



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

Dottorato di ricerca in Scienze Infettivologiche - XXVI ciclo

Coordinatore: Prof. Vincenzo Vullo

Dipartimento di Sanità Pubblica e Malattie Infettive

Riattivazione del Polyomavirus umano JC in pazienti affetti da malattie immuno-mediate e trattati con farmaci biologici: analisi di sequenza della *Non Coding Control Region* virale ed indagine immunofenotipica.

Dottorando: Anna Bellizzi

Tutors: Prof.ssa Maria R. Ciardi
Prof.ssa Valeria A. Pietropaolo

A.A. 2012-2013

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE	4
1.1 I Polyomavirus umani.....	8
1.2 Il Polyomavirus umano JC.....	11
1.2.1 <i>Struttura e genoma del virus JC</i>	12
1.2.2 <i>Regione di controllo non codificante (NCCR).....</i>	14
1.2.3 <i>Le proteine precoci</i>	16
1.2.4 <i>Le proteine tardive</i>	19
1.2.5 <i>La classificazione genotipica di JCV</i>	20
1.2.6 <i>Il ciclo vitale di JCV</i>	23
1.2.7 <i>Il Potenziale oncogeno di JCV.....</i>	25
1.3 Patologie del SNC associate all'infezione da JCV	26
1.3.1 <i>La leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML).....</i>	26
1.3.2 <i>PML associata a sindrome infiammatoria da immuni-ricostituzione (PML-IRIS).....</i>	28
1.3.3 <i>Neuronopatia delle cellule granulari JCV-correlata.....</i>	29
1.3.4 <i>Encefalopatia JCV-correlata</i>	30
1.3.5 <i>Meningite JCV-correlata</i>	30
1.4 L'uso dei farmaci biologici nel trattamento delle malattie immuno-mediate e la riattivazione di JCV.....	31
1.4.1 <i>Il Morbo di Crohn (MC)</i>	31
1.4.2 <i>Il sistema enterico gliale e JCV</i>	35
1.4.3 <i>La Sclerosi Multipla (SM).....</i>	36
1.4.4 <i>Malattie Reumatiche Infiammatorie Croniche (MRIC)</i>	38
2. OBIETTIVI.....	41
3. RISULTATI	42
3.1 Pazienti pediatrici affetti da MC trattati con l'anti-TNF-α infliximab (Coorte 1.1) e pazienti pediatrici affetti da MC non trattati con farmaci biologici (FB) (Coorte 1.2)	42
3.1.1 <i>Ricerca del DNA di JCV tramite q-PCR nei campioni biologici raccolti e valutazione della carica virale in relazione ai tempi di prelievo</i>	42

3.1.2	<i>Analisi di sequenza delle regioni genomiche NCCR e VPI di JCV nei campioni biologici positivi al DNA virale nelle coorti di pazienti pediatriche affetti da MC trattati con infliximab (Coorte 1.1) e non trattati con FB (Coorte 1.2).....</i>	48
3.2	Pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab (Coorte 2)	53
3.2.1	<i>Valutazione sierica degli anticorpi JCV-specifici mediante STRATIFY JCV® e della carica virale tramite q-PCR nei campioni biologici raccolti a t0 da 22 pazienti affetti da SMRR</i>	53
3.2.2	<i>Valutazione della carica virale di JC tramite q-PCR in campioni biologici di 15 pazienti affetti da SMRR con follow-up nel primo anno di trattamento con natalizumab (follow-up < 12 mesi).....</i>	55
3.2.3	<i>Valutazione della carica virale di JC tramite q-PCR in campioni biologici di 30 pazienti affetti da SMRR e con un numero di infusioni di natalizumab compreso tra 4 e 12 (< 12 mesi)</i>	59
3.2.4	<i>Valutazione della carica virale di JCV tramite q-PCR in campioni biologici della coorte di pazienti affetti da SMRR e con un numero di infusioni di natalizumab > 12</i>	62
3.2.5	<i>Confronto del numero dei campioni di urine e di plasma positivi al DNA di JCV e valutazione della rispettiva carica virale nei pazienti affetti da SMRR con un numero di infusioni di natalizumab pari a 0 (t0: baseline), tra 4 e 12 (< 12 mesi) e > 12 (> 12 mesi)</i>	64
3.2.6	<i>Analisi immuno-fenotipica e d'immuno-attivazione e valutazione dell'espressione di membrana dell'α4-integrina (CD49d) nell'assetto linfocitario dei pazienti affetti da SMRR trattati con natalizumab (Coorte 2).....</i>	65
3.2.7	<i>Analisi di sequenza delle regioni genomiche NCCR e VPI di JCV nei campioni biologici positivi al DNA virale ottenuti da pazienti affetti da SMRR trattati con natalizumab (Coorte 2).....</i>	70
3.3	Pazienti affetti da MRIC e trattati con anti-TNF-α (Coorte 3).....	76
3.3.1	<i>Ricerca del DNA di JCV e valutazione della carica virale tramite q-PCR in campioni biologici in pazienti affetti da malattie reumatiche infiammatorie croniche (MRIC) al baseline (t0) e dopo 4 e 8 mesi di trattamento con anti-TNF-α</i>	78
3.3.2	<i>Ricerca del DNA di JCV e valutazione della carica virale tramite q-PCR nei campioni biologici di 22 pazienti affetti da MRIC prelevati al baseline (t0) e dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF-α (Coorte 3 follow-up < 12 mesi)</i>	81
3.3.3	<i>Analisi di sequenza delle regioni genomiche NCCR e VPI di JCV nei campioni biologici positivi al DNA virale in pazienti affetti MRIC e trattati con anti-TNF-α.....</i>	84
3.4	Confronto della viruria e della viremia da JC nelle coorti di pazienti affetti da malattie immuno-mediate e trattati con farmaci biologici	87
4.	DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	93
4.1	<i>Studio della viruria e della viremia da JC in pazienti affetti da MRIC e trattati con anti-TNF-α: la patologia ed il trattamento farmacologico favoriscono la viruria</i>	94
4.2	<i>Nuovi biomarkers predittivi di riattivazione da JCV in pazienti affetti da SMRR trattati con natalizumab?.....</i>	95

4.3	Riattivazione di JCV in pazienti affetti da MC	97
4.4	Riarrangiamenti della NCCR e prevalenza dei genotipi 1A ed 1B di JCV nelle coorti di pazienti affetti da patologie immuno-mediate e trattati con farmaci biologici.....	100
4.5	Conclusioni	104
5.	MATERIALI E METODI	106
5.1	Reclutamento dei pazienti e raccolta dei campioni.....	106
5.1.1	<i>Pazienti affetti da MC e trattati con infliximab (Coorte 1.1) e non trattati con FB (Coorte 1.2)...</i>	106
5.1.2	<i>Pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab (Coorte 2).....</i>	107
5.1.3	<i>Pazienti affetti da MRIC e trattati con FB (Coorte 3)</i>	111
5.2	Analisi in biologia molecolare per l'indagine virologica.....	112
5.2.1	<i>Isolamento dei PBMC da sangue intero ed estrazione del DNA metagenomico</i>	112
5.2.2	<i>Estrazione del DNA metagenomico dal plasma.....</i>	113
5.2.3	<i>Estrazione del DNA metagenomico dalle urine</i>	113
5.2.4	<i>Saggi di PCR.....</i>	113
5.2.5	<i>Sequenziamento della NCCR e della VP1 di JCV e analisi delle sequenze</i>	115
5.3	Analisi Immunofenotipica	115
5.4	Analisi Clinico-Neurologica	118
5.5	Analisi statistica.....	118
6.	BIBLIOGRAFIA	119
7.	APPENDICE.....	135

1. Introduzione

Il trattamento di molte malattie immuno-mediate ha previsto, negli ultimi anni, l'impiego degli anticorpi monoclonali (mAbs). Gli mAbs appartengono alla categoria dei farmaci biologici (FB), il cui principio attivo è costituito da una molecola prodotta o da un organismo vivente (farmaco biologico propriamente detto) o da una sorgente biologica attraverso la tecnologia del DNA ricombinante (farmaco biotecnologico). Tra i farmaci biologici si annoverano emoderivati, immunoglobuline e vaccini tradizionali, mentre i farmaci biotecnologici sono ampiamente rappresentati dai vaccini ricombinanti e dagli stessi anticorpi monoclonali. L'utilizzo degli mAbs è previsto nel protocollo terapeutico di patologie quali la sclerosi multipla (SM), l'artrite reumatoide (AR) e psoriasica (PsA), la psoriasi vulgaris (PsV), la spondilite anchilosante (SA), il lupus eritematoso sistemico (LES), il morbo di Crohn (MC) e la colite ulcerosa (CU) [Hansel et al., 2010]. Tali farmaci sono caratterizzati da un'aumentata selettività e quindi da una minore tossicità rispetto ai farmaci convenzionali, tuttavia il loro uso a scopo terapeutico è stato da tempo associato ad un maggior rischio di riattivazione dalla latenza di agenti patogeni come il *Mycobacterium tuberculosis* (MT) [Keane, 2005] ed il Polyomavirus umano JC (JCV) agente eziologico della leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), il miglior esempio di patologia demielinizzante umana d'origine virale che interessa il Sistema Nervoso Centrale (SNC) [White and Khalili, 2011].

JCV è un virus neurotrofo a DNA a doppio filamento, isolato nel 1971 dal cervello di un paziente affetto da PML e con malattia di Hodgkin [Padgett et al., 1971]. Il 90% della popolazione adulta sembra presentare anticorpi anti-JCV, con il 27% di individui che rilasciano virioni nelle urine in modo assolutamente asintomatico [Kean et al., 2009; Brew et al., 2010]. Il genoma di JCV è composto da due regioni codificanti, una regione precoce ed una regione tardiva, fisicamente separate da una terza regione non codificante di controllo della trascrizione genica e della replicazione virali (NCCR). La regione precoce codifica per le proteine T *primes* (T'), la proteina antigene T grande (AgT) e la proteina antigene t piccolo (Agt), coinvolte nella regolazione della replicazione e della trascrizione del genoma virale, mentre la regione tardiva codifica per le proteine del capsido virale (VP1, VP2 e VP3) e per l'Agnoproteina [Del Valle and Khalili, 2010]. Le regioni codificanti del genoma di JCV sono altamente conservate, mentre la NCCR virale è una regione ipervariabile e contiene al suo interno determinanti di neurotropismo e di neurovirulenza. Infatti, sequenze di NCCR riarrangiate, che si formano durante le fasi di immunosoppressione dell'ospite, sono associate a varianti virali che correlano con una prognosi infausta nei pazienti affetti da PML. La PML era originariamente conosciuta come una rara complicanza di neoplasie ematologiche o di sindromi infiammatorie sistemiche. Un tempo considerata una malattia rara, la PML è divenuta una patologia emergente in relazione al diffondersi dell'infezione da HIV. In particolare, l'incidenza di tale patologia ha avuto un drammatico aumento (50 volte) negli anni '80 durante la pandemia da HIV [Del Valle and Khalili, 2010; Tan and Koralnik, 2010] diminuendo in seguito all'introduzione della terapia antiretrovirale combinata (HAART). Negli ultimi anni, tuttavia, sono stati registrati

nuovi casi di PML in pazienti affetti da malattie immuno-mediate e trattati con mAbs [Bellizzi et al., 2012].

I principali mAbs attualmente associati all'insorgenza di PML sono il natalizumab (Tysabri®), un mAb anti- α 4-integrina (VLA-4) utilizzato per il trattamento della SM recidivante-remittente e del MC, ed il rituximab (Rituxan®), un mAb anti-CD20 impiegato nel trattamento dell'AR.

Nel 2005 sono stati segnalati i primi 3 casi di PML (in 2 soggetti affetti da SM ed in un soggetto affetto da MC) la cui insorgenza è stata ricollegata all'utilizzo del natalizumab [Kleinschmidt-DeMasters and Tyler 2005; Langer-Gould et al., 2005, Van Assche et al., 2005]. A partire dal 2005 e fino a settembre 2013 sono stati confermati 399 casi di PML tra gli oltre 300.000 pazienti trattati con questo farmaco in tutto il mondo [Wüthrich et al., 2013]. In letteratura, il rischio stimato di PML legato all'uso di natalizumab è di circa 11,1 casi ogni 1000 pazienti (intervallo di confidenza (IC) al 95%: 8,3-14,5). Tale rischio è stato stimato considerando i tre principali fattori che concorrono indipendentemente alla possibile insorgenza della PML: la durata del trattamento per un tempo superiore ai 24 mesi, l'uso di farmaci immunosoppressori antecedente alla somministrazione di natalizumab e la presenza di anticorpi anti-JCV [Bloomgren et al., 2012; Sørensen et al., 2012; McCormack, 2013].

Nel 2009 sono stati riportati ben 57 casi di PML associati a rituximab anche se, nella maggior parte di questi casi, l'uso concomitante di immunosoppressori ed il tipo di patologia, come il LES, sembrano essere già di per sè dei fattori predisponenti all'insorgenza della PML [Carson et al., 2009a; Molloy and Calabrese, 2012]. Attualmente, i casi di accertata causalità tra l'uso di rituximab e PML sono 14 [Molloy and Calabrese, 2012]. Pertanto, sia il natalizumab che il rituximab sono stati etichettati dalla Food and Drug Administration (FDA) con la sigla "black box warning" per richiamare l'attenzione sui rischi, potenzialmente letali, derivanti dal loro impiego [Brew et al., 2010; Bellizzi et al., 2012].

Nel 2009, un altro mAb, l'efalizumab (Raptiva®) un anti-CD11a impiegato nel trattamento della psoriasi cronica a placche, è stato ritirato dal commercio dopo l'accertamento causale, da parte dell'Agenzia Europea del Farmaco (EMA) e della FDA, di 4 casi di PML in pazienti trattati con tale farmaco [Carson et al., 2009b]. Infine, diversi casi di eventi demielinizzanti del SNC sono stati riportati anche in seguito all'utilizzo di mAbs quali l'adalimumab (Humira®) e l'infliximab (Remicade®), antagonisti del fattore di necrosi tumorale-alfa (anti-TNF- α), utilizzati a scopo terapeutico in pazienti affetti da AR, spondiloartriti, MC e gravi forme di psoriasi a placche [Major, 2010; Carson et al., 2009a; Molloy and Calabrese, 2012].

Non è ancora noto il meccanismo esatto attraverso il quale questi farmaci inducano la PML, tuttavia, è stato ipotizzato che una ridotta immuno-sorveglianza a livello cerebrale, associata alla mobilitazione ed espansione clonale delle cellule ematopoietiche progenitrici CD34+ e delle cellule B, svolgano un ruolo determinante nella patogenesi di tale malattia [Zohren et al., 2008].

JCV infatti può instaurare latenza, oltre che nel rene, anche in questi tipi cellulari veicolandoli per migrare dal midollo osseo e raggiungere, attraverso il circolo ematico, il SNC [Coisne et al., 2009; Kivisakk et al., 2009; Marzocchetti et al., 2009; Tan et al., 2010]. Inoltre, la differenziazione e la maturazione delle cellule ematopoietiche progenitrici CD34+ e dei linfociti B è sotto il controllo di fattori di trascrizione cellulari specifici, come Spi-B. Spi-B è un fattore di trascrizione delle cellule ematopoietiche che regola positivamente la trascrizione del genoma di JCV, determinando lo switch da uno stato di latenza ad un stato di infezione litica. [Major, 2010]. Recentemente è stato osservato che Spi-B sembra legarsi con maggiore affinità a siti specifici dell'NCCR caratteristici di varianti virali associate a PML, rispetto a quelli presenti nell'archetipo non patogeno. Il sito di legame per il fattore Spi-B di tali varianti virali differisce da quello presente nell'archetipo per una singola mutazione puntiforme che influenza fortemente l'espressione dei geni precoci del virus [Marshall et al., 2012]. Infine, il ritrovamento del DNA di JCV in assenza della proteina del capsido virale nei precursori ematopoietici CD34+ e nelle cellule B prima dello sviluppo di PML, suggerisce che tali cellule possono fungere da serbatoio per il virus latente [Tan et al., 2010].

È stato anche ipotizzato un blocco da parte del natalizumab del traffico dei linfociti JCV-specifici attraverso la barriera emato-encefalica (BEE), con conseguente diminuzione dell'immunosorveglianza e riattivazione di JCV dalla latenza [Berger and Houff, 2009]. Ad oggi, non sono stati individuati biomarkers specifici in grado di individuare precocemente quei pazienti con un rischio maggiore di sviluppare PML, ed inoltre non sono ancora disponibili dati che siano in grado di supportare un'inconfutabile associazione tra la *viral load* di JCV nel sangue e/o nelle urine e la comparsa di PML [Andreoletti et al., 2002; Marzocchetti et al., 2009; Rudick et al., 2010; Tan et al., 2010]. Nel tentativo di ovviare a questa carenza diagnostica, un nuovo test immunoenzimatico (STRATIFY JCV®) è stato messo a disposizione dalla casa farmaceutica produttrice del natalizumab per poter discriminare i pazienti con anticorpi JCV-specifici [Gorelik et al., 2010]. Tuttavia indagini molecolari per la ricerca del DNA virale in campioni di urina si sono rivelate utili per effettuare una più accurata stratificazione del rischio di PML in pazienti trattati con natalizumab [Laroni et al., 2012], in quanto la viruria da JC permetterebbe di individuare quei pazienti JCV positivi per i quali gli anticorpi non risultano ancora rilevabili [Mancuso et al., 2012].

In questo contesto, la caratterizzazione degli effetti del natalizumab sulle cellule T che controllano l'infezione da JCV potrebbe far luce sui fattori virali e dell'ospite che determinano lo sviluppo di PML. Fino ad oggi, in molti studi sono state analizzate le risposte delle cellule T CD4+ e CD8+ JCV-specifiche in individui che avevano sviluppato PML non associata a terapia con natalizumab [Koralnik et al., 2001; Gasnault et al., 2003; Khanna et al., 2009]. Da questi e altri studi è emerso che cellule T CD8+ specifiche per particolari epitopi di JCV sembrerebbero essere associate con una prolungata sopravvivenza di individui HIV-positivi con diagnosi di PML ad uno stadio iniziale di malattia [Du Pasquier et al., 2004]. Inoltre un recente studio ha dimostrato come sia più probabile rilevare risposte delle cellule CD4+ e CD8+ JCV-specifiche in pazienti affetti da

PML e sopravvissuti alla malattia rispetto a quelli in cui la patologia è progredita con esito fatale [Gheuens et al., 2011]. La maggior parte degli studi inoltre si sono concentrati esclusivamente sull'entità delle risposte delle cellule T JCV-specifiche, anche se la qualità della risposta immunitaria potrebbe essere un parametro più significativo da prendere in considerazione [Seder et al., 2008]. In uno studio sulla PML HIV-associata è stato riscontrato un aumento della produzione di interleuchina-10 (IL-10) JCV-specifica da parte di una coltura di cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) isolati da individui HIV-positivi affetti da PML rispetto a quelli isolati da individui HIV-negativi affetti da PML [Weber et al., 2001]. Poco informazioni sono disponibili in relazione alla qualità della risposta JCV-specifica in soggetti trattati con natalizumab: l'unico dato riportato, dopo trattamento con natalizumab, è una variazione dei livelli di mRNA delle citochine interferone gamma (IFN- γ) ed IL-10 prodotte dai PBMC e dalle cellule isolate dal liquido cerebro-spinale (CSF), con un aumento dei livelli di IFN- γ prodotti dai PBMC e dell'IL-10 prodotta dalle cellule del CSF [Khademi et al., 2009]. Tuttavia, quest'ultima tipologia di indagine è risultata essere viziata dal quantitativo e dal tipo di cellule isolabili rispettivamente dal sangue periferico e dal CSF [Polman et al., 2006; Rudick et al., 2006; Stuve et al., 2006; Skarica et al., 2011; Perkins et al., 2012].

Alla luce di tali considerazioni, ed in particolare del fatto che l'incidenza della PML associata all'impiego di mAbs è in continuo aumento e che non esiste una cura risolutiva per questa patologia, risulta di fondamentale importanza un'accurata valutazione del rischio di insorgenza di PML legato all'uso di questi farmaci. L'obiettivo di questa tesi è stato pertanto quello di studiare il meccanismo alla base della riattivazione di JCV in individui affetti da patologie immuno-mediate trattati con mAbs, in modo da ottenere un quadro più completo sul rapporto rischio/beneficio ad essi associato e di individuare dei biomarker predittivi di riattivazione virale e di sviluppo di PML.

1.1 *I Polyomavirus umani*

JCV appartiene alla famiglia dei *Polyomaviridae* che è costituita da virus nudi di piccole dimensioni dotati di un genoma a DNA circolare bicatenario [White et al., 2005]. Tale famiglia racchiude un numero vastissimo di membri che infettano varie specie animali tra cui roditori, conigli, uccelli e primati, uomo incluso [Imperiale, 2001; Delbue et al., 2012]; in particolare, fino ad oggi, sono stati scoperti 11 polyomavirus che infettano l'uomo [White et al., 2013; Feltkamp et al., 2013] (Fig. 1.1).

Il polyomavirus umano JC fu isolato nel 1971 e nello stesso anno fu scoperto anche il polyomavirus umano BK (BKV) [Gardner et al., 1971; Padgett et al., 1971]. La via di ingresso di tali virus sembra essere il tratto respiratorio ed in particolare le tonsille da cui è stato isolato il genoma di entrambi i virus [Kato et al., 2004]. Successivamente, veicolando i PBMC, BKV e JCV si riversano nel sistema circolatorio raggiungendo altri organi, come il rene per entrambi i virus o il SNC per JCV, in cui questi virus instaurano un'infezione persistente e latente [Wei et al., 2000; Pietropaolo et al., 2003; Zhong et al., 2007].

Nell'ospite immunocompetente l'infezione primaria decorre in maniera subclinica, invece gravi stati di immunocompromissione (causati ad esempio dalla somministrazione di terapie immunosoppressive, da immunodeficienza congenita ed acquisita, nonché da trapianto di rene e di midollo osseo, gravidanza, diabete ed altre malattie croniche) stimolano la riattivazione virale, caratterizzata dall'escrezione di particelle virali nelle urine [Doerries, 2006; Ferrante et al., 1997; Thomas et al., 2007; Zhong et al., 2007].

BKV e JCV sono virus ubiquitari largamente diffusi nella popolazione umana poiché circa il 90% degli adulti presenta anticorpi specifici diretti contro questi virus. Gli anticorpi persistono a livelli considerevoli per tutta la vita ed, in particolare, numerosi studi sierologici hanno evidenziato una più precoce e rapida acquisizione di anticorpi verso BKV piuttosto che verso JCV [Kim et al., 2001; Frisque et al., 2006; Knowles, 2006; Lundstig and Dillner, 2006].

I polyomavirus umani BK e JC sono caratterizzati da un'omologia di sequenza genomica pari al 75%, sono molto simili morfologicamente al polyomavirus oncogeno murino (PyV) e presentano un ancestrale comune al virus delle scimmie (SV40), la cui attività trasformante è stata associata all'insorgenza dei mesoteliomi umani [Frisque et al., 1984; Shah, 2007].

Recentemente vari studi hanno portato all'identificazione di nuovi membri della famiglia dei *Polyomaviridae* [White et al., 2013]. Nel 2007 uno studio di *screening* molecolare per la ricerca di virus in prelievi nasofaringei di bambini con infezioni del tratto respiratorio, ha portato alla identificazione di un nuovo polyomavirus umano, denominato Karolinska Institute Polyomavirus (KIPyV) (Fig. 1.2). Esso è filogeneticamente correlato agli altri polyomavirus umani a livello della regione genomica precoce, ma presenta una scarsa omologia di sequenza con la regione genomica tardiva (<30% di aminoacidi identificati) [Allander et al., 2007].

Nello stesso anno un altro gruppo di ricercatori, attraverso l'analisi di sequenze genomiche rilevate nei lavaggi bronchiali di pazienti affetti da grave infiammazione del tratto respiratorio, ha individuato un quarto membro della famiglia *Polyomaviridae*, ovvero il Washington University Polyomavirus (WUPyV) (Fig. 1.2). In seguito al sequenziamento dell'intero genoma virale (5.229 bp), è emersa un'omologia tra le caratteristiche strutturali del genoma di WUPyV e quelle dei virus della famiglia dei *Polyomaviridae*. Inoltre, dati preliminari hanno evidenziato similitudini tra WUPyV e KIPyV, sia per quanto riguarda la struttura genomica e i rapporti filogenetici, che per il loro tropismo [Gaynor et al., 2007; Dalianis et al., 2009]. Tali dati suggeriscono come questi nuovi polyomavirus possano definire un sottogruppo all'interno della famiglia *Polyomaviridae*, con caratteristiche biologiche e patogenetiche proprie [Gaynor et al., 2007].

Nel 2008 Feng e collaboratori hanno condotto uno studio su campioni di Carcinoma a Cellule di Merkel (MCC), un tumore della pelle raro ma aggressivo, per verificare il possibile ruolo delle infezioni virali in tale neoplasia. Nei campioni analizzati, gli Autori hanno caratterizzato la presenza di trascritti della proteina AgT di un polyomavirus mai descritto in precedenza, da loro denominato Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV) [Feng et al., 2008] (Fig. 1.2). Successivamente lo stesso gruppo di ricercatori hanno dimostrato, in seguito ad analisi di sequenza dell'AgT di MCPyV, la presenza di mutazioni dell'antigene virale responsabili della formazione di una forma tronca di AgT, con il dominio di legame per la proteina cellulare Rb inalterato [Shuda et al., 2008].

I Polyomavirus umani 6 e 7 sono stati isolati nel 2010 da Schowalter e colleghi in tamponi cutanei, ed è stato osservato che questi virus sono rilasciati cronicamente dall'epidermide sotto forma di virioni [Schowalter et al., 2010]. Sempre nel 2010 van der Meijden e collaboratori hanno scoperto un nuovo polyomavirus umano associato alla Tricodispasia Spinulosa in un paziente immunocompromesso [Van der Meijden et al., 2010]. Il Polyomavirus umano 9 è stato isolato nel 2011 in un paziente che aveva subito un trapianto di rene e sottoposto a trattamento con farmaci immunosoppressori [Scuda et al., 2011]. Il Malawi Polyomavirus è stato isolato nel 2012 sia in campioni di feci prelevate da un bambino sano del Malawi, sia in campioni di feci diarroiche prelevate da un bambino americano di St. Louis [Siebrasse et al., 2012]. Infine, nel 2013, è stato isolato l'ultimo polyomavirus umano finora conosciuto, l'STL Polyomavirus, ritrovato ancora una volta nel microbiota fecale di un bambino sano malawense [Lim et al., 2013].

Polyomavirus	Anno della scoperta	Fonte
BK virus (BKV)	1971	Trapianto di rene
JC virus (JCV)	1971	Paziente con PML
KI Polyomavirus (KIPyV)	2007	Tratto respiratorio
WU Polyomavirus (WUPyV)	2007	Tratto respiratorio
Merkel Cell Polyomavirus (MCPyV)	2008	Carcinoma delle cellule di Merkel
Human Polyomavirus 6 (HPyV6)	2010	Cute
Human Polyomavirus 7 (HPyV7)	2010	Cute
Trichodysplasia Spinulosa-associated Virus (TSPyV)	2010	Tricodisplesia spinulosa
Human Polyomavirus 9 (HPyV9)	2011	Trapianto di rene
MW Polyomavirus (MWPyV)	2012	Feci
STL Polyomavirus (STLPyV)	2013	Feci

Figura 1.1 I Polyomavirus umani. Sono qui riportati i Polyomavirus umani finora identificati, il rispettivo anno di scoperta e la fonte da cui sono stati isolati [White et al., 2013 modificata].

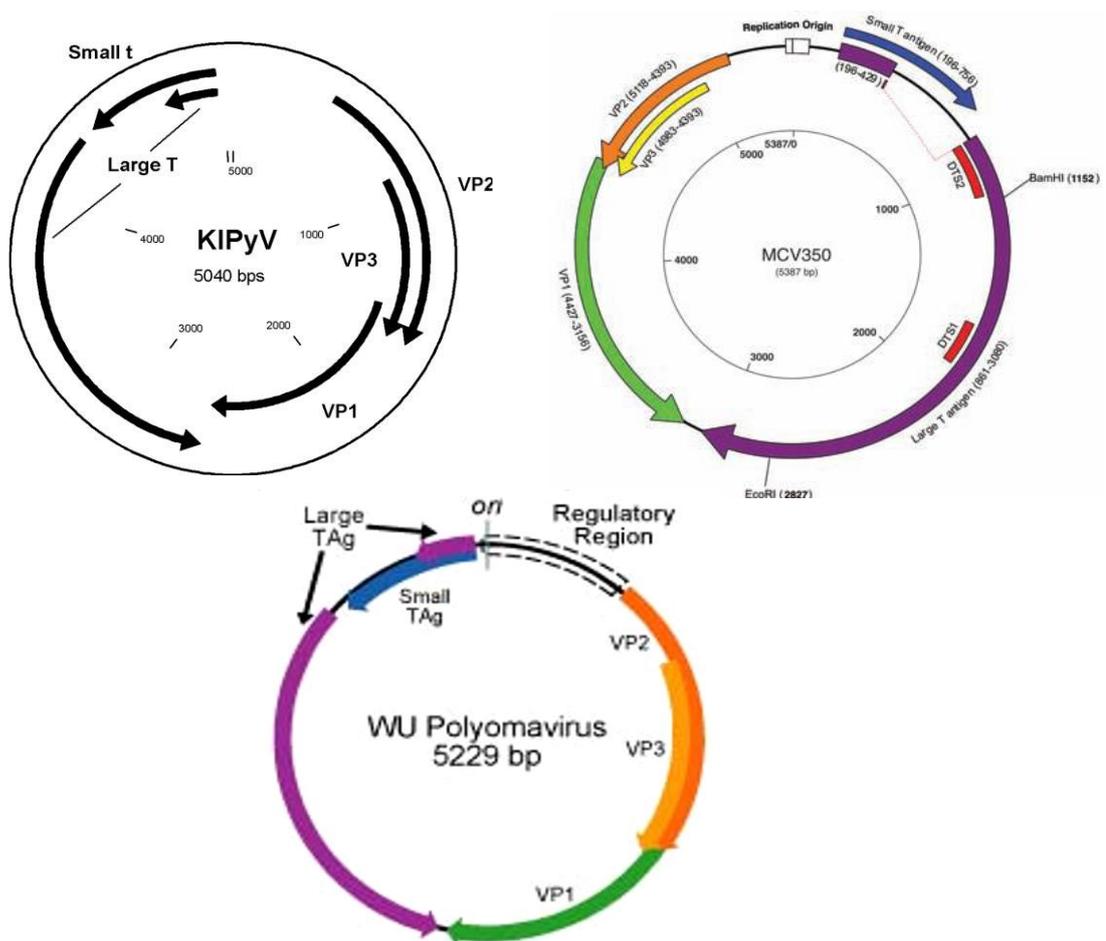


Figura 1.2. Genoma dei Polyomavirus KI, MC, WU [Allander et al., 2007; Gaynor et al., 2007; Feng et al., 2008].

1.2 Il Polyomavirus umano JC

Il John Cunningham virus (JCV) è un membro della famiglia *Polyomaviridae*, genere *Orthopolyomavirus*, con DNA circolare a doppio filamento isolato nel 1971 dal cervello di un paziente affetto da Morbo di Hodgkin [Padgett et al., 1971]. JCV è l'agente eziologico della leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), descritta per la prima volta da Astrom e colleghi nel 1958 [Astrom et al., 1958]. Il virus JC è da considerarsi quindi un virus neurotrofo con proprietà oncogene, così come attesta l'etimologia del nome della sua famiglia di appartenenza: infatti *polyoma* deriva dal greco *poli* = molti e *oma* = tumori. Non a caso, il virus JC è stato associato a molti tumori, sia di origine gliale, tra cui gliomi, ependimomi e medulloblastomi, che non-gliale: infatti è stato rinvenuto in molti prelievi clinici di origine non-neuronale, quali biopsie tumorali del tratto gastro-intestinale ed in particolare del tumore colon rettale (Fig. 1.3) [White and Khalili, 2011].

Per quanto riguarda la via di trasmissione dell'infezione da JCV, oltre che attraverso il tratto respiratorio, sembra che questo virus possa propagarsi anche per via oro-fecale, considerato il ritrovamento di sequenze genomiche virali nel tratto gastro-intestinale umano e nelle acque reflue degli scarichi urbani [Boland et al., 2005].

Sebbene il meccanismo di ingresso nella cellula ospite non sia stato ancora completamente compreso, è noto che uno dei recettori cellulari prediletti dal virus è una glicoproteina contenente un residuo di acido sialico legato in posizione α -(2,6). Tuttavia, è noto che il virus possa utilizzare anche il recettore serotoninergico 5-HT 2α [Brew et al., 2010]. Sono proprio queste molecole che determinano lo spiccato tropismo di JCV per le cellule gliali umane, per le cellule renali e, seppur con minore efficienza rispetto alle precedenti, per i linfociti B. Il tropismo ristretto per il SNC è confermato anche da studi *in vitro* e su animali da laboratorio [Raj and Khalili, 1995; Khalili et al., 2001].

Il virus JC è ubiquitario: gli anticorpi specifici diretti contro di esso sono stati riscontrati nel 70% della popolazione adulta e l'infezione primaria si verifica prevalentemente durante l'infanzia. L'acquisizione del virus non correla necessariamente con uno stato patologico, decorrendo, nella maggior parte dei casi, in modo asintomatico (viremia primaria). Successivamente JCV instaura un'infezione latente nei reni nei quali si riattiva in seguito ad alterazioni immunologiche dell'ospite. La riattivazione è caratterizzata da escrezione dei virioni nelle urine e da migrazione del virus, attraverso il torrente circolatorio, verso il SNC dove infetta gli oligodendrociti [Caldarelli-Stefano et al., 1999; Perez-Liz et al., 2008; Delbue et al., 2013].

Tumor Type/Cancer	References
Glioblastomas	Del Valle et al. 2000, Del Valle et al. 2001, Boldorini et al. 2003, and Pina-Oviedo et al. 2006
Medulloblastoma	Krynska et al. 1999, Del Valle et al. 2000, Delbue et al. 2005, and Shiramizu et al. 2007
Astrocytoma	Del Valle et al. 2001 and Boldorini et al. 2003
Oligoastrocytoma	Rencic et al. 1996, Caldarelli-Stephano et al. 2000, and Del Valle et al. 2001
Oligodendroglioma	Caldarelli-Stephano et al. 2000, Del Valle et al. 2001, Del Valle et al. 2002, and Boldorini et al. 2003
Ependymoma	Caldarelli-Stephano et al. 2000 and Del Valle et al. 2001
Colorectal cancer	Laghi et al. 1999, Ricciardiello et al. 2001, Enam et al. 2002, Lin et al. 2008, and Jung et al. 2008
Esophageal cancer	Del Valle et al. 2005
Gastric cancer	Shin et al. 2006 and Murai et al. 2007
Lung cancer	Zheng et al. 2007

Figura 1.3. Tumori umani associati al Polyomavirus JC [White and Khalili, 2011].

1.2.1 Struttura e genoma del virus JC

JCV è un virus nudo di dimensioni variabili tra i 40 e i 50 nm, con peso molecolare di 3.2×10^6 Daltons e con un capsido a simmetria icosaedrica formato da 72 pentameri (Fig. 1.4) [Stehle and Harrison, 1997; Diotti et al., 2013]. Il nucleocapside racchiude il genoma del virus costituito da una molecola di DNA circolare a doppio filamento di circa 5.3 Kb, con un contenuto in C e G molto simile a quello del DNA dei mammiferi (40-42%), nei quali il virus svolge il suo ciclo vitale. Il genoma virale è associato ad istoni cellulari (H1, H2A, H2B, H3 e H4) formando un complesso definito “minicromosoma virale”, che risulta strutturalmente indistinguibile dalla cromatina della cellula ospite [Cole, 1996; Ahsan and Shah, 2006; Delbue et al., 2013].

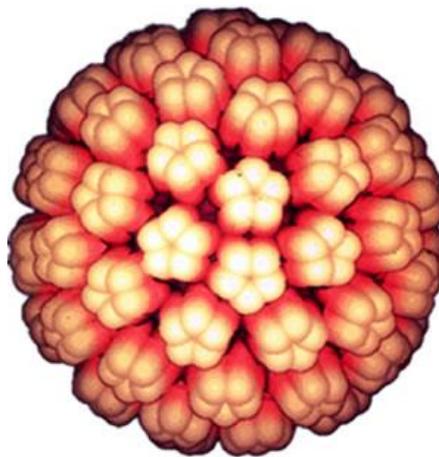


Figura 1.4. Modello della struttura icosaedrica del capsido del Polyomavirus umano JC. L'immagine è stata ottenuta mediante analisi crio-elettromicroscopica.

Il DNA virale può essere funzionalmente suddiviso in tre regioni: una regione precoce, una regione tardiva ed una complessa regione di controllo non codificante (NCCR). La regione precoce codifica per le proteine non strutturali Antigene *T* grande (AgT) ed Antigene *t* piccolo (Agt) che sono implicate nella replicazione e nella trascrizione del genoma virale e sono espresse, seppure a bassi livelli, anche nelle fasi tardive dell'infezione. La regione tardiva codifica per le proteine strutturali del capside (VP1, VP2, VP3 e VPx): la proteina maggiormente rappresentata è VP1 (39 kdal) con 360 molecole per capside, seguono poi VP2 (37 kdal) e VP3 (24 kdal) che contribuiscono alla struttura con 30-60 molecole per capside. Inoltre la proteina VP1, che è esposta sulla superficie del capside, è quella che determina la specificità recettoriale [Ferenczy et al., 2012]. La proteina VPx è chiamata comunemente agnoproteina, è lunga $\cong 71$ aa e sembra che faciliti il trasporto della VP1 al nucleo favorendo in tal modo la formazione di virioni [Carswell and Alwine, 1986].

Tra la regione precoce e la regione tardiva vi è situata la NCCR, idealmente suddivisa in box di sequenze nucleotidiche e a partire dalla quale i geni precoci vengono trascritti in senso antiorario, mentre quelli tardivi in senso orario, sul filamento complementare [Khalili and White, 2006] (Fig. 1.5).

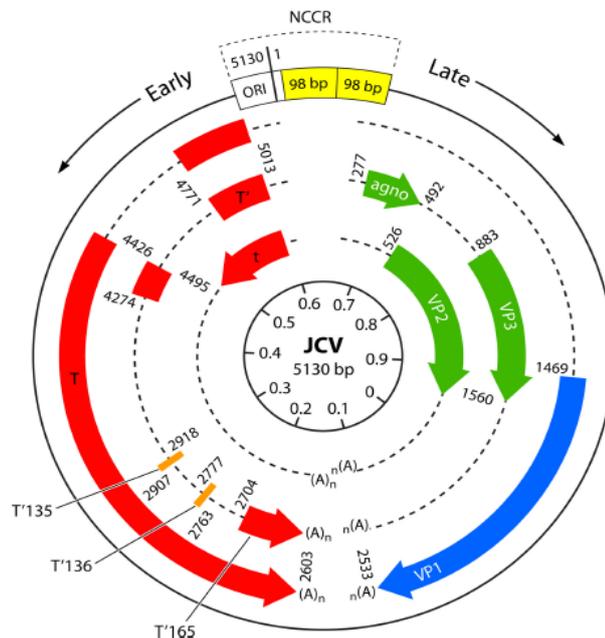


Figura 1.5. Mappa funzionale del genoma di JCV [Boland et al., 2005].

1.2.2 Regione di controllo non codificante (NCCR)

La NCCR contiene l'origine di replicazione (*ori*), la TATA box a cui si lega la RNA polimerasi II durante la trascrizione, siti di legame per l'AgT e fattori di trascrizione cellulari, promotori bidirezionali ed *enhancers* (sequenze nucleotidiche *cis*-agenti che esplicano la loro funzione aumentando fino a 200 volte la frequenza di trascrizione del gene che controllano).

A differenza delle regioni codificanti che sono ben conservate, la regione NCCR è ipervariabile e contiene determinanti per il neurotropismo e la neurovirulenza [Bellizzi et al., 2013].

La NCCR archetipo (*CY*) è divisa in 6 regioni chiamate box A (36pb), B (23pb), C (55pb), D (66pb), E (18pb) ed F (69pb). Ciascun box contiene i siti di legame per fattori trascrizionali cellulari coinvolti nella trascrizione virale [Yogo et al., 1990]. Questi siti di legame possono andare incontro a processi di riarrangiamento, come delezioni o duplicazioni, generando nuove varianti virali dotate di diverso tropismo e grado di patogenicità rispetto al ceppo archetipo.

La sequenza archetipo, ritrovata nei reni e nelle urine di individui sani e nelle acque reflue di scarico, non è stata mai associata a PML e non è infettiva nei modelli di coltura cellulare (Fig. 1.6 A) [Yogo and Sugimoto, 2001; Pietropaolo et al., 2003; Mischitelli et al., 2005].

La NCCR prototipo, invece, è una variante isolata da tessuti di pazienti con PML, ottenuta come riarrangiamento della sequenza archetipo. Il prototipo originale è l'isolato *Mad-1*, che contiene una NCCR costituita da una sequenza A-C-E di 98 pb ripetuta *in tandem* (A-C-E-A-C-E-F), con conseguente duplicazione della TATA box e dei siti di legame specifici per particolari fattori di trascrizione cellulare, tra cui NF-1 ed Spi-B. Le TATA box contenute nelle sequenze di 98 pb ripetute *in tandem* infine sono determinanti nella trascrizione dei geni virali sia precoci che tardivi (Fig. 1.6 B) [Frisque, 1983; Ferenczy et al., 2012]. Inoltre, nel prototipo *Mad-1*, la perdita delle sequenze dei box B e D determina la formazione di siti di legame per fattori di trascrizione cellulari essenziali per l'espressione dei geni virali, tra cui YB-1/Pura e NF-1, e la duplicazione di Oct-6. Si osserva inoltre la transversione T → G nel sito di legame per Spi-B che, come recentemente dimostrato da Marshall e colleghi, determina un aumento dell'affinità di legame per questo importante fattore di trascrizione [Marshall and Major, 2010; Marshall et al., 2012]. La variante *Mad-4* rappresenta una variante del prototipo *Mad-1* ed è spesso usata come ceppo sperimentale di riferimento. Essa è identica a *Mad-1* ad eccezione del fatto che contiene una delezione di 19 pb in corrispondenza della seconda TATA-box in posizione prossimale (Fig. 1.6 C) [Padgett et al., 1977]. Infine, la variante *Mad-8* è la variante NCCR più tipicamente riscontrata nei pazienti con PML. Essa presenta una struttura simile al prototipo *Mad-1*, con una larga delezione ed un'ampia inserzione, ma anche diverse inserzioni minori e semplici cambi di base (Fig. 1.6 D) [Martin et al., 1985].

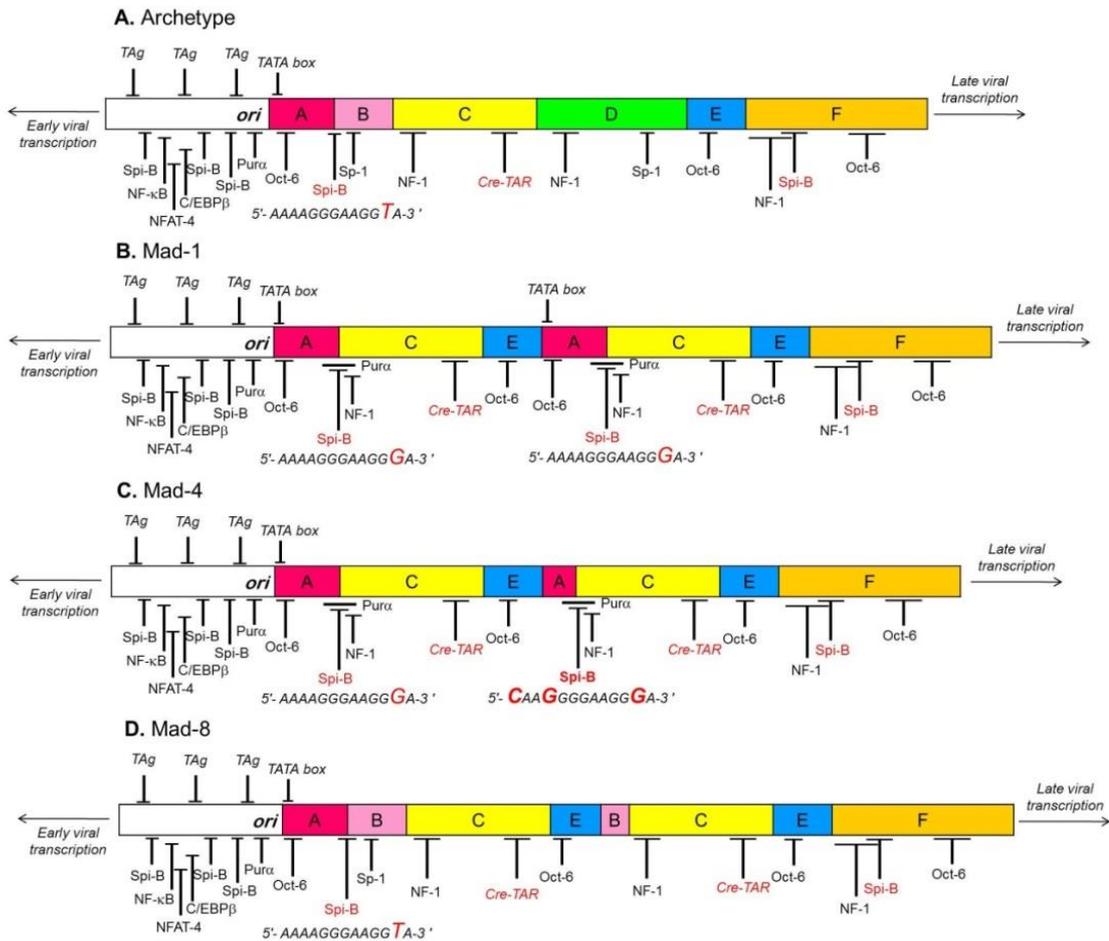


Figura 1.6. Organizzazione strutturale delle sequenze NCCR di JCv [Bellizzi et al., 2013].

Con la scoperta di nuove sequenze riarrangiate della NCCR è stata effettuata una nuova classificazione che suddivide le varianti virali di JC in due grandi gruppi: i virus di classe I, caratterizzati dalla presenza di una ripetizione *in tandem* di 98 pb all'interno della NCCR (come in *Mad-1*), e i virus di classe II, contenenti ceppi che mostrano variazioni rispetto alla NCCR dei virus di classe I [Jensen and Major, 2001; White et al., 2009].

Un'ulteriore classificazione, invece, organizza le sequenze virali della NCCR in quattro varianti:

- varianti di tipo I, le quali non contengono inserzioni nella organizzazione A-C-E della NCCR e sono suddivise a loro volta in varianti di tipo IS (con una sola sequenza A-C-E) e varianti IR (con ripetizioni della sequenza A-C-E), quali *Mad-1* e *Mad-4* (Fig. 1.7 A) [Padgett et al., 1976; Frisque et al., 1984; Jensen and Major, 2001];

- varianti di tipo II, le quali mostrano inserzioni di 23pb e 66pb, che corrispondono rispettivamente al box B e al box D, nella sequenza A-C-E di 98 pb, e sono suddivise in IIS (o *archetype-like*) e IIR contenenti particolari inserzioni e delezioni rispetto alla sequenza IIS, come nel ceppo *Mad-8* (Fig. 1.7 B) [Yogo et al., 1990; Ferenczy et al., 2012].

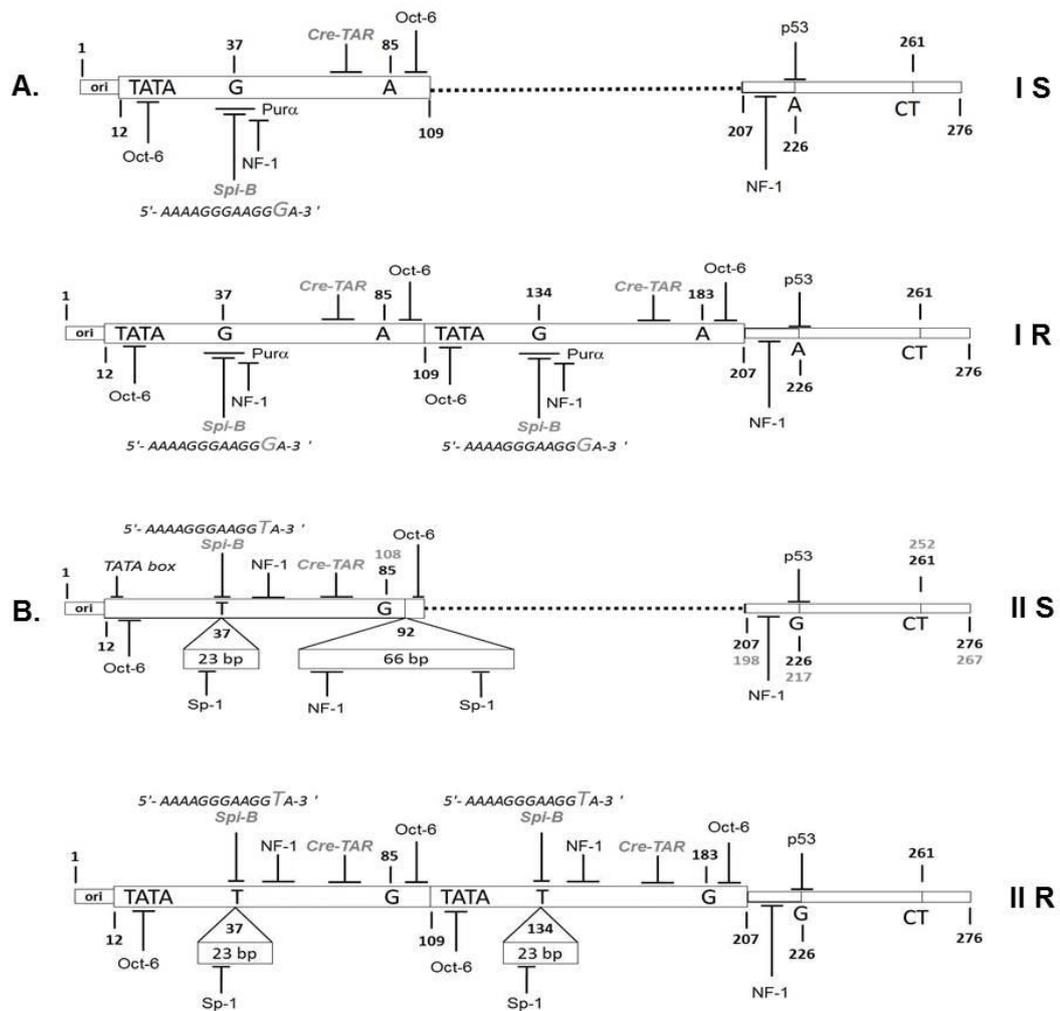


Figura 1.7. Organizzazione strutturale delle sequenze NCCR di JCV. Classificazione di Jensen and Major [Jensen and Major, 2001].

1.2.3 Le proteine precoci

Le proteine precoci sono coinvolte nella trasformazione virale, nella regolazione genica e nella replicazione. Esse sono la proteina AgT, la proteina Agt e le proteine T *prime* (T'135, T'136 e T'165). Tali proteine multifunzionali sono codificate da cinque trascritti differenti che si formano in seguito a *splicing* alternativo a partire da un unico precursore di mRNA. Esse svolgono ruoli precisi nella regolazione del ciclo del virus e nella trasformazione cellulare.

1.2.3.1 L'antigene T grande

L'antigene T è una proteina di 688 aminoacidi e regola il passaggio della trascrizione dalle proteine precoci a quelle tardive nonché la replicazione del genoma virale [Diotti et al., 2013].

In particolare l'AgT modula le vie di segnalazione cellulare in maniera tale da indurre l'ingresso della cellula in fase S ed attivare l'apparato di replicazione e trascrizione dell'ospite (DNA polimerasi α e fattori di trascrizione) al fine di replicare e trascrivere il DNA virale. Evento cruciale,

per la progressione del ciclo cellulare, è l'interazione dell'AgT con le proteine appartenenti alla famiglia Rb e p53 [Orba et al., 2010; Diotti et al., 2013].

L'interazione con p53 previene il processo apoptotico che viene indotto quando vi è un'erronea attivazione cellulare della fase S e promuove la replicazione virale in cellule bloccate in fase G2 [Del Valle et al., 2001; Del Valle and Khalili, 2010].

Tali caratteristiche conferiscono all'AgT proprietà oncogene ed è per tali motivi che questa proteina virale è considerata il principale fattore implicato nella trasformazione cellulare e nella tumorigenesi. Il potenziale oncogeno del polyomavirus JC è stato ampiamente dimostrato *in vitro* in cellule non permissive nelle quali il ciclo di replicazione virale non viene portato a termine, avviando la cellula alla trasformazione [Khalili et al., 2001, White and Khalili, 2005]. *In vivo* invece, studi condotti su topi transgenici hanno mostrato come, nell'insorgenza del neuroblastoma della ghiandola surrenale, non fosse richiesta la replicazione dell'intero genoma virale ma fosse sufficiente la presenza della sola proteina AgT [Small et al., 1986; Franks et al., 1996]. Tali esperimenti hanno evidenziato inoltre come l'interazione dell'AgT con diversi oncosoppressori cellulari, tra cui p53, comporti l'alterazione dello svolgimento dei normali processi di regolazione del ciclo cellulare favorendo l'acquisizione del fenotipo trasformato [Del Valle et al., 2001; Khalili et al., 2001; Khalili et al., 2003a; Khalili et al., 2003b; Caracciolo et al., 2006].

Strutturalmente l'AgT può essere suddiviso in differenti domini funzionali (Fig. 1.8) [Delbue et al., 2012] che, partendo dall'N-terminale al C-terminale sono:

- il dominio **DNaJ**, che si lega al fattore cellulare HSc70 e alla polimerasi α ;
- il motivo **LXCXE**, che si lega in modo specifico ai membri della famiglia Rb inattivandone la funzionalità;
- il dominio **NLS**, necessario per la localizzazione nucleare della proteina;
- il dominio elicastico;
- il dominio di legame per la proteina p53.

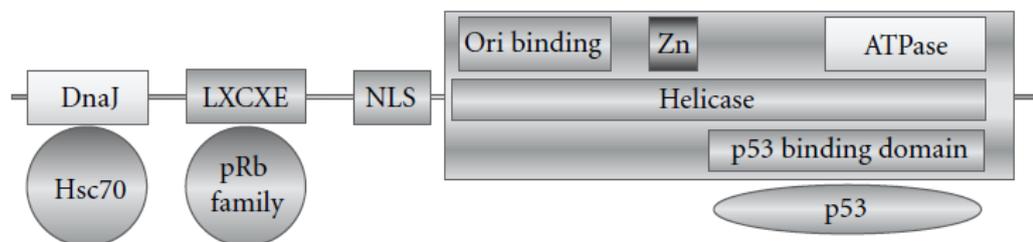


Figura 1.8. Struttura della proteina AgT [Delbue et al., 2012].

1.2.3.2 L'antigene t piccolo e le proteine T'

Il ruolo della proteina Agt nel ciclo vitale di JCV è ancora oggetto di studio, tuttavia è stato dimostrato che l'Agt, analogamente all'AgT, è coinvolto nell'induzione della fase S cellulare. Infatti tale proteina, interagisce ed inattiva i fattori di regolazione appartenenti alla famiglia Rb e sequestra la protein-fosfatasi cellulare A (PP2A) [Bollag et al., 2010]. Questo ultimo legame previene la defosforilazione dell'Agnoproteina, favorendo la replicazione virale. E' noto infatti che la riduzione dei livelli della proteina Agt o della PP2A comporti una diminuzione della replicazione di JCV (Fig. 1.9) [Sariyer et al., 2008].

