

# Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



## Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare *Ciclo XXIII*

**Relazione 1° anno**

**Strategie innovative per l'identificazione e l'espressione  
di antigeni autoimmuni ricombinanti**

Candidato: Chiara Sarasso

*Responsabile del progetto:* Prof. Annalisa Chiocchetti

## EPIDEMIOLOGIA

L'Epatite B è una delle infezioni più comuni, ci sono infatti circa 400 milioni di portatori al mondo. Ogni anno un milione di persone muore per epatite cronica, cirrosi, epatocarcinoma, tutte patologie correlate a questa infezione. Si stima che approssimativamente 400.000 nuovi casi vengano diagnosticati ogni anno solo in America Latina.[1] La prevalenza dei portatori di Epatite B nella popolazione adulta apparentemente sana varia nelle diverse aree geografiche. Motivo per cui il mondo è stato suddiviso in tre zone in base alla prevalenza dell'infezione:

- **Regioni iperendemiche**, in cui l'infezione è praticamente universale: Sud-Est Asiatico (compresa la Cina), Pacifico Occidentale e Africa subsahariana. In queste zone il sovraffollamento nei singoli nuclei familiari e nelle comunità, la promiscuità e l'inosservanza delle più elementari norme igienico-sanitarie favoriscono la diffusione dell'infezione sia orizzontale, da soggetto malato a sano, sia verticale o perinatale, da madre a figlio. La percentuale di portatori in tali popolazioni è maggiore dell'8%.

- **Regioni ad endemia intermedia** quali Nord Africa, Medio Oriente, parte dell'Europa meridionale ed orientale e Sud America con prevalenza di portatori di HBsAg variabile dal 2 al 7% della popolazione generale;

- **Regioni a bassa prevalenza** che comprendono il nord Europa, la maggior parte dei paesi dell'Europa occidentale, gli Stati Uniti, il Canada, l'Australia e la Nuova Zelanda. In queste aree meno del 10% della popolazione generale ha evidenza sierologica di infezione da HBV e il tasso di portatori è pari o inferiore al 2%. Anche in questi paesi tuttavia, la prevalenza di infezione e di portatori può variare considerevolmente in base alle abitudini sociali, voluttuarie e sessuali nonché in base ai gruppi etnici e ai movimenti migratori. [2]



In particolare in Europa uno studio di sieroprevalenza ha permesso di tracciare una dettagliata mappa geografica sulla reale diffusione dell'infezione da HBV nei diversi paesi. L'analisi dell'insieme dei dati raccolti ha portato a suddividere l'Europa in tre pattern epidemiologici distinti:

- un primo pattern rilevabile nei paesi scandinavi e nel Regno Unito si caratterizza per i bassissimi livelli di sieroprevalenza con una percentuale di portatori di HBsAg inferiore allo 0,1% e di marcatori globali d'infezione al di sotto del 5%;
- un secondo pattern osservabile in molti paesi dell'Ovest europeo (quali la Francia, l'allora Repubblica Federale Tedesca e i Paesi Bassi) con percentuali di prevalenza del HBsAg variabili dallo 0,1 allo 0,5% e percentuali globali di marcatori dal 5 al 10%;
- un terzo pattern riscontrabile in tutti i paesi del bacino del mediterraneo e dell'Est europeo, ove la percentuale di sieroprevalenza per l'HBsAg oscilla dall'1 al 5% e quelle globali d'infezione dal 10 al 20%.

L'Italia, paese ad endemia intermedia, si colloca in questa terza fascia con una prevalenza, nella popolazione generale, per uno o più marcatori di infezione da HBV, intorno al 20% ed una positività media per HBsAg del 3% (oscillazioni dallo 0,5% nelle regioni del Nord, al 5% nel Sud).

[3]

Alla fine degli anni ottanta è stato condotto in Italia uno studio di sieroprevalenza su una popolazione di 65000 gestanti, uniformemente distribuite nel territorio nazionale. Secondo questa indagine, la prevalenza media del HBsAg è risultata del 2,4%, ma con una distribuzione alquanto disomogenea nelle diverse regioni: da percentuali bassissime, dello 0,5%, rilevate nel Trentino-Alto Adige, a percentuali del 5,2% in Sardegna e Campania e del 5,6%, in Puglia. Queste differenze si possono verosimilmente attribuire alle diverse abitudini di vita e alle più o meno precarie condizioni sociosanitarie nel Centro-Sud Italia, rispetto al Nord. Sacche iperendemiche, con sieroprevalenza per HBsAg superiore al 7%, e talora sino al 10%, sono state riscontrate in alcune aree urbane del napoletano ad altissima densità di popolazione, così come in aree urbane del Nord-Italia, in particolare nelle province di Bergamo e Brescia.[4]

Se fino alla metà degli anni '80 l'infezione da HBV costituiva il più frequente fattore eziologico delle epatiti croniche, nell'ultimo decennio le migliorate condizioni socioeconomiche ed igienico-sanitarie, il calo della natalità (con il conseguente minore affollamento delle aule scolastiche e dei nuclei familiari), l'utilizzo sempre più diffuso delle siringhe a perdere, hanno progressivamente e considerevolmente modificato l'impatto dell'infezione da HBV nell'eziologia delle epatopatie

croniche in Italia. Nell'ultimo quinquennio, in Italia, la percentuale di epatopatie croniche attribuibili ad infezione da HBV è ulteriormente scesa sino a livelli del 13,7%. [5]

## **VIE DI TRASMISSIONE**

L'HBV si trasmette per via parenterale apparente o inapparente. Il contagio avviene per via percutanea o tramite il contatto diretto con le mucose, per la presenza del virus nei liquidi biologici di una persona infetta (questo vale sia per l'infezione cronica sia per la forma acuta). Il rischio di contrarre l'epatite è direttamente proporzionale alla quantità del liquido infetto che entra in circolo e al livello di contagiosità del portatore dell'HBV che funge da serbatoio dell'infezione. Tra le complessità che contraddistinguono il virus e la malattia esiste anche la variabilità della carica virale, che nei portatori dell'antigene HBsAg oscilla da un minimo di dieci virioni/ml al massimo di un miliardo di virioni/ml. Le più elevate concentrazioni del virus si registrano nel sangue, nei suoi derivati e nei fluidi sierosi, mentre nel seme, nel fluido vaginale e nella saliva sono decisamente più basse. Il sangue e i rapporti sessuali rappresentano quindi i modelli più efficienti di trasmissione del contagio. Seppure in bassissime concentrazioni l'antigene di superficie dell'HBV (HBsAg) è stato individuato anche in fluidi organici come le lacrime, il sudore, le urine, le feci, il colostro, il liquido cerebrospinale e sinoviale, i quali non sono stati però associati ad un reale rischio di trasmissione dell'infezione. Le principali vie di contagio per l'HBV sono quindi rappresentate da trasfusioni di sangue e suoi derivati, rapporti sessuali non protetti, trapianti di organi e tessuti, uso di siringhe e aghi contaminati, impiego di apparecchiature e strumenti sanitari non sterilizzati, trasmissione verticale. La trasmissione verticale è estremamente frequente nelle aree geografiche ad elevata endemia, così come la possibilità che il contagio venga trasmesso dalla puntura di insetti riguarda essenzialmente le zone tropicali e si può comunque considerare piuttosto remota. Le categorie particolarmente esposte al rischio di infezione da HBV sono pertanto i tossicodipendenti, i politrasfusi, gli emodializzati, gli omosessuali maschi, gli operatori sanitari.

I mutamenti sociali che stanno avvenendo nel nostro paese e una serie di abitudini e mode sembrano aver aumentato il propagarsi del contagio da HBV. Per cambiamenti sociali si intendono le numerose migrazioni dai paesi in cui l'HBV ha un andamento endemico, oppure i sempre più frequenti viaggi di svago in zone esotiche spesso appartenenti alla fascia dei paesi in cui è più elevato il rischio di contrarre il virus. Le abitudini considerate "pericolose" sono senza dubbio i rapporti sessuali promiscui, dal momento che l'epatite B va considerata una delle malattie

sessualmente trasmesse più diffuse, ma non sono da meno nuove mode sempre più diffuse quali tatuaggi e piercing.[6]

## **PREVENZIONE**

L'allestimento di vaccini per la prevenzione dell'infezione da HBV rappresenta una delle principali conquiste della medicina moderna.

Esistono diversi tipi di vaccino:

- vaccini a base di HBsAg (Antigene di Superficie);
- vaccini contenenti l'HBsAg e gli Antigeni S e pre S;
- vaccini preparati con la tecnica del DNA ricombinante.[7,8]

Per la prima vaccinazione si consiglia di fare 3 inoculazioni per via intramuscolare, distanziate di 1 mese l'una dall'altra. Un primo richiamo a distanza di 1 anno dalla prima iniezione e successivamente un richiamo ogni 5 anni.

Per il vaccino ricombinante la distanza ottimale tra le dosi è: 0-1-6 mesi e non sono necessari i richiami.

In Italia la vaccinazione del neonato è obbligatoria (Legge n 165 del 27 maggio 1991) e va fatta, per i nati da madri HBsAg negative al 3°-5°-11° mese di vita contemporaneamente alle altre vaccinazioni obbligatorie (antidifterica, antitetanica, antipolio). Inoltre la vaccinazione anti-epatite B è obbligatoria anche per tutti gli adolescenti nel corso del 12° anno di vita (limitatamente ai 12 anni successivi all'entrata in vigore della legge). Infine è obbligatorio per legge lo screening per HBsAg di tutte le gravide nel corso del 3° trimestre di gestazione. Il vaccino è comunque consigliato ai gruppi ad alto rischio quali: individui sessualmente attivi con più di un partner sessuale in 6 mesi, maschi omosessuali o bisessuali, soggetti afferenti a centri per malattie sessualmente trasmesse, partner sessuali o contatti familiari di soggetti HBsAg positivi, tossicodipendenti per via endovenosa, pazienti affetti da coagulopatie/emopatie che necessitano di frequenti trasfusioni di sangue, emoderivati o fattori della coagulazione, emodializzati, soggetti che risiedono o lavorano in istituzioni per malati mentali o istituti di contenzione, operatori sanitari, soggetti che hanno in programma di risiedere per più di 6 mesi in aree ad endemia elevata.[9]

Il vaccino anti-HBV è sicuro ed efficace e induce la produzione di anticorpi diretti contro l'antigene di superficie (anti-HBs), che rappresentano gli anticorpi neutralizzanti protettivi. Si ritiene protettivo un titolo di anti-HBs  $\geq 10$  mIU/ml.[10] Questo titolo anticorpale si osserva di solito in più del 95% dei soggetti vaccinati. L'immunogenicità è ridotta negli individui che hanno più di 40 anni e negli immunocompromessi. In presenza di non responsività al vaccino, si consiglia la

rivaccinazione con 3 ulteriori dosi di vaccino. In questi casi, di solito, circa la metà dei pazienti sieroconverte, nei restanti casi non c'è nessuna indicazione a ripetere un nuovo ciclo vaccinale, ma si può tentare di indurre una risposta somministrando il vaccino con un adiuvante specifico di derivazione T linfocitaria ovvero in concomitanza con immunoglobuline specifiche (HBIg) o con immunostimolanti. Generalmente la persistenza di anti-HBs dopo la vaccinazione correla con l'entità del titolo anticorpale raggiunto dopo l'ultima dose di vaccino. L'anti-HBs scompare in un certo numero di soggetti vaccinati dopo 10 anni dal vaccino, ma l'immunità sembra persistere ancora per molti anni .[11]

