

# **Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”**



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

**Relazione 2° anno**

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

Candidato: Chiara Sarasso

*Responsabile del progetto*: Prof. Annalisa Chiocchetti

# I° PARTE

## 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 socio-sanitarie 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 socio-economiche 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 politrasmessi, 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).

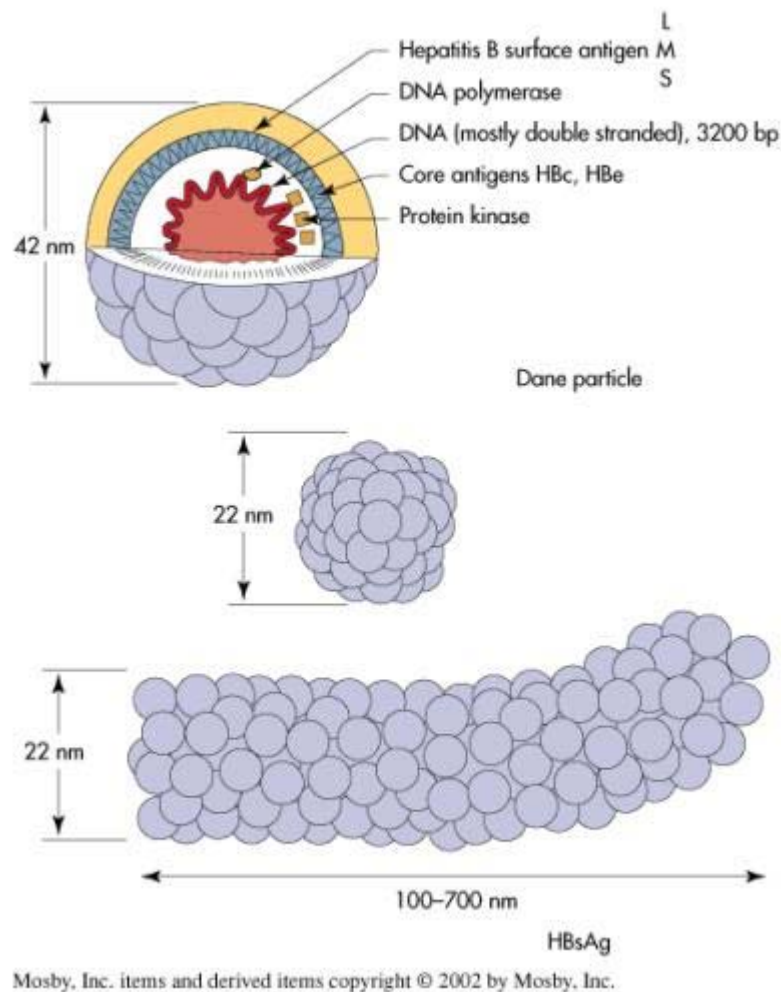
Tutti questi virus hanno una struttura simile, grossolanamente circolare, un genoma a DNA parzialmente bicatenario e una peculiare ed insolita strategia replicativa .[16]

## **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.





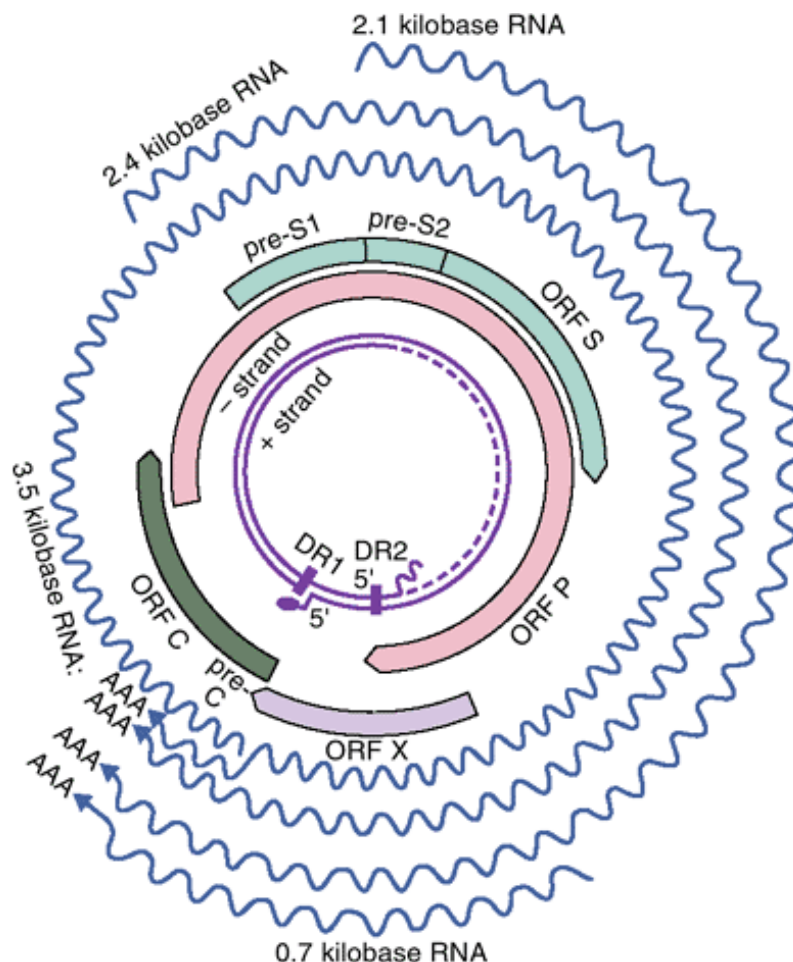
Le "particelle di Dane" altro non sono che i virioni infettanti dell'HBV e la loro presenza nel siero è indicativa di attiva replicazione virale nel fegato. Sono costituite da un involucro esterno lipoproteico (envelope) di 7 nm, contenente tutti gli antigeni di superficie del virus, e da un rivestimento 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 precoci 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.

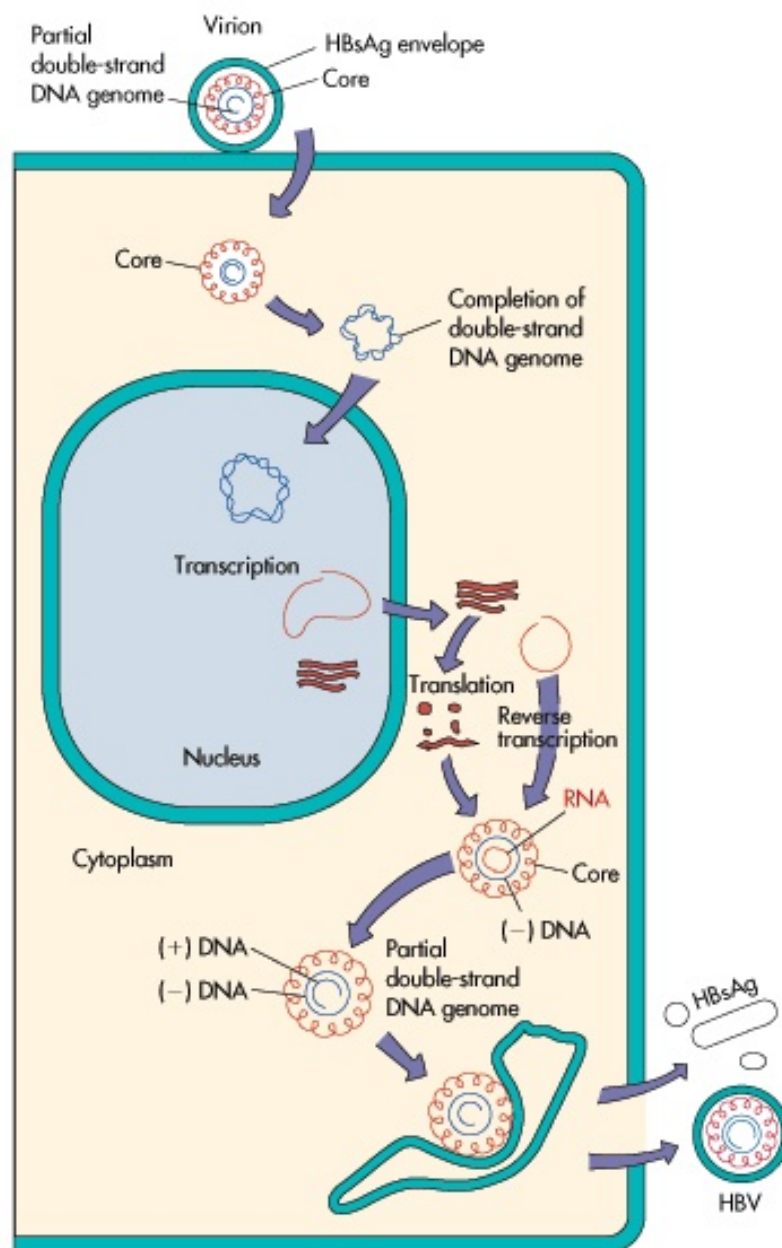
Il cccDNA viene quindi trascritto, ad opera di una RNA-polimerasi DNA-dipendente della cellula dell'ospite, in forme multiple di RNA genomico e subgenomico, tutte a polarità positiva, le quali si distinguono per la differente lunghezza e funzione. Nell'evolversi del ciclo riproduttivo, una parte dell'RNA 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 sierconversione 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 forniti dalla DIASORIN spa

