



EUROPEAN COMMISSION  
E C  
Structural Funds



MINISTERO DELL'UNIVERSITÀ  
E DELLA RICERCA SCIENTIFICA  
E TECNOLOGICA



Università degli Studi  
di  
Catania

**DOTTORATO DI RICERCA IN DISCIPLINE  
MICROBIOLOGICHE  
Ciclo XXIV  
Facoltà di Medicina e Chirurgia  
UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA**

---

**Dott.ssa Domenica Zappalà**

**Espressione di diverse sequenze geniche del  
Polyomavirus JC nel soggetto immunocompromesso**

-----  
**TESI DI DOTTORATO**  
-----

Coordinatore:  
Prof. Angelo Castro

Tutor:  
Prof. Guido Scalia

---

**TRIENNIO 2008 – 2011**

# INDICE

<b>1. Introduzione</b>	<b>pag.3</b>
1.1. <i>Premessa</i>	<i>pag.3</i>
1.2. <i>Polyomaviridae</i>	<i>pag.6</i>
1.3. <i>Morfologia e composizione genica</i>	<i>pag.7</i>
1.4. <i>Ciclo re plicativo</i>	<i>pag.16</i>
<b>2. Patologia e patogenesi</b>	<b>pag.24</b>
2.1. <i>Epidemiologia</i>	<i>pag.24</i>
2.2. <i>Infezione persistente</i>	<i>pag.29</i>
2.3. <i>Potere oncogeno di JCV</i>	<i>pag.31</i>
<b>3. Materiali e metodi</b>	<b>pag.35</b>
3.1. <i>Campioni</i>	<i>pag.35</i>
3.2. <i>Estrazione degli acidi nucleici da campione di plasma</i>	<i>pag.39</i>
3.3. <i>Estrazione degli acidi nucleici da campione bioptico</i>	<i>pag.40</i>
3.4. <i>Amplificazione degli acidi nucleici</i>	<i>pag.40</i>
<b>4. Risultati</b>	<b>pag.43</b>
<b>5. Discussione</b>	<b>pag.47</b>
<b>6. Bibliografia</b>	<b>pag.54</b>

# ***1. INTRODUZIONE***

## ***1.1 Premessa***

E' noto che il sistema immunitario rappresenta la base per la protezione dell'organismo dalle infezioni e quindi ogni suo deficit facilita l'insorgenza di malattie infettive e le rende più gravi comportando talvolta la necessità di instaurare trattamenti complessi o la sospensione di terapie indispensabili per il controllo di altre patologie di base. Lo stato di immunodepressione, in cui possono trovarsi alcuni soggetti a causa di diversi eventi patologici, diventa il presupposto per la riattivazione di agenti patogeni virali già presenti in forma latente nell'organismo. Lo stato di latenza permette al virus di persistere per tutta la vita nell'organismo ospite, dopo la prima infezione, alternandosi talvolta ad episodi di attiva replicazione virale e stati di quiescenza a seconda della capacità reattiva del soggetto infetto. L'attività virale di norma non comporta conseguenze patologiche di rilievo nel soggetto infetto che presenti un sistema immunitario adeguatamente reattivo, al contrario di quanto non avvenga, invece, nei pazienti immunodepressi. L'immunodepressione, quindi, diventa una condizione favorevole per l'agente patogeno che induce infezioni produttive e litiche e quindi manifestazioni patologiche che possono giungere fino all'exitus. Un esempio è rappresentato da alcuni Enterovirus che essendo cardiotropi,

possono rimanere in latenza nelle cellule cardiache, ma in taluni casi possono causare miocardite o pericardite manifeste. Un altro esempio è dato da alcuni esponenti neurotropi della famiglia Herpesviridae che possono indurre encefaliti nei soggetti immunodepressi. L'immunodepressione con la conseguente riattivazione di virus avviene per grave compromissione della funzionalità della risposta immunitaria e può essere scatenata da una patologia che affligge il soggetto come nel caso di pazienti affetti da varie forme leucemiche, da alcuni trattamenti terapeutici immunosoppressivi come nel caso di pazienti trapiantati o dalla somministrazione di farmaci cortico-steroidi come nei soggetti affetti da forme infiammatorie croniche dell'intestino (RCU) che, talvolta, possono essere anche di origine autoimmunitaria (Morbo di Crohn). Un altro gruppo di soggetti immunodepressi è costituito dai pazienti oncologici nei quali i trattamenti con chemioterapici volti a bloccare l'avanzamento del processo neoplastico, ostacolano l'attività del sistema immunitario deputato alle difese innate dell'ospite.

Il meccanismo della riattivazione sembra essere strettamente legato ai processi di replicazione e all'espressione di particolari sequenze geniche.

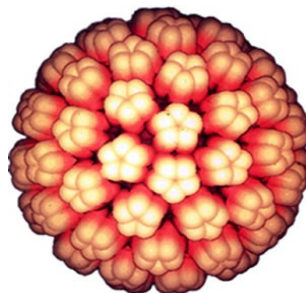
Tra i virus umani persistenti-latenti nell'organismo ospite vengono ricompresi alcuni esponenti della famiglia Polyomaviridae, tra cui è annoverato il JCV. La diagnosi di infezione da JCV, sia nei soggetti immunocompetenti sia negli immunodepressi, appare importante e

piuttosto complessa: questo virus, infatti, è molto diffuso ma solo in alcune occasioni può manifestarsi in forme patologiche; inoltre, proprio a causa della sua persistenza non è sempre possibile accertare un'infezione virale attiva o clinicamente significativa in particolari tessuti. E' stato, oggetto di questo studio, onde considerare la possibilità d'impiego anche diagnostico di diversi bersagli molecolari, la valutazione dell'espressione genica di due differenti regioni di JCV: la regione precoce (*early*) e la regione tardiva (*late*) del genoma virale, in cinque distinti gruppi di soggetti immunodepressi.

## ***1.2 Polyomaviridae***

La famiglia Polyomaviridae è di recente istituzione (VII International Committee on Taxonomy of Viruses, tenutosi nel 2000). È costituita da un solo genere, Polyomavirus, composto da 13 membri specie-specifici di cui solo due infettano specificamente l'uomo: il JCV e il BKV<sup>1</sup>.

La patologia più importante causata da una riattivazione del JCV (Fig.1) in pazienti immunodepressi è la leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), una rara e fatale malattia demielinizzante del sistema nervoso centrale. Sebbene la PML sia stata già descritta in letteratura, sotto una varietà di nomi, fin dal 1930, l'eziologia virale era stata proposta a partire dal 1961 da Richardson ed è stata successivamente confermata nel 1971 con il primo isolamento di JCV inoculando l'estratto di tessuto cerebrale di un paziente affetto da PML in una coltura primaria di cellule fetali umane (PHFG)<sup>2</sup>. Il nome del virus deriva dalle iniziali del paziente da cui venne isolato per la prima volta<sup>3</sup>,

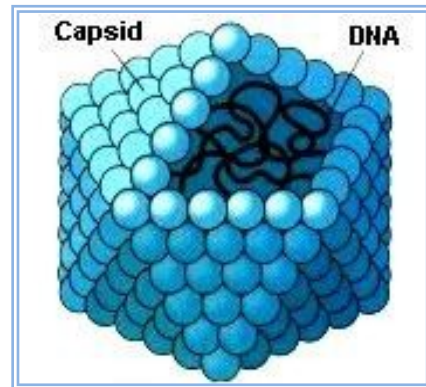


**Fig. 1:** JCV

John Cunningham.

### ***1.3 Morfologia e composizione antigenica***

Il virus JCV è privo di pericapside ed ha un capsid a simmetria icosaedrica, costituito da 72 capsomeri. I virioni hanno un piccolo diametro (45nm) e un peso molecolare di  $27 \times 10^6$  daltons. Il capsid è composto da 6 polipeptidi (da VP1 a



**Fig. 2:** Struttura di JCV

VP6). VP1 è la principale proteina del capsid e costituisce il 70% della massa del virione. VP2 e VP3 sono proteine minori del capsid. VP4, VP5 e VP6 sono istoni cellulari complessati con il genoma virale. Oltre che per le tre proteine del capsid, il genoma virale codifica anche per antigeni Large-T e small-t e per una proteina definita agnoproteina. L'assenza dell'envelope conferisce al JCV una rilevante resistenza ad agenti chimico-fisici quali radiazioni, temperatura e solventi. Il virus è resistente a trattamenti con etere, ma perde l'infettività a pH alcalino, a temperature superiori a  $100^{\circ}\text{C}$  o in seguito a trattamenti con detergenti<sup>4</sup>.

L'architettura del genoma è stata studiata nei dettagli ed è nota l'intera sequenza nucleotidica di tutti i Polyomavirus. Si sa che JCV e BKV hanno un'organizzazione genetica quasi identica, presentando un grado di

omologia del 75%. Il genoma del JCV, che rappresenta circa il 12% della massa virionica, è costituito da una molecola di DNA a doppio filamento circolare di 5 Kbp e di PM pari a  $3 \times 10^6$  daltons. All'interno della particella virale, il DNA si condensa a quattro istoni cellulari (H2A, H2B, H3 e H4) assumendo una forma superelicoidale e formando nucleosomi simili a quelli della cromatina cellulare<sup>5</sup>. Il materiale genetico, costituito da appena sei geni, contiene una quantità limitata di informazioni ed è funzionalmente suddiviso in due regioni, precoce e tardiva che trasportano circa metà delle informazioni genetiche; inoltre tra le due regioni sopra descritte esiste una regione di controllo non codificante (NCCR). La regione precoce viene espressa subito dopo l'ingresso del virus nel nucleo della cellula ospite e prima della replicazione virale. Essa contiene quei geni che codificano per proteine regolatrici non strutturali, come l'antigene Large-T (AgT) e l'antigene small-t, così chiamate in base al loro peso. L'antigene Large-T multifunzionale controlla direttamente il ciclo vitale del virus e interagisce con i circuiti chiave del ciclo virale. Le attività funzionali includono effetti sulla localizzazione nucleare del virus, sulla replicazione del DNA virale mediante il legame diretto al DNA, le attività delle elicasi e il legame della Polimerasi  $\alpha$  che dà inizio alla replicazione. Inoltre è fortemente coinvolto nella regolazione della trascrizione della regione precoce e della regione tardiva. Large-T,

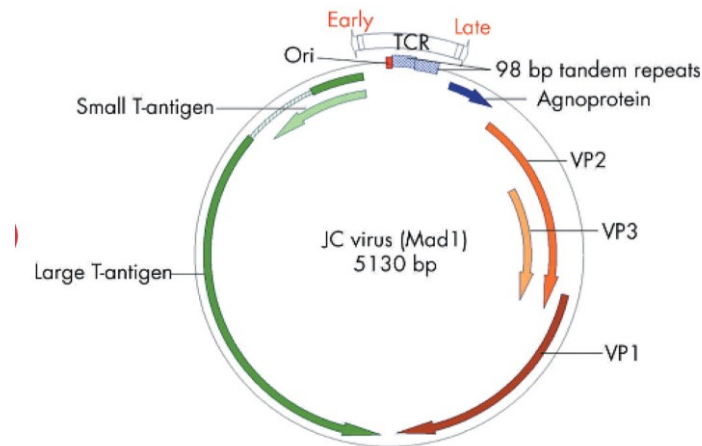


inoltre, è associato alla trasformazione cellulare in quanto interagisce con le proteine oncosoppressorie della cellula. Gli antigeni tumorali vengono sintetizzati da una molecola comune di pre-mRNA mediante un processo di splicing alternativo che comincia in una sequenza di DNA con regione N-terminale identica e regione C-terminale diversa. Recentemente sono state scoperte, in cellule infettate con JCV, altre tre proteine precoci: T'135, T'136 e T'165 che però influenzerebbero negativamente la funzione apoptotica di Large-T<sup>6</sup>.

<i>Early protein</i>	<i>Late protein</i>
<b>AgT</b>	<b>Agno</b>
<b>Agt</b>	<b>VP1</b>
<b>T'136</b>	<b>VP2</b>
<b>T'135</b>	<b>VP3</b>
<b>T'165</b>	

**Tab. 1:** Proteine *early* e *late* di JCV

La regione tardiva espressa durante e dopo la replicazione, racchiude informazione per proteine strutturali di rivestimento quali VP1, VP2 e VP3 (Tab. 1) che vengono codificate da mRNA derivanti da splicing alternativo di un unico trascritto primario. Ciascun virione contiene 360 copie di VP1 e da 30 a 60 copie di VP2 e VP3 (Fig.3).