## **I MARCATORI SIEROLOGICI dell'INFEZIONE da HBV**

### HBsAg e anti-HBs

L'HBsAg è l'indicatore sierologico più importante dell'infezione da HBV. Può essere rilevato nel siero di pazienti affetti da epatite B da 6 a 16 settimane dal contagio e di solito precede di 1-7 settimane l'aumento delle transaminasi e degli eventuali sintomi. L'HBsAg di solito diventa non determinabile dopo 4-6 mesi nei pazienti che vanno incontro a guarigione spontanea, mentre la sua persistenza per più di 6 mesi indica l'evoluzione verso una forma di infezione cronica. La scomparsa dell'HBsAg è seguita dalla comparsa del relativo anticorpo (anti-HBs). Nella maggior parte dei pazienti, l'anti-HBs persiste per anni o per tutta la vita, conferendo un'immunità a lungo termine. Alcuni pazienti, tuttavia, presentano il cosiddetto "periodo finestra" che corrisponde al periodo in cui l'HBsAg si negativizza, ma l'anti-HBs non è ancora determinabile in circolo. In questa fase il paziente non ha né l'antigene s, né l'anticorpo e quindi la diagnosi di infezione da HBV si basa sulla ricerca degli anticorpi anti antigene core di classe IgM (anti-HBc IgM). Circa il 25% dei soggetti infetti presenta nel siero sia HBsAg che anti-HBs. In taluni casi si tratta di portatori cronici nei quali gli anticorpi anti-HBs non sono in grado di neutralizzare i virioni circolanti.[12]

### HBcAg e anti-HBc

L'antigene core dell'HBV (HBcAg) è un antigene intracellulare espresso negli epatociti infetti e quindi non presente nel siero. Il corrispondente anticorpo (anti-HBc) è presente nel siero per tutta la durata dell'infezione: in fase acuta si tratta di IgM che nella fase finestra rappresentano l'unico marcatore di infezione. In particolare, si ritiene che la presenza nel siero di IgM anti-HBc sia diagnostica di infezione acuta, nonostante che tali anticorpi possano rimanere determinabili nel siero anche per più di 2 anni dopo l'infezione acuta e possano ricomparire nelle fasi di riesacerbazione delle epatiti croniche. Le IgG anti-HBc persistono insieme con gli anti-HBs nei

pazienti che guariscono e insieme con l'HBsAg nei pazienti che cronicizzano. La presenza isolata di anti-HBc in assenza di HBsAg o anti-HBs, è stata riportata nello 0,4-1,7% dei donatori di sangue in aree a bassa prevalenza e nel 10-20% della popolazione nelle regioni endemiche. Questo riscontro è indicativo di tre situazioni: periodo finestra di un'epatite B acuta (in questo caso si tratta di anti-HBc di classe IgM), pregressa infezione da HBV guarita risalente a molti anni addietro (di conseguenza il titolo di anti-HBs è diminuito fino a non essere più determinabile); infezione cronica da HBV di lunghissima durata (di conseguenza il titolo di HBsAg è diminuito fino a non essere più determinabile). Ai fini della diagnosi differenziale può essere utile la determinazione dell'HBV-DNA che comunque, in alcuni pazienti con solo anti-HBc, può anche risultare negativo.[10]

### HBeAg e anti-HBe

L'HBeAg è in genere considerato marcatore di attiva replicazione virale ed infettività. E' riscontrabile in circolo nella prima fase dell'epatite acuta B, cioè durante la fase di attiva replicazione virale, pochi giorni dopo la comparsa dell'HBsAg e la sua presenza si associa alla presenza di HBV-DNA nel siero. La maggior parte dei pazienti HBeAg positivi ha una malattia epatica attiva, a meno che non si tratti di pazienti con infezione perinatale che, in questo caso possono avere transaminasi normali e minima infiammazione nel fegato. La sierconversione da HBeAg al relativo anticorpo (anti-HBe) si associa di solito alla scomparsa dell'HBV-DNA nel siero e alla remissione della malattia. Tuttavia un certo numero di pazienti affetti da infezione cronica continua ad avere una malattia epatica attiva e la presenza di HBV-DNA nel siero nonostante la presenza di anticorpi anti-HBe. Questa tipologia di pazienti, prevalente nel bacino del Mediterraneo, è portatrice di una popolazione virale prevalente caratterizzata da una mutazione a livello della regione precore che previene la produzione di HBeAg (mutanti precore).[13]

### HBV-DNA

La presenza di HBV-DNA nel siero è indicativa di replicazione virale. Questo marcatore può essere rilevato nel siero con metodiche quantitative o qualitative i cui limiti di sensibilità dipendono dal test utilizzato: da  $10^5$  a  $10^6$  equivalenti virali/ml in caso di tecniche di ibridizzazione o di amplificazione del segnale, fino a  $10^2$ - $10^3$  equivalenti/ml in caso di polymerase chain reaction (PCR). La guarigione di una epatite B acuta si accompagna generalmente alla scomparsa dell'HBV-DNA rilevata mediante tecniche non-PCR. Con la PCR infatti, l'HBV-DNA può rimanere determinabile nel siero per molti anni dopo la guarigione. Questo dato suggerisce la persistenza del virus dopo guarigione verosimilmente contenuto all'interno del sistema immune. Analogamente in pazienti con infezione cronica, la sierconversione HBeAg ad anti-HBe, sia spontanea che indotta dal trattamento, si accompagna di solito alla scomparsa dell'HBV-DNA sierico determinata da

metodiche non-PCR, che però permane positivo con la PCR a meno che il paziente non abbia sierconvertito da HBsAg ad anti-HBs.[14]

Il principale ruolo clinico della determinazione dell'HBV-DNA sta nella predittività della risposta alla terapia virale in pazienti con infezione cronica. In caso di infezione da virus selvaggio, i pazienti con elevati livelli sierici di HBV-DNA pre-trattamento hanno minori probabilità di rispondere alla terapia con interferone.[15] Non è chiaro se questo vale per la terapia con analoghi nucleosidici. Infine, l'HBV-DNA, in quanto indice di replicazione virale, è utile nella selezione dei pazienti con epatopatia cronica HBV-relata da candidare al trapianto di fegato. I pazienti HBV-DNA positivi, infatti, hanno una probabilità elevatissima di reinfectare il fegato trapiantato con conseguente prognosi negativa per la sopravvivenza sia dell'organo che del paziente.[12]

## **IL VIRUS DELL'EPATITE B**

Il virus dell'epatite B (hepatitis B virus: HBV) è il prototipo di una famiglia di virus a DNA di piccole dimensioni muniti di envelope denominati hepadnaviridae e caratterizzati da uno spiccato epatotropismo e da uno spettro d'ospite ristretto.

Oltre all'HBV questa famiglia comprende:

- il virus dell'epatite della marmotta (woodchuck hepatitis virus: WHV);
- il virus dell'epatite dello scoiattolo (ground squirrel hepatitis virus: GSHV);
- il virus dell'epatite B dell'anatra (duck hepatitis B virus: DHBV);
- altri virus ancora non bene caratterizzati capaci di infettare sia mammiferi (ad esempio alcune specie di scimmie) che uccelli (ad esempio l'airone).

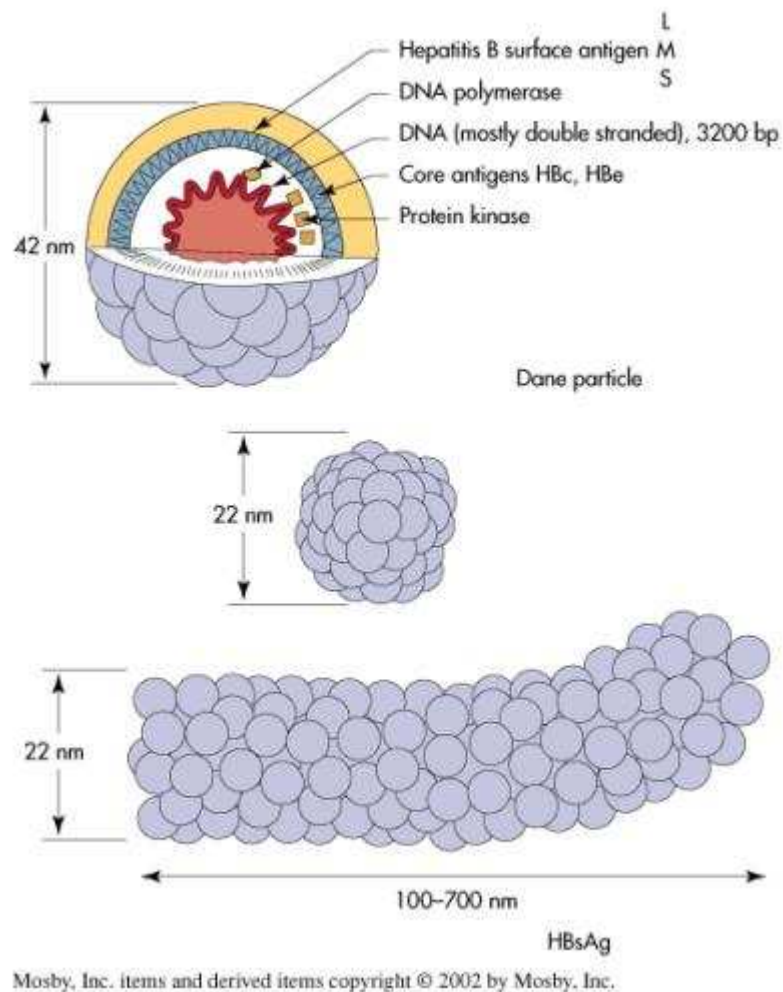
Tutti questi virus hanno una struttura simile, grossolanamente circolare, un genoma a DNA parzialmente bicatenario e una peculiare ed insolita strategia replicativa .[16]

## **STRUTTURA**

Al microscopio elettronico, il siero di pazienti con infezione da HBV presenta diversi tipi di particelle virali, strutturalmente ben distinte, alcune complete altre incomplete:

- "particelle di Dane": particelle sferoidali a doppio guscio di 42 nm;
- particelle sferiche di circa 22 nm;
- particelle filamentose del diametro di 22 nm e di lunghezza variabile.