- HbsAg **ayw3** (wild-type) in pCR2.1
  
  - 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**)
- in pGA4

[vedi ALLEGATO 1]

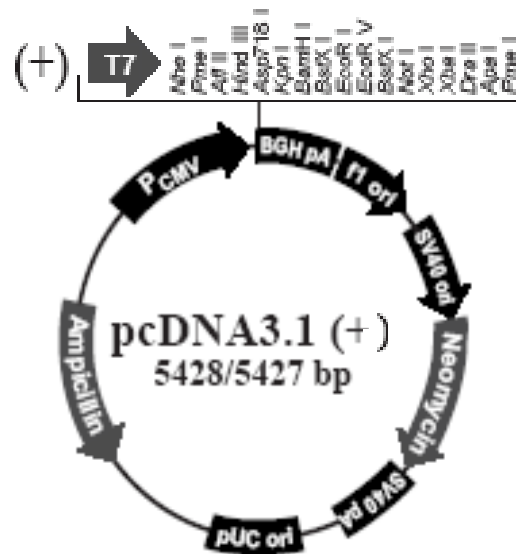
### Linee cellulari eucariotiche

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

**HEK 293 T**, sono cellule embrionali di rene umano che contengono stabilmente integrato nel genoma la sequenza genica codificante l'antigene T del Virus Vacuolante della Scimmia (SV40), necessaria per un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici recanti l'origine di replicazione di SV40.

### Vettori plasmidici di espressione in sistemi eucariotici

[dettagli in ALLEGATO 2]



### **DIGESTIONE ENZIMATICA e LIGASI**

Gli antigeni wild-type, i 10 mutanti forniti dalla DiaSorin in pCR2.1 e pGA4 e il vettore di espressione eucariotico 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 ligati 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 30' con 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.

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

## 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'

94° 30''

TD 60-50° 30''

72 1'

72 10'

} 35 cicli

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

## SEQUENZIAMENTO AUTOMATICO

I prodotti di PCR sono stati purificati dall'eccesso di primers e di nucleotidi non incorporati utilizzando gli enzimi EXO e SAP (ditta USB) tramite un ciclo di incubazione di 20' a 37°C e uno di 20' a 80°C.

Le reazioni di sequenziamento sono quindi state ottenute servendosi del kit specifico ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosistem) seguendo il protocollo consigliato dalla ditta e utilizzando i seguenti cicli di amplificazione:

96°C 5'      1 ciclo  
96°C 20'' }  
50°C 5''    } 25 cicli  
60°C 3'    }

Il prodotto della reazione è stato purificato mediante il kit Montage SEQ96 Sequencing Reaction Cleanup (Montage) e addizionato di formammide, denaturato (3' a 95°C) ed infine caricato su piastra ottica per la successiva analisi al sequenziatore automatico.

### **TRASFEZIONE**

Il giorno prima della trasfezione le cellule HeLa/293T 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) 20 µg di DNA sono stati miscelati a 50 µl di CaCl<sub>2</sub> (0,2M) e portati al volume di 500 µl con acqua milli Q. Alla soluzione di calcio e DNA sono stati poi aggiunti goccia a goccia su vortex, 500 µl di tampone HBS (NaCl 280mM, Hepes 50mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,5mM). La miscela di trasfezione (1ml finale) è stata aggiunta al terreno di coltura. I surnatanti sono stati analizzati dopo 72 ore dalla trasfezione.

### **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 µl di terreno DMEM 10%FBS. Il giorno successivo è stato cambiato il terreno e 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 µl 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 forniti dalla stessa DIASORIN spa:

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

La curva è stata a sua volta determinata confrontando i valori delle assorbanze con quelli ottenuti analizzando un pannello di diluizioni di antigene HBsAg fornito dalla ditta BBI Diagnostics:

- PHA808-11
- PHA808-12
- PHA808-14
- PHA808-16
- PHA808-18
- PHA808-19

## WESTERN BLOT

I surnatanti raccolti dopo trasfezione con i vari mutanti sono stati dissociati con sample buffer (6% SDS, 1,5%  $\beta$ -mercaptoetanolo, 30% glicerolo, 0,03% blu di bromofenolo, 20 g/mL leupeptina, 20



g/mL aprotinina, 2 mM PMSF, 3mM glicerolo fosfato, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 mM NaF), separati mediante SDS-PAGE, trasferiti su membrana di nitrocellulosa e analizzati con gli anticorpi forniti dalla DiaSorin (gli stessi utilizzati per montare il kit ELISA) :

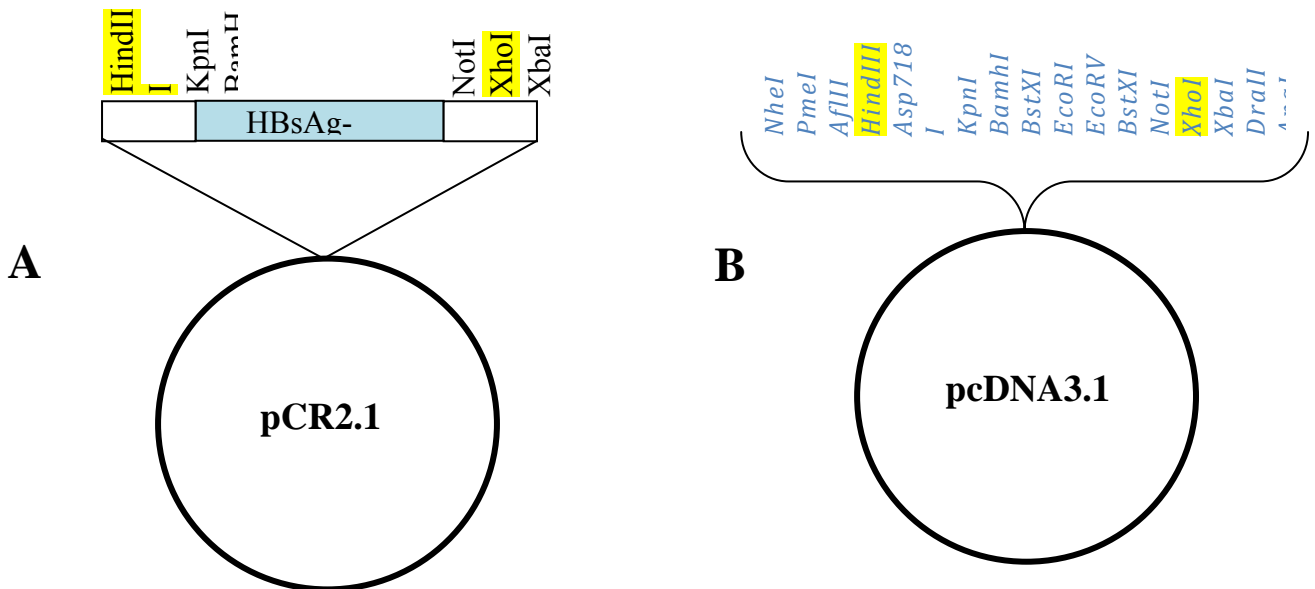
- IgG anti HBsAg H2 (monoclonale) 2µg/ml
- MoAb 4b5 anti HBsAg 2 LIA (monoclonale) 2µg/ml
- IgG antiHBs (policlonale) 2µg/ml

## RISULTATI

### Subclonaggio del cDNA codificante il wild-type e 10 diversi mutanti dell'HBsAg in un vettore di espressione eucariotica.

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

Per poter esprimere la proteina ricombinante in un sistema cellulare eucariotico è stato necessario subclonare il cDNA codificante per l'HBsAg-ayw3 in un plasmide di espressione eucariotica. Nel nostro caso è stato scelto pcDNA3.1 le cui caratteristiche dettagliate sono riportate nei materiali e metodi.

