



Studio della presenza del Polyomavirus umano JC all'interno di esosomi come strategia di persistenza nell'ospite

Responsabile scientifico: Dr. Simone Gianneccchini, Dipartimento di Medicina Sperimentale e Clinica, Sezione di Medicina critica e medicine specialistiche, Viale Morgagni 48

PREMESSA

La leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) è una rara malattia demielinizzante del sistema nervosa centrale causata dall'infezione litica degli oligodendrociti da parte del Polyomavirus JC (JCPyV). La sua incidenza, rara fino agli anni 1980, è stimata essere del 3% in pazienti con AIDS dopo l'avvento della HAART (highly active antiretroviral therapy). Ad oggi, la PML è sempre più diagnosticata in casi di trapianto di cellule ematopoietiche o pazienti sottoposti a terapie biologiche innovative. JCPyV è un virus nudo a doppia elica di DNA circolare il cui genoma è suddiviso in 3 regioni: regione di geni precoci codificante proteine regolatorie; regione di geni tardivi codificante per proteine strutturali; regione regolatoria non codificante (NCCR). Quest'ultima, definita forma NCCR archetipa nei virus non patogeni, può subire mutazioni, delezioni e duplicazioni divenendo la forma NCCR riarrangiata (NCCR PML-associata) tipica dei virus patogeni. La sieroprevalenza di JCPyV nella popolazione umana è del 50-80% negli adulti. L'infezione da JCPyV (genoma contenente la forma NCCR archetipo) si verifica durante la tarda infanzia, probabilmente per via respiratoria o per via intestinale, per poi diffondere attraverso linfociti infetti o attraverso virioni liberi nel sangue ad altri organi, quali rene, midollo osseo e anche il cervello, dove può persistere indefinitamente. JCPyV codifica anche due microRNA che possono essere utilizzati dal virus come mezzo di evasione della risposta immunitaria tramite l'attività di soppressione della espressione della proteina Large-T virale (implicata nella replicazione virale e nella risposta immunitaria difensiva cellula-mediata) o tramite una soppressione di proteine cellulari. JCPyV, come altri virus, può utilizzare gli esosomi, piccole vescicole secrete dalle cellule ed utilizzano nelle comunicazioni intercellulari, come strategie di regolazione genetica virale. La presenza di un alta sieroprevalenza per anticorpi anti-JCPyV nella popolazione umana e la possibilità che nel controllo dell'infezione in pazienti con PML giochi un ruolo predominante la risposta cellula-mediata, fa pensare che il virus possa usare ulteriori strategie non ancora identificate per persistere nell'ospite. A tale proposito recentemente è emerso che molti virus nudi (come i virus delle epatite A ed E e i Picornavirus) possono associarsi ad esosomi grazie alla



presenza nelle loro proteine capsidiche di sequenze dette *Late domain* (sequenze aminoacidiche del tipo PTAP, PPXY, YXXL, YPX₃L) che interagendo con il sistema Exosomal sorting complex required for transport (ESCRT) permettono al virus di uscire dalla cellula all'interno degli esosomi. Tale strategie permetterebbe: 1- Di sfuggire l'attività neutralizzante di anticorpi virus specifici; 2- Aumentare il tropismo virale poiché all'interno degli esosomi può infettare cellule non suscettibili; 3- Uscire dalla cellula senza lisi cellulare.

SCOPO

Lo scopo dello studio è l'analisi della possibile utilizzo da parte di JCPyV degli esosomi come veicolo per persistere nell'ospite. Tale scopo è stato perseguito investigando la presenza all'interno degli esosomi di JCPyV sotto forma di particella intera, o di DNA ad essi associato, in pazienti immunosoppressi ad elevato rischio di sviluppo della PML. L'analisi della presenza dei microRNA all'interno degli esosomi è servita come controllo della espressione virale.