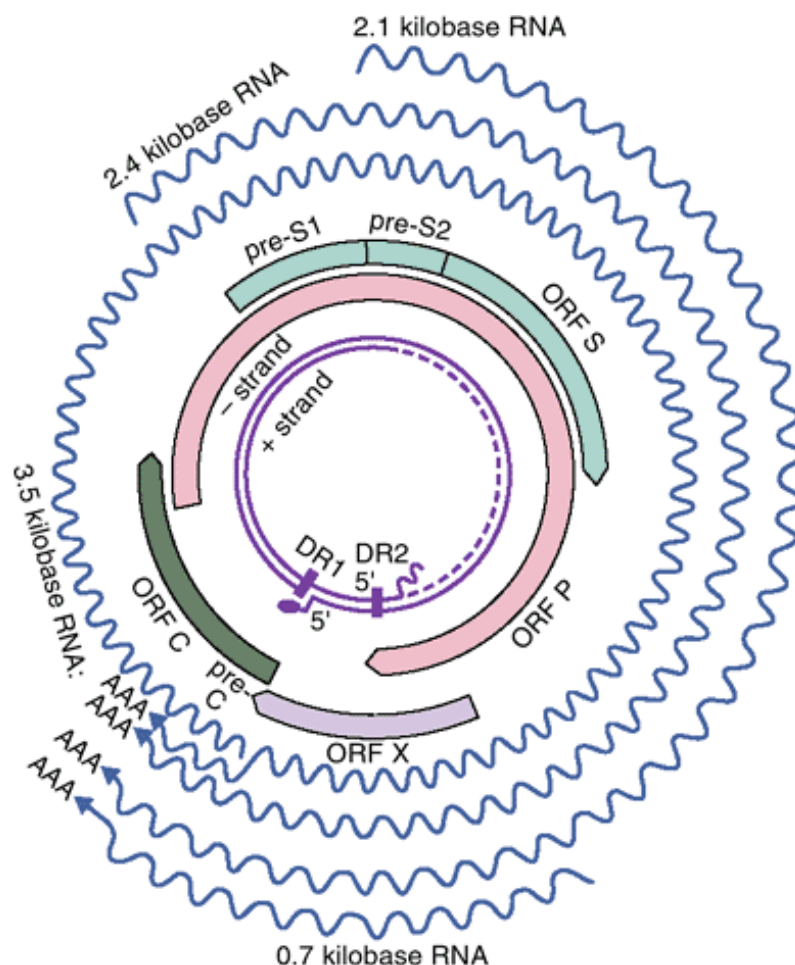
Le "particelle di Dane" altro non sono che i virioni infettanti dell'HBV e la loro presenza nel siero è indicativa di attiva replicazione virale nel fegato. Sono costituite da un involucro esterno lipoproteico (envelope) di 7 nm, contenente tutti gli antigeni di superficie del virus, e da un rivestimento proteico interno (capside) dotato di specificità antigenica (antigene core), che nel suo interno racchiude il genoma virale (HBV-DNA) e la DNA-polimerasi virus-specifica. Nel loro insieme le molecole proteiche del capsid, il genoma e la DNA-polimerasi formano il core della particella virale. Quest'ultimo, di 28 nm di diametro, mostra alla microscopia elettronica una configurazione esagonale a simmetria icosaedrica, con capsomeri, punte e spikes che aggettano dalla superficie del nucleocapsid con prolungamenti di 7-10 nm di lunghezza terminanti con rigonfiamento distale bulbare.

Le particelle sferiche e filamentose sono costituite solo dall'involucro lipoproteico e mancano di nucleocapsid e di genoma, di conseguenza non sono infettanti. Anche se in differente percentuale fra loro costituiscono le forme preponderanti in circolo potendo raggiungere, nel siero dei pazienti infetti, concentrazioni elevatissime, sino a  $10^{13}$  per ml.[17]

L'involucro del virione è formato dal doppio strato lipidico proveniente dalle cellule dell'ospite e da tre glicoproteine virali chiamate proteine di superficie small (S), middle (M) e large (L). Il rivestimento esterno dei diversi tipi di particelle virus-relate presenti nel siero è costituito principalmente dalla proteina S, mentre le proteine M e L sono presenti in minor quantità. La proteina di superficie S rappresenta pertanto un antigene di frequente riscontro chiamato antigene di superficie dell'epatite B (hepatitis B surface antigen: HBsAg).

Una delle caratteristiche peculiari dell'HBV è l'enorme eccesso con cui vengono prodotte alcune proteine virali (in particolare le proteine di superficie e la forma secretoria della proteina nucleocapsidica). L'esubero di sintesi delle proteine di superficie fa sì che solo una piccola porzione di esse vengano utilizzate per la costituzione del rivestimento del virione, la maggior parte viene invece secreta sotto forma di particella (sferica o filamentosa) difettiva, che pur presentando la reattività "HBsAg", non è infettiva in quanto non contiene l'acido nucleico virale.[18]

## ORGANIZZAZIONE



Il genoma dell'HBV è costituito da una molecola di DNA circolare a doppia elica incompleta, del peso molecolare di  $2,3 \times 10^6$  dalton. Il doppio anello è formato da un filamento lungo a polarità negativa di dimensioni costanti (minus strand) e da un filamento corto a polarità positiva che può variare dal 15 al 60% della lunghezza della forma circolare (plus strand).

Il genoma dell'HBV ha un'organizzazione molto compatta, vale a dire che ogni nucleotide si trova in una regione codificante e più della metà del genoma è tradotto da più moduli di lettura aperta (open reading frames, ORFs).[19] Questa estrema compattezza dunque, determina inevitabili sovrapposizioni delle regioni che codificano le proteine virali, con lettura a partire da codoni di inizio parzialmente sfalsati. Questo tipo di architettura risulta molto vantaggiosa, in questo modo infatti l'HBV può contare su un genoma poco ingombrante, ma particolarmente duttile, visto che la mutazione di un singolo nucleotide può cambiare più di una proteina virale.

L'analisi di sequenza del DNA virale (HBV) ha portato all'identificazione di quattro ORFs localizzati tutti sul minus strand:

- ORF pre-S/S che codifica per gli antigeni di superficie (pre-S1, pre-S2 e S);
- ORF pre-C/C che codifica per le proteine strutturali del core e per l'antigene e (HBeAg);
- gene P che codifica per la polimerasi virale;
- gene X che codifica per una proteina il cui ruolo nel ciclo biologico del virus rimane tuttora ignoto.[18]

### Proteine di superficie

L'ORF che codifica per le proteine strutturali dell'involucro esterno della particella di Dane è costituito da un unico modulo di lettura che comprende sia il gene S sia due altre regioni contigue che lo precedono nello stesso modulo definite pre-S1 e pre-S2. Il genoma può così codificare per le tre diverse proteine di superficie: S, M ed L: la proteina L è il prodotto dell'intero ORF (preS1 + preS2 + S), la M del gene S e della sequenza preS2 situate a monte di S e la S codificata solo dal gene S.

Tutte e tre le proteine sono costituenti essenziali dell'involucro esterno dell'HBV ove sono stabilmente rappresentate e sembrano svolgere importanti funzioni quali ad esempio l'assemblaggio del core a livello citoplasmatico, l'adesione alle membrane plasmatiche delle cellule dell'ospite e la penetrazione della particella virale all'interno della cellula epatica.

Nel siero dei pazienti infettati da HBV l'espressione delle tre proteine di superficie è estremamente variabile e dipende dalla fase della malattia (acuta o cronica) e dall'attività replicativa del virus.[19,20]

### Proteine del core

Come per l'ORF pre-S/S, anche per l'ORF del core sono presenti due distinti codoni di inizio della trascrizione che permettono di identificare due regioni: pre-C e C (2). Il prodotto del gene C è la proteina del core (HBcAg) che costituisce l'unità fondamentale del nucleocapside e sintetizzata nel citoplasma della cellula ospite, ritorna nel nucleo concorrendo poi all'assemblaggio della particella virale infettiva. La proteina HBcAg contiene una sequenza carbossiterminale protamino-simile di 38 amminoacidi ricca in arginina e ritenuta responsabile, in quanto altamente basica, del legame tra l'antigene e l'acido nucleico virale.[21]

Se il segnale di trascrizione inizia a livello del primo codone in posizione 1814, si ha la sintesi di una proteina di 25 Kd (espressione dell'intero modulo di lettura pre-C/C) che differisce dall'HBcAg per la presenza all'estremo N-terminale di 29 aminoacidi tradotti dalla regione pre-C. Questa regione contiene un piccolo peptide che ha la funzione di sito di riconoscimento per il trasporto della proteina di 25 Kd nel reticolo endoplasmatico della cellula ospite. In seguito all'eliminazione di tale peptide nel lume dello stesso reticolo endoplasmatico, residua una proteina intermedia di 22 kd che può o essere liberata come tale nel citoplasma o essere ulteriormente clivata all'estremo C-terminale dando origine ad una proteina di 17 Kd chiamata antigene "e" (HBeAg). L'HBeAg è pertanto un antigene nucleocapsidico non strutturale del virus, fisicamente e antigenicamente distinto dall'HBcAg. L'HBeAg non sembra indispensabile per le funzioni biologiche e vitali del virus, come dimostrato dal fatto che le mutazioni virali coinvolgenti la produzione di proteine precore non hanno alcun effetto sulla replicazione virale. Pur non essendo fondamentale per il completamento del ciclo biologico del virus, la produzione dell'HBeAg è stata mantenuta in tutti gli hepadnavirus. E' possibile che ciò tragga ragione dal suo ruolo di modulatore dell'interazione virus/sistema immune dell'ospite, come dimostrato da evidenze sperimentali.[22]

### Proteina P

Il prodotto codificato dal gene P, una proteina basica ricca in istidina di 90000-950000 dalton, si caratterizza per le sue molteplici attività funzionali, prima fra tutte quella svolta nel processo di replicazione del virus, ma anche quella di più recente individuazione che assegna un ruolo importante nelle varie fasi di packaging dell'RNA genomico all'interno della primitiva particella del core.

L'analisi di sequenza del genoma ha rivelato l'esistenza, all'interno dell'ORF P, di quattro distinti domains. Un amminotermine detto primase che codifica per la proteina e funge da primer per la sintesi del minus strand del DNA virale. A questo segue un secondo dominio di incerto significato, definito spacer intercalato tra il primo e il terzo, il quale codifica per la DNA-polimerasi virale. Tale enzima svolge un ruolo chiave nel processo di replicazione del virus ed è dotato di differenti

funzioni: antigene, enzima di riparazione per la chiusura del tratto spaiato del plus strand nel momento dell'ingresso del virione nel nucleo dell'epatocita infettato e infine attività di trascrittasi inversa indispensabile per dirigere la sintesi del DNA virale a partire dall'RNA pregenomico sintetizzato da una polimerasi dell'ospite. Un quarto dominio, localizzato all'estremità 3' dell'ORF codifica per un H-ribonucleasi che serve a degradare l'oligoribonucleotide posto all'estremità 5' una volta che questo ha svolto la sua funzione, ovvero funzionare da primer per la copia del plus strand all'interno del core immaturo.[23,24]

### Proteina X

L'ORF X codifica per una proteina non strutturale del virus la cui esatta funzione rimane ancora per certi aspetti da chiarire. Sembra si tratti di una proteina dalle spiccate proprietà transattivanti in grado di promuovere la trascrizione di diversi geni, non solo dell'HBV (sul quale agisce regolando e/o potenziando le varie fasi del processo replicativo), ma anche di altri virus e delle cellule dell'ospite.[25] In particolare, la proteina X agirebbe su oncogeni e fattori di crescita quali c-myc, c-fos c-jun, TGF- $\alpha$  esercitando così una spinta proliferativa sulla cellula che, se non opportunamente controregolata e bilanciata dall'attività di altri geni ad effetto opposto (antioncogeni), può portare a situazioni estreme, quali la trasformazione neoplastica. [26]

La proteina X ha inoltre potere immunogeno ed è quindi capace di indurre nel soggetto infettato da HBV una risposta anticorpale. Tale risposta, fugace e abortiva nel soggetto con epatite acuta autolimitantesi, può persistere a titoli abbastanza elevati nell'epatite cronica HBsAg-positiva con persistente replicazione virale.

