sia nei pazienti con nefropatia, sia nei campioni di controllo. Questo dato supporta le recenti affermazioni che la carica virale in campioni di urina non è predittiva per lo sviluppo di PAN⁶⁵, pertanto negli ultimi anni è stato proposto di utilizzare come marcatore indicativo di possibile sviluppo di malattia la carica virale in campioni di sangue periferico⁶⁶.

Concludendo, occorre sottolineare che l'analisi mutazionale tramite clonaggio genico e la quantificazione virale sono state condotte su di un ristretto numero di pazienti e non sull'intera coorte analizzata in partenza, pertanto, al fine di ottenere risultati più significativi, è necessario in primo luogo ampliare la casistica dei pazienti affetti da patologia, analizzare un numero maggiore di

pazienti controllo già arruolati nello studio, e, infine, analizzare nel dettaglio oltre ai campioni di urina anche campioni di sangue periferico e di biopsie renali.

BIBLIOGRAFIA

1. Van Regenmortel, M.H.V., Fouquet, C.M. e Bishop, D.H.L. (2000) *Virus Taxonomy: The classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Virus Taxonomy, VIIth report of the ICTV. Academic Press, San Diego
2. Knowles WA. *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspectives*, 1st Ed., Wiley-Liss, New York, NY 2001; 45-51
3. Zu Rhein GM. *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspectives*, 1st Ed., Wiley-Liss, New York, NY 2001; 11-23
4. Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ. Early events during BK virus entry and disassembly. *Virology* 2009;384:266-273
5. Ferber D. Science and government. HHS intervenes in choice of study section members. *Science* 2002;296:1012-1014
6. Bocchetta M, Di Resta I, Powers A, et al. Human mesothelial cells are unusually susceptible to simian virus 40-mediated transformation and asbestos cocarcinogenicity. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:10214-10219
7. Cole, C.N., Conzen, S.D. (2001) In: *Fields Virology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, PA, 2141-2166
8. Hirsch HH, Steiger J. Polyomavirus BK. *Lancet Infect Dis* 2003;3:611-623
9. Shah KV. *Fields Virology*, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, PA 2001; 2175-2196
10. Ault GS, Stoner GL. Human polyomavirus JC promoter/enhancer rearrangement patterns from progressive multifocal leukoencephalopathy brain are unique derivatives of a single archetypal structure *J Gen Virol* 1993;74:1499-1507
11. Moens U, Johansen T, Johnsen JI, Seternes OM, Traavik T. Noncoding control region of naturally occurring BK virus variants: sequence comparison and functional analysis. *Virus Gen*. 1995;10:261-275
12. Yogo Y, Yitamura T, Sugimoto C, Ueki T, Aso Y, Hara K, Taguchi F. Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *J Virol*. 1990;64:3139-3143
13. Yogo Y, Sugimoto C. *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspectives*, 1st Ed., Wiley-Liss, New York, NY 2001; 127-148
14. Kim HS, Henson JW, Frisque RJ. *Human Polyomavirus: molecular and clinical perspectives*, 1st Ed., Wiley-Liss, New York, NY 2001; 73-114

15. Randhawa P, Zygmunt D, Shapiro R, Vats A, Weck K, Swalsky P, Finkelstein S. Viral regulatory region sequence variations in kidney tissue obtained from patients with BK virus nephropathy. *Kidney Int.* 2003;64:743-747
16. Freund R, Garcea RL, Sahli R, Benjamin TL. A single-amino-acid substitution in polyoma virus VP1 correlates with plaque size and hemagglutination behaviour. *J Virol* 1991;65:350-355
17. Gee GV, Tsomaia N, Mierke DF, Atwood WJ. Modeling a sialic acid binding pocket in the external loops of JC virus VP1. *J Biol Chem* 2004;279:49173-49176
18. Sinibaldi L, Goldoni V, Pietropaolo V, Longhi C, Orsi N. Involvement of gangliosides in the interaction between BK virus and Vero cells. *Arch Virol* 1990;113:291-296
19. Dugan AS, Eash S, Atwood WJ. An N-linked glycoprotein with $\alpha(2,3)$ -linked sialic acid is a receptor for BK virus. *J Virol* 2005;79:14442-14445
20. Stehle T, Harrison C. High-resolution structure of a Polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implication for assembly and receptor binding. *EMBO* 1997;16:5139-5148
21. Low JA, Magnuson B, Tsai B, Imperiale MJ. Identification of gangliosides GD1b and GT1b as a receptors for BK virus. *J Virol* 2006;80:1361-1366
22. Jin L, Gibson PE, Booth JC, Clewley JP. Genomic Typing of BK Virus in Clinical Specimens by Direct Sequencing of Polymerase Chain Reaction Products. *J Med Virol* 1993;41:11-17
23. Baksh FK, Finkelstein SD, Swalsky PA et al. Molecular genotyping of BK and JC viruses in human Polyomavirus-associated nephritis after renal transplantation. *Am J Kid Dis* 2001;38:354-365
24. Negrini M, Sabbioni S, Arthur RR, Castagnoli A, Barbanti-brodano G. Prevalence of the archetypal regulatory region and sequence polymorphisms in nonpassaged BK virus variants. *J Virol* 1991;65:5092-5095
25. Shah KV, Human polyomavirus BKV and renal disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2000;15:754-755
26. Goudsmit J, Wertheim-van Dillen P, Van Strien A, Van der Noordaa, J. The role of BK virus in acute respiratory tract disease and the presence of BKV DNA in tonsils. *J Med Virol* 1982;10:91-99
27. Monaco MCG, Jensen PN, Hou J, Durham LC, Major EO. Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: evidence for site of initial viral infection *J. Virol.* 1998;72:9918-9923
28. Possati L, Bartolotta E. Attempts to isolate BK virus from children affected by various diseases. *Acta Virol* 1981;25:254-255