**Fig. 3:** Struttura del genoma di JCV

Queste ultime hanno una sequenza nucleotidica in parte coincidente, infatti VP2 contiene l'intera sequenza di VP3 cui si sommano 400 amminoacidi al terminale amminico. Al contrario, la proteina maggiore VP1 è generata da un "reading frame" alternativo. Da questa regione viene anche codificata una piccola proteina chiamata agnoproteina, che in passato sembrava non essere essenziale per la replicazione del virus. Recentemente sembra che essa giochi un ruolo indispensabile durante il ciclo virale sia nella modulazione della trascrizione dei geni sia nella replicazione del DNA; infatti viene prodotta tardivamente nel ciclo litico e interagisce funzionalmente e fisicamente con la regolazione dell'antigene T e con un fattore trascrizionale cellulare YB-1. Allo stesso modo l'agnoproteina è coinvolta nella morfogenesi delle particelle virali,

nel trasferimento delle proteine capsidiche dal citosol al nucleo, nel trasporto vescicolare intracellulare e nella deregolazione della proliferazione cellulare mediante l'associazione con l'oncosoppressore p53.

La parte non codificante del genoma è definita da codoni di inizio per i geni precoci e tardivi. La regione ORI, che è localizzata tra la sequenza TATA box e il codone di inizio dei geni precoci, include il sito di legame per l'AgT. Questo segmento di DNA dei Polyomavirus risulta altamente conservato nella sequenza e nella struttura. La regione di controllo trascrizionale (TCR) è localizzata tra le due regioni codificanti ed è composta da un gran numero di proteine regolatorie differenti, abbraccia l'origine di replicazione e le sequenze geniche coinvolte nella regolazione trascrizionale dei geni precoci e tardivi (promotori ed enhancer). Tale regione è costituita da circa 200bp. La regione NCCR è considerata il modulatore principale dell'attività virale e del tropismo cellulare. Essa rappresenta anche la sequenza maggiormente variabile del genoma, giacché è sito di molteplici riarrangiamenti, duplicazioni e delezioni che si verificano nel corso della replicazione virale. Questi riarrangiamenti alterano il numero e la posizione delle sequenze che legano diversi fattori di trascrizione determinando diversi effetti nella replicazione del DNA virale, nella trascrizione e nel tropismo cellulare.

Il sequenziamento del genoma completo di JCV in relazione al gene di VP1, così come all'antigene T, ha permesso di classificare il virus in genotipi o sottotipi geograficamente differenti. L'analisi su isolati di JCV, provenienti da tutte le parti del mondo, ha rivelato l'esistenza di un gran numero di sottotipi del virus JC; attualmente se ne conoscono quattordici. Variazioni paragonabili nel virus BK e nel polyomavirus SV40 hanno indicato un ruolo dell'eterogeneità genomica tra i polyomavirus<sup>7-8</sup>. Sono stati osservati numerosi cambiamenti di singole basi nell'intero genoma di JCV e le sequenze TCR esibiscono differenze strutturali estese; mutazioni di singole basi nei geni codificanti non ne influenzano la lettura e sono considerate silenti poiché non hanno nessun effetto sulla composizione amminoacidica delle proteine. A differenza del BKV, il DNA di JCV non mostra nelle sequenze variazioni tali da generare sierotipi differenti, quindi per questo virus si può parlare esclusivamente di genotipi. Sebbene siano stati studiati il ruolo della proteina capsidica maggiore VP1 e le sue mutazioni sul punto di attacco del recettore, il possibile coinvolgimento delle alterazioni proteiche nella specificità cellulare dei sottotipi virali non è stata ancora chiarito. Di tutti i geni del virus, quelli di VP1 mostra il più alto grado di variazioni mentre l'agnogene è il più conservato. L'insieme delle variazioni sulla parte finale della sequenza per VP1 e le proteine dell'antigene T forniscono il mezzo per la sottotipizzazione V-T dei genotipi di JCV

nelle differenti aree geografiche. Attualmente, i maggiori genotipi V-T sono stati assegnati a diverse regioni geografiche mediante la creazione di un albero filogenetico basato sugli isolati di tutto il mondo. Il reale numero di genotipi è attualmente indefinito, poiché si pensa possa incrementare in relazione all'aumento delle popolazioni testate<sup>9</sup>. Cambiamenti all'interno di regioni non codificanti del virus JC vengono utilizzati per la classificazione dei tre maggiori sottotipi della regione TCR del virus: Classe I, Classe II e Archetipo (Fig.4).

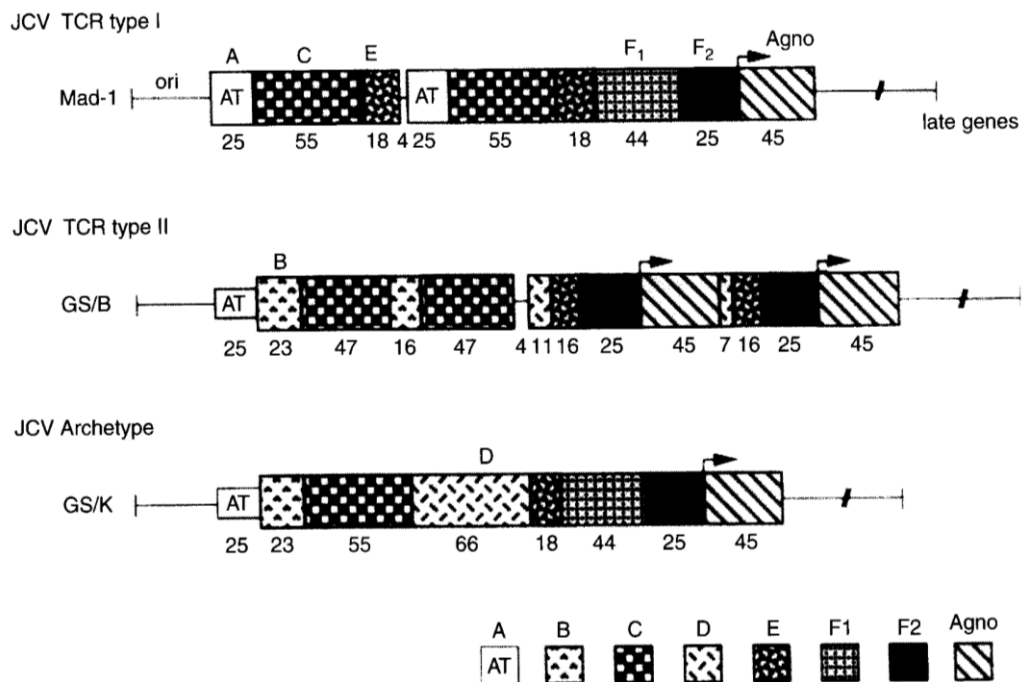


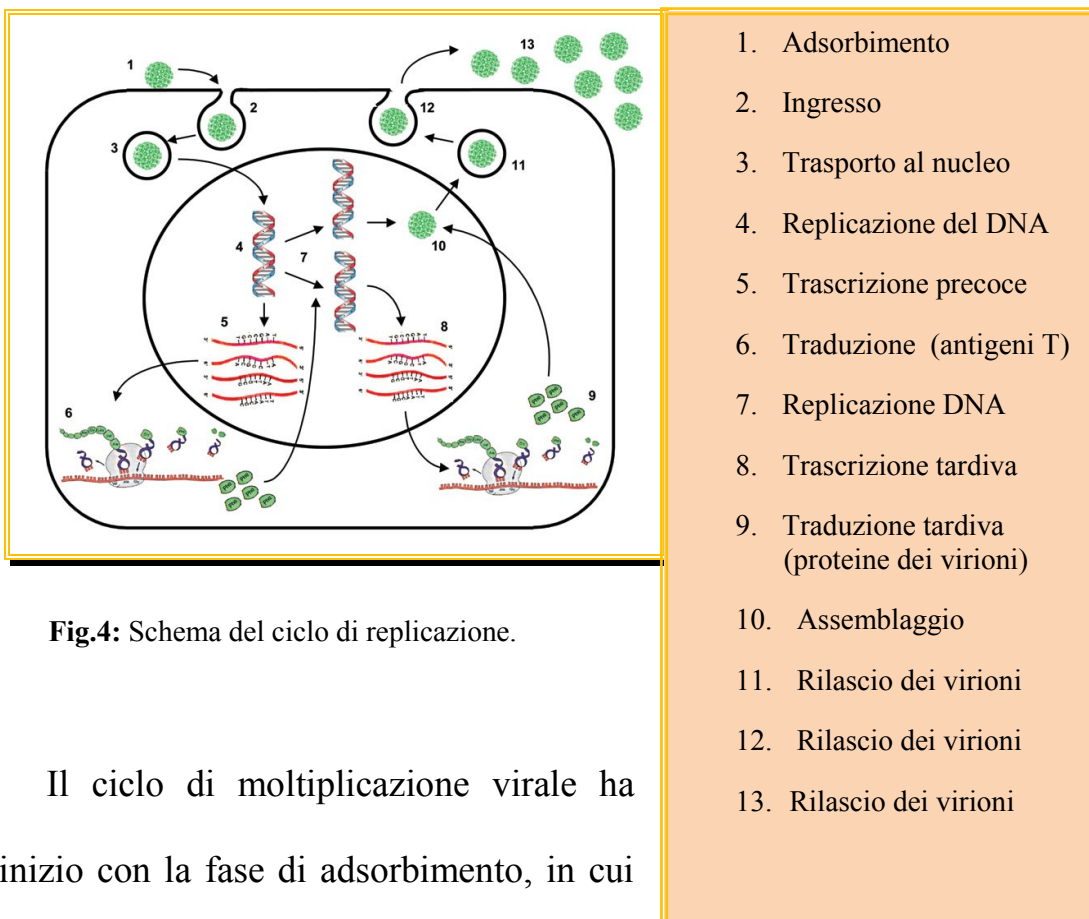
Fig.4: Sottotipi della regione TCR del JCV

Tutte le maggiori varianti isolate di JCV possono essere raggruppate in tipi base. L'estesa eterogeneità della regione TCR ha dato origine all'ipotesi che i riarrangiamenti potrebbero essere considerati come fattore di virulenza nel processo patogenico. Le giunzioni tra i domini di TCR sono variabili nella lunghezza e vengono usati preferenzialmente come punti di rottura quindi servono come fonte di pattern di sequenze riarrangiate. Il DNA del Tipo I contiene due sequenze di TATA dall'inclusione del TATA box nell'elemento ripetuto; il DNA di Tipo II ha soltanto una sequenza TATA e un'inserzione di 23bp che include una potenziale sequenza enhancer seguita da riarrangiamenti ripetuti. L'Archetipo, con un singolo elemento promotore e un'inserzione di 66bp, non presenta nessuna ripetizione significativa. Lo studio comparativo del genoma di popolazioni di JCV ha rivelato che un virus archetipo secondario potrebbe invadere i tessuti infetti. Durante l'infezione attiva, nella sequenza TCR di tipo I e di tipo II, possono essere generati elementi duplicati nel promoter (Fig.4), così da sviluppare sottotipi più virulenti nella popolazione di JCV TCR eterogenea, che potrebbero essere disseminati dalla periferia al cervello durante un'infezione persistente. L'immunodepressione non gioca un ruolo predominante nell'induzione dei riarrangiamenti e non è cellula tipo dipendente. Infatti è piuttosto chiaro che un numero di sottotipi TCR stabili potrebbe svilupparsi ed essere meno sensibile ai riarrangiamenti

rispetto ad altri. Non è chiaro se l'eterogeneità della sequenza TCR sia un fattore determinante nella crescita del virus o nella sua patogenicità. Insieme a queste linee, in alcuni pazienti con PML il genotipo Europeo/Americano 2 è stato trovato in combinazione con sequenze TCR tipo PML. Di conseguenza rimane aperta la questione secondo la quale i genotipi 1 e 2 potrebbero essere legati agli elementi TCR sia archetipo sia PML-tipo nei pazienti con PML e nei soggetti con infezione persistente. Poiché il raggruppamento geografico dei genomi di JCV TCR Tipo II non può essere sottovalutato, si deve tenere in considerazione l'ipotesi che una specifica combinazione genotipo di JCV/subtipo TCR possa essere associata alla PML<sup>10</sup>.

