



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA SPERIMENTALE
E CLINICA

Analisi del microRNA trascrittoma dei Polyomavirus in pazienti immunocompromessi

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

Premessa

I Polyomavirus (PyVs) sono virus nudi a doppia elica di DNA circolare, che hanno una sieroprevalenza nella popolazione umana del 60-90% degli adulti (Imperiale and Major 2007, Johnson 2010). Ad oggi i PyVs identificati nella popolazione umana sono 12: polyomavirus BK (BKPyV), JCPyV, KIPyV, WUPyV, Merkel cell polyomavirus (MCPyV), HPyV6, HPyV7, Trichodysplasia spinulosa-associated polyomavirus, HPyV9, HPyV10, STLPyV e HPyV12 (Allander et al, 2007, Gaynor et al 2007, van Ghelue et al 2012, Moens et al 2015). Inoltre, sembra che nella popolazione umana circoli anche il polyomavirus della scimmia 40 (SV40, Imperiale and Major 2007). I PyVs persistono asintomaticamente nell'ospite e spesso sono associati a severe complicazioni in pazienti immunocompromessi come quelli infettati da HIV o in pazienti trapiantati (Imperiale and Major 2007). In particolare, tra le maggiori patologie associate a i PyVs in particolari casi di immunocompromissione, si ha la Nefropatia poliomavirus associata (PVAN), la Cistite emorragica, e la Leucoencefalopatia multifocale progressiva (PML) associate a BKPyV e JCPyV, la rara displasia della cute Trichodysplasia Spinulosa (TS), associata a TSPyV ed anche il carcinoma a cellule di Merkel, un raro tumore aggressivo della cute associato a MCPyV (Reploeg et al, 2001, Chang and Moore 2012, Dalianis and Hirsch 2013). Gli studi della sieroprevalenza di questi virus suggeriscono che molti soggetti possono essere infettati da



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA SPERIMENTALE
E CLINICA

uno o più PyVs. I PyVs infettano la popolazione umana prevalentemente per via respiratoria o per via intestinale fin da bambini (Berger et al 2006, Vanchiere et al 2009). Sebbene il tropismo cellulare per i due principali PyVs BKPyV e JCPyV sia stato studiato da tempo, meno è conosciuto del reservoir cellulare dei nuovi PyVs. Altri PyVs sono prevalentemente stati trovati nelle vie respiratory (tonsille, polmone) ma anche nei tessuti linfoidei, sulla pelle e nel cervello (Imperiale and Major 2007). Da tempo i PyVs, per il fatto che codificano per antigeni tumorali come il Large T e small t antigen, sono stati associati a malattie tumorali e non (Imperiale and Major 2007). Inoltre, recentemente per alcuni PyVs (BKPyV, JCPyV, MCPyV e SV40) è stato dimostrato che possono codificare microRNA, piccoli RNAs non codificanti con funzione regolatrice post-trascrizionale determinata dal degrado dell'RNA messaggero (mRNA) bersaglio o dalla inibizione della sintesi proteica dovuta al legame al medesimo mRNA (Seo et al 2008, Bauman and Mandelboim 2001, Kinkaïd and Sullivan 2012). In particolare è stato visto che i microRNA dei PyVs down-regolano l'espressione della proteina virale Large-T o proteine cellulari (ULBP3, stress-induced ligand) necessarie all'attività immunologica di cellule NK ed anche linfociti T (Bauman and Mandelboim 2001, Legatie et al 2013). In entrambe i casi questi microRNA virali nasconderebbero il virus alla sorveglianza immunitaria cellulare. Queste nuove informazioni sono rilevanti per il potenziale patogenico dei PyVs poiché modulando la risposta immunitaria antivirale durante la loro persistenza in gran parte della popolazione, tramite i loro microRNA o esprimendo i Large T e small t antigen, possono indirettamente avere un ruolo di cofattori sulla patogenicità di altri virus presenti nell'ospite. In questo contesto è da notare che recenti evidenze suggeriscono che i PyVs, come altri virus, possono utilizzare gli esosomi, piccole vescicole secrete dalle cellule e contenenti microRNA con attività di regolazione dell'espressione genetica che le cellule utilizzano nelle comunicazioni intercellulari, come strategie di regolazione genetica virale (Pegtel et al 2010, Gallo et al 2012).



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA SPERIMENTALE
E CLINICA

Scopo della ricerca

Il progetto proposto sarà focalizzato sullo studio del microRNAs trascrittoma dei PyVs in pazienti immunocompromessi. A tale scopo si ricercherà il DNA e i microRNA dei PyVs in campioni di saliva e si sangue dei suddetti pazienti. In particolare, l'espressione dei microRNA dei PyVs sarà analizzata all'interno degli esosomi presenti nei campioni di saliva, per provare la presenza dei PyVs nella cavità orale, e di sangue periferico per fare luce sul loro ruolo nella persistenza virale. Tale progetto sarà focalizzato sugli esosomi poiché queste piccole vescicole che le cellule producono e liberano nei fluidi biologici durante le loro comunicazioni intercellulari possono contenere i microRNA virali. In questo contesto, esaminando i microRNAs dei PyVs negli esosomi della saliva e confrontandolo con i microRNAs virali presenti nel sangue, possiamo avere nuove indicazioni dello stato delle cellule infettate da PyVs presenti nel paziente. L'analisi del DNA dei PyVs confermerà o no quanto osservato con la ricerca dei microRNAs virali.