Le proteine T' (*prime*) furono scoperte nel 1995 da Trowbridge e Frisque che le ritenevano dei prodotti di degradazione dell'AgT poiché presentano con quest'ultimo un'omologia di sequenza pari a 132 amminoacidi [Trowbridge and Frisque, 1995]. In seguito invece, si comprese che le proteine T' originano da un processo di *splicing* alternativo dell'mRNA codificante per l'AgT. Infatti, esse presentano i medesimi domini J e LXCXE (Cr2) nella porzione N-terminale, mentre differiscono all'estremità C-terminale per il loro grado di fosforilazione che influenza il legame delle T' con i membri della famiglia Rb (pRb, p107 e p130) e con lo chaperone Hsp70. In particolare, dall'interazione fra le proteine T' e lo chaperone Hsp70 e dall'inattivazione delle proteine pRb, p107 e p130 ne consegue il rilascio di un fattore trascrizionale cellulare appartenente alla famiglia E2F. Tale fattore promuove l'avanzamento del ciclo cellulare dalla fase G1 alla fase S (Fig. 1.9) [Prins and Frisque, 2001; Sami Saribas et al., 2014].

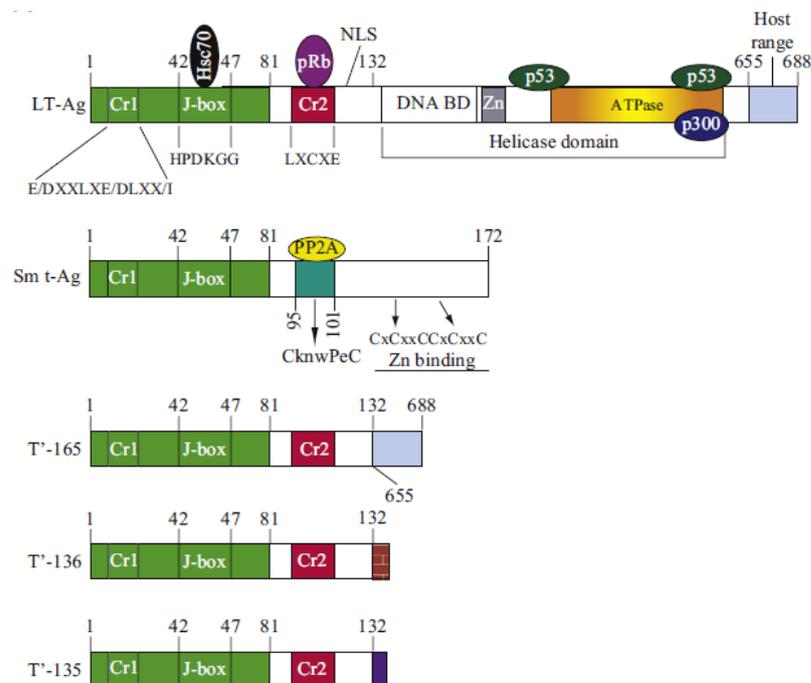


Figura 1.9. Rappresentazione grafica delle proteine precoci di JCV. AgT, Agt e proteine T' *prime* (T'-135, T'-136 e T'-165), con i diversi domini funzionali, che includono Cr1, il box J e Cr2 [Sami Saribas et al., 2014].

1.2.4 *Le proteine tardive*

1.2.4.1 *La proteina VP1*

La proteina VP1 è la principale proteina del capsido virale. Infatti per ogni pentamero di VP1 vi è una singola molecola di VP2 o VP3 [Sthele and Harrison, 1997]. Inoltre, la proteina VP1 contiene gli epitopi riconosciuti dal sistema immunitario ed è implicata nel riconoscimento dei recettori cellulari e pertanto nell'infezione delle cellule bersaglio [Weissert, 2011].

L'analisi di sequenza della regione codificante la proteina è stata utilizzata per definire i diversi genotipi virali. La classificazione dei genotipi di JCV, introdotta da Agostini nel 1996, si basa sull'analisi delle mutazioni puntiformi presenti in un frammento genico di 215 bp della VP1 compreso tra i nucleotidi 1710-1924 [Agostini et al., 1996; Hansjurgan et al., 2001]. Lo schema di tale classificazione utilizza una combinazione di numeri seguita da lettere per designare Genotipi e Sottotipi [Chang et al., 1996].

Attualmente sono stati identificati otto genotipi principali (il genotipo 5 è in realtà un sottogruppo del genotipo 3), classificati sulla base di alcuni siti polimorfici presenti nella regione codificante del genoma virale [Ferenczy et al., 2012].

L'analisi di sequenza della regione codificante la proteina VP1 ha permesso anche di individuare caratteristiche mutazioni presenti in alcuni isolati da pazienti con PML e mai evidenziate in soggetti sani. In particolare, le mutazioni in posizione L55, K60, N265, S267 e S269 sono correlabili con lo sviluppo della PML e sono localizzate in corrispondenza del sito di legame per il recettore di cui ne alterano la specificità [Sunyaev et al., 2009; Gorelik et al., 2011]. Sebbene queste mutazioni siano PML specifiche, esse non si ritrovano in tutti gli isolati (52% dei campioni positivi) suggerendone un ruolo da cofattore nell'insorgenza della patologia.

Altri specifici polimorfismi, localizzati nelle posizioni amminoacidiche 74, 75, 117 e 128, della VP1 virale sembrerebbero invece correlare con una prognosi di PML più favorevole [Delbue et al., 2009].

1.2.4.2 *Le proteine VP2 e VP3*

Le proteine tardive VP2 e VP3 favoriscono il trasporto del virus al nucleo ed il suo scapsidamento [Geiger et al., 2011; Inoue and Tsai, 2011]. Inoltre partecipano al processo di assemblaggio del capsido, costituendone lo strato più interno, come messo in evidenza da uno studio condotto recentemente [Sami Saribas et al., 2014]. In questo studio, è stato dimostrato come il legame tra le proteine VP2 e VP3, lo chaperone Hsp70 e la proteina AgT porti alla formazione di accumuli di pre-virioni all'interno del nucleo delle cellule infettate (Fig. 1.10). In particolare Hsp70 si associa alle proteine tardive VP2 e VP3 e ne media l'interazione con l'AgT nel citoplasma o nei centri di replicazione presenti nel nucleo. Tale interazione induce un cambiamento conformazionale dell'AgT che incrementa la sua affinità di legame per l'origine di replicazione virale avviando il

processo di sintesi di nuovo DNA. Il DNA neoformato viene immediatamente catturato dalle proteine capsidiche VP2 e VP3 che pertanto danno inizio al processo di assemblaggio del virione. Successivamente i nucleocapsidi vengono ricoperti dalla proteina VP1 divenendo virioni maturi (Fig. 1.10) [Sami Saribas et al., 2014].

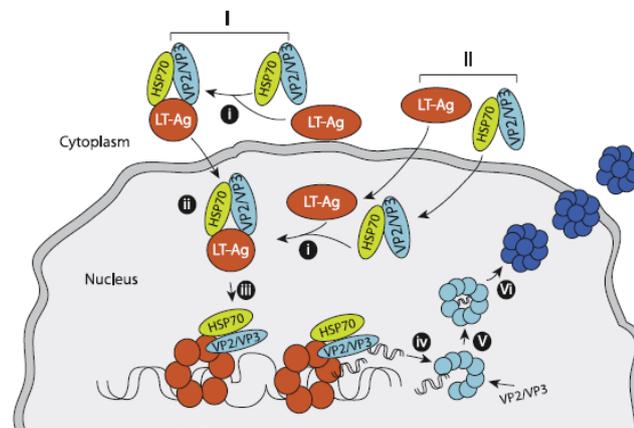


Figura 1.10. Modello rappresentante la replicazione e l'assemblaggio del capside di JCV. Hsp70 si associa alle proteine VP2 e VP3 mediandone l'interazione con AgT nel citoplasma (I) o nei centri di replicazione presenti nel nucleo (II). L'interazione di VP2 e VP3 con AgT (i) induce un cambiamento conformazionale di quest'ultimo (ii), incrementandone la sua affinità di legame per Ori (iii). Il DNA neoformato viene immediatamente catturato dalle proteine VP2 e VP3 ed ha inizio il processo di assemblaggio del capside (iv e v). Infine i nucleocapsidi vengono ricoperti da VP1 formando così i virioni maturi (vi) [Sami Saribas et al., 2014].

1.2.4.3 La proteina VPx o Agnoproteina

L'Agnoproteina (o VPx) è una proteina tardiva attiva durante l'ultima fase dell'infezione cellulare da parte di JCV. Sebbene la sua funzione non sia stata ancora ben compresa, è stato ipotizzato che possa giocare il ruolo di una *viroporina*, favorendo il rilascio del virus dalle cellule [Suzuki et al., 2010]. L'Agnoproteina interagisce anche con l'AgT al fine di ridurre i livelli di replicazione virale favorendo la traduzione dei trascritti tardivi e la formazione di virioni maturi. Infine alcuni Autori hanno dimostrato come anche l'Agnoproteina possa essere implicata nella tumorigenesi. Infatti, nelle cellule non permissive infettate, tale proteina agendo in sinergia con l'AgT contribuirebbe ad alterare la regolazione dei processi metabolici cellulari favorendo l'acquisizione del fenotipo trasformato. In particolare, essa concorrerebbe all'insorgenza di mutazioni a livello del DNA genomico, bloccando l'attività delle proteine coinvolte nei meccanismi di riparo del DNA danneggiato [Khalili et al., 2005].

1.2.5 La classificazione genotipica di JCV

La classificazione del virus JC in genotipi e sottotipi si basa sull'analisi di sequenza della regione codificante la proteina VP1. Tale classificazione è stata introdotta da Agostini nel 1996 e si basa

sull'analisi delle mutazioni puntiformi presenti in un frammento genico di 215 bp della VP1 compreso tra i nucleotidi 1710-1924 [Agostini et al., 1996; Hansjürgen et al., 2001]. Lo schema di tale classificazione utilizza una combinazione di numeri seguita da lettere per designare genotipi e sottotipi [Chang et al., 1996]. Attualmente sono stati identificati otto genotipi principali (il genotipo 5 è un sottogruppo del genotipo 3), classificati sulla base di alcuni siti polimorfici presenti nella regione della VP1 [Ferenczy et al., 2012] (Fig. 1.11).

Type	VP1 type change(s) from consensus	Predominantly associated ethnic group(s)	Identical VP1 sequence	Coding sequences required for complete type identification
1A	75R, 117S, 158L, 345K	European/European-American		
1B	74S, 117S, 126A	European/European-American		
2A1	113(L), 117(A), 126(A), 164(T)	Asian/Native American		
2A2	115L	Asian/Native American		
2B	126A	Asian/Eurasian		
2D1	Consensus	Asian/South Asian	7C1, 7C2	VP2/VP3, VP2, T
2D2	126A	Asian/South Asian	2B	VP2/VP3, agnoprotein, T
2E	113L, 321I	Western Pacific populations	7A	VP2, agnoprotein, T
3A	134A, 164T, 321I, 332Q	African/African-American	3B	t, T
3B	134A, 164T, 321I, 332Q	African/African-American	3A	t, T
4	134A, 164T	European/European-American		
6	164T	African		
7A	113L, 321I	Asian	2E	VP2, agnoprotein, T
7B1	113(L)	Asian		
7B2	37V, 321I	Asian		
7C1	Consensus	Asian/South Asian	2D1, 7C2	VP2/VP3, VP2, agnoprotein, T
7C2	Consensus	Asian/South Asian	2D1, 7C1	VP2/VP3, VP2, T
8A	12H, 164T	Inhabitants of Papua New Guinea	8B	VP2/3, VP2, agnoprotein, T
8B	12H, 164T	Western Pacific populations	8A	VP2/3, VP2, agnoprotein, T
PML-associated mutations	55F, 60 M/E/N, 66H, 265D/T; 267F/L, 269F/Y/C -			

Figura 1.11. Definizione dei genotipi/sottotipi di JCV. Classificazione in base alla posizione nucleotidica dei siti polimorfici all'interno del gene codificante per VP1 [Ferenczy et al., 2012].

Associati ai genotipi sono stati identificati numerosi sottotipi virali correlabili a diverse aree geografiche del pianeta e sviluppatasi in seguito a flussi migratori che hanno portato all'isolamento geografico di alcune popolazioni umane. JCV si è quindi rivelato anche un ottimo *marker* per lo studio dei flussi migratori umani consentendo ai ricercatori di tracciare nuovi percorsi migratori e di verificare quelli già conosciuti [Jobe et al., 2001; Sugimoto et al., 2002; Kmiecik et al., 2008; Hirsch et al., 2013] (Fig. 1.12).

In particolare, i genotipi 1, 4 e relativi sottotipi sono più frequenti in Europa e negli Stati Uniti d'America (USA) [Sugimoto et al., 2002]. I genotipi 2, 7 e i sottotipi correlati sono stati ritrovati nelle popolazioni asiatiche e nei nativi americani. Il tipo genotipo 3 è stato isolato in un paziente proveniente dalla Tanzania e sembra essere prevalente, insieme al genotipo 6, nel continente

africano. Il genotipo 8 ed i suoi sottotipi invece sono caratteristici delle popolazioni del Pacifico Occidentale.

In Italia, il genotipo 1 è il prevalente nella popolazione sana (57,8%), segue il genotipo 4 (27,8%), mentre, il genotipo 2 si riscontra raramente (13,4%) ed il 3 è quasi completamente assente (1%) [Pagani et al., 2003].

Diversi Autori hanno riscontrato con elevata frequenza la presenza del genotipo 2 (sottotipo 2B) nel tessuto cerebrale e nel liquido cefalorachidiano (CSF) di pazienti con PML, suggerendo l'esistenza di una differenza biologica nella potenziale capacità dei vari genotipi di causare tale patologia neurologica [Agostini et al., 1997; Ferrante et al., 2001; Mischitelli et al., 2005].

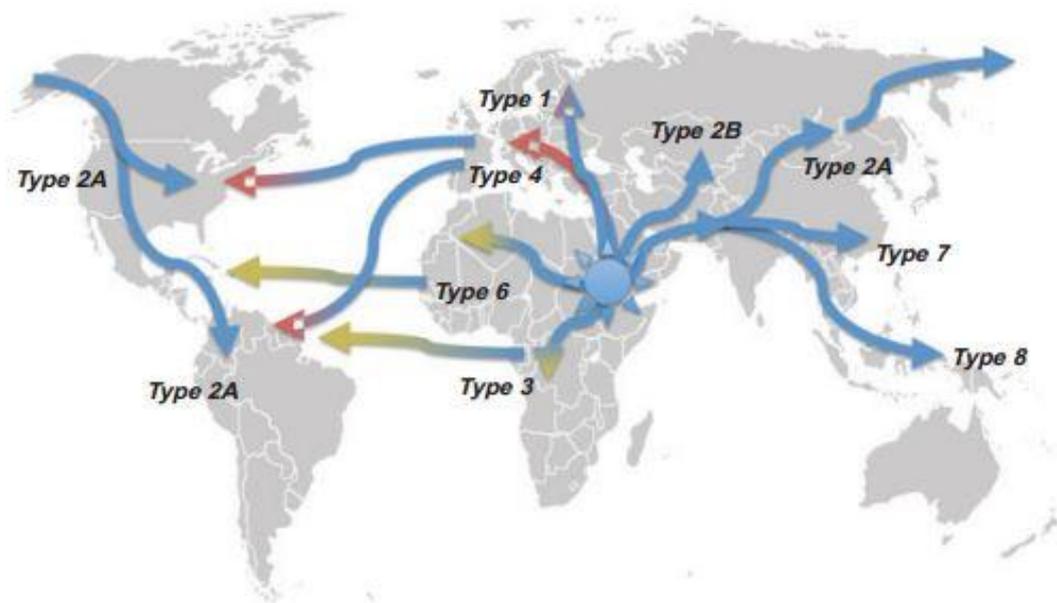


Figura 1.12. Flussi migratori umani e relativi genotipi/sottotipi di JCV riscontrati in diverse aree geografiche del pianeta [Hirsch et al., 2013].

1.2.6 Il ciclo vitale di JCV

Il ciclo vitale di JCV ha inizio con il legame della proteina VP1 a specifici co-recettori glicoproteici presenti sulla superficie della cellula bersaglio, contenenti acido sialico e carichi negativamente [Austin and Fehlings, 2008]. In generale l'acido sialico si trova in posizione α -(2,6) terminale ed è in grado di legarsi ad un pentasaccaride LSTc od ad un recettore serotoninergico 5HT_{2A} [Elphick et al., 2004; Dugan et al., 2005; Neu et al., 2010]. Nella fase di adesione alla cellula svolgono un ruolo fondamentale anche le proteine VP2 e VP3 in quanto facilitano il legame della proteina VP1 al co-recettore cellulare [Cole, 1996; Pho et al., 2000].

Come tutti i virus a DNA, JCV penetra nel citoplasma attraverso un processo di endocitosi mediata da clatrina [Pho et al., 2000; Querbes et al., 2004] e, una volta internalizzato, viene trasportato agli endosomi precoci Rab-5 positivi.

Successivamente il virione viene traslocato all'interno del reticolo endoplasmatico (RE) da cui, mediante un processo di degradazione definito ERAD, si libera nel citoplasma per muoversi verso il nucleo. L'ingresso all'interno del nucleo prevede l'interazione con i complessi dei pori nucleari come mostrato in Figura 1.13 [Ferenczy et al., 2012].

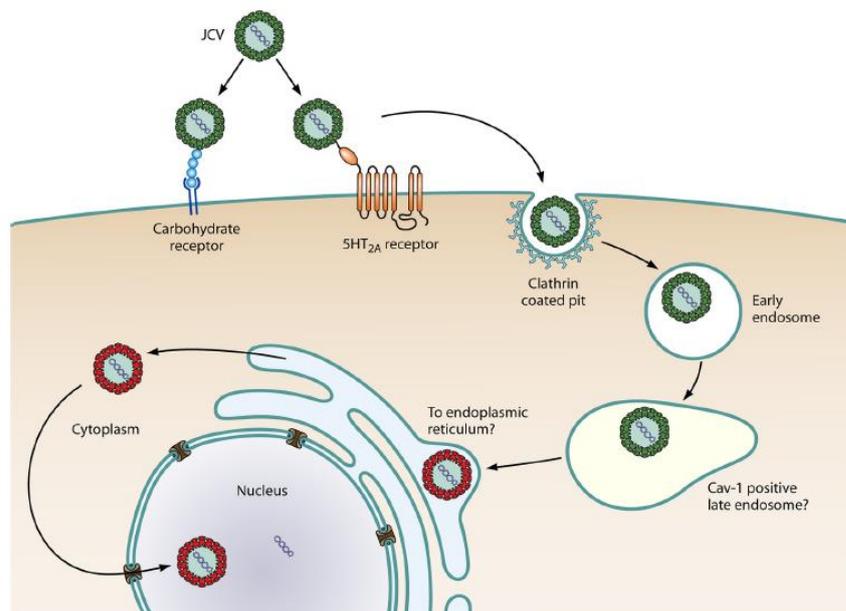


Figura 1.13. Processo di adesione cellulare ed internalizzazione nucleare del virus JC [Ferenczy et al., 2012].

Una volta penetrato nel nucleo, il virione viene sottoposto a scapsidazione ed il minicromosoma virale viene trascritto dalla RNA polimerasi II cellulare per produrre gli mRNA precoci i cui prodotti, AgT e Agt, sono rilevabili 12-15 ore dopo l'infezione. La regolazione della trascrizione

virale dipende non solo dalla disponibilità delle proteine dell'ospite ma anche dal tipo di sequenza della NCCR presente nel genoma virale. Infatti, quanto più tale sequenza presenterà siti di legame per specifici fattori trascrizionali cellulari tanto più l'intero processo replicativo procederà velocemente e maggiore sarà il numero di virioni prodotti [Ferenczy et al., 2012].

La replicazione del genoma virale può essere osservata solo dopo 3-5 giorni post-infezione, prosegue per diverse settimane dall'internalizzazione del virione e si avvale della DNA-polimerasi e della timidino-chinasi cellulari [Feigenbaum et al., 1987; Khalili et al., 1987]. In particolare l'AgT determina l'inizio della sintesi del DNA virale legandosi all'origine di replicazione e, da questo sito, la duplicazione del DNA virale procede bi-direzionalmente. La replicazione del DNA virale è sotto il controllo di fattori specie-specifici che determinano anche il tropismo del virus. Infatti solo alcune cellule possiedono le proteine necessarie al completamento del ciclo di vita virale, tra di esse la più importante è la proteina NF-1 in grado di modulare *in vivo* la replicazione di JCV a seconda dell'isoforma e del tipo cellulare coinvolti [Muller and Mermod; 2000; Monaco et al., 2001; Major, 2010].

La replicazione e l'assemblaggio del capsido di JCV avvengono in corrispondenza di zone del nucleo caratterizzate dall'accumulo di specifiche proteine, come Daxx e SP100, denominate "*Nuclear domain 10 bodies*" (ND10 bodies). Probabilmente il virus utilizza tali domini nucleari come delle impalcature necessarie per la replicazione del genoma e l'assemblaggio dei virioni [Shishido-Hara et al., 2008]. Durante il processo replicativo, inoltre, la NCCR virale del ceppo archetipo va incontro ai processi di riarrangiamento che formeranno le specifiche sequenze della regione di controllo che caratterizzano le varianti virali di JCV.

Ad esempio, la sequenza del prototipo *Mad-1* è contraddistinta da due siti di legame per i fattori Pura, YB-1, LCP-1 e GF-1, quattro siti per i fattori Oct-6/tst-1/SCIP ed NF-1 e sei per il fattore trascrizionale ematopoietico Spi-B [Tamura et al., 1988; Amemiya et al., 1992; Tada and Khalili, 1992; Wegner et al., 1993; Shivakumar and Das, 1994; Chen and Khalili, 1995; Chen et al., 1997; Ferenczy et al., 2012].

La NCCR della variante *Mad-4*, variante del prototipo *Mad-1*, invece è caratterizzata da una delezione di 19 pb che porta all'eliminazione della TATA box posta in posizione terminale e che tuttavia non inficia le capacità replicative del virus come dimostrato dal ritrovamento di tale sequenza nei soggetti affetti da PML [Martin et al., 1985; Mandl and Frisque, 1986; Cubitt et al., 2001; Gosert et al., 2010; Reid et al., 2011].

In concomitanza con la replicazione del genoma virale, ha inizio la trascrizione e la traduzione dei messaggeri tardivi che codificano per le proteine del capsido e per l'Agnoproteina. L'attivazione dell'espressione dei geni tardivi richiede l'intervento della proteina AgT che interagisce con alcuni componenti dell'apparato trascrizionale cellulare quali la TATA Binding Protein (TBP), i fattori ad essa associati (TAFs) ed alcuni fattori trascrizionali, incluso Sp1 [Kim et al., 2000]. In particolare

l'AgT lega la TBP analogamente ad una TAF cellulare [Damania et al., 1998]. L'espressione delle proteine strutturali del virus avviene a partire da due molecole di RNA messaggero: il 16S e ed il 19S. Dal primo mRNA viene prodotta la proteina capsidica VP1 mentre dal secondo messaggero vengono tradotte le proteine virali VP2, VP3 e l'Agno proteina. Successivamente le proteine strutturali sono trasportate nel nucleo dove avviene l'assemblaggio dei virioni visibili già a 24h dall'infezione. Il virione maturo viene rilasciato dalla cellula ospite tramite lisi cellulare, sebbene sia stata osservata al microscopio elettronico anche la secrezione di virioni attraverso la membrana plasmatica intatta. Quale tra questi due meccanismi sia quello preferito dal virus per fuoriuscire dalla cellula ospite è ancora oggetto di studio [Ferenczy et al., 2012].

Il virus JC è tra i virus a DNA con il più lungo ciclo replicativo. La lisi cellulare avviene 24-48 ore dall'inizio del ciclo vitale e spesso gran parte della progenie rimane associata a detriti cellulari.

1.2.7 Il Potenziale oncogeno di JCV

Quando l'espressione dei geni precoci viene seguita dalla replicazione del DNA virale e dall'espressione dei geni tardivi, il risultato è un'infezione produttiva. L'esempio più calzante è l'infezione degli oligodendrociti, che sono permissivi all'infezione litica di JCV e sono distrutti durante il processo infettivo, portando alla comparsa della PML.

Tuttavia sono possibili anche altri scenari, come nel caso di infezione di cellule non permissive nelle quali si osserva soltanto l'espressione dei geni precoci, in quanto tali cellule non sono in grado di supportare né la replicazione virale né l'espressione dei geni tardivi. In questa situazione l'espressione dell'AgT conduce alla inattivazione di oncosoppressori, alla de-regolazione delle vie di segnalazione o all'instabilità genomica, che possono contribuire alla trasformazione cellulare [Khalili et al., 2003a] (Fig. 1.14).

Il potenziale oncogeno del Polyomavirus JC è stato ampiamente dimostrato *in vitro* in cellule non permissive nelle quali il ciclo di replicazione virale non viene portato a termine, avviando la cellula alla trasformazione. I fattori che contribuiscono alla permissività di un dato tipo cellulare possono essere ad esempio il tessuto di origine, il punto di sviluppo o lo stato differenziativo. Ciò può essere osservato negli stessi oligodendrociti che, solo se pienamente maturi permettono la progressione dell'infezione litica, ma quando si trovano in forma indifferenziata portano soltanto all'espressione dell'AgT con conseguente sviluppo di un oligodendroglioma [Khalili et al., 2003a].

Alcuni Autori hanno ipotizzato un possibile coinvolgimento del virus nell'insorgenza e/o nello sviluppo di tumori cerebrali, di linfomi delle cellule B e di tumori del colon-retto, dopo il ritrovamento del DNA, dell'RNA messaggero per l'antigene T e della stessa proteina virale nelle suddette neoplasie [Shadan et al., 2002; Khalili et al., 2003a; Khalili et al., 2003b; Hory et al., 2005; Enam et al., 2006; Lin et al., 2008].

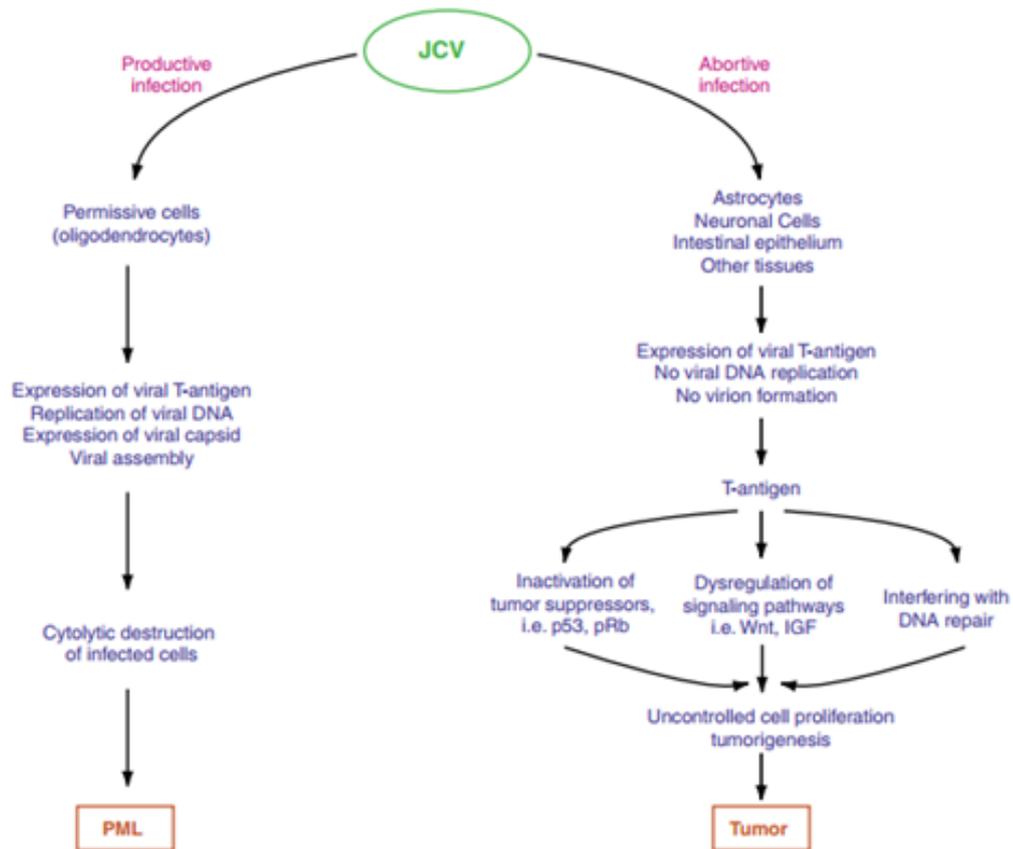


Figura 1.14. Proprietà oncogene del virus JC [Khalili et al., 2003a].

Altri Autori hanno dimostrato l'esistenza di una correlazione fra alcuni tumori del SNC (linfomi, gliomi, oligodendrogliomi) e sviluppo o progressione della PML [Caldarelli-Stefano et al., 2000; Del Valle et al., 2001; Gallia et al., 2001; Croul et al., 2003].

E' bene sottolineare che la sola presenza del DNA di JC non è di per sé indicativa di un effetto causativo nell'insorgenza dei tumori, ma è necessario che i geni virali vengano espressi. Nel caso della proteina AgT, come ampiamente discusso, sono state dimostrate le sue capacità oncogene e proprio la loro comprensione potrebbe essere un punto di partenza per lo sviluppo di target terapeutici in grado di bloccare la progressione tumorale associata al virus JC [Khalili et al., 2003a].

1.3 Patologie del SNC associate all'infezione da JCV

1.3.1 La leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML)

La PML è una rara patologia demielinizzante del cervello, caratterizzata da infezione litica delle cellule gliali, che colpisce prevalentemente gli adulti e solo sporadicamente i bambini.

I pazienti presentano deficit neuropsicologici nel momento dell'insorgenza della patologia. Tra i sintomi più comuni si riscontrano: deficit motori, stato di coscienza alterato, disturbi visivi e atassia. Esistono tuttavia anche manifestazioni atipiche che includono sindrome cerebellare, meningiti e meningoencefaliti, atassia mioclonica progressiva, degenerazione muscolare associata a segni extrapiramidali (Fig. 1.15).

È una malattia progressiva e porta a morte nel giro di qualche mese laddove il paziente si trovi in condizioni permanenti di immunocompromissione. La sopravvivenza media varia in relazione allo stato del paziente: in quelli HIV-negativi è di pochi mesi, mentre nel caso in cui tali soggetti siano HIV-positivi in trattamento con terapie antiretrovirali, la sopravvivenza aumenta sebbene si possano presentare complicanze severe a carico del SNC.

La descrizione dal punto di vista neuropatologico della PML è stata riportata per la prima volta nel 1958 da Astrom e colleghi, in seguito all'analisi di tessuto cerebrale prelevato da due pazienti affetti da Leucemia Linfocitica Cronica e da un paziente con Linfoma di Hodgkin [Astrom et al., 1958]. L'eziologia di questa malattia non era conosciuta fino a quando non è stata osservata da Zu Rhein e Chou, nel 1965, nelle lesioni cerebrali tipiche della PML la presenza di particelle virali [Zu Rhein and Chou, 1965]. Queste ultime sono state poi isolate in colture di cervello fetale umano nel 1971 da Padgett e colleghi. Il nome assegnato al virus, JC (JCV), deriva proprio dalle iniziali del paziente (John Cunningham), il cui tessuto cerebrale venne usato per la coltura e l'isolamento del virus [Padgett et al., 1971].

Inizialmente, sulla base degli studi effettuati, si pensava che la PML fosse una complicanza rara di tumori del sistema ematologico o di disordini autoimmunitari sistemici; tuttavia si è riscontrato un aumento di incidenza di 50 volte con la diffusione del virus dell'HIV, a partire dalla metà degli anni Ottanta. Ad oggi la PML risulta la causa di morte nel 3-5% dei malati di AIDS [Major, 2010].

L'insorgenza della patologia si può osservare anche in seguito a trapianto di organi o cellule staminali e, recentemente, nuovi casi di PML sono associati all'uso di mAbs in pazienti affetti da diverse patologie, quali SM, MC, linfoma non-Hodgkin, LES, AR e patologie ematologiche autoimmuni.

L'incidenza di PML nei pazienti trattati con immunomodulanti dipende dal farmaco utilizzato. Ad esempio il rischio di insorgenza di PML nei trattati con rituximab, anticorpo monoclonale umanizzato diretto contro il CD-20, è stato stimato essere 1/4000 quando utilizzato nei pazienti affetti da LES e 1/25000 quando somministrato a soggetti malati di artrite reumatoide [Clifford et al., 2011]. Una elevatissima incidenza (1/500) è stata osservata in pazienti con psoriasi trattati con Efalizumab, un anticorpo umanizzato diretto contro una molecola di adesione presente sui linfociti T. Per tale ragione, il farmaco è stato ritirato dal commercio [Molloy and Calabrese, 2009].

E' probabile che molte di queste terapie portino all'insorgenza di PML in seguito all'indebolimento dell'immuno-sorveglianza. È stato dimostrato che è proprio la linfopenia dei

linfociti T CD4+ e CD8+ causata dall'utilizzo di natalizumab, efalizumab e rituximab uno dei fattori di rischio primari alla manifestazione della patologia.

D'altro canto diversi farmaci, come natalizumab e rituximab, causano la deplezione in periferia di cellule B mature con la conseguente mobilitazione di cellule B immature dal midollo osseo e la potenziale diffusione del virus latente nel cervello [Ferenczy et al., 2012].

Attualmente non esiste una terapia efficace in grado di contrastare questa patologia.

	Classic PML	PML-IRIS	JC virus granule Cell neuropathy	JC virus encephalopathy	JC virus meningitis
Onset	Subacute	Immune recovery	Chronic	Subacute	Acute
Radiological findings (MRI)	Asymmetric, well demarcated, non-enhancing subcortical white matter lesions, hyperintense in T2 and FLAIR, hypointense in T1	Contrast enhancement and mass effect	Cerebellar atrophy	Cortical lesions	No defined brain lesions, ventricular dilatation
Neurological symptoms	Based on location	Based on location and inflammation	Cerebellar syndrome	Encephalopathy	Headache, stiff neck, fever
Diagnosis	JC virus detection in the CSF, brain biopsy, radiographical findings and symptom	JC virus in the CSF, brain biopsy, radiographical findings and symptoms	Cerebellar biopsy, JC virus in the CSF, radiographical findings and symptoms	Brain biopsy, JC virus PCR in the CSF, radiographical findings and symptoms	JC virus in the CSF and exclusion of other viruses
Histology	Demyelinating lesions often at grey/white junction, JC virus detected in enlarged oligodendrocytes, bizarre astrocytes	Demyelination similar to classic PML, with addition of inflammatory infiltrates	Lytic infection of granule cell neurons in the cerebellum by JC virus	Lytic infection of cortical pyramidal neurons and cortical astrocytes by JC virus	
Treatment	HAART for HIV-positive patients, discontinue or decrease immunosuppression for HIV-negative patients, plasma exchange for natalizumab-treated patients	Similar to PML, consider steroids in cases with notable neurological worsening or signs of impending brain herniation	Similar to classic PML	Similar to classic PML	Similar to classic PML

Figura 1.15 Caratteristiche cliniche delle patologie associate all'infezione da JCV PML: leucoencefalopatia multifocale progressiva; IRIS: sindrome infiammatoria da immuno-ricostituzione; MRI: magnetic resonance imaging; FLAIR: fluid-attenuated inversion recovery, HAART: terapia antiretrovirale combinata. [Riadattata da Tan and Korolnik, 2010].

1.3.2 PML associata a sindrome infiammatoria da immuni-ricostituzione (PML-IRIS)

La sindrome infiammatoria da immuno-ricostituzione o IRIS consiste in un peggioramento clinico paradossale che generalmente si verifica a fronte di una immuno-ricostituzione, presentandosi come una risposta infiammatoria diretta verso patogeni clinicamente silenti o manifesti dopo un periodo di immunosoppressione. Questo processo di immuno-ricostituzione viene dedotto da un

aumento della conta dei linfociti T che generalmente segue l'inizio della terapia HAART in pazienti HIV positivi, oppure in seguito all'interruzione di una terapia immunosoppressiva in pazienti HIV negativi. La PML-IRIS rappresenta circa il 23% dei casi di PML diagnosticati nei pazienti HIV positivi [Cinque et al., 2009] e può essere così definita: "Pazienti HIV positivi trattati con HAART, a seguito della quale si osserva un aumento della conta dei linfociti TCD4+ ed una diminuzione dell'HIV-RNA plasmatico, con conseguente sviluppo paradossale di una PML infiammatoria o di una reazione infiammatoria nel sito di lesioni da PML precedentemente diagnosticate" [Tavazzi et al., 2012]. Clinicamente si presenta con un peggioramento della sintomatologia caratteristica della PML classica, non compatibile col decorso di una PML diagnosticata in precedenza o *de novo* (Fig. 1.15)

1.3.3 *Neuronopatia delle cellule granulari JCV-correlata*

La neuronopatia delle cellule granulari JCV-correlata (JCV GCN) è una patologia causata dall'infezione delle cellule granulari del cervelletto da parte del JCV. Questa patologia può manifestarsi sia isolatamente che in concomitanza con la PML [Du Pasquier et al., 2003; Koralnik et al., 2005] ed è stata descritta sia in pazienti HIV positivi che HIV negativi [Otis and Moral, 2005; Hecht et al., 2007; Granot et al., 2009]. Nella JCV GCN si assiste ad una distruzione delle cellule granulari del cervelletto con conseguente disfunzione cerebellare subacuta o cronica che si manifesta con i seguenti sintomi: atassia, disartria ed incoordinazione motoria. La diagnosi è effettuata tramite biopsia cerebellare che mostra una infezione litica delle cellule granulari, le quali assumono un aspetto ipocromatico con nucleo allargato (Fig. 1.16) [Tan and Koralnik, 2010]. La RM mostra atrofia marcata del parenchima cerebellare e l'esame del liquor con la ricerca del genoma virale può completare l'iter diagnostico in presenza di un quadro clinico-radiologico compatibile con JCV GCN (Fig. 1.15).

Studi molecolari hanno rivelato una mutazione a livello del gene che codifica per la proteina capsidica maggiore VP1. Tale mutazione determina un cambiamento degli ultimi tredici aminoacidi della proteina [Dang and Koralnik, 2006] ma il meccanismo con il quale questa mutazione determini un tropismo neuronale è attualmente in fase di studio. La terapia della JCV GCN è identica a quella prevista per la PML [Tavazzi et al., 2012].

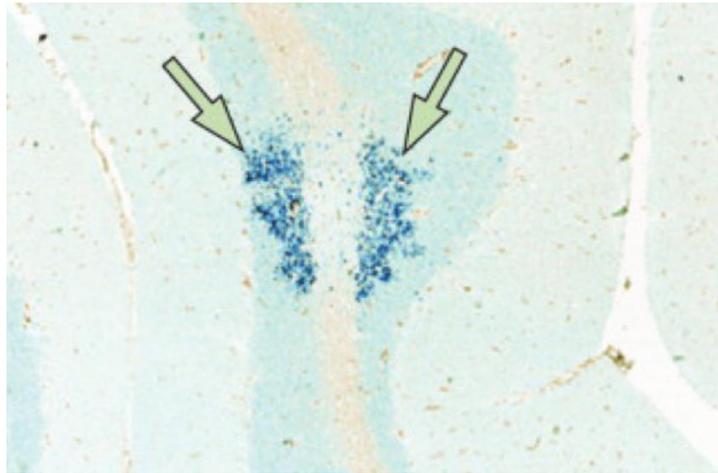


Figura 1.16 Sezione istologica di JCV GCN. Le frecce indicano le cellule granulari infette dal JCV. [Tan and Koralnik, 2010]

1.3.4 *Encefalopatia JCV-correlata*

Sebbene JCV infetti prevalentemente gli oligodendrociti, è stato osservato che tale virus possiede la capacità di infettare anche i corpi neuronali che compongono la sostanza grigia. Wuthrich e colleghi [Wüthrich et al., 2009] hanno descritto un caso di una infezione JCV-correlata dei neuroni piramidali in una paziente HIV-negativa con storia di cancro polmonare, che ha presentato un esordio subacuto di un declino cognitivo associato ad afasia ed encefalopatia con *exitus* dopo quattro mesi e mezzo. La RM ha mostrato delle lesioni a livello della sostanza grigia con estensione secondaria alle aree sottocorticali e la ricerca del genoma virale tramite PCR nel liquor è risultata positiva per JCV. La diagnosi è stata infine confermata dall'esame istologico che mostrava un quadro di infezione litica JCV-correlata dei neuroni piramidali e degli astrociti con associata necrosi laminare (Fig. 1.15). Recentemente Dang e colleghi hanno individuato una correlazione tra l'encefalopatia correlata a JCV una variante virale caratterizzata da una NCCR simile all'archetipo e dalla delezione della porzione genica codificante per la Agnoproteina [Dang et al., 2012]. Infine altri autori hanno descritto quadri di estensione delle lesioni della PML all'interno della sostanza grigia [Moll et al., 2008; Tallantyre et al., 2009].

1.3.5 *Meningite JCV-correlata*

Sono stati infine pubblicati numerosi casi che descrivono la presenza del genoma del JCV nel liquor di pazienti, sia immunocompetenti che immunocompromessi, che presentano esclusivamente sintomi meningei. Non è ancora chiaro se tale quadro clinico sia dovuto ad un'infezione virale primaria o ad una riattivazione del virus [Tavazzi et al., 2012]. Clinicamente la presentazione della meningite da JCV consiste nei classici sintomi meningei come cefalea, nausea, *rigor nuchalis* e diplopia in assenza di deficit neurologici focali [Blake et al., 1992; Villard et al., 2005]. A

differenza della PML non sono presenti lesioni focali della sostanza bianca cerebrale e la RM mostra solo una lieve dilatazione dei ventricoli cerebrali. La diagnosi è confermata dalla ricerca del genoma virale nel liquor in assenza di tutti gli altri virus neurotropi. La terapia, anche in questo caso, è quella prevista per la PML (Fig. 1.15) [Tavazzi et al., 2012].

1.4 L'uso dei farmaci biologici nel trattamento delle malattie immuno-mediate e la riattivazione di JCV

Le malattie immuno-mediate sono patologie caratterizzate da un'alterazione del Sistema Immunitario (SI) che dà origine ad anomale risposte immuni dirette contro componenti *self* ed in grado di determinare un'alterazione funzionale o anatomica del distretto colpito. Le malattie immuno-mediate presentano caratteristiche patogenetiche peculiari, ciò determina un'ampia variabilità di quadri clinici e specifici trattamenti curativi [Douglas et al., 2004]. L'impiego degli anticorpi monoclonali è previsto nel protocollo terapeutico di molte patologie immuno-mediate tra cui il MC, la SM e le Malattie Reumatiche Infiammatorie Croniche (MRIC), tuttavia, il loro uso è stato da tempo associato ad un maggior rischio di riattivazione dalla latenza di agenti patogeni ubiquitari ed opportunisti come JCV, agente eziologico della PML, che rappresenta il miglior esempio di patologia demielinizzante umana d'origine virale che interessa il SNC.

1.4.1 Il Morbo di Crohn (MC)

Il MC è malattia infiammatoria cronica dell'intestino la cui insorgenza è riconducibile all'effetto sinergico di una predisposizione genetica e di diversi fattori ambientali, quali infezioni, cure antibiotiche, dieta e condizioni igieniche, che determinano un'aberrante risposta immunitaria nei confronti del microbiota intestinale [Swidsinski et al., 2002; Darfeuille-Michaud et al., 2004; Conte et al., 2006; Sartor, 2006; Packey and Sartor, 2008; Reiff and Kelly, 2010]. In particolare si osserva l'attivazione di una cascata di reazioni autoimmuni che causa un danno a carico della barriera mucosale, culminando in un'aumentata permeabilità della stessa. L'instaurarsi di questa nuova condizione consente ad agenti infettivi e/o ad antigeni di agenti infettivi, di entrare in stretto contatto con le cellule del sistema immunitario scatenando una risposta infiammatoria incontrollata [Swidsinski et al., 2002; Conte et al., 2006; Sartor, 2006; Packey and Sartor, 2008; Reiff and Kelly, 2010].

Il Morbo di Crohn è caratterizzato da un'infiammazione cronica estesa a tutti gli strati della parete intestinale e a tutto il canale digerente, dall'orofaringe all'area perianale. Inoltre nel MC si ha un contemporaneo interessamento del mesentere e dei linfonodi regionali, sia che venga colpito il colon sia il tenue (Fig. 1.17).

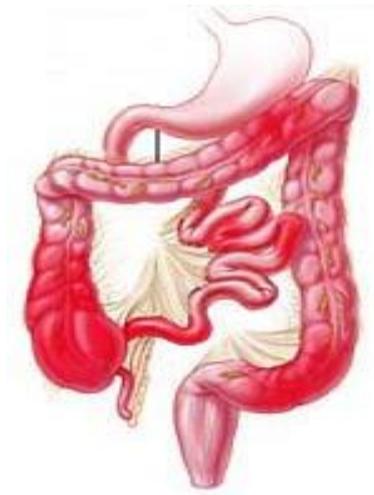


Figura 1.17. Loci dell'infiammazione nel MC [Sartor, 2006]

I sintomi del MC possono essere divisi in intestinali ed extraintestinali. Nel caso di MC con interessamento dell'intestino tenue, si hanno sintomi come diarrea cronica e calo ponderale e/o sintomi caratterizzati da vomito, distensione addominale e dolori addominali. Quando ad essere colpito è principalmente il colon, il corteo sintomatologico è caratterizzato da diarrea e perdita di sangue e/o muco con le feci. Quando l'interessamento è a livello dello stomaco e del duodeno i sintomi principali possono essere nausea e vomito.

Il MC può essere caratterizzato anche da una patologia a livello dell'ano con presenza di ragadi non dolorose, ulcere, fistole, ascessi ed escrescenze carnose. Il MC può avere un'intensità da moderata a grave che viene espressa con un indice di attività (CDAI) con valori compresi tra 220 e 450. L'indicazione di una remissione clinica si presenta con un valore di CDAI inferiore a 150.

All'esame endoscopico il morbo di Crohn dell'ileo terminale si presenta con una mucosa interessata da ulcere ad andamento serpiginoso. Segno distintivo della malattia è l'interessamento discontinuo della mucosa; infatti, segmenti gravemente danneggiati si alternano ad altri in cui la mucosa sembra apparentemente di aspetto normale: a questo tipo di lesioni viene dato il nome di "skips areas" (Fig. 1.18). Nel 50% dei casi ad interessamento colico, il retto viene risparmiato. Il processo infiammatorio è transmurale, interessa cioè tutto lo spessore della parete intestinale estendendosi sovente attraverso la sierosa ed il mesentere, rendendo così spiegabile il caratteristico sviluppo di fistole e raccolte ascessuali. L'insieme dei processi infiammatori e di riparazione della mucosa danneggiata danno luogo ad un quadro endoscopico di aspetto acciottolato tipico della malattia di Crohn, aspetto che può variare con l'intensità della stessa [Sartor, 2006].

L'aspetto a granulomi è l'elemento diagnostico più utile per differenziare il morbo di Crohn dalle altre forme di malattie infiammatorie dell'intestino. L'aspetto istologico si mostra con ulcerazioni superficiali del tenue in prossimità delle placche del Peyer (ulcere aftoidi) e foci di

infiammazioni croniche estese alla sottomucosa, spesso accompagnati dalla formazione di granulomi non rivestiti [Hendrickson et al., 2002] (Fig. 1.19).

La diagnosi non sempre è agevole e l'iter diagnostico non è facilmente schematizzabile; esso deve essere flessibile e personalizzabile.

Gli strumenti diagnostici di cui ci avvale sono prima di tutto la storia clinica con la presenza dei sintomi già descritti. Successivamente devono essere eseguite indagini di laboratorio come: emocromo, VES, PCR, albuminemia, immunoglobuline, pANCA, ASCA (particolari tipi di anticorpi), ricerca del sangue occulto nelle feci, coltura delle feci per la ricerca di germi dannosi per l'intestino, prove di coagulazione e di funzionalità epatica.

In seguito le indagini devono avere lo scopo di localizzare la malattia, per cui risultano utili un'ecografia addominale, una scintigrafia con globuli bianchi marcati nonché la radiologia tradizionale. Anche la TAC e la RMN hanno un ruolo nella diagnosi del MC per l'evidenziazione di ascessi e/o fistole. Infine, l'endoscopia con biopsia, sotto forma di esofago-gastro-duodenoscopia e di colonscopia è comunque la migliore diagnosi di MC.

L'approccio terapeutico del MC può essere di tipo nutrizionale e/o farmacologico. La terapia nutrizionale consiste nell'uso di una dieta esclusiva a base di formule speciali (contenenti carboidrati, proteine, lipidi, vitamine, fibre e sali minerali) da parte del paziente per 6-8 settimane. La terapia farmacologica si avvale dell'uso di mesalazina (5-ASA) e nei casi più gravi di glucocorticoidi (come il prednisone) e di farmaci immunosoppressori [Prakash and Markham, 1999; Sandborn, 2006]. Il trattamento terapeutico di tale patologia prevede anche l'impiego di mAbs (infliximab e adalimumab) che bloccano il TNF α , un importante mediatore dell'infiammazione nel MC. L'utilizzo di tali farmaci biologici risulta particolarmente efficace nei pazienti con MC fistolizzante ed in quelli in cui si è instaurata una cortico-dipendenza MC [Berger et al., 2002].

Sebbene l'uso dell'infliximab abbia migliorato la qualità della vita dei pazienti affetti da MC, la sua somministrazione prolungata è stata associata, in alcuni pazienti, allo sviluppo di linfomi, ad infezioni batteriche ed alla riattivazione virale di JCV [Bongartz et al., 2006]. In particolare, il blocco funzionale del TNF- α porterebbe ad una ridotta espressione di alcune citochine proinfiammatorie implicate nella sorveglianza immunitaria, favorendo la fuoriuscita di JCV dalla latenza [Maini and Feldmann, 2002]. Finora, tuttavia, il meccanismo patogenetico correlato all'insorgenza della PML resta ancora oggetto di studio, è chiaro tuttavia che il maggior fattore di rischio nei pazienti MC trattati con infliximab, sembra essere un trattamento terapeutico prolungato nel tempo [Major, 2010]. Tuttavia, anche una specifica organizzazione strutturale della NCCR potrebbe svolgere un ruolo determinante nello sviluppo della PML in tale corte di pazienti. Varianti virali caratterizzate da siti di legame ad alta affinità per il fattore ematopoietico Spi-B ed per il fattore NF-1 sono state ritrovate in pazienti MC pediatrici [Bellizzi et al., 2011]. Anche se il meccanismo attraverso il quale l'infliximab è coinvolto nella riattivazione virale non è ancora del tutto chiarito, è

possibile supporre che l'utilizzo di tale mAb vada ad incrementare il numero di cellule ematopoietiche circolanti contenente JCV in forma latente. In particolare il blocco funzionale del TNF- α comporterebbe una ridotta espressione delle molecole di adesione presenti sulla superficie delle cellule ematopoietiche che quindi sarebbero in grado di riversarsi dal midollo osseo nel torrente circolatorio [Maini and Feldmann, 2002; Giannecchini et al., 2012].

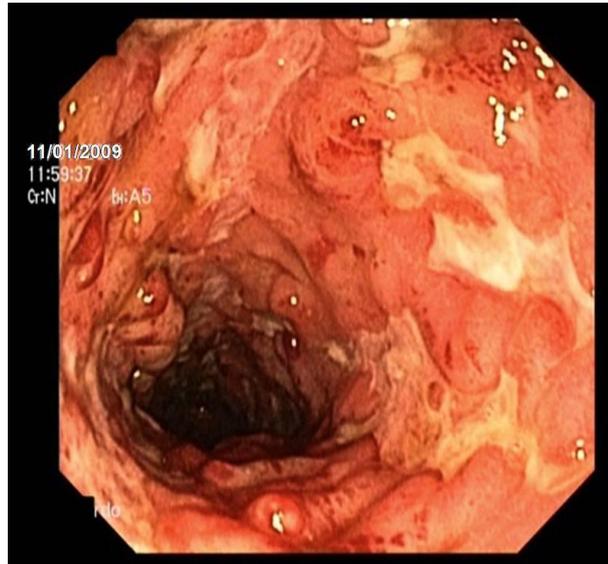


Figura 1.18. Esame endoscopico che mostra la presenza di una mucosa interessata da ulcere ad andamento serpiginoso nel colon discendente. Il valore CDAI > 300 conferma la diagnosi di MC [per gentile concessione del Prof. Salvatore Cucchiara e del Dott. Giovanni Di Nardo, Unità di Gastroenterologia e di Epatologia Pediatrica, Università di Roma “Sapienza”].

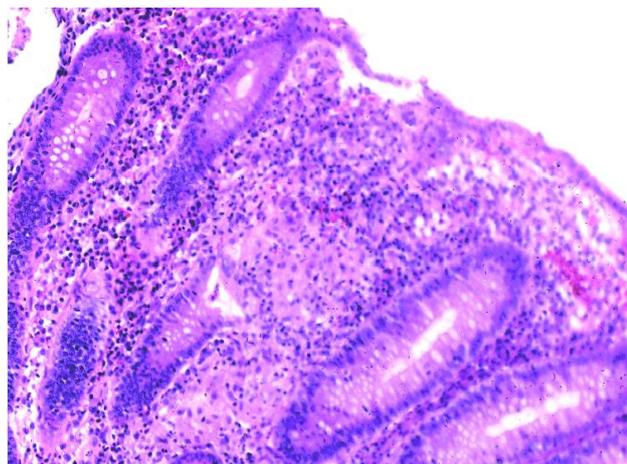


Figura 1.19. Aspetto istologico di un reperto con MC in fase moderatamente attiva. Sono visibili granulomi nella lamina propria. Colorazione con ematossilina e eosina; ingrandimento 100x [Hendrickson et al., 2002].

1.4.2 Il sistema enterico gliale e JCV

Il tratto gastrointestinale dei mammiferi possiede la peculiare proprietà di essere dotato di un sistema nervoso intrinseco (o Sistema Nervoso Enterico, SNE) in grado di regolare in maniera autonoma tutte le funzioni digestive. L'esistenza di un sistema nervoso intestinale capace di agire in maniera indipendente era derivata dagli studi pionieristici dei due grandi fisiologi inglesi Bayliss e Starling che già agli inizi del secolo scorso postularono la cosiddetta "legge dell'intestino" [Bayliss and Starling, 1900]. Tale legge si basava sulla dimostrazione che ogni distensione radiale endoluminale di un'ansa di intestino tenue isolata evocava un riflesso stereotipo propulsivo caratterizzato da due eventi coordinati: una contrazione a monte, unitamente ad un rilasciamento a valle, della sede di stimolazione. I due ricercatori inglesi chiamarono tale attività coordinata riflesso peristaltico o peristalsi e attribuirono correttamente la genesi ed il controllo di tale evento riflesso alla rete nervosa enterica. Dalle brillanti osservazioni di Bayliss e Starling, negli anni successivi si ebbe un progressivo declino delle ricerche sull'innervazione enterica tanto che negli anni successivi si consolidò l'erronea convinzione che le due divisioni del sistema autonomo, il parasimpatico ed il simpatico, svolgessero un ruolo preponderante nella regolazione delle attività digestive. Tuttavia, negli ultimi trent'anni studi hanno consentito di stabilire inequivocabilmente che il SNE non solo ha una dignità propria, ma è l'unica divisione del sistema nervoso periferico (SNP) paragonabile ad un vero e proprio "cervello" (o *little brain* degli Autori Anglosassoni), per certi versi simile all'encefalo (o *big brain*), presente nella parete del canale alimentare, nel tratto biliare e nel parenchima pancreatico [Goyal and Hirano, 1996]. Pertanto, l'erronea interpretazione secondo la quale i neuroni enterici funzionano come *relais* parasimpatici per segnali provenienti dal SNC è stata definitivamente abbandonata. Un'immensa mole di dati ha chiaramente dimostrato che il SNE è costituito, proprio come il SNC, da un rete neuronale che comprende classi di cellule nervose altamente specializzate, ossia neuroni effettori (eccitatori e inibitori), sensori intrinseci ed interneuroni che, sebbene connessi ed integrati al SNC e al SNP, sono in grado di governare autonomamente, attraverso circuiti nervosi integrati, pressoché tutte le funzioni digestive, quali l'attività motoria del canale alimentare, le secrezioni gastro-entero-bilio-pancreatiche, l'assorbimento intestinale di nutrienti ed il circolo splanchnico. Tutte queste attività sono governate da un numero di cellule neuronali intrinseche paragonabili per numero a quelle del midollo spinale (da cui l'assunto del *little brain*) [Tonini et al., 2002]. Inoltre, è stato dimostrato che il SNE è in grado di modulare e, a sua volta di essere modulato dal ricco sistema immunitario presente lungo tutto il tratto digestivo (organizzazione morfo-funzionale del SNE) [Goyal and Hirano, 1996]. I neuroni enterici sono organizzati in plessi gangliari (il mienterico di Auerbach e il sottomucoso di Meissner) ed in plessi agangliari. I gangli sono avvolti da cellule gliali simili agli astrociti del SNC che, rivestendo con le loro estensioni la maggior parte del soma dei neuroni, li separano dai tessuti adiacenti costituendo una vera e propria barriera emato-enterica. La glia enterica svolge un ruolo importante anche in complessi meccanismi di modulazione della risposta infiammatoria intestinale,

attraverso la produzione di interleuchine e l'espressione *de novo* di antigeni di istocompatibilità di classe II [Jessen, 2004; Ruhl et al., 2004].