29. Brown P, Tsasi T, Gajdusek DC. Seroepidemiology of human papovaviruses. Discovery of virgin populations and some unusual patterns of antibody prevalence among remote peoples of the world. *Am J Epidemiol* 1975;102:331-340
30. Pietropaolo V, Di Taranto C, Degener AM, Jin L, Sinibaldi L, Baiocchini A, Melis M, Orsi N. Transplacental transmission of human polyomavirus BK. *J. Med. Virol.* 1998;56:372-376
31. Rziha HJ, Bornkamm GW, Zur Hausen H. BK virus: I. Seroepidemiologic studies and serologic response to viral infection. *Med Microbiol Immunol.* 1978;165:73-81
32. Boldorini R, Veggiani C, Amoruso E et al. Latent human polyomavirus infection in pregnancy: investigation of possible transplacental transmission. *Pathology* 2008;40:72-77
33. Drachenberg CB, Papadimitriou JC, Wali R, Cubitt L, Ramos E. BK polyoma virus allograft nephropathy: ultrastructural features from viral cell entry to lysis. *Am J Transplantation* 2003;3:1383-1392
34. Eash S, Quebers W, Atwood WJ. Infection of Vero cells by BK virus is dependent on caveolae. *J Virol* 2004;78:11583-11590.
35. Pullmans L, Putener D, Helenius A. Local actin polymerization and dynamo recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* 2002;296: 535-539
36. Griffith GR, Marriott SJ, Rintoul DA, Consigli RA. Early event in polyomavirus infection: fusion of monopinocytotic vesicles containing virions with mouse kidney cell nuclei. *Virus Res* 1988;10:41-52
37. Boldorini R, Veggiani C, Barco D, Monga G. Are sequence variations in the BK virus control region essential for the development of polyomavirus nephropathy? *Am J Clin Pathol.* 2005;124:303-312
38. Ferrante P, Caldarelli-Stefano R, Omodeo-Zorini E, Vago L, Boldorini R, Costanzi G. PCR detection of JC virus DNA in brain tissue from patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Med Virol.* 1995;47:219-225
39. Delbue S, Pagani E, Guerini FR, Agliardi C, Mancuso R, Borghi E, Rossi F, Boldorini R, Veggiani C, Car PG, Ferrante P. Distribution, characterization and significance of polyomavirus genomic sequences in tumors of the brain and its covering. *J Med Virol.* 2005;77:447-454
40. White, K.M. and Khalili, K. Polyomaviruses and human cancer: molecular mechanisms underlying patterns of tumorigenesis. *Virology* 2004;324:1-16
41. Binet I, Nickenleit V, Hirsch HH, Prince O, Dalqueen P, Gudat R, Mihatsch JM, Tiel G. Polyomavirus disease under new immunosuppressive drugs: a cause of renal graft dysfunction and graft loss. *Transplantation* 1999;67:918-922