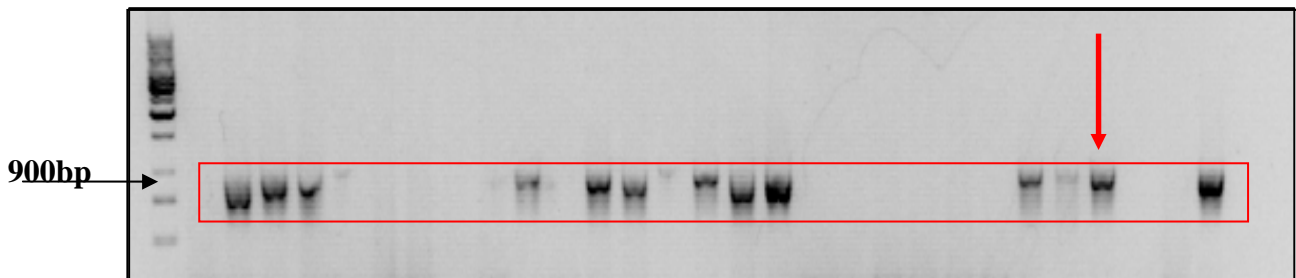


**Fig. 1A** La figura rappresenta uno schema del clonaggio di HbsAg-ayw3 in pCR2.1. In giallo sono evidenziati gli enzimi di restrizione scelti per il sub clonaggio in pcDNA3.1 **B** Rappresenta uno schema del polylinker di pcDNA3.1 con evidenziati in giallo gli enzimi di restrizione scelti per il sub clonaggio di HbsAg-ayw3.

Inizialmente sono stati identificati gli enzimi di restrizione per il sub clonaggio: Hind III e XhoI (Fig.1) poiché in grado di digerire all'interno del polylinker di pcDNA3.1 e di pCR2.1 ma non in HBsAg; in seguito:

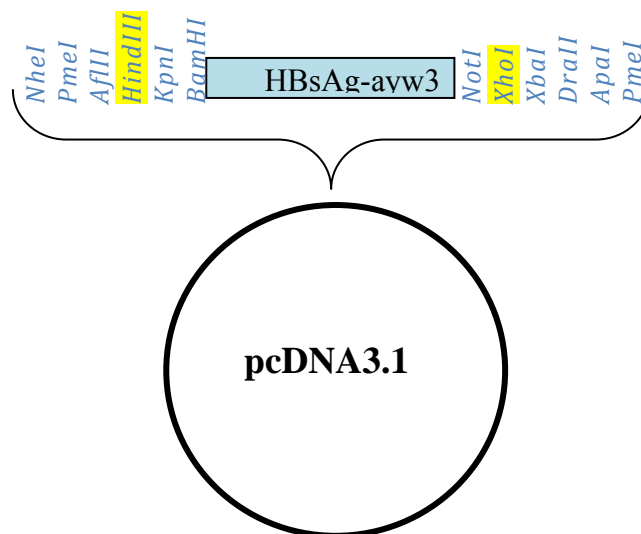
- entrambi i DNA sono stati digeriti;
- l'inserto codificante per HBsAg-ayw3 e il vettore pcDNA3.1 sono stati separati e successivamente purificati da gel;
- inserto e vettore sono stati ligati;
- con il prodotto di ligazione sono stati trasformati batteri competenti poi fatti crescere su terreno selettivo;

- le colonie cresciute sono state analizzate tramite PCR utilizzando primers specifici per pcDNA3.1. (Fig.2)



**Fig.2** In figura è mostrato il risultato delle PCR effettuate su 28 colonie. Le bande presenti all'interno del rettangolo rosso sono tutte positive in quanto rispondenti alle dimensioni attese: 900 bp. La freccia rossa indica la colonia scelta per l'estrazione del DNA plasmidico.

In figura 2 è riportato il risultato ottenuto dopo aver separato su gel di agarosio il prodotto di PCR. L'amplificato atteso era di circa 900 bp di cui 200 bp erano parte del vettore, conseguenza della posizione di appaiamento dei primers e 700 bp rappresentano l'effettiva lunghezza dell'inserto. Le bande nel rettangolo rosso sono le colonie risultate positive allo screening per PCR. In figura alcuni frammenti hanno un'apparente diversa taglia. Tale aspetto può essere attribuito a ricombinazione o più verosimilmente alla presenza di diversa quantità di DNA che ne ha modificato la corsa. E' stata poi selezionata la colonia indicata con la freccia rossa di taglia e di corsa elettroforetica attese. La colonia positiva è stata fatta crescere in terreno selettivo ed è stato estratto il DNA plasmidico. Il risultato finale è il subclonaggio della regione codificante per HBsAg-ayw3 nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1:



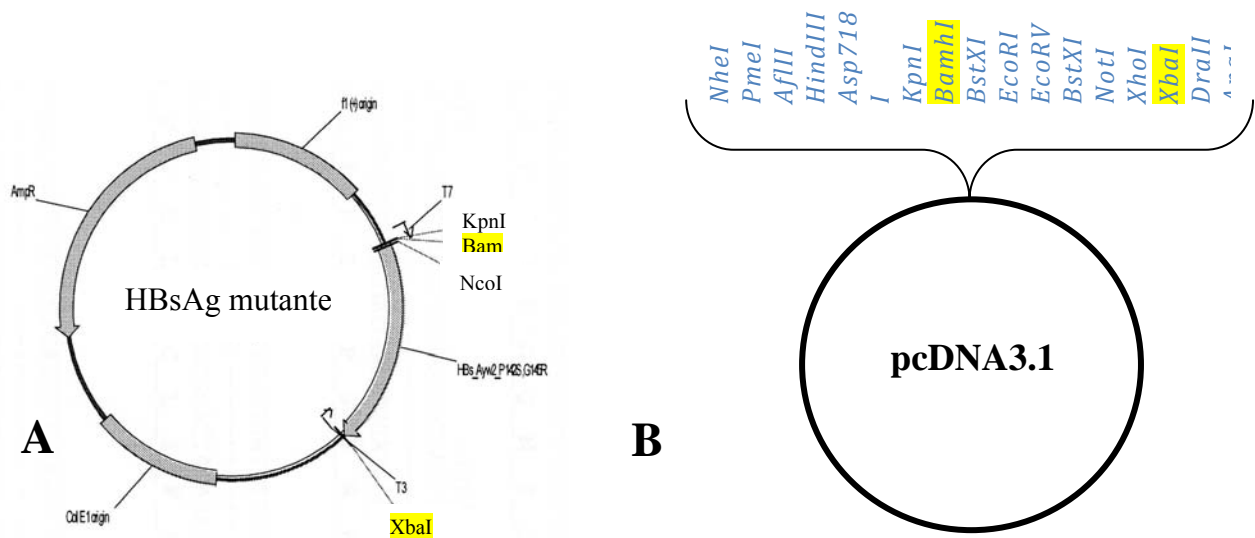
**Fig.3** La figura mostra lo schema del sub clonaggio del cDNA codificante la proteina ricombinante HBsAg-ayw3 in pcDNA3.1

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 seguiti gli stessi passaggi utilizzati per sub clonare l'HBsAg wild-type.

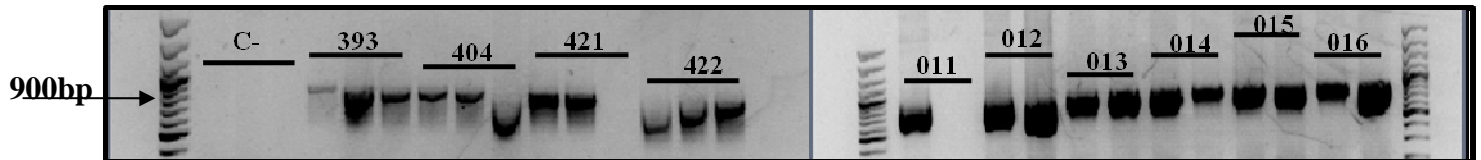


**Fig. 4A** La figura rappresenta uno schema del clonaggio dei 10 mutanti HBsAg in pGA4. In giallo sono evidenziati gli enzimi di restrizione scelti per il sub clonaggio in pcDNA3.1 **B** Rappresenta uno schema del polylinker di pcDNA3.1 con evidenziati in giallo gli enzimi di restrizione scelti per il sub clonaggio dei 10 mutanti HBsAg.

Una volta identificati gli enzimi di restrizione migliori per il sub clonaggio ( BamHI e XbaI, Fig.4):

- Entrambi i DNA sono stati digeriti;
- Gli inserti codificanti per i mutanti HBsAg e i vettori pcDNA3.1 sono stati purificati da gel;
- Inserti e vettori sono stati ligati;

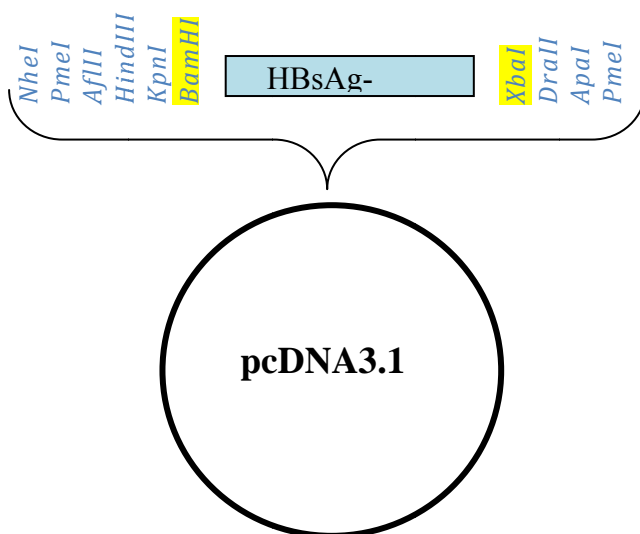
- con il prodotto di ligazione sono stati trasformati batteri competenti fatti crescere su terreno selettivo;
- le colonie cresciute sono state analizzate tramite PCR utilizzando primers specifici per pcDNA3.1. (Fig.2)



**Fig.5** In figura è mostrato il risultato delle PCR effettuate su 24 colonie cresciute su terreno selettivo, 3 per i mutanti 393-404-421-422 e 2 per i mutanti 011-012-013-014-015-016. Le bande presenti all'altezza di 900 bp indicano che la colonia è da considerarsi positiva.

