



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) (Ferenczy et al, 2012). 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) (Ferenczy et al, 2012). Ad oggi, la PML è sempre più diagnosticata in casi di trapianto di cellule ematopoietiche o pazienti sottoposti a terapie biologiche innovative (Bloomgren et al, 2012). 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) (Ferenczy et al, 2012). 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 (Kean et al 2009, Moens et al, 2013). 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 (Ferenczy et al, 2012). La replicazione efficiente di JCPyV nel tessuto cerebrale con conseguente sviluppo di PML è associata ad un genoma contenente la forma NCCR riarrangiata (NCCR PML-



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA SPERIMENTALE
E CLINICA

associata), caratterizzate da ripetizioni in tandem, delezioni e duplicazioni come anche mutazioni nella proteina VP1 (principale proteina capside contenente i siti di legame al recettore virale). 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 (ULBP3, *stress-induced ligand*) necessarie all'attività immunologica di cellule NK ed anche linfociti T (Bauman et al, 2013; Lagatie et al, 2012). Studi molecolari hanno dimostrato che l'espressione di questi microRNA virali è alta in presenza della NCCR archetipo e molto ridotta in presenza di NCCR PML-associata (Broekema and Imperiale 2013). JCPyV, come altri virus, può utilizzare gli esosomi, piccole vescicole secrete dalle cellule ed utilizzano nelle comunicazioni intercellulari, come strategie di regolazione genetica virale. Da alcuni anni il nostro gruppo di ricerca insieme ad altri nel mondo ha dimostrato che i microRNA di JCPyV, veicolati all'interno di esosomi, possono essere monitorati in numerosi fluidi biologici come siero, urine, liquor cefalorachidiano, saliva (Basnyat et al, 2017; Pietilä et al, 2015; Lagatie et al, 2014; Giovannelli et al, 2015; Rocca et al, 2015). In questo contesto è emerso che in pazienti immunocompromessi come gli HIV positivi l'espressione dei microRNA di JCPyV all'interno degli esosomi è inversamente proporzionale alla DNA viremia. Tuttavia, altri studi condotti da altri gruppi di ricerca, hanno invece dimostrato diretta correlazione tra DNA virale ed espressione dei microRNA. Una spiegazione a questi differenti risultati può essere data dal fatto che in un medesimo individuo possono essere presenti differenti forme di JCPyV con NCCR differenti che permangono persistenti in differenti sedi dell'organismo. In questo contesto, i microRNA all'interno degli esosomi, poiché provenienti da cellule di differenti organi, possono rappresentare la presenza di varianti virali anche non in attiva replicazione che esprimono i propri microRNA all'interno della cellula e li veicola all'esterno nei fluidi biologici durante le intercomunicazioni cellulari. Così sembra sempre di più emergere un potenziale scenario dove la presenza di correlazione tra DNA e microRNA virali in circolo tutto dipende dalla



variante di JCPyV NCCR maggiormente presente nei differenti organi: 1- In condizioni di immunocompetenza, la prevalenza di virus con forma archetipo (dove il virus con NCCR non mutata ha ridotta replicazione per l'attività regolatoria dei microRNA virali e del sistema immune) determinerà bassa replicazione del DNA virale e alta espressione dei microRNA; 2- in condizioni di immunocompromissione, la prevalenza della forma PML-associata (dove il virus con NCCR riarrangiata ha un'intensa attività replicativa per la ridotta espressione dei microRNA virali e del sistema immune) produrrà alta replicazione del DNA virale in presenza di bassa espressione dei microRNA; 3- in condizioni intermedie, dove il virus si è riattivato ma non ha ancora dato PML (situazione in cui le due forme virali sono presenti entrambe) possono essere rilevati alti livelli di DNA viremia (prodotto dalle varianti virali contenenti NCCR mutata) in presenza di buona espressione di microRNA virali (prodotta dalle varianti contenenti NCCR archetipo) (Martelli and Gianecchini 2017). Tuttavia, 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, and YXXL) che interagendo con il sistema Exosomal sorting complex required for transport (ESCRT) permettono al virus di uscire dalla cellula all'interno degli esosomi (Freed 2002; Raab-Traub and Dittmer 2017). Tale strategia 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 utilizzazione da parte di JCPyV degli esosomi come veicolo per persistere nell'ospite. Tale scopo sarà 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 servirà come controllo della espressione virale. Gli esosomi saranno purificati dal plasma e verranno caratterizzati per la loro dimensione e numero di particelle e per la presenza di molecole marker degli esosomi tramite Nanotracing analysis e Western Blot, Da tali esosomi sarà estratto il DNA per quantificare JCPyV tramite digital droplet PCR quantitative specifica. Nello stesso tempo, il DNA di JCPyV sarà quantificato nello stesso campione di sangue di partenza utilizzato per l'estrazione degli esosomi. Successivamente saranno confrontati la natura delle sequenze della NCCR di JCPyV nel plasma con le sequenze della NCCR di JCPyV all'interno degli esosomi purificati dal medesimo plasma. Eventuali differenze molecolari potranno essere indicative di una differente provenienza cellulare del virus contenuto negli esosomi rispetto a quello presente nel plasma. I microRNA di JCPyV saranno estratti dagli esosomi direttamente dal plasma. Inoltre, la potenziale associazione di JCPyV e gli esosomi sarà valutata in esperimenti di infezione virale in vitro con l'utilizzo di colture cellulari, cloni molecolari di JCPyV e molecole inibitorie del pathway molecolare coinvolto nella generazione degli esosomi.