## **REPLICAZIONE**

Il ciclo vitale dell'HBV è particolare e unico nel suo genere. L'HBV, pur essendo un virus a DNA, replica come un retrovirus: la duplicazione del proprio genoma prevede infatti la sintesi di un pregenoma ad RNA intermedio successivamente retrotrascritto, ad opera della trascrittasi inversa, nel corrispondente DNA.[27]

Le tappe del ciclo vitale sono le seguenti:

- **adesione e ingresso nella cellula ospite:**

gli eventi più precoci del ciclo dell'HBV sono ancora in gran parte ignoti per l'assenza di modelli cellulari in vitro. Il migliore modello sperimentale è rappresentato dall'infezione di epatociti di anatra con DHBV: su queste cellule sono stati dimostrati almeno  $10^4$  siti di legame ad alta affinità. Il legame specifico a questi siti saturabili si accompagna all'adesione del virus a siti di legame non saturabili e a bassa affinità. Sulla base delle evidenze sperimentali, si ritiene che, sia per l'HBV che

per il DHBV, i siti recettoriali responsabili dell'interazione virus-ospite siano situati all'interno del domain pre-S della proteina di superficie L. Resta comunque sconosciuta la natura dei recettori cellulari, anche se nel modello degli epatociti di anatra è stata descritta una glicoproteina di 180 kd sulla superficie cellulare appartenente alla famiglia delle carbossipeptidasi D in grado di legare le particelle virali con elevata affinità. Questa proteina transmembrana sarebbe il recettore responsabile del riconoscimento e dell'internalizzazione del virus, tuttavia sarebbe necessario un secondo fattore dell'ospite per completare l'ingresso del virus nella cellula.

Una volta avvenuto il legame con i recettori cellulari, la tappa successiva prevede la liberazione del genoma e degli altri costituenti virali nel citoplasma della cellula ospite. Per l'HBV sembra che ciò avvenga per endocitosi. Una volta nel citoplasma, il DNA genomico deve raggiungere il nucleo, come questo trasporto possa avvenire è oggetto di numerosi studi. Le evidenze più recenti supportano il ruolo della polimerasi virale che sarebbe in grado di legare le molecole di DNA all'interno del nucleo, mentre le particelle del core sarebbero coinvolte nel trasporto nucleare.

Una volta nel nucleo il genoma circolare parzialmente a doppia elica si trasforma in una nuova forma di DNA virale chiamato DNA circolare chiuso covalentemente (cccDNA). Il cccDNA rappresenta lo stampo per la trascrizione del genoma virale.[28]

- **replicazione del genoma:**

la prima tappa della replicazione del genoma è la formazione del cccDNA che viene successivamente amplificato di circa 50 volte. La trasformazione del DNA virale in cccDNA e la successiva amplificazione prevedono una serie di reazioni enzimatiche che necessitano dell'intervento di fattori dell'ospite e della proteina virale L. Il cccDNA è il primo intermedio replicativo a comparire dopo l'infezione e rappresenta la principale forma di DNA presente nel nucleo.

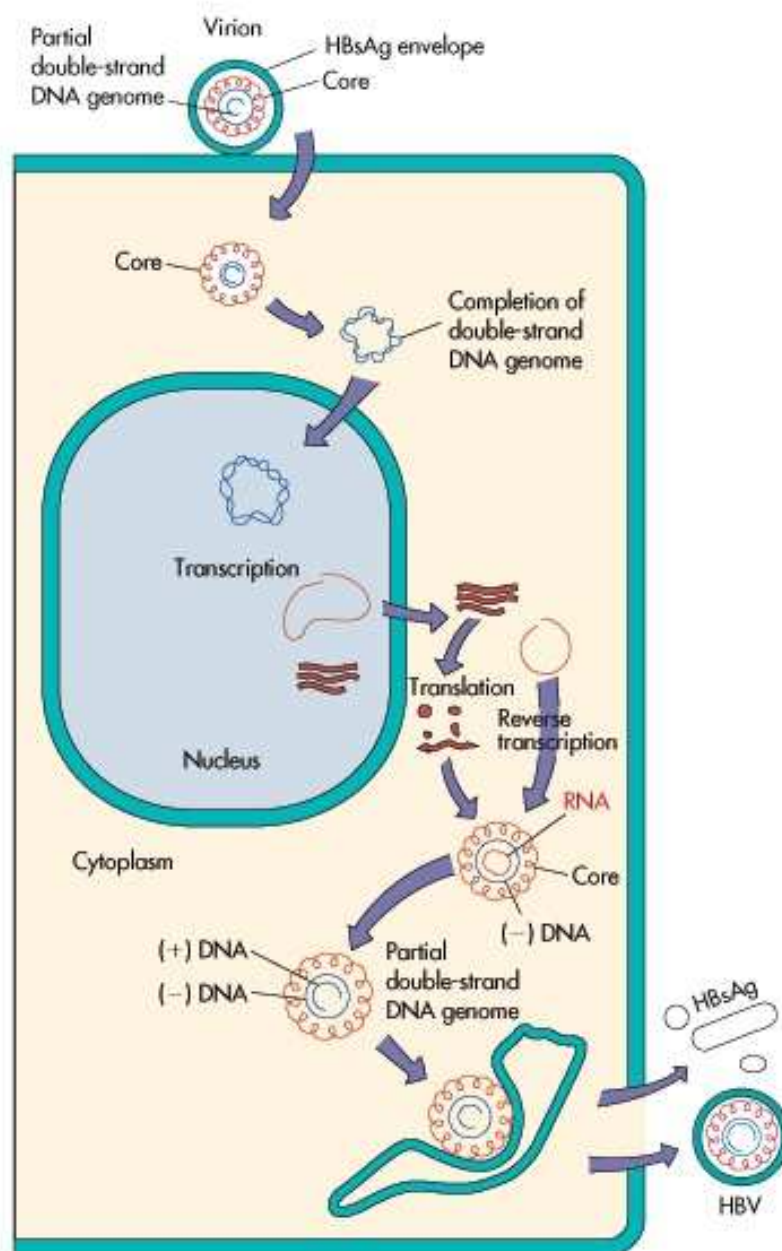
Il cccDNA viene quindi trascritto, ad opera di una RNA-polimerasi DNA-dipendente della cellula dell'ospite, in forme multiple di RNA genomico e subgenomico, tutte a polarità positiva, le quali si distinguono per la differente lunghezza e funzione. Nell'evolversi del ciclo riproduttivo, una parte dell'RNA genomico migra nel citoplasma ove viene utilizzato come RNA messaggero (mRNA) per dirigere la sintesi delle proteine virali strutturali e non, mentre un'altra parte rimane temporaneamente sequestrata nel nucleo dell'epatocita per poi migrare verso il citoplasma e fungere da stampo per la sintesi di nuovo DNA virale.

L'RNA destinato alla replicazione virale, definito pre-genomico (pgRNA), viene incapsidato in particelle core immature all'interno delle quali viene poi retrotrascritto ad opera della DNA polimerasi virale nella catena minus strand del DNA virale. Man mano che il minus strand si allunga, il pgRNA viene degradato ad opera della DNA-polimerasi virale che possiede anche

attività ribonucleasica. Una volta completato il minus strand, questo servirà da stampo per la sintesi della catena corta (plus strand) che ha luogo sempre all'interno della particella virale immatura.[27,29]

- **assemblaggio delle particelle virali e liberazione in circolo:**

Per essere secreto il virus deve assolutamente possedere l'involucro, in particolare deve avere le proteine di superficie. L'assemblaggio delle particelle del core con le proteine dell'envelope avviene nel citoplasma attraverso una complessa interazione che genera virioni con involucro. Le particelle così assemblate vengono trasportate nel reticolo di Golgi e quindi secrete mediante trasporto vescicolare.



## VARIABILITA' GENETICA

Rispetto ad altri virus il genoma dell'HBV sembra essere relativamente stabile con un tasso di variabilità circa 100-1000 volte più basso rispetto ai virus a RNA, ma 100 volte più alto rispetto agli altri virus a DNA. Questo dato si può verosimilmente imputare al fatto che le modalità di replicazione dell'HBV prevedono la sintesi di un pre-genoma ad RNA quindi ritrascritto in DNA, la fase di retro-trascrizione pertanto giustificerebbe una variabilità genomica piuttosto elevata. Al contrario il numero di mutazioni dell'HBV pari a  $2 \times 10^5$  sostituzioni/per sito/per anno è nettamente inferiore a quello di altri virus con meccanismi replicativi simili quali l'HIV. E' verosimile che l'estrema compattezza del genoma virale sia uno dei fattori limitanti per la produzione di mutanti biologicamente efficienti. [30,31]

Le varianti dell'HBV negli ultimi anni hanno suscitato notevole interesse non solo virologico, ma anche clinico di conseguenza mutazioni a carico dei differenti geni virali (regioni core e precore, regione S e regione P) sono state studiate in relazione a specifiche condizioni cliniche.

- In riferimento alla regione pre-S/S che codifica per le proteine di superficie, la presenza di regioni ipervariabili e quindi suscettibili di mutazioni nelle due porzioni idrofiliche del gene S, giustifica il riscontro di diversi sottotipi virali e la possibilità nell'ambito degli stessi, di frequenti mutazioni con sostituzioni aminoacidiche senza però comportare importanti ripercussioni sulla biologia o sulla patogenicità dell'HBV. Mutazioni puntiformi e delezioni delle regioni pre-S1 pre-S2 possono, invece, riflettersi rispettivamente sull'assemblaggio del virione e sulle potenzialità oncogene del virus. [32,33]

Sul piano clinico la variazione più importante a carico del gene S è quella riguardante il domain gruppo-specifico "a" altamente immunogeno, in particolare la regione tra gli aa 124 e 147. Tale domain presente in tutti i sottotipi virali dell'HBV, rappresenta il bersaglio verso cui è diretta la risposta anticorpale neutralizzante antiHBs, in grado di conferire protezione nei confronti dei diversi sottotipi del virus.[34] Questa mutazione fu inizialmente descritta in un bambino italiano infettatosi dalla madre HBeAg-positiva nonostante che avesse già sviluppato, a seguito della profilassi vaccinale, anticorpi anti-HBs a titolo elevato (il bambino divenne HBsAg e HBeAg positivo portatore di epatite cronica). [35] Questa stessa mutazione è stata successivamente evidenziata sia in bambini sottoposti a profilassi passiva-attiva anti-HBV [36,37], sia nei trapiantati d'organo dopo profilassi con globuline umane specifiche iperimmuni.[38,39] Tale mutazione consiste nella sostituzione in posizione 145, dell'aminoacido glicina con l'aminoacido arginina, questo determina la selezione di un mutante virale biologicamente attivo in grado di riprodursi e di sfuggire all'azione neutralizzante degli anticorpi anti-HBs, in quanto la sostituzione Gly>Arg altera



la struttura conformazionale dell'epitopo immunodominante "a" riducendo o annullando la capacità di legame degli anticorpi monoclonali o policlonali specifici. [34]

Ogni tipo di mutazione del gene pre-S/S può portare ad errori diagnostici soprattutto quando sono utilizzate metodiche di rilevamento dell'HBsAg basate sulla cattura dell'antigene o che si avvalgono dell'uso di anticorpi monoclonali antiHBs che possono non legarsi al mutante HBsAg. Pertanto i pazienti portatori di un'infezione da varianti HBV con mutazioni nella regione del gene pre-S/S potrebbero risultare falsamente negativi.[40]