42. Boubenider S, Hiesse C, Marchand S, Hafi A, Kriaa F, Charpentier B. Post-transplantation polyomavirus infections. *J Nephrol.* 1999;12:24-29
43. Nickeleit V, Hirsch HH, Binet I, Gudat F, Prince O, Dalquen P, Thiel G, Mihatsch MJ. Polyomavirus infection of renal allograft recipients: from latent infection to manifest disease. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:1080-1089
44. Randhawa P, Baksh F, Aoki N, Tschirhart D, Finkelstein S. JC virus infection in allograft kidneys: analysis by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Transplantation* 2001;71:1300-1303
45. Ahuja M, Cohen EP, Dayer AM, Kampalath B, Chang CC, Bresnahn BA, Hariharan S. Polyoma virus infection after renal transplantation. Use of immunostaining as a guide to diagnosis. *Transplantation* 2001;71:896-899
46. Koss, L. (1979) *Diagnostic cytology and its histopathologic bases*, 3rd Ed., Lippincott JB, Philadelphia, PA 711-741
47. Nickeleit, V., Singh, H.K., Mihatsch M.J. Latent and productive polyomavirus infections of renal allografts: morphological, clinical, and pathophysiological aspects. *Adv Exp Med Biol* 2006;577:190-200
48. Moens U, Rekvig OP. Molecular Biology of BK Virus and clinical and basic aspects of BK Virus renal infection. In: Khalili K, Stoner GL, eds. *Human Polyomaviruses: Molecular and Clinical Perspectives*. New York, NY: Wiley-Liss Inc; 2001:359-408
49. Ferguson AT, Subramani S. Complex functional interactions at the early enhancer of the PQ strain of BK virus. *J Virol.* 1994;68: 4274-4286
50. Sharma PM, Gupta G, Vats A, Shapiro R, Randhawa PS. Polyomavirus BK non-coding control region rearrangements in health and disease. *J Med Virol.* 2007;79:1199-1207
51. Nickeleit V, Singh HK, Mihatsch MJ. Polyomavirus nephropathy: morphology, pathophysiology, and clinical management. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2003;12:599-605
52. Trofe J, Hirsch HH, Ramos E. Polyomavirus-associated nephropathy: update of clinical management in kidney transplant patients. *Transpl Infect Dis.* 2006;8:76-85
53. Sundsfjord A, Johansen T, Flaegstad T et al. At least two types of control regions can be found among naturally occurring BK virus strains. *J Virol.* 1990;64:3864-3871
54. Olsen GH, Andresen PA, Hilmarsen HT, et al. Genetic variability in BK Virus regulatory regions in urine and kidney biopsies from renal-transplant patients. *J Med Virol.* 2006;78:384-393

55. Moens U, Van Ghelue M. Polymorphism in the genome of non-passaged human polyomavirus BK: implications for cell tropism and the pathological role of the virus. *Virology*. 2005;331:209-231
56. Woodman CBJ, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issue. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:11-22
57. Knowels WA. The epidemiology of BK virus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes, In: Khalili K, Stoner GL, (eds). *Human Polyomaviruses – Molecular and clinical perspectives*. Wiley-Liss Inc: New York; 2001. pp 527-559
58. Zheng HY, Ikegaya H, Takasaka T, et al. Characterization of the VP1 loop mutations widespread among JC Polyomavirus isolates associated with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:996-1002
59. Randhawa P, Khaleel-Ur-Rehman K, Swalsky P, et al. DNA sequencing of viral capsid protein VP-1 region in patients with BK virus interstitial nephritis. *Transplantation* 2002;73:1090-1094
60. Di Taranto C, Pietropaolo V, Orsi GB, et al. Detection of BK Polyomavirus genotypes in healthy and HIV-positive children. *Eur J Epidemiol* 1997;13:653-657
61. Chen Y, Sharp PM, Fowkes M, et al. Analysis of 15 novel full-length BK virus sequences from three individuals: evidence of a high intra-strain genetic diversity. *J Gen Virol* 2004;85:2651-2663
62. Dugan A, Gasparovic ML, Tsomaia N, et al. Identification of amino acid residues in BK virus VP1 critical for viability and growth. *J Virol* 2007;81:350-355
63. Krautkrämer E, Klein TM, Sommerer C, et al. Mutation in BC loop of the BKV VP1 region do not influence viral load in renal transplant patients. *J Med Virol* 2009;81:75-81
64. Randhawa P, Ho A, Shapiro R, et al. Correlates of quantitative measurement of BK Polyomavirus (BKV) DNA with clinical course of BKV infection in renal transplant recipients. *J Clin Microbiol* 2004;42:1176-1180
65. Bressollette-Bodin C, Coste-Burel M, Hourmant M, et al. A prospective longitudinal study of BK virus infection in 104 renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005;5:1926-1933
66. Hirsh HH, Knowels W, Dickenmann M, et al. Prospective study of Polyomavirus type BK replication and nephropathy in renal-transplant recipients. *New Engl J Med* 2002;347:488-496