Metodiche

Campionamento. Nello studio saranno raccolti 200 campioni accoppiati di saliva e plasma da pazienti HIV positivi (gruppo 1) e, come gruppo di riferimento di controllo, 200 campioni accoppiati di saliva e plasma da pazienti sani (gruppo 2), afferenti alla SOD di Malattie Infettive e Tropicali dell'Azienda Ospedaliera Universitaria di Careggi (AOUC). Nel Gruppo 1 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. In occasione di tale prelievo, verrà richiesto il consenso al prelievo di un'aliquota aggiuntiva di sangue (5 ml) e contestualmente sarà chiesto di raccogliere autonomamente un quantitativo di circa 0,5 ml di saliva in una provetta sterile fornita al momento. *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. Nel



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA SPERIMENTALE
E CLINICA

Gruppo 2 saranno arruolati pazienti sani, afferenti alla SOD di Malattie Infettive e Tropicali. 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) e contestualmente sarà chiesto di raccogliere autonomamente un quantitativo di circa 0,5 ml di saliva in una provetta sterile fornita al momento. Criteri di inclusion: 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.

Polyomavirus. Nel progetto saranno presi in considerazione i seguenti Polyomavirus: Polyomavirus JC (JCPyV), BK (BKPyV), Human Merker cell (MCPyV), e simian virus 40 (SV40) di cui si conosce l'espressione di microRNAs.

Estrazione del DNA e microRNAs dei Polyomavirus. Il DNA totale sarà estratto da 200 microlitri di plasma e saliva usando QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) secondo le istruzioni della ditta. L' RNA sarà isolato dagli esosomi (partendo da 250 microlitri di saliva), usando kit di estrazione di RNA da esosomi (Norgen).

Polyomavirus DNA ddPCR. Il DNA estratto sarà analizzato mediante droplet digital PCR (DDPCR) assay (Pinheiro et al 2012), usando primer e probe specifici per il Large T antigen e il Vp1 di JCPyV, BKPyV, MCPyV e SV40. Il limite di sensibilità è 2-10 copie di PyV DNA.

Polyomavirus microRNAs retrotrascrizione e DDPCR stem-loop. L'espressione dei microRNAs dei PyVs sarà condotta tramite l'utilizzo di stem-loop MiRNA quantitative assay specifico per JCPyV, BKPyV, MCPyV e SV40 (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



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA SPERIMENTALE
E CLINICA

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.

Bibliografia

- Allander, T., Andreasson, K., Gupta, S., Bjerkner, A., Bogdanovic, G., Persson, M. A. A., Dalianis, T., Ramqvist, T., Andersson, B. 2007. Identification of a third human polyomavirus. *J Virol* 81:4130–4136.
- Bauman Y, Mandelboim O. 2011. MicroRNA based immunoevasion mechanism of human polyomaviruses. *RNA Biol.* 8:591-594.
- Berger, J. R., Miller, C. S., Mootoor, Y., Avdiushko, S. A., Kryscio, R. J., Zhu, H. 2006. JC virus detection in bodily fluids: clues to transmission. *Clin Infect Dis* 43, e9–e12
- Chang Y, Moore PS. 2012. Merkel cell carcinoma: a virus-induced human cancer. *Annu Rev Pathol.* 7:123-144.
- Dalianis T, Hirsch HH. 2013. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology.* 437:63-72.
- Gallo A, Tandon M, Alevizos I, Illei GG. 2012. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS One.* 7:e30679.
- Gaynor, A. M., Nissen, M. D., Whiley, D. M., Mackay, I. M., Lambert, S. B., Wu, G., Brennan, D. C., Storch, G. A., Sloots, T. P., Wang, D. 2007. Identification of a novel polyomavirus from patients with acute respiratory tract infections. *PLoS Pathog* 3:e64.
- Giovannelli I, Martelli F, Repice AM, 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.



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA SPERIMENTALE
E CLINICA

Imperiale MJ, Major E. Polyomaviruses. In Fields Virology, 5th edition, Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (eds). Lippincott Williams and Wilkins: Philadelphia, 2007, 2263–2298.

Johnson EM. 2010. Structural evaluation of new human polyomaviruses provides clues to pathobiology. Trends Microbiol. 18:215-223.

Kincaid RP, Sullivan CS. 2012. Virus-encoded microRNAs: an overview and a look to the future. PLoS Pathog. 8 e1003018.

Lagatie O, Tritsmans L, Stuyver LJ. 2013. The miRNA world of polyomaviruses. Virol J. 10:268-288.

Moens U, Rasheed K, Abdulsalam I, Sveinbjørnsson B. 2015. The role of Merkel cell polyomavirus and other human polyomaviruses in emerging hallmarks of cancer. Viruses. 7:1871-1901.

Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM. 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 107:6328-6333.

Pinheiro LB, Coleman VA, Hindson CM, Herrmann J, Hindson BJ, Bhat S, Emslie KR. 2012. Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. Anal Chem. 84:1003-1011.

Reploeg MD, Storch GA, Clifford DB. 2001. BK virus: a clinical review. Clin. Infect. Dis. 33:191–202.

Seo GJ, Fink LH, O'Hara B, Atwood WJ, Sullivan CS. 2008. Evolutionarily conserved function of a viral microRNA. J Virol, 82:9823–9828.

Vanchiere JA, Abudayyeh S, Copeland CM, Lu LB, Graham DY, Butel JS. 2009. Polyomavirus shedding in the stool of healthy adults. J. Clin. Microbiol. 47:2388–2391.



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

DIPARTIMENTO DI
MEDICINA SPERIMENTALE
E CLINICA

Van Ghelue M, Khan MT, Ehlers B, Moens U. 2012. Genome analysis of the new human polyomaviruses. Rev Med Virol. 22:354-377.

Simone Jacobini