- Le varianti della regione preC si caratterizzano per l'incapacità di esprimere l'antigene nucleocapsidico "e" che rappresenta, assieme all'antigene del core, il naturale bersaglio della risposta cellulomediata dell'ospite, mantenendo comunque conservate le più importanti funzioni biologiche del virus quali la capacità di riprodursi e il potenziale patogenico. La mutazione osservata con maggiore frequenza nella regione pre-C è rappresentata dalla sostituzione, in corrispondenza del nucleotide 1896, di un'adenosina al posto di una guanosina (G>A), con conseguente conversione di un codone 28, che nel ceppo selvaggio codifica per il triptofano, in un codone di stop che impedisce la trascrizione provocando così l'arresto della sintesi della proteina virale.[41,42,43] In altre parole, in presenza di questo tipo di mutazione, la sintesi della proteina nucleocapsidica avviene come di norma, ma l'antigene "e" non viene sintetizzato per la presenza di una mutazione tra i due codon di inizio. L'antigene "e" è un importante bersaglio della risposta immune sia cellulomediata sia umorale, pertanto la sua perdita può consentire al virus di sfuggire al sistema immune dell'ospite. In termini clinici la sieroconversione dell'antigene "e" con comparsa del relativo anticorpo è classicamente ritenuto un segno di marcata riduzione dell'attiva replicazione. Alcuni pazienti e portatori cronici del virus tuttavia, sviluppano l'anti-HBe, ma continuano a presentare replicazione del virus ad alto titolo. Questi pazienti sono appunto portatori della mutazione pre-core che è diventata prevalente nei paesi del bacino del Mediterraneo. Subito dopo la sua prima descrizione, si riteneva che tale mutazione determinasse una rapida progressione dell'infezione verso forme fulminanti o croniche ad elevata attività. Osservazioni successive non hanno confermato questo dato anche perché sono stati descritti portatori asintomatici di tale mutazione.[44]
- Molto importanti sul piano clinico sono le mutazioni del gene C propriamente detto che tendono a raggrupparsi in porzioni ristrette del genoma virale (tra le sequenze 48-60 e 84-101) codificanti per epitopi strutturali riconosciuti dai linfociti T, sia helper sia citotossici. Tali mutazioni correlano solitamente con la severità della malattia epatica, verosimilmente

tramite un migliore riconoscimento degli epatociti infettanti da parte dei linfociti T citotossici e talora possono essere responsabili del riscontro di insoliti pattern sierovirologici, quali presenza di HBsAg e assenza di anti-HBc nello stesso campione o addirittura presenza di HBsAg e di HBeAg e assenza di anti-HBc. [45,46]

- Mutazioni nel motivo conservato YMDD del sito catalitico della trascrittasi inversa codificata dal gene P alterano la sintesi del DNA virale e sono state correlate alla resistenza alla lamivudina, un farmaco antivirale utilizzato per la terapia delle epatopatie HBV-relate. Sempre a carico del gene P altre mutazioni puntiformi sembrano interferire con la sintesi delle catene di DNA.
- Rare e ancora senza particolare significato sono le mutazioni a carico del gene X in corrispondenza del quale sono state descritte sequenze integrate troncate, associate a delezioni, fusioni con il gene C e sviluppo di carcinoma epatocellulare.[37]

## SCOPO DEL LAVORO

La small protein, meglio conosciuta come HBsAg, contiene il sito maggiormente immunodominante del virus dell'HBV. Questo sito denominato determinante "a" è comune a tutti i sierotipi e genotipi del virus insieme con gli epitopi sierotipici che determinano i maggiori sottotipi dell'HBV: *dw*, *yw*, *dr* e *yr*. [48]

Il determinante "a" è localizzato in un'ampia area antigenica all'interno della regione idrofila maggiore (MHR). La sua struttura terziaria è cruciale per il riconoscimento da parte del sistema immunitario. Mutazioni in quest'area inducono una minore affinità di legame con gli anticorpi HBsAg-specifici. Inoltre i mutanti possono sfuggire all'identificazione da parte di analisi diagnostiche basate sul legame antigene-anticorpo. [30,49]

Anticorpi monoclonali contro HBsAg sono largamente utilizzati in test diagnostici immunologici, tuttavia questi test non sono in grado di evidenziare tutti i casi di infezione con varianti virali che portano mutazioni nella regione MHR. L'aumento del numero di mutanti deriva proprio dalla necessità del virus di eludere il sistema immunitario. Questi mutanti hanno vantaggi selettivi per la propagazione e la trasmissione verticale e orizzontale in individui vaccinati. [50]

Obiettivo di questo lavoro è stata la produzione di forme ricombinanti dei principali mutanti di HBsAg (HBV) per allestire kit diagnostici in grado di riconoscere le diverse varianti del virus. I kit così allestiti potranno poi essere utilizzati per valutare l'infezione da Epatite B in diverse popolazioni di soggetti epatopatici apparentemente HBsAg negativi.

Nel dettaglio il programma di ricerca prevede i seguenti punti:

- Espressione in cellule di mammifero dell'antigene HBsAg wild-type e di 10 mutanti identificati tra quelli già descritti in letteratura.
- Determinazione del livello di espressione, mediante test ELISA, sia dell'antigene ricombinante wild-type che dei 10 mutanti.
- Raccolta di 30 ml di surnatante delle trasfezioni dell'antigene wild-type e dei mutanti con livello di espressione di almeno  $1\mu\text{g/ml} \pm 20\%$ .
- Trattamento delle cellule di mammifero trasfettate con selezione (G418) nel tentativo di ottenere cloni stabili esprimenti l'antigene wild-type e tutti i 10 mutanti.

Il lavoro è stato svolto presso il Dipartimento di Scienze Mediche Laboratorio di Immunologia in collaborazione con la DiaSorin S.p.A.

## MATERIALI E METODI

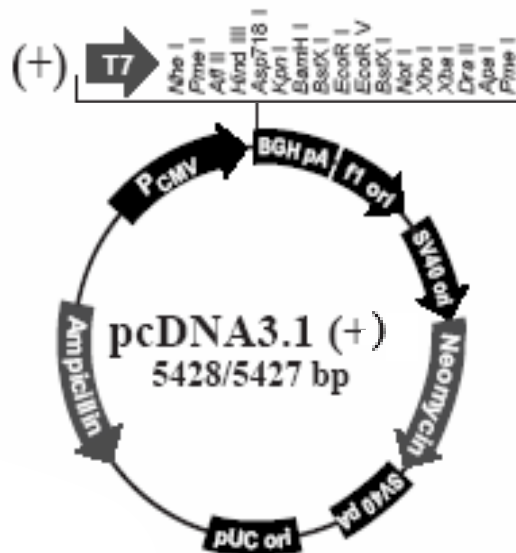
### Antigeni mutanti HbsAg e wild-type

- HbsAg ayw3 (wild-type)
- HbsAg D144A (404)
- HbsAg G145R (393)
- HbsAg P142L-G145R (421)
- HbsAg P142S-G145R (422)
- HbsAg T123N (011)
- HbsAg T123N-T124S (012)
- HbsAg P142L-F/Y143H-D144E-G145R (013)
- HbsAg I110R-S117I-G119R-T123N (014)
- HbsAg 122+DT (015)
- HbsAg 122+DT-G145R (016)

### Linee cellulari

HeLa, sono cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate derivanti da un cancro della cervice uterina. Crescono in adesione in terreno DMEM 10% FBS.

### Vettori plasmidici



## DIGESTIONE ENZIMATICA e LIGASI

Gli antigeni wild-type e i 10 mutanti forniti dalla DiaSorin in pCR2.1 e pGA4 e pcDNA3.1 sono stati digeriti per 2 ore 37°C con i seguenti enzimi di restrizione:

- ✓ XbaI
- ✓ HindIII
- ✓ XhoI
- ✓ BamHI

I frammenti di DNA ottenuti sono stati separati tramite elettroforesi su gel di agarosio (2%), purificati mediante QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) e successivamente legati mediante azione della T4 DNA ligasi (1-2 U; Invitrogen). La reazione di ligasi è stata condotta a 22° C per 2 ore.

## TRASFORMAZIONE BATTERICA

Come recipiente dei plasmidi originati, è stato utilizzato il ceppo batterico *Escherichia coli*, specie JM109 (Promega) A 100 µl di batteri competenti sono stati aggiunti 10 µl del prodotto di ligazione e incubati 10' in ghiaccio. Successivamente è stato indotto uno shock termico (42°C per 45''), per permettere l'ingresso del vettore nella cellula batterica. Le cellule sono state successivamente incubate 2' in ghiaccio e 60' in 900 µl di LB broth a 37°C. Infine sono stati piastrati su piastre Petri contenenti terreno selettivo (LB-agar-ampicillina 50 µg/ml) e lasciati crescere 12-18 ore a 37°C.

Le colonie cresciute sono state scrinate mediante PCR.

## PCR

Per amplificare i frammenti di DNA corrispondenti agli antigeni HbsAg mutanti e wild-type clonati in pcDNA3.1 sono stati utilizzati 2 primers specifici per il plasmide:

- For -TGGGAGGTCTATATAAGCAGA-
- Rev -GCAACTAGAAGGCACAGTCGA-

in una miscela di reazione composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 µM di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA polimerasi (5U/µl) (Invitrogen) e 2mM di MgCl<sub>2</sub>.

Le condizioni di amplificazione utilizzate sono le seguenti:

94° 5'	} 35 cicli
94° 30''	
TD 60-50° 30''	
72 1'	
72 10'	

I prodotti di amplificazione sono stati controllati su gel di agarosio (1%)

## **TRASFEZIONE**

L'estrazione del DNA plasmidico è stata effettuata tramite QIAGEN Plasmid Midi (QIAGEN).

Il giorno prima della trasfezione le cellule HeLa sono state piastrate in capsule Petri, in terreno DMEM + 10% FBS, alla concentrazione di  $4 \times 10^6$ . Sono poi state trasfettate con metodo calcio/fosfato: (per ognuno dei 10 antigeni mutanti e il wild-type) 15  $\mu\text{g}$  di DNA sono stati miscelati a 50  $\mu\text{l}$  di  $\text{CaCl}_2$  (0,2M) e portati al volume di 500  $\mu\text{l}$  con acqua milli Q. Alla soluzione di calcio e DNA sono stati poi aggiunti goccia a goccia su vortex, 500  $\mu\text{l}$  di tampone HBS (NaCl 280mM, Hepes 50mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,5mM). La miscela di trasfezione (1ml finale) è stata aggiunta al terreno di coltura.

I surnatanti sono stati analizzati dopo 24-48-72 ore dalla trasfezione, per valutare quale fosse il tempo di incubazione che fornisse la migliore resa. Le 48 ore sono state scelte come tempo di incubazione ottimale.

## **PROVA DI TOSSICITA' e SAGGIO MTT**

Cellule HeLa sono state piastrate in piastra multi well da 48 pozzetti alla concentrazione di  $5 \times 10^4$  in 200  $\mu\text{l}$  di terreno DMEM 10%FBS. Il giorno successivo è stato cambiato il terreno a cui sono state aggiunte dosi crescenti di G418 (da 0,4 a 2,4 mg/ml). Le cellule sono poi state incubate per 24-48-72 ore.

Al termine dell'incubazione è stato aspirato il terreno e ad ogni pozzetto è stato aggiunto 0,5 mg/ml di MTT. Dopo un'incubazione di 1h e 30min è stato aspirato il surnatante e ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 200  $\mu\text{l}$  di DMSO. Sono state infine lette le assorbanze dei campioni a 450 nm, dopo aver miscelato per 5'.