ATTIVITA'FORMATIVA

I anno

- 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

II anno

- 19/12/2007 *Human Papilloma viruses loads and its association with non melanoma skin cancer*
- 14/01/2008 *Biologia molecolare e genetica in ambito forense, principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche* – Dott. Giorgio Portera
- 21/01/2008 *K⁺ channels in the heart: in and out of control* – Dr. Susanne Radicke
- 23/01/2008 *Integrin trafficking and tumor cells invasiveness* – Dr. Jim Norman
- 24/01/2008 *La microscopia a forza atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni* – Dott. Mario Raspanti
- 06/02/2008 *Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo* – Dott. Gianluca DeBellis
- 07/02/2008 *La proteina HMGB1 e un segnale di danno tissutale* – Prof. M.E. Bianchi
- 28/02/2008 *Caratterizzazione molecolare della leucemia linfatica cronica* – Prof. Valter Gattei
- 05/03/2008 *Analytic vaccinology and human citomegalovirus monoclonal antibodies as tool to identify novel antigens for protective vaccination*
- 06/03/2008 *Applications of gene expression profile to cancer research* – Dott. Enzo Medico
- 07/03/2008 *Fatty liver preservation against ischemia reperfusion injury* – Dott. Joan Rossello Catafau
- 13/03/2008 *Il sistema Ghrelin: aspetti endocrini e metabolici* – Prof. C. Guana
- 13/03/2008 *To repress gene expression just take out vinegar role of the class 2 histone deacetylase HDAC4* – Prof. Claudio Brancolini
- 20/03/2008 *Immunologia della psoriasi*
- 03/04/2008 *Mutazioni del gene dell'insulina come causa di diabete neonatale/infantile un nuovo esempio da malattia da misfolding*
- 09/04/2008 *Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria* – Prof. Gaetano Cairo
- 14/04/2008 *Interazione tra tumori e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica: il ruolo della via metabolica del mevalonato* – Dott. Massimo Massaia
- 17/04/2008 *Epidemiologia dell'infezione da HPV e del cancro della cervice uterina: un modello dinamico* – Dott. Iacopo Baussano
- 24/04/2008 *Ghrelin e pancreas endocrine*
- 15/05/2008 *The mechanisms of cell infection with Hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions*

- 22/05/2008 *La ricerca farmacologica, dal laboratorio alla clinica*
- 23/05/2008 *Sistema degli endocannabinoidi nuovo target terapeutico per l'obesità e le sue complicanze cardio-metaboliche*
- 26/05/2008 *Copy number variations: non solo ritardo mentale* – Prof.ssa Orsetta Zuffardi
- 3-11/06/2008 *Il trasferimento tecnologico dall'università all'impresa* – Prof. Gastaldi, Dott. Conicella, Dott. Romani, Dott. Baldi
- 05/06/2008 *Cap-analysis gene expression (CAGE) analysis of transcriptional complexity and regulation* – Dr. Piero Carninci
- 12/6/2008 *mechanical ventilation and multiple organ failure*
- 13/06/2008 *Problem solving in patologia epatica* – Prof. Gavino Faà
- 26/06/2008 *Tecniche FISH nello studio di linfomi non-Hodgkin* – Dott.ssa Maria Grazia Tibiletti
- 03/07/2008 *Recenti aspetti in tema di malattie uromodulina associate*
- 1/7/2008 *Recombinant protein expression* – Prof. Andrew Bradbury
- 2/7/2008 *Recombinant antibodies and other affinity reagents* – Prof. Andrew Bradbury
- 16/7/2008 *Display technologies: phage, yeast, bacteria and ribosoma* – Prof. Andrew Bradbury
- 18/7/2008 *Fluorescent protein* – Prof. Andrew Bradbury

III anno

- 12/12/2008 *Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche* – Prof. Antonio Uccelli
- 15/12/2008 *Interazioni geni - ambiente nella eziologia della SM: studi sui gemelli* – Prof. Marco Solveti
- 09/01/2009 *La malattia celiaca* – Prof. Riccardo Troncone
- 13/01/2009 *Porpora trombocitopenica autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici* – Prof. Francesco Zaja
- 27/01/2009 *Interazioni geni - ambiente nella eziologia della sclerosi multipla: studi sui gemelli* – Marco Solveti
- 20/02/2009 *When a fine tuner of signaling pathways becomes a dangerous amplifier: the case of the Prolyl-isomerase Pin1 in cancer* – Prof. Giannino Del Sal
- 19/03/2009 *Le nanotecnologie applicate alla medicina* – Prof. G. Peluso