### 1.4 Ciclo replicativo

Il ciclo replicativo completo si svolge in un tempo compreso tra le 48 e le 72 ore, poiché dipende da variabili come temperatura, stato funzionale della cellula ospite e numero delle particelle virali che l'hanno infettata.



**Fig.4:** Schema del ciclo di replicazione.

Il ciclo di moltiplicazione virale ha inizio con la fase di adsorbimento, in cui avviene il riconoscimento dei recettori virus-specifici posti sulla membrana della cellula e l'interazione di questi con gli antirecettori



virali. L'andamento dell'infezione, però, dipende dal tipo di cellula infettata e dal suo stato fisiologico, poiché virus con genoma tanto piccolo sono fortemente dipendenti dalle funzioni cellulari. Inoltre, in cellule permissive ha luogo un'infezione produttiva con distruzione della cellula e produzione di nuova progenie virale, mentre in cellule non permissive ha luogo un'infezione abortiva (o non produttiva) che potrebbe promuovere la trasformazione oncogenica<sup>11</sup>. In pratica la replicazione del JCV è limitata alle cellule gliali e ai linfociti B per l'esigenza di proteine intranucleari cellulo-specifiche necessarie per la moltiplicazione del virus.

I recettori sulla membrana cellulare sono rappresentati da residui  $\alpha$  (2-3) e  $\alpha$  (2-6) acido sialico e poiché questi oligosaccaridi sono presenti in maniera ubiquitaria su glicoproteine e glicolipidi della membrana cellulare, il JCV può entrare in un ampio spettro di cellule dei vertebrati<sup>12</sup>. Il solo legame all'acido sialico non è sufficiente a favorire l'infezione; recentemente è stato scoperto che anche il recettore serotoninergico 5-HT<sub>2A</sub> assume un ruolo rilevante nell'uptake di JCV in cellule della glia umana<sup>13</sup>. In seguito all'attacco del JCV sulle cellule si verifica l'attivazione di proteine chinasi ERK1 e ERK2, eventi di signalling necessari per l'entrata del virus e per l'infezione. Il virus JC richiede proprio l'assemblaggio con parti della membrana rivestite da clatrina per entrare più rapidamente nella cellula target mediante

endocitosi. Dopo l'ingresso, il polyomavirus viene trasportato generalmente, attraverso il citosol, al nucleo grazie all'attivo trasporto favorito dal citoscheletro. La fase di internalizzazione richiede circa 2-4 ore. L'espressione dei Polyomavirus è essenzialmente divisa in tre fasi fortemente controllate. Dopo l'espressione delle proteine precoci regolatrici, Large-T (AgT) dà inizio alla replicazione del DNA e, poco dopo, la moltiplicazione virale entra nella fase tardiva, che prevede l'espressione degli mRNA tardivi. La traduzione dell'agnoproteina e la produzione delle proteine capsidiche virali sono seguite dall'assemblaggio dei virioni. I geni precoci continuano ad essere espressi durante gli stadi tardivi dell'infezione poiché servono come fattori di trascrizione. Le funzioni dell'AgT e dell'agnoproteina sono controllati da eventi consecutivi di fosforilazione. In confronto ad altri polyomavirus, il JCV ha un ciclo litico lungo con trascrizione precoce e fase di replicazione che durano circa 5 giorni seguiti da produzione di mRNA tardivi per 15-20 giorni; l'alta produzione di virus e la veloce progressione dell'infezione è stata chiarita dalla capacità di JCV di interferire con il programma di morte cellulare<sup>14</sup>. L'infezione da JCV è capace di indurre l'espressione di un membro della famiglia di proteine inibitorie dell'apoptosi chiamata survivina, come evento precoce mediato dall'antigene T e sostituito da meccanismi pro-apoptotici tardivi nell'infezione, quando la produzione di proteine tardive aumenta. Inoltre

l'agnoproteina potrebbe essere coinvolta nella soppressione dei segnali di sopravvivenza cellulare<sup>15</sup>. Dopo il legame alla membrana cellulare, i virioni entrano nella cellula per endocitosi e sono trasportati lungo il citoscheletro citoplasmatico, mediante l'espressione di una proteina di elongazione FEZ1, fino in prossimità di un poro nucleare, dove alcuni fattori provocano la liberazione del DNA all'interno del nucleo. A tal proposito è stata descritta la funzione dell'agnogene del JCV la cui interazione con proteine ligandi gioca un ruolo nella localizzazione citoplasmatica del virus; inoltre l'inibizione dell'agnogene danneggia il meccanismo di maturazione virale. La prima proteina ligando dell'agnogene che sia stata descritta fu la tubulina, una proteina dei microtubuli del citoscheletro. L'agnogene appare bloccare l'associazione di FEZ1 con i microtubuli inducendo in tal modo la sua dissociazione<sup>16-</sup>  
<sup>17</sup>. A questo punto il genoma virale viene trascritto dall'apparato biosintetico della cellula ospite (RNA polimerasi II) in una serie di messaggeri la cui trascrizione, che avviene bilateralmente dall'origine della replicazione, è sottoposta a controllo temporale; come già detto, essa avviene in presenza della regione ORI e di AgT procedendo dagli elementi ORI con i siti leganti l'AgT posizionati a circa 180° dal sito di origine. Le regioni ORI sono caratterizzate da sequenze ripetute invertite in corrispondenza del sito *early*, da una regione palindromica ricca in GC nella parte centrale e da una sequenza AT a livello del sito *late* di ORI. Studi

condotti sui polyomavirus umani confermano l'importanza delle sequenze succitate nella replicazione del DNA. Ciò rende possibile la comparsa di due serie di messaggeri che codificano rispettivamente per proteine "precoci" e per proteine "tardive". I messaggeri precoci sono trascritti dal genoma del virus infettante, mentre quelli tardivi dalle nuove molecole di DNA neoformato<sup>18</sup>. Dai messaggeri precoci e in seguito a splicing alternativi, come detto precedentemente, si ha l'origine degli antigeni small-t e Large-T. L'antigene Large-T, è una fosfoproteina nucleare ed è un fattore essenziale per la replicazione del DNA virale poiché si lega all'origine di replicazione (ORI) in cui promuove lo srotolamento della doppia elica e il reclutamento delle proteine cellulari che sono richieste per la sintesi del DNA<sup>19-20-21</sup>.

La replicazione del DNA, che avviene bilateralmente dall'origine della replicazione e in intermedi replicativi superavvolti, genera un filamento sintetizzato in maniera continua e l'altro sotto forma di diversi frammenti che saranno successivamente uniti. In questo processo è coinvolto un complesso di enzimi dell'ospite che comprendono primasi, DNA polimerasi  $\alpha$  e  $\beta$ , topoisomerasi I e II e RNAsi.

Il nuovo DNA replicato è complessato a istoni cellulari (H2A, H2B, H3 e H4). Questa fase è accompagnata dalla trascrizione della regione tardiva, dalla generazione di mRNA per l'espressione delle proteine tardive, dalla sintesi delle proteine del capsido e dall'assemblaggio dei

virioni. La liberazione dei virioni neoformati si verifica solo con la morte e la lisi della cellula infetta<sup>22</sup>.

In cellule non permissive, all'infezione segue la produzione di antigeni Large-T e dei trascritti primari, ma non vengono sintetizzati i trascritti tardivi e le proteine tardive. Alcune cellule infettate poiché mantengono ed esprimono antigeni Large-T, potrebbero subire mutazioni a livello genico, con potere oncogeno, che possono stimolare la replicazione del DNA cellulare interferendo con i prodotti dei geni oncosoppressori p53 e pRb. Secondo quanto descritto da diversi studi in vitro, che mostrano come il JCV sia il solo Polyomavirus umano che possa indurre tumori solidi (astrocitomi, glioblastomi e neuroblastomi) in primati non umani<sup>23</sup>; questo meccanismo pare essere alla base dell'induzione di patologie neoplastiche. Infatti, le proteine virali precoci, in sistemi sperimentali, hanno dimostrato di avere un alto potenziale trasformante (oncogeno)<sup>24-25</sup>. Tali antigeni tumorali vengono sintetizzati da una molecola comune di pre-mRNA mediante un processo di splicing alternativo che comincia in una sequenza di DNA con regione N-terminale identica e regione C-terminale diversa.

La regione di controllo trascrizionale di JCV (TCR) è stata artificialmente suddivisa nel dominio ORI e in 4 subdominii TCR da A a D, in ognuno dei quali è stato osservato un gruppo di siti *promoter* interattivi delle regioni precoce e tardiva (Fig. 4).

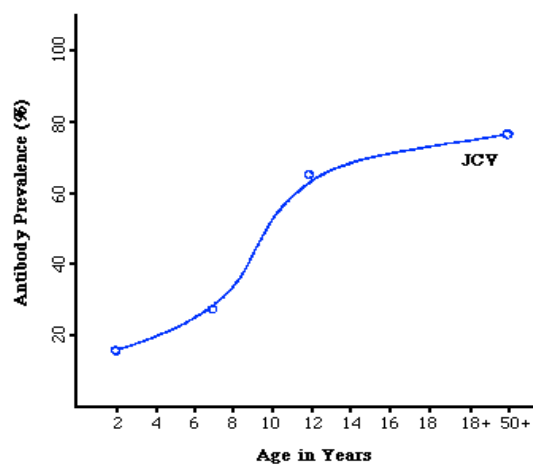
All'esterno del dominio TCR sul sito precoce di ORI è stata localizzata una sequenza legante per il potente fattore trascrizionale nucleare kB, noto come NF-kB, ed un sito potenzialmente legante il fattore di attivazione dei linfociti T (NFAT1). NF-kB è espresso costitutivamente nei linfociti B e può essere mantenuto nel citoplasma da una proteina inibitrice (IκB). L'*enhancer* trascrizionale viene attivato mediante la stimolazione da parte di un numero di agenti attivanti come i *promoters* tumorali (forbol-miristato-acetato o PMA) o le citochine infiammatorie che ne esplicano la sua attività. Inoltre il fattore di necrosi tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) favorisce il legame del fattore trascrizionale nucleare kB al suo sito di legame kB del JCV regolando l'espressione di molti geni virali e cellulari<sup>26</sup>. NF-kB normalmente è complessato nel citoplasma con la proteina IκB<sup>27-28</sup>, ma recettori attivati per le citochine pro-infiammatorie stimolano proteine chinasi a fosforilare IκB affinché NF-kB venga rilasciato attivo nel nucleo<sup>29</sup>. Come NF-kB un altro fattore di trascrizione di JCV, C/EBP $\beta$ , modula la funzione degli elementi Kb<sup>30</sup>. In modo simile il fattore NFAT1 è responsivo al fattore di necrosi  $\alpha$  e alla Interleuchina-2 (IL-2). Quanto detto finora avvalora il concetto secondo il quale l'attivazione del controllo trascrizionale *in vivo*, per la modulazione dell'espressione di JCV, dipende dall'espressione di fattori inducibili coinvolti nei meccanismi di segnale immunologicamente

regolati. Questo mostra che l'interferenza con la funzione di kB nell'espressione dei geni tardivi riduce l'attività ma non la blocca del tutto. Questo sosterebbe che gli elementi TCR possano coinvolgere il promotore della regione tardiva di JCV durante lo stato di persistenza dell'infezione. La sequenza specifica ricca in GGA/C (GRS) all'interno della regione ORI potrebbe interagire anche con la kB e, in modo simile, risulta inducibile sia dal PMA sia dalle citochine infiammatorie. La regione responsiva interagisce con la nuova proteina legante la sequenza GGA/C che è detta GBP-i la quale viene indotta in una vasta gamma di tipi cellulari; così essa svolge una funzione nella mediazione dell'attivazione del virus JCV in tutti i siti di persistenza sospetti. Allo stesso modo della classe delle proteine NF-kB, i complessi della proteina GBP-i probabilmente rappresentano un assemblaggio combinatorio di varie specie di proteine che viene modificato in seguito ad induzione. La duplice funzione potrebbe coinvolgere il meccanismo di trascrizione basale e altre proteine trascrizionali associate con l'attività tardiva del promotore.