Sebbene non sia mai stata stabilita una correlazione eziologica fra JCV e patologie del tratto gastrointestinale (GI), sequenze genomiche virali sono state isolate nelle cellule epiteliali del GI e nell'esofago e ciò ha suggerito che il GI possa rappresentare un'altra via d'ingresso del virus JC, accanto al tratto respiratorio [Ricciardiello et al., 2001; Selgrad et al., 2008]. Tuttavia, non si può escludere che JCV possa raggiungere l'epitelio intestinale indirettamente mediante il flusso sanguigno, instaurando latenza [Selgrad et al., 2008].

Recentemente, Selgrad e colleghi hanno ritrovato il ceppo Mad-1 di JCV nelle cellule gliali del SNE di pazienti affetto da pseudo-ostruzione intestinale idiopatica cronica (CIIP) [Selgrad et al., 2008]. Inoltre è stato anche dimostrato che il virus JC infetta produttivamente le cellule gliali di pazienti affetti da turbe della motilità dell'intestino. In particolare l'infezione litica potrebbe contribuire alla disgregazione tissutale e alla diffusione del virus nel distretto gastro-intestinale [Selgrad et al., 2009].

Pertanto la localizzazione di JCV nelle cellule entero-gliali, la lisi di tali cellule in seguito a rilascio della progenie virale e l'attivazione del sistema immunitario e della risposta infiammatoria in tali distretti, potrebbero in soggetti affetti da patologie gastrointestinali croniche, contribuire ad aggravare ulteriormente il quadro clinico di tali pazienti [Selgrad et al., 2009].

1.4.3 *La Sclerosi Multipla (SM)*

La SM, malattia infiammatoria demielinizzante del SNC, è caratterizzata dalla presenza di aree multiple di demielinizzazione della sostanza bianca denominate placche [Harrison, 2014]. Le placche si formano in tempi diversi, sono sparse nel SNC e sono caratterizzate inizialmente da un infiltrato infiammatorio perivascolare che svolge un ruolo cruciale nel processo di demielinizzazione attraverso fagocitosi, rilascio di citochine, proteasi, radicali liberi ed anticorpi. Nelle fasi tardive la placca diventa inattiva e si trasforma in una cicatrice con una perdita completa di oligodendrociti e con un danno assonale secondario causa del deficit neurologico irreversibile della SM [Harrison, 2014]. La SM è una malattia invalidante e rappresenta la principale causa di disabilità neurologica acquisita in individui tra i 15 ei 45 anni con un'età media d'insorgenza di 29 anni, [Disanto et al., 2012] e colpisce prevalentemente le donne con un rapporto di 2:1: in Italia vi sono più di 100 individui affetti ogni 100.000 soggetti sani [Atlas of MS, 2013].

Dal punto di vista clinico si distinguono quattro forme di SM [Minagar, 2013]:

- 1) SM recidivante -remittente (SMRR)
- 2) SM secondaria progressiva (SMSP)
- 3) SM primaria progressiva (SMPP)

4) SM recidivante progressiva (SMRP)

Il fenotipo clinico più comune è la forma SMRR che può manifestarsi con un singolo attacco demielinizzante uni- o multifocale seguito da ricadute [Miller et al., 2012].

Entro 10 anni dalla diagnosi iniziale, la maggior parte dei pazienti con SMRR sviluppa la forma SMSP caratterizzata da un grado maggiore di neurodegenerazione [Vukusic and Confavreux, 2007].

La SMPP rappresenta la forma meno frequente ed è caratterizzata da assenza di recidive, da un progressivo deterioramento dello stato neurologico e da un ridotto stato neuro-infiammatorio [Lublin, 2005; Vukusic and Confavreux, 2007]. A differenza della SM recidivante-remittente, che colpisce prevalentemente la popolazione femminile, questa forma di SM colpisce indistintamente individui maschi e femmine.

L'eziologia della malattia è attualmente sconosciuta: tuttavia la SM può essere inclusa nell'ambito delle malattie multifattoriali la cui patogenesi comprende fattori genetici ed ambientali. In particolare, in presenza di una predisposizione genetica, l'insorgenza della patologia sarebbe legata ad un'anomala risposta immunitaria con aggressione della mielina. Alcuni studi suggeriscono che alla base di tale risposta immune possano concorrere con diversi meccanismi d'azione vari agenti infettivi tra cui virus patogeni ubiquitari ed opportunisti. I virus di questo genere permangono per tutta la vita nell'individuo infetto, dando luogo ad un'infezione persistente tipica del Polyomavirus umano JC [Kakalacheva et al, 2011].

L'uso terapeutico del natalizumab è indicato come monoterapia nella SMRR non responsiva alla terapia farmacologica con interferon- β [Lima, 2013; McCormack, 2013]. Nonostante l'uso del natalizumab riduca del 68% il tasso di recidiva clinica ad un anno e diminuisca la progressione verso la disabilità, negli ultimi anni, la somministrazione di tale farmaco è stata associata ad un aumentato rischio di sviluppare PML [Bloomgren et al., 2012]. I fattori di rischio che concorrono alla possibile insorgenza di tale patologia sono: la durata del trattamento, l'uso di immunosoppressori antecedenti alla somministrazione di natalizumab e la presenza di anticorpi anti-JCV [McCormack, 2013]. Infatti, prima e durante il trattamento con natalizumab, i pazienti vengono sottoposti ad analisi quantitativa dello status sierologico JCV specifico, come da protocollo, al fine di valutare la stratificazione del rischio di sviluppare PML [Lima, 2013]. Studi recenti condotti su una vasta coorte geograficamente diversificata di soggetti affetti da SM, hanno evidenziato una prevalenza anticorpale anti-JCV compresa tra il 47% ed il 68%: in particolare nella sola popolazione italiana si è osservata una prevalenza pari al 58.3% [Olsson et al., 2013]. Inoltre è stato stimato che l'incidenza di PML in soggetti trattati con immunosoppressori e con monoterapia con natalizumab per un tempo superiore a 24 mesi, è pari a 11.1/1000 pazienti rispetto a 2.1/1000 pazienti sieronegativi [Bloomgren et al., 2012].

La patogenesi della PML in pazienti trattati con natalizumab è complessa ed è ancora da definire se la malattia insorga a causa di una riattivazione di JCV direttamente nel SNC oppure a livello del

circolo periferico. Nel primo caso il natalizumab, ostacolando l'ingresso dei linfociti T citotossici a livello cerebrale, andrebbe a bloccare il controllo della latenza virale da parte di tali cellule, nel secondo caso invece il farmaco, impedendo il sequestro dei linfociti B infettati a livello del midollo o della milza, contribuirebbe ad aumentare la carica virale nel sangue e favorirebbe la disseminazione del virus al SNC mediante gli stessi linfociti B. Studi *in vitro* hanno inoltre evidenziato come il natalizumab possa indurre l'espressione di fattori trascrizionali coinvolti nel differenziamento delle cellule B, tra cui il fattore Spi-B, che sembra regolare positivamente la trascrizione di JCV incrementando la carica virale in tali cellule [Lindberg et al., 2008]. In particolare, è stato dimostrato che la proteina Spi-B lega con maggiore affinità i siti di legame presenti in sequenze di NCCR isolate da tessuto cerebrale di pazienti con PML rispetto a quelli presenti in sequenze provenienti da tessuto renale di soggetti sani ed isolate da campioni di urine. Dati riportati in letteratura evidenziano che, sequenze della NCCR di JCV fiancheggianti la regione promoter/enhancer, sono altamente conservate tra i vari ceppi virali e contengono siti di legame per Spi-B adiacenti alla TATA box. In particolare, il sito di legame per Spi-B di Mad-1/Mad-4, varianti isolate da pazienti con PML, differisce per un singolo nucleotide da quello dell'archetipo CY [Marshall et al., 2012]. Questa mutazione puntiforme determina un aumento dell'affinità di legame tra la proteina Spi-B e la regione del promoter/enhancer delle varianti virali Mad-1 e Mad-4 rispetto alla variante archetipo CY non patogena [Marshall et al., 2012; Diotti et al., 2013].

Infine, come già menzionato, la NCCR di JCV è caratterizzata da un'ampia variabilità genomica con formazione di riarrangiamenti virali, alcuni dei quali, isolati dall'encefalo di soggetti con PML, correlano con lo sviluppo della malattia. Inoltre, studi *in vitro* hanno dimostrato che tali riarrangiamenti della NCCR, conferiscono al virus JC un tasso di replicazione maggiore rispetto al virus archetipo [Ferenczy et al., 2012].

1.4.4 Malattie Reumatiche Infiammatorie Croniche (MRIC)

Le MRIC sono un gruppo di gravi patologie croniche che colpiscono una percentuale significativa della popolazione, provocandone un peggioramento della qualità di vita [Mócsai et al., 2014]. L'AR è una malattia sistemica immuno-mediata che provoca dolore e gonfiore delle articolazioni con ripercussioni gravo sul sistema osseo e muscolo-scheletrico ed è caratterizzata da un'elevata mortalità e co-morbidità. L'eziologia della malattia è ancora oggetto di studio, tuttavia essa può essere inclusa nell'ambito delle malattie multifattoriali la cui patogenesi comprende differenti fattori, inclusi gli agenti infettivi [Benucci et al., 2012; Cross et al., 2014].

La SA è una forma di artrite infiammatoria cronica che colpisce le articolazioni della colonna vertebrale soprattutto a livello delle vertebre sacro-iliache. Essa può provocare una significativa disabilità ed è associata ad altre patologie concomitanti tra cui l'artrite periferica, l'uveite anteriore, la psoriasi e le malattie infiammatorie croniche intestinali [Robinson and Brown, 2014]. Infine la

PsA pur appartenendo al gruppo delle MIRC, è caratterizzata da un complesso quadro clinico che coinvolge lo scheletro assiale, con presenza di forti dolori alla schiena, uveite, interessamento dermatologico, coinvolgimento gastroenterico ed una chiara associazione genetica con il gene codificante per l'antigene leucocitario umano B27, un antigene di superficie HLA di classe I codificato nel locus B del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) sul braccio corto del cromosoma 6. Questo gene mostra un notevole polimorfismo: infatti è stato identificato un numero sempre crescente di alleli tra le varie etnie della specie umana ed è stato stabilito che non tutti gli allelotipi sono associati allo sviluppo di malattia [Yang et al., 2014].

Sebbene la PsA sia una malattia distinta rispetto all'AR e alla SA, l'utilizzo di farmaci anti-reumatici modificanti la malattia (DMARDs) è stato introdotto nella terapia di tutte le MIRC al fine di migliorare la sintomatologia e la qualità della vita e di ritardare la progressione della malattia stessa [Bijlsma, 2012].

Tra i DMARDs, il metotrexato (MTX) è ampiamente utilizzato come intervento terapeutico di prima linea nel trattamento della MIRC, anche se la sua natura epatotossica ne limita l'uso e l'efficacia [Mócsai et al., 2014]. Inoltre, dal momento che nella patogenesi di molte malattie infiammatorie ed immuno-mediate risulta evidente una over-espressione delle citochine pro-infiammatorie, anche l'uso di glucocorticoidi sintetici (GC) rientra negli interventi di prima linea per il trattamento di queste patologie. Tuttavia molti pazienti mostrano un certo grado di resistenza nei confronti di tali farmaci con l'aumentare della durata del trattamento [Dejager et al., 2014]. Alla fine degli anni 90' sono stati introdotti nella terapia di AR e di altre malattie immuno-mediate i primi antagonisti del TNF α come l'infliximab e l'adalimumab, approvati anche per la terapia del MC, ed il rituximab e l'etanercept [Mócsai et al., 2014].

L'infliximab, l'adalimumab ed il rituximab sono 3 anticorpi monoclonali: il primo ed il terzo sono anticorpi parzialmente umanizzati mentre il secondo è un anticorpo completamente umano. L'etanercept invece è una proteina di fusione costituita dalla regione Fc dell'immunoglobulina umana G (IgG) e dalla porzione extracellulare del recettore umano p75 per TNF [Mócsai et al., 2014].

Anche in questo caso il trattamento con farmaci biologici è stato associato ad una maggiore suscettibilità alle infezioni virali, come quella da JCV [Comar et al., 2013].

Nel 2009 infatti sono stati riportati 57 casi di PML associati a rituximab [Carson et al., 2009a], anche se nella maggior parte di questi casi è stato riscontrato l'uso concomitante di altri immunosoppressori e molte delle malattie trattate con rituximab, come il LES, sembrano già predisporre di per sé alla PML [Molloy and Calabrese, 2012]. Infine, tra gli individui affetti da MIRC, sono stati confermati 34 casi di PML correlabili all'utilizzo di farmaci biologici, così come riportato nel database del Food and Drug Administration Adverse Event Reporting System (AERS FDA), anche se 17 di questi casi sono stati diagnosticati in pazienti affetti da LES [Molloy and

Calabrese 2009; Kothary et al., 2011; Molloy and Calabrese, 2012]. Inoltre, in 6 casi di PML in pazienti affetti da MRIC e trattati con anti-TNF- α è stato segnalato l'uso concomitante di altri agenti immunosoppressivi. Di conseguenza, le sporadiche associazioni tra terapia anti-TNF- α e PML porterebbe a concludere che non sia possibile attribuire agli anti-TNF- α un ruolo causale nello sviluppo della PML, anche se recentemente sono stati segnalati due casi di PML in 2 pazienti affetti da AR ed in trattamento monoterapico con infliximab ed adalimumab, rispettivamente [Kumar et al., 2010; Ray et al., 2014].

2. Obiettivi

Dal momento che il numero dei casi di PML associato all'impiego di FB continua ad aumentare e che non esiste una cura per la PML, risulta di fondamentale importanza la conoscenza del rischio di insorgenza di questa rara patologia in seguito all'uso di questi farmaci. Pertanto l'obiettivo di questa tesi è stato quello di studiare la riattivazione di JCV in individui affetti da patologie immuno-mediate e trattati con FB, in modo da ottenere un quadro più completo sul rapporto rischio/beneficio associato all'impiego di questi farmaci e per individuare potenziali bio-marcatore predittivi di riattivazione virale e di rischio d'insorgenza della PML.

Al fine di valutare il rischio di riattivazione di JCV in pazienti affetti da malattie immuno-mediate e trattati con FB, abbiamo arruolato quattro coorti di individui:

- 1) 1 coorte di pazienti pediatriche affetti da MC trattati con l'anti-TNF- α infliximab (*Coorte 1.1*);
- 2) 1 coorte di pazienti pediatriche non trattati con FB (*Coorte 1.2*);
- 3) 1 coorte di pazienti con SM recidivante-remittente trattati con natalizumab (*Coorte 2*);
- 4) 1 coorte di pazienti MRIC trattati con anti-TNF- α (*Coorte 3*).

I principali obiettivi di questo studio sono stati:

- il monitoraggio della carica virale di JCV mediante Real Time PCR quantitativa (q-PCR) in campioni biologici quali urine, plasma e biopsie intestinali per la *Coorte 1.1* e la *Coorte 1.2*; invece campioni di urina, plasma e PBMC sono stati raccolti dalla *Coorte 2* e dalla *Coorte 3*. Tutti i campioni sono stati raccolti a vari tempi di campionamento specifici;

- l'analisi dei possibili riarrangiamenti della NCCR di JCV, al fine di individuare possibili mutazioni nei siti di legame per specifici fattori di trascrizione cellulari;

- l'analisi della sequenza genica della VP1 di JCV, al fine di definire una possibile correlazione tra un caratteristico genotipo/sottotipo di JCV, il tipo di malattia immuno-mediata studiata e il trattamento con uno specifico FB;

- l'analisi immunofenotipica e la valutazione dell'immunoattivazione e dell'espressione dell' $\alpha 4$ integrina sulla membrana cellulare delle varie sottopopolazioni linfocitarie, al fine di indagare le alterazioni immunologiche indotte dal natalizumab esclusivamente nei pazienti affetti da SM recidivante-remittente.

3. Risultati

3.1 Pazienti pediatrici affetti da MC trattati con l'anti-TNF- α infliximab (Coorte 1.1) e pazienti pediatrici affetti da MC non trattati con farmaci biologici (FB) (Coorte 1.2)

3.1.1 Ricerca del DNA di JCV tramite q-PCR nei campioni biologici raccolti e valutazione della carica virale in relazione ai tempi di prelievo

Dalla *Coorte 1.1* (pazienti pediatrici affetti da MC trattati con l'anti-TNF- α infliximab) sono stati raccolti 90 campioni di urina, 90 campioni di plasma, 54 campioni di biopsie da ileo e 54 campioni di biopsie da colon-retto, per un totale di 288 campioni. Dalla *Coorte 1.2* (pazienti pediatrici affetti da MC non trattati con FB) invece sono stati raccolti 125 campioni di urina, 125 campioni di plasma, 75 biopsie di ileo e 75 biopsie di colon-retto, per un totale di 400 campioni. Questi campioni sono stati raccolti ai seguenti tempi di *follow-up*: alla visita iniziale di arruolamento nello studio (t0) e a 4, 8, 12 e 18 mesi dal t0 (t1, t2, t3 e t4 rispettivamente). I campioni di PBMC non sono stati raccolti nelle due coorti di pazienti pediatrici, a causa della piccola quantità di sangue intero in EDTA prelevabile. Infine 10 campioni di urina, 10 campioni di plasma, 10 campioni di biopsie da ileo e 10 campioni di biopsie da colon-retto, per un totale di 40 campioni sono stati raccolti da 10 pazienti pediatrici di controllo affetti da infiammazione intestinale non classificabile come MC.

Dall'analisi di q-PCR è emerso che il DNA di JCV è presente in 99/288 campioni totali raccolti nella *Coorte 1.1* ed in 59/400 campioni totali raccolti nella *Coorte 1.2*, e tale differenza è statisticamente significativa ($p < 0,05$). La Tabella 2.1 mostra in dettaglio la distribuzione del DNA di JCV nelle varie tipologie di campioni analizzati. In particolare, il numero totale di campioni positivi è risultato significativamente maggiore nella *Coorte 1.1* rispetto alla *Coorte 1.2* sia nei campioni di urina ($p = 0,03$), sia nei campioni di plasma ($p < 0,05$) che nelle biopsie colon-rettali ($p = 0,02$) (Tab. 2.1). Tutti i campioni del *gruppo di controllo* pediatrico sono risultati negativi per il DNA di JCV (dati non mostrati).

Tabella 2.1 Numero totale di campioni positivi e negativi per il DNA di JCV nelle coorti di pazienti pediatrici affetti da MC

	Urine			Plasma			Ileo			Colon-retto			Totale		
	Pos	Neg	Tot	Pos	Neg	Tot	Pos	Neg	Tot	Pos	Neg	Tot	Pos	Neg	Tot
<i>Coorte 1.1</i>	34	56	90	28	62	90	21	33	54	16	38	54	99	189	288
<i>Coorte 1.2</i>	27	98	125	9	116	125	14	36	75	9	66	75	59	341	400
<i>p*</i>	0.03			< 0.05			0.07			0.02			< 0.05		

Pos: positivo al DNA di JCV; Neg: negativo al DNA di JCV.

* χ^2 test

Per quanto riguarda l'andamento della presenza del DNA di JCV nelle urine, ai vari tempi di prelievo, la viruria è stata riscontrata a t0 in 6/18 campioni nella *Coorte 1.1* ed in 7/25 campioni nella *Coorte 1.2*. Quattro mesi dopo (t1), il numero di pazienti con viruria è aumentato fino a 10 in entrambe le coorti (10/18 nella *Coorte 1.1* e 10/25 nella *Coorte 1.2*), mentre 8 mesi dopo il trattamento con infliximab (t2) è stata osservata una riduzione del numero di pazienti con viruria (6/18 nella *Coorte 1.1* e 4/25 nella *Coorte 1.2*). Infine sia dopo 12 che dopo 18 mesi dall'inizio del trattamento con il FB (t3 e t4), il numero di pazienti che presentavano viruria è rimasto costante: 6/18 nella *Coorte 1.1* e 3/25 nella *Coorte 1.2*, rispettivamente. Nessuna associazione significativa tra il numero di pazienti con viruria da JCV è stata osservata nelle due coorti durante il follow-up ($p > 0.05$) (Tab. 2.2). Confrontando invece la carica virale di JCV a livello urinario in queste due coorti, è stato possibile osservare un significativo aumento del titolo virale nei pazienti pediatrici trattati con infliximab rispetto a quelli sottoposti a terapia convenzionale sia a t3 ($p = 0,039$) che a t4 ($p = 0,030$) (Tab. 2.2).

Per quanto riguarda i campioni di plasma invece, i risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza del DNA di JCV a t0 in 6/18 pazienti della *Coorte 1.1* e in 3/25 pazienti della *Coorte 1.2*. A t1, nella *Coorte 1.1*, i pazienti che mostravano viremia sono stati 7/18 mentre nella *Coorte 1.2* solo 2/25. Infine, a t2 e t3, si è osservata una diminuzione dei campioni di plasma positivi per il DNA di JCV: infatti la viremia è stata riscontrata in 5/18 pazienti della *Coorte 1.1* e in 1/25 della *Coorte 1.2*. A t4, il numero di pazienti con viremia si è mantenuto costante nella *Coorte 1.1*, mentre nella *Coorte 1.2* tale numero è aumentato da 1 a 2 (Tab. 2.3). In particolare, il numero di pazienti con viremia è risultato essere sempre significativamente maggiore nella *Coorte 1.1* rispetto a quello della *Coorte 1.2* ad eccezione che al baseline t0 ($p > 0.05$) (Tab. 2.3). Inoltre, confrontando la carica virale plasmatica di entrambi i gruppi, abbiamo osservato che la viremia aumenta significativamente nella *Coorte 1.1* rispetto alla *Coorte 1.2* solo a t1 ($p = 0,05$) (Tab. 2.3).

Per quanto riguarda invece la ricerca del DNA di JCV nelle biopsie ileali e colon-rettali nella *Coorte 1.1* e nella *Coorte 1.2*, i risultati ottenuti al tempo t0 hanno mostrato la presenza del DNA virale in 10/18 biopsie ileali e in 8/18 biopsie di colon-retto nella *Coorte 1.1* ed in 9/25 biopsie di ileo e in 4/25 biopsie colon-rettali nella *Coorte 1.2*. A t3 invece, il DNA di JCV è stato ritrovato in 7/18 biopsie ileali e in 4/18 biopsie del colon-retto nella *Coorte 1.1* e in 5/25 campioni ileale e in 2/25 biopsie colon-rettali nella *Coorte 1.2* (Tab. 2.4). A t4 il numero di biopsie ileali positive al DNA di JCV è diminuito ulteriormente o si è mantenuto costante in entrambe le coorti, ad eccezione del numero di biopsie colon-rettali che è aumentato da 2 a 3 nella *Coorte 1.2* dopo 18 mesi di trattamento con terapia convenzionale. Ad ogni modo, il numero di pazienti con biopsie intestinali JCV positive non si è dimostrato significativamente differente nelle due coorti ai vari tempi di campionatura ($p > 0.05$), ad eccezione dei campioni colon-rettali raccolti a t0 ($p = 0,04$) (Tab. 2.4). Confrontando infine la carica virale riscontrata nei prelievi bioptici ottenuti dalle due

coorti, abbiamo osservato un significativo aumento nella *Coorte 1.1* rispetto alla *Coorte 1.2* nelle biopsie ileali solo a t3 ($p = 0.042$).

Tabella 2.2 Ricerca del DNA di JCV in campioni di urina e relativa carica virale nella *Coorte 1.1* e nella *Coorte 1.2* ai vari tempi di follow-up

JCV Urina t0						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	p^{\S}	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mL</i>	p^{\ddagger}
<i>Coorte 1.1*</i>	12	6	18	0.70	6.30 (4.85 – 8.85)	0.193
<i>Coorte 1.2**</i>	18	7	25		4.70 (2.98 – 9.62)	
JCV Urina t1						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	p^{\S}	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mL</i>	p^{\ddagger}
<i>Coorte 1.1</i>	8	10	18	0.31	6.12 (3.17 – 8.37)	0.496
<i>Coorte 1.2</i>	15	10	25		5.07 (3.72 – 8.93)	
JCV Urina t2						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	p^{\S}	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mL</i>	p^{\ddagger}
<i>Coorte 1.1</i>	12	6	18	0.18	5.85 (4.30 – 8.15)	0.286
<i>Coorte 1.2</i>	21	4	25		5.57 (3.92 – 5.88)	
JCV Urina t3						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	p^{\S}	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mL</i>	p^{\ddagger}
<i>Coorte 1.1</i>	12	6	18	0.09	7.47 (5.63 – 9.39)	0.039
<i>Coorte 1.2</i>	22	3	25		5.36 (4.23 – 5.92)	
JCV Urina t4						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	p^{\S}	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mL</i>	p^{\ddagger}
<i>Coorte 1.1</i>	12	6	18	0.09	6.70 (3.85 – 7.85)	0.030
<i>Coorte 1.2</i>	22	3	25		5.18 (4.02 – 5.89)	

gEq: genomi equivalenti

**Coorte 1.1*: Coorte di pazienti pediatriche affetti da MC e non responsivi a terapia convenzionale e quindi trattati con infliximab

***Coorte 1.2*: Coorte di pazienti pediatriche affetti da MC e responsivi a terapia convenzionale

\S : χ^2 test con un $p < 0,05$ statisticamente significativo

\ddagger : Mann-Whitney U tests con un $p < 0,05$ statisticamente significativo

Tabella 2.3 Ricerca del DNA di JCV in campioni di plasma e relativa carica virale nella Coorte 1.1 e nella Coorte 1.2 ai vari tempi di follow-up

JCV Plasma <i>t0</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mL</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1*</i>	12	6	18	0.09	4.93 (3.06 – 6.58)	0.523
<i>Coorte 1.2**</i>	22	3	25		4.20 (3.49 – 5.20)	
JCV Plasma <i>t1</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mL</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1</i>	11	7	18	0.01	5.30 (3.78 – 5.59)	0.050
<i>Coorte 1.2</i>	23	2	25		3.56 (2.92 – 5.54)	
JCV Plasma <i>t2</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mL</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1</i>	13	5	18	0.03	3.08 (2.58 – 6.11)	0.770
<i>Coorte 1.2</i>	24	1	25		4.18	
JCV Plasma <i>t3</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mL</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1</i>	13	5	18	0.03	3.63 (2.76 – 5.35)	0.587
<i>Coorte 1.2</i>	24	1	25		3.13	
JCV Plasma <i>t4</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mL</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1</i>	13	5	18	0.03	4.24 (3.92 – 5.54)	0.450
<i>Coorte 1.2</i>	24	2	25		3.68 (3.13 – 4.24)	

gEq: genomi equivalenti

**Coorte 1.1*: Coorte di pazienti pediatriche affetti da MC e non responsivi a terapia convenzionale e quindi trattati con infliximab

***Coorte 1.2*: Coorte di pazienti pediatriche affetti da MC e responsivi a terapia convenzionale

§: χ^2 test con un $p < 0,05$ statisticamente significativo

‡: Mann-Whitney U tests con un $p < 0,05$ statisticamente significativo

Tabella 2.4 Ricerca del DNA di JCV in biopsie ileali e colon-rettali e relativa carica virale nella Coorte 1.1 e nella Coorte 1.2 ai vari tempi di follow-up

JCV Ileo <i>t0</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mg</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1*</i>	8	10	18	0.20	4.29 (3.54 – 6.57)	0.568
<i>Coorte 1.2**</i>	16	9	25		5.73 (3.81 – 8.15)	
JCV Ileo <i>t3</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mg</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1</i>	11	7	18	0.17	5.85 (4.34 – 8.48)	0.042
<i>Coorte 1.2</i>	20	5	25		3.97 (3.45 – 6.81)	
JCV Ileo <i>t4</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mg</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1</i>	11	4	18	0.22	5.07 (3.81 – 7.15)	0.480
<i>Coorte 1.2</i>	20	4	25		4.85 (3.60 – 6.63)	
JCV Colon-retto <i>t0</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mg</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1</i>	10	8	18	0.04	3.66 (3.10 – 4.67)	0.089
<i>Coorte 1.2</i>	21	4	25		5.38 (3.30 – 6.71)	
JCV Colon-retto <i>t3</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mg</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1</i>	14	4	18	0.18	4.85 (3.52 – 6.08)	0.355
<i>Coorte 1.2</i>	23	2	25		4.49 (3.32 – 4.92)	
JCV Colon-retto <i>t4</i>						
	<i>Neg</i>	<i>Pos</i>	<i>Tot</i>	<i>p</i> [§]	<i>Carica virale, mediana (range), log gEq/mg</i>	<i>p</i> [‡]
<i>Coorte 1.1</i>	14	4	18	0.18	4.25 (3.38 – 4.78)	0.355
<i>Coorte 1.2</i>	23	3	25		4.32 (3.65 – 4.50)	

gEq: genomi equivalenti

**Coorte 1.1*: Coorte di pazienti pediatriche affetti da MC e non responsivi a terapia convenzionale e quindi trattati con infliximab

***Coorte 1.2*: Coorte di pazienti pediatriche affetti da MC e responsivi a terapia convenzionale

§: χ^2 test con un $p < 0,05$ statisticamente significativo

‡: Mann-Whitney U tests con un $p < 0,05$ statisticamente significativo

Concludendo dai dati ottenuti in queste coorti di pazienti pediatriche affette da MC in trattamento e non con infliximab, è emerso che la viremia è risultata significativamente più elevata nella *Coorte 1.1* rispetto alla *Coorte 1.2* dopo 4 mesi di trattamento (t1), ovvero quando sembra che l'infliximab raggiungendo la sua massima efficacia, potrebbe determinare la mobilitazione dei precursori emopoietici CD34+ infettati con JCV. Nelle urine e nelle biopsie ileali, invece, la carica virale aumenta in modo significativo nella *Coorte 1.1* rispetto alla *Coorte 1.2* dopo 1 anno di trattamento con infliximab (a t3). In tale coorte, l'utilizzo prolungato del farmaco riducendo l'immunosorveglianza dell'ospite potrebbe favorire l'infezione produttiva delle cellule epiteliali tubulari del rene e delle cellule gliali enteriche. Inoltre, i virioni prodotti dalle cellule gliali enteriche potrebbero infettare le cellule epiteliali intestinali facilitando la diffusione del virus nel tratto gastrointestinale. Infine a t3 e t4 (a 12 e 18 mesi di trattamento con infliximab, rispettivamente), la viruria da JCV si è mostrata significativamente più elevata rispetto alla viremia ($p < 0,05$) solo nella *Coorte 1.1*.

3.1.2 Analisi di sequenza delle regioni genomiche NCCR e VPI di JCV nei campioni biologici positivi al DNA virale nelle coorti di pazienti pediatrici affetti da MC trattati con infliximab (Coorte 1.1) e non trattati con FB (Coorte 1.2)

Come precedentemente descritto, la NCCR archetipo (CY) di JCV viene classicamente divisa in 6 regioni chiamate box A (36pb), B (23pb), C (55pb), D (66pb), E (18pb) ed F (69pb). Ciascun box contiene siti di legame per fattori trascrizionali cellulari coinvolti nella trascrizione virale [Yogo et al., 1990] che possono andare incontro a processi di riarrangiamento, generando nuove varianti virali dotate di diverso tropismo e grado di patogenicità rispetto al ceppo archetipo.

La NCCR prototipo, invece, è una variante isolata da tessuti di pazienti con PML, ottenuta come riarrangiamento della sequenza archetipo ed il prototipo originale viene identificato come ceppo *Mad-1*, che contiene una NCCR costituita da una sequenza A-C-E di 98 pb ripetuta in tandem (A-C-E-A-C-E-F), con conseguente duplicazione della TATA box e dei siti di legame specifici per particolari fattori di trascrizione cellulare, tra cui NF-1 ed Spi-B.

Negli ultimi anni, la scoperta di diverse sequenze riarrangiate della NCCR virale rispetto ai due modelli strutturali archetipo e prototipo, ha permesso un nuovo sistema di classificazione di tale regione in grado di identificare due gruppi di virus JC: i virus di classe I, con una NCCR caratterizzata dalla presenza di una ripetizione in tandem di una sequenza genomica di 98 pb come nel ceppo *Mad-1*, e i virus di classe II, contenenti ceppi con riarrangiamenti rispetto alla NCCR dei virus di classe I [Jensen and Major, 2001; White et al., 2009].

Inoltre, questa classificazione ha consentito un'ulteriore suddivisione in quattro varianti:

- varianti di tipo I, le quali non contengono inserzioni nella organizzazione strutturale A-C-E e sono suddivise a loro volta in varianti di tipo IS (caratterizzate da un'unica sequenza A-C-E) e varianti IR (caratterizzata dalla ripetizione in tandem della sequenza A-C-E), quali *Mad-1* e *Mad-4* [Padgett et al., 1976; Frisque et al., 1984; Jensen and Major, 2001];

- varianti di tipo II, le quali contengono inserzioni di 23pb e di 66pb, corrispondenti rispettivamente ai box B e D, nella sequenza A-C-E di 98 pb della NCCR del tipo IS. Le varianti di tipo II si dividono in varianti IIS (o *archetype-like*) e IIR contenenti inserzioni e delezioni rispetto alla sequenza IIS, come *Mad-7* e *Mad-8* [Yogo et al., 1990; Ferenczy et al., 2012].

Nella coorte dei pazienti pediatrici affetti da MC e trattati con infliximab (Coorte 1.1), l'analisi di sequenza delle NCCR di JCV, ha rilevato la presenza di un'organizzazione strutturale simile a quella dell'archetipo CY di tipo IIS nel 72% delle sequenze analizzate, mentre nel 26% è stata riscontrata un'organizzazione CY-simile ma con la delezione del box D e/o due variazioni nucleotidiche ricorrenti: la trasversione T→G nella posizione nucleotidica 37 all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B e la transizione G→A nella posizione

nucleotidica 217 del box F all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1. Questi riarrangiamenti sono stati sempre ritrovati a t3 in campioni di plasma ed in biopsie intestinali di 7 soggetti con diagnosi severa di MC (PCDAI > 30) e quindi trattati con infliximab. In particolare l'identificazione della mutazione nucleotidica a livello del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B, la cui espressione è elevata nelle linee cellulari ematopoietiche come le CD34+ e le cellule B [Lindberg et al., 2008], permette di correlare la sua comparsa durante la diffusione di JCV nell'ospite attraverso il circolo ematico. Infine il restante 2% delle sequenze analizzate, presente in 2 biopsie colon-rettali di 2/7 pazienti dopo 18 mesi di trattamento con infliximab, ha mostrato la presenza di una particolare sequenza riarrangiata della NCCR, con un'organizzazione strutturale di tipo IR simil-Mad1 (Tab. 2.5, Fig. 2.1 e Fig. 2.2). Tale sequenza è costituita da una duplicazione della sequenza di 98 bp, con conseguente delezione del box B, duplicazione del box C, delezione del box D e conservazione del box E.

Infine nella coorte dei pazienti pediatrici affetti da MC e non trattati con FB (*Coorte 1.2*) è stata riscontrata sempre una sequenza delle NCCR di JCV con un'organizzazione strutturale simile a quella dell'archetipo CY di tipo IIS con la caratteristica transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 del box F all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1 (dato non mostrato).

Tabella 2.5: Analisi di sequenza della NCCR di JCV in campioni biologici positivi per il DNA virale nella coorte dei pazienti pediatrici affetti da MC e trattati con infliximab (*Coorte 1.1*)

Campione	N° JCV+	CY archetipo* (%) (IIS) [§]	Caratteristiche delle sequenze di NCCR riarrangiate (%)		
			37 T → G e 217 G → A** (IIS) [§]	37 T → G, 217 G → A** e delezione box D (IIR) [§]	Simil-Mad1 (IR) [§]
<i>Urina</i>	34	34 (100%)	0	0	0
<i>Plasma</i>	28	20 (71%)	8 (29%)	0	0
<i>Ileo</i>	21	10 (47%)	7 (33%)	4 (20%)	0
<i>Colon-retto</i>	16	8 (50%)	5 (32%)	1 (6%)	2 (12%)
Totale (%)	99	72 (72%)	20 (21%)	5 (5%)	2 (2%)

* Le sequenze archetipo isolate presentano tutte un esiguo numero di mutazioni puntiformi (media di 2 mutazioni puntiformi a sequenza) che non interessano siti di legame per fattori di trascrizione cellulare. È inoltre presente la transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 nel box F.

** La trasversione T→G nella posizione nucleotidica 37 nel box A interessa il sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B e la transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 nel box F interessa il sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1. La numerazione nucleotidica considerata è quella del ceppo non patogeno CY di JCV [Yogo et al., 1990].

[§]: classificazione della NCCR di Jensen and Major (2001).

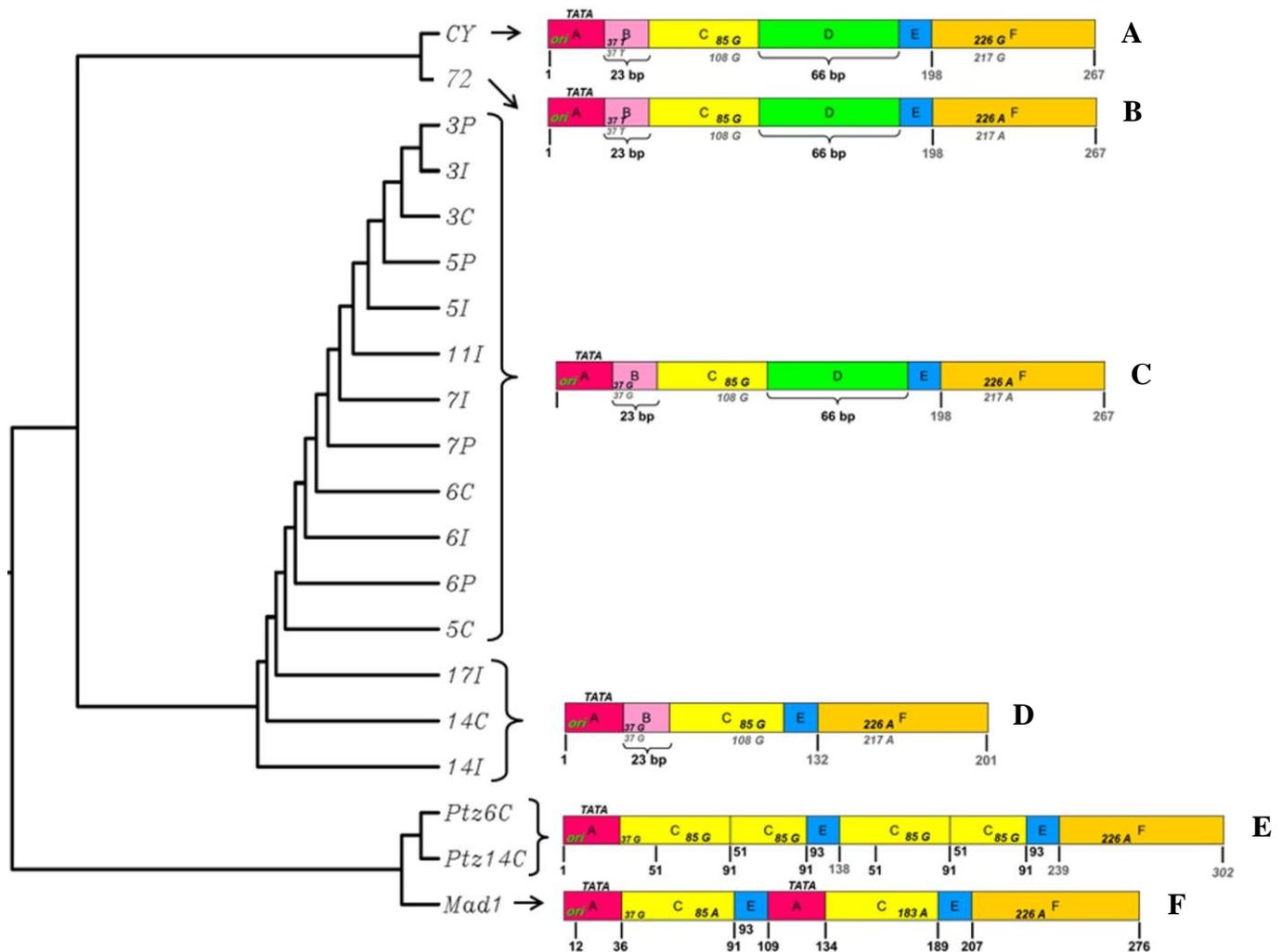


Figure 2.1 Sequenze della NCCR di JCV ritrovate nei campioni biologici dei pazienti pediatrici della *Coorte 1.1*. La sequenze nucleotidica della NCCR di JCV è mostrata dal nucleo dell'origine di replicazione del DNA (*ori*) fino al codone di inizio della gene leader (*agno-proteina*) dei geni virali precoci. In **A**, la numerazione nucleotidica della sequenza archetipo CY, isolata da Yogo e colleghi nel 1990, è riportati in grassetto grigio. In **F**, la numerazione nucleotidica si basa sulla sequenza della NCCR della variante Mad1 PML-associata e isolata da Frisque e colleghi nel 1984, e il numero dei nucleotidi sono indicati in grassetto nero. In **B**, la variante virale archetipo CY ritrovata in 72/99 (72%) sequenze analizzate. In **C**, **D** ed **E**, sono riportate le 27/99 (27%) sequenze riarrangiate della NCCR. Queste ultime sequenze sono state ottenute esclusivamente da plasma e biopsie intestinali. In particolare, tra questi 27 campioni, 20 (8 campioni di plasma, 7 biopsie ileali e 5 biopsie del colon-retto) hanno mostrato una organizzazione della NCCR *arche-like* CY con due variazioni nucleotidiche ricorrenti, la trasversione 37 T→G nel BoxA e la transizione 217 G→A nel BoxF (**C**); 5 campioni (4 biopsie ileali e 1 biopsia di colon-retto) hanno mostrato le due variazioni nucleotidiche sopra menzionate in associazione alla delezione del BoxD (**D**); infine due biopsie colon-rettali, ottenute da due diversi pazienti dopo 18 mesi di trattamento, hanno mostrato una particolare sequenza della NCCR riarrangiata, con un'organizzazione strutturale simile alla variante patogena Mad1 (**E**). Il cladogramma è stato realizzato mediante software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

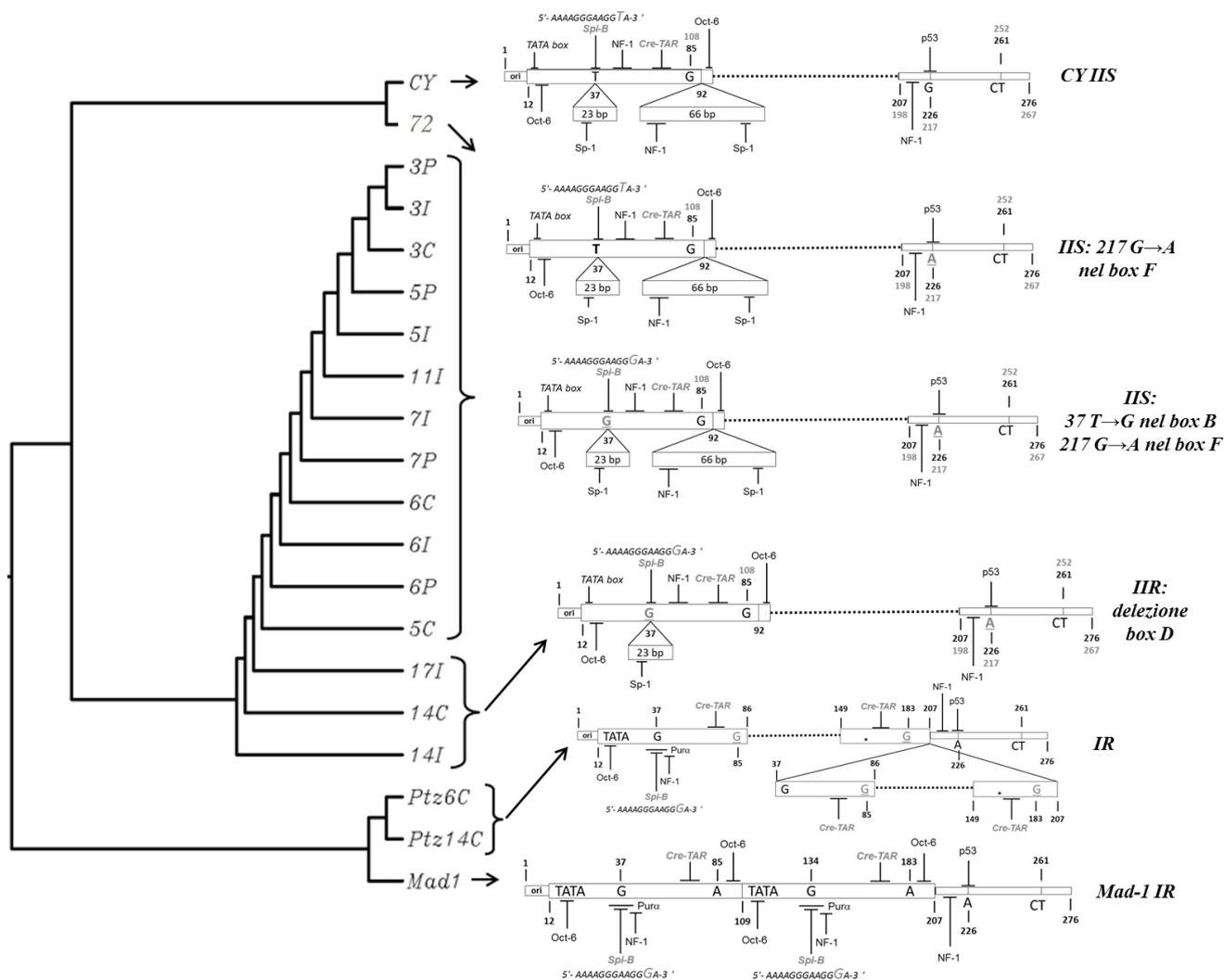


Figure 2.2 Sequenze della NCCR di JCV ritrovate nei campioni biologici dei pazienti pediatrici della *Coorte 1.1* secondo la classificazione di Jensen and Major (2001). La sequenze nucleotidica della NCCR di JCV è mostrata dal nucleo dell'origine di replicazione del DNA (ori) fino al codone di inizio della gene leader (*agno-proteina*) dei geni virali precoci. *CY IIS*: sequenza archetipo CY, isolata da Yogo e colleghi nel 1990; *IIS*: 217 G→A nel box F: variante virale archetipo CY ritrovata in 72/99 (72%) sequenze analizzate. *IIS*: 37 T→G nel BoxA e 217 G→A nel BoxF: 8 campioni di plasma, 7 biopsie ileali e 5 biopsie del colon-retto hanno mostrato una organizzazione della NCCR *arche-like* CY con due variazioni nucleotidiche ricorrenti, la trasversione 37 T→G nel BoxA e la transizione 217 G→A nel BoxF; *IIR*: *delezione box D*: 4 biopsie ileali e 1 biopsia di colon-retto hanno mostrato le due variazioni nucleotidiche sopra menzionati in associazione alla delezione del BoxD; *IR*: infine due biopsie colon-rettali, ottenute da due diversi pazienti dopo 18 mesi di trattamento, hanno mostrato una particolare sequenza della NCCR riarrangiata, con un'organizzazione strutturale simile alla variante patogena Mad1. *Mad1 IR*: sequenza della NCCR della variante Mad1 PML-associata e isolata da Frisque e colleghi nel 1984. Il cladogramma è stato realizzato mediante software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Per quanto riguarda l'indagine genotipica condotta mediante analisi della sequenza della VP1 di JCV, nei pazienti affetti da MC e trattati con infliximab è stato osservato il genotipo 1A in 10/18 e quello 1B in 8/18 pazienti. Gli stessi genotipi (1A ed 1B) sono stati osservati rispettivamente in 6/25 e 4/25 pazienti affetti da MC ma non trattati con infliximab. In questi pazienti non sono mai state osservate co-infezioni (Fig. 2.3). Non è stata riscontrata nessuna associazione significativa tra i genotipi ritrovati ed l'uso d'infliximab, ampiamente impiegato nel trattamento del MC pediatrico.

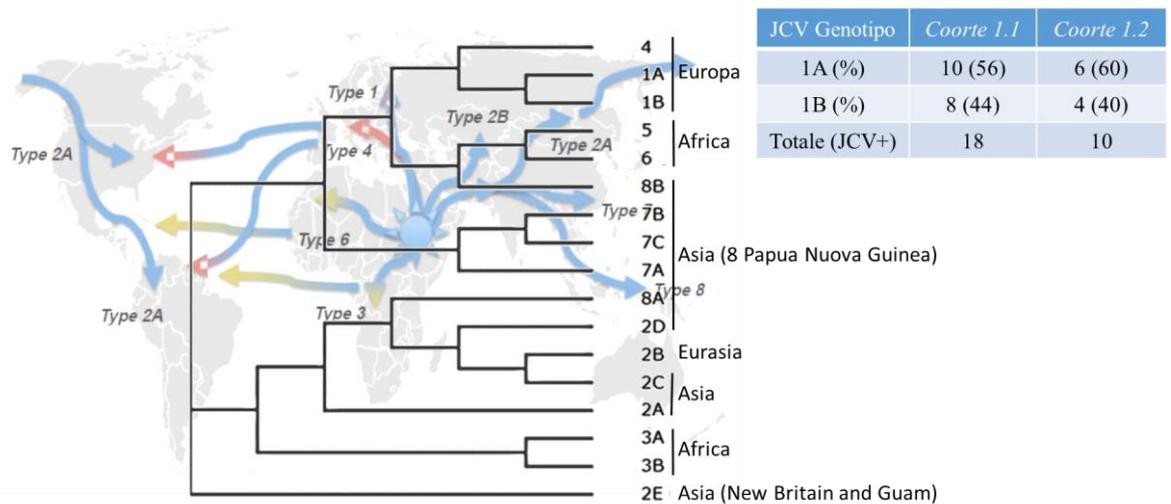


Figure 2.3 Genotipi di JCV ritrovati nelle coorti di pazienti pediatriche affette da MC trattati rispettivamente con infliximab (Coorte 1.1) e con terapia farmacologica convenzionale (Coorte 1.2). I genotipi 1A e 1B ritrovati sono quelli maggiormente diffusi nel continente Europeo ed in Italia. Il cladogramma è stato realizzato mediante software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.2 *Pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab (Coorte 2)*

3.2.1 *Valutazione sierica degli anticorpi JCV-specifici mediante STRATIFY JCV® e della carica virale tramite q-PCR nei campioni biologici raccolti a t0 da 22 pazienti affetti da SMRR*

Prima dell'inizio del trattamento con *natalizumab* (Tysabri®) (t0: *baseline* ovvero numero di infusioni di *natalizumab* pari a 0), sono stati arruolati 22 pazienti affetti da SMRR (età *media* ± *dev. stand.*: 30,6 ± 6,8; mesi di malattia *media* ± *dev. stand.*: 84 ± 85,7; EDSS *media* ± *dev. stand.*: 1,9 ± 1,3) (Tab. 2.6) ed idonei all'inserimento nel programma terapeutico del Tysabri® [AIFA: Nota informativa sul Tysabri®]. Sono stati raccolti un totale di 22 campioni di sangue intero in EDTA e 22 campioni di urina. Inoltre in questi pazienti, in seguito alla messa a punto del test di ricerca di anticorpi anti-JCV (STRATIFY JCV®) eseguito dalla Biogen Idec., a t0 è stata riscontrata la presenza di tali anticorpi in 4 pazienti (STRATIFY JCV® positivi) mentre i restanti 18 sono risultati negativi al test (STRATIFY JCV® negativi). Nei 4 pazienti STRATIFY JCV® positivi il DNA virale è stato riscontrato esclusivamente nel plasma (2,84 log₁₀ gEq/mL) e nei PBMC (2,07 log₁₀ gEq/10⁶ cellule) di un solo paziente (Tab. 2.7). Invece nei 18 pazienti STRATIFY JCV® negativi la viruria è stata riscontrata in 4/18 campioni con una mediana della carica virale pari a 4,38 log₁₀ gEq/mL (range: 3,48-4,58), mentre la viremia è stata osservata in 2/18 pazienti con una mediana della carica virale pari a 3,02 log₁₀ gEq/mL (range: 2,70-3,20). In questi 18 pazienti inoltre, il DNA di JCV è stato rilevato in 2 campioni di PBMC con una mediana della carica virale pari a 3,42 log₁₀ gEq/10⁶ cellule (range: 1,95-3,72) (Tab. 2.7). A t0, non è stata evidenziata nessuna differenza statisticamente significativa tra la viruria e la viremia né dei pazienti STRATIFY JCV® positivi né in quelli STRATIFY JCV® negativi. Inoltre né la viremia né la viruria sono risultati correlabili con il dato della presenza o assenza nel siero di anticorpi anti-JCV. Infine 2 su 22 pazienti hanno sospeso la terapia per reazione allergica al farmaco dopo 2 infusioni e 5 su 22 hanno mostrato una scarsa *compliance*.

Tabella 2.6. Dati clinici e anagrafici dei pazienti affetti da SMRR al baseline (t0)

Baseline (0 infusioni) t0	
Femmine/Maschi	8/14
Totale pazienti	22
STRATIFY JCV®* +/- t0	4/18
Età media (± dev. stand)	30,6 (± 6,8)
Mediana (range)	31 (19-40)
Media mesi di malattia (± dev. stand)	84 (± 85,7)
Mediana (range)	60 (12-240)
EDSS** Medio (± dev. stand)	1,9 (± 1,3)
Mediana (range)	2 (0-4)
Nessuna terapia precedente	9
Interferone	13

*STRATIFY JCV®: ricerca nel siero degli anticorpi anti-JCV mediante *2-step virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbed assay (ELISA)*. L'indagine viene condotta di *routine* ogni anno nei pazienti trattati con natalizumab.
**EDSS: l'attività della malattia nei pazienti con sclerosi multipla viene indicata mediante il Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS).