METODICHE

Per raggiungere gli obiettivi prefissi lo studio comprenderà due parti sperimentali:

Campionamento. Nello studio saranno esaminati 200 campioni di plasma ottenuti da pazienti HIV positivi afferenti alla SOD di Malattie Infettive e Tropicali dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi (AOUC).

In particolare saranno arruolati pazienti HIV positivi, afferenti alla SOD di Malattie Infettive e Tropicali 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. In occasione di tale prelievo, come in precedenza, verrà richiesto il consenso al prelievo di un'aliquota aggiuntiva di sangue (5 ml). 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 saranno analizzati



anche 100 campioni di plasma di soggetti sani donatori. Per soggetto “sano” si definisce il soggetto non affetto da patologia infettiva cronica (HIV, HCV, HBV), che afferisce alla SOD di Malattie Infettive e Tropicali per esami ematici di controllo relativi ad altra patologia infettiva acuta pregressa. In occasione del prelievo ematico di controllo programmato, verrà richiesto il consenso al prelievo di un’aliquota aggiuntiva di sangue (5 ml). 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 saranno 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 sarà compiuta con metodica NanoSight NS300 Nanoparticle analysis system. La loro caratterizzazione per la presenza del marker esosomico della tetraspasmina (CD63) sarà compiuta mediante western blot con anticorpi specifici anti-CD63 (Giovannelli et al, 2016).

Estrazione del DNA e microRNAs del Polyomavirus JC da esosomi. Il DNA totale sarà 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 sarà 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 sarà 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 (Giovannelli et al, 2016).



Polyomavirus JC microRNAs retrotrascrizione e ddPCR stem-loop. L'espressione dei microRNAs di JCPyV sarà condotta tramite l'utilizzo di stem-loop MiRNA quantitative assay specifico per JCPyV (life technologies, Foster City, CA) (Giovannelli et al 2015). Ogni reazione sarà condotta usando 50 nanogrammi di RNA e includerà un controllo negativo. Il cDNA ottenuto dalla retrotrascrizione del RNA di partenza sarà 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.

Analisi dell'evoluzione molecolare della regione di controllo noncodificante (NCCR) di JCPyV. Questa analisi sarà condotta su i campioni positivi di DNA ottenuti sia direttamente da plasma o supernatante cellulare che dagli esosomi purificati da questi tramite una PCR nested specifiche per le regioni NCCR già in uso nel nostro laboratorio. I prodotti così amplificati saranno utilizzati per il loro sequenziamento. Le sequenze ottenute verranno analizzate tramite il programma BIOEDIT e confrontate con quelle dei virus JCPyV disponibili in banca dati ottenute da pazienti con o senza PML.