In figura 5 è riportato il risultato ottenuto dopo aver separato su gel di agarosio il prodotto di PCR. La lunghezza attesa dell'amplificato era di circa 900 bp tenendo conto della posizione di appaiamento dei primers sul vettore e dell'effettiva lunghezza dell'inserito. Quasi tutte le colonie analizzate sono risultate positive. Una colonia positiva per ogni mutante è stata fatta crescere su terreno selettivo ed è stato estratto il DNA plasmidico.

Il risultato finale è il clonaggio della regione codificante per i 10 mutanti dell'HBsAg nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1

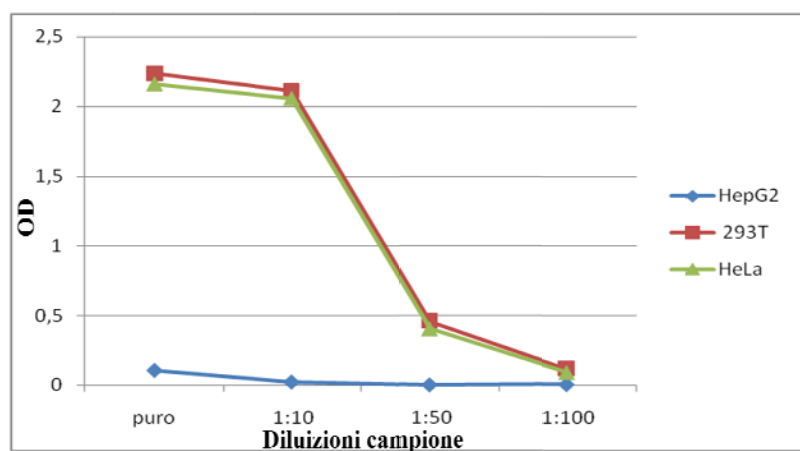


**Fig.6** La figura mostra lo schema del sub clonaggio del cDNA codificante la proteina ricombinante HBsAg-ayw3 in pcDNA3.1

## Identificazione della linea eucariotica che meglio si presta alle condizioni di espressione delle proteine ricombinanti dell'HBsAg

Per esprimere i vettori contenenti il wild-type e i mutanti HBsAg è stato necessario identificare la linea cellulare eucariotica che desse i migliori risultati di espressione in seguito a trasfezione.

Sono quindi state trasfettate tre diverse linee cellulari eucariotiche: HeLa, 293T, HepG2 ( le prime due abitualmente utilizzate nel nostro laboratorio per il clonaggio di diversi costrutti ricombinanti; le ultime, in quanto derivanti da una linea epatocitaria) con il DNA codificante per la proteina ricombinante HBsAg-ayw3. Il risultato è stato valutato dopo 48 ore dalla trasfezione analizzando i surnatanti delle tre linee cellulari con il kit ELISA ETIMAK-4 fornito dalla DiaSorin.

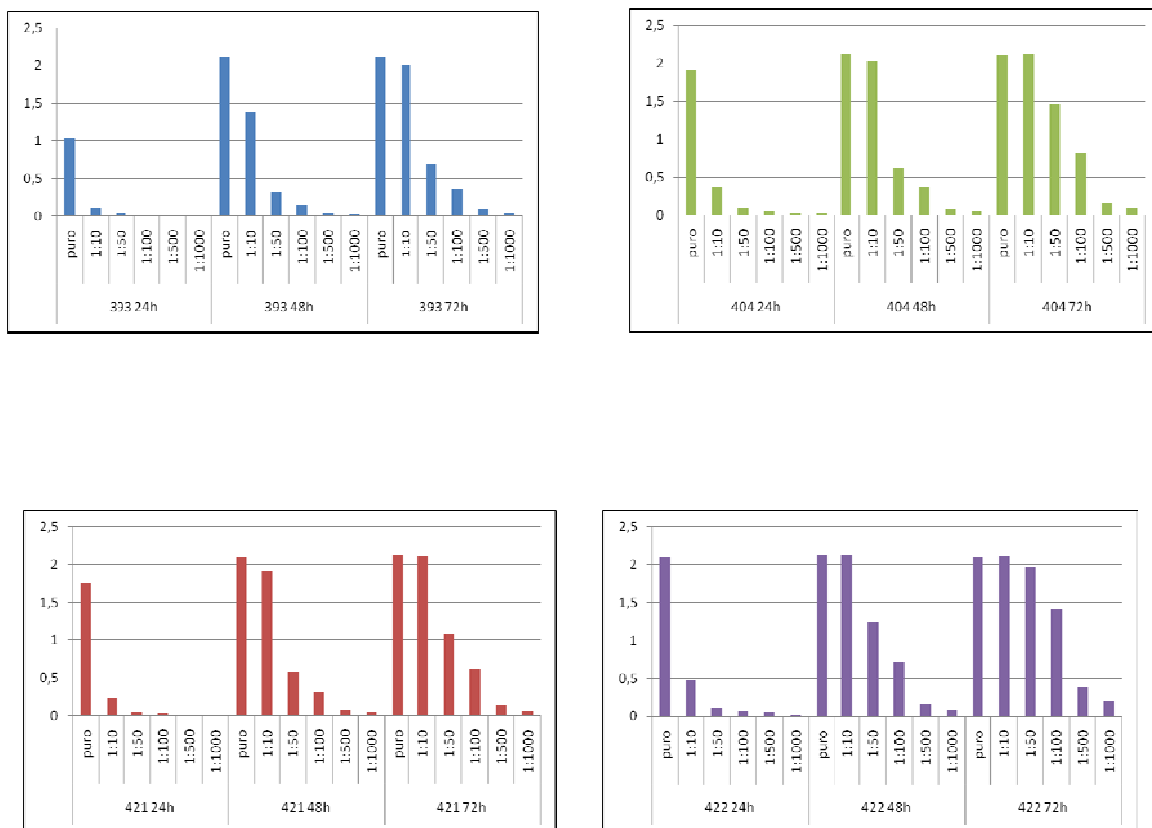


**Fig.7** Il grafico mostra l'espressione della proteina HBsAg-ayw3 in tre linee cellulari eucariotiche (HeLa; 293T; HepG2) sotto forma di assorbanza valutata tramite ETIMAK-4.

Il grafico mostrato in figura 7 evidenzia come le HepG2 esprimano livelli bassissimi della proteina HBsAg-ayw3 essendo il valore dell'assorbanza rilevato al di sopra del valore soglia ( $OD = 0,04$ ) solo nel campione puro. Per quanto riguarda invece le HeLa e le 293T si può osservare una buona e pressoché identica capacità di espressione della proteina ricombinante essendo tutti valori delle assorbanze superiori al valore soglia del kit. Essendo però parte del progetto di ricerca la realizzazione di cloni stabili, sono state scelte le HeLa come linea cellulare più adatta, in quanto le 293T sono solo debolmente adese alla plastica e per tale ragione meno adatte allo scopo.

**Valutazione della migliore tempistica di trasfezione per ottenere la concentrazione maggiore di proteina ricombinante nel surnatante.**

Una volta identificata nelle HeLa la linea cellulare da utilizzare, è stato necessario mettere a punto anche la tempistica di trasfezione, al fine di ottenere la migliore resa di produzione delle proteine ricombinanti HBsAg. Infatti se al passare del tempo il mutante si accumula nel surnatante di coltura è anche possibile che venga degradato e quindi i suoi livelli si riducano. Inoltre le cellule continuano a replicarsi e dopo 72 ore comunque iniziano a morire, cosa che rende sconsigliabile proseguire la coltura oltre. Le cellule sono quindi state piastrate e trasfettate con quattro dei mutanti HBsAg (393, 404, 421, 422) seguendo il protocollo descritto in materiali e metodi, la raccolta dei surnatanti è stata poi effettuata a 24-48-72 ore dalla trasfezione per ogni mutante testato. I livelli di espressione della proteina ricombinante sono quindi stati valutati per mezzo del kit ELISA ETIMAK-4 fornito dalla ditta DiaSorin.