Tabella 2.7. Carica virale di JC e STRATIFY JCV® dei pazienti affetti da SMRR al baseline (t0)

STRATIFY JCV®* positivo								
Pz N° Totale	N° Pz JCV DNA +†	N° Pz JCV DNA -†	Urine		Plasma		PBMC	
			JCV+/ JCV-	log10 gEq/mL (range) [§]	JCV+/ JCV-	log10 gEq/mL (range) [§]	JCV+/ JCV-	log10 gEq/10 ⁶ c (range) [§]
4	1	3	0/4	-	1/3	2,84	1/3	2,07
STRATIFY JCV®* negativo								
18	7	11	4/14	4,38 (3,48-4,58)	2/16	3,02 (2,70-3,20)	2/16	3,42 (1,95-3,72)
Totale t0	8/22	14/22	4/18	4,38 (3,48-4,58)	3/19	2,84 (2,70-3,20)	3/19	2,07 (1,95-3,72)

*STRATIFY JCV®: servizio di supporto fornito dalla Biogen Idec, per la ricerca nel siero degli anticorpi anti-JCV mediante *2-step virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbed assay (ELISA)*. L'indagine viene condotta di *routine* ogni anno nei pazienti in trattamento con natalizumab.

[§]I dati sono stati espressi come copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale per millilitro (gEq/ml) per i campioni di plasma e urine e come copie di gEq di DNA virale su 10⁶ cellule (gEq/10⁶c).

†Per N° Pz JCV DNA + e N° Pz JCV DNA - si intende il numero di paziente nei quali è stata riscontrata la presenza o meno di DNA di JCV nei campioni di plasma e/o PBMC e/o urina.

3.2.2 Valutazione della carica virale di JC tramite q-PCR in campioni biologici di 15 pazienti affetti da SMRR con follow-up nel primo anno di trattamento con natalizumab (follow-up < 12 mesi)

Su 15/22 pazienti affetti da SMRR e reclutati a t0 (età *media* \pm *dev. stand.*: $33 \pm 7,7$; mesi di malattia *media* \pm *dev. stand.*: $112,4 \pm 100,3$; EDSS *media* \pm *dev. stand.*: $1,9 \pm 1,3$) (Tab. 2.8), è stato condotto il seguente *follow-up* (*follow-up* < 12 mesi):

- ogni 4 (t1), 8 (t2) e 12 (t3) infusioni di natalizumab è stato prelevato un totale di 45 campioni di sangue intero in EDTA e 45 campioni di urina.

A t0, mediante STRATIFY JCV[®], la presenza di anticorpi anti-JC è stata rilevata in un solo paziente (1/15), mentre a t3 il numero di pazienti STRATIFY JCV[®] positivi è salito a 7. Per quanto riguarda la ricerca del DNA di JCV mediante q-PCR nei campioni biologici raccolti, a t0 la viruria è stata riscontrata in 4 pazienti STRATIFY JCV[®] negativi a t0. Questi pazienti hanno sviluppato anticorpi anti-JCV durante il primo anno di trattamento con natalizumab divenendo STRATIFY JCV[®] positivi a t3. La mediana della carica virale nei campioni di urina, riscontrata a questo tempo di *follow-up*, è stata pari a $4,38 \log_{10} \text{ gEq/mL}$ (range: 3,48-4,58), mentre dopo 4 mesi di trattamento con natalizumab (t1) questo valore è sceso fino a $4,11 \log_{10} \text{ gEq/mL}$ (range: 2,00-6,01). A t2 (dopo 8 infusioni di natalizumab), il numero di pazienti con DNA di JCV nelle urine è salito da 4 a 5, in seguito al riscontro di viruria da JCV in 1 paziente STRATIFY JCV[®] negativo sia a t0 sia a t3. Tale paziente è risultato successivamente negativo al DNA di JCV nelle urine a t3 (dopo 12 infusioni di natalizumab). In conclusione, il numero di pazienti SMRR che hanno manifestato una viruria persistente per tutta la durata del *follow-up* è pari a 4. Complessivamente, rispetto a t0 e t1, la mediana della carica virale nelle urine sale fino a $5,18 \log_{10} \text{ gEq/mL}$ (range: 3,77-5,65) a t2 e fino a $5,63 \log_{10} \text{ gEq/mL}$ (range: 5,29-5,94) a t3, e tale incremento è statisticamente significativo ($p = 0,05$) (Tab. 2.9 e Fig. 2.4).

Per quanto riguarda invece la ricerca del DNA di JCV nei campioni di plasma raccolti da 15 pazienti con *follow-up* < 12 mesi, la viremia è stata rilevata a t0 solo in 2 pazienti STRATIFY JCV[®] negativi con un valore della mediana della carica virale pari a $2,95 \log_{10} \text{ gEq/mL}$ (range: 2,70-3,21). A t1, invece, i 2 pazienti che presentavano viremia a t0 si sono negativizzati mentre altri 2 pazienti (STRATIFY JCV[®] negativi a t0 e STRATIFY JCV[®] positivi a t3) con viruria persistente per tutto il corso del *follow-up*, hanno mostrato la presenza del DNA di JCV a livello plasmatico con una mediana della carica virale pari a $2,15 \log_{10} \text{ gEq/mL}$ (range: 1,61-2,69). Infine a t2 tutti i pazienti con *follow-up* < 12 mesi sono risultati negativi per il DNA di JCV mentre ad 1 anno di trattamento con natalizumab (t3) solo 1 paziente (STRATIFY JCV[®] negativo a t0 e t3) presentava una carica virale nel plasma pari a $1,86 \log_{10} \text{ gEq/mL}$ e nei PBMC pari a $1,11 \log_{10} \text{ gEq}/10^6$ cellule (Tab. 2.9).

Per quanto riguarda i PBMC, a t0 il DNA di JCV è stato rilevato nei PBMC di 2 pazienti (uno dei quali con viruria persistente per tutto il corso del follow-up ed entrambi STRATIFY JCV® negativi a t0 e STRATIFY JCV® positivi a t3), con un valore medio di copie di DNA virale pari a 2,82 log10 gEq/10⁶ cellule (range: 1,92-3,72).

A t1, il DNA virale è stato ritrovato nei PBMC di un singolo paziente (1 log10 gEq/10⁶cellule) che ha mostrato viremia allo stesso tempo di campionatura e viruria persistente per tutto il corso del follow-up.

Infine a t2 nei PBMC di 1 solo paziente è stato possibile osservare una positività per il DNA di JCV con una carica virale pari a 2,16 log10 gEq/10⁶cellule (Tab. 2.9).

Da questi dati è possibile evidenziare che il numero medio di genomi equivalenti di JCV rilevati nelle urine è significativamente più elevato di quello osservato nel plasma (p= 0,047) (Fig. 2.4) e nei PBMC (p = 0,029).

Tabella 2.8 Dati clinici e anagrafici dei 15 pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab di cui è stato possibile eseguire il follow-up nei primi 12 mesi di trattamento con prelievi seriali a t0, t1, t2 e t3

Follow-up < 12 mesi	
Femmine/Maschi	7/8
Totale pazienti	15
STRATIFY JCV®* +/- t0	1/14
STRATIFY JCV®* +/- t3	7/8
Età media (± dev. stand)	33 (± 7,7)
Mediana (range)	34 (19-47)
Media mesi di malattia (± dev. stand)	112,4 (± 100,3)
Mediana (range)	84 (12-240)
EDSS** Medio (± dev. stand)	1,9 (± 1,3)
Mediana (range)	2 (0-4)
Nessuna terapia precedente	5
Interferone	10

*STRATIFY JCV®: servizio di supporto fornito dalla Biogen Idec, per la ricerca nel siero degli anticorpi anti-JCV mediante *2-step virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbed assay (ELISA)*. L'indagine viene condotta di routine ogni anno nei pazienti in trattamento con natalizumab. Nei pazienti arruolati in questo studio, tale indagine è stata condotta a t0 e t3. **EDSS: l'attività della malattia nei pazienti con sclerosi multipla viene indicata mediante il Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS). I valori di questa scala sono compresi tra 0 (esame neurologico normale) e 10 (paziente allettato).

Tabella 2.9. Carica virale di JC nei campioni di urina, plasma e PBMC prelevati dai 15 pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab di cui è stato possibile eseguire il follow-up nei primi 12 mesi di trattamento con prelievi seriali a t0, t1, t2 e t3

N° infusioni*	Pz N° Totale	N° Pz JCV DNA + [†]	N° Pz JCV DNA - [†]	Urina		Plasma		PBMC	
				JCV+/ JCV-	log10 gEq/mL (range) [§]	JCV+/ JCV-	log10 gEq/mL (range) [§]	JCV+/ JCV-	log10 gEq/10 ⁶ c (range) [§]
t0	15	7	8	4/11	4,38 (3,48-4,58)	2/13	2,95 (2,70-3,21)	2/13	2,82 (1,92-3,72)
t1	15	4	11	4/11	4,11 (2,00-6,01)	2/13	2,15 (1,61-2,69)	1/14	1
t2	15	5	10	5/10	5,18 (3,77-5,65)	0/15	-	1/14	2,16
t3	15	5	10	4/11	5,63 (5,29-5,94)	1/14	1,86	1/14	1,11
Totale	15	9	6	17/43	5,18 (2,00-6,01)	5/55	2,15 (1,61-3,21)	5/55	1,92 (1,00-3,72)

* Prelievi seriali di urina, plasma e PBMC sono stati eseguiti a t0 (*baseline*: numero di infusioni di natalizumab pari a 0) e ogni 4 mesi per 1 anno (t1: 4 infusioni; t2: 8 infusioni; t3: 12 infusioni). [†]Per N° Pz JCV DNA + e N° Pz JCV DNA – si intende il numero di paziente nei quali è stata riscontrata la presenza o meno di DNA di JCV nei campioni di plasma e/o PBMC e/o urina.

[§]I valori mediani di carica virale di JCV (ed il rispettivo range) ritrovati nei campioni di urina e plasma sono stati espressi come log10 delle copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale per millilitro (gEq/ml), mentre la mediana del numero di copie di genoma virale ritrovato nei PBMC è stata espressa come log10 delle copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale su 10⁶ cellule (gEq/10⁶c).

Infine, tra i 15 pazienti analizzati, 2 non hanno eseguito 2 infusioni di natalizumab, uno a causa di una concomitante infezione urinaria da *Escherichia coli* ed uno a causa del peggioramento del quadro clinico di SMRR e con una positività di anticorpi anti-JCV a t3.

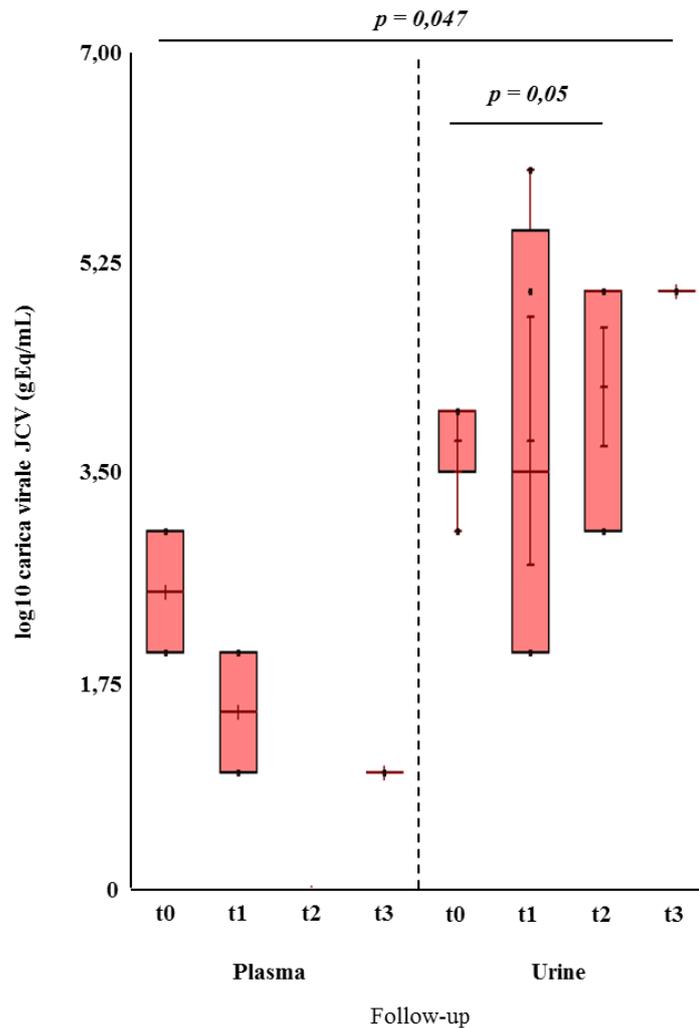


Figura 2.4. Confronto tra i valori di viremia e viruria da JCV (espressi in log10 gEq/ml) nei 15 pazienti affetti da SMRR con follow-up nei primi 12 mesi di trattamento con natalizumab. Prelievi seriali di urina e plasma sono stati eseguiti a t0 (*baseline*: numero di infusioni di natalizumab pari a 0) e ogni 4 mesi per 1 anno (t1: 4 infusioni; t2: 8 infusioni; t3: 12 infusioni). Non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa tra le viremie da JCV registrate ai vari tempi previsti dal follow-up, mentre i valori di viruria osservati a t2 sono significativamente più elevati rispetto a quelli osservati a t0. Infine, i valori di viremia rilevati sono risultati essere sempre significativamente più bassi rispetto ai valori di viruria ad ogni tempo di follow-up. L'analisi statistica è stata eseguita mediante test non parametrici e la significatività è fissata per p value < 0,05.

3.2.3 Valutazione della carica virale di JC tramite q-PCR in campioni biologici di 30 pazienti affetti da SMRR e con un numero di infusioni di natalizumab compreso tra 4 e 12 (< 12 mesi)

In questa coorte sono stati arruolati oltre ai 15 pazienti sopradescritti, anche altri 15 pazienti con un numero medio di infusioni compreso tra 4 e 12 (< 12 mesi) (età *media* \pm *dev. stand.*: $35 \pm 8,4$; mesi di malattia *media* \pm *dev. stand.*: $107 \pm 89,7$; EDSS *media* \pm *dev. stand.*: $2,1 \pm 1,0$) (Tab. 2.10).

Dai 15 pazienti con un numero medio di infusioni compreso tra 4 e 12, sono stati raccolti complessivamente 18 campioni di sangue intero in EDTA (4 prelevati a t1, 4 a t2 e 10 a t3) e 14 campioni di urina (3 prelevati a t1, 3 a t2 e 8 a t3) sui quali si è andata a valutare la carica virale di JC tramite q-PCR.

I risultati hanno evidenziato, per quanto riguarda i campioni di sangue, una negatività al DNA virale in tutti i campioni di plasma analizzati mentre in un solo campione di PBMC, ottenuto da un paziente STRATIFY JCV® positivo dopo 12 mesi di trattamento con natalizumab (t3) è stata rilevata la presenza del DNA di JCV con una carica virale pari a $1,95 \log_{10} \text{ gEq}/10^6 \text{ cellule}$. Per quanto riguarda i campioni di urina, solo in 1 campione si è osservata una viruria pari a $6,04 \log_{10} \text{ gEq}/10^6 \text{ cellule}$ in 1 paziente STRATIFY JCV® negativo a t3.

Tabella 2.10. Dati clinici e anagrafici dei pazienti affetti da SMRR e con un numero di infusioni di natalizumab compreso tra 4 e 12 (< 12 mesi)

	<12 mesi 4-12 infusioni (t1-t3)
Femmine/Maschi	13/17
Totale pazienti	30
STRATIFY JCV®* +/- t0	5/25
STRATIFY JCV®* +/- t3	13/17
Età media (\pm dev. stand)	35 (\pm 8,4)
Mediana (range)	34 (19-51)
Media mesi di malattia (\pm dev. stand)	107 (\pm 89,7)
Mediana (range)	78 (12-300)
EDSS** Medio (\pm dev. stand)	2,1 (\pm 1,0)
Mediana (range)	2 (0-4)
Nessuna terapia precedente	9
Interferone	18
Glatimer acetato	3

*STRATIFY JCV®: servizio di supporto fornito dalla Biogen Idec, per la ricerca nel siero degli anticorpi anti-JCV mediante *2-step virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbed assay (ELISA)*. L'indagine viene condotta di *routine* ogni anno nei pazienti in trattamento con natalizumab. Nei pazienti arruolati in questo studio, tale indagine è stata condotta a t0 e t3. **EDSS: l'attività della malattia nei pazienti con sclerosi multipla viene indicata mediante il Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS). I valori di questa scala sono compresi tra 0 (esame neurologico normale) e 10 (paziente allettato).

Complessivamente sono stati analizzati 59 campioni di urina, 45 provenienti dai 15 pazienti affetti da SMRR con un follow up completo nel primo anno di trattamento con natalizumab e 14 provenienti dai 15 pazienti affetti da SMRR con un numero di infusioni di natalizumab compreso tra 4 e 12 (< 12 mesi) al fine di valutare la carica virale di JCV tramite q-PCR.

I risultati hanno mostrato che 14/59 campioni di urina erano positivi al DNA di JCV. 12 di questi 14 campioni di urina positivi al DNA di JCV sono stati prelevati da 4 pazienti con STRATIFY JCV[®] negativo a t0 e STRATIFY JCV[®] positivo a t3, ed in essi è stata evidenziato un valore mediano della viruria pari a 5,33 log₁₀ gEq/mL (range: 2-6,01). Nei restanti 2 campioni di urina, prelevati da 2 pazienti STRATIFY JCV[®] negativi sia t0 sia t3, il valore medio della carica virale era pari a 5,74 log₁₀ gEq/mL (range: 3,77-6,04) (Tab. 2.11).

Per quanto riguarda i campioni di sangue intero in EDTA, in questa coorte sono stati raccolti 63 campioni di plasma e 63 campioni di PBMC, nei quali si è andati sempre a determinare la carica virale di JCV tramite q-PCR. 3/63 campioni di plasma e 4/63 di PBMC sono risultati positivi al DNA di JCV. In particolare, i risultati ottenuti hanno messa in evidenza la presenza di una viremia pari a 2,42 log₁₀ gEq/mL (range: 1,61-2,69) in 2 campioni di plasma di 2 pazienti con STRATIFY JCV[®] positivo a t3, nei quali è stata osservata anche una viruria persistente durante l'intero primo anno di trattamento con natalizumab. Un terzo paziente, con STRATIFY JCV[®] negativo a t0 e t3, ha mostrato invece la presenza del DNA virale sia nel plasma (1,86 log₁₀ gEq/mL) che nei PBMC (1,11 log₁₀ gEq/10⁶ cellule) (Tab. 2.11).

Infine in 3 campioni di PBMC prelevati da tre pazienti, con STRATIFY JCV[®] positivo solo a t3 è stato quantificato un valore della mediana del numero di copie di DNA di JCV pari a 1,95 log₁₀ gEq/10⁶ cellule (Tab. 2.11).

L'indagine statistica, eseguita mediante il test del χ^2 , ha permesso di individuare un'associazione statisticamente significativa ($p = 0,0006$) tra il numero di campioni di urina positivi al DNA di JCV prelevati da pazienti con uno STRATIFY JCV[®] positivo a t3 ed il numero di campioni di urina positivi al DNA di JCV prelevati da pazienti con uno STRATIFY JCV[®] negativo a t3. E' stato stimato un rischio relativo (RR) di riattivazione virale pari a 2,57 (intervallo di confidenza IC 95%: 1,61-4,09) (Tab. 2.11). Non è stato possibile estrapolare la stessa correlazione tra la viremia e il valore dello STRATIFY JCV[®] ottenuto a t3 (Tab. 2.11).

Infine, l'analisi dei risultati ha permesso di concludere che l'andamento della viruria possa rappresentare un indice predittivo di riattivazione del virus JC nei primi 12 mesi di trattamento con natalizumab in pazienti affetti da SMRR anche nei casi in cui il saggio ELISA specifico per la ricerca di anticorpi anti-JCV fornisca un risultato negativo ed in virtù dell'elevata sensibilità della metodica di Real Time PCR (q-PCR).

Tabella 2.11. Carica virale di JC e STRATIFY JCV® dei pazienti affetti da SMRR con un numero di infusioni di natalizumab compreso tra 4 e 12 (< 12 mesi)

STRATIFY JCV®* positivo t3									
Pz N° Totale	N° Pz JCV DNA + [†]	N° Pz JCV DNA - [†]	Urina		Plasma		PBMC		RR (IC 95%) p value**
			JCV+/ JCV-	log10 gEq/mL (range) [§]	JCV+/ JCV-	log10 gEq/mL (range) [§]	JCV+/ JCV-	log10 gEq/10 ⁶ c (range) [§]	
13	5	8	12/15	5,33 (2-6,01)	2/27	2,42 (1,61-2,69)	3/26	1,95 (1-2,66)	2,40 (1,52-3,80) p = 0,0012
STRATIFY JCV®* negativo t3									
17	3	14	2/30	5,74 (3,77-6,04)	1/33	1,86	1/33	1,11	p > 0,05
Totale < 12 mesi	8/30	22/30	14/45	5,33 (2-6,04)	3/60	1,86 (1,61-2,69)	4/59	1,53 (1-2,66)	
RR (IC 95%) p value**				2,57 (1,61-4,09) p = 0,0006		p > 0,05		p > 0,05	

*STRATIFY JCV®: servizio di supporto fornito dalla Biogen Idec, per la ricerca nel siero degli anticorpi anti-JCV mediante 2-step virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbed assay (ELISA). L'indagine viene condotta di routine ogni anno nei pazienti in trattamento con natalizumab. Nei pazienti arruolati in questo studio, tale indagine è stata condotta a t0 e t3. [§]I dati sono stati espressi come copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale per millilitro (gEq/ml) per i campioni di plasma e di urina, e come copie di gEq di DNA virale su 10⁶ cellule (gEq/10⁶c). [†]Per N° Pz JCV DNA + e N° Pz JCV DNA - si intende il numero di paziente nei quali è stata riscontrata la presenza o meno di DNA di JCV nei campioni di plasma e/o PBMC e/o urina. Questi due raggruppamenti di pazienti saranno identificati rispettivamente come viremici/virurici (VIR) e non viremici e non virurici (NO VIR) durante le indagini immunologiche condotte esclusivamente nella coorte dei pazienti affetti da SMRR e trattata con natalizumab (Coorte 2). ** Il rischio relativo (RR) con intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) statisticamente significativo per p value < 0,05 mediante il test del χ^2 .

3.2.4 Valutazione della carica virale di JCV tramite q-PCR in campioni biologici della coorte di pazienti affetti da SMRR e con un numero di infusioni di natalizumab > 12

In questa coorte sono stati arruolati sia 22 pazienti con un numero di infusioni di natalizumab compreso tra 13 e 24 (t4), sia 11 pazienti con un numero di infusioni di natalizumab > 24 (t5). Sono stati raccolti complessivamente 38 campioni di sangue intero in EDTA e 34 campioni di urina dai 22 pazienti a t4 (età *media* ± *dev. stand.*: 38,2 ± 7,6; mesi di malattia *media* ± *dev. stand.*: 100 ± 79,2; EDSS *media* ± *dev. stand.*: 2,2 ± 1,1) (Tab. 2.12). Infine 18 campioni di sangue intero in EDTA e 14 campioni di urina sono stati prelevati a t5 dagli 11 pazienti sopraindicati (età *media* ± *dev. stand.*: 39,7 ± 10,6; mesi di malattia *media* ± *dev. stand.*: 75,6 ± 44,9; EDSS *media* ± *dev. stand.*: 2,2 ± 1,0) (Tab. 2.12).

Tabella 2.12. Dati clinici e anagrafici dei pazienti affetti da SMRR e con un numero di infusioni di natalizumab > 12

	Numero di infusioni > 12	
	13-24 infusioni (t4)	> 24 infusioni (t5)
Femmine/Maschi	17/5	9/2
Totale pazienti	22	11
STRATIFY JCV®* +/- t3	6/16	3/8
Età media (± dev. stand)	38,2 (± 7,6)	39,7 (± 10,6)
Mediana (range)	37 (27-54)	40 (22-54)
Media mesi di malattia (± dev. stand)	100 (± 79,2)	75,6 (± 44,9)
Mediana (range)	72 (12-300)	72 (12-180)
EDSS** Medio (± dev. stand)	2,2 (± 1,1)	2,2 (± 1,0)
Mediana (range)	2 (1-4)	2 (1-4)
Nessuna terapia precedente	5	1
Interferone	12	8
Glatimer acetato	5	2

*STRATIFY JCV®: servizio di supporto fornito dalla Biogen Idec, per la ricerca nel siero degli anticorpi anti-JCV mediante *2-step virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbed assay (ELISA)*. L'indagine viene condotta di *routine* ogni anno nei pazienti in trattamento con natalizumab. Per questi pazienti è disponibile il dato dello STRATIFY JCV® a t3. **EDSS: l'attività della malattia nei pazienti con SMRR viene indicata mediante il Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS).

In questi due gruppi di pazienti non è stata osservata alcuna differenza o correlazione statisticamente significativa tra i dati clinici e anagrafici, i risultati ottenuti dalla ricerca del DNA di JCV nei vari campioni biologici e l'esito dell'indagine anticorpale STRATIFY JCV®. Pertanto tutti i risultati sono da riferirsi al numero totale di pazienti SMRR inseriti in tale coorte e con un numero di infusioni comunque maggiore di 12. E' da sottolineare che i prelievi di 6 pazienti (1 STRATIFY JCV® positivo a t3 e 5 pazienti STRATIFY JCV® negativi a t3) sono stati effettuati sia a t4 che a t5

per cui il numero totale di pazienti non corrisponde a 33 (somma di 22 pazienti con un numero di infusioni compreso tra 13-24 e di 11 pazienti con infusioni > 24) bensì a 27. Infatti, da questi 27 pazienti, sono stati raccolti 48 campioni di urina di cui 8 positivi al DNA di JCV (mediana della viruria: 5,11 log₁₀ gEq/mL; range: 2,94-6,67), 56 campioni di plasma di cui 9 con carica virale (mediana della viremia: 3,01 log₁₀ gEq/mL; range: 1,52-4,72) e 56 campioni di PBMC, di cui 6 presentavano un numero mediano di copie di genomi virali pari a 2,39 log₁₀ gEq/10⁶ cellule (range: 1,48-4,11). Tali dati sono stati riassunti nella Tabella 2.13.

Tabella 2.13. Carica virale di JCV e STRATIFY JCV® dei pazienti affetti da SMRR con un numero di infusioni di natalizumab > 12

N° infusioni	STRATIFY JCV®* positivo t3								
	Pz N° Totale	N° Pz JCV DNA +†	N° Pz JCV DNA -†	Urina		Plasma		PBMC	
				JCV+/ JCV-	log ₁₀ gEq/mL (range) [§]	JCV+/ JCV-	log ₁₀ gEq/mL (range) [§]	JCV+/ JCV-	log ₁₀ gEq/10 ⁶ c (range) [§]
13-24 inf (t4)	6	3	3	2/5	5,57 (5,50-5,65)	1/8	1,52	1/8	1,66
> 24 inf (t5)	3	1	2	0/3	-	1/3	4,58	0/4	-
STRATIFY JCV®* negativo t3									
13-24 inf (t4)	16	7	9	2/25	5,19 (3,81-5,49)	6/23	3,00 (2,67-4,72)	2/27	2,42 (2,23-2,56)
> 24 inf (t5)	8	4	4	4/7	4,53 (2,94-6,67)	1/13	3,25	3/11	3,03 (1,48-4,11)
Totale > 12 mesi	27**	14**	13**	8/40	5,11 (2,94-6,67)	9/47	3,01 (1,52-4,72)	6/50	2,39 (1,48-4,11)

*STRATIFY JCV®: servizio di supporto fornito dalla Biogen Idec, per la ricerca nel siero degli anticorpi anti-JCV mediante 2-step virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbed assay (ELISA). L'indagine viene condotta di routine ogni anno nei pazienti in trattamento con natalizumab. Per questi pazienti è disponibile il dato dello STRATIFY JCV® a 12 infusioni di natalizumab (t3). [§]I dati sono stati espressi come copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale per millilitro (gEq/ml) per i campioni di plasma e di urina, e come copie di gEq di DNA virale su 10⁶ cellule (gEq/10⁶c). ** Per 1 paziente STRATIFY JCV® positivo a t3 e per 5 pazienti STRATIFY JCV® negativi a t3 sono stati disponibili prelievi sia a t4 che a t5. †Per N° Pz JCV DNA + e N° Pz JCV DNA - si intende il numero di paziente nei quali è stata riscontrata la presenza o meno di DNA di JCV nei campioni di plasma e/o PBMC e/o urina. Questi due raggruppamenti di pazienti saranno identificati rispettivamente come viremici/virurici (VIR) e non viremici e non virurici (NO VIR) durante le indagini immunologiche condotte esclusivamente nella coorte dei pazienti affetti da SMRR e trattata con natalizumab (Coorte 2).

3.2.5 Confronto del numero dei campioni di urine e di plasma positivi al DNA di JCV e valutazione della rispettiva carica virale nei pazienti affetti da SMRR con un numero di infusioni di natalizumab pari a 0 (t0: baseline), tra 4 e 12 (< 12 mesi) e > 12 (> 12 mesi)

Dal confronto tra i valori di viruria e di viremia (log10 gEq/mL) ottenuti dai 22 pazienti affetti da SMRR con un numero di infusioni di natalizumab pari a 0 (t0), i valori ottenuti dai 30 pazienti con un numero di infusioni di natalizumab compreso tra 4 e 12 e quelli acquisiti dai 27 pazienti con un numero di infusioni superiore a 12, è stato osservato che il valore mediano di viremia (2,84 a t0, 1,86 in pazienti trattati con natalizumab da meno di 12 mesi e 3,01 in pazienti trattati da più di 12 mesi) è sempre inferiore a quello della viruria (4,38 a t0, 5,33 in pazienti trattati con natalizumab da meno di 12 mesi e 5,11 in pazienti trattati da più di 12 mesi) ($p = 0,001$) (Tab. 2.14 e Fig. 2.5). Inoltre il test del χ^2 ha permesso di concludere che i pazienti con un numero di infusioni superiore a 12 (9/47) ha un rischio relativo pari a 1,71 di sviluppare viremia da JC rispetto ai pazienti con un numero di infusioni inferiore a 12 (3/60) ($p = 0,04$) (Tab. 2.14).

Tabella 2.14. Carica virale di JCV dei pazienti affetti da SMRR con un numero di infusione di natalizumab pari a 0 (t0: baseline), tra 4 e 12 (< 12 mesi) e > 12 (> 12 mesi)

	Pz N° Totale	N° Pz JCV DNA +†	N° Pz JCV DNA -†	Urina		Plasma		PBMC	
				JCV+/ JCV-	log10 gEq/mL (range)§	JCV+/ JCV-	log10 gEq/mL (range)§	JCV+/ JCV-	log10 gEq/10 ⁶ c (range)§
Totale t0	22	8	14	4/18	4,38 (3,48-4,58)	3/19	2,84 (2,70-3,20)	3/19	2,07 (1,95-3,72)
Totale < 12 mesi	30	8	22	14/45	5,33 (2-6,04)	3/60	1,86 (1,61-2,69)	4/59	1,53 (1-2,66)
Totale > 12 mesi	27	14	13	8/40	5,11 (2,94-6,67)	9/47	3,01 (1,52-4,72)	6/50	2,39 (1,48-4,11)
RR (IC 95%) p value**					$p > 0,05$		1,71 (1,61-2,52) $p = 0,04$		$p > 0,05$

§I dati sono stati espressi come copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale per millilitro (gEq/ml) per i campioni di plasma e di urina, e come copie di gEq di DNA virale su 10⁶ cellule (gEq/10⁶c). †Per N° Pz JCV DNA + e N° Pz JCV DNA - si intende il numero di pazienti nei quali è stata riscontrata la presenza o meno di DNA di JCV nei campioni di plasma e/o PBMC e/o urine. Questi due raggruppamenti di pazienti saranno identificati rispettivamente come viremici/virurici (VIR) o non-viremici/virurici (NO VIR) durante le indagini immunologiche condotte esclusivamente nella coorte dei pazienti affetti da SMRR trattata con natalizumab (Coorte 2). ** Il rischio relativo (RR) con intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) statisticamente significativo per p value < 0,05 mediante il test del χ^2 .

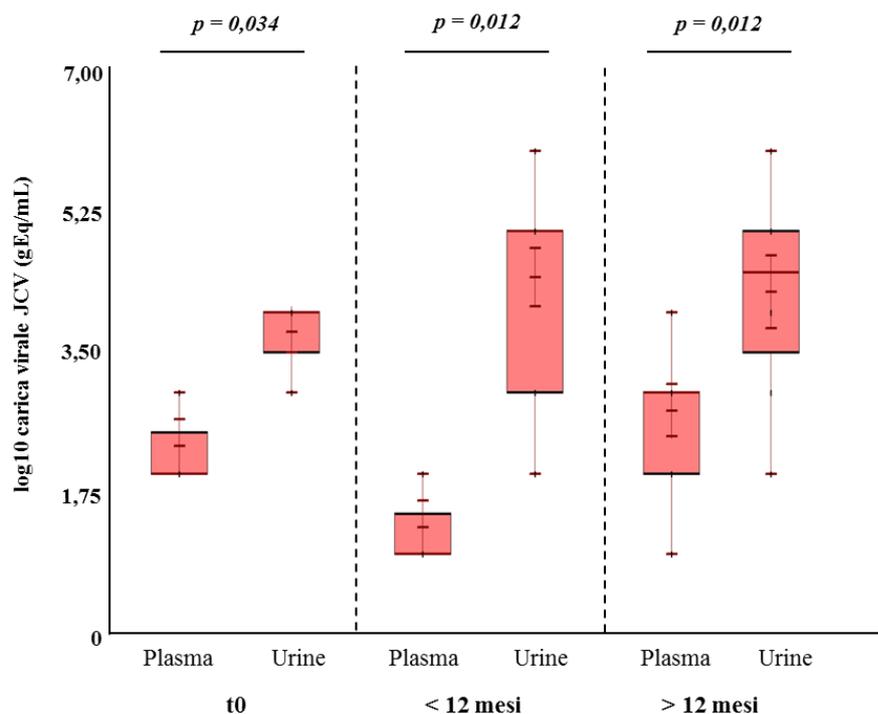


Figura 2.5. Confronto tra i valori di viremia e viruria da JC (espressi in log₁₀ gEq/ml) nei 22 pazienti affetti da SMRR con un numero di infusioni di natalizumab pari a 0 (t₀), nei 30 pazienti con un numero di infusioni di natalizumab compreso tra 4 e 12 e nei 27 pazienti con un numero di infusioni superiore a 12. I valori di viremia rilevati sono sempre significativamente più bassi rispetto ai valori di viruria in ogni gruppo di pazienti analizzato. L'analisi statistica è stata eseguita mediante test non parametrici e la significatività fissata per p value < 0,05.

3.2.6 Analisi immuno-fenotipica e d'immuno-attivazione e valutazione dell'espressione di membrana dell' $\alpha 4$ -integrina (CD49d) nell'assetto linfocitario dei pazienti affetti da SMRR trattati con natalizumab (Coorte 2)

Al fine di indagare le alterazioni immunologiche indotte dal natalizumab nei pazienti affetti da SMRR nel primo anno di trattamento (< 12 mesi) e dopo un numero di infusioni superiore a 12 (> 12 mesi), sono state quantificate le varie sottopopolazioni di linfociti T CD4⁺ e T CD8⁺ e ne è stata misurata l'immuno-attivazione attraverso la determinazione della percentuale di cellule che presentano i marcatori HLA-DR e CD38. Tali valori sono stati quindi confrontati con i dati ottenuti al *baseline* (t₀) da pazienti affetti da SMRR ma non in trattamento con natalizumab.

Per l'indagine immuno-fenotipica e d'immuno-attivazione e per la valutazione dell'espressione dell' $\alpha 4$ -integrina (CD49d) sulla membrana cellulare delle varie sottopopolazioni linfocitarie isolate sono stati analizzati 22, 63 e 56 campioni di sangue intero in eparina prelevati rispettivamente da:

- 22 pazienti affetti da SMRR arruolati al *baseline* (t₀) e non in trattamento con natalizumab;
- 30 pazienti affetti da SMRR con un numero medio di infusioni compreso tra 4 e 12 (< 12 mesi);
- 27 pazienti affetti da SMRR con un numero medio di infusioni > 12 (> 12 mesi).

Inoltre i pazienti SMRR di ogni coorte sono stati ulteriormente suddivisi in *viremici/virurici* (VIR) e *non-viremici e non virurici* (NO VIR) in base alla presenza o meno di DNA di JCV nei campioni di plasma e/o PBMC e/o urine, ricercato mediante la metodica di q-PCR.

L'indagine immuno-fenotipica è stata condotta mediante citofluorimetria in seguito a marcatura specifica per CD27 e CD45RO. Nella Figura 2.6 è riportato un esempio della visualizzazione in citofluorimetria delle diverse sottopopolazioni linfocitarie, identificabili mediante la presenza e/o assenza sulla membrana linfocitaria di questi due importanti marcatori dello stadio di differenziazione dei linfociti T CD4+ e T CD8+.

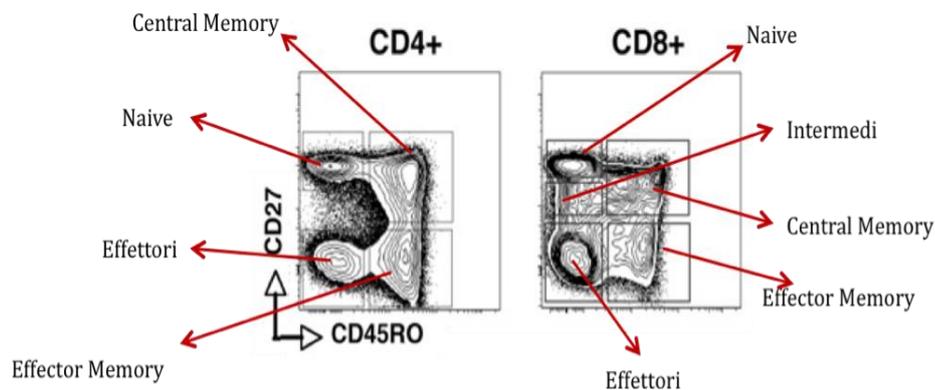


Figura 2.6 Visualizzazione citofluorimetrica dei marcatori di superficie CD27 e CD45RO per la definizione delle sottopopolazioni dei linfociti T CD4 e CD8. In seguito alla marcatura con CD27 e CD45RO, le cellule T CD4+ e CD8+ naïve sono CD27+/CD45RO-; le cellule CD4+ e CD8+ central memory sono CD27+/CD45RO+; le cellule CD4+ e CD8+ effector memory sono CD27-/CD45RO+ ed infine quelle effettori sono CD27-/CD45RO-.

Dall'indagine immuno-fenotipica delle sottopopolazione dei linfociti T CD4+ e TCD8+ ritrovate nelle 2 coorti di pazienti SMRR e trattati rispettivamente con meno di 12 infusioni (< 12 mesi) e con più di 12 (> 12 mesi) infusioni di natalizumab rispetto a quelle ritrovate al baseline (t0), non sono emerse differenze statisticamente significative tra i pazienti viremici e/o virurici e quelli nè viremici e nè virurici ($p > 0,05$).

Anche l'analisi d'immuno-attivazione è stata condotta mediante citofluorimetria in seguito a marcatura specifica per CD38 e HLA-DR, i due principali marcatori di membrana dell'immuno-attivazione linfocitaria. Dai dati presenti in letteratura è noto che i pazienti affetti da SM presentano livelli di immuno-attivazione maggiori rispetto a quelli presenti negli individui sani, e tale dato è ragionevolmente coerente con la patogenesi della SM [Gandhi et al., 2009; Kasper and Shoemaker, 2010; Duddy et al., 2007]. Solo per questo tipo di indagine è stata condotta un confronto tra i 19 individui sani arruolati come coorte di controllo (10 donne e 9 uomini; età mediana: 35, range: 25-47), i 30 pazienti affetti da SMRR con un numero medio di infusioni compreso tra 4 e 12 (< 12

mesi) ed i 27 pazienti affetti da SMRR con un numero medio di infusioni > 12 (> 12 mesi). Da tale confronto è emerso che l'immuno-attivazione è significativamente più elevata nei linfociti T CD4+ di entrambe le coorti di pazienti considerate rispetto a quanto osservato per i linfociti T CD4+ della coorte di controllo.

Nella Figura 2.7 si possono osservare in ordinata i valori di CD38+/HLA-DR dei linfociti T CD4+ e CD8+ rispettivamente, mentre sull'ascissa sono state riportate le tre popolazioni poste a confronto (pazienti con SMRR trattati con natalizumab da <12 mesi, pazienti con SMRR trattati da > 12 mesi e pazienti di controllo).

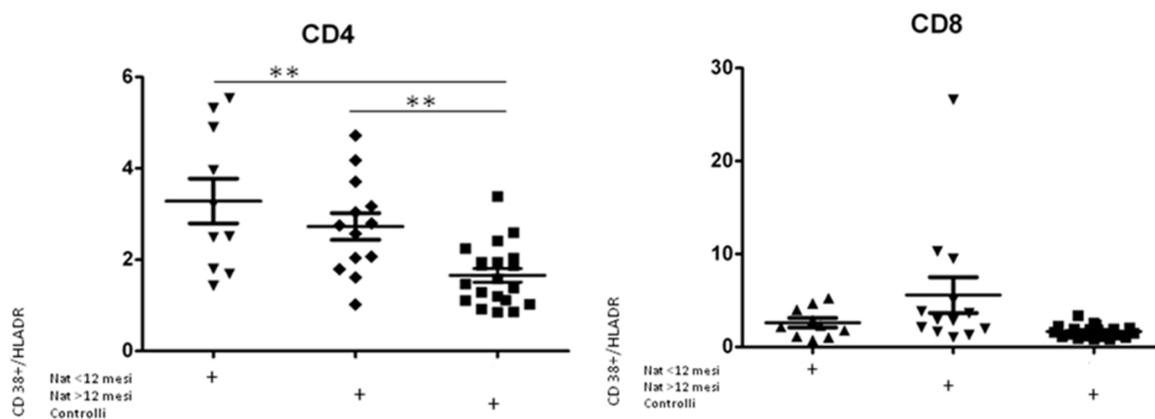


Figura 2.7 Confronto dei marker CD38/HLA-DR di immunoattivazione (in ordinata) delle popolazioni linfocitarie CD4 e CD8 nelle tre popolazioni di individui poste a confronto. *Nat < 12 mesi*: pazienti con SMRR trattati con natalizumab da <12 mesi; *Nat > 12 mesi*: pazienti con SMRR trattati con natalizumab da > 12 mesi; *Controlli*: coorte di 19 individui sani (10 donne e 9 uomini; età mediana: 35, range: 25-47).

Inoltre confrontando lo stato di immuno-attivazione dei linfociti T CD4+ e CD8+ dei pazienti affetti da SMRR che presentavano viremia e/o viruria da JCV rispetto a quelli nè viremici e nè virurici inclusi nelle 3 coorti considerate, è stato osservato un aumento dei linfociti T CD4+ CD38-/HLA-DR+ tra i pazienti non viremici e non virurici rispetto a quelli viremici e/o virurici ($p = 0,0033$) solo nella coorte dei pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab da < 12 mesi (Fig. 2.8).

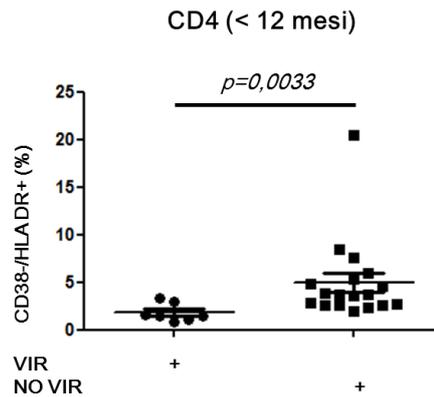


Figura 2.8 Confronto della presenza dei marker di immunoattivazione CD38/HLA-DR nella popolazione linfocitaria CD4+ dei pazienti viremici e/o virurici vs i non viremici e non virurici trattati con natalizumab da <12 mesi: in tale coorte, è stato osservato un aumento dei linfociti T CD4+ CD38-/HLA-DR+ tra i pazienti non viremici e/o virurici rispetto a quelli nè viremici nè virurici ($p = 0,0033$).

Infine sempre nelle 3 coorti sopraindicate, è stata studiata l'espressione del CD49d nelle varie sottopopolazioni di linfociti T CD4+ e TCD8+: CD4 naïve, CD4 central memory, CD4 effector memory, CD4 effettori, CD8 naïve, CD8 central memory, CD8 effector memory, CD8 intermedi, CD8 effettori. Il CD49d o $\alpha 4$ -integrina, rappresenta il bersaglio specifico dell'anticorpo monoclonale natalizumab, il quale agisce arrestando il processo infiammatorio a livello del SNC, caratteristico nei pazienti di SM, mediante il blocco della diapedesi dei linfociti T CD4+ e CD8+ attivati verso i loci d'infiammazione. Tale diapedesi linfocitaria è mediata dall'interazione dell' $\alpha 4$ -integrina, presente sulla membrana dei linfociti, con le molecole di adesione cellulare VCAM-1, presenti sull'endotelio vascolare cerebrale.

Per ognuna di queste sottopopolazioni linfocitarie è stata valutata l'espressione del marcatore CD49d mediante il Mean Fluorescence Intensity (MFI), ovvero l'intensità media di fluorescenza: tale valore è tanto maggiore quanto più elevata è l'espressione del marcatore stesso sulla membrana della popolazione cellulare studiata.

Dall'analisi dei valori di MFI ottenuti dalle varie sottopopolazioni linfocitarie in seguito a marcatura con anticorpi anti-CD49d, è stato possibile osservare una riduzione significativa dell'espressione dell' $\alpha 4$ -integrina nei linfociti T CD4 naïve ($p = 0,043$), CD4 central memory ($p = 0,036$) e CD4 effector memory ($p = 0,012$) dei pazienti affetti da SMRR viremici e/o virurici per JCV rispetto a quella dei pazienti nè viremici nè virurici durante il primo anno di trattamento con natalizumab (Fig. 2.9). Infine, sempre nei pazienti affetti da SMRR e con viremia e/o viruria da JCV, è stata osservata una riduzione significativa dell'espressione del marcatore CD49d nei linfociti T CD8 effettori ($p = 0,043$) nel primo anno di trattamento con natalizumab (< 12 mesi) (Fig. 2.10).

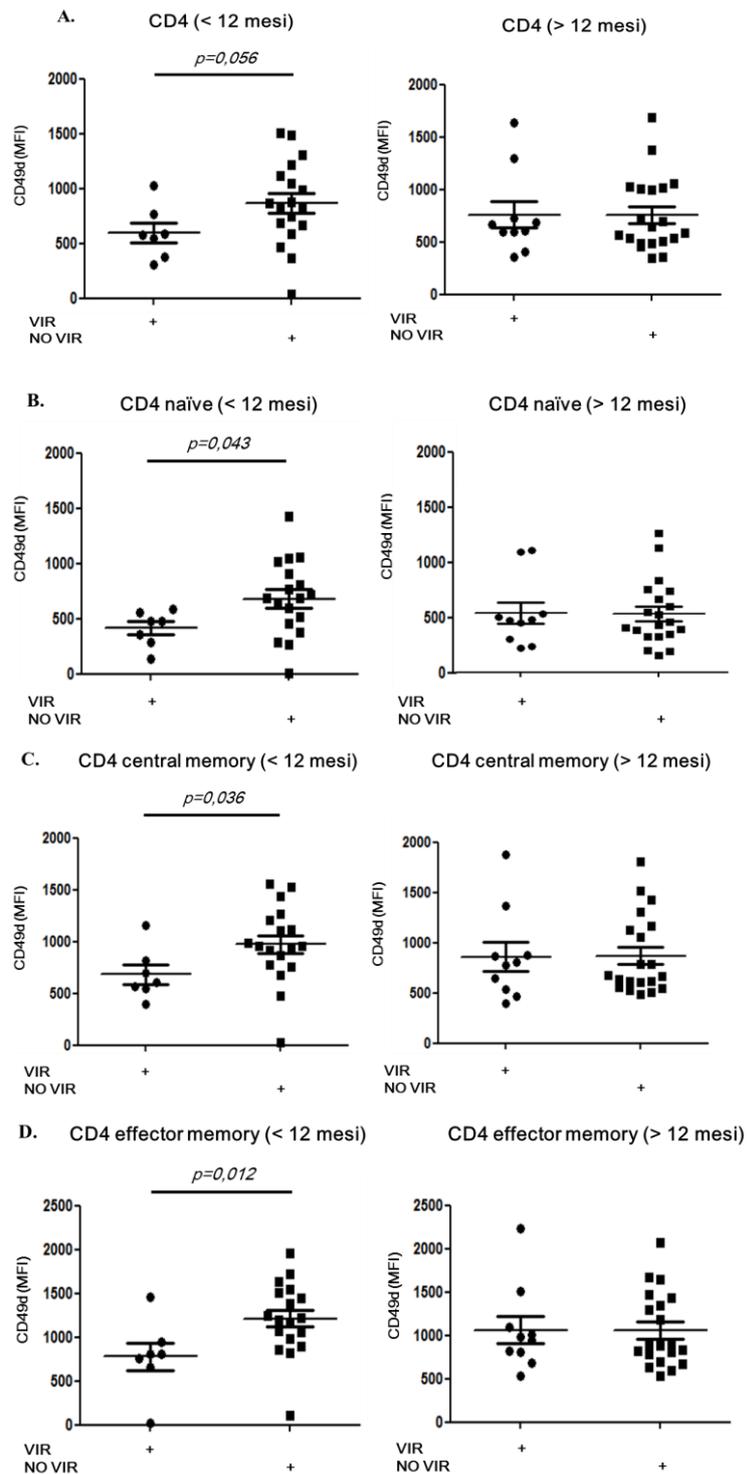


Figura 2.9. Confronto dei valori di MFI ottenuti dalle varie sub-popolazioni linfocitarie CD4+ in seguito a marcatura con anticorpi anti-CD49d ($\alpha 4$ -integrina) nei pazienti viremici e/o virurici vs quelli non viremici e non virurici con SMRR trattati con natalizumab da <12 mesi e da > 12 mesi. Dall'analisi dei valori di MFI ottenuti dalle varie sottopopolazioni linfocitarie in seguito a marcatura con anticorpi anti-CD49d è stato possibile osservare una riduzione significativa dell'espressione dell' $\alpha 4$ -integrina nei linfociti T CD4 naïve ($p = 0,043$), CD4 central memory ($p = 0,036$) e CD4 effector memory ($p = 0,012$) dei pazienti affetti da SMRR viremici e/o virurici per JC rispetto a quella osservata nei linfociti dei pazienti non viremici e non virurici durante il primo anno di trattamento con natalizumab.

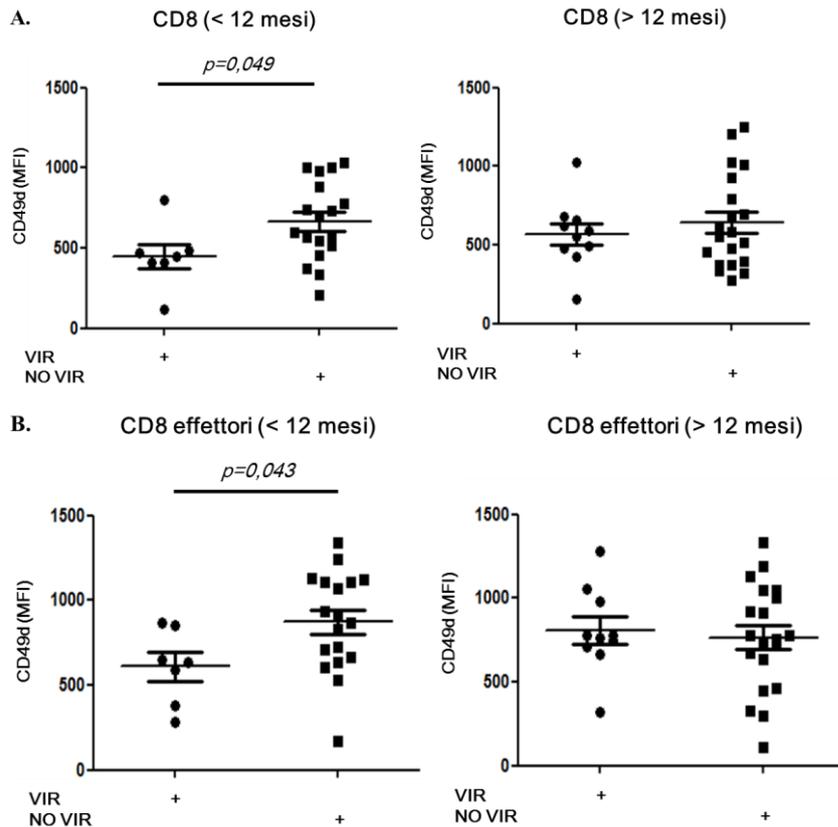


Figura 2.10. Confronto dei valori di MFI ottenuti nelle varie sub-popolazioni linfocitarie CD8+ in seguito a marcatura con anticorpi anti-CD49d ($\alpha 4$ -integrina) nei pazienti viremici e/o virurici vs quelli non viremici e non virurici delle coorti di pazienti con SMRR trattati con natalizumab da <12 mesi e da > 12 mesi. Dall'analisi dei valori di MFI ottenuti nelle varie sottopopolazioni linfocitarie CD8+ in seguito a marcatura con anticorpi anti-CD49d, è stata osservata una riduzione significativa dell'espressione del marcatore CD49d nei linfociti T CD8 effettori ($p = 0,043$) dei pazienti affetti da SMRR con viremia e/o viruria da JC, nel primo anno di trattamento con natalizumab (< 12 mesi).

3.2.7 Analisi di sequenza delle regioni genomiche NCCR e VP1 di JCV nei campioni biologici positivi al DNA virale ottenuti da pazienti affetti da SMRR trattati con natalizumab (Coorte 2)

L'analisi della regione genomica della NCCR di JCV nei campioni biologici positivi per il DNA virale è stata condotta mediante sequenziamento diretto dei prodotti di PCR per la regione virale d'interesse. Nella coorte dei paziente affetti da SMRR e trattati con natalizumab da meno di 12 mesi (< 12 mesi), è stata riscontrata un'organizzazione strutturale simile a quella dell'archetipo CY nel 68% dei campioni biologici analizzati, mentre nel restante 32% sono state individuate sequenze della NCCR riarrangiate e con caratteristiche mutazioni di singoli nucleotidi. In 4 urine positive al DNA di JCV prelevate rispettivamente a t0, t1, t2 e t3 da un unico paziente affetto da SMRR e STRATIFY JCV® positivo nel primo anno di trattamento con natalizumab, è stata ritrovata una sequenza della NCCR caratterizzata da una duplicazione del sito di legame per il fattore di

trascrizione cellulare NF-1 nel box F con perdita della transizione nucleotidica G→A nella posizione 217 del stesso box. Tale mutazione nucleotidica è stata ritrovata in tutte le sequenze analizzate che mostravano struttura archetipo. Inoltre sia nel campione di plasma che in quello di PBMC prelevati da un paziente affetto da SMRR e STRATIFY JCV[®] negativo dopo un anno di trattamento con natalizumab, è stata ritrovata una transizione nucleotidica A→G nella posizione 208 del box F con interessamento del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1. Infine in 4 campioni di PBMC, appartenenti a 4 diversi pazienti con SMRR e STRATIFY JCV[®] positivi dopo un anno di trattamento con natalizumab, sono state ritrovate rispettivamente le seguenti organizzazioni strutturali della NCCR:

- 1 sequenza con un'organizzazione della NCCR archetipo e le seguenti due mutazioni puntiformi caratteristiche: la trasversione T→G all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B (in posizione 37 nel box A) e la transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 del box F.

- 1 sequenza con un'organizzazione simile alla NCCR archetipo ma con la delezione del box D e con le due mutazioni nucleotidiche appena descritte.

- 2 sequenze della NCCR di tipo IIR, caratterizzate dalla delezione del box B con trasversione T→G all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B, dalla duplicazione del box C e dalla presenza del box D. (Tab. 2.15 e Fig. 2.11).

Infine, nella coorte dei paziente affetti da SMRR e trattati con natalizumab da più di 12 mesi (> 12 mesi), è stata riscontrata un'organizzazione strutturale simile a quella dell'archetipo CY in tutti i campioni biologici analizzati, ad eccezione di una sequenza che presentava un'organizzazione della NCCR archetipo ma era caratterizzata dalla presenza della trasversione T→G all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B (in posizione 37 nel box A) e dalla presenza della transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 del box F (Tab. 2.16 e Fig. 2.12).