Esperimenti di infezione di substrati cellulari in vitro con JCPyV. In questi esperimenti in vitro saranno utilizzate cellule COS-7 altamente suscettibili all'infezione con JCPyV per la presenza del Large-T antigene di SV40. Queste cellule saranno infettate con particelle di JCPyV ottenute con cloni molecolari contenenti la regione NCCR nella forma archetipa e nella forma riarrangiata. La replicazione virale sarà analizzata andando a ricercare il DNA di JCPyV a differenti tempi (24, 48 e 72 ore post infezione) tramite real-time PCR quantitativa sia all'interno delle cellule che nel supernatante intero e negli esosomi purificati da quest'ultimo. Con gli esosomi JCPyV DNA positivi purificati saranno compiuti esperimenti di infezione in presenza o no di anticorpi anti-JCPyV e anticorpi anti-CD63 (marker esosomiale) per valutarne la capacità infettiva ricercando il DNA virale nelle cellule trattate.

Bibliografia



1. Basnyat, P, Virtanen, E, Elovaara, I, Hagman, S, Auvinen, E. 2017. JCPyV microRNA in plasma inversely correlates with JCPyV seropositivity among long-term natalizumab-treated relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J Neurovirol.* 23:734-741.
2. Bauman, Y, Mandelboim, O. 2011. MicroRNA based immunoevasion mechanism of human polyomaviruses. *RNA Biol.* 8:591-594.
3. Bloomgren G, Richman S, Hotermans C, Subramanyam M, Goelz S, Natarajan A, Lee S, Plavina T, Scanlon JV, Sandrock A, Bozic C. 2012. Risk of natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy. *N Engl J Med.* 366:1870-1880.
4. Broekema NM, Imperiale MJ. 2013. miRNA regulation of BK polyomavirus replication during early infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:8200-8205.
5. Ferenczy MW, Marshall LJ, Nelson CD, Atwood WJ, Nath A, Khalili K, Major EO. 2012 Molecular biology, epidemiology, and pathogenesis of progressive multifocal leukoencephalopathy, the JC virus-induced demyelinating disease of the human brain. *Clin Microbiol Rev.* 25:471-506.
6. Freed EO. 2002. Viral late domain. *J Virol* 76:4679-4687.
7. Giovannelli I, Clausi V, Nukuzuma S, Della Malva N, Nosi D, Giannecchini S. 2016. Polyomavirus JC microRNA expression after infection in vitro. *Virus Res* 213:269-273.
8. Giovannelli I, Martelli F, Repice A, Massacesi L, Azzi A, Giannecchini S. 2015. Detection of JCPyV microRNA in blood and urine samples of multiple sclerosis patients under natalizumab therapy. *J Neurovirol* 21:666-670.
9. Giovannelli, I, Ciccone, N, Vaggelli, G, Della Malva, N, Torricelli, F, Rossolini, GM, Giannecchini, S. 2016. Utility of droplet digital PCR for the quantitative detection of polyomavirus JC in clinical samples. *J Clin Virol.* 82:70-75.
10. Kean, JM, Rao, S, Wang, M, Garcea, RL. 2009. Seroepidemiology of human polyomaviruses. *PLoS Pathog.* 5:e1000363.
11. Lagatie, O, Tritsmans, L, Stuyver, LJ. 2013. The miRNA world of polyomaviruses. *Virol J.* 10:268–288.



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA SPERIMENTALE
E CLINICA

12. Lagatie, O, Van Loy, T, Tritsmans, L, Stuyver, LJ. 2014. Viral miRNAs in plasma and urine divulge JC polyomavirus infection. *Virology* 2:11-158.
13. Martelli, F, Giannecchini, S. 2017. Polyomavirus microRNAs circulating in biological fluids during viral persistence. *Rev Med Virol* 27:e1927.
14. Moens, U, Van Ghelue, M, Song, X, Ehlers, B. 2013. Serological cross-reactivity between human polyomaviruses. *Rev Med Virol*. 23:250-264.
15. Pietilä, T, Nummi, M, Auvinen, P, Mannonen, L, Auvinen, E. 2015. Expression of BKV and JCV encoded microRNA in human cerebrospinal fluid, plasma and urine. *J Clin Virol*. 65:1-5.
16. Raab-Traub N, and Dittmer DP. 2017. Viral effects on the content and function of extracellular vesicles. *Nat. Rev. microbial*. 15:559-572.
17. Rocca, A, Martelli, F, Delbue, S, Ferrante, P, Bartolozzi, D, Azzi, A, Giannecchini, S. 2015. The JCPYV DNA load inversely correlates with the viral microRNA expression in blood and cerebrospinal fluid of patients at risk of PML. *J Clin Virol*. 70:1-6.

Firenze, 2.12.2017

S. Giannecchini