La concentrazione di G418 necessaria per avere il 50% di mortalità a 48 ore di incubazione è stata fissata a 1,2mg/ml. Tale concentrazione è stata poi utilizzata per ottenere cloni trasfettati stabilmente con HBsAg.

## **SAGGIO ELISA**

ETI-MAK-4 (DiaSorin)

Per valutare la positività all'HBsAg dei surnatanti ottenuti dopo la trasfezione, i campioni sono stati analizzati tramite un kit ELISA prodotto e fornito direttamente dalla ditta DiaSorin.

Il metodo per la determinazione qualitativa di HBsAg, di tipo immunoenzimatico si configura come un dosaggio *sandwich* diretto. La presenza di HBsAg media il legame del tracciante alla fase solida:

l'attività enzimatica risulta pertanto proporzionale alla concentrazione di HBsAg presente nei campioni.

- **Pozzetto** sensibilizzato con anticorpi **anti-HBs** (monoclonali di topo)
- **Tracciante enzimatico:** anticorpo anti-HBs (pecora) coniugato con perossidasi di rafano (HRP)

La misura dell'attività enzimatica viene eseguita ponendo a contatto una soluzione incolore di cromogeno/substrato che, in seguito all'azione dell'enzima, produce una colorazione misurabile mediante fotometro.

Il protocollo seguito è quello consigliato dal kit.

Per dosare il contenuto in HBsAg dei vari surnatanti raccolti risultati positivi al primo screening, le assorbanze dei campioni sono state confrontate con quelle ottenute analizzando mediante lo stesso kit, una curva di sieri HBsAg positivi a concentrazione nota:

- ✓ 5,36ng/ml
- ✓ 1,89ng/ml
- ✓ 0,68ng/ml
- ✓ 0,21ng/ml

Per restare nel range di sensibilità del kit, i campioni sono stati diluiti 1:100, 1:500, 1:1000 e le assorbanze lette a 450nm.

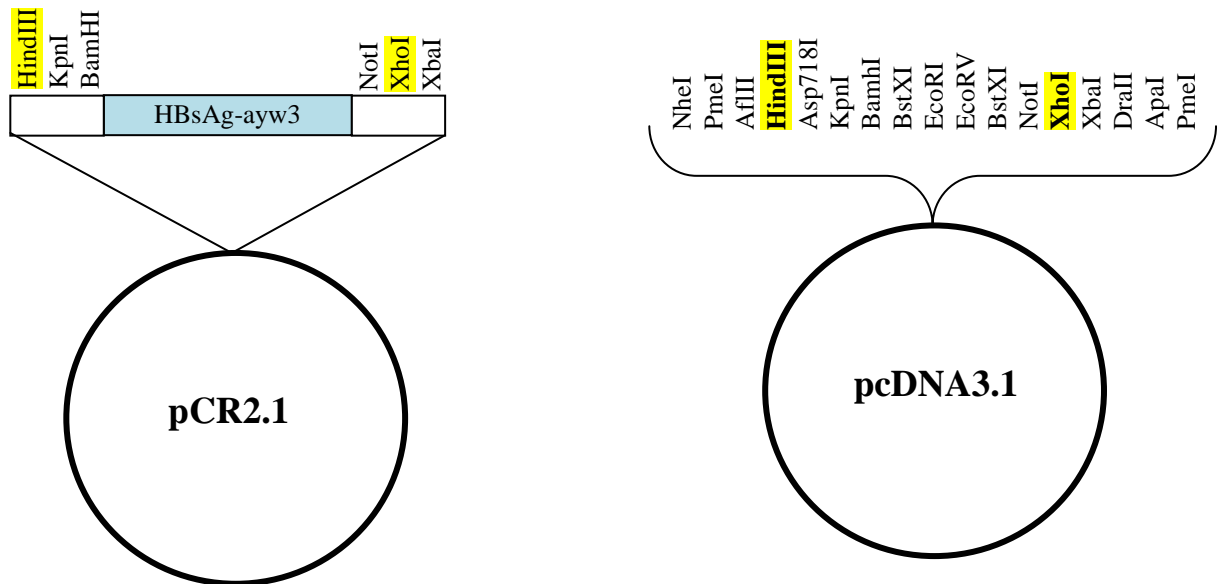
## RISULTATI

### Clonaggio di HBsAg-ayw3 (wild-type) in pcDNA3.1

L'HBsAg-ayw3 è stato fornito direttamente dalla ditta DiaSorin clonato in pCR2.1.

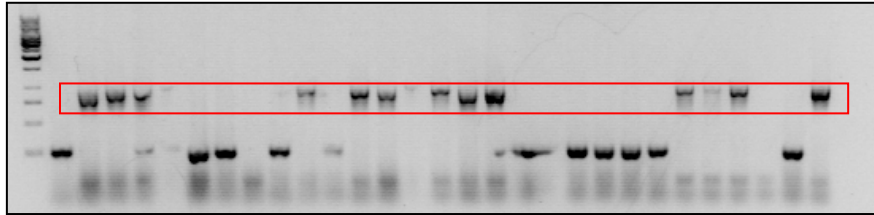
Al fine di esprimere la proteina in un modello eucariotico è stato necessario clonarla in un vettore di espressione capace di far esprimere proteine ricombinanti in cellule eucariotiche. Nel nostro caso è stato scelto pcDNA3.1.

Per sub clonare l'HBsAg-ayw3 in pcDNA3.1 sono stati scelti come enzimi di restrizione HindIII e XhoI.

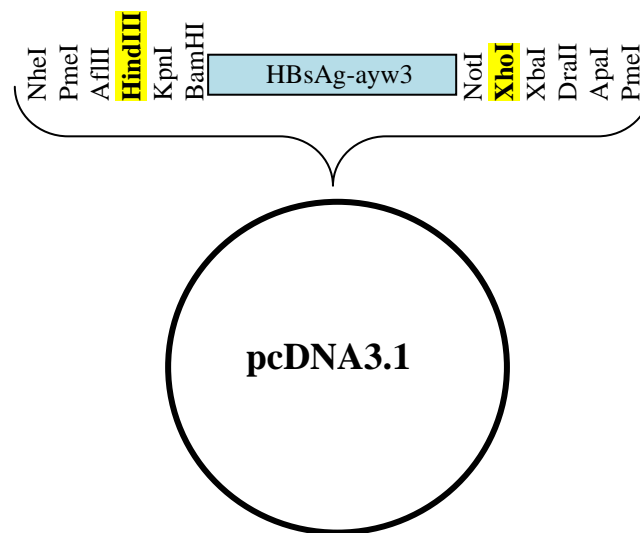


I campioni (HBsAg-ayw3 e pcDNA3.1) sono stati digeriti per 2 ore a 37°C con gli enzimi di restrizione: HindIII e XhoI. La digestione è stata caricata su gel e le bande corrispondenti al vettore plasmidico e all'inserto HBsAg-ayw3 sono state purificate con il kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Successivamente il DNA dell'inserto (HBsAg-ayw3) è stato ligato nel vettore di espressione pcDNA3.1 per opera della T4 Ligasi (Invitrogen). 10µl della reazione di ligazione sono stati quindi utilizzati per trasformare batteri competenti poi piastrati su piastre con LB agar Amp<sup>+</sup> e fatti crescere a 37° per circa 16 ore. Le colonie cresciute sono state scrinate tramite PCR utilizzando primers specifici per pcDNA3.1.





Una delle colonie positive alla PCR è stata messa a crescere in 100ml di LB broth Amp+ a 37° per 16 ore circa e il DNA plasmidico è stato estratto tramite MIDI-PREP kit (Qiagen) e quantificato allo spettrofotometro.

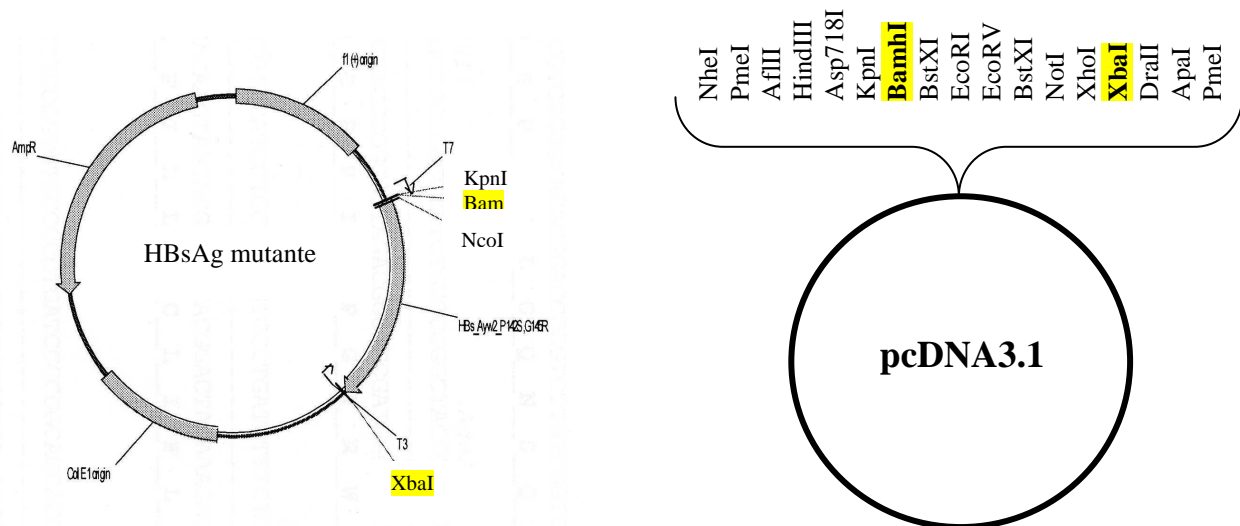


## Clonaggio dei 10 antigeni HbsAg mutanti in pcDNA3.1

I 10 mutanti HBsAg :

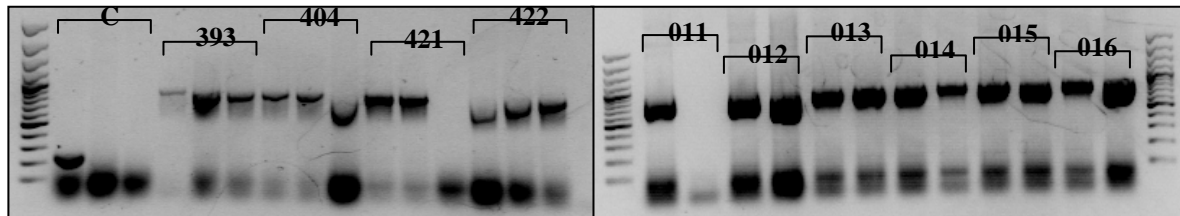
- HbsAg D144A (404)
- HbsAg G145R (393)
- HbsAg P142L-G145R (421)
- HbsAg P142S-G145R (422)
- HbsAg T123N (011)
- HbsAg T123N-T124S (012)
- HbsAg P142L-F/Y143H-D144E-G145R (013)
- HbsAg I110R-S117I-G119R-T123N (014)
- HbsAg 122+DT (015)
- HbsAg 122+DT-G145R (016)

sono stati forniti dalla ditta DiaSorin clonati in pGA4.