Tabella 2.15 Analisi di sequenza della NCCR di JCV in campioni biologici positivi al DNA virale ottenuti da pazienti affetti da SMRR trattati con natalizumab da meno di 12 mesi (< 12 mesi)

	N° JCV+	CY archetipo* (%) (IIS) [§]	Caratteristiche delle sequenze di NCCR riarrangiate (%)				(IIR) [§]
			37 T → G 217 G → A** (IIS) [§]	208 A → G** (IIS) [§]	duplicazione NF-1 in boxF (IIS) [§]	37 T → G, 217 G → A** delezione boxD (IIR) [§]	
<i>Urina</i>	18	14 (78%)	0	0	4 (22%)	0	0
<i>Plasma</i>	6	5 (83%)	0	1 (17%)	0	0	0
<i>PBMC</i>	7	2 (29%)	1 (14%)	1 (14%)	0	1 (14%)	2 (29%)
Totale (%)	31	21 (68%)	1 (3%)	2 (6%)	4 (14%)	1 (3%)	2 (6%)

*Le sequenze archetipo isolate presentano tutte un esiguo numero di mutazioni puntiformi (media di 2 mutazioni puntiformi a sequenza) che non interessano siti di legame per fattori di trascrizione cellulare. È inoltre presente la transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 nel box F.

**La trasversione T→G nella posizione nucleotidica 37 nel box A interessa il sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B e le transizioni A→G e G→A rispettivamente nelle posizioni nucleotidiche 208 e 217 nel box F interessano il sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1. La numerazione nucleotidica considerata è quella del ceppo non patogeno CY di JCV [Yogo et al., 1990].

[§]: Classificazione della NCCR di Jensen and Major (2001).

Tabella 2.16 Analisi di sequenza della NCCR di JCV in campioni biologici positivi al DNA virale ottenuti da pazienti affetti da SMRR trattati con natalizumab con un numero di infusioni > 12 (> 12 mesi)

	N° JCV+	CY archetipo* (%) (IIS) [§]	37 T → G e 217 G → A** (IIS) [§]
<i>Urina</i>	8	8 (100%)	0
<i>Plasma</i>	9	9 (100%)	0
<i>PBMC</i>	6	5 (83%)	1 (17%)
Totale (%)	23	22 (95,5%)	1 (4,5%)

*Le sequenze archetipo isolate presentano tutte un esiguo numero di mutazioni puntiformi (media di 2 mutazioni puntiformi a sequenza) che non interessano siti di legame per fattori di trascrizione cellulare. È inoltre presente la transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 nel box F.

**La trasversione T→G nella posizione nucleotidica 37 nel box A interessa il sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B e la transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 nel box F interessa il sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1. La numerazione nucleotidica considerata è quella del ceppo non patogeno CY di JCV [Yogo et al., 1990].

[§]: Classificazione della NCCR di Jensen and Major (2001).

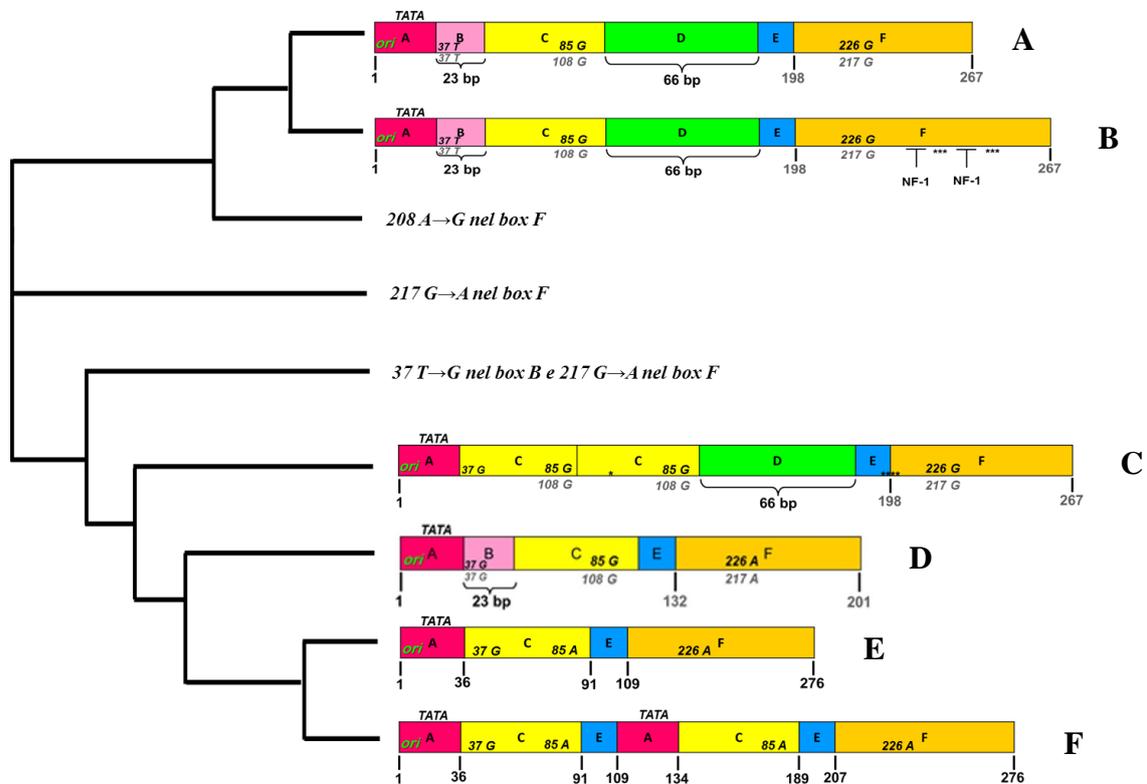


Figure 2.11 Sequenze della NCCR di JCV ritrovate nei campioni biologici della coorte di pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab (*Coorte2*). La sequenze nucleotidica della NCCR di JCV è mostrata dal nucleo dell'origine di replicazione del DNA (ori) fino al codone di inizio della gene leader (*agno-proteina*) dei geni virali precoci. In **A**, la numerazione nucleotidica della sequenza archetipo CY, isolata da Yogo e colleghi nel 1990, è riportati in grassetto grigio. In **F**, la numerazione nucleotidica si basa sulla sequenza della NCCR della variante Mad1 PML-associata e isolata da Frisque e colleghi nel 1984, e il numero dei nucleotidi sono indicati in grassetto nero. In **B** la sequenza della NCCR caratterizzata da una duplicazione del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1 nel box F, con perdita della transizione nucleotidica G→A nella posizione 217 del stesso box, ritrovata nei 4 campioni di urina positivi per il DNA di JCV, prelevate rispettivamente a t0, t1, t2 e t3 da un unico paziente affetto da SMRR e STRATIFY JCV® positivo nel primo anno di trattamento con natalizumab. In **C** è riportate la sequenza della NCCR riarrangiata (del tipo IIR secondo la classificazione di Jensen and Major del 2001), caratterizzata dalla delezione del box B con trasversione T→G all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B, dalla duplicazione del box C e dalla presenza del box D e isolata dai campioni di PBMC di 2 pazienti con SMRR e STRATIFY JCV® positivi dopo un anno di trattamento con natalizumab. In **D** è riportata la sequenza con un'organizzazione della NCCR archetipo ma con la delezione del box D e le seguenti due mutazioni puntiformi caratteristiche: la trasversione T→G all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B (in posizione 37 nel box A) e la transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 del box F. Infine in **E** è riportata la sequenza modello IS costituita da un'unica sequenza da 98 bp (Jensen and Major, 2001). Il cladogramma è stato realizzato mediante software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

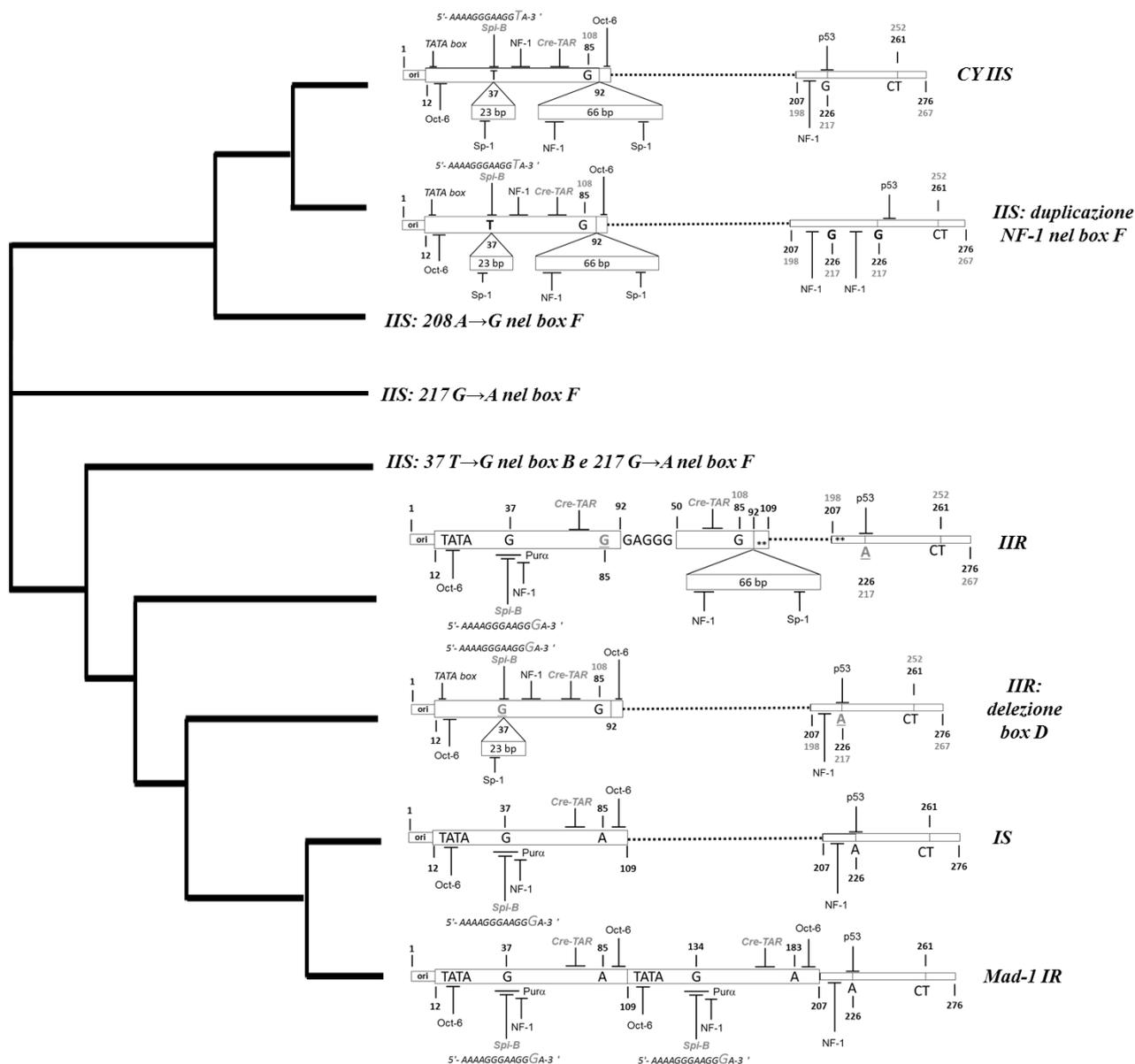
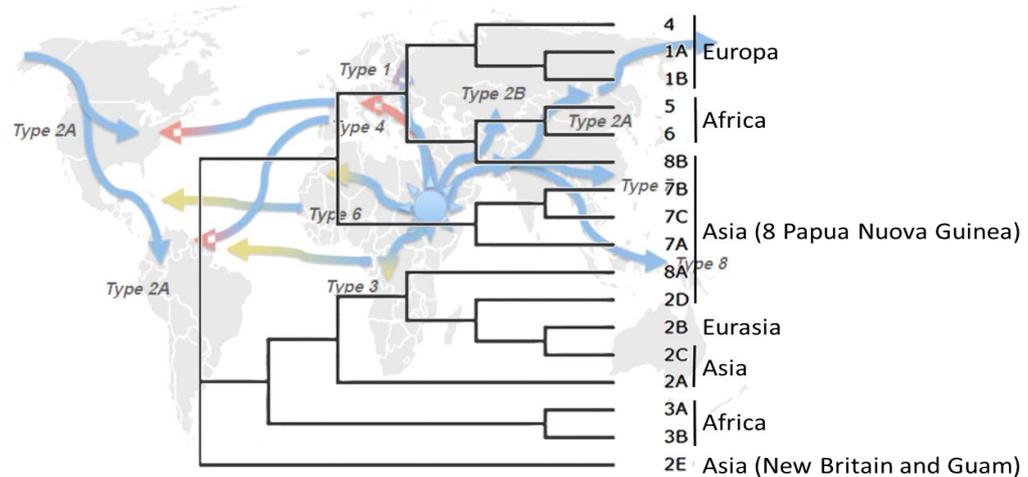


Figure 2.12 Sequenze della NCCR di JCV ritrovate nei campioni biologici della coorte di pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab (Coorte 2) secondo la classificazione di Jensen and Major (2001). La sequenze nucleotidica della NCCR di JCV è mostrata dal nucleo dell'origine di replicazione del DNA (ori) fino al codone di inizio della gene leader (*agno-proteina*) dei geni virali precoci. *CY IIS*: sequenza archetipo CY, isolata da Yogo e colleghi nel 1990; *IIS: duplicazione NF-1 nel box F*: sequenza della NCCR caratterizzata da una duplicazione del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1 nel box F, con perdita della transizione nucleotidica G→A nella posizione 217 del stesso box; *IIR*: sequenza della NCCR riarrangiata, caratterizzata dalla delezione del box B con trasversione T→G all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B, dalla duplicazione del box C e dalla presenza del box D e isolata da campioni di PBMC di 2 pazienti con SMRR e STRATIFY JCV® positivi dopo un anno di trattamento con natalizumab. *IIR: delezione box D* è riportata la sequenza con un'organizzazione della NCCR archetipo ma con la delezione del box D e le seguenti due mutazioni puntiformi caratteristiche: la trasversione T→G all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B (in posizione 37 nel box A) e la transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 del box F. *IS*: sequenza modello costituita da un'unica sequenza da 98 bp. *Mad-1 IR*: sequenza della NCCR della variante Mad1 PML-associata e isolata da Frisque e colleghi nel 1984. Il cladogramma è stato realizzato mediante software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Per quanto riguarda l'indagine genotipica, condotta mediante analisi della sequenza della VP1 di JCV, nella coorte dei paziente affetti da SMRR e trattati con natalizumab da meno di 12 mesi (< 12 mesi) sono stati osservati i genotipi 1A e 1B in 4/10 campioni di urine e in 5/10 campioni di plasma positivi al DNA di JCV. Inoltre nelle urine del paziente STRATIFY JCV® positivo e con riarrangiamenti della NCCR, è stata osservata una co-infezione da parte dei genotipi 1A e 2C, mentre nel plasma dello stesso paziente è stato ritrovato soltanto il genotipo 1A. Nella coorte dei paziente affetti da SMRR e trattati con natalizumab da più di 12 mesi (> 12 mesi) sono stati sempre ritrovati i genotipi 1A, 1B ed il genotipo 4 nelle urine e/o nel plasma dei pazienti positivi al DNA di JCV (Fig. 2.13).



JCV Genotipo	SM < 12 mesi (t0, t1-t3)	SM > 12 mesi (t4-t5)
1A (%)	4 (40)	4 (31)
1B (%)	5 (50)	6 (46)
4 (%)	-	3 (23)
Co-infezione (%)	1 (10)	-
Totale (JCV+)	10	13

Figure 2.13 Genotipi di JCV ritrovati nelle coorti di pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab da meno di 12 mesi (< 12 mesi) e da più di 12 mesi (> 12 mesi). I genotipi 1A, 1B e 4 ritrovati nei campioni biologici analizzati, sono quelli maggiormente diffusi nel continente Europeo ed in Italia. In questo studio non è stata riscontrata nessuna associazione significativa tra i genotipi ritrovati e il trattamento della SMRR con natalizumab. Il cladogramma è stato realizzato mediante software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.3 Pazienti affetti da MRIC e trattati con anti-TNF- α (Coorte 3)

In questo studio è stato dinamicamente arruolato un totale di 58 pazienti affetti da malattie reumatiche infiammatorie croniche (MRIC): in particolare, sono stati studiati 22 pazienti affetti da artrite reumatoide (AR), 11 da spondilite anchilosante (SA) e 25 da artrite psoriasica (PsA). Dopo aver ottenuto il consenso informato, 56 campioni di urine e 58 campioni di sangue intero in EDTA sono stati prelevati prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF- α (t0: *baseline*). Successivamente, 42 campioni di urine e 46 campioni di sangue intero in EDTA sono stati prelevati dopo 4 mesi di trattamento con anti-TNF- α (t1), infine, 22 campioni di urine e 22 campioni di sangue intero in EDTA sono stati raccolti dopo 8 mesi di trattamento con FB (t2). Questi pazienti, trattati esclusivamente con farmaci anti-reumatici *disease modifying* (DMARDs) e/o glucocorticoidi, sono stati inclusi nel programma terapeutico con FB in quanto non più responsivi al trattamento esclusivo con DMARDs. Tuttavia l'uso concomitante di tali farmaci è stato comunque previsto durante il trattamento con anti-TNF- α . Dopo aver ottenuto il consenso informato, i dati anagrafici e clinici (sesso, età, diagnosi, piano terapeutico ed indici di attività della malattia) sono stati raccolti a t0, prima dell'inizio della terapia con biologici, ed aggiornati durante il follow-up (Tab. 2.17a e 2.17b).

Tabella 2.17a Dati clinici dei pazienti affetti da MRIC raccolti ai tempi previsti dal protocollo di follow-up

Parametri clinici	t0	t1	t2	p value
M/F (n)	20/38	15/32	9/13	
Età in anni (mediana/range)	53/19-79			
Diagnosi: AP/AR/SA	25/22/11	22/17/8	11/7/4	
Durata della Malattia in mesi (mediana/range)	72/9-480			
PCR (mg/dl; mediana/25°-75° percentile)	0.24/0.07-0.85	0.23/0.08-0.62	0.13/0.04-0.29	
VES (mm/h; mediana/25°-75° percentile)	15.00/10-29	14.00/5-22	9.00/4.5-19	0.026
HAQ (0-3; media/DS)	1.09 ± 0.76	0.83± 0.72	1.01 ± 1.67	
DAS28-VES (media/DS)*	4.05 ± 1.12	3.17± 1.28	2.88 ± 1.12	0.005
DAS28-PCR (media/DS)*	3.53± 1.0	2.82± 1.09	2.64± 0.97	0.020
VAS dell'Attività della Malattia per il Medico (0-100 mm, VAS; media/DS)*	46.4± 18.7	29.51± 21.92	22.14 ± 20.4	< 0,0001
VAS dell'Attività della Malattia per il Paziente (0-100 mm, VAS; media/DS)*	55.9± 25.8	41.52 ± 24.67	31.3 ± 24.8	< 0,0001
BASDAI (1-10; media/DS)**	5.53 ± 2.8	3.95 ± 2.92	4.60 ± 4.31	0.026
DMARDs Concomitanti (n/%)	30/55.9	21/44.7	8/36.4	
DMARDs e glucocorticoidi concomitanti (n/%)	11/18.6	7/14.0	3/13.6	
Glucocorticoidi concomitanti (n/%)	8/11.9	1/2.2	2/9.0	
Nessun trattamento concomitante (n/%)	9/13.6	18/39.1	9/41.0	

Tabella 2.17b Dati clinici al baseline (t0) dei pazienti affetti da artrite psoriasica (PsA), artrite reumatoide (AR) e spondilite anchilosante (SA)

Diagnosi	PsA	AR	SA
N° totale pazienti	25	22	11
M/F (n)	12/13	2/20	6/5
Età in anni (mediana/range)	52/38-72	56/19-79	47/25-62
Durata della Malattia in mesi (mediana/range)	72/24-480	96/16-372	96/9-420
PCR (mg/dl; mediana/25°-75° percentile)	0.18/0-0.52	0.45/0.07-1.20	0.80/0.2-3.14
VES (mm/h; mediana/25°-75° percentile)	13/8-21	17/14-32	29/8.3-38
HAQ (0-3; media/DS)	0.88 ± 0.68	1.39 ± 0.79	0.97 ± 0.75
DAS28-VES (media/DS)*	3.71 ± 1.11	4.43 ± 1.03	/
DAS28-PCR (media/DS)*	3.28 ± 0.85	3.81 ± 1.12	/
VAS dell'Attività della Malattia per il Medico (0-100 mm, VAS; media/DS)*	42.84 ± 19.07	45.73 ± 20.34	55.82 ± 10.99
VAS dell'Attività della Malattia per il Paziente (0-100 mm, VAS; media/DS)*	50.00 ± 26.18	56.73 ± 26.44	67.45 ± 21.24
BASDAI (1-10; media/DS)**	5.29 ± 2.60	/	6.10 ± 3.34
DMARDs Concomitanti (n/%)	15/60	12/54	3/27
DMARDs e glucocorticoidi concomitanti (n/%)	2/8	8/36	1/9.1
Glucocorticoidi concomitanti (n/%)	5/20	1/5	2/18.2
Nessun trattamento concomitante (n/%)	3/12	1/5	5/45.7

PsA: artrite psoriasica; AR: artrite reumatoide; SA: spondilite anchilosante; PCR: proteina C reattiva; VES: velocità di sedimentazione eritrocitaria; HAQ: Health Assessment Questionnaire; DS: deviazione standard; DAS28: Disease Activity Score su 28 articolazioni; VAS: visual analogue scale; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; DMARDs: disease modifying anti-rheumatic drugs. *Solo per pazienti con PsA ed AR. **Solo per pazienti con PsA e SA.

Dai dati raccolti, è stato possibile osservare un miglioramento del quadro clinico dei pazienti caratterizzato da una significativa riduzione dei valori di alcuni parametri diagnostici correlati con lo stato d'infiammazione e la disabilità. In particolare, il valore mediano della velocità di eritrosedimentazione (VES) è diminuito significativamente da 15,00 mm/h a t0 fino a 9,00 mm/h a t2 ($p = 0,026$), così come i valori di *Visual Analogue Scale* (VAS) dell'attività della malattia secondo il paziente o secondo il medico ($p = 0,0001$). Infine, per i pazienti affetti da AR e PsA l'attività della malattia è stata valutata mediante il *Disease Activity Score* (DAS) calcolato sullo stato infiammatorio di 28 articolazioni in relazione ai valori di PCR (DAS28-PCR) e/o della VES (DAS28-VES), con punteggio crescente in base alla gravità della sintomatologia: la DAS28-PCR è diminuita da un valore medio di $3,53 \pm 1,0$ a t0 ad un valore di $2,64 \pm 0,97$ a t2 ($p = 0,020$) mentre la DAS28-VES è diminuita significativamente da $4,05 \pm 1,12$ a t0 ad un valore di $2,88 \pm 1,12$ a t2 ($p = 0,005$) (Tab. 2.17a). Invece sia per i pazienti affetti da SA che per quelli affetti da PsA, l'attività della malattia è stata valutata facendo riferimento al *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity*

Index (BASDAI), che va da un punteggio minimo di 0 (nessuna attività) ad un punteggio massimo di 10 (massima attività). Tale punteggio è diminuito da $5,53 \pm 2,8$ a t0 fino a $4,60 \pm 4,31$ a t3 ($p = 0,026$) (Tab. 2.17a).

3.3.1 *Ricerca del DNA di JCV e valutazione della carica virale tramite q-PCR in campioni biologici in pazienti affetti da malattie reumatiche infiammatorie croniche (MRIC) al baseline (t0) e dopo 4 e 8 mesi di trattamento con anti-TNF- α*

Prelievi di urina, plasma e PBMC ottenuti da sangue intero in EDTA, sono stati analizzati al baseline (t0: prima dell'inserimento nel programma terapeutico che prevede l'impiego di FB *target oriented* anti-TNF- α) in 22 pazienti affetti da AR, 11 pazienti affetti da SA e 25 pazienti affetti da PsA. Complessivamente a t0, 30/56 campioni di urina sono risultati positivi per il DNA di JCV, presente con un numero medio di copie di genomi equivalenti pari a $7,46 \log_{10}$ gEq/mL (range: 4,15-8,23): in particolare, tra i pazienti con AR è stato osservato un valore medio di viruria pari a $7,44 \log_{10}$ gEq/mL, mentre tra i pazienti affetti da SA e da PsA sono stati riscontrati valori medi di viruria pari a $7,60 \log_{10}$ gEq/mL e a $7,33 \log_{10}$ gEq/mL rispettivamente. Per quanto riguarda i campioni di plasma invece, su un totale di 58 prelievi, 5 (2 in 2 pazienti con AR, 1 in un paziente con SA e 2 in 2 pazienti con PsA) hanno mostrato viremia da JCV (valore medio: $4,60 \log_{10}$ gEq/mL, range: 4,38-4,74) (Tab. 2.18). Tutti i campioni di PBMC sono risultati negativi per il DNA di JCV a t0.

Dopo i primi 4 mesi di trattamento con anti-TNF- α (t1), su un totale di 47 pazienti arruolati (22 affetti da PsA, 17 da AR e 8 da SA), è stata rilevata viruria da JCV in 22/42 campioni di urina prelevati, con un valore medio stimato di $7,50 \log_{10}$ gEq/mL (range: 4,23-8,36). In particolare, tra i pazienti affetti da AR, il valore medio di viruria è stato pari a $7,60 \log_{10}$ gEq/mL, mentre nei pazienti affetti da PsA ed in quelli con SA tale valore era pari a $6,78 \log_{10}$ gEq/mL e $7,85 \log_{10}$ gEq/mL rispettivamente. Nel plasma invece, il DNA di JCV è stato ritrovato in 5/46 campioni prelevati (1 da 1 paziente con AR e 4 da 4 pazienti con PsA), il valore medio calcolato era pari a $4,96 \log_{10}$ gEq/mL (range: 4,41-5,27) (Tab. 2.18). Nei pazienti affetti da SA non è stata rilevata viremia. Il DNA di JCV è stato infine ritrovato in 3 campioni di PBMC isolati rispettivamente da 1 paziente affetto da AR, 1 paziente affetto da SA ed 1 paziente affetto da PsA con un numero medio di copie di genomi equivalenti pari a $3,47 \log_{10}$ gEq/ 10^6 cellule (dati non mostrati).

Infine a t2, dopo 8 mesi di trattamento con anti-TNF- α , il DNA di JCV è stato ritrovato in 13/22 campioni di urina raccolti da 22 pazienti affetti da MRIC, con un valore medio di viruria pari a $7,63 \log_{10}$ gEq/mL (range: 3,20-8,43); invece una viremia media pari a $4,79 \log_{10}$ gEq/mL è stata osservata in 4/22 pazienti, 3 affetti da AR ed 1 affetto da SA. Nessun paziente affetto da PsA ha mostrato viremia da JC in questa fase del trattamento con anti-TNF- α (Tab. 2.18). Nei PBMC, il

DNA di JCV è stato rilevato in 2/22 campioni isolati (1 da 1 paziente con AR e 1 da 1 paziente affetto da SA), con un valore medio di 3,17 gEq/10⁶cellule (dati non mostrati).

Tabella 2.18 Carica virale di JC nei campioni di plasma e di urina di pazienti affetti da MRIC e trattati con anti-TNF- α , il cui prelievo è stato eseguito al baseline (t0) e dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con FB

Patologia	PsA	AR	SA	MRIC
t0*				
<i>Plasma JCV+ ÷ JCV- (NP)</i>	2/23	2/20	1/10	5/53
<i>log10 gEq/mL (range)[§]</i>	4.57/4.51-4.62	4.60/4.38-4.74	4.61	4.60/4.38-4.74
<i>Urina JCV+ ÷ JCV- (NP)</i>	9/15 (1)	15/6 (1)	6/5	30/26 (2)
<i>log10 gEq/mL (range)[§]</i>	7.33/4.23-8.09	7.44/4.15-8.23	7.60/4.95-8.10	7.46/4.15-8.23
t1*				
<i>Plasma JCV+ ÷ JCV- (NP)</i>	4/17 (1)	1/16	0/8	5/41 (1)
<i>log10 gEq/mL (range)[§]</i>	4.91/4.41-5.27	5.10	/	4.96/4.41-5.27
<i>Urina JCV+ ÷ JCV- (NP)</i>	8/11 (3)	11/6	3/3 (2)	22/20 (5)
<i>log10 gEq/mL (range)[§]</i>	6.78/4.23-7.43	7.60/4.24-8.36	7.85/5.50-8.04	7.50/4.23-8.36
t2*				
<i>Plasma JCV+ ÷ JCV- (NP)</i>	0/11	3/4	1/3	4/18
<i>log10 gEq/mL (range)[§]</i>	/	4.91/4.36-5.20	3.87	4.79/3.87-5.20
<i>Urina JCV+ ÷ JCV- (NP)</i>	4/7	7/0	2/2	13/9
<i>log10 gEq/mL (range)[§]</i>	6.40/3.20-6.80	7.84/4.14-8.43	7.45/7.19-7.61	7.63/3.20-8.43

* Prelievi seriali di urina e plasma sono stati eseguiti a t0 (*baseline*: prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF- α) e dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α .

[§]I valori medi ed il range delle rispettive virurie e viremie sono stati espressi come log10 delle copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale millilitro (gEq/mL).

PsA: artrite psoriasica; AR: artrite reumatoide; SA: spondilite anchilosante; MRIC: malattie reumatiche infiammatorie croniche; NP: non pervenuti.

In conclusione, dall'analisi dell'andamento dei valori di viruria e viremia registrati ai vari tempi di campionatura in questa coorte, è stato possibile osservare una viruria persistente da JC durante tutto il follow-up e significativamente più elevata rispetto alla viremia ($p = 0,015$) (Fig. 2.14). Questi dati permettono di concludere che lo scenario infiammatorio determinato dalla MRIC, in associazione con la terapia biologica e/o convenzionale concomitante, favorisca prevalentemente la riattivazione di JCV a livello dell'epitelio dell'apparato urinario con conseguente rilascio dei virioni nell'urina. Al contrario, la viremia sembra non essere favorita, considerato l'esiguo numero di campioni di plasma positivi al DNA di JCV osservato in questi pazienti rispetto al numero di campioni di urina positivi al virus. Infatti da una analisi più dettagliata, mediante il test del χ^2 è stato

possibile stimare un rischio relativo di riattivazione di JCV a livello dell'epitelio renale in pazienti affetti da MRIC ed in trattamento con anti-TNF- α , rispetto alla positività al DNA di JCV nei campioni di plasma e di PBMC (RR=2,41, IC 95%: 1,73-3,37 con $p < 0,00001$).

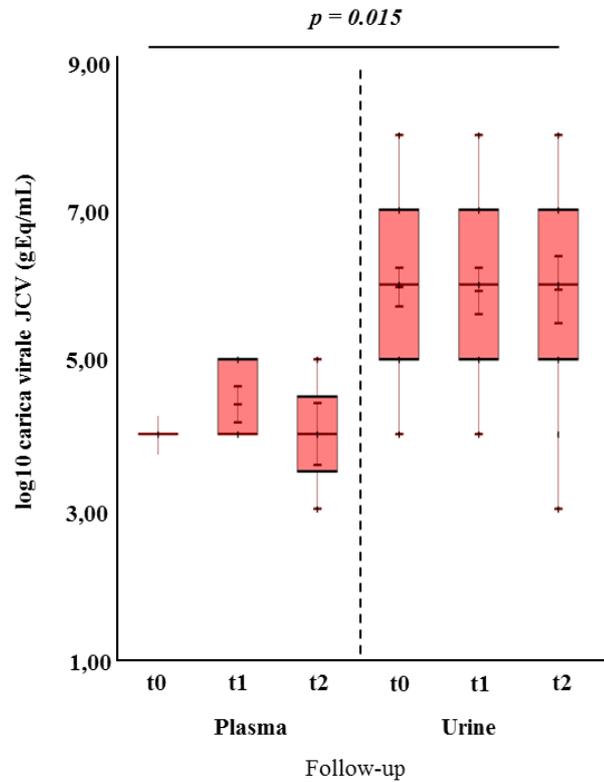


Figura 2.14. Confronto tra i valori di viremia e viruria da JC (espressi in log10 gEq/ml) in pazienti affetti da MRIC e trattati con anti-TNF- α per 8 mesi. Prelievi seriali di plasma e urina sono stati eseguiti a t0 (*baseline*: prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF- α) e dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α . Non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa tra le viremie da JC registrate ai vari tempi previsti dal follow-up. Infine, i valori di viremia si sono rilevati sempre significativamente più bassi rispetto ai valori di viruria ad ogni tempo ($p = 0,015$). L'analisi statistica è stata eseguita mediante test non parametrici e la significatività fissata per p value $< 0,05$.

3.3.2 *Ricerca del DNA di JCV e valutazione della carica virale tramite q-PCR nei campioni biologici di 22 pazienti affetti da MRIC prelevati al baseline (t0) e dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α (Coorte 3 follow-up < 12 mesi)*

Dai pazienti affetti da MRIC sopradescritti è stato possibile selezionare un coorte di 22 pazienti con un assetto completo di prelievi di sangue ed urina effettuati al baseline (t0: prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF- α) e dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α . La diagnosi di malattia e le caratteristiche anagrafiche e cliniche di questi 22 pazienti sono state raccolte nella Tabella 2.19.

Al baseline (t0: prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF- α), in questa coorte di 22 pazienti, 13 campioni di urina sono risultati positivi per il DNA di JCV, presente con un numero mediano di copie di genomi equivalenti pari a 7,17 log₁₀ gEq/mL (range: 4,23-8,23). Invece, tutti i campioni di plasma e PBMC ottenuti a t0 sono risultati negativi. Dopo i primi 4 mesi di trattamento con anti-TNF- α (t1), è stata rilevata una viruria da JC in 12/19 campioni, con un valore mediano stimato di 6,20 log₁₀ gEq/mL (range: 4,23-8,36) (Tab. 2.20). Nel plasma invece, il DNA di JCV è stato ritrovato in 5/20 campioni (1 da 1 paziente con AR e 4 da 4 pazienti con PsA) ed il valore mediano della viremia è risultato pari a 4,83 log₁₀ gEq/mL (range: 4,41-5,28). Nei pazienti affetti da SA, non è stata rilevata viruria da JC dopo 4 mesi di trattamento con anti-TNF- α (Tab. 2.20). Inoltre, il DNA virale non è stato ritrovato in nessuno dei campioni di PBMC isolati a t1. Infine a t2 (dopo 8 mesi di trattamento con anti-TNF- α), il DNA di JCV è stato ritrovato in 13/22 campioni di urina, con un valore mediano di viruria pari a 6,80 log₁₀ gEq/mL (range: 3,20-8,43); invece una viremia mediana pari a 4,57 log₁₀ gEq/mL è stata osservata in 4/22 pazienti, 3 affetti da AR ed 1 affetto da SA, nessun paziente affetto da PsA ha mostrato viremia da JC in questa fase del trattamento con anti-TNF- α . Nei PBMC infine, il DNA di JCV è stato rilevato in 2/22 campioni isolati (1 da 1 paziente con AR e 1 da 1 paziente affetto da SA), con un valore medio di 2,89 gEq/10⁶cellule (Tab. 2.20).

In conclusione, dall'analisi dell'andamento dei valori di viruria e viremia registrati ai vari tempi di monitoraggio in questa coorte di pazienti, è stato possibile osservare una viruria persistente da JC durante tutto il follow-up e significativamente più elevata rispetto alla viremia ($p = 0,022$) (Fig. 2.15), così come osservato nella coorte più ampia di pazienti affetti da MRIC da cui questo campione è stato estrapolato.

Tabella 2.19 Dati clinici e anagrafici dei 22 pazienti affetti da MRIC, suddivisi per diagnosi di malattia, al baseline (t0)

Patologia	PsA	AR	SA	MRIC
M/F (n)	7/4	0/7	2/2	9/13
Età in anni (mediana/range)	53 (46-66)	54 (19-79)	48 (38-56)	53 (19-79)
Diagnosi: AP/AR/SA	-	-	-	11/7/4
Durata della Malattia in mesi (mediana/range)	48 (24-228)	60 (20-168)	84 (36-168)	60 (20-228)
PCR (mg/dl; mediana/25°-75° percentile)	0,04 (0-0,47)	0,08 (0,03-0,30)	1,71 (0,95-2,85)	0,09 (0-0,52)
VES (mm/h; mediana/25°-75° percentile)	13 (8,50-18)	16 (15-27)	8 (6,50-21)	15 (11-21)
HAQ (0-3; media/DS)	0,97/0,74	1,12/0,70	0,92/0,76	1,02/0,70
DAS28-VES (media/DS)*	3,90/0,90	4,26/0,84	-	4,04/0,90
DAS28-PCR (media/DS)*	3,45/0,71	3,34/0,90	-	3,41/0,76
VAS dell'Attività della Malattia per il Medico (0-100 mm, VAS; media/DS)*	38,20/24,41	45,57/27,52	49,50/14,06	43,10/23,37
VAS dell'Attività della Malattia per il Paziente (0-100 mm, VAS; media/DS)*	48,45/26,93	52,43/31,63	66,75/26,62	53,04/27,92
BASDAI (1-10; media/DS)**	4,80/3,20	-	7,01/4,87	5,40/3,65
DMARDs Concomitanti (n/%)	5 (45)	4 (57)	2 (50)	11 (50)
DMARDs e glucocorticoidi concomitanti (n/%)	0	2 (29)	1 (25)	3 (14)
Glucocorticoidi concomitanti (n/%)	4 (37)	0	0	4 (18)
Nessun trattamento concomitante (n/%)	2 (18)	1 (14)	1 (25)	4 (18)
Enbrel®	6	1	0	7
Humira®	4	4	1	9
Simponi®	1	0	3	4
Cimzia®	0	2	0	2

PsA: artrite psoriasica; AR: artrite reumatoide; SA: spondilite anchilosante; PCR: proteina C reattiva; VES: velocità di sedimentazione eritrocitaria; HAQ: Health Assessment Questionnaire; DS: deviazione standard; DAS28: Disease Activity Score su 28 articolazioni; VAS: visual analogue scale; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; DMARDs: disease modifying anti-rheumatic drugs. *Solo per pazienti con PsA ed AR. **Solo per pazienti con PsA e SA. Enbrel®: principio attivo *etanercept*; Humira®: principio attivo *adalimumab*; Simponi®: principio attivo *golimumab*; Cimzia®: principio attivo *certolizumab pegol*.

Tabella 2.20 Carica virale di JCV nei campioni di plasma, urina e PBMC prelevati da 22 pazienti affetti MRIC al baseline (t0) e dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α

	Pz N° Totale (NP)	N° Pz JCV DNA + [†]	N° Pz JCV DNA - [†]	Urina		Plasma		PBMC	
				JCV+ / JCV- (NP)	log10 gEq/mL (range) [§]	JCV+ / JCV- (NP)	log10 gEq/mL (range) [§]	JCV+ / JCV- (NP)	log10 gEq/10 ⁶ c (range) [§]
t0*	22	13	9	13/8 (1)	7,17 (4,23-8,23)	0/22	-	0/22	-
t1*	20 (2)	14	6	12/7 (3)	6,20 (4,23-8,36)	5/15 (2)	4,83 (4,41-5,28)	0/19 (3)	-
t2*	22	13	9	13/9	6,80 (3,20-8,43)	4/18	4,57 (3,87-5,20)	2/20	2,89 (2,35-3,44)
Totale	22	16	6	38/24 (4)	6,89 (3,20-8,43)	9/55 (2)	4,78 (3,87-5,28)	2/61 (3)	2,89 (2,35-3,44)

*Prelievi seriali di plasma, PBMC ed urina sono stati eseguiti a t0 (baseline: prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF- α) e dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α .

[§]I valori mediani di carica virale di JC (ed il rispettivo range) ritrovati nei campioni di plasma ed urina sono stati espressi come log10 delle copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale per millilitro (gEq/ml), mentre la mediana del numero di copie di genoma virale ritrovato nei PBMC è stata espressa come log10 delle copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale su 10⁶ cellule (gEq/10⁶c).

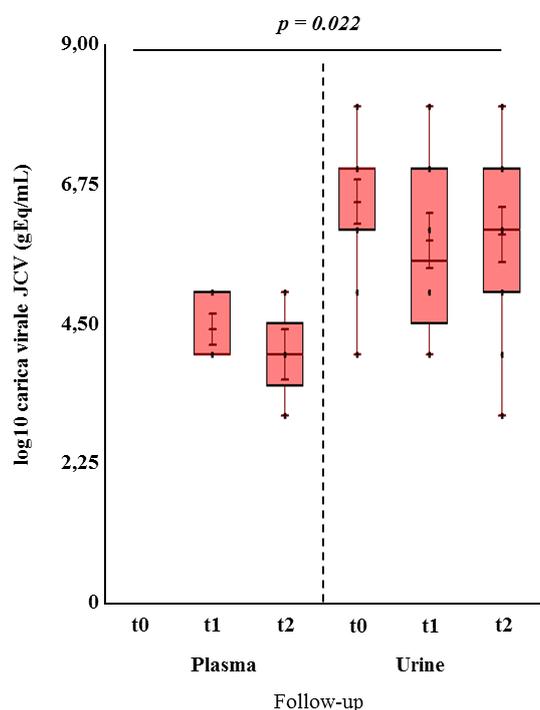


Figura 2.15 Confronto tra i valori di viremia e viruria da JC (espressi in log10 gEq/ml) in 22 pazienti affetti da MRIC e trattati con anti-TNF- α per 8 mesi. Prelievi seriali di plasma e urina sono stati eseguiti a t0 (baseline: prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF- α) e dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α . Non è stata riscontrata nessuna differenza statisticamente significativa tra le viremie da JC registrate ai vari tempi previsti dal follow-up. Infine, i valori di viremia si sono rilevati sempre significativamente più bassi rispetto ai valori di viruria ad ogni tempo ($p = 0,022$). L'analisi statistica è stata eseguita mediante test non parametrici e la significatività fissata per p value < 0,05.

3.3.3 Analisi di sequenza delle regioni genomiche NCCR e VP1 di JCV nei campioni biologici positivi al DNA virale in pazienti affetti MRIC e trattati con anti-TNF- α

L'analisi della regione genomica NCCR di JCV è stata eseguita nei campioni biologici positivi al DNA virale mediante sequenziamento diretto dei prodotti di PCR con *primers* specifici per la regione virale d'interesse. Nella coorte dei paziente affetti MRIC ed in trattamento da 8 mesi con anticorpi monoclonali anti-TNF- α , è stata riscontrata un'organizzazione strutturale simile a quella dell'archetipo CY in tutti i campioni biologici positivi al DNA di JCV, ad eccezione di un'unica sequenza riarrangiata di tipo IIR caratterizzata da una sequenza così costituita: box A, delezione del box B, duplicazione del box C ed in particolare del sito di legame cre-TAR, inserzione dei 6 nucleotidi iniziali del box D, box E, una nuova duplicazione del box C, una ripetuta inserzione dei 6 nucleotidi iniziali del box D e dell'intero box E ed infine box F completo (Tab. 2.21, Fig. 2.16 e Fig. 2.17). Questa sequenza è stata isolata dal plasma di una paziente affetta da PsA con viruria persistente da JC durante il trattamento con anti-TNF- α e con genotipo 2B, ritrovato sia nel plasma che nelle urine. Invece, negli altri 33 pazienti affetti da MRIC con viruria e/o viremia da JC durante il trattamento con anti-TNF- α sono stati individuati i genotipi 1A, 1B ed il genotipo 4 rispettivamente in 7, 10 e 14 pazienti mentre in 2 pazienti, 1 affetto da PsA ed 1 affetto da SA, è stata riscontrata rispettivamente una co-infezione a livello urinario da parte dei genotipi 1A e 1B e da parte dei genotipi 2E, 2A e 7B (Fig. 2.18).

Tabella 2.21 Analisi di sequenza della NCCR di JCV in campioni biologici positivi al DNA virale nella coorte dei pazienti affetti da malattie reumatiche infiammatorie croniche (MRIC) e trattati con anti-TNF- α

	N° JCV+	CY archetipo* (%) (IIS) [§]	(IIR) [§]
<i>Urina</i>	65	65 (100%)	0
<i>Plasma</i>	14	13 (93%)	1 (7%)
<i>PBMC</i>	5	5 (83%)	0
<i>Totale (%)</i>	84	83 (98%)	1 (2%)

* Le sequenze archetipo isolate presentano tutte un esiguo numero di mutazioni puntiformi (media di 2 mutazioni puntiformi a sequenza) che non interessano siti di legame per fattori di trascrizione cellulare. È inoltre presente la transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 nel box F. La numerazione nucleotidica considerata è quella del ceppo non patogeno CY di JCV [Yogo et al., 1990].

[§]: Classificazione della NCCR di Jensen and Major (2001).

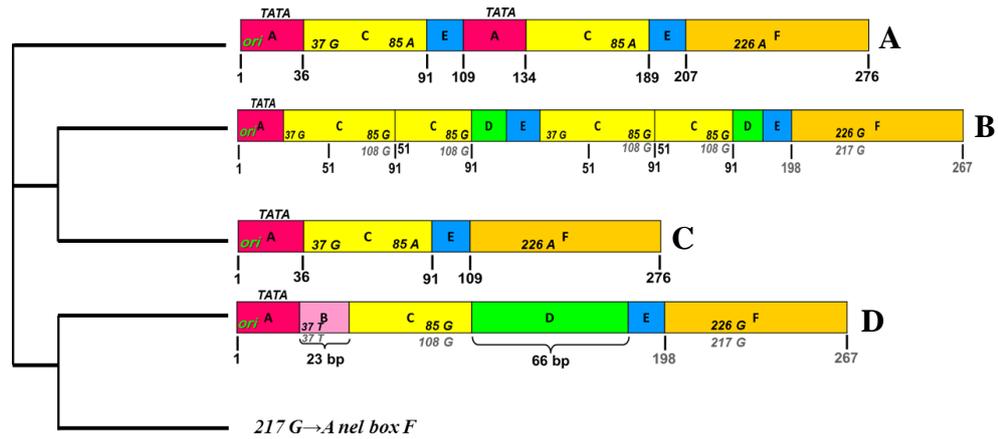


Figure 2.16 Sequenze della NCCR di JCV ritrovate nei campioni biologici dei pazienti affetti da malattie reumatiche infiammatorie croniche (MRIC) e trattati con anti-TNF- α (Coorte 3). La sequenze nucleotidica della NCCR di JCV è mostrata dal nucleo dell'origine di replicazione del DNA (ori) fino al codone di inizio della gene leader (*Agnoproteina*) dei geni virali precoci. In **A**, la numerazione nucleotidica si basa sulla sequenza della NCCR della variante Mad1 PML-associata e isolata da Frisque e colleghi nel 1984, e il numero dei nucleotidi sono indicati in grassetto. In **D**, la numerazione nucleotidica della sequenza archetipo CY, isolata da Yogo e colleghi nel 1990, è riportati in grassetto grigio. In **B** è riportata la sequenza riarrangiata di tipo IIR caratterizzata dalla duplicazione di una sequenza costituita da: presenza del box A, delezione del box B, duplicazione del box C (con conseguente duplicazione del sito di legame cre-TAR), l'inserzione dei 6 nucleotidi iniziali del box D e presenza del box E. Tale sequenza è stata isolata dal plasma di una paziente affetta da PsA con viruria persistente da JCV durante il trattamento con anti-TNF- α . In **C** è riportata la sequenza modello IS costituita da un'unica sequenza da 98 bp (Jensen and Major, 2001).

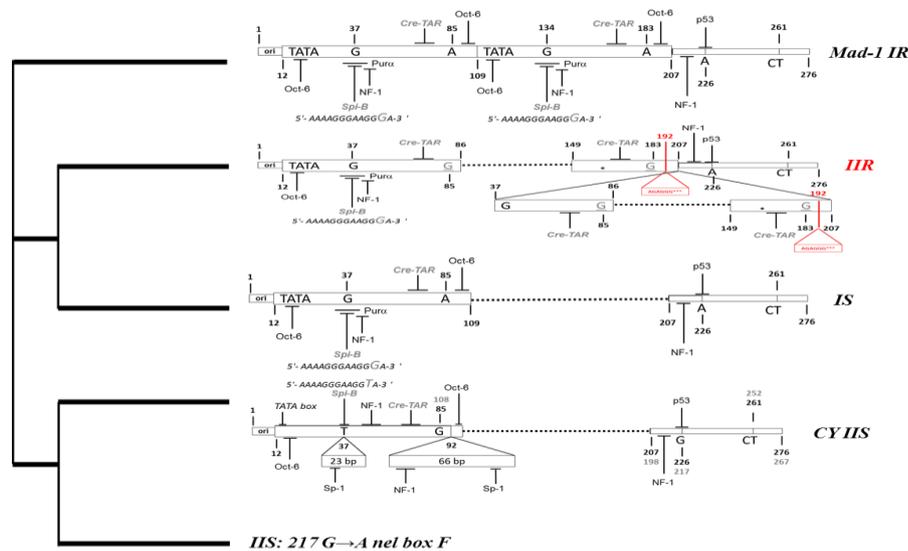


Figure 2.17 Sequenze della NCCR di JCV ritrovate nei campioni biologici dei pazienti affetti da malattie reumatiche infiammatorie croniche (MRIC) e trattati con anti-TNF- α (Coorte 3), secondo la classificazione di Jensen and Major (2001). La sequenze nucleotidica della NCCR di JCV è mostrata dal nucleo dell'origine di replicazione del DNA (ori) fino al codone di inizio della gene leader (*agno-proteina*) dei geni virali precoci. *Mad-1 IR*: sequenza della NCCR della variante Mad1 PML-associata e isolata da Frisque e colleghi nel 1984; *IIR*: sequenza riarrangiata caratterizzata dalla duplicazione di una sequenza costituita da: la presenza del box A, la delezione del box B, la duplicazione del box C (con conseguente duplicazione del sito di legame cre-TAR), l'inserzione di un box D ampiamente delecto e la presenza del box E. *IS*: sequenza modello costituita da un'unica sequenza da 98 bp; *CY IIS*: sequenza archetipo CY, isolata da Yogo e colleghi nel 1990. Il cladogramma è stato realizzato mediante software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

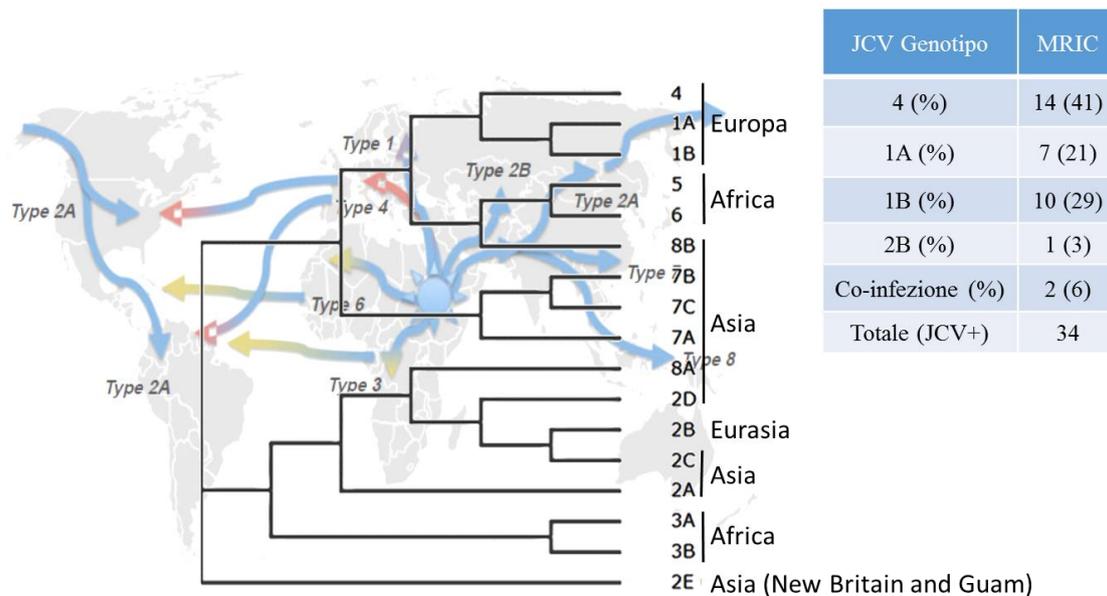


Figure 2.18 Genotipi di JCV ritrovati nella coorte di pazienti affetti da malattie reumatiche infiammatorie croniche (MRIC) e trattati con anti-TNF- α (Coorte 3). I genotipi 1A, 1B e 4 ritrovati nei campioni biologici analizzati, sono quelli maggiormente diffusi nel continente Europeo ed in Italia. Inoltre, esclusivamente in questa coorte è stato ritrovato il genotipo euroasiatico 2B nel plasma e nelle urine di una paziente affetta da PsA con viruria persistente da JCV durante il trattamento con anti-TNF- α e con una sequenza riarrangiata della NCCR di JCV di tipo IIR. In questo studio non è stata riscontrata nessuna associazione significativa tra i genotipi ritrovati e il trattamento delle MRIC con anti-TNF- α . Il cladogramma è stato realizzato mediante software ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.4 Confronto della viruria e della viremia da JC nelle coorti di pazienti affetti da malattie immuno-mediate e trattati con farmaci biologici

Infine è stata effettuata una comparazione tra i valori di viruria e viremia da JC ottenuti da 15 pazienti affetti da SMRR con follow up nel primo anno di trattamento con natalizumab (*Coorte 2 follow-up < 12 mesi*), 22 pazienti affetti da MRIC con prelievi al baseline (t0) e dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α (*Coorte 3 follow-up < 12 mesi*) e 18 pazienti pediatriche affette da MC e trattati con infliximab.

Per il confronto della viruria ottenuto al baseline (t0) ovvero prima dell'inizio del trattamento di ogni paziente con l'opportuno FB, sono stati considerati anche i valori di carica virale (espressi in gEq/mL) calcolati nei campioni di urina prelevati da una coorte di controllo costituita da 19 volontari sani (10 donne e 9 uomini; età mediana: 35 range: 25-47). Nel gruppo di controllo è stata osservata viruria da JCV in 5/19 individui (2 donne e 3 uomini) con un valore mediano della carica virale pari a 5,75 log₁₀ gEq/mL (3,54-8,43). Inoltre, il DNA di JCV è stato riscontrato nel plasma di 1 un individuo (carica virale pari a 2,83 log₁₀ gEq/mL) ed in nessun campione di PBMC (Tab. 2.22).