## 2. PATOLOGIA E PATOGENESI

### 2.1 Epidemiologia

L'ubiquitariet  del virus JCV   dimostrata dalla presenza di anticorpi specifici nel 70–80% della popolazione mondiale. La comparsa degli anticorpi avviene durante l'infanzia e la maggior parte delle persone diventa sieropositiva a circa 10 anni



**Fig. 5:** Sieroprevalenza in base alle diverse fasce di et 

(Fig.5). Attualmente l'uomo   l'unico ospite conosciuto e non si conoscono serbatoi animali. L'esatta via di trasmissione dell'infezione   ancora poco chiara. Probabilmente la trasmissione avviene per via aerogena o per ingestione di acqua e/o cibi contaminati<sup>31</sup>. Altre potenziali fonti di contagio possono essere alcuni fluidi biologici infetti tra cui sperma, sangue e urina; queste vie di trasmissione, per , non giustificerebbero l'elevata sieroprevalenza che si riscontra nell'infanzia



e, anche in base a studi recenti, la via di trasmissione transplacentare è poco probabile<sup>32</sup>.

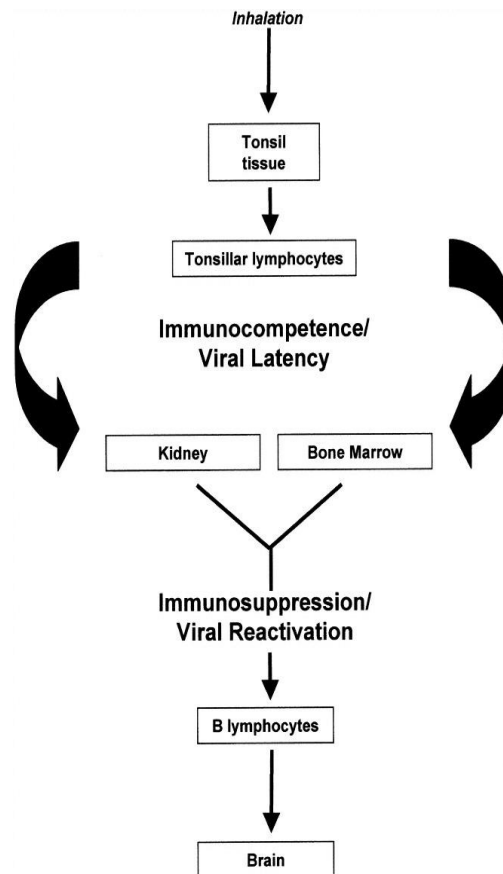
I principali ceppi virali finora identificati sono otto e includono i genotipi 1 e 4, diffusi principalmente in Europa, Siberia e America settentrionale<sup>33</sup>, ed i genotipi 3 e 6 che sono diffusi rispettivamente in Africa Orientale e Africa Centro-Occidentale<sup>34</sup>. Il tipo 2, chiamato tipo europeo-asiatico, fu scoperto in un'ampia regione che si estende dall'Europa all'Asia occidentale ed orientale. In Italia i genotipi più frequenti sono l'1 e il 4, mentre è raro rilevare il genotipo 2<sup>35</sup>. In Asia molti territori sono dominati dal tipo 2A che è strettamente correlato ai tipi Cy e My giapponesi. I genotipi 2 e 7 sono più frequenti in Asia e nelle popolazioni a sud della Cina, mentre il genotipo 8 è stato identificato in Papua Nuova Guinea e nelle isole dell'Oceano Pacifico<sup>36</sup>. Nonostante la comparsa degli anticorpi, il virus non viene eliminato dall'organismo, rimane latente nel rene e nel midollo osseo, rendendo l'ospite portatore sano fino ad un eventuale riattivazione. Il JCV ha uno spiccato neurotropismo, come evidenziato dalla sua capacità di infettare il cervello nei casi di PML, dalla possibilità di coltivarlo *in vitro* in cellule fetali gliali e dalla sua capacità di indurre tumori cerebrali in primati non umani inoculati sperimentalmente. Per questi motivi il JCV, originariamente, fu ritenuto strettamente neurotrofo. Studi successivi hanno invece dimostrato che JCV è capace di infettare altri citotipi,

come cellule dello stroma tonsillare, cellule progenitrici ematopoietiche, cellule renali e colture primarie di endotelio vascolare .

Molti studi hanno documentato lo stato di latenza del JCV nei linfociti B ma il suo genoma è stato reperito anche in altri distretti dell'organismo come cervello, polmone, milza, fegato e tonsille, e proprio le cellule del tessuto tonsillare rappresentano la prima sede d'infezione<sup>37</sup>. Il virus in seguito all'interazione con il recettore della cellula suscettibile, viene internalizzato e, giunto a livello nucleare si replica e trascrive il suo bagaglio di informazioni. In seguito a questa prima replicazione regionale il virus passa ai linfociti B tonsillari circolanti. Tali cellule si agganciano agli elementi dello stroma tonsillare attraverso vari meccanismi molecolari di adesione che facilitano il trasferimento del virus al linfocita. Il virus, adeso alla membrana cellulare oppure internalizzato nei linfociti B, viene trasportato in tutto l'organismo<sup>38</sup> dal quale non viene eliminato ma vi rimane in forma latente al livello del rene e del midollo osseo, rendendo l'ospite portatore sano fino ad una eventuale riattivazione (Fig. 6).

I linfociti B, oltre a rappresentare il mezzo attraverso cui i virioni raggiungono la loro sede d'azione, rappresentata fondamentalmente dal cervello, o quella di latenza, rene e midollo spinale, potrebbero anche servire da serbatoio del virus.

Il virus viene riattivato in varie condizioni nelle quali la funzione dei linfociti T è gravemente compromessa, quali, per esempio trapianti d'organo, AIDS, terapie immunosoppressive per patologie neoplastiche, gravidanze, diabete e tarda età.



**Fig. 6:** Diagramma della possibile diffusione di JCV nell'uomo

Lo stato del sistema immunitario non è l'unico fattore coinvolto nel processo di riattivazione. Studi recenti hanno provato che soggetti con accertata infezione da JCV, nonostante una deficitaria risposta immunitaria, non manifestano la PML.

Possono essere due gli esiti di un'infezione da JCV: infezione litica in cellule permissive come gli oligodendrociti che permettono la replicazione del DNA virale; infezione silente o abortiva in cellule non permissive come nel caso dell'epitelio colon-rettale, determinando una probabile trasformazione delle cellule con conseguente insorgenza di cancro<sup>39</sup>. Invece, il reperimento di JCV DNA, a livello della mucosa del colon, in soggetti normali e in soggetti affetti da retto-colite ulcerosa (RCU), indurrebbe ad avanzare l'ipotesi secondo la quale il virus entrando in latenza nelle cellule epiteliali intestinali, in seguito a terapie cortico-steroidi, sfugga alla sorveglianza immunitaria e si riattivi. Nonostante la presenza del JCV sia stata dimostrata in alcuni tumori umani, sia di origine neuronale che non, come ad esempio il carcinoma del colon<sup>40</sup> e del polmone<sup>41</sup>, è stata frequentemente descritta la presenza di sequenze virali sia nel tratto gastrointestinale normale sia in casi di cancro del colon e dello stomaco<sup>42-43</sup>, probabilmente ciò può essere associato alle modalità di trasmissione. Infatti, oltre alla trasmissione oro-faringea, si ipotizza anche una via fecale-orale facilitata dall'ingestione del virus tramite cibi contaminati; ciò spiegherebbe la

presenza del virus presso un distretto dell'organismo non particolarmente permissivo, come ad esempio le cellule della mucosa intestinale, e l'instaurazione di un'infezione abortiva con conseguente probabile attivazione del meccanismo neoplastico. Attualmente non sono chiari il ruolo e i meccanismi molecolari con i quali il JCV possa indurre neoplasia, probabilmente sono coinvolte le tre proteine regolatrici codificate dal genoma virale: antigene Large-T, antigene small-t e agnoproteina e diverse alterazioni nei meccanismi genetici ed epigenetici<sup>44</sup>.

## ***2.2 Infezione persistente***

In seguito ad infezione primaria il virus persiste nell'organismo ospite per tutta la vita. Il sistema nervoso centrale (SNC), il sistema ematopoietico e soprattutto il rene ne costituiscono i *reservoir* più importanti<sup>45-46</sup>; infatti, il reperimento del virus nel tratto urinario (tessuto renale, pelvi renale e uretere) di individui immunodepressi e donne in gravidanza spiega perfettamente il concetto di persistenza e riattivazione. Inoltre, l'alta frequenza di positività al DNA di JCV nella porzione midollare del rene, indica che in questo sito le cellule epiteliali del rivestimento interno dei tubuli sono i bersagli migliori e più spesso sottoposti al processo di attivazione rispetto ad altre cellule del tratto

renale. La moltiplicazione nel tratto urinario potrebbe produrre una viruria transitoria, che nei soggetti immunocompetenti non manifesta alcun effetto patologico<sup>47</sup> poiché il virus rimane latente per un tempo indefinito. JCV è pure frequentemente presente nel basso e nell'alto tratto intestinale, essendo rilevabile in circa il 76-100% della mucosa esofagea e gastrica. Questo dimostra che il tratto gastrointestinale, vista l'alta prevalenza del virus, può considerarsi un nuovo sito di persistenza<sup>48</sup>. La disseminazione dei polyomavirus umani in diversi organi porta all'ipotesi che il virus venga diffuso per via ematica. Questo fu sostenuto da un recente studio sulle particelle di polyomavirus nei linfociti di bambini immunocompetenti e ha indotto altre ricerche sul ruolo generale delle cellule linfoidei nell'instaurazione della persistenza del virus<sup>49</sup>. La diffusione per via ematica del virus JC al SNC caratterizza la distribuzione multifocale del virus nella PML<sup>50</sup>. A conferma del fatto che le cellule linfoidei potrebbero essere coinvolte nella diffusione del virus nell'organismo, vengono occasionalmente chiamati in causa milza e linfonodi come potenziali serbatoi del virus. Questo è stato confermato dalla presenza di DNA di JCV e di proteine del capsido in un piccolo numero di linfociti B nel midollo osseo e nella milza di pazienti HIV positivi affetti da PML. I linfociti T CD4/CD8+ non vengono infettati. La presenza di cellule polimorfonucleate infettate da JCV nel parenchima perivascolare e negli spazi di Virchow-Robin conferma il

trasporto ematico come via d'ingresso del JCV a livello encefalico. Sebbene il virus potrebbe non essere reperito nella milza dei pazienti affetti da HIV-1 e nei controlli, il ritrovamento del DNA virale nel 40% dei soggetti affetti da PML conferma il suo accumulo negli organi linfoidi<sup>51</sup>. Questa tesi secondo la quale i linfociti siano *reservoir* e vettori per la distribuzione del JCV chiude il cerchio delle informazioni sulla patogenesi del virus JC. Il ruolo dell'infezione del virus JC nelle cellule linfoidi è stato chiarito dalla scoperta che i linfociti B tonsillari e le cellule dello stroma cellulare possano essere cellule ospiti per l'infezione da JCV. Infatti, la coltivazione delle cellule tonsillari con la conseguente dimostrazione della presenza di DNA del virus ha confermato la caratteristica di suscettibilità di tali cellule. Queste scoperte confermano che le tonsille oltre ad essere coinvolte durante la fase di infezione primaria sono anche sito di persistenza virale.