**Fig.8** I 4 grafici mostrano i livelli di espressione di ogni mutante ricombinante (393, 404, 421, 422) nei surnatanti raccolti a 24, 48,72 ore dalla trasfezione, valutati come densità ottica del campione utilizzando in kit ETIMAK-4.

Come si può vedere dai grafici mostrati in figura 8, il maggior livello di espressione delle proteine ricombinanti nel surnatante è stato ottenuto, per tutti e quattro i mutanti analizzati, a 72 ore dalla trasfezione. Le 72 ore sono quindi state scelte come tempistica ottimale del protocollo di trasfezione per le proteine ricombinanti HBsAg.

### **Espressione in cellule di mammifero di 10 mutanti HBsAg identificati tra quelli già descritti in letteratura e quantificazione dei surnatanti mediante kit ETIMAK-4**

I surnatanti ottenuti dalla trasfezione di cellule HeLa con tutti i mutanti sono stati raccolti a 72 h dalla trasfezione e quantificati mediante kit ELISA ETIMAK-4 fornito dalla DiaSorin confrontando le assorbanze con quelle ottenute da una curva standard come descritto nei materiali e metodi.

MUTANTE	ng/ml
G145R (393)	2303
D144A (404)	2936
P142L-G145R (421)	2847
P142S-G145R (422)	2701
T123N (11)	1800
122+DT (15)	978
T123N-T124S (12)	210
P142L-F/Y143H (13)	26
I110R-S117I-G119R-T123N (14)	106
122+DT-G145R (16)	57

**Fig.9** La tabella riporta le quantificazioni di tutti i surnatanti raccolti per ogni mutante HBsAg. In azzurro sono riportate le concentrazioni di HBsAg in circa 30 ml di surnatante raccolto. In arancione sono riportate le concentrazioni medie di HBsAg in surnatanti raccolti in tre diverse trasfezioni.

Come si può vedere nella tabella riportata in figura 9 le concentrazioni ottenute per i primi 6 mutanti rispondono alle richieste della DiaSorin ( 30 ml di surnatante 1 µg/ml +/- 20%) mentre le concentrazioni medie calcolate in 3 diversi test ELISA su surnatanti raccolti dopo tre diverse trasfezione con gli ultimi quattro mutanti mostrano che la resa della trasfezione è sempre più bassa.



E' possibile formulare diverse ipotesi che possono spiegare la minor concentrazione di proteina nei surnatanti dei mutanti HBsAg 11-12-13-14-16:

- Il DNA plasmidico che codifica per questi mutanti, utilizzato per le trasfezioni, si è danneggiato.
- Le cellule trasfettate esprimono questi mutanti con minor efficienza rispetto agli altri.
- Le cellule esprimono i mutanti con la stessa efficienza, ma il kit ELISA li rileva meno ed in maniera discontinua poiché gli anticorpi utilizzati non sono tutti in grado di riconoscere le proteine mutate in quanto le mutazioni interferiscono con il sito di legame dei reagenti utilizzati dal kit.

Per valutare un possibile danno del DNA codificante le proteine ricombinanti HBsAg abbiamo effettuato 2 tipi di analisi: la prima tramite sequenziamento automatico volta a valutare se fossero intervenuti fenomeni di ricombinazione o mutazioni. Tutti i DNA codificanti per i mutanti sono stati sequenziati ex-novo come descritto in materiali e metodi. Il DNA che codifica per i mutanti HBsAg non mostra nessuna mutazione o delezione nucleotidica. La seconda volta a valutare la preparazione del DNA. Per valutare il grado di purezza del DNA ciascun plasmide è stato letto allo spettrofotometro a due diverse lunghezze d'onda : 260 nm per quantificare gli acidi nucleici, 280 per le proteine. Il rapporto delle assorbanze ottenute a queste lunghezze d'onda per ogni DNA ha mostrato un valore di purezza di  $1,9 \pm 0,1$  (purezza massima:  $260/280 = 2$ ).

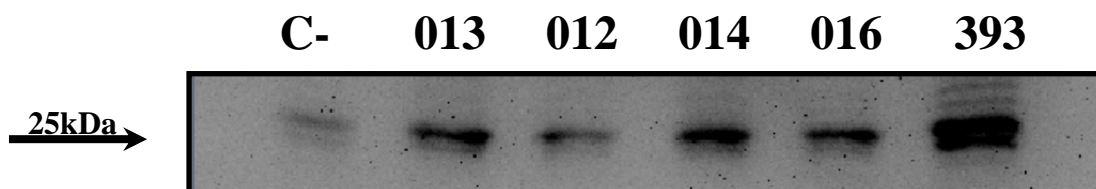
Gli stessi DNA controllati su gel di agarosio hanno ulteriormente confermato i valori di purezza sopra citati.

Per verificare se le cellule esprimano con diversa efficienza i mutanti, i surnatanti delle cellule trasfettate sono stati analizzati in Western blot. Tale metodica infatti identifica una proteina di interesse con l'ausilio di un solo anticorpo, diversamente da quanto accade in ELISA a sandwich in cui vengono utilizzati due anticorpi (uno di cattura e un tracciante) per cui se uno dei due non è in grado di riconoscere l'antigene di interesse il test risulta negativo.

Sono stati utilizzati tre anticorpi forniti dalla DiaSorin:

- IgG anti HBsAg H2 (monoclonale) 2µg/ml
- MoAb 4b5 anti HBsAg 2 LIA (monoclonale) 2µg/ml
- IgG antiHBs (policlonale) 2µg/ml

Tutti e tre gli anticorpi sopra elencati sono utilizzati nel kit commerciali ETIMAK-4 e LIAISON della DiaSorin: i primi due come cattura , il terzo come tracciante.

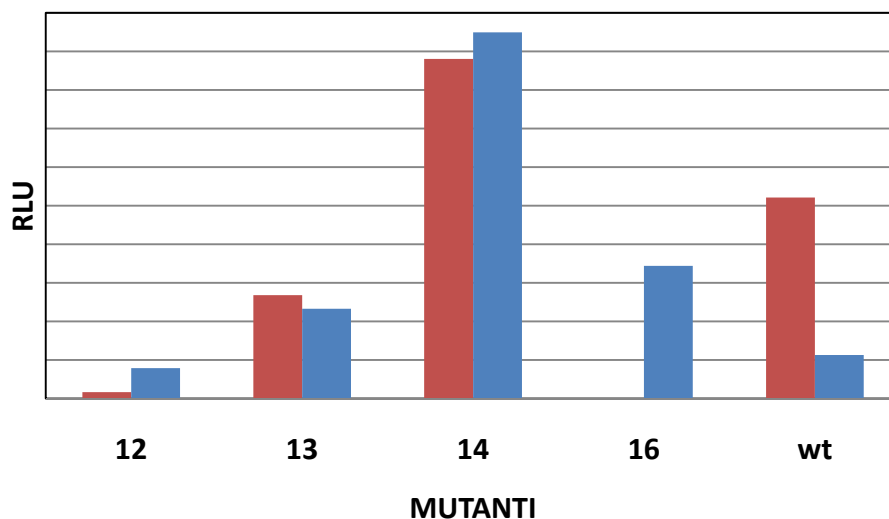


**Fig.10** La figura mostra il risultato di un Western blot con MoAb 4b5 anti HBsAg 2 LIA (monoclonale) 2 µg/ml. Il campione 393 è stato considerato come controllo positivo.

Come si può vedere in figura 10 tutti i campioni, colorati con MoAb 4b5 anti HBsAg 2 LIA (monoclonale) 2 mg/ml, hanno dato un segnale evidente, che pur non essendo uguale per i vari mutanti e nonostante la presenza di un leggero aspecifico nel controllo negativo, non è tuttavia proporzionale alla quantificazione ottenuta in ELISA. Gli altri due anticorpi utilizzati (IgG anti HBsAg H2, IgG antiHBs) non hanno colorato la membrana.

Poiché però non è stato possibile comprendere quale fosse la reale concentrazione degli anticorpi sopra citati nel coating della piastra ELISA, si potrebbe a questo punto presumere che, una diversa distribuzione e/o concentrazione degli stessi possa rendere la quantificazione dei surnatanti HBsAg con kit ETIMAK-4 imprecisa. Va però tenuto presente che gli stessi anticorpi che in ELISA danno buoni risultati di identificazione di una proteina, non sempre riescono a fare altrettanto in metodiche come il Western blot, dove la proteina non è più nella sua forma nativa bensì ridotta.