Tabella 2.22 Carica virale di JC a t0 nei campioni di urina di 18 pazienti pediatriche affette da MC (*Coorte 1.1*), 15 pazienti affetti da SMRR (*Coorte 2 follow-up < 12 mesi*), 22 pazienti affetti da MRIC (*Coorte 2 follow-up < 12 mesi*) e 19 individui sani (CTRL)

Patologia	Coorte 1.1	Coorte 2	Coorte 3				Coorte Controllo
	MC	SMRR	PsA	AR	SA	MRIC	CTRL
F ÷ M	8 ÷ 10	7 ÷ 8	4 ÷ 7	7 ÷ 0	2 ÷ 2	13 ÷ 9	10 ÷ 9
JCV+ ÷ JCV-	6 ÷ 12	4 ÷ 11	4 ÷ 10**	7 ÷ 0	2 ÷ 2	13 ÷ 8**	5 ÷ 14
log ₁₀ JCV load (range) [†]	6,30 (4,85-8,85)	4,38 (3,48-4,58)	6,82 (4,23-8,09)	6,89 (5,07-8,23)	7,74 (7,68-7,80)	7,17 (4,23-8,23)	5,75 (3,54-8,43)
Età (range) [†]	15 (8-22)	34 (19-47)	53 (46-66)	54 (19-79)	48 (38-56)	53 (19-79)	35 (25-47)
Durata della malattia, mesi (range) [†]	nd	84 (12-240)	48 (24-228)	60 (20-168)	84 (36-168)	60 (20-228)	-
Attività della malattia ^{‡§} (range)	> 30	2 (0-4)	3,31 (2,46-4,52)	3,35 (2,12-4,37)	6,15 (2,44-13,30)	-	-

MC: morbo di Crohn; SMRR: sclerosi multipla recidivante-remittente; PsA: artrite psoriasica; AR: artrite reumatoide; SA: spondilite anchilosante; MRIC: malattie reumatiche infiammatorie croniche. [†]Per ogni categoria sono indicati i valori mediani (range). La carica virale di JC viene espressa come log₁₀ di genomi equivalenti (gEq)/mL. [§]L'attività della malattia è indicata in base a scale di valori specifiche per ogni tipo di patologia. Per la *Coorte 1.1* dei pazienti pediatriche affette da morbo di Crohn, l'attività della malattia è stata valutata mediante l'Indice Pediatrico di Attività della Malattia di Crohn (PCDAI) (punteggio: ≤ 10 malattia non attiva; 10-30: malattia lieve; > 30 da attività di malattia da moderata a grave); per la *Coorte 2* dei pazienti con SMRR è stato usato l'Expanded Disability Status Scale (EDSS) di Kurtzke: questa scala va da 0 (esami neurologici nella norma) a 10 (paziente allettato). Per la *Coorte 3* è stato considerato il Disease Activity Score su 28 articolazioni calcolato sul valore della proteina C reattiva (DAS28-PCR) per quanto riguarda i pazienti con PsA o AR, mentre per i pazienti affetti da SA è stato considerato il Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI), che va da 0 a 10 (massima attività). ** A t0, tra i 22 pazienti con MRIC, il campione d'urina di 1 paziente affetto da AP non è pervenuto.

Dal confronto delle virurie a t0 nelle 3 coorti di pazienti arruolate, è emerso che la viruria riscontrata nei 22 pazienti affetti da MRIC (mediana: 7,17 log₁₀ gEq/mL; range: 4,23-8,23) è sempre maggiore rispetto a quella riscontrata nelle altre coorti (6,30 log₁₀ gEq/mL nella *Coorte 1.1*; 4,38 log₁₀ gEq/mL nella *Coorte 2* e 5,75 log₁₀ gEq/mL nella *Coorte di controllo*) (p = 0,025) (Fig. 2.19). Inoltre il test del χ^2 ha permesso di identificare una correlazione statisticamente significativa tra il numero di pazienti con viruria a t0 (13/21) e la presenza di una malattia reumatica infiammatoria cronica: infatti, rispetto al numero di individui sani con viruria (5/19), è stato possibile stimare un rischio relativo di 1,99 (IC 95%: 1,07-3,70) di andare incontro a viruria da JCV se affetti da MRIC (p = 0,024). Questo risultato induce a concludere che lo scenario infiammatorio che caratterizza i pazienti affetti da MRIC favorisce lo *shedding* di JCV nelle urine ma non la comparsa della viremia: infatti nessuno di questi pazienti sviluppa viremia da JCV a t0. Inoltre, a t0, non è stata riscontrata alcuna differenza statisticamente significativa tra la carica virale di JC nelle urine prelevate dalla coorte dei pazienti pediatrici affetti da MC e trattati con infliximab e quella ritrovata nelle urine dei pazienti affetti da MRIC e trattati con anti-TNF- α .

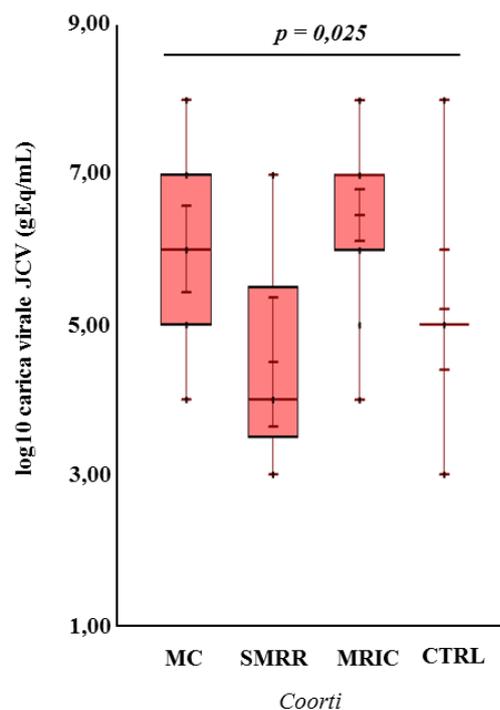


Figura 2.19 Confronto della carica virale di JC a t0 nei campioni di urina di 18 pazienti pediatrici affetti da MC, 15 pazienti affetti da SMRR, 22 pazienti affetti da MRIC e 19 individui sani (CTRL). La viruria riscontrata nei 22 pazienti affetti da MRIC a t0 si è rivelata significativamente più alta rispetto ai valori di viruria ritrovati nelle altre coorti (p = 0,025). L'analisi statistica è stata eseguita mediante test non parametrici e la significatività fissata per p value < 0,05. MC: morbo di Crohn; SMRR: sclerosi multipla recidivante-remittente; MRIC: malattie reumatiche infiammatorie croniche; CTRL: gruppo di controllo.

Dal confronto tra i valori di viruria e viremia da JC ottenuti da 15 pazienti affetti da SMRR dopo 4 (t1) e 8 (t2) infusioni di natalizumab e quelli ottenuti da 22 pazienti affetti MRIC dopo 4 (t1) e 8

(t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α , è emerso che sia i valori di viremia ($p = 0,046$) che quelli di viruria ($p = 0,008$) si sono mantenuti più elevati nella coorte dei pazienti affetti da MRIC rispetto a quella dei pazienti con SMRR (Fig. 2.20). Inoltre è emerso che un rischio relativo (RR), pari a 1,70 (IC 95%: 1,12-2,59), di viruria persistente da JC durante il trattamento con anti-TNF- α è presente tra i pazienti affetti da MRIC rispetto a quelli affetti da SMRR ($p = 0,01$). Invece in entrambi le coorti, sembra che il trattamento farmacologico con biologici ed il contesto infiammatorio determinato della patologia primaria (SMRR o MRIC) favoriscano la persistenza della viruria rispetto alla viremia, questo aspetto è più marcato nei pazienti affetti da MRIC [nella coorte di pazienti con SMRR: RR = 1,91 (IC 95%: 1,25-2,93) con $p = 0,02$; nella coorte di pazienti affetti da MRIC: RR = 2,25 (IC 95%: 1,44-3,53) con $p = 0,0002$] (Tab. 2.23).

Tabella 2.23 Confronto della viruria e della viremia da JC in 15 pazienti affetti SMRR dopo 4 (t1) e 8 (t2) infusioni di natalizumab vs 22 pazienti affetti da MRIC dopo rispettivamente 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α

	Pz N° Totale	N° Pz JCV DNA + [†]	N° Pz JCV DNA - [†]	Urina		Plasma		RR (IC 95%) p value **
				JCV+/ JCV-	log10 gEq/mL (range) [§]	JCV+/ JCV-	log10 gEq/mL (range) [§]	
SMRR t1*	15	4	11	4/11	4,11 (2,00-6,01)	2/13	2,15 (1,61-2,69)	
SMRR t2*	15	5	10	5/10	5,18 (3,77-5,65)	0/15	-	
MRIC t1*	20 (2)	14	6	12/7 (3)	6,20 (4,23-8,36)	5/15 (2)	4,83 (4,41-5,28)	
MRIC t2*	22	13	9	13/9	6,80 (3,20-8,43)	4/18	4,57 (3,87-5,20)	
SMRR Totale	15	5	10	9/21	5,18 (2,00-6,01)	2/28	2,15 (1,61-2,69)	1,91 (1,25-2,93) $p = 0,02$
MRIC Totale	22	16	6	25/16 (3)	6,53 (3,20-8,43)	9/33 (2)	4,78 (3,87-5,28)	2,25 (1,44-3,53) $p = 0,0002$
RR (IC 95%) p value**					1,70 (1,12-2,59) $p = 0,01$			$p > 0,05$

* Prelievi seriali di plasma, PBMC ed urina sono stati eseguiti dopo 4 (t1) e 8 (t2) infusioni di natalizumab in pazienti affetti da SMRR; invece prelievi seriali di plasma, PBMC ed urina sono stati eseguiti dopo 4 (t1) e 8 (t2) mesi di trattamento con anti-TNF- α in pazienti affetti da MRIC. [†]Per N° Pz JCV DNA + e N° Pz JCV DNA - si intende il numero di paziente nei quali è stata riscontrata la presenza o meno di DNA di JCV nei campioni di plasma e/o PBMC e/o urine. [§]I valori mediani di carica virale di JC (ed il rispettivo range) ritrovati nei campioni di plasma ed urina sono stati espressi come log10 delle copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale per millilitro (gEq/ml).

** Il rischio relativo (RR) con intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) statisticamente significativo per p value $< 0,05$ mediante il test del χ^2 .

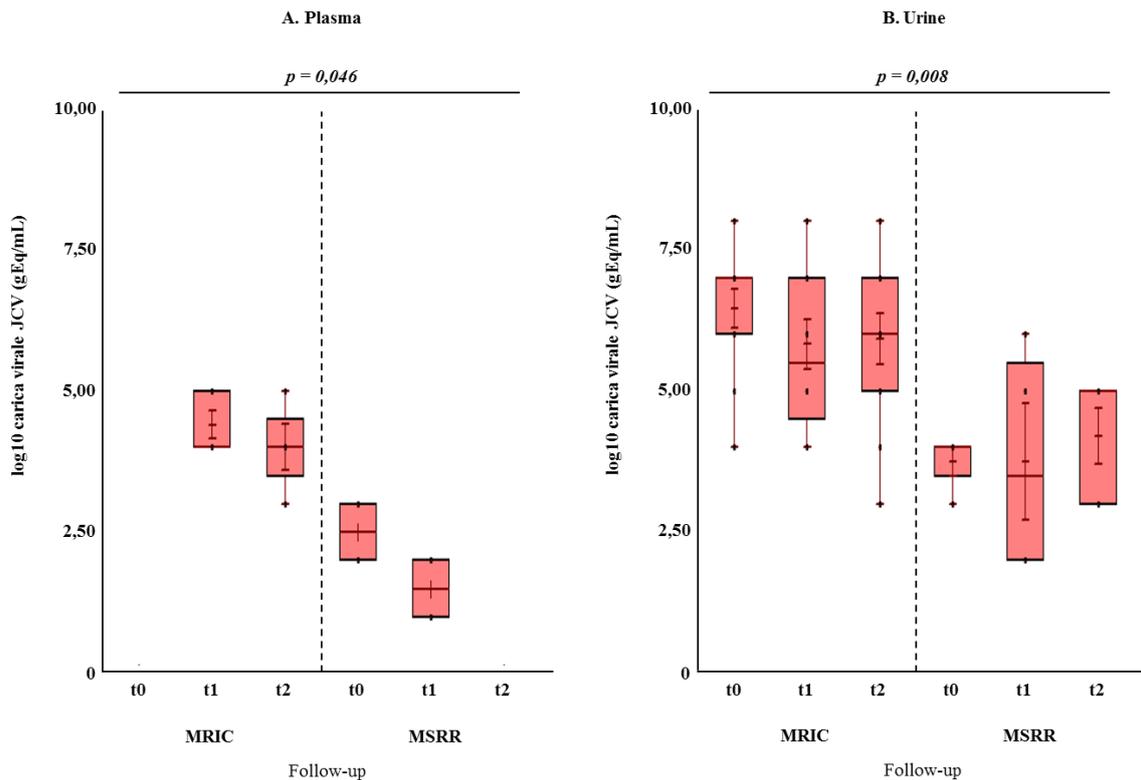


Figura 2.20 Confronto tra i valori di viremia e viruria da JC (espressi in log₁₀ gEq/ml) in 22 pazienti affetti da MRIC ed in 15 pazienti affetti da SMRR al baseline (t₀) e trattati rispettivamente con anti-TNF- α e con natalizumab per 8 mesi. Prelievi seriali di plasma e urina sono stati eseguiti da pazienti affetti da MRIC e da pazienti affetti da SMRR a t₀ (*baseline*: prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF- α) e dopo 4 (t₁) e 8 (t₂) mesi di trattamento rispettivamente con anti-TNF- α e con natalizumab. I valori di viremia ($p = 0,046$) e di viruria ($p = 0,008$) si sono rilevati sempre significativamente più elevati nei pazienti affetti da MRIC rispetto a quelli affetti da SMRR. L'analisi statistica è stata eseguita mediante test non parametrici e la significatività fissata per p value < 0,05.

Per quanto riguarda invece il confronto tra i valori di viruria e viremia da JC ottenuti dallo studio di 15 pazienti affetti da SMRR dopo 4 (t₁), 8 (t₂) e 12 (t₃) infusioni di natalizumab e quelli ottenuti dallo studio di 18 pazienti pediatrici affetti da MC dopo 4 (t₁), 8 (t₂) e 12 (t₃) mesi di trattamento con l'anti-TNF- α infliximab, è emerso che sia i valori di viremia ($p = 0,052$) che quelli di viruria ($p = 0,028$) si sono mantenuti più elevati nella coorte dei pazienti affetti da MC rispetto a quella dei pazienti con SMRR (Fig. 2.21). Inoltre è emerso che un rischio relativo pari a 1,81 (IC 95%: 1,35-2,45) di viremia da JC durante il trattamento con l'anti-TNF- α infliximab è presente tra i pazienti affetti da MC rispetto a quelli affetti da SMRR ($p = 0,0022$) (Tab. 2.23).

Infine nessuna differenza sostanziale è emersa tra i 18 pazienti pediatrici affetti da MC e trattati con infliximab e tra i 22 pazienti adulti affetti da MRIC e trattati con anti-TNF- α diversi dall'infliximab.

Tabella 2.24 Confronto della viruria e della viremia da JC in 15 pazienti affetti da SMRR dopo 4 (t1), 8 (t2) e 12 (t3) infusioni di natalizumab vs 18 pazienti affetti MC dopo rispettivamente 4 (t1), 8 (t2) e 12 (t3) mesi di trattamento con l'anti-TNF- α infliximab

	Pz N° Totale	N° Pz JCV DNA + [†]	N° Pz JCV DNA - [†]	Urina		Plasma		RR (IC 95%) p value**
				JCV+ / JCV-	log10 gEq/mL (range) [§]	JCV+ / JCV-	log10 gEq/mL (range) [§]	
SMRR t1*	15	4	11	4/11	4,11 (2,00-6,01)	2/13	2,15 (1,61-2,69)	
SMRR t2*	15	5	10	5/10	5,18 (3,77-5,65)	0/15	-	
SMRR t3*	15	5	10	4/11	5,63 (5,29-5,94)	1/14	1,86	
MC t1*	18	12	8	10/8	6,12 (3,17-8,37)	7/11	5,30 (3,78-5,59)	
MC t2*	18	6	12	6/12	5,85 (4,30-8,15)	5/13	3,08 (2,58-6,11)	
MC t3*	18	6	12	6/12	7,47 (5,63-9,39)	5/13	3,63 (2,76-5,35)	
SMRR Totale	15	6	9	13/32	5,30 (2,00-6,01)	3/42	1,86 (1,61-2,69)	1,88 (1,32-2,67) p = 0,0058
MC Totale	18	18	0	22/32	6,21 (3,17-9,39)	17/37	4,30 (2,58-6,11)	p > 0,05
RR (IC 95%)							1,81	
p value**								p > 0,05
								1,81 (1,35-2,45) p = 0,0022

* Prelievi seriali di plasma, PBMC ed urina sono stati eseguiti dopo 4 (t1), 8 (t2) e 12 (t3) infusioni di natalizumab in pazienti affetti da SMRR; mentre prelievi seriali di plasma ed urina sono stati eseguiti dopo 4 (t1), 8 (t2) e 12 (t3) mesi di trattamento con l'anti-TNF- α infliximab in pazienti affetti da MC. [†]Per N° Pz JCV DNA + e N° Pz JCV DNA - si intende il numero di paziente nei quali è stata riscontrata la presenza o meno di DNA di JCV nei campioni di plasma e/o PBMC e/o urine.

[§] I valori mediani di carica virale di JC (ed il rispettivo range) ritrovati nei campioni di plasma ed urina sono stati espressi come log10 delle copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale per millilitro (gEq/ml).

** Il rischio relativo (RR) con intervallo di confidenza al 95% (IC 95%) statisticamente significativo per p value < 0,05 mediante il test del χ^2 .

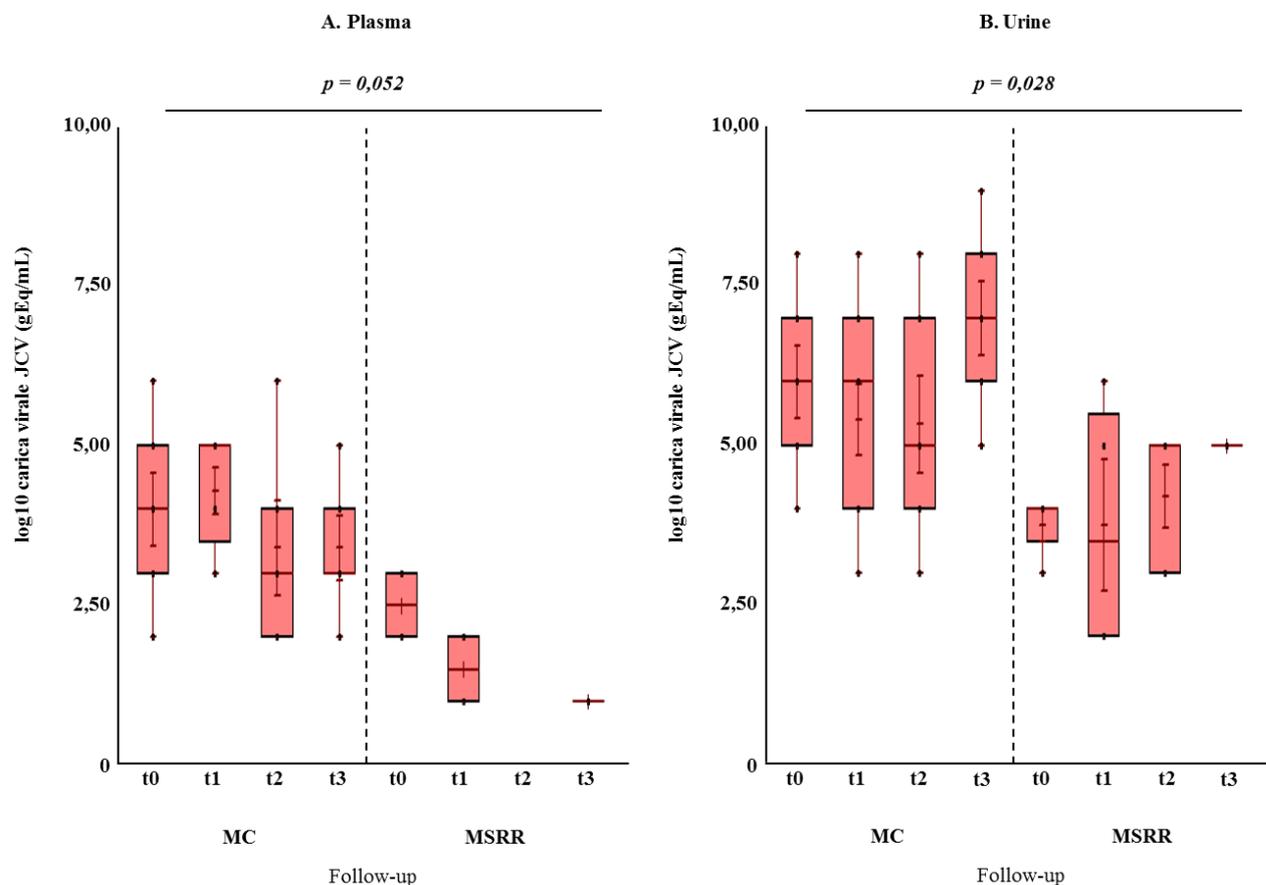


Figura 2.21 Confronto tra i valori di viremia e viruria da JC (espressi in log₁₀ gEq/ml) in 18 pazienti affetti da MC ed in 15 pazienti affetti da SMRR al baseline (t₀) e trattati rispettivamente con l'anti-TNF- α infliximab e con natalizumab per 12 mesi. Prelievi seriali di plasma e urina sono stati eseguiti da pazienti affetti da MC e da pazienti affetti da SMRR a t₀ (*baseline*: prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF- α) e dopo 4 (t₁) e 8 (t₂) mesi di trattamento rispettivamente con l'anti-TNF- α infliximab e con natalizumab. I valori di viremia ($p = 0,052$) e di viruria ($p = 0,028$) si sono rilevati sempre significativamente più elevati nei pazienti affetti da MC rispetto a quelli affetti da SMRR. L'analisi statistica è stata eseguita mediante test non parametrici e la significatività fissata per p value < 0,05.

4. Discussioni e conclusioni

Nell'ultimo decennio, l'insorgenza della PML in seguito all'utilizzo dei FB ha reso indispensabile andare a valutare il rischio di sviluppo di questa patologia durante il trattamento con tali farmaci. Infatti, l'epidemiologia della PML in questo contesto rimane ancora da definire in quanto tale patologia, oltre che essere rara, è anche sotto-diagnosticata [Molloy and Calabrese, 2012]. In particolare è importante comprendere come lo scenario infiammatorio, che caratterizza le diverse malattie immuno-mediate, possa influenzare la riattivazione del virus JC.

Le malattie immuno-mediate sono caratterizzate da uno squilibrio della risposta immunitaria cellulo-mediata e da *patterns* infiammatori alterati che indirizzano tale risposta o verso i linfociti di tipo T helper 1 (Th1), con conseguente produzione di interleuchina (IL)-12 e TNF- α , o verso i linfociti di tipo T helper 2 (Th2), con produzione di IL-10. In particolare nella AR, nella SMRR e nel MC, è prevalente una risposta immunitaria di tipo Th1, con un eccesso di produzione di IL-12 e TNF- α , mentre nel LES si osserva prevalentemente una risposta di tipo Th2 con un eccesso di produzione di IL-10 [Elenkov and Chrousos, 2002]. Come l'infiammazione influisca sulla riattivazione di JCV e sull'insorgenza della PML è ancora da chiarire, tuttavia è noto che nei pazienti affetti da LES e con elevati livelli di IL-10, una potente citochina antinfiammatoria, il rischio di insorgenza di PML risulta maggiore rispetto a quello valutato negli individui affetti da altre patologie immuno-mediate [Calabrese et al., 2007; Molloy and Calabrese, 2009; Molloy and Calabrese, 2012]. Anche nei pazienti con SMRR e che hanno sviluppato PML associata all'uso di natalizumab, è stata osservata soltanto la produzione di IL-10 da parte dei linfociti T CD4+ JCV-specifici e non quella delle citochine infiammatorie IFN- γ , TNF- α ed IL-2, dotate di attività antivirale accertata. Pertanto, la riduzione del controllo della replicazione di JCV sia a livello del SNC sia a livello periferico può essere correlata ad un rischio maggiore di insorgenza della PML [Perkins et al., 2012].

Molti possono essere i meccanismi attraverso i quali il trattamento con natalizumab indirizzi la risposta immunitaria delle cellule T CD4+ verso la produzione di IL-10, tra i quali la mobilitazione delle cellule CD34+ infettate dal virus che determina l'aumento della carica antigenica JCV-specifica [Major 2009; Darrah et al., 2010], l'alterazione dell'interazione tra cellule presentanti l'antigene (APC) e cellule T [Brooks et al., 2006] o l'influenza diretta del natalizumab sulla produzione di citochine da parte dei linfociti T, così come osservato in seguito al trattamento con ribavirina dell'infezione da virus dell'epatite C [Langhans et al., 2012].

Infine, un aumento dei livelli plasmatici di IL-10, specifico della risposta immunitaria Th2, è stato osservato anche in pazienti affetti da MIRC in trattamento con glucocorticoidi (GC) [Elenkov and Chrousos, 2002]. Studi condotti *in vitro* ed *in vivo*, sia negli animali che nell'uomo, hanno dimostrato che i GC sopprimono la produzione di TNF- α , IFN- γ ed IL-2, citochine pro-infiammatorie tipiche della risposta Th1 [Beutler et al., 1986; Boumpas et al., 1993]. Inoltre, sia *in*

vivo che *in vitro*, il loro legame con i recettori specifici presenti sia a livello citoplasmatico che nucleare sulle APC [Elenkov et al., 1996; Blotta et al., 1997], inibisce la sintesi dell'IL-12, il principale induttore della risposta Th1. L'IL-12 è inoltre un potente attivatore della produzione di IFN- γ e pertanto l'inibizione della sua produzione da parte delle APC rappresenta il più importante meccanismo mediante il quale i glucocorticoidi spostano la risposta immunitaria verso i linfociti Th2.

Da questi studi si deduce quanto sia fondamentale la produzione di citochine implicate nel controllo dell'infezione virale, come TNF- α , IFN- γ ed IL-2, e l'immunosorveglianza di tipo cellulo-mediata da parte dei linfociti Th1 nel controllo della replicazione e della riattivazione di JCV. Tuttavia, l'immunità cellulare Th1-mediata non sembra essere completamente efficace nel controllo dell'infezione a livello dell'epitelio renale, in quanto persino negli individui immunocompetenti risulta comune lo *shedding* dei virioni nelle urine [Egli et al., 2009].

4.1 Studio della viruria e della viremia da JC in pazienti affetti da MRIC e trattati con anti-TNF- α : la patologia ed il trattamento farmacologico favoriscono la viruria

Sulla base di quanto premesso, dai risultati ottenuti confrontando a t0 la carica di JCV nei campioni di urina di tutti i tipi di pazienti inclusi in questo studio, è stato possibile osservare una viruria significativamente più elevata nei pazienti affetti da MRIC rispetto a quella ritrovata nei pazienti affetti da SMRR o MC ($p < 0.05$). Inoltre dal momento che 7 su 13 pazienti affetti da MRIC e con viruria da JC, sono stati trattati anche con glucocorticoidi, come terapia concomitante alla terapia con FB, è ragionevole supporre che il notevole stato di immunosoppressione indotto dai GC possa aver contribuito, insieme allo scenario infiammatorio caratteristico delle MRIC, a favorire la riattivazione di JCV a livello dell'epitelio renale in questa categoria di pazienti. Tuttavia, ulteriori indagini sistematiche sono necessarie per meglio comprendere se vi sia una correlazione tra l'uso di glucocorticoidi, lo squilibrio della risposta immunitaria nelle MRIC e la prevalenza di viruria in pazienti affetti da malattie immuno-mediate.

Inoltre, dall'analisi dell'andamento dei valori di viruria e viremia registrati ai vari tempi di campionatura per i pazienti affetti da MRIC, è stato possibile osservare una viruria persistente da JCV durante tutto il follow-up e significativamente più elevata rispetto alla viremia ($p = 0,015$). Questi dati permettono di concludere che lo scenario infiammatorio determinato dalla MRIC, in associazione con la terapia biologica e/o convenzionale concomitante, favorisca la riattivazione di JCV a livello dell'epitelio renale con rilascio di virioni nell'urina. Al contrario, la viremia sembra non essere favorita: infatti è stato possibile stimare un rischio relativo pari a 2,41 (IC 95%: 1,73-3,37) di riattivazione virale a livello del rene rispetto alla possibilità di riscontrare il DNA di JCV nel plasma dei pazienti con MRIC e trattati con anti-TNF- α . Sebbene alcuni Autori, in soggetti affetti da AR, abbiano osservato una prevalenza della risposta immunitaria di tipo Th1, con un

eccesso di produzione di IL-12, TNF- α ed INF- γ , citochine con attività antivirale accertata [Elenkov and Chrousos, 2002], la terapia con anti-TNF- α nei pazienti con MRIC JCV positivi se da una parte riduce l'infiammazione, dall'altra causa una diminuzione dell'espressione di citochine pro-infiammatorie ed interferisce con il reclutamento di linfociti T attivati. Ne consegue una ridotta produzione di INF- γ a livello locale che sembrerebbe favorire la replicazione di JCV nel distretto urinario, senza interferire invece sul controllo dell'infezione a livello sistemico. Pertanto, risulta di grande importanza la caratterizzazione dei *patterns* infiammatori delle diverse malattie immuno-mediate, al fine di comprendere come la produzione di diversi tipi di citochine, pro- e anti-infiammatorie, possa influenzare la riattivazione del virus JC.

4.2 Nuovi biomarkers predittivi di riattivazione da JCV in pazienti affetti da SMRR trattati con natalizumab?

Il natalizumab è un anticorpo monoclonale appartenente alla categoria dei FB, utilizzato in monoterapia nel trattamento della SMRR e che lega la catena $\alpha 4$ delle integrine $\alpha 4\beta 1$ e $\alpha 4\beta 7$ espresse sulla membrana dei linfociti T attivati. L'efficacia di questo trattamento è dimostrata da una serie di studi longitudinali che mostrano sia una riduzione di circa il 68% del tasso annuale di recidive sia una diminuzione della progressione di disabilità nel 42% dei pazienti trattati con il farmaco rispetto a quelli trattati solo con placebo [Duddy et al., 2007; Gandhi et al., 2009; Kasper and Shoemaker, 2010]. Tuttavia l'uso del natalizumab è stato associato ad un maggior rischio di sviluppare PML. Come ampiamente descritto, la PML è una grave patologia del SNC, ad esito quasi sempre fatale, che deriva da un'infezione litica degli oligodendrociti da parte del Polyomavirus JC. Essa insorge in seguito ad alterazioni immunologiche dell'ospite che compromettono l'immunosorveglianza a livello del SNC e che permettono il riarrangiamento della NCCR del virus dalla forma archetipo non patogena verso forme maggiormente neurovirulente, generando virioni dotati di una migliore fitness replicativa. I meccanismi attraverso i quali insorga la PML in seguito a terapia con natalizumab, sono ancora poco noti e, soprattutto nei pazienti trattati, non sono stati individuati i fattori virali e/o dell'ospite che predispongono allo sviluppo della malattia [Mancuso et al., 2012].

Inoltre non è stata ancora stabilita una chiara associazione tra viremia, viruria e PML. Al fine di effettuare una stratificazione del rischio d'insorgenza di tale patologia tra i pazienti con SMRR trattati con natalizumab, è stato messo a punto un saggio ELISA per la ricerca degli anticorpi anti-JCV (STRATIFY JCV[®]). Sebbene questa metodica sia estremamente sensibile, alcuni Autori hanno riscontrato un tasso di falsi negativi pari 2,5% in una coorte di pazienti affetti da SMRR con DNA virale nelle urine ma privi di anticorpi JCV-specifici nel siero [Gorelik et al., 2010].

Anche in questo studio, i dati ottenuti dallo STRATIFY JCV[®] non sono risultati essere sempre correlabili con quelli ottenuti dalla q-PCR: infatti il ritrovamento del DNA virale nei campioni di

urina al baseline, precedeva quello degli anticorpi ritrovati nei campioni di siero dopo 12 infusioni con natalizumab (pazienti STRATIFY JCV[®] negativi al baseline e positivi al t3). Questi dati sono in accordo con studi già presenti in letteratura, che riportano una frequente riattivazione asintomatica da JCV a livello del tratto urinario in pazienti affetti da SMRR trattati con meno di 12 infusioni di natalizumab [Chen et al., 2009; Sadiq et al., 2010].

Pertanto, come suggerito da altri Autori [Laroni et al., 2012], l'analisi dei risultati ha permesso di concludere che in pazienti affetti da SMRR, l'andamento della viruria possa rappresentare un indice predittivo di riattivazione virale nei primi 12 mesi di trattamento con natalizumab, considerata l'elevata sensibilità della metodica di q-PCR anche nei casi in cui lo STRATIFY JCV[®] fornisca un risultato negativo.

Infine, i risultati ottenuti suggeriscono che la replicazione di JCV a livello del distretto urinario, con comitante presenza di viruria, non sia dovuta ad un mancato controllo dell'infezione da parte delle cellule T, quanto piuttosto ad una ridotta diapedesi linfocitaria dal flusso sanguigno indotta dal natalizumab. Infatti, come già ipotizzato da altri Autori, la mancata localizzazione dei linfociti T a livello dell'epitelio renale infetto vanificherebbe la presentazione degli antigeni virali da parte delle APC [Chen et al., 2009; Mancuso et al., 2012]. Inoltre è stata osservata da alcuni Autori una diminuzione della risposta cellulo-mediata JCV-specifica, in seguito a stimolazione *in vitro* dei PBMC prelevati da pazienti con SMRR, con un pool antigenico specifico per la proteina VP1 di JCV, dopo 6 e 12 infusioni di natalizumab. Tale diminuzione è risultata essere più pronunciata nei pazienti viremici rispetto a quelli non viremici, e ciò ha indotto gli Autori a concludere che il natalizumab abbia un effetto negativo diretto sulla produzione di IFN- γ da parte delle cellule T JCV-specifiche dopo circa 1 anno di trattamento (12 infusioni). Pertanto, la riduzione della risposta cellulare JCV-specifica sembrerebbe favorire la riattivazione del virus nel rene e la sua successiva diffusione nel sangue [Chen et al., 2009]. Anche dai risultati di questo studio è emersa una maggiore prevalenza di pazienti STRATIFY JCV[®] negativi che sviluppano viremia da JCV in seguito alla somministrazione di un numero di infusioni di natalizumab maggiore di 12. Inoltre, l'assenza di anticorpi anti-JCV in questi pazienti consente di ipotizzare che l'immunità umorale non sia in grado di tenere sotto controllo la replicazione virale a livello sistemico. Al contrario sembra che il virus non solo instauri latenza nei linfociti B e nei loro progenitori, ma anche che sfrutti il macchinario di ricombinazione di tali cellule per replicarsi generando possibili varianti neurovirulente. Inoltre sembra che i virioni di JCV, una volta assemblati, permangano all'interno del nucleo cellulare non solo per evadere il riconoscimento delle cellule infette da parte del sistema immunitario, ma anche per essere veicolati verso il SNC [Ferenczy et al., 2012].

Infine sono state analizzate le diverse sottopopolazioni linfocitarie coinvolte nel controllo dell'infezione da JCV, al fine di valutare l'espressione di membrana del CD49d ($\alpha 4$ -integrina), molecola bersaglio del natalizumab. La valutazione dell'espressione di questa molecola è stata effettuata, attraverso citofluorimetria, sui PBMC dei pazienti affetti da SMRR ottenuti al baseline e

durante il primo ed il secondo anno di trattamento con natalizumab. Rispetto al baseline, nel primo anno di trattamento, è stata osservata una ridotta espressione di CD49d sulla membrana dei linfociti T CD4+ naïve, di memoria e di memoria attivati e dei linfociti T CD8+ attivati. Tale riduzione è risultata essere significativamente più marcata nei pazienti viremici e/o virurici (VIR) rispetto a quelli nè viremici né virurici (NO VIR).

Nel secondo anno di trattamento invece, sono stati osservati livelli di espressione di CD49d più elevati in tutte le sottopopolazioni linfocitarie studiate, tuttavia non è stata riscontrata alcuna correlazione statisticamente significativa tra i pazienti VIR rispetto a quelli NO VIR. Tali osservazioni suggeriscono che la riduzione dell'espressione di CD49d sulla membrana dei linfociti T CD4+ naïve, di memoria e di memoria attivati e dei linfociti T CD8+ attivati durante il primo anno di trattamento con natalizumab, sia in grado di influire negativamente sull'attivazione e sulla diapedesi di tali cellule. Tale evento, se da un lato migliora il decorso ed il quadro clinico della SMRR, dall'altro espone il paziente ad un maggior rischio di riattivazione virale in quanto riduce l'immunosorveglianza cellulare [Ferenczy, 2012]. Infine, è importante notare come la riduzione dell'espressione dell' α 4-integrina fosse prevalente nei pazienti VIR rispetto a quelli NO VIR e tale riduzione aumenterebbe il rischio d'insorgenza di PML in tali pazienti. Infatti, una ridotta espressione di tale molecola sulla membrana delle popolazioni linfocitarie deputate al controllo della infezione e/o riattivazione da JCV, andrebbe a compromettere l'immunosorveglianza a livello del SNC, venendo meno il meccanismo di diapedesi proprio dei linfociti T attivati. In particolare, la diminuzione dell'espressione dell' α 4-integrina sui linfociti T CD8+ attivati potrebbe rappresentare il miglior biomarcatore precoce d'insorgenza di PML, in quanto è stato osservato che la presenza di cellule T CD8+ specifiche per particolari epitopi di JCV va ad incidere sul decorso della PML in individui HIV-positivi, bloccando la progressione della patologia [Du Pasquier et al., 2004]. Inoltre, un recente studio ha evidenziato la presenza di cellule CD8+ JCV-specifiche in pazienti affetti da PML non fatale rispetto a quelli in cui la patologia è progredita con esito infausto [Gheuens et al., 2011]. Ne consegue che il monitoraggio dell'espressione CD49d sui linfociti T CD4+ e T CD 8+ possa rappresentare un importante indice predittivo di riattivazione di JCV e di possibile insorgenza di PML in pazienti trattati con natalizumab.

4.3 Riattivazione di JCV in pazienti affetti da MC

La recente introduzione degli mAbs, tra cui l'infliximab, nel trattamento di patologie immuno-mediate, come il MC, è stata associata alla riattivazione di patogeni opportunisti come il *M. tuberculosis* ed il Polyomavirus JC [Hansel et al., 2010; Kumar et al., 2010]. Tuttavia la riattivazione di JCV e l'insorgenza della PML è stata descritta solo in pazienti affetti da MC trattati con natalizumab [Van Assche et al., 2005; Major, 2010; Marshall and Major, 2010]. Come già ampiamente descritto, il virus JC instaura latenza anche a livello del tratto gastrointestinale ed in particolare nelle cellule enterogliali del sistema nervoso enterico (SNE), che sembrano essere

permissive all'infezione di JCV. Infatti è stata dimostrata la presenza di un'associazione tra la riattivazione di questo virus e la recrudescenza del decorso clinico della pseudo-ostruzione idiopatica intestinale cronica (CIIP), una patologia correlata alla motilità intestinale [Selgrad et al., 2009]. Inoltre è possibile supporre che, in condizioni di immuno-compromissione come quelle determinate dal trattamento con infliximab, l'infezione produttiva delle cellule enterogliali generi virioni in grado di infettare le cellule epiteliali intestinali, favorendo quindi la diffusione del virus al di fuori del SNE.

Negli individui immuno-competenti, il controllo immunologico dell'infezione virale a livello del SNE si basa sull'attivazione dei linfociti T in seguito alla presentazione dell'antigene virale da parte delle APC con produzione e rilascio di IL-12 ed IL-18. In presenza di tali citochine, i linfociti T iniziano a produrre citochine pro-infiammatorie, come il TNF- α , l'IL-2 e l'IFN- γ , citochina primariamente coinvolta nel controllo delle infezioni virali. Nella mucosa intestinale di pazienti affetti da MC, molti Autori hanno inoltre riscontrato un aumento dei livelli di IL-12, IL-18 e TNF- α , un potente mediatore dell'infiammazione intestinale in quanto recluta le cellule del sistema immunitario nel sito di infezione [Monteleone et al., 1999; Pizzarro et al., 1999; Hendrickson et al., 2002]. Il blocco del TNF- α da parte dell'infliximab potrebbe provocare una ridotta espressione di citochine pro-infiammatorie, come IL-1 ed IL-6, ed interferire con il reclutamento di linfociti T attivati con conseguente diminuzione dei livelli di IFN- γ . In questo contesto, come alcuni Autori hanno ipotizzato, JCV potrebbe riattivarsi all'interno delle cellule gliali enteriche, avviare un ciclo litico ed eventualmente infettare le cellule circostanti come quelle dell'epitelio intestinale [Selgrad et al., 2009; Bellizzi et al., 2012]. Tuttavia, è necessario ricordare che JCV è stato anche riscontrato nelle cellule epiteliali dei tubuli renali [Randhawa et al., 2001] e nei precursori ematopoietici CD34+ e nelle cellule B presenti sia nel midollo osseo che nel torrente circolatorio [Tan et al., 2010]. Sulla base di tali considerazioni, in questo studio è stato valutato il possibile ruolo dell'infliximab sulla riattivazione di JCV a livello delle cellule epiteliali del tratto gastroenterico, dell'apparato urinario e nel circolo ematico. È stata effettuata la ricerca del DNA virale in biopsie intestinali ileali e colon-rettali ed in campioni di urina e di plasma. Tutti i campioni sono stati raccolti, a vari tempi di follow-up, da due coorti di pazienti pediatriche affette da MC: una coorte comprendeva pazienti trattati con infliximab (*Coorte 1.1*) mentre l'altra pazienti trattati con terapia convenzionale (*Coorte 1.2*).

I risultati ottenuti hanno mostrato, in entrambe le coorti, un aumento del numero di pazienti con viruria dopo 4 mesi di trattamento (t1) rispetto a quanto osservato al baseline (t0). Infatti, se da una parte l'utilizzo dell'infliximab e della terapia convenzionale migliora il decorso clinico della malattia attenuando l'infiammazione, dall'altra sembra interferire con il controllo dell'infezione virale da parte del sistema immunitario. Inoltre a partire da un anno e fino a 18 mesi di trattamento con infliximab (t3 e t4 rispettivamente) è stato osservato un aumento significativo della carica di JCV nelle urine dei pazienti trattati con infliximab rispetto a quelli trattati con terapia

convenzionale. Tale risultato ha messo in evidenza come l'infliximab possa favorire la replicazione virale a livello renale con *shedding* dei virioni nelle urine già dopo 1 anno di trattamento. Al contrario, la viremia è risultata significativamente più elevata nella Coorte 1.1 rispetto alla Coorte 1.2 dopo soli 4 mesi di trattamento, periodo che coincide con la massima efficacia terapeutica del farmaco. Pertanto, analogamente a quanto osservato nei pazienti trattati con natalizumab [Lindberg et al., 2008; Major, 2010], anche nel caso dei pazienti trattati con infliximab si può ipotizzare una mobilitazione dei precursori emopoietici CD34+ e dei linfociti B infettati da JCV, i quali riversandosi nel circolo sanguigno andrebbero a veicolare il virus al SNC.

Infine, per quanto riguarda la ricerca del DNA virale nelle biopsie intestinali prelevate a t0, t3 e t4, una carica virale più elevata è stata riscontrata nelle biopsie di ileo ottenute da pazienti pediatriche affette da MC dopo un anno di trattamento con infliximab (t3) rispetto a quelli trattati con terapia convenzionale. Nessuna variazione statisticamente significativa è stata invece riscontrata tra le cariche virali di JC rilevate nelle biopsie colon-rettali ai vari tempi di follow-up. Dai risultati ottenuti è pertanto possibile ipotizzare che JCV si riattivi a livello delle cellule entero-gliali [Selgrad et al., 2009] con produzione di virioni che andrebbero a diffondere nelle cellule dell'epitelio intestinale e nel sangue. Il meccanismo alla base di questa riattivazione potrebbe risiedere nel blocco del TNF- α da parte dell'infliximab con una riduzione dell'attività dei linfociti T e dell'INF- γ ed anche nello sbilanciamento dell'immunosorveglianza locale dovuto alla mancata attivazione delle cellule T. Inoltre, in pazienti affetti da MC ed in trattamento con infliximab, l'infezione di cellule non permissive alla replicazione virale, come le cellule dell'epitelio intestinale, potrebbe portare ad una replicazione abortiva di JCV con conseguente sovra-espressione dell'AgT, la principale proteina virale oncogena. Tale sovra-produzione in concomitanza con la presenza di altri fattori intrinseci dell'ospite, potrebbe anche contribuire alla trasformazione cellulare ed allo sviluppo di tumori del tratto GI. In particolare, il cancro del colon-retto è la terza causa di morte per tumore nelle donne e la quarta nell'uomo ed ogni anno si registrano più di 500.000 casi con prognosi infausta. Molti sono i fattori di rischio che concorrono allo sviluppo di tale neoplasia, ma una condizione d'infiammazione cronica, come quella che si osserva nel MC e nella CU, fa aumentare il rischio d'insorgenza di tale neoplasia [Parkin et al., 2005; Ullman and Itzkowitz, 2011]. Recentemente è stata osservata un'associazione tra lo sviluppo del cancro del colon-retto e l'infezione da JCV [Burnett-Hartman et al., 2008]. Quale sia il contributo virale nell'eziologia di questa neoplasia è difficile da determinare poiché l'infezione da JCV è molto diffusa [Jiang et al., 2009] e non esistono modelli animali d'infezione da JCV. Infatti le uniche prove di oncogenicità e di trasformazione cellulare riconducibili a questo virus sono state ottenute direttamente da esperimenti su diverse colture cellulari ed indirettamente mediante trapianto di cellule neoplastiche in modelli animali [Maginnis and Atwood, 2009]. Tuttavia il DNA di JCV è stato ritrovato in molti tumori umani sia di origine gliale (gliomi, ependimomi e medulloblastomi) sia di origine non gliale come il cancro del colon-retto [Burnett-Hartman et al., 2008] suggerendo che il virus possa infettare un gran numero di tipi cellulari diversi. Al fine di comprendere come JCV possa essere coinvolto

nello sviluppo del cancro del colon-retto, sarebbe di grande importanza comprendere se il genoma virale si mantenga in una forma episomale all'interno della cellula infettata o si integri nel genoma umano alterandone la sequenza. Inoltre lo studio della NCCR virale in cellule prelevate da tumori a diverso stadio, risulterebbe di grande ausilio per l'identificazione di riarrangiamenti caratteristici di tali cellule rispetto a quelli riscontrabili nelle cellule della normale mucosa intestinale circostante. Pochi studi sono stati condotti a riguardo e non è stato mai possibile selezionare un particolare ceppo di JCV associabile alla neoplasia colon-rettale. Tuttavia quando campioni di cellule umane di cancro del colon-retto sono state trapiantate in topi nudi (topi geneticamente modificati al fine impedire il rigetto delle cellule cancerose trapiantate), tutte le sottopopolazioni di cellule tumorali derivatene, sono risultate positive al DNA di JCV. Pertanto, il virus potrebbe essere coinvolto nel processo di trasformazione delle cellule del colon-retto e le cellule contenenti il genoma virale potrebbero essersi selezionate in base alle loro particolari caratteristiche di crescita e di adattamento [Laghi et al., 1999; Coelho et al., 2010].

4.4 Riarrangiamenti della NCCR e prevalenza dei genotipi 1A ed 1B di JCV nelle coorti di pazienti affetti da patologie immuno-mediate e trattati con farmaci biologici

Il ruolo dell'infliximab nella disregolazione della sorveglianza immunitaria dell'infezione da JCV, è stato messo in evidenza anche dal ritrovamento di sequenze riarrangiate della NCCR in biopsie intestinali ed in campioni di plasma prelevati a t3 e t4 da 7 pazienti affetti da MC, trattati con infliximab e con un valore PCDAI >40 al baseline. In generale, nei pazienti affetti da MC e trattati con infliximab, l'analisi di sequenza di tale regione, ha evidenziato la presenza di un'organizzazione strutturale di tipo IIS (archetipo CY) nel 72% delle sequenze analizzate, mentre nel 26% è stata riscontrata un'organizzazione CY-simile ma con una delezione del box D e/o la presenza di due variazioni nucleotidiche ricorrenti: la trasversione T→G all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B e la transizione G→A nella posizione nucleotidica 217 del box F all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1. In particolare, l'identificazione della mutazione nucleotidica a livello del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B, la cui espressione è elevata nelle linee cellulari ematopoietiche, come le CD34+ e le cellule B, permette di correlare la presenza di questa mutazione puntiforme con una maggior capacità di diffusione del virus nell'ospite. Infine nel restante 2% delle sequenze analizzate, ritrovate in 2 biopsie colon-rettali di 2 dei 7 pazienti sopra descritti, è stata identificata una particolare sequenza riarrangiata della NCCR, con un'organizzazione strutturale di tipo IR (simil-Mad1). Dal momento che le cellule epiteliali intestinali non sono permissive alla replicazione del virus, la presenza di tali sequenze evidenzia l'importanza dei meccanismi di riarrangiamento della NCCR al fine di generare varianti dotate di una migliore fitness replicativa [Bellizzi et al., 2012]. Inoltre, negli ultimi anni il ritrovamento del DNA di JCV in cellule non permissive alla replicazione virale ha permesso di ipotizzare che tale

virus possa svolgere un ruolo nell'insorgenza del cancro del colon-retto. Infatti, i riarrangiamenti della NCCR (simil-Mad1), riscontrati nelle cellule colon-rettali di pazienti con MC trattati con infliximab, potrebbe rappresentare un ottimo punto di partenza per esplorare il possibile ruolo del virus JC nella patogenesi del cancro del colon, anche in virtù della natura oncogena dei Polyomavirus umani al momento dimostrata solo *in vitro* [Maginnis and Atwood, 2009; Bellizzi et al., 2012].

Per quanto riguarda lo studio della NCCR nella coorte dei paziente affetti da SMRR e trattati con natalizumab, è stata riscontrata un'organizzazione strutturale di tipo IIS (archetipo CY) nel 68% dei campioni analizzati, mentre nel restante 32% sono state individuate sequenze riarrangiate e/o con caratteristiche mutazioni nucleotidiche. In 4 urine positive al DNA di JCV prelevate rispettivamente a t0, t1, t2 e t3 da un unico paziente affetto da SMRR e STRATIFY JCV® positivo a t3, è stata ritrovata una sequenza caratterizzata da una duplicazione del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1 nel box F con perdita della transizione nucleotidica G→A nella posizione 217 del stesso box. Invece, in 2 campioni di PBMC, appartenenti a 2 diversi pazienti con SMRR e STRATIFY JCV® positivi a t3, è stata ritrovata un'organizzazione della NCCR di tipo IIR, caratterizzata dalla delezione del box B con trasversione T→G all'interno del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare Spi-B, dalla duplicazione del box C e dalla presenza dei box D E ed F.

Infine, nella coorte dei paziente affetti MRIC ed in trattamento da 8 mesi con anticorpi monoclonali anti-TNF- α , in tutti i campioni biologici positivi al DNA di JCV è stata sempre riscontrata un'organizzazione strutturale di tipo IIS (archetipo CY), ad eccezione di un'unica sequenza riarrangiata di tipo IIR così costituita: box A, delezione del box B, duplicazione del box C ed in particolare del sito di legame cre-TAR, inserzione dei 6 nucleotidi iniziali del box D, box E, una nuova duplicazione del box C, una ripetuta inserzione dei 6 nucleotidi iniziali del box D e dell'intero box E ed infine box F completo. Questa sequenza è stata isolata dal plasma di una paziente affetta da PsA con viruria persistente da JC durante tutto il follow-up e con genotipo 2B ritrovato sia nel plasma che nelle urine.

La presenza di riarrangiamenti della NCCR di tipo IIR ritrovati in campioni di PBMC di pazienti con SMRR trattati con natalizumab e con uno STRATIFY JCV® positivo al t3 e nel plasma di una paziente affetta da PsA, trattata con anti-TNF- α e con viruria persistente durante tutto il follow-up, evidenzia come ceppi virali dotati di una maggiore patogenicità possano riversarsi nella circolazione sanguigna sia in forma latente nei PBMC sia sotto forma di virioni liberi nel plasma. In particolare, entrambe le sequenze riarrangiate presentano una delezione del box B con trasversione nucleotidica 37 T→G nel sito di legame per il fattore di trascrizione ematopoietico Spi-B e duplicazioni del box C con duplicazione del sito di legame per l'elemento CRE. Tali riarrangiamenti sono sovrapponibili a sequenze di varianti neurotrope ritrovate da alcuni Autori in pazienti con PML [Marzocchetti et al., 2007; Ferenczy et al., 2012]. In particolare la potenziale

neurovirulenza di queste sequenze riarrangiate di tipo IIR è conferita dalla ripetizione nel box C del sito di legame per l'elemento CRE, uno specifico *enhancer* della replicazione di JCV nelle cellule gliali [Kumar et al., 1996], e dalla formazione del sito di legame ad alta affinità per il fattore di trascrizione ematopoietico Spi-B, la cui espressione è elevata nelle linee cellulari ematopoietiche (CD34+ e cellule B) in cui il virus JC instaura latenza [Lindberg et al., 2008; Major, 2010]. Inoltre, come ampiamente descritto in letteratura, sembra che l'impiego dei FB possa favorire la mobilitazione delle cellule CD34+ e dei linfociti B infettati da JCV che pertanto possono considerati *carriers* in grado di veicolare il virus verso il SNC [Major, 2009; Neumann et al., 2009]. In particolare la transversione nucleotidica 37 T→G, converte il tipico sito di legame per il fattore cellulare Spi-B (5'-AAAAGGGAAGGTA-3') della variante non patogena di tipo IIS (archetipo CY) in quello caratteristico della variante IR PML-associata (Mad-1 e Mad-4) (5'-AAAAGGGAAGGGA-3'), e ciò potrebbe favorire la riattivazione del virus ed il processo di riarrangiamento della NCCR. Inoltre si è visto che questa transversione nucleotidica vada a incrementare la trascrizione dei geni precoci di JCV, in quanto il sito di legame per Spi-B delle varianti PML-associate presenta un'affinità maggiore per la proteina cellulare Spi-B rispetto al sito presente nella variante non patogena [Marshall et al., 2012]. Inoltre, nelle cellule B, Spi-B coopera con la proteina del retino-blastoma (pRB) e con la proteina che lega la TATA box (TBP) regolando l'espressione dei fattori cellulari coinvolti nella maturazione di tali cellule [Gallant and Gilkeson, 2006; Schmidlin et al., 2008.] In particolare Spi-B lega sequenze specifiche presenti in prossimità della TATA box dei promotori genici cellulari al fine di favorire il legame di TBP alla TATA box, richiamare il complesso trascrizionale basale (TFIID), incrementare l'attività della RNA polimerasi di tipo II e quindi avviare la trascrizione genica. Nelle cellule B infettate da JCV invece, Spi-B legando il proprio sito specifico adiacente alla TATA box virale, richiama la proteina TBP cellulare verso la TATA box indirizzando il complesso TFIID cellulare sui promotori della NCCR virale ed attivando la trascrizione delle proteine virali precoci. Questo modello viene attualmente proposto per spiegare l'attivazione dell'espressione genica di JCV nelle cellule ematopoietiche in cui il virus instaura latenza [Marshall et al., 2012]. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per comprendere quali siano i pathway cellulari coinvolti nell'espressione del fattore di trascrizione ematopoietico Spi-B e se tali pathways siano regolati dalla produzione di particolari citochine coinvolte nel controllo dell'infezione virale [Bellizzi et al., 2013].

Infine, il riscontro della transizione nucleotidica del 217 G→T nel box F a livello del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1 è in accordo con dati presenti in letteratura secondo i quali questa mutazione puntiforme è presente nei ceppi europei di JCV, come descritto da Agostini e colleghi [Agostini et al., 1996]. Tuttavia, in 4 urine positive al DNA di JCV prelevate rispettivamente a t0, t1, t2 e t3 da un unico paziente affetto da SMRR e STRATIFY JCV® positivo a t3, è stata ritrovata una sequenza della NCCR caratterizzata da una duplicazione del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1 nel box F con perdita della transizione nucleotidica G→A nella posizione 217 del stesso box. È stato osservato inoltre che NF-1 va ad incrementare

l'espressione dei geni precoci e tardivi di JCV nelle cellule gliali, permissive alla replicazione virale [Shinohara et al., 1997; Monaco et al., 2001]. Pertanto, i siti di legame per NF-1, disposti come sequenze ripetute in tandem sulla NCCR di JCV, potrebbero essere considerati determinanti di specificità per le cellule gliali e quindi determinanti di neurotropismo. La duplicazione del sito di legame per il fattore di trascrizione cellulare NF-1 nel box F, osservata in NCCR isolate da campioni di urine, suggerisce quindi che già a livello dell'epitelio renale, le alterazioni dell'immuno-sorveglianza indotte dal natalizumab, possano esercitare una pressione selettiva sulle varianti di JCV con selezione di quelle che, presentando determinanti di neurotropismo, conferiscono al virus maggiore neurovirulenza.