METODICHE

Campionamento. Nello studio sono stati esaminati 120 campioni di plasma ottenuti da pazienti HIV positivi afferenti alla SOD di Malattie Infettive e Tropicali dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi (AOUC) per esami ematici di controllo relativi al follow-up della patologia infettiva di base precedentemente presi in considerazione in altri studi del nostro gruppo e di cui si conosce la loro positività al JCPyV. Criteri di inclusione: 1- Pazienti HIV positivi; 2- Età ≥ 25 anni; 3- Firma del consenso informato. Criteri di esclusione: 1- Età < 25 anni; Consenso non fornito da parte del paziente. Come controlli sono stati analizzati 50 campioni di plasma di soggetti sani donatori. Criteri di inclusione: 1- Pazienti con sierologia negativa per HIV, HCV, HBV eseguita negli ultimi 3 mesi; 2- Età ≥ 25 anni; 3- Firma del consenso informato. Criteri di esclusione: 1- Età < 25 anni; 2- Consenso non fornito da parte del paziente.

Purificazione degli esosomi da plasma e loro caratterizzazione. Gli esosomi sono stati purificati partendo da 500 microlitri di plasma dei pazienti HIV e dai soggetti donatori mediante il kit di purificazione di esosomi (Norgen) secondo le istruzioni. La caratterizzazione delle dimensioni e del numero delle particelle esosomiali dopo purificazione è stata compiuta con metodica NanoSight NS300 Nanoparticle analysis system. La loro caratterizzazione per la presenza del marker esosomico della tetraspasmina (CD63) è stata compiuta mediante western blot con anticorpi specifici anti-CD63.

Estrazione del DNA e microRNAs del Polyomavirus JC da esosomi. Il DNA totale è stato estratto da 200 microlitri di esosomi (estratti precedentemente dal plasma o da supernatante di cellule infette), e da 200



microlitri di plasma o supernatante usando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) secondo le istruzioni della ditta. L'RNA è stato isolato direttamente dagli esosomi (partendo da 250 microlitri di plasma o supernatante cellulare), usando kit di estrazione di RNA da esosomi (Norgen).

Polyomavirus JC DNA droplet digital PCR ddPCR. Il DNA estratto direttamente da plasma o supernatante cellulare o da gli esosomi da questi purificati è stato analizzato mediante droplet digital PCR (ddPCR) assay, usando primer e probe specifici per il Large T antigen e il NCCR di JCPyV. Il limite di sensibilità è 2-10 copie di PyV DNA.

Polyomavirus JC microRNAs retrotrascrizione e ddPCR stem-loop. L'espressione dei microRNAs di JCPyV è stata condotta tramite l'utilizzo di stem-loop MiRNA quantitative assay specifico per JCPyV (life technologies, Foster City, CA). Ogni reazione è stata condotta usando 50 nanogrammi di RNA e includerà un controllo negativo. Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione del RNA di partenza è stato amplificato tramite ddPCR. Il limite di sensibilità è 10 copie di viral miRNA per nanogrammo di RNA. Il saggio è specifico e riproducibile come dimostrato negli esperimenti preliminari.

Esperimenti di infezione di substrati cellulari in vitro con JCPyV. In questi esperimenti in vitro sono state utilizzate cellule COS-7 altamente suscettibili all'infezione con JCPyV per la presenza del Large-T antigene di SV40. Queste cellule sono state infettate con particelle di JCPyV ottenute con cloni molecolari contenenti la regione NCCR nella forma archetipa. La replicazione virale è stata analizzata andando a ricercare il DNA di JCPyV a differenti tempi (1, 2, 3, 7, 11 e 15 giorni post infezione) tramite real-time PCR quantitativa nel supernatante intero e negli esosomi purificati da quest'ultimo. Ulteriori esperimenti di infezione in presenza di molecole inibitorie del pathway degli esosomi sono stati condotti per vedere la relazione tra processazione degli esosomi e produzione di virus ad essi associato.

Microscopio elettronico. Cellule Cos-7 a 7 giorni post infezione con JCPyV sono state analizzate anche al microscopio elettronico mediante le procedure standard di TEM.