- 22/04/2009 *Patologia dei tumori cerebrali. Recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi* – Prof. Davide Schiffer
- 30/04/2009 *Polarized inflammation in tumour development* – Antonio Sica
- 05/05/2009 *Effetti anti-steatogeni ed anti-tumorali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo* – Prof. Amedeo Columbano
- 06/05/2009 *Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: design of stimuli-responsive nanomaterials for cancer diagnosis and therapy* – Dott.ssa Barbara Palazzo
- 14/05/2009 *Functional Genomics of Brain* – Prof. Stefano Gustincich
- 03/06/2009 *Role of Raf in tumorigenesis* – Prof. M. Beccarini
- 10/06/2009 *Marcatori molecolari nel carcinoma coloretale: dalla teoria alla pratica clinica* – Dott. Milo Frattini

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
- IV INTERNATIONAL CONFERENCE ON POLYOMAVIRUSES AND HUMAN DISEASE, Barcellona (ES), 30/09 – 01/10/2007
- LA BIOLOGIA MOLECOLARE NELLA CARATTERIZZAZIONE DEI TUMORI, Aula CeRMS, Azienda Ospedaliera San Giovanni Battista, Torino (IT), 16/04/2008
- VERSO LA PERSONALIZZAZIONE DEL TRATTAMENTO MEDICO DEL CARCINOMA POLMONARE, Palazzina della Facoltà di Medicina e Chirurgia, Ospedale di Orbassano – Torino (IT), 27/02/2009

CORSI

- “REAL TIME PCR – ABI PRISM 7500 COURSE”, Applied Biosystems, Monza (IT), 21-22/04/2008

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

A) Comunicazioni presentate personalmente (orali o poster)

Miglio U, Allegrini S, Veggiani C, Paganotti A, Boldorini R.

Sequence variation in the regulatory region of human Polyomavirus isolated from kidney transplant recipient.

IV International conference on Polyomaviruses and human diseases.

Barcellona (ES), 02/10/2007

Miglio U.

Diagnostiche molecolari in Anatomia Patologica - Tumore polmonare non a piccole cellule e Mycobatteriosi (Corso ECM per operatori della sanità).

Azienda Ospedaliero Universitaria “Maggiore della Carità”

Novara (IT), 2/11/2007 – 21/02/2008 – 22/05/2008

B) Altre comunicazioni

Allegrini S., Veggiani C., Amoruso E, **Miglio U.**, Paganotti A., Ribaldone E R, Boldorini R.
Human polyomavirus infection and pregnancy: investigation on possible vertical transmission.
IV International conference on Polyomaviruses and human diseases. Barcellona (ES), 01/10/2007

Boldorini R., **Miglio U.**, Allegrini S., Veggiani C., Paganotti A.
Sequence variation in the regulatory region of BK virus isolated from kidney transplant recipient.
Primo congresso internazionale sulla ricerca internazionale. Padova (IT), 12/06/2007

POSTER

Boldorini R., Allegrini S., **Miglio U.**, Paganotti A., Veggiani C.
Frequency of Polyomavirus detection in surgical samples of unselected human tumours. (poster)
IV international conference on Polyomaviruses and human diseases, Barcellona, 03/10/2007

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*, 2008; 40(1): 72-77

Review: *“Complication post renal transplantation: letterature focus on BK virus nephropathy and diagnostic tools actually available”*, Mischitelli M, Bellizzi A, Anzi vino E, Fioriti D, Boldorini R, **Miglio U**, Chiarini F, Di Monaco F, Pietropaolo V. *Virology Journal*, 2008; 5: 38-43

“Detection, distribution and patologica significance of BK virus strains isolated from patients with kidney transplants, with and without Polyomavirus-associated nephropathy”, Boldorini R, Allegrini S, **Miglio U**, Paganotti A, Veggiani C. *Arch Pathol Lab Med*, 2009; 133: 766-774

“Genomic mutations of viral protein 1 do not affect the development of BK virus nephropathy in kidney transplant recipients” Boldorini R, Allegrini S, **Miglio U**, Paganotti A, Veggiani C, Mischitelli M, Pietropaolo V, Monga G. *J Med Virol*, 2009; 81: 1385-1393

“Polyomavirus infection in bone marrow transplants: JC virus that involved?” Mischitelli M, Fioriti D, Anzivino E, Bellizzi A, Barucca V, Boldorini R, **Miglio U**, Sica S, Sorà F, De Matteis S, Chiarini F, Pietropaolo V. *J Med Virol*, In Press

“Mutation in the external loops of BK Virus VP1 and urine viral load in renal transplant recipients” Tremolada S, DelBue S, Castagnoli L, Allegrini S, **Miglio U**, Boldorini R, Elia F, Gordon J, Ferrante P. *J Cell Physiol*, In Press