L'analisi della sequenza della VP1 virale è stata eseguita sui campioni di urina e plasma al fine di stabilire quali fossero i genotipi di JCV circolanti nei pazienti trattati con farmaci biologici. In tutte le coorti di pazienti arruolate è stata osservata una prevalenza dei genotipi 1A e 1B che sono quelli più comunemente riscontrati nelle popolazioni europee [Agostini et al., 2001]. Anche nei due pazienti affetti da SMRR, che dopo un anno di trattamento con natalizumab presentavano nei PBMC sequenze riarrangiate della NCCR di tipo IIR, sono stati ritrovati il genotipo 1A ed il genotipo 1B. Il genotipo 1B inoltre è stato riscontrato in due pazienti affetti da MC, trattati con infliximab e con riarrangimenti della NCCR di tipo IR (simil-Mad1) a livello delle biopsie colon-rettali. Infine il genotipo 2B è stato ritrovato nel plasma e nelle urine di una paziente affetta da PsA con una sequenza della NCCR riarrangiata di tipo IIR nel plasma e con viruria persistente durante tutto il follow-up. Pertanto, sebbene non sia stato possibile stabilire una correlazione statisticamente significativa tra i riarrangimenti della NCCR ed i genotipi di JCV ritrovati in ogni coorte, è stata tuttavia osservata la presenza di un particolare genotipo di JCV per ogni specifico riarrangiamento della NCCR ritrovato. Infine il ritrovamento dei genotipi 1A e 1B nella coorte dei pazienti pediatrici affetti da MC e trattati con infliximab, ha permesso di ipotizzare che, diversamente da quanto osservato da Comar e colleghi, tali genotipi sono quelli maggiormente diffusi nell'Italia centrale. Infatti questi Autori hanno riscontrato la prevalenza del genotipo 2B in pazienti pediatrici affetti da malattie infiammatorie croniche intestinali ed afferenti a diversi ospedali dell'Italia settentrionale [Comar et al., 2013].

In questo studio il genotipo 2B è stato isolato da una paziente con PsA trattata con anti-TNF- α e con una sequenza riarrangiata della NCCR di JCV del tipo IIR nel plasma. Poiché tale genotipo è caratteristico dei pazienti affetti da PML [Hirsch et al., 2013] e che tale riarrangiamento della NCCR è sovrapponibile a quello ritrovato da alcuni Autori in pazienti con PML [Marzocchetti et al., 2007], è importante non sottovalutare il rischio di disseminazione nel circolo sanguigno di varianti particolarmente neurovirulente in pazienti trattati con farmaci biologici.

In conclusione, sebbene non sia stato possibile individuare una reale correlazione tra la presenza di varianti neurovirulente ed il trattamento con specifici farmaci biologici, da questo studio è emerso che durante la diffusione del virus nell'ospite si vadano a selezionare particolari sequenze

della NCCR di JCV e che il trattamento con anticorpi monoclonali sembri avere un ruolo nella selezione di tali varianti. Tuttavia rimane ancora da chiarire quali siano i fattori virali e dell'ospite alla base di questo processo di selezione.

4.5 Conclusioni

In base ai dati riportati in questo studio, è possibile concludere quanto sia importante comprendere se e come lo scenario infiammatorio specifico delle diverse patologie immuno-mediate possa determinare la riattivazione del virus JC dai suoi siti di latenza. In particolare, nei pazienti affetti da MRIC rispetto a quelli affetti da SMRR e MC, è stato osservato che lo specifico *pattern* citochinico determinato dalla patologia, possa giocare un ruolo chiave nello squilibrio dell'immunità cellulo-mediata deputata al controllo dell'infezione da JCV favorendo lo *shedding* urinario del virus. Inoltre, per una più accurata stratificazione del rischio di PML in pazienti trattati con natalizumab, testare la viruria da JC sembrerebbe essere utile per identificare quei pazienti con una risposta umorale JCV-specifica non ancora rilevabile. Inoltre, dato che il numero di pazienti affetti da MC e da MRIC trattati con anti-TNF- α hanno mostrato livelli più elevati di viruria rispetto a quelli osservati nei pazienti con SMRR durante il follow-up, si potrebbe supporre che gli anti-TNF- α favoriscano la riattivazione di JCV a livello dell'epitelio renale rispetto a quanto non faccia il natalizumab.

Inoltre, dai risultati di questo studio si evince l'importanza dell'analisi dei riarrangiamenti della NCCR di JCV. Infatti, il particolare riarrangiamento ritrovato nei PBMC di pazienti con SMRR trattati con natalizumab, potrebbe risultare un buon candidato di neuro-invasività per individuare precocemente quei pazienti con un rischio più elevato di sviluppo di PML. Questa ipotesi è sostenuta dal fatto che il natalizumab, mobilitando i precursori ematopoietici CD34+ e le cellule B infettate dal virus, genera una sovra-espressione del fattore cellulare Spi-B e conseguentemente il processo di riarrangiamento della NCCR virale. Pertanto lo studio dei meccanismi molecolari cellulari coinvolti nella latenza e nella riattivazione di JCV nelle cellule del sangue periferico risulta di sostanziale rilevanza al fine di identificare i pezzi mancanti nel *puzzle* della patogenesi della PML.

Inoltre negli ultimi anni il ritrovamento del DNA di JCV in cellule non permissive alla replicazione virale, come quelle prelevate da pazienti affetti da cancro del colon-retto, ha permesso di ipotizzare che JCV possa svolgere un ruolo nell'insorgenza di tale neoplasia. In particolare, il rilevamento di riarrangiamenti della NCCR virale (simil-Mad1), nelle cellule colon-rettali di pazienti con MC trattati con infliximab potrebbe rappresentare un ottimo punto di partenza per esplorare il possibile ruolo del virus JC nella patogenesi del cancro del colon, anche in virtù della natura oncogena dei Polyomavirus umani al momento dimostrata solo *in vitro* [Maginnis and Atwood, 2009].

Un altro dato importante emerso da questo studio è stata la marcata riduzione dell'espressione dell' $\alpha 4$ integrina sulle cellule linfocitarie deputate al controllo dell'infezione e della riattivazione di JCV in pazienti affetti da SMRR che hanno sviluppato viruria e/o viremia nel primo anno di trattamento con natalizumab. In futuro, la riduzione dell'espressione di questa molecola potrebbe rappresentare un valido biomarcatore da utilizzare durante il monitoraggio della riattivazione di JCV in pazienti trattati con natalizumab per i quali il rischio di sviluppare PML è più elevato rispetto a pazienti trattati con altri farmaci biologici.

In conclusione, dal momento che il numero di pazienti affetti da malattie immuno-mediate e trattati con FB è in continuo aumento, il monitoraggio della riattivazione di JCV e l'analisi della sequenza della NCCR virale potranno rivelarsi utili nel corso della valutazione del rischio d'insorgenza di PML. E' necessario, tuttavia, che queste osservazioni vengano integrate con lo studio dell'interazione molecolare, nelle cellule infettate, tra i cofattori proteici cellulari, come Spi-B, ed i corrispettivi siti di legame specifici presenti sulla NCCR virale. Risulta quindi fondamentale focalizzare l'attenzione sui *pathways* cellulari, finemente regolati dal sistema immunitario dell'ospite, che portano alla riattivazione del virus in condizioni di immunodepressione, dal momento che, fino ad oggi, il trattamento della PML con farmaci anti-virali si è rivelato inefficace.

5. Materiali e metodi

5.1 Reclutamento dei pazienti e raccolta dei campioni

5.1.1 Pazienti affetti da MC e trattati con infliximab (Coorte 1.1) e non trattati con FB (Coorte 1.2)

In questo studio osservazionale prospettico, presso l'Unità di Gastroenterologia e di Epatologia Pediatrica dell'Università di Roma "Sapienza", tra gennaio 2010 e dicembre 2011 sono state reclutate 2 coorti dinamiche di pazienti (Tab. 4.1):

- *Coorte 1.1.* Diciotto pazienti (10 maschi e 8 femmine; età media \pm dev. stand.: 14.61 ± 4.36 anni) con MC attivo e trattati con infliximab sono stati arruolati secondo i seguenti criteri di inclusione: diagnosi di MC confermata da almeno 6 mesi mediante criteri clinici, endoscopici, radiologici e/o istologici; malattia luminale attiva o fistolizzante nonostante adeguata terapia convenzionale a base di antibiotici, glucocorticoidi e antinfiammatori non steroidei (FANS). I criteri di esclusione sono stati: controindicazioni al trattamento con infliximab, come storia pregressa di tubercolosi o radiografia toracica tubercolosi-positiva in assenza di una adeguata profilassi antibiotica, insufficienza cardiaca congestizia, sindrome demielinizzante, sepsi o ascessi, stenosi intestinali sintomatici, storia pregressa o attuale di cancro, assenza del consenso informato. Tutti i dati clinici e anagrafici sono stati raccolti immediatamente prima dell'infusione iniziale con infliximab, somministrato secondo protocollo terapeutico.

- *Coorte 1.2.* Venticinque pazienti affetti da MC (14 maschi e 11 femmine; età media \pm dev. stand.: $14,00 \pm 3,20$ anni) e trattati con terapia convenzionale sono stati arruolati secondo i seguenti criteri di inclusione: diagnosi di MC confermata da almeno 6 mesi mediante criteri clinici, endoscopici, radiologici e/o istologici e assenza di malattia luminale attiva o fistolizzante dopo l'uso di un adeguato trattamento con antibiotici e/o glucocorticoidi e/o FANS.

Dopo l'arruolamento, l'attività clinica del MC è stata valutata mediante l'Indice Pediatrico di Attività della Malattia o PCDAI [Lavagna et al., 2007]. Sono stati raccolti in totale 215 campioni di plasma e 215 campioni di urina ai seguenti tempi di campionamento: alla visita iniziale di arruolamento nello studio (t0) e a 4, 8, 12 e 18 mesi dal t0 (t1, t2, t3 e t4 rispettivamente). In queste due coorti non sono stati raccolti campioni di PBMC a causa della piccola quantità dell'aliquota di sangue intero in EDTA prelevabile. Inoltre, 129 biopsie ileali e 129 biopsie colon-rettali sono state raccolte a t0, t3 e t4.

Infine è stato reclutato un gruppo di controllo di 10 pazienti pediatrici (età media \pm dev. stand.: $12,00 \pm 5,20$ anni) con infiammazione intestinale non classificabile come *Inflammatory Bowel Diseases* (IBD) (Tab. 4.1).

Tabella 4.1 *Caratteristiche dei pazienti affetti da MC arruolati nello studio*

	<i>Coorte 1.1*</i>	<i>Coorte 1.2**</i>	<i>Coorte di controllo pediatrico***</i>
N° Pazienti	18	25	10
Maschi	10	14	4
Femmine	8	11	6
Età mediana (range)	15 (8-22)	14 (2-21)	12 (6-19)
PCDAI‡	>30	10-30	-

‡: l'attività della malattia di tutti i pazienti è stata valutata mediante l'Indice Pediatrico di Attività della Malattia di Crohn (PCDAI) (punteggio: ≤ 10 malattia non attiva; 10-30: malattia lieve; > 30 da attività di malattia da moderata a grave). *: Coorte di pazienti affetti da morbo di Crohn non responsive a terapia convenzionale e quindi trattati con infliximab. **: Coorte di pazienti affetti da morbo di Crohn responsivi a terapia convenzionale. ***: pazienti di controllo con infiammazione intestinale non classificabile come *Inflammatory Bowel Diseases* (IBD).

5.1.2 *Pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab (Coorte 2)*

Presso il Dipartimento di Neurologia e Psichiatria dell'Università di Roma "Sapienza", tra marzo 2012 e marzo 2014 sono stati arruolati pazienti affetti da SMRR con il seguente numero di infusioni di natalizumab (Tab. 4.2a e 4.2b):

- 22 pazienti sono stati arruolati prima dell'inizio del trattamento con il FB (t_0 : *baseline* ovvero numero di infusioni di natalizumab pari a 0), per un totale di 22 campioni di sangue intero in EDTA, 22 campioni di urina e 22 campioni di sangue intero in eparina. Di questi 22 pazienti, 2 hanno sospeso la terapia per reazione allergica al farmaco dopo 2 infusioni e 5 hanno mostrato una scarsa *compliance*. Sui rimanenti 15 pazienti è stato possibile condurre il seguente *follow-up* durante il primo anno di trattamento con natalizumab (*follow-up* < 12 mesi): ogni 4 (t_1), 8 (t_2) e 12 (t_3) infusioni di natalizumab rispettivamente, sono stati prelevati un campione di sangue intero in EDTA, 1 provetta di urine raccolte senza conservanti ed 1 provetta di sangue intero in eparina, per un totale di 45 campioni di sangue intero in EDTA, 45 campioni di urina e 45 campioni di sangue intero in eparina (Tab. 4.2a).

- Oltre alla campionatura effettuata dalla coorte di 15 pazienti sopraindicati, sono stati raccolti un totale di 18 campioni di sangue intero in EDTA (4 prelevati a t_1 , 4 a t_2 e 10 a t_3), 14 campioni di urina (3 prelevati a t_1 , 3 a t_2 e 8 a t_3) e 18 campioni di sangue intero in eparina (4 prelevati a t_1 , 4 a t_2 e 10 a t_3) da altri 15 pazienti affetti da SMRR con un numero medio di infusioni compreso tra 4 e 12 (Tab 4.2b).

Tabella 4.2a Dati clinici e anagrafici dei 15 pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab di cui è stato possibile eseguire il follow-up nei primi 12 mesi di trattamento con prelievi seriali a t0, t1, t2 e t3

Follow-up < 12 mesi	
Femmine/Maschi	7/8
Totale pazienti	15
STRATIFY JCV[®]* +/- t0	1/14
STRATIFY JCV[®]* +/- t3	7/8
Età media (± dev. stand)	33 (± 7,7)
Mediana (range)	34 (19-47)
Media anni di malattia (± dev. stand)	112,4 (± 100,3)
Mediana (range)	84 (12-240)
EDSS** Medio (± dev. stand)	1,9 (± 1,3)
Mediana (range)	2 (0-4)
Nessuna terapia precedente	5
Interferone	10
Glatimer acetato	-

Tabella 4.2b. Dati clinici e anagrafici dei pazienti affetti da SMRR e trattati con natalizumab in base al numero di infusione di FB ricevute

	Baseline 0 infusioni t0	<12 mesi 4-12 infusioni (t1-t3)	13-24 mesi 13-24 infusioni (t4)	>24 mesi > 24 infusioni (t5)
Femmine/Maschi	8/14	13/17	17/5	9/2
Totale pazienti	22	30	22	11
STRATIFY JCV[®]* +/- t0	4/18	5/25	-	-
STRATIFY JCV[®]* +/- t3	-	13/17	6/16	3/8
Età media (± dev. stand)	30,6 (± 6,8)	35 (± 8,4)	38,2 (± 7,6)	39,7 (± 10,6)
Mediana (range)	31 (19-40)	34 (19-51)	37 (27-54)	40 (22-54)
Media anni di malattia (± dev. stand)	84 (± 85,7)	107 (± 89,7)	100 (± 79,2)	75,6 (± 44,9)
Mediana (range)	60 (12-240)	78 (12-300)	72 (12-300)	72 (12-180)
EDSS** Medio (± dev. stand)	1,9 (± 1,3)	2,1 (± 1,0)	2,2 (± 1,1)	2,2 (± 1,0)
Mediana (range)	2 (0-4)	2 (0-4)	2 (1-4)	2 (1-4)
Nessuna terapia precedente	9	9	5	1
Interferone	13	18	12	8
Glatimer acetato	-	3	5	2

*STRATIFY JCV[®]: servizio di supporto fornito dalla Biogen Idec, per la ricerca nel siero degli anticorpi anti-JCV specifici mediante *2-step virus-like particle-based enzyme-linked immunosorbed assay (ELISA)*. L'indagine viene condotta di routine ogni anno nei pazienti in trattamento con natalizumab. Nei pazienti arruolati in questo studio, tale indagine è stata condotta a t0 e t3. **EDSS: l'attività della malattia nei pazienti con SMRR viene indicata mediante il Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS). I valori di questa scala sono compresi tra 0 (esame neurologico normale) e 10 (paziente allettato).

Da ogni campione di sangue intero sono stati successivamente ottenuti i campioni di plasma e di PBMC utilizzati per il saggio di PCR quantitativa (q-PCR). Invece, i campioni di sangue intero in

eparina sono stati utilizzati per l'indagine immuno-fenotipica e di immuno-attivazione e per la valutazione dell'espressione dell' α 4-integrina (CD49d) sulla membrana cellulare delle varie sottopopolazioni linfocitarie isolate. I dati ottenuti dall'indagine immuno-fenotipica e di immuno-attivazione e dalla valutazione dell'espressione dell' α 4-integrina (CD49d) (condotte su un totale di 63 campioni di sangue intero in eparina) sono stati raggruppati nell'unica coorte dei 30 pazienti affetti da SM e con un numero medio di infusioni compreso tra 4 e 12 (< 12 mesi). Sempre per l'analisi dei dati ottenuti da queste due tipologie di analisi, i pazienti di questo gruppo di campionatura sono stati ulteriormente suddivisi in *viremici/virurici* (VIR) e *non viremici e non virurici* (NO VIR) in base alla presenza o meno di DNA di JCV nei campioni di plasma e/o PBMC e/o urine.

- Inoltre, un totale di 38 campioni di sangue intero in EDTA, 34 campioni di urina e 38 campioni di sangue intero in eparina sono stati raccolti da 22 pazienti affetti da SMRR con un numero medio di infusioni compreso tra 13 e 24 (t4); mentre un totale di 18 campioni di sangue intero in EDTA, 14 campioni di urina e 18 campioni di sangue intero in eparina sono stati raccolti da 11 pazienti affetti da SMRR con un numero medio di infusioni maggiore di 24 (t5). Da ogni campione di sangue intero sono stati successivamente ottenuti i campioni di plasma e di PBMC utilizzati per il saggio di PCR quantitativa (q-PCR). Invece, i campioni di sangue intero in eparina sono stati utilizzati per l'indagine immuno-fenotipica e di immuno-attivazione e per la valutazione dell'espressione dell' α 4-integrina (CD49d) sulla membrana cellulare delle varie sottopopolazioni linfocitarie isolate. I dati ottenuti dall'indagine immuno-fenotipica e di immuno-attivazione e dalla valutazione dell'espressione dell' α 4-integrina (CD49d) (condotte su un totale di 56 campioni di sangue intero in eparina) sono stati raggruppati nell'unica coorte dei 27 pazienti affetti da SM e con un numero medio di infusioni > 13 (> 12 mesi). Sempre per l'analisi dei dati ottenuti da queste due tipologie di analisi, i pazienti di questo gruppo di campionatura sono stati ulteriormente suddivisi in *viremici/virurici* (VIR) e *non viremici e non virurici* (NO VIR) in base alla presenza o meno di DNA di JCV nei campioni di plasma e/o PBMC e/o urine.

L'utilizzo del natalizumab per il trattamento della SMRR è stato approvato dall'AIFA come terapia "disease modifying" il 07/12/2006 in determinati gruppi di pazienti secondo criteri ben precisi, che tutti i pazienti reclutati soddisfano [AIFA: Nota informativa sul Tysabri®]. Tali pazienti sono risultati o non responsivi alle terapie immunosoppressive ed immunomodulanti convenzionali o affetti da SMRR a rapida evoluzione (anche non precedentemente trattata con farmaci immunomodulanti o immunosoppressori) nell'anno precedente la terapia (peggioramento del quadro clinico, alto tasso di recidive, rapido aumento della disabilità). Il programma terapeutico ha previsto l'infusione per via endovenosa (IV) di 300 mg di natalizumab ogni 4 settimane (1 infusione al mese) ed esclusivamente per questa coorte di pazienti, in seguito all'attivazione del servizio STRATIFY JCV® da parte della Biogen Idec., è stata valutata nel siero la presenza di anticorpi anti-virus JC specifici a t0 e ogni 12 infusioni di natalizumab (t3: 1 anno di trattamento).

Ad ogni visita di controllo successiva alla prima (tempo t0: visita di arruolamento nello studio, effettuata prima dell'inizio della terapia con natalizumab) sono stati raccolti i campioni da analizzare ed è stata effettuata un'anamnesi dettagliata indirizzata a comprendere sia l'efficacia del farmaco nei confronti dell'attività di malattia sia la possibile insorgenza di alterazioni neuro-cognitive precoci suggestive di una possibile riattivazione di JCV a livello cerebrale. L'attività della malattia è stata valutata mediante il Kurtzke Expanded Disability Status Scale (EDSS), i cui valori sono compresi tra 0 (esame neurologico normale) e 10 (paziente allettato). Parte integrante dell'esame clinico è stata la valutazione neuromotoria e l'esecuzione di RMN, indispensabile ad inizio e fine terapia ed eventualmente eseguibile in corso di trattamento a seconda dell'andamento clinico del paziente. Per quanto concerne il prelievo di campioni di liquor, è stato stabilito che la rachicentesi fosse effettuata esclusivamente nel caso di alterazioni cliniche o neuro-radiologiche in presenza di una replicazione virale nel plasma o nei PBMC. Ogni paziente, opportunamente informato, ha firmato il consenso di adesione allo studio.

5.1.3 Pazienti affetti da MRIC e trattati con FB (Coorte 3)

Un totale di 58 pazienti affetti da MRIC, ed in particolare 22 affetti da AR, 11 da SA ed 25 da PsA, sono stati dinamicamente arruolati presso l'Unità di Reumatologia del Dipartimento di Medicina Interna e di Discipline Mediche dell'Università di Roma "Sapienza", tra febbraio 2013 e marzo 2014 (Tab. 4.3).

Tabella 4.3 Dati clinici dei pazienti affetti da MRIC raccolti ai tempi previsti dal protocollo di follow-up

Diagnosis	PsA	AR	SA
N° totale pazienti	25	22	11
M/F (n)	12/13	2/20	6/5
Età in anni (mediana/range)	52/38-72	56/19-79	47/25-62
Durata della Malattia in mesi (mediana/range)	72/24-480	96/16-372	96/9-420
PCR (mg/dl; mediana/25°-75° percentile)	0.18/0-0.52	0.45/0.07-1.20	0.80/0.2-3.14
VES (mm/h; mediana/25°-75° percentile)	13/8-21	17/14-32	29/8.3-38
HAQ (0-3; media/DS)	0.88 ± 0.68	1.39 ± 0.79	0.97 ± 0.75
DAS28-VES (media/DS)*	3.71 ± 1.11	4.43 ± 1.03	/
DAS28-PCR (media/DS)*	3.28 ± 0.85	3.81 ± 1.12	/
VAS dell'Attività della Malattia per il Medico (0-100 mm, VAS; media/DS)*	42.84 ± 19.07	45.73 ± 20.34	55.82 ± 10.99
VAS dell'Attività della Malattia per il Paziente (0-100 mm, VAS; media/DS)*	50.00 ± 26.18	56.73 ± 26.44	67.45 ± 21.24
BASDAI (1-10; media/DS)**	5.29 ± 2.60	/	6.10 ± 3.34
DMARDs Concomitanti (n/%)	15/60	12/54	3/27
DMARDs e glucocorticoidi concomitanti (n/%)	2/8	8/36	1/9.1
Glucocorticoidi concomitanti (n/%)	5/20	1/5	2/18.2
Nessun trattamento concomitante (n/%)	3/12	1/5	5/45.7

PsA: artrite psoriasica; AR: artrite reumatoide; SA: spondilite anchilosante; PCR: proteina C reattiva; VES: velocità di sedimentazione eritrocitaria; HAQ: Health Assessment Questionnaire; DS: deviazione standard; DAS28: Disease Activity Score su 28 articolazioni; VAS: visual analogue scale; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; DMARDs: disease modifying anti-rheumatic drugs. *Solo per pazienti con PsA ed AR. **Solo per pazienti con PsA e SA.

Dopo aver ottenuto il consenso informato, 56 campioni di urine e 58 campioni di sangue intero in EDTA sono stati prelevati prima dell'inizio del trattamento con anti-TNF- α (t0: *baseline*). Successivamente, 42 campioni di urine and 46 campioni di sangue intero in EDTA sono stati prelevati dopo 4 mesi di trattamento con anti-TNF- α (t1) e 22 campioni di urine and 22 campioni di sangue intero in EDTA sono stati raccolti dopo 8 mesi di trattamento con FB (t2). Questi pazienti sono stati trattati esclusivamente con farmaci anti-reumatici *disease modifying* (DMARDs) e/o glucocorticoidi prima di essere inclusi nel programma terapeutico con biologici (t0), in quanto non

responsivi al trattamento esclusivo con DMARDs. Tuttavia, per questa categoria di pazienti, è previsto l'uso concomitante di DMARDs durante il trattamento con anti-TNF- α . Dopo aver ottenuto il consenso informato, i dati anagrafici e clinici (sesso, età, diagnosi, piano terapeutico ed indici di attività della malattia) sono stati raccolti a t0, prima dell'inizio della terapia con biologici, ed aggiornati durante il follow-up (Tab. 4.3a e 4.3b). Per tutti i pazienti sono stati considerati i valori di *Visual Analogue Scale* (VAS) dell'attività della malattia secondo il paziente e secondo il medico [Lesuis et al., 2012] l'*Health Assessment Questionnaire* (HAQ) [Fries et al., 1982], ed i valori della proteina C reattiva (PCR) (mg/l) ed alla velocità di eritrosedimentazione (VES) (mm/h). Per i pazienti affetti da AR e PsA l'attività della malattia è stata valutata mediante il *Disease Activity Score* (DAS) calcolato sullo stato di 28 articolazioni in relazione ai valori di PCR e/o della VES, con punteggio crescente in base alla gravità della sintomatologia [Lesuis et al., 2012]. Per i pazienti affetti da SA invece, l'attività della malattia è stata valutata facendo riferimento al *Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index* (BASDAI), che va da un punteggio minimo di 0 (nessuna attività) ad un punteggio massimo di 10 (massima attività) [Garrett et al., 1994].

Infine, sono stati arruolati 19 soggetti sani (9 maschi, 10 femmine, età media \pm dev. st.: 35,94 \pm 6,56 anni) come *gruppo di controllo*. In questo gruppo, 19 campioni di plasma, 19 campioni di PBMC e 19 campioni di urina sono stati raccolti al tempo unico t0.

5.2 *Analisi in biologia molecolare per l'indagine virologica*

I campioni raccolti sono stati sottoposti ad estrazione del DNA metagenomico al fine di effettuare le seguenti analisi:

- ricerca del DNA di JCV su urina, plasma, PBMC ed eventualmente liquor con la metodica della PCR quantitativa Real Time (q-PCR);
- sequenziamento genico della NCCR e della VP1 di JCV nei campioni risultati positivi q-PCR.

5.2.1 *Isolamento dei PBMC da sangue intero ed estrazione del DNA metagenomico*

Le cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC) sono state isolate da sangue intero conservato in EDTA mediante la tecnica di centrifugazione in gradiente di densità da Ficoll Hystopaque [Bøyum et al., 1991] e la conta dei linfociti vitali è stata effettuata mediante esclusione con trypan blue in camera di Burkett. Successivamente il DNA metagenomico è stato estratto da 10⁶ PBMC mediante il QIAmp[®] DNA Blood Kit (QIAGEN S.p.A, Milano, Italia), seguendo le istruzioni fornite dalla casa produttrice. Una volta estratto, il DNA è stato conservato a -20°C fino al successivo utilizzo.

5.2.2 Estrazione del DNA metagenomico dal plasma

A 200 µl di plasma prelevato in EDTA, sono stati aggiunti 20 µl di proteinasi K a 200 µg/ml e 180 µl di tampone di lisi (10 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA pH 7.2, 10 mM NaCl, 0.5% sodiododecilsolfato o SDS) ed incubati per 2 ore a 55°C e 10 minuti a 70°C. Successivamente è stato aggiunto etanolo assoluto e il tutto è stato trasferito su colonne monouso a scambio ionico, fornite dal DNeasy® Blood miniKit (QIAGEN S.p.A, Milano, Italia). Il DNA così isolato è stato eluito per scambio ionico in un volume di 100 µl, quantificato ad un O.D. 260 nm in spettrofotometria e usato direttamente per le reazioni di PCR.

5.2.3 Estrazione del DNA metagenomico dalle urine

Ad 1 ml di urine prelevate senza conservanti, sono stati aggiunti 50 µl di proteinasi K a 200 µg/ml e 500 µl di tampone di lisi (10 mM Tris-HCl pH 8.1, 10 mM EDTA pH 7.2, 10 mM NaCl, 0.5% sodiododecilsolfato o SDS) e incubati per due ore a 55°C e 10 minuti a 70°C. Successivamente è stato aggiunto etanolo assoluto e il tutto è stato trasferito su colonne monouso a scambio ionico, fornite dal DNA con DNeasy® Tissue Kit (QIAGEN S.p.A, Milano, Italia). Il DNA così isolato è stato eluito per scambio ionico in un volume di 200 µl, quantificato ad un O.D. 260 nm in spettrofotometria e usato direttamente per le reazioni di PCR.

5.2.4 Saggi di PCR

Il DNA estratto dai campioni di urina, plasma e PBMC è stato analizzato mediante PCR di tipo quantitativo (q-PCR) per la quantificazione del DNA di JCV. I campioni positivi sono stati successivamente sottoposti a PCR qualitativa con primers specifici per la regione genica della NCCR e della VP1 virale rispettivamente, e a successivo sequenziamento diretto del prodotto di PCR così ottenuto.

5.2.4.1 q-PCR JCV-specifica

La q-PCR è stata eseguita utilizzando la 7300 Real Time PCR System (AB Applied Biosystems). Le amplificazioni mediante PCR sono state ottenute in un volume di reazione di 25 µl contenente 5 µl del campione di DNA, la miscela di reazione per l'amplificazione quantitativa, i primers forward e reverse per l'antigene T di JCV ed infine la sonda TaqMan costruita a partire dalla sequenza amplificata dai due primers. I cicli termici previsti per l'amplificazione comprendono un primo passaggio di denaturazione della durata di 2 min a 50 °C, seguito da 40 cicli a 95 °C per 10 minuti, 95 °C per 15 s, 60 °C per 1 minuto, alla fine dei quali viene letta la fluorescenza. I dati dell'avvenuta amplificazione sono stati analizzati con il software fornito dal produttore. Le curve standard per la quantificazione di JCV sono state costruite utilizzando diluizioni seriali (da 10⁵ a 10² copie) di un plasmide contenente l'intero genoma di JCV (ADVANCED BIOTECHNOLOGIES

Inc., Columbia, MD). Tutti i campioni sono stati testati in triplo ed il numero di copie del DNA di JCV in ogni campione è stato calcolato tramite la curva standard. I dati sono stati espressi come copie di genomi equivalenti (gEq) di DNA virale per millilitro (gEq/ml) per i campioni di plasma e urina, e come copie di gEq di DNA virale su 10^6 cellule (gEq/ 10^6 cellule) per i campioni di PBMC e come copie di gEq di DNA virale su 2,5 mg di tessuto biptico per le biopsie intestinali (gEq/mg). Per prevenire la contaminazione durante l'esecuzione della q-PCR, sono state adottate tutte le convenzionali precauzioni da adottare durante l'allestimento di una PCR. Il controllo negativo (NTC) è stato incluso in ogni reazione di amplificazione. La sensibilità della q-PCR è di circa 10 molecole di DNA target in 10 μ l di DNA totali.

5.2.4.2 PCR nested specifica per la NCCR di JCV

I campioni risultati positivi alla Q-PCR per JCV sono stati sottoposti ad amplificazione specifica per la RR di mediante nested PCR, utilizzando come primer esterni BKTT1 (5'-AAG GTC CAT GAG CTC CAT GGA TTC TTC C-3') e BKTT2 (5'-CTA GGT CCC CCA AAA GTG CTA GAG CAG C-3'), e come primer interni JC1 (5'-CCT CCA CGC CCT TAC TAC TTC TGA G-3') e JC2 (5'-AGC CTG GTG ACA AGC CAA AAC AGC TCT-3'). Il prodotto finale di questa PCR nested è costituito da un frammento di 308 pb [Pietropaolo et al., 2003]. L'amplificazione è stata effettuata in un volume di reazione di 45 μ l, contenente 10 pmol di ciascun primers, 0,2 mM di dNTP, 1,5 mM di $MgCl_2$ e 2U di BioTaq DNA polimerasi in un adeguato tampone di reazione (Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM). Nella prima reazione di amplificazione 5 μ l di DNA sono stati aggiunti alla mix di PCR mentre nella seconda reazione sono stati aggiunti 1 μ l di DNA template ottenuto dalla prima amplificazione. La PCR è stata effettuata utilizzando la GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA). Il test è stato eseguito su DNA totale purificato ad una concentrazione di almeno 50 ng/ μ l. I campioni sono stati amplificati secondo i seguenti cicli termici:

- prima nested: 1 ciclo di denaturazione a 95 °C per 3 minuti, seguito da 45 cicli a 95 °C per 30 s, annealing per 1 min a 55 °C ed estensione per 1 min e 30 s a 72 °C. Il processo di amplificazione si conclude con un ciclo di estensione finale a 72 °C per 5 minuti;

- seconda nested: 1 ciclo di denaturazione a 95 °C per 3 minuti, seguito da 30 cicli a 95 °C per 30s, annealing per 30 s a 68 °C ed estensione per 30 s a 72 °C. Il processo di amplificazione si conclude con un ciclo di estensione finale a 72 °C per 5 minuti.

In tutte le reazioni di amplificazione sono stati inseriti controlli positivi e negativi, al fine di escludere falsi positivi e falsi negativi. I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% in tampone TBE (0.89 M Tris, 0.89 M acido borico, 0.02 M EDTA, pH 8.2) contenente bromuro di etidio (EtBr) alla concentrazione finale di 1 μ L/ml. Le bande di positività sono state evidenziate mediante esposizione agli ultravioletti.

5.2.4.3 PCR specifica per la regione genica della VP1 di JCV

Per amplificare la regione VP1 di JCV è stata eseguita un'unica reazione di PCR, utilizzando la GeneAmp PCR System 9600 (Perkin-Elmer Cetus, Emeryville, CA). Come primer sono stati impiegati JLP15 (1710-1734 nt) (5'-ACA GTG TGG CCA GAA TTC ACT ACC-3') e JLP16 (1924-1902 nt) (5'-TAA AGC CTC CCC CCC CAA CAG AAA-3') che definiscono un segmento di 215 bp [Agostini et al., 2001]. L'amplificazione è stata effettuata in un volume di reazione di 20 µL contenente 25 pmol/µL di ciascun primer, 0,4 mM di dNTP, 2,5 mM di MgCl₂, 2U di BioTaq DNA polimerasi, 10x buffer NH₄ Bioline e 5 µL di DNA campione.

In seguito alla denaturazione iniziale a 95 °C per 9 minuti, si hanno 40 cicli a 95 °C per 40 s, 1 ciclo di annealing a 63 °C per 40 s ed 1 ciclo di estensione a 72 °C per 40 s, il protocollo di amplificazione veniva concluso con un ciclo di estensione a 72 °C per 7 min [Agostini et al., 1997].

I prodotti di PCR sono stati analizzati mediante elettroforesi su gel d'agarosio al 2% in tampone TBE (0.89 M Tris, 0.89 M acido borico, 0.02 M EDTA, pH 8.2) contenente EtBr alla concentrazione finale di 1 µL/ml. Le bande di positività sono state evidenziate mediante esposizione agli ultravioletti.

5.2.5 Sequenziamento della NCCR e della VP1 di JCV e analisi delle sequenze

I prodotti di PCR corrispondenti alla NCCR e alla VP1 di JCV, sono stati successivamente purificati e sequenziati.

Gli amplificati sono stati purificati in modo da rimuovere l'eccesso di primers e di sali usando il kit QIAquick PCR (QIAGEN). Il sequenziamento del DNA è stato eseguito *in service* (BioFab research s.r.l., Roma, Italia).

L'analisi di omologia e di allineamento multiplo delle sequenze ottenute sono state eseguite con il software BLAST® [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>] e ClustalW2 [<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>]. Le sequenze sono state confrontate tra di loro e con quelle di ceppi di JCV di riferimento depositate nella Banca Dati EMBL e Gene Bank.

5.3 Analisi Immunofenotipica

Vari studi finora eseguiti hanno mostrato come l'utilizzo di natalizumab possa determinare delle modificazioni immunologiche nei pazienti trattati, con risultati a volte anche discordanti fra loro. Il nostro studio si propone pertanto di individuare quelle modificazioni cellulari che possono verificarsi in corso di trattamento con natalizumab attraverso la metodica della citometria a flusso (FACS) con utilizzo di anticorpi monoclonali. Le sottopopolazioni linfocitarie analizzate sono mostrate in Figura 4.1.

Su tutte queste popolazioni linfocitarie verranno valutati i livelli di espressione del marcatore CD49d ($\alpha 4$ integrina) molecola bersaglio del natalizumab. La valutazione dell'espressione del marcatore CD49d è stata effettuata mediante il Mean Fluorescence Intensity (MFI), ovvero l'intensità media di fluorescenza: più elevato è questo valore, maggiore è l'espressione del marcatore stesso sulla popolazione cellulare studiata.

Pertanto, per l'analisi immunofenotipica dei campioni di sangue intero sono stati utilizzati i seguenti anticorpi monoclonali coniugati a fluorocromi:

- Pacific blue anti-human-**CD3**,
- Pacific blue anti-human-**CD45**,
- phycoerythrin (PE) anti-human-**CD57**,
- peridinin chlorophyll protein (PerCP)/Cyanine (Cy)5.5 anti-human-**HLA-DR**,
- PerCP anti-human-**CD3**,
- PE/Cy7 anti-human-**CD8**,
- allophycocyanin (APC) anti-human-**D38**,
- APC/Cy7 anti-human-**CD4** (Biolegend[®]),
- Fluorescein isothiocyanate (FITC) anti-human-**CD28**,
- FITC anti-human-**CD27**,
- PE anti-human-**CD45RO** (BD Biosciences[®]),
- Pe/Vio 770 anti-human-**CD8** (Biolegend[®]),
- APC anti-human-**CD49d** (Biolegend[®])
- APC/Vio 770 anti-human-**CD4** (Biolegend[®])

Tutti gli anticorpi sono stati titolati prima dell'utilizzo. Il protocollo di marcatura prevedeva l'impiego di campioni di sangue intero. Per ciascun paziente sono stati preparati due tubi da citofluorimetria contenenti le seguenti combinazioni di anticorpi monoclonali:

primo tubo: Pacific blue anti-human-**CD3**, FITC anti-human-**CD28**, PE anti-human-**CD57**, PerCP/Cy5.5 anti-human-**HLA-DR**, PE/Cy7 anti-human-**CD8**, APC anti-human-**CD38**, APC/Cy7 anti-human-**CD4** per la determinazione dell'attivazione dei linfociti T CD4+ e T CD8+.

secondo tubo: Pacific blue anti-human-**CD45**, FITC anti-human-**CD27**, PE anti-human-**CD45RO**, PerCP anti-human-**CD3**, PE/Cy7 anti-human-**CD8**, APC/Cy7 anti-human-**CD4** per la determinazione delle varie sottopopolazioni dei linfociti T CD4+ e T CD8+ (Figura 4.1).

terzo tubo: Pacific Blue anti-human-**CD45**, FITC anti-human-**CD27**, PE anti-human-**CD45RO**, PerCp anti-human-**CD3**, Pe/Vio 770 anti-human-**CD8**, APC anti-human-**CD49d**, APC/Vio 770

anti-human-**CD4** per la valutazione dell'espressione dell' $\alpha 4$ -integrina (CD49d) sulla membrana cellulare delle varie sottopopolazioni linfocitarie isolate

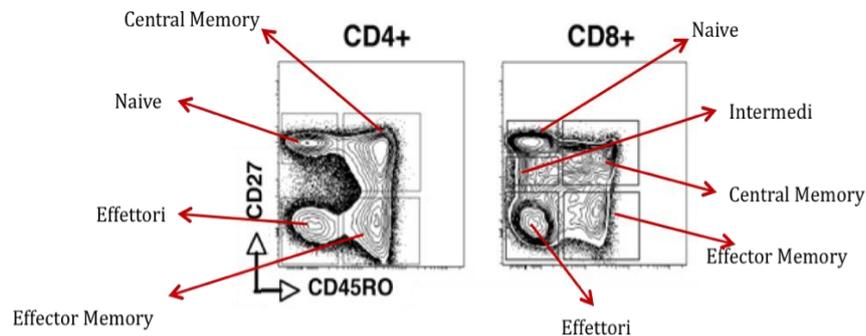


Figura 4.1 Marcatori di superficie utilizzati per la definizione delle sottopopolazioni dei linfociti T CD4 e CD8: visualizzazione in citofluorimetria. In seguito alla marcatura con CD27 e CD45RO, le cellule T CD4+ e CD8+ naïve sono CD27+/CD45RO-; le cellule CD4+ e CD8+ central memory sono CD27+/CD45RO+; le cellule CD4+ e CD8+ effector memory sono CD27-/CD45RO+ ed infine quelle effettori sono CD27-/CD45RO-.

In ogni tubo sono stati aggiunti 50 μ l di sangue intero. I tubi sono stati agitati per 10 secondi e successivamente incubati al buio, a 4°C, per 20 minuti. Dopo l'incubazione, in ciascun tubo sono stati aggiunti 450 μ l di soluzione lisante (preparata mediante diluizione 1:10 della Lysing Solution 10x [BD] con acqua bidistillata sterile). I tubi sono stati nuovamente agitati per 10 secondi ed incubati per altri 10 minuti al buio, a temperatura ambiente. I campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 300g, il sovrantante è stato rimosso ed è stato effettuato un lavaggio con soluzione di phosphate buffered saline (PBS) contenente 1% bovina serum albumine (BSA) e 0.1% azide di sodio (NaN₃). Dopo una ulteriore centrifugazione a 300g per 5 minuti il campione è stato risospeso in 250 μ l della soluzione 1% BSA, 0.1% NaN₃ e PBS. A questo punto i campioni marcati sono stati analizzati con un citofluorimetro equipaggiato con tre laser, otto canali di fluorescenza e 10 parametri complessivi (MACSQuant, Miltenyi). Sono stati acquisiti 50.000 eventi per ogni campione analizzato nel gate dei linfomonociti.

Per la definizione del limite tra la positività e la negatività dell'espressione di HLA-DR e CD38 è stata impiegata la metodica della "fluorescence minus one" (FMO). Tale procedura prevede la preparazione, per ciascun soggetto esaminato, di alcuni campioni in cui sono presenti tutti gli anticorpi monoclonali della miscela utilizzata, ad eccezione dell'anticorpo per cui si vuole determinare il gate per la popolazione positiva. Questo permette di definire e localizzare la popolazione di eventi negativa nel canale del fluorocromo coniugato all'anticorpo mancante nel mix. I dati ottenuti sono stati successivamente analizzati mediante software FlowJo versione 8.7.

5.4 *Analisi Clinico-Neurologica*

Ad ogni incontro clinico il paziente è stato “stadiato” da un punto di vista motorio e neuro cognitivo. A tal fine sono stati utilizzati il *MSQoL-54* , test standardizzato per la valutazione della capacità e dell’indipendenza motoria dedicato agli individui affetti da SMRR. La sfera neuro-cognitiva è stata studiata attraverso il *Rao’s Brief Repeatable Battery and Stroop Test* corredato da aggiustamenti per età, sesso e livello culturale.

5.5 *Analisi statistica*

I dati sono stati sintetizzati mostrando la media e la deviazione standard dei valori. Nel momento in cui lo Z test indicava una distribuzione non-normale dei valori, si ricorreva all’utilizzo di test non parametrici come il Mann–Whitney U test e il Kruskal–Wallis test. I dati categoriali sono stati analizzati mediante il χ^2 test e lo Student's t test. Valori di p value < 0.05 sono stati considerati statisticamente significativi. Il MYSTAT 12 software version 12.01.04 è stato utilizzato per effettuare l’analisi statistica dei dati.

6. Bibliografia

- Agostini HT, Deckhut A, Jobes DV, Girones R, Schlunck G, Prost MG, Frias C, Pérez-Trallero E, Ryschkewitsch CF, Stoner GL (2001) Genotypes of JC virus in East, Central and Southwest Europe. *J Gen Virol* 82: 1221-1331.
- Agostini HT, Ryschkewitsch CF, Stoner GL (1996) Genotype profile of human polyomavirus JC excreted in urine of immunocompetent individuals. *J Clin Microbiol* 34(1): 159-164.
- Agostini HT, Yanagihara R, Davis V, Ryschkewitsch CF, Stoner GL (1997) Asian genotypes of JC virus in Native Americans and in a Pacific Island population: markers of viral evolution and human migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 94(26): 14542-14546.
- Ahsan N, Shah KV (2006) Polyomaviruses and human diseases. *Adv Exp Med Biol* 577: 1-18.
- AIFA: Nota informativa sul Tysabri® - <http://www.agenziafarmaco.gov.it/it/content/nota-informativa-importante-su-tysabri-natalizumab-18022010>
- Allander T, Andreasson K, Gupta S, Bjerkner A, Bogdanovic G, Persson MA, Dalianis T, Ramqvist T, Andersson B (2007) Identification of third human polyomavirus. *J Virol* 81: 4130-4136.
- Amemiya K, Traub R, Durham L, Major EO (1992) Adjacent nuclear factor-1 and activator protein binding sites in the enhancer of the neurotropic JC virus. A common characteristic of many brain-specific genes. *J Biol Chem* 267: 14204-14211.
- Andreoletti L, Lescieux A, Lambert V, Si-Mohamed A, Matta M, Wattré P, Belec L (2002) Semiquantitative detection of JCV-DNA in peripheral blood leukocytes from HIV-1-infected patients with or without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Med Virol* 66: 1-7.
- Astrom KE, Mancall EL, Richardson EP Jr (1958) Progressive multifocal leuko-encephalopathy; a hitherto unrecognized complication of chronic lymphatic leukaemia and Hodgkin's disease. *Brain* 81(1): 93-111.
- Atlas of MS 2013 - <http://www.atlasofms.org/index.aspx>
- Austin JW, Fehlings MG (2008) Molecular mechanisms of Fas-mediated cell death in oligodendrocytes. *J Neurotrauma* 25: 411-426.
- Bayliss WM, Starling EH (1900) The movements and innervation of the large intestine. *J Physiol* 26: 107-118.
- Bellizzi A, Anzivino E, Ferrari F, Di Nardo G, Colosimo MT, Fioriti D, Mischitelli M, Chiarini F, Cucchiara S, Pietropaolo V (2011) Polyomavirus JC reactivation and noncoding control region sequence analysis in pediatric Crohn's disease patients treated with infliximab. *J Neurovirol* 17(4): 303-313.
- Bellizzi A, Anzivino E, Rodio DM, Palamara AT, Nencioni L, Pietropaolo V (2013) New insights on human polyomavirus JC and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Clin Dev Immunol* 2013: 839719. doi: 10.1155/2013/839719.
- Bellizzi A, Nardis C, Anzivino E, Rodio DM, Fioriti D, Mischitelli M, Chiarini F, Pietropaolo V (2012) Human polyomavirus JC reactivation and pathogenetic mechanisms of progressive multifocal leukoencephalopathy and cancer in the era of monoclonal antibody therapies. *J Neurovirol* 18: 1-11.
- Benucci M, Saviola G, Baiardi P, Manfredi M, Sarzi, Puttini P, Atzeni F (2012) Determinants of Risk Infection During Therapy with Anti TNF-Alpha Blocking Agents in Rheumatoid Arthritis. *Open Rheumatol J* 6: 33-37.
- Berger JR, Houff S (2009) Opportunistic infections and other risks with newer multiple sclerosis therapies. *Ann Neurol* 65: 367-377.

- Berger M, Shankar V, Vafai A (2002) Therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Am J Med Sci* 324: 14-30.
- Beutler B, Krochin N, Milsark IW, Luedke C, Cerami A (1986) Control of cachectin (tumor necrosis factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. *Science* 232: 977-980.
- Bijlsma JW (2012) Disease control with glucocorticoid therapy in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 51(Suppl 4): iv9-13. doi: 10.1093/rheumatology/kes086.
- Blake K, Pillay D, Knowles W, Brown DW, Griffiths PD, Taylor B (1992). JC virus associated meningoencephalitis in an immunocompetent girl. *Arch Dis Child* 67: 956-957.
- BLAST® Basic Local Alignment Search Tool: - <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, Lee S, Plavina T, Scanlon JV, Sandrock A, Bozic C (2012) Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med* 366: 1870-1880.
- Blotta MH, Dekruyff RH, Umetsu DT (1997) Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. *J Immunol* 158: 5589-5595.
- Boland CR, Luciani MG, Gasche C, Goel A (2005) Infection, inflammation, and gastrointestinal cancer. *Gut* 54: 1321-1331.
- Bollag B, Hofstetter CA, Reviriego-Mendoza MM, Frisque RJ (2010) JC virus small T antigen binds phosphatase PP2A and Rb family proteins and is required for efficient viral DNA replication activity. *PLoS One* 5: e10606. doi:10.1371/journal.pone.0010606.
- Bongartz T, Sutton AJ, Sweeting MJ, Buchan I, Matteson EL, Montori V (2006) Anti-TNF antibody therapy in rheumatoid arthritis and the risk of serious infections and malignancies: systematic review and meta-analysis of rare harmful effects in randomized controlled trials. *JAMA* 296: 2275-2285.
- Boumpas DT, Chrousos GP, Wilder RL, Cupps TR, Balow JE (1993) Glucocorticoid therapy for immune-mediated diseases: basic and clinical correlates. *Ann Intern Med* 119: 1198-1208.
- Bøyum A, Løvhaug D, Tresland L, Nordlie EM (1991). Separation of leucocytes: improved cell purity by fine adjustments of gradient medium density and osmolality. *Scand J Immunol* 34: 697-712
- Brew BJ, Davies NW, Cinque P, Clifford DB, Nath A (2010) Progressive multifocal leukoencephalopathy and other forms of JC virus disease. *Nat Rev Neurol* 6: 667-679.
- Brooks DG, Trifilo MJ, Edelman KH, Teyton L, McGavern DB, Oldstone MB (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 12: 1301-1309.
- Burnett-Hartman AN, Newcomb PA, Potter JD (2008) Infectious agents and colorectal cancer: a review of *Helicobacter pylori*, *Streptococcus bovis*, JC virus, and human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 2970-2979.
- Calabrese LH, Molloy ES, Huang D, Ransohoff RM (2007) Progressive multifocal leukoencephalopathy in rheumatic diseases: evolving clinical and pathologic patterns of disease. *Arthritis Rheum* 56: 2116-2128.
- Caldarelli-Stefano R, Boldorini R, Monga G, Meraviglia E, Zorini EO, Ferrante P (2000) JCV in human glial-derived tumors. *Hum Pathol* 31: 394-395.

Caldarelli-Stefano R, Vago L, Omodeo-Zorini E, Mediati M, Losciale L, Nebuloni M, Costanzi G, Ferrante P (1999) Detection and typing of JC virus in autopsy brains and extraneural organs of AIDS patients and non-immunocompromised individuals. *J Neurovirol* 5: 125-133.

Caracciolo V, Reiss K, Khalili K, De Falco G, Giordano A (2006) Role of the interaction between large T antigen and Rb family members in the oncogenicity of JC virus. *Oncogene* 25: 5294-5301.

Carson KR, Evens AM, Richey EA, Habermann TM, Focosi D, Seymour JF, Laubach J, Bawn SD, Gordon LI, Winter JN, Furman RR, Vose JM, Zelenetz AD, Mamtani R, Raisch DW, Dorshimer GW, Rosen ST, Muro K, Gottardi-Littell NR, Talley RL, Sartor O, Green D, Major EO, Bennett CL (2009a) Progressive multifocal leukoencephalopathy after rituximab therapy in HIV-negative patients: a report of 57 cases from the Research on Adverse Drug Events and Reports project. *Blood* 113: 4834-4840.

Carson KR, Focosi D, Major EO, Petrini M, Richey EA, West DP, Bennett CL (2009b) Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project. *Lancet Oncol* 10: 816-824.

Carswell S, Alwine JC (1986) Simian virus 40 agnoprotein facilitates perinuclear-nuclear localization of VP1, the major capsid protein. *J Virol* 60(3): 1055-1061.

Chang D, Liou ZM, Ou WC, Wang KZ, Wang M, Fung CY, Tsai RT (1996) Production of the antigen and the antibody of the JC virus major capsid protein VP1. *J Virol Methods* 59: 177-187.

Chen NN, Kerr D, Chang CF, Honjo T, Khalili K (1997) Evidence for regulation of transcription and replication of the human neurotropic virus JCV genome by the human S(mu)bp-2 protein in glial cells. *Gene* 185: 55-62.

Chen NN, Khalili K (1995) Transcriptional regulation of human JC polyomavirus promoters by cellular proteins YB-1 and Pur alpha in glial cells. *J Virol* 69: 5843-5848.

Chen Y, Bord E, Tompkins T, Miller J, Tan CS, Kinkel RP, Stein MC, Viscidi RP, Ngo LH, Koralnik IJ (2009) Asymptomatic reactivation of JC virus in patients treated with natalizumab. *N Engl J Med* 361: 1067-1074

Cinque P, Koralnik IJ, Gerevini S, Miro JM, Price RW (2009). Progressive multifocal leukoencephalopathy in HIV-1 infection. *Lancet Infect Dis* 9: 625-636

Clifford DB, Ances B, Costello C, Rosen-Schmidt S, Andersson M, Parks D, Perry A, Yerra R, Schmidt R, Alvarez E, Tyler KL (2011) Rituximab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in rheumatoid arthritis. *Arch Neurol* 68(9): 1156-1164.

ClustalW2 - multiple sequence alignment - <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>

Coelho TR, Almeida L, Lazo PA (2010) JC virus in the pathogenesis of colorectal cancer, an etiological agent or another component in a multistep process? *Virol J* 7: 42. doi: 10.1186/1743-422X-7-42.

Coisne C, Mao W, Engelhardt B (2009) Cutting edge: Natalizumab blocks adhesion but not initial contact of human T cells to the blood-brain barrier *in vivo* in an animal model of multiple sclerosis. *J Immunol* 182: 5909-5913.

Cole CN (1996) Polyomaviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM and Howley PM, editors. *Fundamental Virology*, Third edition, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 917-946.

Comar M, Delbue S, Lepore L, Martelossi S, Radillo O, Ronfani L, D'Agaro P, Ferrante P (2013) Latent viral infections in young patients with inflammatory diseases treated with biological agents: prevalence of JC virus genotype 2. *J Med Virol* 5(4): 716-722.