**Valutazione della concentrazione nel surnatante delle proteine ricombinanti HBsAg mediante confronto tra kit LIAISON DiaSorin, Murex Version 3 Abbott.**



**Fig.11** Il grafico rappresenta il risultato ottenuto analizzando i mutanti 12-13-14-16-HBsAg-ayw3 con il metodo LIAISON. In blu sono riportate le medie dei valori di RLU ottenuti in due analisi dei surnatanti con il kit commerciale HBsAg LIAISON; in rosso sono riportate le medie dei valori di RLU ottenuti in due analisi dei surnatanti con un nuovo pannello di anticorpi verso l'antigene HBsAg in fase di sperimentazione, sempre utilizzando la tecnologia LIAISON.

Gli stessi surnatanti precedentemente analizzati con metodo ELISA e in WB sono stati analizzati anche dallo strumento LIAISON direttamente in DiaSorin utilizzando sia il kit commerciale HBsAg (in blu nel grafico fig. 11) che utilizza gli stessi anticorpi del kit ELISA ETIMAK4, sia un nuovo pannello di anticorpi in fase di sperimentazione rivolti verso la porzione invariabile dell'HBsAg (in rosso nel grafico fig.11) ed un nuovo buffer.

Come si può notare la capacità di riconoscimento degli antigeni mutanti dell'HBsAg da parte del kit commerciale è maggiore per i mutanti 12, 14 e 16. Risulta invece migliore il nuovo pannello di anticorpi nei confronti del mutante 13 e del wild-type in nostro possesso (come da direttive DiaSorin il wild-type HBsAg-ayw3 da questo momento non è più stato tenuto in considerazione ai fini di valutarne l'effettiva concentrazione, essendo di maggiore importanza la capacità dei diversi kit di riconoscere i mutanti HBsAg).

**Valutazione della concentrazione nel surnatante delle proteine ricombinanti HBsAg mediante confronto tra kit LIAISON DiaSorin, Murex Version 3 Abbott.**

Tenendo inoltre conto del fatto che gli anticorpi utilizzati nel kit commerciale HBsAg LIAISON sono gli stessi del kit ELISA ETIMAK-4, ma non hanno fornito un risultato proporzionale a quello ottenuto in ELISA, si è deciso di valutare la validità del processo di quantificazione analizzando con il kit Murex Version 3 della ditta Abbot la concentrazione dei surnatanti HBsAg positivi di tutti i mutanti. Tale kit infatti è stato utilizzato per quantificare i campioni usati per costruire la curva della BBI Diagnostics, usata anche questa volta come standard.

**A**

	LIAISON nuovo buffer	LIAISON commerciale	LIAISON ultime	Abbott
	RLU	RLU	RLU	ng/ml
MUT 11	/	/	661400	720
MUT 12	15602	3632	30760	neg
MUT 13	45584	50331	88170	19
MUT 14	186430	167191	424950	130
MUT 15	/	/	813150	1062
MUT 16	70162	561	87540	19
MUT 393	/	/	1470600	1062
MUT 404	/	/	1760800	1422
MUT 421	/	/	1608100	1271
MUT 422	917038	1605627	1965900	1240

**B**

	LIAISON nuovo buffer	LIAISON commerciale	LIAISON ultime	Abbott
	%	%	%	%
MUT 11	/	/	33,6	58
MUT 12	1,7	0,2	1,5	/
MUT 13	4,9	3,1	4,48	1,5
MUT 14	20	10,4	21,6	10
MUT 15	/	/	41,3	85
MUT 16	7,6	0,04	4,45	1,5
MUT 393			74,8	85
MUT 404			89,5	115
MUT 421			81,7	102
MUT 422	100	100	100	100

**Fig.12** In tabella A sono riportati i dati grezzi ottenuti applicando le diverse metodiche di rilevamento dell'HBsAg a nostra disposizione: LIAISON con l'utilizzo del nuovo buffer messo a punto in DiaSorin; LIAISON kit commerciale; Murex Version 3 della Abbot. Tutti i valori riportati sono da considerarsi positivi poiché nettamente superiori al controllo negativo di ognuna delle analisi. In tabella B sono riportati gli stessi dati espressi come percentuale rispetto ad un campione scelto e posto arbitrariamente uguale a 100. Sono evidenziati in rosso i valori ottenuti con il kit Abbot rispetto a quelli DiaSorin; sono evidenziati in giallo i valori ottenuti con il kit Abbot che risultano minori rispetto a quelli DiaSorin.

Per avere poi un quadro generale dei dati ottenuti è stata costruita una tabella (fig 12 A) in cui sono riportati i dati grezzi ottenuti da tre diversi kit HBsAg DiaSorin e quello Abbot. Essendo però le

unità di misura diverse tra i kit è stata costruita una seconda tabella (fig. 12 B) in cui sono riportati per ogni metodica utilizzata gli stessi dati espressi come percentuale rispetto ad un campione scelto arbitrariamente e posto uguale a 100%. Tutti i valori, sia RLU che ng/ml sono stati quindi rapportati al loro 100% ed ora si può apprezzare l'effettiva variabilità di identificazione dell'HBsAg dei diversi kit diagnostici utilizzati.

### **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 a produrre la proteina ricombinante.

Poiché l'interesse della DiaSorin verso la produzione di cloni trasfettati stabilmente con le proteine mutanti è cambiato, la linea di ricerca è stata interrotta.

## CONCLUSIONI

Come richiesto nel programma di studio e ricerca stipulato in collaborazione tra l'Università del Piemonte Orientale, sede di Novara e la DiaSorin spa, sede di Saluggia, riguardante lo "sviluppo di antigeni ricombinanti di HBsAg espressi in cellule eucariotiche per applicazioni diagnostiche", sono stati raccolti e consegnati alla ditta stessa almeno 30 ml di surnatante contenente i 10 mutanti HBsAg concordati.

Sei di questi:

- HbsAg D144A (**404**)
- HbsAg G145R (**393**)
- HbsAg P142L-G145R (**421**)
- HbsAg P142S-G145R (**422**)
- HbsAg T123N (**011**)
- HbsAg 122+DT (**015**)

in concentrazione uguale o superiore a 1 µg/ml.

Solo quattro dei 10:

- HbsAg T123N-T124S (**012**)
- HbsAg P142L-F/Y143H-D144E-G145R (**013**)
- HbsAg I110R-S117I-G119R-T123N (**014**)
- HbsAg 122+DT-G145R (**016**)

sono stati consegnati in concentrazione inferiore a quella concordata, come confermato anche dal kit Murex Version 3 della ditta Abbott e dalla curva di taratura della BBI Diagnostics, poiché prodotti dalle cellule trasfettate, in quantità inferiore rispetto agli altri sei.

E' comunque da considerarsi positivo il dato secondo cui, il kit Murex Version 3 della Abbott, uno dei più efficienti sul mercato nel riconoscimento degli antigeni mutanti dell'HBsAg fino ad ora identificati, dimostra , rispetto al test HBsAg in LIAISON di ultima messa a punto, minor sensibilità nell'identificazione dei mutanti 13-14-16 e che non riconosce del tutto il mutante 12, altrimenti riconosciuto con LIAISON. Si è quindi potuto infine dimostrare, conducendo le analisi in parallelo, una maggior sensibilità nei confronti dei mutanti HBsAg del kit HBsAg LIAISON della ditta DiaSorin.

## 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



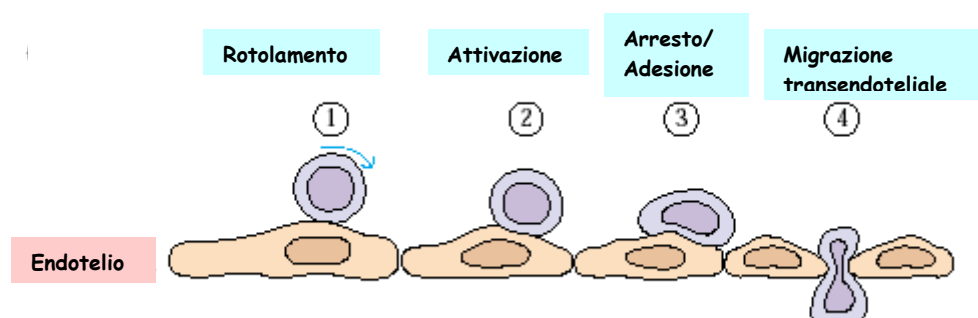
30. Weber B "Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact" *J Clin Virol* 2005;32(2):102-12
31. Carman WF "The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus" *J Viral Hepat* 1997;4 Suppl 1:11-20
32. Gerken G, Kremsdorf D, Capel F, Petit 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

## II° PARTE

### Premessa

L'adesione cellulare è un processo dinamico che regola funzioni complesse, tra cui il reclutamento dei leucociti dal circolo sanguigno al sito di infezione, durante l'infiammazione. Essa è inoltre il primo evento coinvolto nel ricircolo dei linfociti, un processo fisiologico alla base della sorveglianza immunologica, che permette ai linfociti di pattugliare continuamente l'organismo.