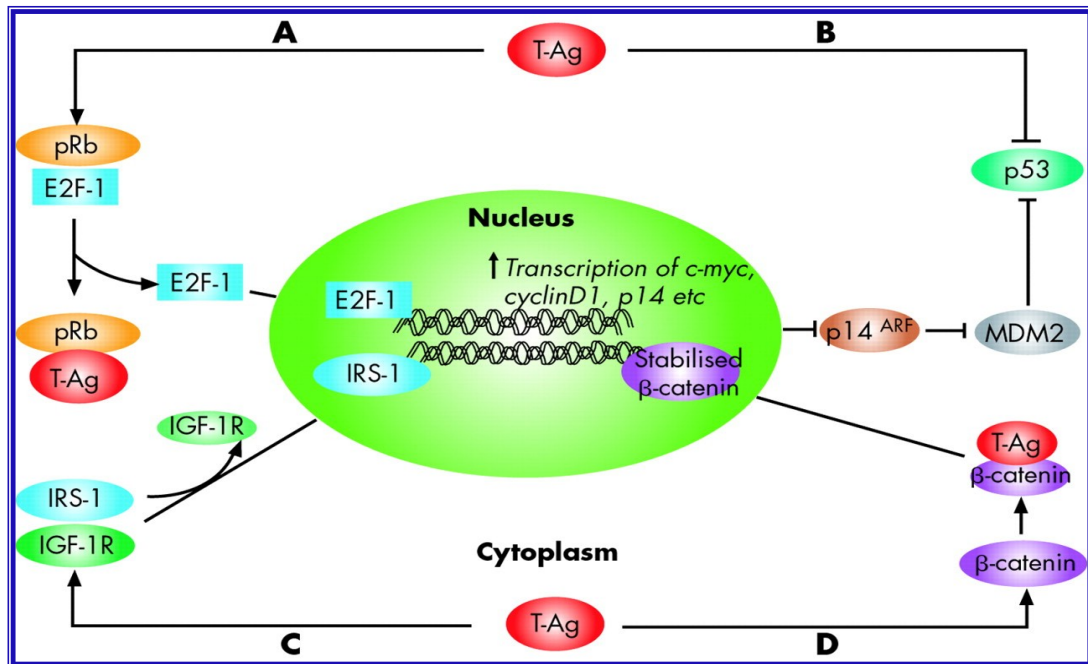
### ***2.3 Potere oncogeno di JCV***

Evidenze sperimentali e cliniche hanno dimostrato il ruolo del virus JC nell'insorgenza del cancro grazie alla sua capacità di trasformazione di cellule in coltura, con particolare riguardo a cellule di origine gliale sia umane sia animali. I geni che subiscono mutazioni, e per questo coinvolti nel processo di cancerogenesi, possono essere

classificati in tre ampie categorie: oncogeni, oncosoppressori e mutanti. Lo sviluppo di una instabilità del genoma cellulare è un evento importante nei processi di carcinogenesi. Le vie che possono portare all'instabilità del genoma sono fondamentalmente due: la prima è caratterizzata dai tumori che hanno una diffusa instabilità microsatellitare (MSI), che è la conseguenza di un sistema difettivo nella riparazione del mismatch del DNA (MMR). Questo meccanismo si verifica sia a causa di mutazioni della linea germinativa nei geni MMR sia a causa della metilazione che induce il silenziamento del gene hMLH1<sup>52</sup>. Si pensa che l'inattivazione del gene hMLH1, attraverso l'ipermetilazione del *promoter*, sia la causa del fenotipo MSI nella maggioranza dei carcinomi gastrici sporadici<sup>53</sup>. La seconda e la più comune via dell'instabilità genomica è caratterizzata dall'inattivazione delle sequenze dei geni oncosoppressori e dall'attivazione di geni oncogeni. Geni come *Ras* e *Raf* sono dei proto-oncogeni che mutando diventano attivi oncogeni inducendo l'insorgenza del cancro nell'uomo<sup>54-55</sup>. Pertanto, viene alterata la regolazione della proliferazione cellulare che porta a crescita incontrollata delle cellule e ad inibizione del meccanismo di apoptosi cellulare. Alla base di questo meccanismo neoplastico è previsto un coinvolgimento dei geni *early* di JCV, il cui prodotto di sintesi, in particolare AgT, interagisce con alcuni enzimi della cellula ospite coinvolti nel controllo di varie funzioni cellulari,



inclusi il ciclo cellulare e i meccanismi di riparazione e di sintesi del DNA<sup>56</sup>. Le proteine coinvolte in tale interazione sono gli oncosoppressori p53 e pRB, i fattori di necrosi 1 e 2 (NF1/NF2) e la  $\beta$ -catenina. AgT interferisce disattivando i due oncosoppressori p53 e pRB



i quali, all'interno della cellula, hanno la funzione di proteggere il DNA da eventuali danni, regolare la progressione del ciclo cellulare ed indurre il processo di apoptosi. L'antigene T si lega pure alla  $\beta$ -catenina<sup>57-58</sup> per arrivare al nucleo, dove viene aumentata l'espressione del gene *c-myc* e *Ciclina D* nei casi di medulloblastoma, cancro del colon e cancro dell'esofago<sup>59-60-61-62</sup> (Fig.7).

**Fig. 7:** Interazione dei diversi fattori nel processo neoplastico.

Inoltre è stato dimostrato come AgT si leghi direttamente al substrato 1 del recettore per l'insulina (IRS-1) per essere trasportato all'interno del nucleo<sup>63</sup>, dove contribuisce al processo di cancerogenesi nei bambini con medulloblastoma<sup>64</sup>.

La proteina virale interferisce con la riparazione del DNA, per mezzo della proteina Rad51, e sembra essere responsabile dell'attivazione della survivina, inibitore del processo di apoptosi. E' stata documentata l'espressione della proteina Large-T specificatamente nei nuclei delle cellule del cancro del colon e non nelle cellule dell'epitelio normale adiacente<sup>65</sup>. L'antigene small-t (Agt) probabilmente non è essenziale per il ciclo virale, ma potrebbe rappresentare un'oncoproteina che stimola diversi meccanismi di crescita. Agt si lega anche ad una proteina regolatrice fosfatasi negativa 2A (PP2A), regolatrice della progressione e trasformazione cellulare e ad uno *chaperon* molecolare CDC37 che svolge la sua funzione nel passaggio dalla fase G1 alla fase S del ciclo cellulare. Analogamente viene bloccata la funzione della proteina pRB che si lega ai fattori di trascrizione cellulare E2F i quali promuovono il passaggio dalla fase G1 alla fase S, impedendo pertanto l'espressione dei geni *c-fos* e *c-myc* necessari per entrare in fase S. Le cellule trasformate dal JCV manifestano proprietà fenotipiche alterate come la morfologia e la produzione dell'attivatore del plasminogeno.

### ***3. MATERIALI E METODI***

#### ***3.1 Campioni***

Lo studio retrospettivo, è stato condotto presso l'unità di Virologia Clinica del Laboratorio Analisi dell'A.U.O. Policlinico-Vittorio-Emanuele, Presidio Ospedaliero "Gaspare Rodolico" di Catania. I soggetti inclusi nello studio erano pazienti ricoverati o seguiti ambulatorialmente, nel periodo compreso tra gennaio 2008 e gennaio 2011, presso le unità operative di ematologia, trapianti, gastroenterologia e chirurgia dell'apparato digerente di diversi nosocomi della città di Catania. In questo studio sono stati presi in considerazione 200 campioni di plasma, provenienti da un corrispondente numero di pazienti, inviati al laboratorio di virologia per l'esecuzione delle indagini virologiche previste dai protocolli diagnostici applicati a ciascuna tipologia di

pazienti suddivisi per patologia di base: Leucemia Linfatica o Mieloide Acuta (LLA o LMA), Linfoma di Hodgkin o non Hodgkin (LH o LNH), trapiantati di organo solido (SOT), nello specifico di rene, trapianto di midollo osseo (TMO), RCU e sottoposti a terapia steroidea.

Alcune caratteristiche e le percentuali relative alle varie categorie di pazienti sono esposte in tabella 2, mentre la consistenza di ciascun gruppo può essere meglio apprezzata nel grafico 1.

Nello studio, inoltre venivano inclusi 55 campioni biotipici: 16 (29%) biopsie a fresco prelevate da soggetti affetti da RCU, 19 (34,5%) biopsie intestinali incluse in paraffina, provenienti da soggetti con forme precancerose o carcinoma (Ca) del colon, 20 (36,5%) biopsie renali paraffinate, prelevate in seguito a sospetto rigetto del rene trapiantato (Tab. 3-Graf. 2).

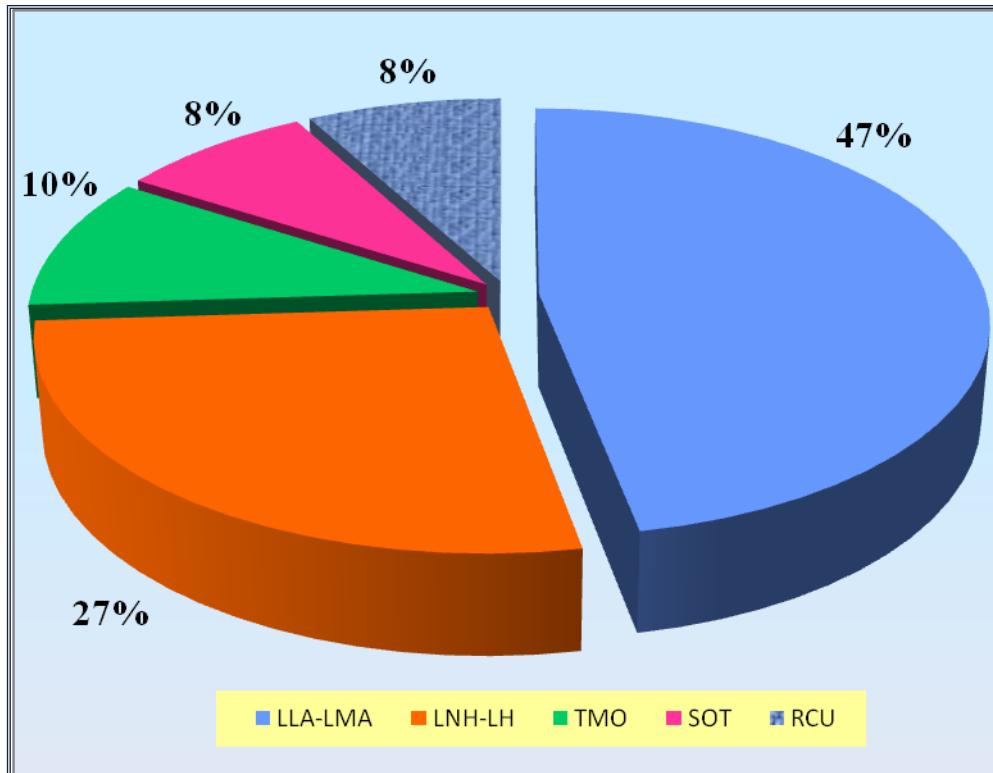
I campioni di plasma provenienti dai reparti di ematologia e trapianti, e le biopsie intestinali a fresco, prelevate durante l'esame endoscopico (colonscopia) presso i reparti di gastroenterologia, venivano trasportati entro 60-90 minuti dal prelievo e processati immediatamente dopo l'arrivo presso il Laboratorio di Virologia. I campioni relativi ai pazienti affetti da polipi adenomatosi o Ca intestinale e le biopsie ottenute in seguito a trapianto di rene, prelevati in sede operatoria, venivano inviati all' U.O. di Anatomia Patologica per essere inclusi in

paraffina al fine di garantire la corretta conservazione e la successiva indagine istologica.

Per un approfondimento diagnostico, di questi ultimi campioni, venivano inviate all'U.O. di Virologia Clinica per le indagini virologiche, almeno due sezioni dello spessore di circa 5-10µm, così come suggerito da Woon-Tae Jung et al. (2007) e Sahnla Enam et al. (2002).

<b>Pazienti Tot.200 N(%)</b>	<b>Età (mediana)</b>	<b>Sesso M/F</b>	<b>Caratteristiche cliniche</b>
<b>94 (47%)</b>	<b>18-81(47)</b>	<b>70/22</b>	<b>LAM o LLA</b>
<b>54 (27%)</b>	<b>18-84(47)</b>	<b>35/19</b>	<b>LNH-LH</b>
<b>20 (10%)</b>	<b>23-84(47)</b>	<b>12/8</b>	<b>TMO</b>
<b>16 (8%)</b>	<b>43-66(54)</b>	<b>10/6</b>	<b>SOT (rene)</b>
<b>16 (8%)</b>	<b>23-65(51)</b>	<b>10/6</b>	<b>RCU</b>

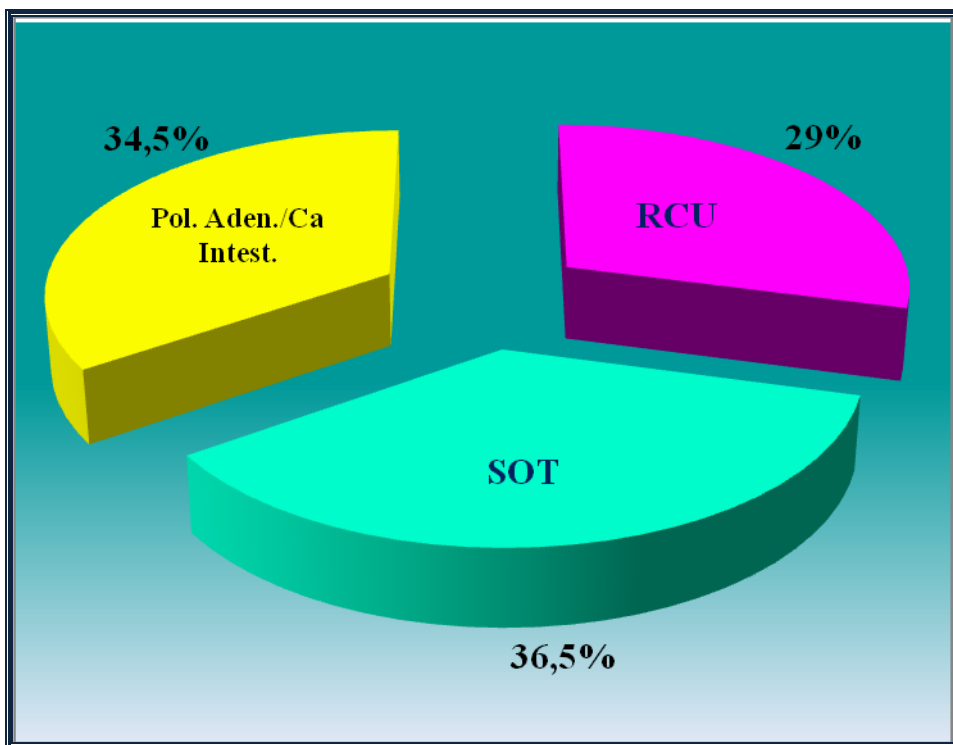
**Tab. 2:** Età, sesso e caratteristiche cliniche dei pazienti arruolati nello studio.