- Conte MP, Schippa S, Zamboni I, Penta M, Chiarini F, Seganti L, Osborn J, Falconieri P, Borrelli O, Cucchiara S (2006) Gut-associated bacterial microbiota in paediatric patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 55: 1760-1767.
- Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, Williams B, Gabriel S, Lassere M, Johns N, Buchbinder R, Woolf A, March L (2014) The global burden of rheumatoid arthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis* 73(7): 1316-1322. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204627.
- Croul S, Otte J, Khalili K (2003) Brain tumors and polyomaviruses. *J Neurovirol* 9: 173-182.
- Cubitt CL, Cui X, Agostini HT, Nerurkar VR, Scheirich I, Yanagihara R, Ryschkewitsch CF, Stoner GL (2001) Predicted amino acid sequences for 100 JCV strains. *J Neurovirol* 7: 339-344.
- Dalianis T, Ramqvist T, Andreasson K, Kean JM, Garcea RL (2009) KI, WU and Merkel cell polyomaviruses: a new era for human polyomavirus research. *Semin Cancer Biol* 19: 270-275.
- Damania B, Mital R, Alwine JC (1998) Simian virus 40 large T antigen interacts with human TFIIB-related factor and small nuclear RNA activating protein complex for transcriptional activation of TATA containing polymerase III promoters. *Mol Cell Biol* 18: 1331-1338.
- Dang X, Koralnik IJ (2006). A granule cell neuron-associated JC virus variant has a unique deletion in the VP1 gene. *J Gen Virol* 87: 2533-2537
- Dang X, Wüthrich C, Gordon J, Sawa H, Koralnik IJ (2012) JC virus encephalopathy is associated with a novel agnoprotein-deletion JCV variant. *PLoS One* 7(4): e35793. doi: 10.1371/journal.pone.0035793.
- Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer MA, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF (2004) High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 127(2): 412-421.
- Darrah PA, Hegde ST, Patel DT, Lindsay RW, Chen L, Roederer M, Seder RA (2010) IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. *J Exp Med* 207: 1421-1433.
- Dejager L, Vandevyver S, Petta I, Libert C (2014) Dominance of the strongest: Inflammatory cytokines versus glucocorticoids. *Cytokine Growth Factor Rev* 25(1): 21-33.
- Del Valle L, Gordon J, Assimakopoulou M, Enam S, Geddes JF, Varakis JN, Katsetos CD, Croul S, Khalili K (2001) Detection of JC virus DNA sequences and expression of the viral regulatory protein T-antigen in tumors of the Central Nervous System. *Canc Res* 61: 4287-4293.
- Del Valle L, Khalili K (2010) Detection of human polyomavirus proteins, T-antigen and agnoprotein, in human tumor tissue arrays. *J Med Virol* 82: 806-811.
- Delbue S, Branchetti E, Bertolacci S, Tavazzi E, Marchioni E, Maserati R, Minnucci G, Tremolada S, Vago G, Ferrante P (2009) JC virus VP1 loop-specific polymorphisms are associated with favorable prognosis for progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurovirol* 15(1): 51-56.
- Delbue S, Comar M, Ferrante P (2012) Review on the relationship between Human Polyomaviruses-Associated Tumors and Host Immune System. *Clin Dev Immunol* 2012: 542092. doi: 10.1155/2012/542092.
- Delbue S, Ferrarresso M, Ghio L, Carloni C, Carluccio S, Belingheri M, Edefonti A, Ferrante P (2013) A review on JC Virus infection in kidney transplant recipients. *Clin Dev Immunol* 2013: 926391. doi: 10.1155/2013/926391.

- Diotti RA, Nakanishi A, Clementi N, Mancini N, Criscuolo E, Solforosi L, Clementi M (2013) JC polyomavirus (JCV) and monoclonal antibodies: friends or potential foes? *Clin Dev Immunol* 2013: 967581. doi: 10.1155/2013/967581.
- Disanto G, Morahan JM, Ramagopalan SV (2012) Multiple sclerosis: risk factors and their interactions. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 11(5): 545-555.
- Doerries K (2006) Human polyomavirus JC and BK persistent infection. *Adv Exp Med Biol* 577: 102-116.
- Douglas MA, Michelle AE (2004) *Mosby's Dictionary of Medicine, Nursing & Allied Health Dictionary*, 6th Edition, New York Piccin.
- Du Pasquier RA, Corey S, Margolin DH, Williams K, Pfister LA, De Girolami U, Mac Key JJ, Wüthrich C, Joseph JT, Koralnik IJ (2003). Productive infection of cerebellar granule cell neurons by JC virus in an HIV+ individual. *Neurology* 61: 775-782.
- Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Zheng Y, Jean-Jacques J, Letvin NL (2004) A prospective study demonstrates an association between JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes and the early control of progressive multifocal leukoencephalopathy. *Brain* 127: 1970-1978.
- Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, Kim H, Bar-Or A (2007) Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol* 178: 6092-6099.
- Dugan AS, Eash S, Atwood WJ (2005) A N-linked glycoprotein with $\alpha(2,3)$ -linked sialic acid is a receptor for BK virus. *J Virol* 79: 14442-14445.
- Egli A, Infanti L, Dumoulin A, Buser A, Samaridis J, Stebler C, Gosert R, Hirsch HH (2009) Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *J Infect Dis* 199: 837-846.
- Elenkov IJ, Chrousos GP (2002) Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 966: 290-303.
- Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP (1996) Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Physicians* 108: 374-381.
- Elphick GF, Querbes W, Jordan JA (2004) The human polyomavirus JCV uses serotonin receptors to infect cells. *Science* 306: 1380-1384.
- Enam S, Gan DD, White MK, Del Valle L, Khalili K (2006) Regulation of human neurotropic JCV in colon cancer cells. *Anticancer Res* 26: 833-841.
- Feigenbaum L, Khalili K, Major EO, Khoury G (1987) Regulation of the host range of human papovavirus JCV. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 3695-3698.
- Feltkamp MCW, Kazem S, Van der Meijden E, Lauber C, Gorbalenya AE (2013) From Stockholm to Malawi: recent developments in studying human polyomaviruses. *J Gen Vir* 94: 482-496.
- Feng H, Shuda M, Chang Y, Moore PS (2008) Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 319: 1096-1100.
- Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CD, Atwood WJ, Nath A, Khalili K, Major EO (2012) Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev* 25(3): 471-506.

Ferrante P, Caldarelli-Stefano R, Omodeo-Zorini E, Cagni AE, Cocchi L, Suter F, Macerati R (1997) Comprehensive investigation of the presence of JC virus in AIDS patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Med Virol* 52: 235-242.

Ferrante P, Mediati M, Caldarelli-Stefano R, Losciale L, Mancuso R, Cagni AE, Maserati R (2001) Increased frequency of JC virus type 2 and of dual infection with JC virus type 1 and 2 in Italian progressive multifocal leukoencephalopathy patients. *J Neurovirol* 7(1): 35-42.

Franks RR, Rencic A, Gordon J, Zoltick PW, Curtis M, Knobler RL, Khalili K (1996) Formation of undifferentiated mesenteric tumors in transgenic mice expressing human neurotropic polyomavirus early protein T-antigen. *Oncogene* 12: 2573-2578.

Fries JF, Spitz PW, Young DY (1982). The dimensions of health outcomes: the Health Assessment Questionnaire, disability and pain scales. *J Rheumatol* 9: 789-793.

Frisque RJ (1983) Nucleotide sequence of the region encompassing the JC virus origin of DNA replication. *J Virol* 46(1): 170-176.

Frisque RJ, Bream GL, Cannella MT (1984) Human polyomavirus JC virus genome. *J Virol* 51: 458-469.

Frisque RJ, Hofstetter C, Tyagarajan SK (2006) Transforming activities of JC virus early proteins. *Adv Exp Med Biol* 577: 288-309.

Gallant S, Gilkeson G (2006) ETS transcription factors and regulation of immunity. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 54(3): 149-163.

Gallia GL, Del Valle L, Laine C, Curtis M, Khalili K (2001) Concomitant progressive multifocal leukoencephalopathy and primary central nervous system lymphoma expressing JC virus oncogenic protein, large T antigen. *Mol Pathol* 54: 354-359.

Gandhi R, Laroni A, Weiner HL (2009). Role of the innate immune system in the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 221: 7-14.

Gardner SD, Field AM, Coleman DV, Hulme B (1971) New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *Lancet* 1: 1253-1257.

Garrett S, Jenkinson T, Kennedy LG, Whitelock H, Gaisford P, Calin A (1994). A new approach to defining disease status in ankylosing spondylitis: the Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index. *J Rheumatol* 21: 2286-2291.

Gasnault J, Kahraman M, de Goer de Herve MG, Durali D, Delfraissy JF (2003) Critical role of JC virus-specific CD4 T-cell responses in preventing progressive multifocal leukoencephalopathy. *AIDS* 17: 1443-1449.

Gaynor AM, Nissen MD, Whiley DM, Mackay IM, Lambert SB, Wu G, Brennan DC, Storch GA, Sloots TP, Wang D (2007) Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 3: 0595-0604

Geiger R, Andrichke D, Friebe S, Herzog F, Luisoni S, Heger T, Helenius A (2011) BAP31 and BiP are essential for dislocation of SV40 from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Nat Cell Biol* 13(11): 1305-1314.

Gheuens S, Bord E, Kesari S, Simpson DM, Gandhi RT (2011) Role of CD4+ and CD8+ T-cell responses against JC virus in the outcome of patients with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) and PML with immune reconstitution inflammatory syndrome. *J Virol* 85: 7256-7263.

Giannecchini S, Clausi V, Vultaggio A, Macera L, Maggi F, Martelli F, Azzi A, Maggi E, Matucci A (2012) Assessment of the risk of polyomavirus JC reactivation in patients with immune-mediated diseases during long-term treatment with infliximab. *J Neurovirol* 18(1): 55-61.

Gorelik L, Lerner M, Bixler S, Crossman M, Schlain B, Simon K, Pace A, Cheung A, Chen LL, Berman M, Zein F, Wilson E, Yednock T, Sandrock A, Goelz SE, Subramanyam M (2010) Anti-JC virus antibodies: implications for PML risk stratification. *Ann Neurol* 68: 295-303.

Gorelik L, Reid C, Testa M, Brickelmaier M, Bossolasco S, Pazzi A, Bestetti A, Carmillo P, Wilson E, McAuliffe M, Tonkin C, Carulli JP, Lugovskoy A, Lazzarin A, Sunyaev S, Simon K, Cinque P (2011) Progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) development is associated with mutations in JC virus capsid protein VP1 that change its receptor specificity. *J Infect Dis.* 204(1): 103-114.

Gosert R, Kardas P, Major EO, Hirsch HH (2010) Rearranged JC virus noncoding control regions found in progressive multifocal leukoencephalopathy patient samples increase virus early gene expression and replication rate. *J Virol* 84: 10448-10456.

Goyal RK, Hirano I (1996) The enteric nervous system: mechanism of disease. *New Engl J Med* 25: 1106-1115.

Granot R, Lawrence R, Barnett M, Masters L, Rodriguez M, Theocharous C, Pamphlett R, Hersch M (2009). What lies beneath the tent? JC-virus cerebellar granule cell neuronopathy complicating sarcoidosis. *J Clin Neurosci* 16: 1091-1092.

Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJT (2010) The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nature* 9: 325-338.

Hansjorgen T, Agostini TH, Jobes DV, Stoner GL (2001) Molecular evolution and epidemiology of JC virus. In: Khalili K, Stoner GL, editors. *Human Polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*. New York: Wiley-Liss, A John Wiley & sons, Inc., 491-526.

Harrison DM (2014) Multiple sclerosis. *Ann Intern Med* 160(7): ITC4-2-ITC4-18. doi: 10.7326/0003-4819-160-7-201404010-01004.

Hecht JH, Glenn OA, Wara DW, Wu YW (2007). JC virus granule cell neuronopathy in a child with CD40 ligand deficiency. *Pediatr Neurol* 36: 186-189.

Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH (2002) Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 15: 79-94.

Hirsch HH, Kardas P, Kranz D, Leboeuf C (2013) The human JC polyomavirus (JCPyV): virological background and clinical implications. *APMIS* 121: 685-727.

Hory R, Muray Y, Tzuneyama K, Abdel-Aziz HO, Nomoto K, Takahashi H, Cheng CM, Kuchina T, Harman BV, Takano Y (2005) Detection of JCV DNA sequences in colorectal cancers in Japan. *Virchows Arch* 447: 723-730.

Imperiale MJ (2001) Oncogenic transformation by the human polyomaviruses. *Oncogene* 20(54): 7917-7923.

Inoue T, Tsai B (2011) A large and intact viral particle penetrates the endoplasmic reticulum membrane to reach the cytosol. *PLoS Pathog* 7(5): e1002037 doi: 10.1371/journal.ppat.1002037.

Jensen PN, Major EO (2001) A classification scheme for human polyomavirus JCV variants based on the nucleotide sequence of the noncoding regulatory region. *J Neurovirol* 7: 280-287.

Jessen KR (2004) Glial cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36: 1861-1867.

- Jiang M, Abend JR, Johnson SF, Imperiale MJ (2009) The role of polyomaviruses in human disease. *Virology* 384: 266-273.
- Jobe DV, Friedlaender JS, Mgone CS, Agostini HT, Koki G, Yanagihara R, Ng TCN, Chima SC, Ryschkewitsch CF, Stoner GL (2001) New JC virus (JCV) genotypes from Papua New Guinea and Micronesia (type 8 and type 2E) and evolutionary analysis of 32 complete JCV genomes. *Arch Virol* 146: 2097-2113.
- Kakalacheva K1, Münz C, Lünemann JD (2011) Viral triggers of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1812(2): 132-140.
- Kasper L, Shoemaker J (2010). Multiple sclerosis immunology: The healthy immune system vs. the MS immune system. *Neurology* 74(supp. 1): S2-S8
- Kato A, Kitamura T, Takasaka T, Tominaga T, Ishikawa A, Zheng HY, Yogo Y (2004) Detection of the archetypal regulatory region of JC virus from the tonsil tissue of patients with tonsillitis and tonsillar hypertrophy. *J Neurovirol* 10: 244-249.
- Kean JM, Rao S, Wang M, Garcea RL (2009) Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog* 5: e1000363. doi: 10.1371/journal.ppat.1000363.
- Keane J (2005) TNF-blocking agents and tuberculosis: new drugs illuminate an old topic. *Rheumatology* 44: 714-720.
- Khademi M, Bornsen L, Rafatnia F, Andersson M, Brundin L (2009) The effects of natalizumab on inflammatory mediators in multiple sclerosis: prospects for treatment-sensitive biomarkers. *Eur J Neurol* 16: 528-536.
- Khalili K, Croul S, Del Valle L, Krynska B, Gordon J (2001) Oncogenic potential of human neurotropic virus: laboratory and clinical observations. *Isr Med Assoc J* 3(3): 210-215.
- Khalili K, Del Valle L, Otte J, Weaver M, Gordon J (2003a) Human neurotropic polyomavirus, JCV, and its role in carcinogenesis. *Oncogene* 22: 5181-5191.
- Khalili K, Del Valle L, Wang JY, Darbinian N, Lassak A, Safak M, Reiss K (2003b) T-antigen of human polyomavirus JC cooperates with IGF-IR signaling system in cerebellar tumors of the childhood-medulloblastomas. *Anticancer Res* 23: 2035-2041.
- Khalili K, Feigenbaum L, Khoury G (1987) Evidence for a shift in 5' termini of early viral RNA during the lytic cycle of JC virus. *Virology* 158: 469-472.
- Khalili K, White MK (2006) Human demyelinating disease and the polyomavirus JCV. *Mult Scler* 12(2): 133-142.
- Khalili K, White MK, Sawa H, Nagashima K, Safak M (2005) The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. *J Cell Physiol* 204: 1-7.
- Khanna N, Wolbers M, Mueller NJ, Garzoni C, Du Pasquier RA (2009) JC virus-specific immune responses in human immunodeficiency virus type 1 patients with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 83: 4404-4411.
- Kim HS, Goncalves NM, Henson JW (2000) Glial cell-specific regulation of the JC virus early promoter by large T antigen. *J Virol* 74: 755-763.
- Kim HS, Henson JW, Frisque RJ (2001) Transcription and replication in the Human Polyomaviruses. In: Khalili K, Stoner GL, editors. *Human Polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*. New York: Wiley-Liss, A John Wiley & sons, Inc., 73-126.

- Kivisakk P, Healy BC, Vigiotta V, Quintana FJ, Hootstein MA (2009) Natalizumab treatment is associated with peripheral sequestration of proinflammatory T cells. *Neurology* 72: 1922-1930.
- Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL (2005) Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 353: 369-374.
- Kmieciak D, Debicki S, Trzeciak WH (2008) Occurrence rate and genotype distribution of the JC virus (JCV) in a sample from the Polish population. *J Med Virol* 80(6): 1079-1083.
- Knowles WA (2006) Discovery and epidemiology of the human polyomaviruses BK virus (BKV) and JC virus (JCV). *Adv Exp Med Biol* 577: 19-45.
- Koralnik IJ, Du Pasquier RA, Letvin NL (2001) JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in individuals with progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 75: 3483-3487.
- Koralnik IJ, Wüthrich C, Dang X, Rottnek M, Gurtman A, Simpson D, Morgello S (2005). JC virus granule cell neuronopathy: A novel clinical syndrome distinct from progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 57: 576-580.
- Kothary N, Diak IL, Brinker A, Bezabeh S, Avigan M, Dal Pan G (2011) Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with efalizumab use in psoriasis patients. *J Am Acad Dermatol* 65: 546-551.
- Kumar D, Bouldin TW, Berger RG (2010) A case of progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with infliximab. *Arthritis Rheum* 62: 3191-3195.
- Kumar KU, Tang SC, Pater MM, Pater A (1996). Glial and muscle embryonal carcinoma cell-specific independent regulation of expression of human JC virus early promoter by cyclic AMP response elements and adjacent nuclear factor 1 binding sites. *J Med Virol* 49: 199-204.
- Laghi L, Randolph AE, Chauhan DP, Marra G, Major EO, Neel JV, Boland CR (1999) JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and in colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7484-7489.
- Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, Bollen AW, Pelletier D (2005) Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med* 353: 375-381.
- Langhans B, Nischalke HD, Arndt S, Braunschweiger I, Nattermann J, Sauerbruch T, Spengler U (2012) Ribavirin exerts differential effects on functions of CD4(+) Th1, Th2, and regulatory T cell clones in hepatitis C. *PLoS One* 7: e42094. doi: 10.1371/journal.pone.0042094.
- Laroni A, Giacomazzi CG, Grimaldi L, Gallo P, Sormani MP, Bertolotto A, McDermott JL, Gandoglia I, Martini I, Vitello G, Rinaldi F, Barzon L, Militello V, Pizzorno M, Bandini F, Capello E, Palù G, Uccelli A, Mancardi GL, Varnier OE (2012) Urinary JCV-DNA testing during Natalizumab treatment may increase accuracy of PML risk stratification. *J Neuroimmune Pharmacol* 7: 665-672.
- Lavagna A, Bergallo M, Daperno M, Sostegni R, Costa C, Leto R, Crocellà L, Molinaro G, Rocca R, Cavallo R, Pera A (2007) Infliximab and the risk of latent viruses reactivation in active Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 13(7): 896-902.
- Lesuis N, Befrits R, Nyberg F, van Vollenhoven RF (2012). Gender and the treatment of immunemediated chronic inflammatory diseases: rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and psoriasis: anobservational study. *BMC Med* 10: 82-91.

- Lim ES, Reyes A, Antonio M, Saha D, Ikumapayi UN, Adeyemi M, Stine OC, Skelton R, Brennan DC, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JJ, Wang D (2013) Discovery of STL polyomavirus, a polyomavirus of ancestral recombinant origin that encodes a unique T antigen by alternative splicing. *Virology* 436(2): 295-303.
- Lima MA (2013) Progressive multifocal leukoencephalopathy: new concepts. *Arq Neuropsiquiatr* 271(9B): 699-702.
- Lin PY, Fung CY, Chang FP, Huang WS, Chen WC, Wang JY, Chang D (2008) Prevalence and genotype identification of human JC virus in colon cancer in Taiwan. *J Med Virol* 80: 1828-1834.
- Lindberg RL, Achtnichts L, Hoffmann F, Kuhle J, Kappos L (2008) Natalizumab alters transcriptional expression profiles of blood cell subpopulations of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 194: 153-164.
- Lublin FD (2005) Clinical features and diagnosis of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 2005 23(1): 1-15.
- Lundstig A, Dillner J (2006) Serological diagnosis of human polyomavirus infection. *Adv Exp Med Biol* 577: 96-101.
- Maginnis M, Atwood W (2009) JC virus: an oncogenic virus in animals and humans? *Semin Cancer Biol* 19: 261-269
- Maini RN, Feldmann M (2002) How does infliximab work in rheumatoid arthritis? *Arthritis Res* 4(Suppl 2): S22-S28.
- Major EO (2009) Reemergence of PML in natalizumab-treated patients – new cases, same concerns. *N Engl J Med* 361: 1041-1043.
- Major EO (2010) Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med* 61: 35-47.
- Mancuso R, Saresella M, Hernis A, Marventano I, Ricci C, Agostini S, Rovaris M, Caputo D, Clerici M (2012) JC virus detection and JC virus-specific immunity in natalizumab-treated multiple sclerosis patients. *J Transl Med* 10: 248-258.
- Mandl CW, Frisque RJ (1986) Characterization of cells transformed by the human polyomavirus JC virus. *J Gen Virol* 67: 1733-1739.
- Marshall LJ, Major EO (2010) Molecular regulation of JC virus tropism: insights into potential therapeutic targets for progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuroimmune Pharmacol* 5(3): 404-417.
- Marshall LJ, Moore LD, Mirsky MM, Major EO (2012) JC virus promoter/enhancers contain TATA box-associated Spi-B binding sites that support early viral gene expression in primary astrocytes. *J Gen Virol* 93: 651-661.
- Martin JD, King DM, Slauch JM, Frisque RJ (1985) Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. *J Virol* 53: 306-311.
- Marzocchetti A, Sanguinetti M, Giambenedetto SD, Cingolani A, Fadda G, Cauda R, De Luca A (2007) Characterization of JC virus in cerebrospinal fluid from HIV-1 infected patients with progressive multifocal leukoencephalopathy: insights into viral pathogenesis and disease prognosis. *J Neurovirol* 13: 338-346.
- Marzocchetti A, Tompkins T, Clifford DB, Gandhi RT, Kesari S, Berger JR, Simpson DM, Prosperi M, De Luca A, Koralnik IJ (2009) Determinants of survival in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology* 73: 1551-1558.
- McCormack PL (2013) Natalizumab: a review of its use in the management of relapsing-remitting multiple sclerosis. *Drugs* 73(13): 1463-1481.

- Miller DH, Chard DT, Ciccarelli O, (2012) Clinically isolated syndromes. *The Lancet Neurology* 11: 157-169.
- Minagar A (2013) Current and future therapies for multiple sclerosis. *Scientifica (Cairo)* 2013: 249101 doi: 10.1155/2013/249101.
- Mischitelli M, Fioriti D, Videtta M, Degener AM, Antinori A, Cinque P, Giordano A, Pietropaolo V (2005) Investigation on the role of cell transcriptional factor Sp1 and HIV-1 TAT protein in PML onset or development. *J Cell Physiol* 204(3): 913-918.
- Mócsai A, Kovács L, Gergely P (2014) What is the future of targeted therapy in rheumatology: biologics or small molecules? *BMC Med* 12(1): 43-51.
- Moll NM, Rietsch AM, Ransohoff AJ, Cossoy MB, Huang D, Eichler FS, Trapp BD, Ransohoff RM (2008) Cortical demyelination in PML and MS: Similarities and differences. *Neurology* 70(5): 336-343.
- Molloy ES, Calabrese LH (2009) Progressive multifocal leukoencephalopathy: a national estimate of frequency in systemic lupus erythematosus and other rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 60: 3761-3765.
- Molloy ES, Calabrese LH (2012) Progressive multifocal leukoencephalopathy associated with immunosuppressive therapy in rheumatic diseases: evolving role of biologic therapies. *Arthritis Rheum* 64: 3043-3051.
- Monaco MC, Sabath BF, Durham LC, Major EO (2001) JC virus multiplication in human hematopoietic progenitor cells requires the NF-1 class D transcription factor. *J Virol* 75: 9687-9695.
- Monteleone G, Trapasso F, Parrello T, Biancone L, Stella A, Iuliano R, Luzzza F, Fusco A, Pallone F (1999) Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* 163:143-147.
- Muller K, Mermoud N (2000) The histone-interacting domain of nuclear factor I activates simian virus 40 DNA replication in vivo. *J Biol Chem* 275: 1645-1650.
- Neu U, Maginnis MS, Palma AS, Ströh LJ, Nelson CD, Feizi T, Atwood WJ, Stehle T (2010) Structure-function analysis of the human JC polyomavirus establishes the LSTc pentasaccharide as a functional receptor motif. *Cell Host Microbe* 8: 309-319.
- Neumann F, Zohren F, Haas R (2009) The role of natalizumab in hematopoietic stem cell mobilization. *Expert Opin Biol Ther* 9: 1099-1106.
- Olsson T, Achiron A, Alfredsson L, Berger T, Brassat D, Chan A, Comi G, Eraksoy M, Hegen H, Hillert J, Jensen PE, Moiola L, Myhr KM, Oturai A, Schippling S, Siva A, Sorensen PS, Trampe AK, Weber T, Potts J, Plavina T, Paes D, Subramanyam M, Wiendl H, Dib H, Uren D, Hemmer B, Buck D (2013) Anti-JC virus antibody prevalence in a multinational multiple sclerosis cohort. *Mult Scler* 19(11): 1533-1538.
- Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Kubota K, Tanaka S, Kimura T, Sawa H (2010) Large T antigen promotes JC virus replication in G2 arrested cells by inducing ATM- and ATR-mediated G2 checkpoint signaling. *J Biol Chem* 285: 1544-1554.
- Otis CN, Moral LA (2005). Images in pathology: granule cell loss in AIDS-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *Int J Surg Pathol* 13(4): 360.
- Packey CD, Sartor RB (2008) Interplay of commensal and pathogenic bacteria, genetic mutations, and immunoregulatory defects in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *J Intern Med* 263(6): 597-606.
- Padgett BL, Walker DL, Zu Rhein GM, Eckroade RJ, Dessel BH (1971) Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leukoencephalopathy. *Lancet* 19: 1257-1260.

- Padgett BL, Walker DL, Zu Rhein GM, Varakis JN (1977) Differential neurooncogenicity of strains of JC virus, a human polyomavirus, in newborn Syrian hamsters. *Cancer Res* 37: 718-720.
- Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Hodach AE, Chou SM (1976) JC papovavirus in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Infect Dis* 133: 686-690.
- Pagani E, Delbue S, Mancuso R, Borghi E, Tarantini L, Ferrante P (2003) Molecular analysis of JC virus genotypes circulating among the Italian healthy population. *J Neurovirol* 9(5): 559-566.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108.
- Perez-Liz G, Del Valle L, Gentilella A, Croul S, Khalili K (2008) Detection of JC virus DNA fragments but not proteins in normal brain tissue. *Ann Neurol* 64(4): 379-387.
- Perkins MR, Ryschkewitsch C, Liebner JC, Monaco MC, Himelfarb D, Ireland S, Roque A, Edward HL, Jensen PN, Remington G, Abraham T, Abraham J, Greenberg B, Kaufman C, LaGanke C, Monson NL, Xu X, Frohman E, Major EO, Douek DC (2012) Changes in JC virus-specific T cell responses during natalizumab treatment and in natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *PLoS Pathog* 8(11): e1003014. doi: 10.1371/journal.ppat.1003014.
- Pho MT, Ashok A, Atwood WJ (2000) JC virus enters human glial cells by a clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *J Virol* 74: 2288-2292.
- Pietropaolo V, Videtta M, Fioriti D, Mischitelli M, Arancio A, Orsi N, Degener AM (2003) Rearrangement patterns of JC virus noncoding control region from different biological samples. *J Neurovirol* 9: 603-611.
- Pizarro TT, Michie MH, Bentz M, Woraratanadharm J, Smith MF, Jr., Foley E, Moskaluk CA, Bickston SJ, Cominelli F (1999) IL-18, a novel immunoregulatory cytokine, is up-regulated in Crohn's disease: Expression and localization in intestinal mucosal cells. *J Immunol* 162: 6829-6835.
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L (2006) A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354: 899-910.
- Prakash A, Markham A (1999) Oral delayed-release mesalazine: a review of its use in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Drugs* 57: 383-408.
- Prins C, Frisque RJ (2001) JC virus T' proteins encoded by alternatively spliced early mRNAs enhance T antigen-mediated viral DNA replication in human cells. *J. NeuroVirol* 7(3): 250-264.
- Querbes W, Benmerah A, Tosoni D, Di Fiore PP, Atwood WJ (2004) A JC virus-induced signal is required for infection of glial cells by a clathrin- and eps15- dependent pathway. *J Virol* 78: 250-256.
- Raj GV, Khalili K (1995) Transcriptional regulation: lessons from the human neurotropic polyomavirus, JCV. *Virology* 213(2): 283-291.
- Randhawa P, Baksh F, Aoki N, Tschirhart D, Finkelstein S (2001) JC virus infection in allograft kidneys: analysis by polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Transplantation* 71: 1300-1303.
- Ray M, Curtis JR, Baddley JW (2014) A case report of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) associated with adalimumab. *Ann Rheum Dis* 73(7): 1429-1430. doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204978.
- Reid CE, Li H, Sur G, Carmillo P, Bushnell S, Tizard R, McAuliffe M, Tonkin C, Simon K, Goelz S, Cinque P, Gorelik L, Carulli JP (2011) Sequencing and analysis of JC virus DNA from natalizumab-treated PML patients. *J Infect Dis* 204: 237-244.

- Reiff C, Kelly D (2010) Inflammatory bowel disease, gut bacteria and probiotic therapy. *Int J Med Microbiol* 300(1): 25-33.
- Ricciardiello L, Chang DK, Laghi L, Goel A, Chang CL, Boland CR (2001) Mad-1 is the exclusive JC virus strain present in the human colon, and its transcriptional control region has a deleted 98-base-pair sequence in colon cancer tissues. *J Virol* 75: 1996-2001.
- Robinson PC, Brown MA (2014) Genetics of ankylosing spondylitis. *Mol Immunol* 57(1): 2-11
- Rudick RA, O'Connor PW, Polman CH, Goodman AD, Ray SS, Griffith NM, Jurgensen SA, Gorelik L, Forrestal F, Sandrock AW, Goelz S (2010) Assessment of JC virus DNA in blood and urine from natalizumab-treated patients. *Ann Neurol* 68: 304-310.
- Rudick RA, Stuart WH, Calabresi PA, Confavreux C, Galetta SL (2006) Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354: 911-923.
- Ruhl A, Nasser Y, Sharkey KA (2004) Enteric glia. *Neurogastroenterol Motil* 16: 44-49.
- Sadiq SA, Puccio LM, Brydon EW (2010). JCV detection in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *J Neurol* 257: 954-958
- Sami Saribas A, Mun S, Johnson J, El-Hajmoussa M, White MK, Safak M (2014) Human polyoma JC virus minor capsid proteins, VP2 and VP3, enhance large T antigen binding to the origin of viral DNA replication: Evidence for their involvement in regulation of the viral DNA replication. *Virology* 449: 1-16.
- Sandborn WJ (2006) Treatment of ulcerative colitis with oral mesalamine: advances in drug formulation, efficacy expectations and dose response, compliance, and chemoprevention. *Rev Gastroenterol Disord* 6: 97-105.
- Sariyer IK, Khalili K, Safak M (2008) Dephosphorylation of JC virus agnoprotein by protein phosphatase 2A: inhibition by small t antigen. *Virology* 375: 464-479.
- Sartor RB (2006) Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3: 390-407.
- Schmidlin H, Diehl SA, Nagasawa M, Scheeren FA, Schotte R, Uittenbogaart CH, Spits H, Blom B (2008) Spi-B inhibits human plasma cell differentiation by repressing BLIMP1 and XBP-1 expression. *Blood* 112(5): 1804-1812.
- Schowalter RM, Pastrana DV, Pumphrey KA, Moyer AL, Buck CB (2010) Merkel cell polyomavirus and two previously unknown polyomaviruses are chronically shed from human skin. *Cell Host Microbe* 7: 509-515.
- Scuda N, Hofmann J, Calvignac-Spencer S, Ruprecht K, Liman P, Kühn J, Hengel H, Ehlers B (2011) A novel human polyomavirus closely related to the African green monkey-derived lymphotropic polyomavirus (LPV). *J Virol* 85: 4586-4590.
- Seder RA, Darrah PA, Roederer M (2008) T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol* 8: 247-258.
- Selgrad M, De Giorgio R, Fini L, Cogliandro RF, Williams S, Stanghellini V, Barbara G, Tonini, M, Corinaldesi R, Genta RM, Domiati-Saad R, Meyer R, Goel A, Boland CR, Ricciardiello L (2009) JC virus infects the enteric glia of patients with chronic idiopathic intestinal pseudo-obstruction. *Gut* 58: 25-32.
- Selgrad M, Malfetheriner P, Fini L, Goel A, Boland CR, Ricciardiello L (2008) The role of viral and bacterial pathogens in gastrointestinal cancer. *J Cell Physiol* 216: 378-388.
- Shadan FF, Cunningham C, Boland CR (2002) JC virus a biomarker for colorectal cancer? *Med Hypotheses* 59: 667-669.

- Shah KV (2007) SV40 and human cancer: a review of recent data. *Int J Cancer* 120: 215-223.
- Shinohara T, Nagashima K, Major EO (1997) Propagation of the human polyomavirus, JCV, in human neuroblastoma cell lines, *Virology* 228(2): 269-277
- Shishido-Hara Y, Higuchi K, Ohara S, Duyckaerts C, Hauw JJ, Uchihara T (2008) Promyelocytic leukemia nuclear bodies provide a scaffold for human polyomavirus JC replication and are disrupted after development of viral inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 67: 299-308.
- Shivakumar CV, Das GC (1994) Biochemical and mutational analysis of the polyomavirus core promoter: involvement of nuclear factor-1 in early promoter function. *J Gen Virol* 75: 1281-1290.
- Shuda M, Feng H, Kwun HJ, Rosen ST, Gjoerup O, Moore PS, Chang Y (2008) T antigen mutations are a human tumor-specific signature for Merkel cell polyomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 16272-16277.
- Siebrasse EA, Reyes A, Lim ES, Zhao G, Mkakosya RS, Manary MJ, Gordon JI, Wang D (2012) Identification of MW polyomavirus, a novel polyomavirus in human stool. *J Virol* 86(19): 10321-10326.
- Skarica M, Eckstein C, Whartenby KA, Calabresi PA (2011) Novel mechanisms of immune modulation of natalizumab in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 235: 70-76.
- Small JA, Khoury G, Jay G, Howley PM, Scangos GA (1986) Early regions of JC virus and BK virus induce distinct and tissue-specific tumors in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 8288-8292.
- Sørensen PS, Bertolotto A, Edan G, Giovannoni G, Gold R, Havrdova E, Kappos L, Kieseier BC, Montalban X, Olsson T (2012) Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab. *Mult Scler* 18: 143-152.
- Stehle T, Harrison SC (1997) High-resolution structure of a polyomavirus VP1-oligosaccharide complex: implications for assembly and receptor binding. *EMBO J* 16(16): 5139-5148.
- Stuve O, Marra CM, Jerome KR, Cook L, Cravens PD (2006) Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *Ann Neurol* 59: 743-747.
- Sugimoto C, Hasegawa M, Kato A, Zheng HY, Ebihara H, Taguchi F, Kitamura T, Yogo Y (2002) Evolution of human Polyomavirus JC: implications for the population history of humans. *J Mol Evol* 54(3): 285-297.
- Sunyaev SR, Lugovskoy A, Simon K, Gorelik L (2009) Adaptive mutations in the JC virus protein capsid are associated with progressive multifocal leukoencephalopathy (PML). *PLoS Genet* 5(2): e1000368. doi: 10.1371/journal.pgen.1000368.
- Suzuki T, Orba Y, Okada Y, Sunden Y, Kimura T, Tanaka S, Nagashima K, Hall WW, Sawa H (2010) The human polyoma JC virus agnoprotein acts as a viroporin. *PLoS Pathog* 6: e1000801. doi:10.1371/journal.ppat.1000801.
- Swidsinski A, Ladhoff A, Pernthaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H (2002) Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 122: 44-54.
- Tada H, Khalili K (1992) A novel sequence-specific DNA-binding protein, LCP-1, interacts with single-stranded DNA and differentially regulates early gene expression of the human neurotropic JC virus. *J Virol* 66: 6885-6892.
- Tallantyre EC, Paine SM, Sharp CP, Lowe JS, Gran B (2009). Atypical progressive multifocal leukoencephalopathy associated with an unusual JC polyomavirus mutation. *Arch Neurol* 66: 1021-1024.
- Tamura T, Inoue T, Nagata K, Mikoshiba K (1988) Enhancer of human polyoma JC virus contains nuclear factor I-binding sequences; analysis using mouse brain nuclear extracts. *Biochem Biophys Res Commun* 157: 419-425.

- Tan CS, Ellis LC, Wuthrich C, Ngo L, Broge TA Jr, Saint-Aubyn J, Miller JS, Koralnik IJ (2010) JC virus latency in the brain and extraneural organs of patients with and without progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol* 84: 9200-9209.
- Tan CS, Koralnik IJ (2010) Progressive multifocal leukoencephalopathy and other disorders caused by JC virus: clinical features and pathogenesis. *Lancet Neurol* 9: 425-437.
- Tavazzi E, White MK, Khalili K (2012) Progressive multifocal leukoencephalopathy: Clinical and molecular aspects. *Rev Med Virol* 22: 18-32.
- Thomas LD, Vilchez RA, White ZS, Zanwar P, Milstone AP, Bustel JS, Dummer S (2007) A prospective longitudinal study of polyomavirus shedding in lung transplant recipients. *J Infect Dis* 195: 442-449.
- Tonini M, De Ponti F, Frigo G, Crema F (2002) Pharmacology of the enteric nervous system. In: Brookes S & Costa M editors. *Innervation of the gastrointestinal tract*. Taylor & Francis, London, New York, 213-294.
- Trowbridge PW, Frisque RJ (1995) Identification of three new JC virus proteins generated by alternative splicing of the early viral mRNA. *J Neurovirol* 1(2): 195-206.
- Ullman TA, Itzkowitz SH (2011) Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology* 140: 1807-1816.
- Van Assche G, Van Ranst M, Sciot R, Dubois B, Vermeire S, Noman M, Verbeeck J, Geboes K, Robberecht W, Rutgeerts P (2005) Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *N Engl J Med* 353: 362-368.
- Van der Meijden E, Janssens RW, Lauber C, Bouwes Bavinck JN, Gorbalenya AE, Feltkamp MC (2010) Discovery of a new human polyomavirus associated with trichodysplasia spinulosa in an immunocompromized patient. *PLoS Pathog* 6: e1001024. doi:10.1371/journal.ppat.1001024.
- Viallard JF, Ellie E, Lazaro E, Lafon ME, Pellegrin JL (2005) JC virus meningitis in a patient with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 14: 964-966.
- Vukusic S, Confavreux C (2007) Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. *Curr Opin Neurol* 20(3): 269-274.
- Weber F, Goldmann C, Kramer M, Kaup FJ, Pickhardt M (2001) Cellular and humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 49: 636-642.
- Wegner M, Drolet DW, Rosenfeld MG (1993) Regulation of JC virus by the POU-domain transcription factor Tst-1: implications for progressive multifocal leukoencephalopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 4743-4747.
- Wei J, Liu CK, Atwood WJ (2000) JC virus binds to primary human glial cells, tonsillar stromal cells, and B-lymphocytes, but not to T lymphocytes. *J Neurovirol* 6: 127-136.
- Weissert R (2011) Progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neuroimmunol* 231: 73-77.
- White MK, Gordon J, Khalili K (2013) The Rapidly Expanding Family of Human Polyomaviruses: Recent Developments in Understanding Their Life Cycle and Role in Human Pathology. *PLoS Pathog* 9(3): e1003206. doi:10.1371/journal.ppat.1003206.
- White MK, Gordon J, Reiss K, Del Valle L, Croul S, Giordano A, Darbinyan A, Khalili K (2005) Human polyomavirus and brain tumors. *Brain Res Rev* 50: 69-85.
- White MK, Khalili K (2005) Expression of JC virus regulatory proteins in human cancer: potential mechanisms for tumorigenesis. *Eur J Cancer* 41(16): 2537-2548.

- White MK, Khalili K (2011) Pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy--revisited. *J Infect Dis* 203(5): 578-586.
- White MK, Safak M, Khalili K (2009) Regulation of gene expression in primate polyomaviruses. *J Virol* 83(21): 10846-10856.
- Wüthrich C, Dang X, Westmoreland S, McKay J, Maheshwari A, Anderson MP, Ropper AH, Viscidi RP, Koralnik IJ (2009). Fulminant JC virus encephalopathy with productive infection of cortical pyramidal neurons. *Ann Neurol* 65: 742-748.
- Wüthrich C, Popescu BF, Gheuens S, Marvi M, Ziman R, Denq SP, Tham M, Norton E, Parisi JE, Dang X, Lucchinetti CF, Koralnik IJ (2013) Natalizumab-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy in a Patient With Multiple Sclerosis: A Postmortem Study. *J Neuropathol Exp Neurol* 72(11): 1043-1051.
- Yang T, Duan Z, Wu S, Liu S, Zeng Z, Li G, Wang S, Fan D, Ye D, Xu S, Zhang L, Pan F (2014) Association of HLA-B27 genetic polymorphisms with ankylosing spondylitis susceptibility worldwide: a meta-analysis. *Mod Rheumatol* 24(1): 150-161.
- Yogo Y, Kitamura T, Sugimoto C, Ueki T, Aso Y, Hara K, Taguchi F (1990) Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from non-immunocompromised individuals. *J Virol* 64: 3139-3143.
- Yogo Y, Sugimoto C (2001) The archetype concept and regulatory region rearrangement. In: Khalili K, Stoner GL, editors. *Human Polyomaviruses: molecular and clinical perspectives*. New York: Wiley-Liss, A John Wiley & sons, Inc., 127-148.
- Zhong S, Zheng HY, Suzuki M, Chen Q, Ikegaya H, Aoki N, Usuku S, Kobayashi N, Nukuzuma S, Yasuda Y, Kuniyoshi N, Yogo Y, Kitamura T (2007) Age-related urinary excretion of BK polyomavirus by nonimmunocompromised individuals. *J Clin Microbiol* 45: 193-198.
- Zohren F, Toutzaris D, Klarner V, Hartung HP, Kieseier B, Haas R (2008) The monoclonal anti-VLA-4 antibody natalizumab mobilizes CD34+hematopoietic progenitor cells in humans. *Blood* 111: 3893-3895.
- Zu Rhein G, Chou SM (1965) Particles resembling papova viruses in human cerebral demyelinating disease. *Science* 148(3676): 1477-1479.

7. Appendice

Durante i tre anni di Dottorato in Scienze Infettivologiche (XXVI ciclo), la Candidata:

- ha pubblicato parte dei risultati ottenuti da questo studio nei seguenti articoli:

Bellizzi A, Anzivino E, Rodio DM, Cioccolo S, Scrivo R, Morreale M, Pontecorvo S, Ferrari F, Di Nardo G, Nencioni L, Carluccio S, Valesini G, Francia A, Cucchiara S, Palamara AT, Pietropaolo V. "Human Polyomavirus JC monitoring and noncoding control region analysis in dynamic cohorts of individuals affected by immune-mediated diseases under treatment with biologics: an observational study". *Virology Journal*, 10 (1): 298, 2013, doi:10.1186/1743-422X-10-298, (IF: 2.090).

Bellizzi A, Anzivino E, Ferrari F, Di Nardo G, Colosimo MT, Fioriti D, Mischitelli M, Chiarini F, Cucchiara S, Pietropaolo V. "Polyomavirus JC reactivation and noncoding control region sequence analysis in pediatric Crohn's disease patients treated with infliximab". *Journal of Neurovirology*, 17 (4): 303-313, 2011, doi: 10.1007/s13365-011-0036-3 (IF: 2.310).

- ha pubblicato i seguenti lavori scientifici, attinenti al progetto di ricerca svolto, su riviste di rilevanza nazionale ed internazionale:

Iannetta M, **Bellizzi A**, Lo Menzo S, Anzivino E, D'abramo A, Oliva A, D'agostino C, D'ettorre G, Pietropaolo V, Vullo V, Ciardi MR. "Hiv-Associated Progressive Multifocal Leukoencephalopathy: longitudinal study of JC Virus Non-Coding Control Region Rearrangements and host immunity". *Journal of Neurovirology*, 19: 274-279, 2013 (IF: 2.310).

Bellizzi A, Anzivino E, Rodio DM, Palamara AT, Nencioni L, Pietropaolo V. "New insights on human Polyomavirus JC and pathogenesis of Progressive Multifocal Leukoencephalopathy". *Clinical and Developmental Immunology* 2013, doi: 10.1155/2013/839719, (IF: 1.838).

Bellizzi A, Nardis C, Anzivino E, Rodio DM, Fioriti D, Mischitelli M, Chiarini F, Pietropaolo V. "Human polyomavirus JC reactivation and pathogenetic mechanisms of progressive multifocal leukoencephalopathy and cancer in the era of monoclonal antibody therapies". *Journal of Neurovirology*, 2012, doi: 10.1007/S13365-012-0080-7 (IF: 2.336).

- ha collaborato alla realizzazione e alla stesura dei seguenti lavori scientifici pubblicati su riviste di rilevanza nazionale ed internazionale:

Mitterhofer AP, Tinti F, Pietropaolo V, Umbro I, Anzivino E, **Bellizzi A**, Zavatto A, Poli L, Berloco PB, Taliani G. "Role of BK virus infection in end-stage renal disease patients waiting for kidney transplantation - viral replication dynamics from pre- to post-transplant". *Clinical Transplantation* 28 (3): 299-306, 2014, doi: 10.1111/CTR.12312. (IF: 1.634).

Umbro I, Anzivino E, Tinti F, Zavatto A, **Bellizzi A**, Rodio DM, Mancini C, Pietropaolo V, Mitterhofer AP. "Possible antiviral effect of ciprofloxacin treatment on Polyomavirus BK replication and analysis of non-coding control region sequences". *Virology Journal*, 10: 274, 2013, doi: 10.1186/1743-422X-10-274, (IF: 2.090).

Pietropaolo V, Passariello C, **Bellizzi A**, Virga A, Anzivino E, Rodio DM, Fioriti D, Bertozzi MA, Voliani S, Scaravelli G, Antonini G, Gentile V. "Analysis of sperm motility related to transcriptional

alterations of mitochondrial genes in males affected by infertility”. *European Journal of Inflammation*, 10: 455-462, 2012 (IF: 5.233).

Mitterhofer AP, Umbro I, Pietropaolo V, Meçule A, Russo GE, Tinti F, Fiacco F, Poli L, **Bellizzi A**, Anzivino E, Ferretti G, Berloco PB, Chiarini F, Taliani G. “Polyomavirus BK infection in end-stage renal disease: analysis of viral replication in patients on hemodialysis or peritoneal dialysis”. *Transplantation Proceedings*, 44: 1869-1872, 2012 (IF: 1.005).

Mitterhofer AP, Tinti F, Umbro I, Pietropaolo V, Fiacco F, **Bellizzi A**, Anzivino E, Ginanni Corradini S, Poli L, Rossi M, Berloco PB, Ferretti G, Chiarini F, Taliani G. “Polyomavirus BK infection before liver transplantation in patients with chronic kidney disease”. *Transplantation Proceedings*, 44: 1934-1937, 2012 (IF: 1.005).

Nardis C, Anzivino E, **Bellizzi A**, Rodio DM, De Pità O, Chiarini F, Pietropaolo V. “Reactivation of human polyomavirus JC in patients affected by psoriasis vulgaris and psoriatic arthritis and treated with biological drugs: preliminary results”. *Journal of Cellular Physiology*, 2012. doi: 10.1002/JCP.24089 (IF: 3.986)

Anzivino E, **Bellizzi A**, Mitterhofer AP, Tinti F, Barile M, Colosimo MT, Fioriti D, Mischitelli M, Chiarini F, Ferretti G, Taliani G, Pietropaolo V. “Early monitoring of the human polyomavirus BK replication and sequencing analysis in a cohort of adult kidney transplant patients treated with basiliximab”. *Virology Journal*, 8: 407, 2011, doi:10.1186/1743-422X-8-407 (IF: 2,55).

Devirgiliis V, Panasiti V, Fioriti D, Anzivino E, **Bellizzi A**, Cimillo M, Curzio M, Melis L, Roberti V, Gobbi S, Lieto P, Richetta AG, Calvieri S, Chiarini F, Nicosia R, Pietropaolo V. “Antibacterial activity of methyl aminolevulinate photodynamic therapy in the treatment of a cutaneous ulcer”. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 24: 793-795, 2011 (IF: 3,061).

- ha partecipato a congressi nazionali ed internazionali mediante i posters e/o comunicazioni orali qui di seguito elencati:

Bellizzi A, Anzivino E, Rodio DM, Cioccolo S, Scrivo R, Morreale M, Ferrari F, Di Nardo G, Nencioni L, Cucchiara S, Francia A, Valesini G, Palamara AT, Pietropaolo V. “Polyomavirus JC monitoring and regulatory region analysis in dynamic cohorts of immune-mediated diseases treated with biologics: an observational study”. 41° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, 13-16 ottobre 2013, Abstract: pag. 185 (**poster**).

Anzivino E, **Bellizzi A**, Rodio DM, Umbro I, Tinti F, Mitterhofer AP, Mancini C, Pietropaolo V. “Possible antiviral effect of ciprofloxacin treatment on Polyomavirus BK replication and analysis of non-coding control region sequences in a patient with acute renal dysfunction”. 41° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, 13-16 ottobre 2013, Abstract: pag. 186 (**poster**).

Rodio DM, Anzivino E, **Bellizzi A**, Cioccolo S, Campanella C, Capitani D, Sobolev AP, Marini F, Mannina L, Pietropaolo V. “NMR-based metabolic approach and Polyomavirus JC DNA detection: preliminary results in urine samples of individuals affected by immune-mediated diseases”. 41° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, 13-16 ottobre 2013, Abstract: pag. 191 (**poster**).

Limongi D, Iebba V, **Bellizzi A**, Pietropaolo V, Palamara AT, Schippa S, Nencioni L. “Correlazione tra presenza di virus influenzali e aumento di E. coli in campioni biotipici prelevati da pazienti pediatriche con morbo di Crohn”. 41° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, 13-16 ottobre 2013, Abstract: pag. 179 (**poster**).

Bellizzi A, Anzivino E, Rodio DM, Scrivo R, Morreale M, Nencioni L, Di Nardo G, Valesini G, Francia A, Palamara AT, Pietropaolo V. “Analysis of Polyomavirus JC noncoding control region rearrangements in autoimmune diseases during treatment with natalizumab and anti-TNF Agents”. 5th International Conference on Polyomaviruses and Human Diseases: Basic and Clinical Perspectives. Stresa, 9-11 maggio 2013, pubblicato su Journal of Neurovirology, DOI 10.1007/s13365-013-0171-0, (IF: 2.310) (**comunicazione orale in inglese**).

Anzivino E, **Bellizzi A**, Rodio DM, Sciarra A, Cattarino S, Gentile V, Pietropaolo V. “A molecular analysis of the human polyomaviruses DNA sequences in prostate cancer patients reveals a high frequency of JCV detection: preliminary results”. 40° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, 7-10 ottobre 2012, Abstract: pag. 159 (**poster**).

Bellizzi A, Iannetta M, Lo Menzo S, Anzivino E, Rodio DM, D’Ettore G, Vullo V, Ciardi MR, Pietropaolo V. “HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: longitudinal study of JC virus noncoding control region rearrangements in serial cerebrospinal fluid samples”. 40° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia, Riccione, 7-10 ottobre 2012, Abstract: pag. 80 (**comunicazione orale in italiano**).

Bellizzi A, Anzivino E, Ferrari F, Di Nardo G, Fioriti D, Mischitelli M, Rodio DM, Chiarini F, Cucchiara S, Pietropaolo V. “Rearranged polyomavirus JC non-coding control region sequences as a possible marker of virulence within a cohort of pediatric Crohn’s disease patients treated with infliximab”. 11th International Symposium on Neurovirology, New York, USA, 29 May-2 June 2012, pubblicato su Journal of Neurovirology, Volume 18, Supplement 1, S13-S14, 2012 (IF: 2.310) (**poster**).

Bellizzi A, Anzivino E, Ferrari F, Di Nardo G, Fioriti D, Mischitelli M, Rodio DM, Chiarini F, Cucchiara S, Pietropaolo V. “Polyomavirus JC reactivation and non-coding control region sequence analysis in pediatric Crohn’s disease patients treated with infliximab”. Presentato a 39° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia 3-6 ottobre 2011, Riccione, Italia; abstract pag. 103 (**poster**).

Nardis C, Anzivino E, **Bellizzi A**, Rodio DM, De Pità O, Chiarini F, Pietropaolo V. “Reactivation of the human JC virus in psoriatic patients treated with biological drugs”. Presentato a 39° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia 3-6 ottobre 2011, Riccione, Italia; abstract pag. 103 (**poster**).

Rodio DM, Pietropaolo V, Anzivino E, **Bellizzi A**, Mischitelli, Fioriti D, Di Silverio F, Sciarra A, Chiarini F, Gentile V. “The oncogenic potential of human polyomavirus BK in prostate cancer”. Presentato a 39° Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia 3-6 ottobre 2011, Riccione, Italia; abstract pag. 103 (**poster**).

Anzivino E, **Bellizzi A**, Mitterhofer AP, Tinti F, Barile M, Fioriti D, Mischitelli M, Rodio DM, Ferretti G, Taliani G, Chiarini F, Pietropaolo V. “Early monitoring of the human polyomavirus bk replication and sequencing analysis in a cohort of adult kidney transplant patients treated with basiliximab”. Presentato a 39°

Congresso Nazionale della Società Italiana di Microbiologia 3-6 ottobre 2011, Riccione, Italia; abstract pag. 103 (**poster**).

- ha infine partecipato alla stesura dei poster e delle comunicazioni orali, presentati a congressi nazionali e internazionali ed elencati qui di seguito:

Scrivo R, **Bellizzi A**, Magrini L, Anzivino E, Rodio DM, Morreale M, Nencioni L, Francia A, Palamara AT, Pietropaolo V, Valesini G. “Analisi molecolare della regione genomica di controllo della trascrizione genica del Polyomavirus umano JC in pazienti trattati con farmaci biologici: dati preliminari di uno studio longitudinale” 50° Congresso Nazionale Società Italiana Reumatologia Napoli, 27-30 novembre 2013 pubblicato su Reumatismo vol 65 (NS3): pag 402, 2013

Bellizzi A, Anzivino E, Rodio DM, Cioccolo S, Morreale M, Pontecorvo S, Carluccio S, Nencioni L, Francia A, Palamara AT, Pietropaolo V. “Human Polyomavirus JC monitoring and noncoding control region analysis in dynamic cohorts of individuals affected by multiple sclerosis under treatment with natalizumab: an observational study”. 12th International Symposium on Neurology, Washington, USA, 29 October-2 November 2013.

Iannetta M, **Bellizzi A**, Lo Menzo S, Anzivino E, Dettorre G, Pietropaolo V, Ciardi MR, Vullo V. “A case of HIV-associated progressive multifocal leukoencephalopathy: longitudinal study of JCV NCCR arrangement in serial CSF samples”. Presentato a 4° Congresso “ICAR – Italian Conference on AIDS and Retroviruses” 10-12 Giugno 2012, Napoli, Italia. Abstract P110

Tinti F, Mordenti M, Pietropaolo V, **Bellizzi A**, Anzivino E, Ginanni Corradini S, Rossi M, Ferretti G, Taliani G, Poli L, Berloco PB, Mitterhofer AP. “Studio dell’infezione da BK virus nel pre-trapianto di fegato con e senza insufficienza renale”. 35° Congresso Nazionale Società Italiana Trapianti d’Organi Roma, 27-29 ottobre 2011

Umbro I, Tinti F, Pietropaolo V, Poli L, Russo GE, Mecule A, **Bellizzi A**, Anzivino E, Rocca AR, Barzacca B, Ferretti G, Taliani G, Berloco PB, Mitterhofer AP. “Infezione da BK Virus nel Pre-Trapianto di Rene: Studio della Replicazione Virale in Pazienti in Emodialisi Versus Dialisi Peritoneale”. 35° Congresso Nazionale Società Italiana Trapianti d’Organi Roma, 27-29 ottobre 2011.

Tutti i prodotti scientifici, qui sopra elencati, sono disponibili sul sito U-Gov Ricerca Catalogo e Valutazione prodotti della ricerca, il servizio interattivo che raccoglie in maniera sistematica i dati relativi alla produzione scientifica della Sapienza, in linea con gli standard Miur-Cineca (<http://www.uniroma1.it/tags/u-gov>).