Affinchè i leucociti circolino fra vasi sanguigni ed interstizio, essi devono aderire alle cellule endoteliali ed attraversare la parete del vaso (stravaso). Lo stravaso dei leucociti è un processo complesso che può essere diviso in 4 fasi: marginazione e rotolamento, attivazione, adesione salda all'endotelio e migrazione transendoteliale. Ciascuna di queste fasi è mediata da una diversa famiglia di molecole di adesione. Durante la fase iniziale si ha il legame reversibile dei leucociti all'endotelio vascolare attraverso l'interazione delle selectine<sup>1</sup>, espresse dall'endotelio, a residui carboidratici di glicoproteine leucocitarie. Questa interazione non è in grado di ancorare i leucociti contro la forza del flusso sanguigno che infatti rotolano lungo l'endotelio formando e rompendo continuamente il contatto. Tuttavia essa fa sì che i leucociti ricevano segnali di attivazione che ne consentono l'adesione salda alla superficie endoteliale. L'attivazione dei leucociti determina un cambiamento conformazionale delle loro integrine<sup>2</sup> di membrana che aumentano l'affinità di legame per molecole della famiglia delle immunoglobuline espresse dall'endotelio, come ad esempio VCAM-1 (*Vascular Cell Adhesion Molecule-1*) e ICAM-1 (*Inter-Cellular Adhesion*

<sup>1</sup> La famiglia delle selectine è costituita da glicoproteine di membrana con un dominio lectinico che ne permette il legame a specifici gruppi carboidratici, come il tetrasaccaride sialil-Lewis<sup>x</sup>. Essa è composta da tre membri: La *P-selectina* espressa da piastrine e cellule endoteliali, la *E-selectina* espressa esclusivamente dalle cellule endoteliali e la *L-selectina* presente sulla maggior parte dei leucociti.

<sup>2</sup> Le integrine sono glicoproteine transmembrana eterodimeriche poiché formate da una catena  $\alpha$  e una  $\beta$ . La loro attivazione e in-attivazione è un evento chiave nella cascata di adesione leucocitaria. Le integrine interagiscono con molecole della famiglia delle immunoglobuline ma anche con componenti della matrice extracellulare.

*Molecule-1*) . Il legame tra queste molecole ferma il rotolamento e permette ai leucociti di insinuarsi tra cellule endoteliali adiacenti (diapedesi).

Tra le molecole che partecipano alla tras migrazione leucocitaria vi sono le proteine CD31 e CD38. La loro interazione si ha durante il rotolamento e promuove le fasi successive inducendo l'espressione di integrine e la secrezione di citochine. È stato ipotizzato un ruolo per l'interazione CD38/CD31 anche durante la diapedesi.

## CD31

CD31, anche noto come PECAM-1 (*Platelet-Endothelial-Cell-Adhesion-Molecule 1*), è una glicoproteina transmembrana di 130 kDa abbondantemente espressa sulla superficie delle cellule endoteliali, e localizzata a livello delle regioni di contatto cellula-cellula e della porzione della membrana plasmatica che si affaccia nel lume del vaso. È inoltre presente sulla superficie di cellule ematopoietiche, piastrine, monociti, neutrofilii, cellule *natural killer* e linfociti T (1).

CD31 stabilisce interazioni omofile con altre molecole di CD31 poste sulla superficie di cellule adiacenti. Questo tipo di legame gioca un ruolo importante nella formazione e nel mantenimento di uno stato di inibizione da contatto in cellule endoteliali in coltura. Infatti, l'utilizzo di anticorpi diretti contro la porzione extracellulare di CD31, previene la formazione di un monostrato di cellule endoteliali bovine, in coltura (2). CD31 media *in vivo* la migrazione dei leucociti attraverso l'endotelio mediante interazioni omofile ed eterofile con antigeni di superficie leucocitari e proteine della matrice extracellulare (3, 4).

### La struttura di CD31

La proteina CD31 matura è costituita da:

1. una porzione extracellulare di 574 aa organizzati a costituire 6 domini Ig-simili (Ig-1/-6) contenenti 9 potenziali siti di N-glicosilazione. I residui carboidratici costituiscono circa il 40% della massa molecolare della proteina matura.

Il quinto dominio immunoglobulinico possiede una struttura secondaria irregolare, dal momento che possiede solo 3 dei 7 foglietti  $\beta$  necessari per costituire un dominio Ig-simile. Tra i domini immunoglobulinici 4 e 5 è presente un ponte disolfuro che si instaura ad opera di due residui cisteinici posti all'esterno dei suddetti domini (5).

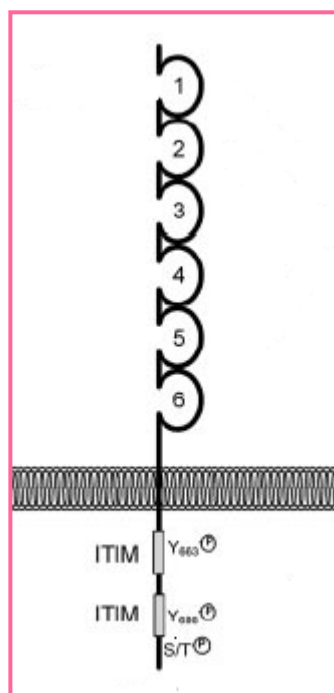
I domini immunoglobulinici sono responsabili della interazione di CD31 con diverse molecole. In particolare l'interazione omofila coinvolge il dominio immunoglobulinico 1 mentre i domini 1-3 ed il dominio 6 sono responsabili dell'interazione eterofila (6);

2. un singolo dominio transmembrana di 19 aa;
3. un dominio intracitoplasmatico di 118 aa molto complesso da un punto di vista strutturale e funzionale. Questo dominio è soggetto a diverse modificazioni post-traduzionali che ne influenzano la funzione e la localizzazione cellulare. Esso contiene un dominio ITAM (*Immunoregulatory Tyrosine-Based Activation Motive*) che, fosforilato su specifiche tirosine, agisce da sito d'interazione per molecole adattatrici contenenti il motivo SH-2, come ad esempio SHP-2 e il suo omologo SHP-1. Il dominio ITAM, che possiede la

sequenza consenso (D/E)X<sub>7</sub>(D/E)X<sub>2</sub>YX<sub>2</sub>LX<sub>7</sub>YX<sub>2</sub>(L/I), costituisce un motivo necessario e sufficiente per la trasduzione di segnali che portano all'attivazione e alla proliferazione cellulare.

La porzione intracitoplasmatica di CD31 presenta anche due motivi ITIMs (*Immunoregulatory Tyrosine-Based Inhibitory Motifs*), aventi la sequenza consenso L/IV/SxYxxL/V anch'essi capaci di legare proteine contenenti il motivo SH-2. La fosforilazione di questi domini a livello delle tirosine Y663 e Y686 inibisce la trasduzione del segnale tirosina-chinasica, la proliferazione, l'attivazione cellulare (7) e può anche regolare l'interazione con componenti del citoscheletro mediante il reclutamento o l'interazione diretta con le catenine  $\beta$  e  $\gamma$  (1, 8).

Esistono diverse isoforme di CD31 generate tramite splicing alternativo o taglio proteolitico del dominio citoplasmatico. Gli eventi che controllano la sintesi, e il significato funzionale di queste isoforme non sono ancora pienamente chiariti (9).



**Figura 1. Struttura di CD31:** CD31 è una glicoproteina transmembrana di 130kDa. La molecola è costituita da una porzione extracellulare organizzata in 6 domini immunoglobulinici coinvolti nell'interazione con diversi ligandi extracellulari, un piccolo dominio transmembrana e un dominio intracitoplasmatico che ne media l'interazione con proteine citoplasmatiche e la trasduzione del segnale.

## La funzione di CD31

CD31 gioca un ruolo chiave nella cascata di eventi che porta allo stravasamento dei leucociti durante l'infiammazione. In particolare, CD31 media sia l'adesione tra cellule endoteliali adiacenti che tra cellule endoteliali e leucociti circolanti. Come descritto precedentemente, durante la migrazione dal lume del vaso all'interstizio, si ha un progressivo aumento dell'adesione dei leucociti all'endotelio mentre il legame tra le cellule endoteliali viene sfavorito. Si assiste così all'aumento della permeabilità vascolare che permette la diapedesi (10).