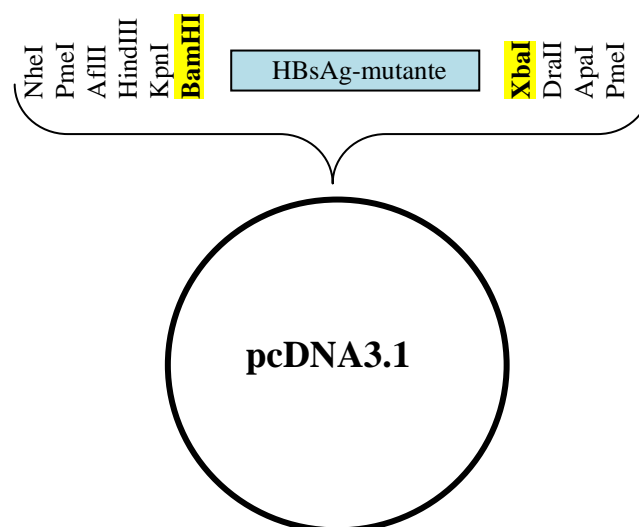


Per sub clonare i mutanti HBsAg in pcDNA3.1 sono stati scelti come enzimi di restrizione BamHI e XbaI. I campioni (HBsAg-mutanti e pcDNA3.1) sono stati digeriti per 2 ore a 37°C in presenza di BamHI e XbaI. La digestione è stata caricata su gel e le bande corrispondenti al vettore plasmidico e all'inserto, una per ogni mutante, sono state purificate con il kit QIAquick Gel Extraction (Qiagen). Successivamente il DNA degli inserti è stato ligato nel vettore di espressione pcDNA3.1 in 10 diverse reazioni, per opera della T4 Ligasi (Invitrogen).

10µl di ogni reazione di ligazione sono stati quindi utilizzati per trasformare batteri competenti poi piastrati su piastre con LB agar Amp<sup>+</sup> e fatti crescere a 37° per circa 16 ore. Le colonie cresciute sono state scrinate tramite PCR utilizzando primers specifici per pcDNA3.1.



Per ognuno dei 10 mutanti è stata scelta una colonia positiva alla PCR che è stata messa a crescere in 100ml di LB broth Amp<sup>+</sup> a 37° per 16 ore circa e il DNA plasmidico è stato estratto tramite MIDI-PREP kit (Qiagen) e quantificato allo spettrofotometro.

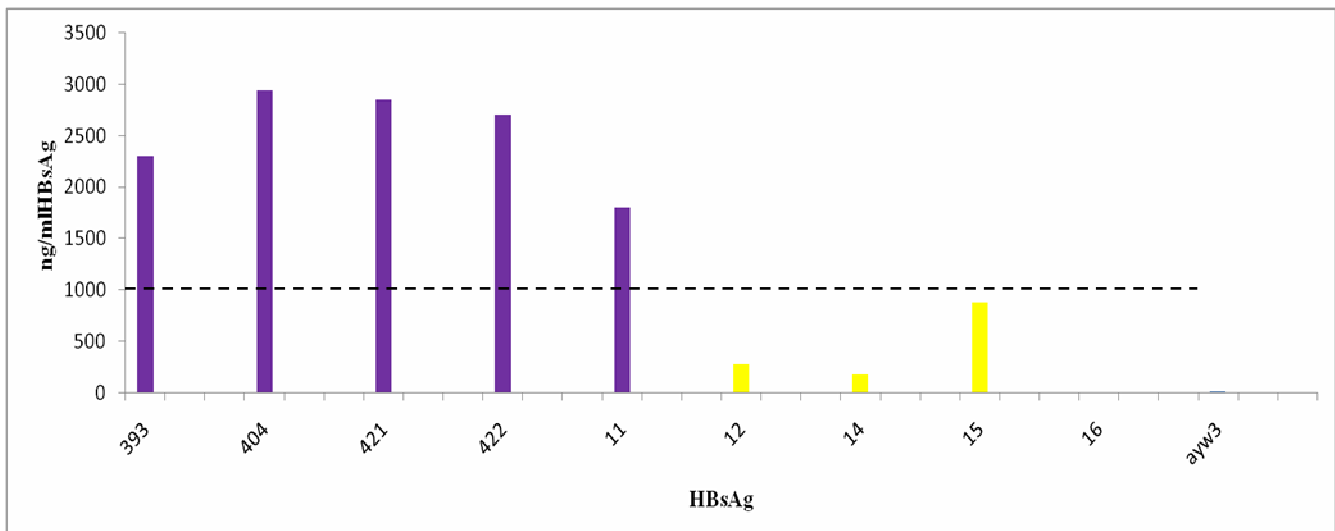


## Espressione degli antigeni ricombinanti in cellule eucariotiche e determinazione del livello di espressione mediante test ELISA

Dopo aver messo a punto la metodica ottimale di trasfezione le cellule (HeLa) sono state piastrate  $4 \times 10^6$  e il giorno seguente trasfettate con  $15 \mu\text{g}$  di DNA.

La raccolta dei surnatanti è stata effettuata a 48 ore dalla trasfezione.

I livelli di espressione della proteina ricombinante sono stati valutati per mezzo di un kit ELISA fornito dalla ditta DiaSorin e confrontati con una curva di taratura costituita da sieri HBV positivi a concentrazione HBsAg nota.



I primi 5 mutanti trasfettati hanno mostrato un livello di espressione (in viola) che risponde pienamente alle esigenze del programma di ricerca ( $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ). I 30 ml di surnatante per ogni mutante dosato sono conservati a  $-20^\circ\text{C}$ , in attesa di essere consegnati alla DiaSorin.

Per gli altri 5 HBsAg testati invece non è stato ottenuto un livello soddisfacente di espressione.

La causa di questo risultato può essere imputato a cause differenti: problemi durante la trasfezione; difficoltà dello stesso kit ELISA nell'identificare i mutanti.

**Trattamento delle cellule di mammifero trasfettate con selezione (G418) nel tentativo di ottenere cloni stabili esprimenti tutti gli antigeni.**

Cellule HeLa trasfettate con:

- HbsAg ayw3 (wild-type)
- HbsAg D144A (404)
- HbsAg G145R (393)
- HbsAg P142L-G145R (421)
- HbsAg P142S-G145R (422)

sono state messe in selezione con G418 (1,2 mg/ml) per ottenere cloni trasfettati stabilmente. Dopo circa una settimana di incubazione nella piastra sono rimasti visibili foci costituiti da cloni di cellule trasfettate stabilmente. I cloni sono stati prelevati e posti in piastra da 96 pozzetti per essere espansi, sempre in terreno selettivo. Solo per uno dei mutanti: HbsAg P142S-G145R (422) si è ottenuto un clone trasfettato stabilmente che continua per altro a produrre nel surnatante la proteina ricombinante.

## BIBLIOGRAFIA

1. Lee W. "Hepatitis B virus infection" *N. Engl. J. Med.* 1997;337:1733-1745
2. Dehesa-Violante M., Nunez-Nateras R. "Epidemiology of Hepatitis virus B and C" *Arch. Med. Res.* 38 (2007) 606-611
3. Goudeau A. "Epidemiology and eradication strategy for hepatitis B in Europe. The european regional study group" *Veccine* 1990;8:S113-6
4. Stroffolini T., Pasquini P., Mele A. "HBsAg carriers among pregnant women in Italy: results from the screening during a vaccination campaign against hepatitis B" *Public Health* 1988;102:329-33
5. De Bac C., Stroffolini T., Gaeta G.B., Taliani G., Giusti G. "pathogenic factors in cirrhosis with and without hepatocellular carcinoma: a multicenter italian study" *Hepatology* 1994;20:1225-30
6. Zuckerman AJ, Zuckerman JN "Molecular epidemiology of hepatitis B virus mutants" *J Med Virol.* 1999;58(3):193-5
7. Makidon PE, Bielinska AU, Nigavekar SS, Janczak KW, Knowlton J, Scott AJ, Mank N, Cao Z, Rathinavelu S, Beer MR, Wilkinson JE, Blanco LP, Landers JJ, Baker JR Jr. "Pre-clinical evaluation of a novel nanoemulsion-based hepatitis B mucosal vaccine" *PLoS ONE* 2000;3(8):e2954
8. Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. "Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination" *Epidemiol Rev.* 2006;28:112-25.
9. Koff RS. Review article "vaccination and viral hepatitis - current status and future prospects" *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26(10):1285-92
10. European Consensus Group on hepatitis B immunity. Are booster immunizations needed for lifelong hepatitis B immunity *Lancet* 2000;355:561-565
11. Zuckerman JN, Zuckerman AJ "Current topics in hepatitis B" *J Infect.* 2000 ;41(2):130-6
12. Ramakrishna B, Mukhopadhyaya A, Kurian G. "Correlation of hepatocyte expression of hepatitis B viral antigens with histological activity and viral titer in chronic hepatitis B virus infection. An immunohistochemical study" *J Gastroenterol Hepatol* 2008
13. Fattovich G, Bortolotti F, Donato F. "Natural history of chronic hepatitis B: special emphasis on disease progression and prognostic factors" *J Hepatol.* 2008;48(2):335-52.
14. Zhu R, Zhang HP, Yu H, Li H, Ling YQ, Hu XQ, Zhu HG. "Hepatitis B virus mutations associated with in situ expression of hepatitis B core antigen, viral load and prognosis in chronic hepatitis B patients" *Pathol Res Pract.* 2008

15. Lok AS, Chung HT, Liu VW, Ma OC. "Long-term follow-up of chronic hepatitis B patients treated with interferon alfa" *Gastroenterology* 1993 ;105(6):1833-8
16. Lee WM "Hepatitis B virus infection" *N Engl J Med*. 1997;337(24):1733-45
17. Yokosuka O, Arai M "Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B" *Med Mol Morphol* 2006;39(3):113-20
18. Lee WM "Hepatitis B virus infection" *N Engl J Med* 1997;337(24):1733-45
19. Miller RH, Kaneko S, Chung CT, Girones R, Purcell RH "Compact organization of the hepatitis B virus genome" *Hepatology* 1989;9(2):322-7
20. Wright TL, Lau JY "Clinical aspects of hepatitis B virus infection" *Lancet* 1993;342(8883):1340-4
21. Eckhardt SG, Milich DR, McLachlan A "Hepatitis B virus core antigen has two nuclear localization sequences in the arginine-rich carboxyl terminus" *J Virol* 1991;65(2):575-82
22. Thomas HC "The emergence of envelope and precore/core variants of hepatitis B virus: the potential role of antibody selection" *J Hepatol* 1995;22(1 Suppl):1-8
23. Chang LJ, Hirsch RC, Ganem D, Varmus HE "Effects of insertional and point mutations on the functions of the duck hepatitis B virus polymerase" *J Virol* 1990;64(11):5553-8
24. Hirsch RC, Lavine JE, Chang LJ, Varmus HE, Ganem D "Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription" *Nature* 1990;344(6266):552-5
25. Balsano C, Avantaggiati ML, Natoli G, De Marzio E, Will H, Perricaudet M, Levrero M "Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmyc protooncogene at the transcriptional level" *Biochem Biophys Res Commun* 1991;176(3):985-92
26. Avantaggiati ML, Natoli G, Balsano C, Chirillo P, Artini M, De Marzio E, Collepardo D, Levrero M "The hepatitis B virus (HBV) pX transactivates the c-fos promoter through multiple cis-acting elements" *Oncogene* 1993;8(6):1567-74
27. Summers J, Mason WS "Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate" *Cell* 1982;29(2):403-15
28. Kann M, Bischof A, Gerlich WH "In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome" *J Virol* 1997;71(2):1310-6
29. Mason WS, Aldrich C, Summers J, Taylor JM "Asymmetric replication of duck hepatitis B virus DNA in liver cells: Free minus-strand DNA" *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(13):3997-4001