RISULTATI

Caratterizzazione degli esosomi ottenuti dal plasma di pazienti. Prima di tutto siamo andati a caratterizzare le vescicole esosomiali che venivano purificate con il metodo indicato. Le loro dimensioni sono state valutate dopo estrazione tramite l'uso della tecnica del NanoSight NS300 Nanoparticle analysis system. Con questa abbiamo visto che la dimensione media delle particelle era di 70 nm, e la loro concentrazione era di 2.5×10^9 particelle/ml di plasma. Successivamente l'analisi elettroforetica e il successivo Western Blot hanno evidenziato la presenza di tetraspanin CD63, CD81 e annexin II, tipici



marker esosomiali. Tuttavia, non essendo possibile avere una popolazione pura di soli esosomi le abbiamo indicate come vescicole arricchite in esosomi (EEV).

Ricerca del DNA di JCPyV nel plasma e negli esosomi estratti dal plasma. Una volta stabilito che eravamo in condizioni di ottenere EEV dal plasma di pazienti, siamo andati a vedere la prevalenza del DNA di JCPyV nel plasma totale e nella sua frazione arricchita in esosomi. Analizzando 120 pazienti HIV positivi e 50 controlli sani, abbiamo trovato una positività nel plasma totale per JCPyV DNA di 34,5% per gli HIV e di 2% per i sani. In questi stessi campioni, analizzando la positività di JCPyV DNA negli EEV abbiamo trovato il 13% per gli HIV e il 2% per i sani. Inoltre, il numero di copie di DNA di JCPyV nel plasma era in media di 10^3 /ml mentre negli EEV era di 5×10 /ml. Questi dati mostrano che, anche se in quantità ridotta, una parte del DNA virale contenuta nel plasma può essere associata in qualche modo agli esosomi. Inoltre, la metodica di PCR utilizzata ha evidenziato che tutti i DNA virali ottenute presentavano sequenze tipiche di virus archetipo, quindi con assenza di riarrangiamenti nella NCCR tipici del virus PML-associato. Per questo motivo non siamo andati ad analizzarne le sequenze della NCCR. Infine, negli stessi pazienti ricercando i microRNA di JCPyV negli esosomi abbiamo trovato una positività del 15% per i pazienti HIV e di 4% per i sani.

Ricerca del DNA di JCPyV in EEV in cellule Cos-7 post-infezione vitro. Dopo aver visto che JCPyV poteva essere associato a EEV nel plasma di pazienti HIV o controlli sani, abbiamo studiato questa associazione in vitro. Precisamente, sono state infettate cellule Cos-7 altamente suscettibili all'infezione di JCPyV, e il DNA virale è stato ricercato da 1 a 15 giorni post-infezione. In questi esperimenti è stata usata una molteplicità di infezione di 0,1 di una variante virale con forma archetipa (non patogena). La quantificazione del DNA di JCPyV è stata fatta alla suddetta tempistica sia nel soprannatante cellulare intero che nella sua parte arricchita in esosomi. I risultati hanno mostrato che da 2 giorni post-infezione i soprannatanti di coltura mostrano una cinetica crescente della replicazione virale arrivando al picco di 10^8 copie di DNA / ml al 15° giorno. Analizzando il DNA negli EEV, anche qui si osserva una crescita nel tempo ma il numero di copie a 15 giorni post infezione non supera le 10^3 copie / ml. Quindi, anche in vitro, negli EEV è presente una piccola frazione del DNA di JCPyV. Successivamente, per comprendere se il DNA di JCPyV era associato agli esosomi perché interno, o perché era co-purificato assorbito sull'esterno degli EEV, abbiamo trattato gli EEV con DNase. Con tale trattamento non abbiamo notato nessuna riduzione della quantità di DNA che voleva dire che il DNA stesso era protetto. Tale protezione poteva essere dovuta o perché era all'interno o perché era in particelle virali che co-purificavano insieme agli EEV. Allora abbiamo preso il soprannatante virale e lo abbiamo trattato con Triton-100 (0.1%) per denaturare gli EEV prima della