**Graf. 1:** Distribuzione dei pazienti inclusi nello studio in base alle caratteristiche cliniche.

Tot. 55 Pazienti N(%)	Età (mediana)	Sesso M/F	Caratteristiche cliniche
16 (29%)	23-65 (51)	12/6	RCU
19 (34,5%)	21-87 (66)	11/8	Polipi adenomatosi del colon/Ca intestinale
20 (36,4%)	29-64 (51)	8/12	SOT (rene)

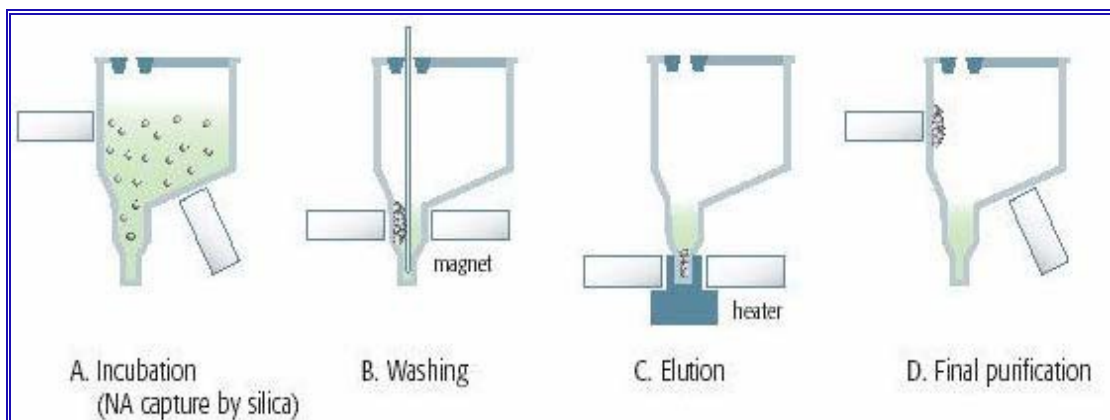
**Tab. 3:** Distribuzione dei campioni biotipici a fresco e paraffinati, provenienti da pazienti affetti da RCU, Polipi adenomatosi del colon/Ca colon e SOT



**Graf. 2:** Percentuali di biopsie intestinali e renali analizzati nello studio.

### 3.2. Estrazione degli acidi nucleici da campione di plasma

Veniva impiegato un sistema di estrazione automatico, Nuclisens® EasyMag Biomérieux, basato sulla tecnologia di estrazione con la silice (detta anche tecnologia di BOOM). Durante l'incubazione dei campioni trattati con tampone di lisi, contenente tiocianato di guanidina, l'acido nucleico veniva catturato da particelle di silice magnetica. Il dispositivo magnetico del Nuclisens® EasyMag attrae la silice, dando la possibilità al sistema di purificare gli acidi nucleici attraverso una fase di lavaggi ripetuti eseguiti mediante l'impiego di due tamponi differenti; il procedimento è schematizzato in Figura.8.



**Fig. 8:** Metodo di estrazione basato sulla tecnologia di BOOM.

Al termine del ciclo di lavaggio si ha la liberazione degli acidi nucleici dalla silice mediante riscaldamento con successiva separazione dell'eluato dalla silice grazie all'impiego del dispositivo magnetico.



### ***3.3 Estrazione degli acidi nucleici da campione biotico***

I campioni biotici venivano trattati secondo le istruzioni dettate dal kit manuale commerciale utilizzato (DNeasy<sup>R</sup> Blood & Tissue Qiagen GmbH, Hilden). Per le biopsie paraffinate veniva applicato un procedimento preliminare, precedentemente messo a punto dal laboratorio di Virologia Clinica, per la completa eliminazione della paraffina dal tessuto e un eccellente mantenimento della qualità degli acidi nucleici da estrarre.

### ***3.4 Amplificazione mediante PCR***

L'amplificazione dell'acido nucleico del virus JC veniva eseguita mediante una tecnica di PCR qualitativa in "house". Venivano utilizzati primers esterni per il I round di amplificazione e primers interni per il II, costruiti sulle sequenze genomiche ottenute da NCBI GenBank, nella regione dei geni o porzioni geniche codificanti rispettivamente la proteina Large-T e la porzione corrispondente all'introne *late* mRNA di mVP1/mVP2 (VP1/VP2). Questa tecnica richiede una miscela di componenti (buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Taq polimerasi, H<sub>2</sub>O) con volume finale di 50 µl in cui vengono risospesi 10µl DNA estratto per ogni campione. I cicli di amplificazione, pari a 35, sono stati effettuati in un termociclatore Perkin Elmer "GeneAmp PCR System 9700" (Applied

Biosystems, Monza, Italia). Il profilo termico delle reazioni del I round era: denaturazione iniziale a 95°C per 4', seguita da 35 cicli di denaturazione a 95°C per 1', annealing a 50°C per 1' ed estensione a 72°C per 1 minuto. Il profilo termico si concludeva con una estensione finale a 72°C per 5'. Per aumentare sia la specificità sia la sensibilità del metodo, si ricorreva ad una nested PCR, in cui un'aliquota del primo amplificato veniva sottoposta ad una seconda amplificazione (nested) utilizzando dei "primers" interni.

Terminata l'amplificazione, il prodotto ottenuto veniva sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio per la valutazione della presenza di bande caratteristiche, in peso molecolare, delle sequenze amplificate rispettivamente di 171bp per la regione precoce e di 322bp per la regione tardiva.

I campioni positivi per JCV venivano successivamente confermati con l'utilizzo di un kit commerciale di real-Time PCR (JCV Q-PCR Alert Kit, Nanogen Advanced Diagnostics, Milano, Italia). La reazione di amplificazione veniva eseguita con un ABI PRISM 7000 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Monza, Italia) utilizzando la tecnica Taqman.

La reazione di amplificazione, relativa alla sequenza Large T, avveniva all'interno di un volume di 25µl di cui 20µl di JCV-Q PCR Mix (Nanogen) e 5µl di DNA estratto di ogni campione in esame; inoltre

nella stessa seduta venivano inseriti un controllo negativo ( $K^-$ ) e un campione certamente positivo ( $K^+$ ). Il profilo termico delle reazioni era: 50°C per 2', denaturazione iniziale di 95°C per 10' seguita da 45 cicli a 95°C per 15'' (denaturazione) e 60°C per 1' (annealing ed estensione). I dati di amplificazione venivano analizzati dal Sequence Detection System software (Applied Biosystems) e ciascun campione veniva validato anche sulla base della presenza, nel pozzetto corrispondente, del gene housekeeping ( $\beta$ -globina), utilizzato quale controllo interno di estrazione. I risultati venivano considerati accettabili con un Ct della  $\beta$ -globina inferiore a 39.

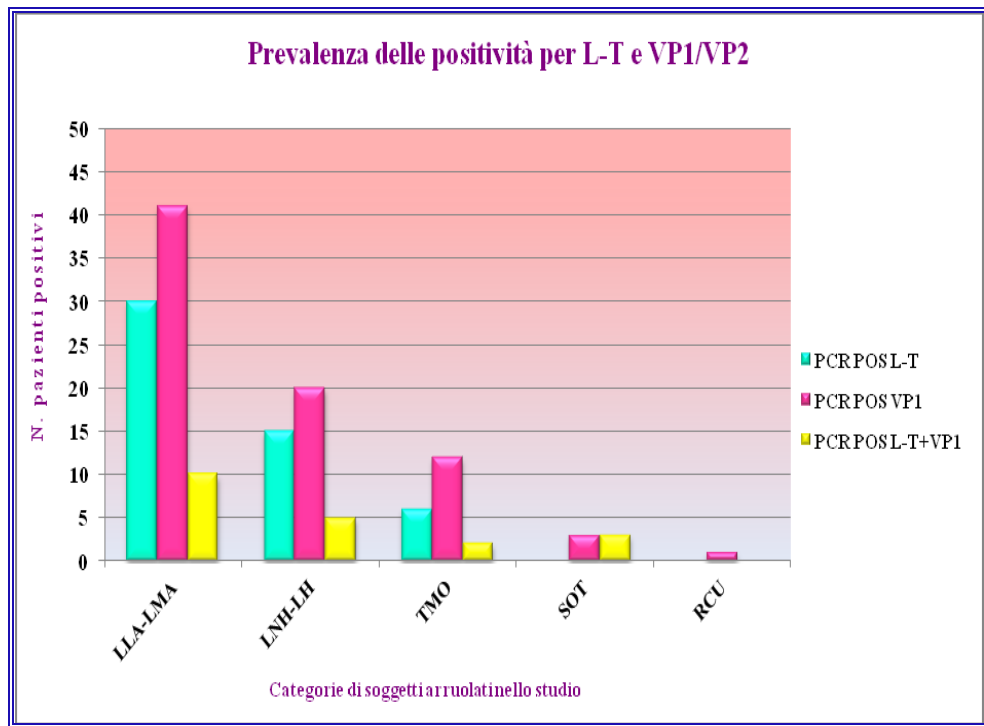
#### ***4. RISULTATI***

Dei 200 campioni di plasma analizzati 148/200 (74%) erano positivi per le sequenze di JCV ricercate e 52/200 (26%) erano negativi. In particolare, la positività per la sequenza Large-T (L-T) veniva reperita nel 25,5% dei casi trattati (51/200 campioni) a fronte di una positività del 38,5% (77/200 campioni) per la sequenza VP1/VP2. Di tutti i soggetti affetti da LLA o LAM il 32% (30/94) era positivo solo alla sequenza precoce L-T, il 43,4% (41/94) alla sequenza VP1/VP2 ed il 10,6% (10/94) mostrava una contemporanea positività ad entrambe le sequenze. Per i pazienti con LNH o LH la sequenza L-T era rilevata nel 28% (15/54) dei casi, la sequenza tardiva nel 37% (20/54) ed entrambe nel 9% (5/54). In tutti i pazienti sottoposti a trapianto di midollo osseo veniva rilevato acido nucleico virale per almeno una delle due sequenze saggiate e nel 10% dei casi si notava la copresenza di L-T e VP1/VP2; del tutto diversa era la situazione riguardante i soggetti sottoposti a trapianto di rene (SOT), per i quali non veniva mai reperita la sequenza precoce da sola. Dei 16 soggetti affetti da RCU, solo uno manifestava positività per la sequenza tardiva del polyomavirus JC. I risultati ottenuti sono riassunti in tabella 4. Infine per la valutazione di significatività di associazione tra le due sequenze analizzate, veniva effettuato il Test del  $\chi^2$ . La correlazione tra le regioni VP1/VP2 e Large-T appariva statisticamente

significativa nella quasi totalità dei soggetti analizzati (Tab.4), eccetto che per il gruppo dei pazienti affetti da RCU per il quale il  $\chi^2$  risultava non significativo per mancanza di risultati positivi per la sequenza Large-T da sola e in associazione con la sequenza VP1/VP2. Inoltre veniva confrontata la positività delle sequenze ricercate nelle diverse categorie di pazienti immunodepressi analizzati (Graf.3).