30. Weber B "Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact" *J Clin Virol* 2005;32(2):102-12
31. Carman WF "The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus" *J Viral Hepat* 1997;4 Suppl 1:11-20
32. Gerken G, Kremsdorf D, Capel F, Petit MA, Dauguet C, Manns MP, Meyer zum Büschenfelde KH, Brechot C "Hepatitis B defective virus with rearrangements in the preS gene during chronic HBV infection" *Virology* 1991;183(2):555-65
33. Kekulé AS, Lauer U, Meyer M, Caselmann WH, Hofschneider PH, Koshy R "The preS2/S region of integrated hepatitis B virus DNA encodes a transcriptional transactivator" *Nature* 1990;343(6257):457-61
34. Lee HS, Ulrich PP, Vyas GN "Mutations in the S-gene affecting the immunologic determinants of the envelope protein of hepatitis B virus" *J Hepatol* 1991;13 Suppl 4:S97-101
35. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC "Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus" *Lancet* 1990;336(8711):325-9
36. Moriyama K, Nakajima E, Hohjoh H, Asayama R, Okochi K "Immunoselected hepatitis B virus mutant" *Lancet* 1991;337(8733):125
37. Okamoto H, Yano K, Nozaki Y, Matsui A, Miyazaki H, Yamamoto K, Tsuda F, Machida A, Mishiro S "Mutations within the S gene of hepatitis B virus transmitted from mothers to babies immunized with hepatitis B immune globulin and vaccine" *Pediatr Res* 1992;32(3):264-8
38. McMahon G, Ehrlich PH, Moustafa ZA, McCarthy LA, Dottavio D, Tolpin MD, Nadler PI, Ostberg L "Genetic alterations in the gene encoding the major HBsAg: DNA and immunological analysis of recurrent HBsAg derived from monoclonal antibody-treated liver transplant patients" *Hepatology* 1992;15(5):757-66
39. Hawkins AE, Gilson RJ, Gilbert N, Wreghitt TG, Gray JJ, Ahlers-de Boer I, Tedder RS, Alexander GJ "Hepatitis B virus surface mutations associated with infection after liver transplantation" *J Hepatol* 1996;24(1):8-14
40. Ly TD, Servant-Delmas A, Bagot S, Gonzalo S, Férey MP, Ebel A, Dussaix E, Laperche S, Roque-Afonso AM "Sensitivities of four new commercial hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) assays in detection of HBsAg mutant forms" *J Clin Microbiol* 2006;44(7):2321-6



41. Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC "Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection" *Lancet* 1989;2(8663):588-91
42. Thomas HC, Carman WF "The host immune response may be responsible for selection of envelope and precore/core variants of HBV" *J Hepatol* 1991;13 Suppl 4:S108-13
43. Bonino F, Brunetto MR, Rizzetto M, Will H "Hepatitis B virus unable to secrete e antigen" *Gastroenterology* 1991;100(4):1138-41
44. Nakahori S, Yokosuka O, Ehata T, Chuang WL, Imazeki F, Ito Y, Ohto M "Detection of hepatitis B virus precore stop codon mutants by selective amplification method: frequent detection of precore mutants in hepatitis B e antigen positive healthy carriers" *J Gastroenterol Hepatol.* 1995 Jul-Aug;10(4):419-25
45. Ehata T, Omata M, Yokosuka O, Hosoda K, Ohto M "Variations in codons 84-101 in the core nucleotide sequence correlate with hepatocellular injury in chronic hepatitis B virus infection" *J Clin Invest* 1992;89(1):332-8
46. Chuang WL, Omata M, Ehata T, Yokosuka O, Ito Y, Imazeki F, Lu SN, Chang WY, Ohto M "Precore mutations and core clustering mutations in chronic hepatitis B virus infection" *Gastroenterology* 1993;104(1):263-71
47. Kwon SY, Choe WH, Lee CH, Yeon JE, Byun KS "Rapid re-emergence of YMDD mutation of hepatitis B virus with hepatic decompensation after lamivudine retreatment" *World J Gastroenterol* 2008;14(27):4416-9
48. Norder H, Couroucé AM, Magnius LO "Molecular basis of hepatitis B virus serotype variations within the four major subtypes" *J Gen Virol* 1992;73 ( Pt 12):3141-5
49. Zuckerman JN, Zuckerman AJ "Mutations of the surface protein of hepatitis B virus" *Antiviral Res* 2003;60(2):75-8
50. Thakur V, Kazim SN, Guptan RC, Hasnain SE, Bartholomeusz A, Malhotra V, Sarin SK "Transmission of G145R mutant of HBV to an unrelated contact" *J Med Virol* 2005;76(1):40-6

**CORSI FREQUENTATI I anno:**

**Corso di Inglese.** Docente: Prof. Irving Bell.

***SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE***

**Anno Accademico 2007/08**

Human Papilloma Viruses loads and its association with non melanoma skin cancer

Dott. S. Weissenbrau

19-12-2007

Biologia molecolare e genetica in ambito forense, principali applicazioni e sviluppo delle nuove tecniche

Dott. G. Portera

14/1/2008

K<sup>+</sup> channels in the heart: in and out of control

Dr. R. Radicke

21-1-2008

Integrin trafficking and tumor cells invasiveness

Dott. J. Norman

23/1/2008

La microscopia a forza atomica nella ricerca biomedica: dalle immagini alle interazioni

Prof. M. Ruspanti

24-1- 2008

Metodi e applicazioni delle nuove tecnologie di sequenziamento ultramassivo

Dott. G. De Bellis

6/2/2008

La proteina HMGB1 e un segnale di danno tissutale

Prof. ME. Bianchi

7/2/2008

New treatment strategies for multiple mieloma

Prof. A. Palumbo

21/2/2008

Caratterizzazione molecolare della leukemia linfatica cronica

Prof. V. Gattei

28/2/2008

Analytic vaccinology and human citomegalovirus human monoclonal antibodies as tool to identify novel antigens for protective vaccination

Dott. A. Maccagno

5/3/2008

Applications of gene expression profile to cancer research  
Prof. E. Medico  
6/3/2008

Fatty liver preservation against ischemia reperfusion injury  
Dott. JR. Catafau  
7/3/2008

Il sistema Ghrelin aspetti endocrini e metabolici  
Prof. F. Broglio e Prof. C. Gauna  
13/3/2008

To repress gene expression just take out vinegar role of the class 2 histone deacetylase HDAC4  
Prof. C. Brancolini  
13/3/2008

Immunologia della psoriasi  
Prof. G. Girolomoni  
20/3/2008

Mutazioni del gene dell'insulina come causa di diabete neonatale/infantile un nuovo esempio da malattia da misfolding  
Prof. F. Barbetti  
3/4/2008

Modificazioni del metabolismo del ferro nella risposta infiammatoria  
Prof. G. Cairo  
9/4/2008

Interazione tra tumori e sistema immunitario nella leucemia linfatica cronica il ruolo della via metabolica del mevalonato  
Prof. M. Massaia  
14/4/2008

The herpesvirus DNA polymerases a model for new antiviral drug discovery  
Prof. G. Palu  
16/4/2008

Epidemiologia dell'infezione HPV e del cancro della cervice uterina un modello dinamico  
Dr. J. Baussano  
17/4/2008

Ghrelin e pancreas endocrine  
Prof. R. Granata  
24/4/2008

The mechanisms of cell infection with hepatitis C virus- novel potential targets for therapeutic interventions  
Prof. A. Budkowska  
15/5/2008

La ricerca farmacologica, dal laboratorio alla clinica  
Dott. D. Valle  
22/5/2008

Sistema degli endocannabinoidi nuovo target terapeutico per l' obesita' e le sue complicanze  
cardio-metaboliche  
Prof. U. Pagotto  
23/5/2008

Copy number variations non solo ritardo mentale  
Prof. O. Zuffardi  
26/5/2008

Cap Analyses Gene Expression Analyses of trascrptional complexity and regulation  
Dr. P. Carninci  
5/6/2008

Mechanical ventilation and multiple organ failure  
Dr. Fraus B Plotz  
12/6/2008

Problem solving in epatologia epatica  
Prof. G. Faa  
13/6/2008

Tecniche FISH nello studio di linfomi non-Hodgkin  
Drssa. MG. Tibiletti  
26/6/2008

From mekacaryocytes to platelets regulation, microenvironment and patholssa. ogy  
Drssa. A. Balduini  
30/6/2008

Recenti aspetti in tema di malattie uromodulina associate  
Prof. F. Scolari  
3/7/2008

Recombinant protein expression  
1/7/2008

Recombinant antibodies and other affinity reagents  
2/7/2008

Display technologies phage,yeast,bacteria and ribosoma  
16/7/2008

Fluorescent protein  
18/7/2008

Prof. A. Bradbury

## CONGRESSI FREQUENTATI I ANNO:

1. **Riunione SIB-LLP 2008** Milano presso il LITA-Segrate 30 maggio 2008
2. **VI SIICA NATIONAL CONFERENCE**, Università La Sapienza, ROMA, 11-14 giugno 2008

## COMUNICAZIONI A CONGRESSI I ANNO :

- **Riunione SIB-LLP 2008** Milano presso il LITA-Segrate 30 maggio 2008  
“DEHYDROEPIANDROSTERONE SULFATE INHIBITS PLATELETS AGGREGATION”  
Sarasso C., Rastoldo A., Baldassarri S., Zanfa M., Bertoni A., Sinigaglia F. (Presentazione orale)
- **CNBX - Perugia, 17-19 settembre 2008** “INHIBITION OF PLATELET AGGREGATION BY THE PHYTOESTROGEN 8-PRENYLNARINGENIN”  
M. Zanfa, S. Baldassarri, C. Sarasso, A. Bagarotti, A. Rastoldo, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia
- **53° National meeting of italian society of biochemistry and molecular biology** - Riccione, 23-26 settembre 2008 "DEHYDROEPIANDROSTERONE INHIBITS PLATELET AGGREGATION WITH A cGMP-DEPENDENT MECHANISM"  
A. Rastoldo, C. Sarasso, S. Baldassarri, M. Zanfa, A. Bagarotti, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia
- **9° Riunione del gruppo di Studio Piastrine** - S.Pellegrino Terme (BG), 12-14 ottobre 2008  
THE ENDOCANNABINOID 2-ARACHIDONOYLGLYCEROL ACTIVATES HUMAN PLATELETS THROUGH NON-CB1/CB2 RECEPTORS  
S. Baldassarri, A. Bertoni, A. Bagarotti, C. Sarasso, M. Zanfa, A. Rastoldo, C. Di Vito, M.V. Catani, L. Avigliano, M. Maccarrone, M. Torti, F. Sinigaglia
- **9° Riunione del gruppo di Studio Piastrine** - S.Pellegrino Terme (BG), 12-14 ottobre 2008  
STUDY OF THE MECHANISMS OF PLATELET INHIBITION INDUCED BY THE PHYTOESTROGEN 8-PN  
M. Zanfa, S. Baldassarri, C. Sarasso, A. Bagarotti, A. Rastoldo, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia

## **PUBBLICAZIONI**

Baldassarri S, Bertoni A, Bagarotti A, **Sarasso C**, Zanfa M, Catani MV, Avigliano L, Maccarrone M, Torti M, Sinigaglia F. “The endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol activates human platelets through non-CB(1)/CB(2) receptors”. In press (Journal of Thrombosis and Haemostasis)