loro purificazione. Una volta trattato, il sopranantante è stato soggetto a purificazione con la metodica per gli EEV. Quantificando il DNA in tale purificato di EEV non abbiamo trovato nulla, che ci porta a pensare che il DNA sia associato agli EEV. Ultimo studio è stato quello di compiere infezioni di Cos-7 in presenza di inibitori del pathway degli esosomi. I due inibitori usati erano GW4866 e U18666A alla concentrazione di 10 μ M. In tali esperimenti abbiamo visto che il materiale DNA contenuto nelle EEV veniva notevolmente ridotto se le EEV erano purificate da sopranantanti cellulari dove il virus era cresciuto in presenza degli inibitori (valore a 72 h post infezione di 60-80% di riduzione rispetto al controllo).

ME di cellule infettate. In ultimo siamo andati a vedere se al microscopio elettronico si osservano cellule con esosomi associati a virus. Le immagini ottenute fino ad oggi non hanno dato la prova certa, ma ulteriori prove saranno da condurre.

CONCLUSIONI

Collettivamente i dati ottenuti in vivo e in vitro indicano che una parte molto ristretta di JCPyV DNA può essere trovata associata a vescicole extracellulari riconducibili per caratteristiche strutturali ad esosomi. In particolare, negli esosomi del plasma JCPyV DNA è stato trovato nel 13% dei pazienti analizzati con una carica virale di 5×10 copie/ml. Considerando che nel plasma totale i pazienti erano 34,5% positivi e che il numero di copie era di circa 10^3 copie/ml, si può dire che marginalmente il DNA virale è associato ad esosomi. Tale associazione studiata in vitro (tramite trattamento con DNase degli esosomi o trattamento con triton-100 dei sopranantanti prima dell'estrazione delle EEV) ha rilevato che non è semplicemente dovuta a DNA libero assorbito sull'esterno degli esosomi, e nemmeno a DNA dei virioni che co-purificano insieme agli esosomi. E' invece possibile che il DNA si trovi all'interno degli esosomi, libero o associato al virione. Tuttavia la prova di tale evento non è stato possibile confermarla. Recenti dati in letteratura riportano che virus come il virus della Epatite A ed E, conosciuti essere virus con struttura composta di solo capside, possono essere associati ad esosomi seppur in piccola parte. Tale associazione è forse determinata dalla presenza di *late domain* nelle loro proteine capsidiche che permettono l'inserimento del virione nel processo di biogenesi degli esosomi. In tale contesto, l'analisi di sequenze della VP1 del virus JCPyV ha evidenziato la presenza di *late domain* (YPX₃L) nella sequenza di tale proteina. Quindi la possibilità che anche JCPyV possa usare questa strategia per inserire il proprio virione all'interno di esosomi non è da escludere. Inoltre, dati di microscopia elettronica in letteratura evidenziano che i polyomavirus possono ritrovarsi in vescicole cellulari durante la loro fase replicativa. Questo potrebbe servire al virus per uscire dalla cellula senza lisi cellulare attraverso il rilascio di tali vescicole. In conclusione, tale fenomeno spiegherebbe la persistenza di



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA SPERIMENTALE
E CLINICA

tali virus nell'ospite e l'ampio spettro di tessuti in cui si possono trovare il DNA. Infatti, l'uso degli esosomi per veicolare il DNA o la medesima particella virale permetterebbe al virus di sfuggire le difese immunitarie (anticorpi neutralizzanti in prima istanza), senza peraltro sviluppare risposta infiammatoria per la mancata lisi cellulare con conseguente rilascio di fattori pro-infiammatori. Inoltre, all'interno degli esosomi si potrebbe veicolare in tessuti non suscettibili al virus per assenza dei suoi recettori. Tutto questo porta a pensare che indagare più approfonditamente il fenomeno è sicuramente importante per capire i meccanismi di resistenza di questi virus.

Firenze, 30.11.2018

S. Giannecchini

A handwritten signature in blue ink, reading 'Simone Giannecchini'.