Campioni di plasma	PCR+ Large-T (%)	PCR+ VP1/VP2 (%)	PCR+ Large-T/VP1-2 (%)	Neg (%)	TOT	p value
LLA-LMA	30 (32%)	41 (43%)	10 (10,6%)	13 (14%)	94	$\chi^2=24,011$ ; $P<0,001$
LNH-LH	15 (28%)	20 (37%)	5 (9%)	14 (26%)	54	$\chi^2=5,794$ ; $P<0,05$
TMO	6 (30%)	12 (60%)	2 (10%)	0	20	$\chi^2=12,857$ ; $P<0,001$
SOT	0	3 (19%)	3 (19%)	10 (62%)	16	$\chi^2=6,15$ ; $P<0,025$
RCU	0	1 (6%)	0	15 (94%)	16	N.S.*
TOT	51 (25,5%)	77 (38,5%)	20 (10%)	52 (26%)	200	

**Tab.4:** Positività in PCR per le regioni Large-T e VP1-VP2 nei campioni di plasma dei soggetti, arruolati nello studio, in base alle caratteristiche cliniche. N.S\* Non significativo



**Graf. 3**

Delle 55 biopsie analizzate il 24% (13/55) risultava positivo al test molecolare per il reperimento del JCV mentre il 76% (42/55) era negativo. In particolare, delle 16 biopsie a fresco, provenienti da pazienti affetti da RCU, il 31,5% (5/16) era positivo alla sequenza VP1/VP2, il 6,2% (1/55) manifestava entrambe le sequenze ricercate e nessuno dei campioni era risultato positivo alla sequenza precoce. Per ciò che attiene ai campioni biotici di rene paraffinati, la sequenza precoce e la sequenza tardiva venivano reperite ciascuna nel 15% (3/20) dei casi, mentre il 5% (1/20) risultava positivo per entrambe le sequenze. Nessuno dei campioni biotici provenienti da soggetti con diagnosi di polipo adenomatoso o Ca intestinale presentava positività (Tab. 5). Così come

per i campioni di plasma anche per i campioni biotici veniva applicato il Test del  $\chi^2$  che risultava non significativo in tutti i gruppi analizzati.

Campioni biotici	PCR+ Large-T (%)	PCR+ VP1/VP2 (%)	PCR+ Large-T/VP1-2 (%)	Neg (%)	TOT	$\chi^2$
RCU	0	5 (31,3%)	1 (6,2%)	10 (62,5%)	16	N.S.*
SOT	3 (15%)	3 (15%)	1 (5%)	13 (65%)	20	N.S.*
Ca Intestinale	0	0	0	19 (100%)	19	N.S.*
TOT	3 (5,45%)	8 (14,54%)	2 (3,63%)	42 (76,36%)	55	

**Tab. 5:** Positività in PCR delle sequenze Large-T e VP1/VP2 nei campioni biotici saggiati.  
N.S. \* Non significativo

## ***5. DISCUSSIONE***

Tra le categorie di soggetti suscettibili a patologie gravi e a volte, invalidanti, è indubbio che l'ospite immunocompromesso venga considerato quello maggiormente a rischio. La condizione di deficit immunitario espone l'individuo, dunque, a continue infezioni, specie virali, che possono aggravare ulteriormente il quadro patologico di base che affligge il paziente. Questo giustifica il grande interesse della comunità scientifica nella valutazione di quali possano essere gli agenti microbici, in aggiunta a quelli "convenzionali", che potrebbero indurre patologie anche gravi in soggetti parzialmente o del tutto privi di difese immunitarie. Tra gli agenti etiologici coinvolti nel processo di riattivazione, vengono annoverati anche i polyomavirus tra cui il JCV.

La caratteristica potenzialità del virus ad indurre infezioni persistenti-latenti spiega il perché possa essere reperito in circolo a seguito di una fase di immunodepressione del soggetto. Tale condizione di deficit immunologico, anche parziale, è caratteristica peculiare di soggetti sottoposti a chemioterapia per patologie neoplastiche, terapie steroidee prolungate, o in soggetti in cui siano presenti fattori genetici predisponenti l'insorgenza di disordini linfoproliferativi, come avviene nella maggior parte delle forme leucemiche. Si è ritenuto interessante, quindi, valutare la presenza del virus in diversi gruppi di soggetti con



deficit immunologico, tra cui pazienti affetti da leucemia linfoide o mieloide acuta (LLA o LMA), soggetti con linfomi di Hodgkin o non-Hodgkin (LH e LNH), individui sottoposti a trapianto di midollo osseo (TMO) o di rene (SOT) e pazienti in trattamento con terapia corticosteroidica in seguito a retto-colite ulcerosa (RCU). In questi soggetti ci è sembrato importante confrontare l'espressione di sequenze geniche differenti sulla base delle caratteristiche replicative del virus onde valutare la possibilità di aggiungere un ulteriore presidio diagnostico. Come riportato dalla letteratura, la presenza del DNA di JCV nel rene, nei linfonodi, nella milza e nel midollo spinale suggerisce una marcata diffusione linfo-ematica, successiva alla sua riattivazione, soprattutto nei pazienti con leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML), una severa patologia demielinizzante che vede il JCV quale principale responsabile. Come suggerito da Major et al. (1992), la diffusione multifocale e perivascolare del virus, veicolato dai linfociti al SNC, avviene per via ematica. L'idea che i linfociti siano da considerarsi un *reservoir* per il JCV, è stata anche supportata da Jensen et al. (1999), secondo i quali i linfociti B tonsillari e le cellule dello stroma sono suscettibili all'infezione da JCV<sup>66</sup>. Sulla base di questo principio e sulla modalità di replicazione bidirezionale del JCV, si è ritenuto opportuno prendere in considerazione due diverse regioni del virus, la sequenza Large-T (L-T) comunemente citata in letteratura come bersaglio

diagnostico di elezione e conseguentemente maggiormente impiegata in diagnostica molecolare, e una porzione genica della regione tardiva definita VP1/VP2. L'opportunità di lavorare con due diverse porzioni del genoma virale ci è sembrato potesse essere di ausilio per una più accurata definizione del concetto di "latenza" e di "riattivazione" del virus in oggetto. Il virus persiste in maniera asintomatica nei soggetti immunocompetenti, così come riportato da Pagani et al. (2003) e Rossi et al. (2007)<sup>67</sup>, tuttavia, come più volte detto, nel paziente immunocompromesso il decorso dell'infezione è spesso correlato a severe complicanze e, a volte, a morte del paziente. Lo stato di debilitazione generalizzato ha un impatto notevole sul decorso di un'infezione, sia essa endogena o esogena (infezione primaria o reinfezione). Pertanto la scelta dei diversi gruppi di soggetti immunocompromessi arruolati nello studio, così come la scelta del campione biologico, è stata dettata rispettivamente dallo stato di deficit immunologico del paziente e dalla condizione di virus in attiva replicazione che viene reperito nel plasma e non in sangue intero, onde evitare il rilievo di virus presente a livello delle cellule ematiche. Sembra di rilievo notare come il reperimento della sequenza tardiva da sola è stato osservato nel 38,5% di tutti i casi analizzati, a fronte del 25,5% di positività solo per la sequenza precoce Large-T (Tab.4). In effetti, valutando criticamente i risultati ottenuti sembra che la VP1/VP2 rivesta

un ruolo fondamentale nella diagnosi di tale tipologia di soggetti; la prima percentuale fornisce un dato importante nei termini di “false negatività” al JCV; infatti, qualora ci si fosse avvalsi solo della sequenza precoce, abitualmente considerata come unico target diagnostico del virus, l’infezione da JCV sarebbe potuta passare inosservata. Il significato della positività a questo *target* diagnostico, comunque, dovrà essere accuratamente vagliato. I casi di positività per VP1/VP2, non sempre coincidenti con la sequenza Large-T, potrebbero essere riferiti alle diverse fasi del ciclo replicativo del virus o ad una sua riattivazione, dal momento che la loro espressione è strettamente correlata al completamento del ciclo virale. La prevalenza di VP1/VP2 rispetto alla L-T, osservata in ogni gruppo di pazienti, sembra deporre per una sostanziale efficacia diagnostica della sequenza tardiva reperita mediante tecniche di biologia molecolare. Comunque, il rilevamento sia dell’una sia dell’altra sequenza virale, fa sì che tutte le categorie di soggetti analizzati costituiscano un gruppo di popolazione a rischio di sequele dell’infezione con potenzialità di insorgenza di PML. I risultati ottenuti indicano, come precedentemente accennato, che la ricerca delle due sequenze valutate in questo studio possono dare delle informazioni di rilievo nella diagnostica applicata a particolari categorie di pazienti, nel nostro caso soggetti con immunodepressione di diverso grado e derivazione. L’inserimento nei protocolli diagnostici dedicati ai soggetti

immunodepressi anche della ricerca del JCV a livello plasmatico, potrebbe consentire il monitoraggio del virus in questi pazienti onde evitare che la riattivazione virale misconosciuta possa indurre sequele potenzialmente gravi quale anche la PML. Dai dati ottenuti, il rilevamento delle due sequenze, seppur in percentuali diverse a secondo della popolazione studiata, mostrerebbe una validità diagnostica sia dell'una sia dell'altra sequenza ricercata che, però, dovrebbe essere più accuratamente valutata con follow-up prolungati nel tempo; se la sequenza Large-T è reperibile nelle prime fasi della replicazione del virus, e poi successivamente, in tutti i processi di regolazione, l'effettiva formazione dei virioni viene confermata dal reperimento della sequenza VP1/VP2, la cui sintesi determina la formazione della struttura esterna del virus come noto indispensabile per il rilascio virale e la successiva disseminazione. Sebbene nel gruppo di pazienti affetti da RCU sia stata osservata una bassa percentuale di positività alla sola sequenza VP1/VP2, il dato non può essere sottovalutato ma dovrà essere ulteriormente approfondito. L'importanza delle due regioni geniche, dunque, viene nuovamente confermata dalla significatività del dato statistico ( $P < 0,05$ ) ottenuto nei diversi gruppi di pazienti trattati, eccetto che per il gruppo dei pazienti affetti da RCU. Quest'ultimo caso esula dalla significatività statistica, probabilmente anche per il numero esiguo

di campioni analizzati rispetto agli altri o per un'attività immunitaria non del tutto ridotta dal trattamento terapeutico steroideo.

L'espressione delle due sequenze è stata valutata sia a livello del torrente circolatorio sia in sede d'organo di latenza. Infatti, nello studio è stata valutata la presenza delle due sequenze geniche del JCV anche in campioni biotici del colon e del rene, a fresco o paraffinati. La positività alla sequenza VP1/VP2 appare più frequente, rispetto alla Large-T, per i campioni biotici di colon provenienti da soggetti con RCU e per le biopsie renali provenienti da soggetti trapiantati. Invece, per quanto riguarda i campioni biotici di Ca intestinale, in accordo con ciò che è stato riportato da Polly et al. (2004)<sup>68</sup>, ma in contrasto con quanto descritto da Woon-Tae jung et al. (2007)<sup>69</sup> e Ryouta Hori et al. (2005)<sup>70</sup>, non sembrerebbe esserci alcuna evidenza di associazione tra JCV e l'instabilità genetica nel cancro del colon. Per ciò che concerne le biopsie positive, nonostante l'effettiva presenza in particolar modo, della sequenza VP1/VP2, non è stata rilevata alcuna correlazione statisticamente significativa. Ciò potrebbe dipendere dai meccanismi di replicazione che si instaurano in seguito allo stato di latenza o riattivazione del virus nelle cellule per esso non permissive, come nel caso delle cellule dell'epitelio intestinale. Quanto detto indica la possibilità di migliorare la diagnostica, e quindi le conoscenze relative a JCV in patologia umana, valutando anche la presenza della sequenza

VP1/VP2, non solo nei casi di patologie notoriamente rette da JCV ma anche per altre, d'organo o sistemiche, per le quali il ruolo di questo virus non sia stato considerato.

Inoltre, la limitazione imposta dall'impossibilità di valutare in vitro il virus mediante l'isolamento, potrebbe essere risolta per mezzo della ricerca di una regione diversa che, in questo caso, denuncia pienamente l'attività replicativa del virus. Il nuovo bersaglio diagnostico, quindi, confrontato e affiancato a quello tradizionale, potrebbe chiarire l'evoluzione delle patologie connesse a questo virus. La ricerca di due regioni differenti del virus potrebbe essere di aiuto nel chiarire la diagnosi e, laddove fosse in corso una terapia, permettere un corretto monitoraggio e l'ottimizzazione dell'intervento terapeutico prima che l'attiva replicazione virale possa indurre patologie di grave entità.

---

## 6. BIBLIOGRAFIA

- <sup>1</sup> Antonelli G., Clementi M., *Principi di virologia medica*, Ambrosiana, 2008, cap.42, pag. 133.
- <sup>2</sup> Padgett BL, Walker DL, Zurhein GM, Eckroade RJ, *Cultivation of Papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy*. The lancet (1971).
- <sup>3</sup> Balows, Hansler. Leinnette, *Laboratory diagnosis of infectious diseases principles and practice*. Vol II, Springer-Verlag: pag. 317.
- <sup>4</sup> Balows, Hansler. Leinnette, *Laboratory diagnosis of infectious diseases principles and practice*. Vol II, Springer-Verlag: pag. 320.
- <sup>5</sup> [www.microbiologybytes.com/virology/Polyomaviruses.html](http://www.microbiologybytes.com/virology/Polyomaviruses.html)
- <sup>6</sup> Frisque et al. *Transforming activities of JC virus early proteins*. Advances in Experimental Medicine and Biology 2005, 577,288-309.
- <sup>7</sup> Dorries et al. *New aspects in the pathogenesis of polyomavirus-induced disease*. 1997 Advances in virus Research, 48, 205-61.
- <sup>8</sup> Knowles et al. (2001) *The Epidemiology of BK virus and the occurrence of antigenic and genomic subtypes, in Human Polyomaviruses. Molecular and Clinical Perspectives* (eds K. Khalili and G.L. Stoner), John Wiley & Sons, Inc., New York.
- <sup>9</sup> Agostini et al. (2001) *Molecular evolution and epidemiology of JC virus, in Human Polyomaviruse. Molecular and Clinical Perspectives* (eds. K. Khalili and G.L. Stoner) Wiley & Sons, Inc., New York.
- <sup>10</sup> Elsner et al. *Human polyomavirus JC control region variants in persistently infected CNS and kidney tissue*. Journal of General Virology, 4, 789-99.

- 
- 11 Dulbecco R., Ginseberg H. S., *Virologia*, Zanichelli, 1993, pag 1125.
  - 12 Martyn K. et al. *Expression of JC virus regulatory proteins in human cancer: Potential mechanism for tumourigenesis*. European Journal of Cancer 41 (2005).
  - 13 Write M. et al. *Human Polyomavirus and brain tumors*. Brain Research Reviews, 50 (2005): pagg. 69-85.
  - 14 Pina Oviedo et al. *Effects of JC virus infection on anti-apoptotic protein surviving in progressive multifocal leukoencephalopathy*. 2007 American Journal of Pathology, 170,1291-304 .
  - 15 Merabova et al. *JC virus agnoprotein inhibits in vitro differentiation of oligodendrocytes and promotes apoptosis*. 2008, Journal of Virology, 82, 1558-69.
  - 16 Khalili et al. *The agnoprotein of Polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein*. 2005 Journal of cellular Physiology, 204, 1-7.
  - 17 Suzuki et al. *Identification of FEZ1 as a protein that interacts with JCV agnoprotein and microtubules: role of agnoprotein-induced dissociation of FEZ1 from microtubules in virus propagation*. Journal of Biological Chemistry, 2005,280, 24948-24956.
  - 18 La Placa, *Principi di microbiologia*, Esculapio, 2008: pagg. 608.
  - 19 Dean FB et al. *Simian virus 40 (SV40) DNA replication: SV40 large T antigen unwinds DNA containing the SV40 origin of replication*. Proc Natl Acad Sci USA 84:16-20.
  - 20 Dornreiter I et al. *SV40 T antigen binds directly to the large subunit of purified DNA polymerase alpha*. EMBO J 9:3329-3336.
  - 21 Melendy T et al. *An interaction between replication protein A and SV40 antigen appears essential for primosome assembly during SV40 DNA replication*. J Biol Chem 268:3389-3395.



- 
- 22 La Placa, *Principi di microbiologia*, Esculapio, 2008: pagg. 610.
- 23 Martyn K. et al. *Expression of JC virus regulatory proteins in human cancer: Potential mechanism for tumorigenesis*. European Journal of Cancer 41 (2005).
- 24 Haggerty S. et al. *JC virus-simiam virus 40 genomes containing heterologous regulatory signals and chimeric early regions: identification of regions restricting transformation by JC virus*. J Virol 1989,63:2180-2190.
- 25 Khalili K. et al. *Small tumor antigen of polyomaviruses: role in viral life cycle and cell transformation*. J Cell Physiol 2008, 215:309-319.
- 26 Fiers et al. *Tumor necrosis factor. Characterization at the molecular, cellular and in vivo level*. 1991, FEBS Lett. 285, 199-212.
- 27 Ghosh et al. *Missing pieces in the NF-KappaB puzzle*. 2002, Cell 109, S81-S96.
- 28 Phelps et al. *Mechanism of kappa B DNA binding by Rel/NF-kappa B dimers*. 2000, J. Biol. Chem. 275, 24392-24399.
- 29 Karin et al. *Phosphorilation meets ubiquitination: the control of NF-kappaB activity*. 2000, Annu. Rev. Immunol. 18,621-663.
- 30 Romagnoli et al. *Early growth response-1 protein is induced by JC virus infection and binds and regulates the JC virus promoter*. 2008, Virology 375, 331-341.
- 31 Bofill-Mas S. et al. *Role of the environment in the transmission of JC virus*, Journal of Neurovirology (2003); 9 Suppl 1: pagg. 54-8.
- 32 Boldorini R. et al. *Latent human polyomavirus infection in pregnancy: investigation of possible transplacental transmission*, Pathology 2008 Jan; 40(1): pagg. 72-7.

- 
- 33 Knieciak D. et al. *Occurrence rate and genotype distribution of the JC virus in a sample from the Polish population*, Journal Medical Virology 2008; 80 (6); pagg. 1079-1083.
- 34 Sylvester C. et al. *Molecular Epidemiology of Human Polyomavirus JC in the Biaka Pygmies and Bantu of Central Africa*, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz; vol. 93 (5); pagg. 615-624.
- 35 Pagani E. et al. *Molecular analysis of JC virus genotypes circulating among the Italian healthy population*, Journal of Neurovirology (2003); vol. 9 (5); pagg. 559-566.
- 36 Yanagihara et al., *JC virus genotypes in the Western Pacific suggest Asian mainland relationships and virus association with early population Movements*, Human Biology 2002; vol. 74 (3); pagg. 473-488.
- 37 Delbue S. et al. *Presence and expression of JCV early gene large T Antigen in the brains of immunocompromised and immunocompetent individuals*. J Med Virol. 2008,80:2147-2152.
- 38 Monaco MC et al. *Detection of JC virus DNA in human tonsil tissue: Evidence for site of initial viral infection*. J Virol. 1998;72:9918-9923.
- 39 Haggerty S et al. *JC virus-simiam 40 genomes containing heterologous regulatory signals and chimeric early regions: identification of regions restricting transformation by JC virus*. J Virol 1989,63:2180-2190.
- 40 Jung WT et al. *JC virus T-antigen expression in sporadic adenomatous polyps of the colon*. 2008, Cancer,112(5);pagg. 1028-1036.
- 41 Zheng H. et al. *Oncogenic role of JC virus in lung cancer*. Journal of Pathology. 2007; 212(3): pagg.306-15.

- 
- 42 Laghi L. et al. *JC virus DNA is present in the mucosa of the human colon and colorectal cancers*. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 7484-7489.
- 43 Shin SK et al. *Oncogenic T-antigen of JC virus is present frequently in human gastric cancers*. Cancer 2006; 107: 481-488.
- 44 Goel A. et al. *Association of JC virus T-antigen expression with the methylator phenotype in sporadic colorectal cancers*. GASTROENTEROLOGY 2006; 130: 1950-1961.
- 45 Lafon ME et al. *JC virus remains latent in peripheral blood B lymphocytes but replicates actively in urine from AIDS patients*. J Infect Dis 177:1502-1505, 1998.
- 46 Monaco MC et al. *JC virus infection of hematopoietic progenitor cells, primary B lymphocytes, and tonsillar stromal cells: Implication for viral latency*. J Virol 70:7004-7012, 1996.
- 47 Doerries K. et al. *Human polyomavirus JC and BK persistent infection, Advances in experimental medicine and biology* 2006; 577; pagg. 102-16.
- 48 Ricciardiello et al. *JC virus DNA sequences are frequently present in the human upper and lower gastrointestinal tract*. Gastroenterology, 119:1228-1235, 2000.
- 49 Comar M. et al. *JCV/BKV and SV40 viral load in lymphoid tissues of young immunocompetent children from an area of north-west Italy*. 2010, J Med Virol., 82(7):1236-40.
- 50 Major et al. *Pathogenesis and molecular biology of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain*. Clin. Microbiol. Rev. 5:49-73.
- 51 Eggers et al. *Quantification of JC virus DNA in the cerebrospinal fluid of patients with human immunodeficiency virus-associated*

- 
- progressive multifocal leukoencephalopathy-a longitudinal study*. 1999, *Journal of Infectious Diseases*, 180, 1690-94
- 52 Bollag B. et al. *Hibrid genomes of the polyomaviruses JC virus, and simiam virus 40: identification of sequences important for efficient transformation*. *J Virol* 63 (1989) 863-872.
- 53 Brynska B. et al. *Role of cell cycle regulators in tumor formation in transgenic mice expressing the human neurotropic virus, JCV, early protein*. *J. Cell. Biochem.* 67 (1997) 223-230.
- 54 Barbacid M. *Ras genes*. *Annu Rev Biochem* 1987, 56, 779-827
- 55 Davies H. et al. *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. *Nature* 2002, 417, 949-954.
- 56 M. K. White et al. *Human polyomaviruses and brain tumors*. *Brain research areviews* 50 (2005), pagg. 69-85.
- 57 S. Enam, L. Del Valle, C. Lara, D.D.Gan, C. Ortiz-Hidalgo, J.P Palazzo, K. Khalili, *Association of polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and Beta-catenin*, *Cancer Res.* 2(2002) 793-7101.
- 58 D.D. Gan, K. Khalili, *Interaction between JCV large T-antigen and beta-catenin*. *Mkm*.
- 59 J. Coyle-Rink et al. *Developmental expression of Wnt signaling factors in mouse brain*, *Cancer Biol. Ther.* 1 (2002) 640-645.
- 60 L. Del Valle et al. *Detection of JC virus DNA sequences and expression of viral T-antigen and agnoprotein in esophageal cancer*, *Cancer* 103 (2004) 516-527.
- 61 S. Enam, L. et al. *Association of polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and Beta-catenin*, *Cancer Res.* 2(2002) 793-7101.

- 
- 62 D.D. Gan et al. *Involvement of Wnt signaling pathway in murine medulloblastoma induced by human neurotropic JC virus*, *Oncogene* 20 (2001) 4864-4870.
- 63 A.Lassak et al. *Insulin receptor substrate 1 translocation to the nucleus by human JCV virus T-antigen*, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 17231-17238.
- 64 K.Khalili, L. Del Valle, J.Y. Wang, N. darbinian, A. Lassak, M Safak, K. Reiss, *T-antigen of human polyomavirus JC cooperates with the IGF-IR signaling system in cerebellar tumors of childhood-medulloblastomas*, *Anticancer Res.* 23 82003) 2035-2041.
- 65 Goel A. et al. *Association of JC virus T-antigen expression with the methylator phenotype in sporadic colorectal cancers.* *GASTROENTEROLOGY* 2006; 130: 1950-1961.
- 66 Jensen PN et al. *Viral variant nucleotide sequences help expose leukocytic positioning in the JC virus pathway to the CNS. Concentrates on the possible role of JCV variants for viral dissemination.* *J Leukoc Biol* 1999; 65:428-438
- 67 Rossi et al. *Presence, quantitation and characterization of JC virus in the urine of Italian immunocompetent subjects.* 2007; *J Med Virol* 79:408-412
- 68 Polly A. Newcomb et al. *No evidence of an Association of JC Virus and colon Neoplasia.* 2004; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*13:662-666.
- 69 Woon-Tae Jung et al. *JC Virus T-Antigen Expression in Sporadic Adenomatous Polyps of the Colon.* 2008, American Cancer Society, 112:5.
- 70 Ruouta Hori et al. *Detection of JC virus DNA sequence in colorectal cancers in Japan.* 2005, *Virchows Arch*, 447:723-730.