Muller e coll. (11) sono stati i primi a dimostrare che, pretrattando monociti o neutrofilii con anticorpi specifici diretti contro CD31, se ne inibisce la migrazione attraverso un monostato di cellule endoteliali. I loro esperimenti hanno suggerito che la tras migrazione leucocitaria sia un processo mediato da interazioni omofiliche tra molecole di CD31 presenti sulla superficie delle cellule endoteliali e molecole di CD31 presenti sui leucociti, interazioni che si realizzano a livello delle giunzioni tra le cellule endoteliali. Così una molecola di CD31 espressa sulla superficie di leucociti circolanti può legare una molecola di CD31 espressa sulle cellule endoteliali, rimpiazzando i legami omofilici pre-esistenti e favorendo la migrazione e la diapedesi. Si ritiene che la distruzione transiente dei legami pre-esistenti tra molecole CD31 di cellule endoteliali adiacenti determini la perdita dello stimolo inibitorio mediato da CD31. Ciò si traduce: (A) nell'attivazione delle cellule endoteliali che aumentano l'espressione delle molecole d'adesione facilitando lo stravasamento leucocitario e (B) nel rimaneggiamento del citoscheletro leucocitario così da rendere "malleabile" la cellula e favorire il passaggio dal lume all'interstizio.

Studi condotti, sia *in vitro* che *in vivo*, hanno dimostrato che CD31 è anche implicato nella migrazione leucocitaria attraverso la matrice extracellulare (12) e la membrana basale perivascolare (13-15).

Evidenze sperimentali *in vitro* suggeriscono che CD31 possa anche modulare la velocità e la direzione di migrazione dei neutrofilii, sia in seguito al contatto con cellule endoteliali attivate da citochine che in risposta a fattori chemiotattici come fMLP (*N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*) (16, 17). Neutrofilii difettivi di CD31 hanno inoltre mostrato *in vitro* un'alterata motilità in risposta ad alcune chemochine come IL-8, suggerendo un ruolo di CD31 nella polarizzazione e nello spreading leucocitario (18).

## I ligandi di CD31

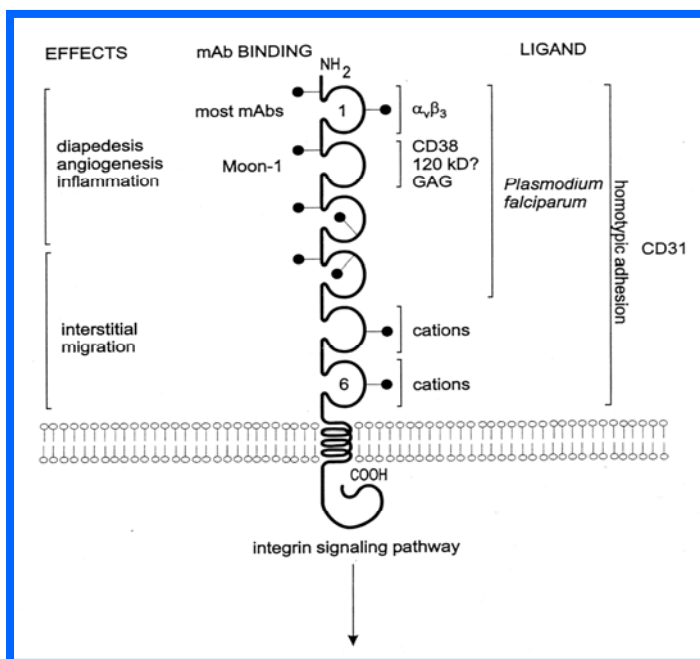
Come già accennato, CD31 è in grado di formare legami omotipici, con un'altra molecola di CD31, o eterotipici, con molecole di altra natura. Il legame omotipico è mediato dal dominio Ig-1 ed è indipendente dalla presenza di cationi divalenti. Una molecola di CD31 espressa sulla superficie di cellule circolanti può legare una molecola di CD31 espressa da una porzione di cellule endoteliali. Secondo il modello proposto, il legame omofilo tra molecole di CD31 opposte si realizza solo dopo che le selectine hanno mediato l'adesione fra le cellule circolanti e l'endotelio(19).

CD31 può anche legare altri componenti della membrana cellulare mediante una interazione eterotipica che dipende dalla presenza di cationi divalenti (20) e coinvolge i domini Ig-1/3 ed il dominio Ig-6 (6).

I ligandi eterotipici di CD31 sono:

- l'integrina  $\alpha_v\beta_3$  che interagisce con CD31 nella fase di adesione stretta all'endotelio e probabilmente anche durante la diapedesi vera e propria (21, 22);
- CD38 una molecola espressa prevalentemente da cellule della linea linfo-monocitica ad alcuni stadi differenziativi
- una proteina di 120kDa, non ancora identificata, espressa sulla superficie di cellule T attivate (23);

È stato anche riportato che CD31 interagisce, nel sistema nervoso centrale (SNC), con gli eritrociti infettati da *Plasmodium falciparum* (24).



**Figura 2. Rappresentazione schematica della struttura e delle funzioni di CD31**



## CD38

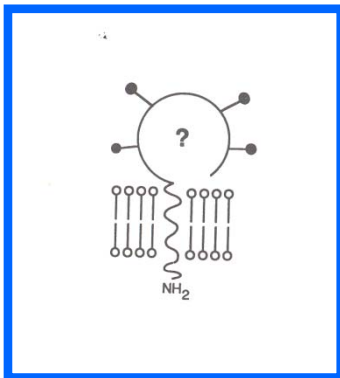
CD38 è una proteina di membrana espressa su diverse cellule di origine linfatica che svolge molteplici ruoli nella regolazione della sopravvivenza, della crescita, del differenziamento, della migrazione e della morte delle cellule del sistema immunitario.

CD38 è una molecola di adesione che lega CD31 ed è coinvolta nelle interazioni tra leucociti e cellule endoteliali. È inoltre un ectoenzima, poiché possiede un dominio ADP-ribosil ciclasico.

Tale molecola è espressa da piastrine, eritrociti, cellule epiteliali prostatiche, cellule muscolari sia lisce che striate, cellule dei tubuli renali e, nel SNC, dalle cellule di Purkinje e dagli astrociti. Studi recenti hanno identificato la presenza di una forma enzimaticamente attiva sulla superficie degli osteoclasti aprendo lo scenario per una nuova funzione di CD38 nel riassorbimento osseo. Le implicazioni funzionali della presenza di CD38 in questi tessuti rimangono ancora non determinate (25).

### La struttura di CD38

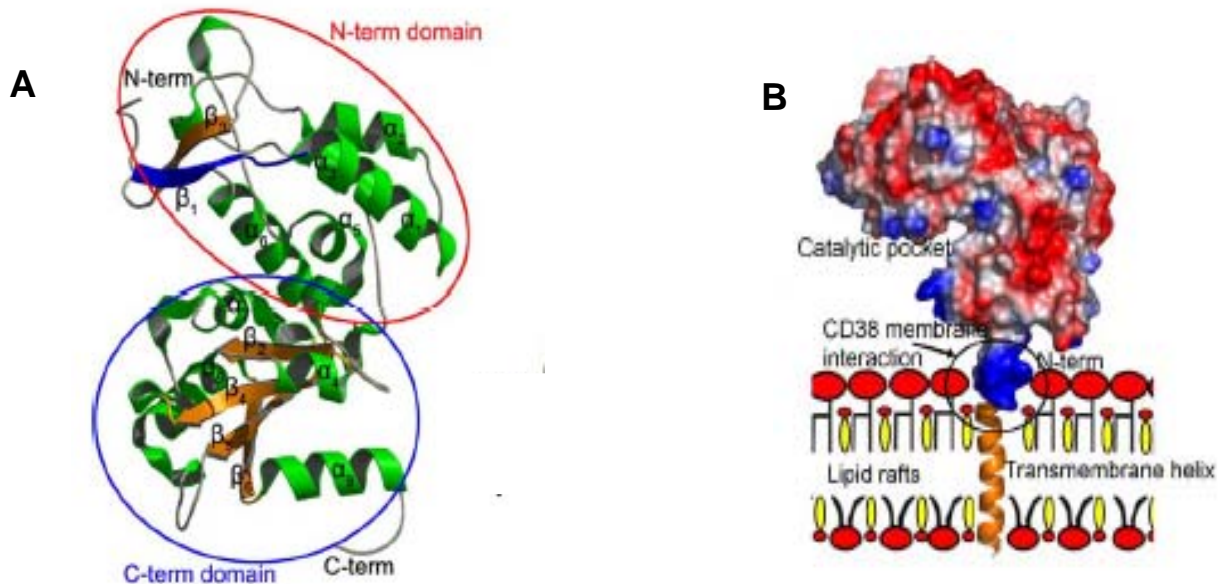
CD38 è una glicoproteina transmembrana di tipo II, di circa 45kDa. È formato da 300 amminoacidi che si organizzano a costituire un piccolo dominio intracellulare N-terminale di 20 aa, una porzione transmembrana ad elica di 23 aa ed una porzione extracellulare C-terminale di 257 aa (26).



**Figura 3. Struttura di CD38:** CD38 è una glicoproteina di tipo II del peso di 45kDa. La molecola è composta da una breve coda intracitoplasmatica, una singola regione transmembrana ed un lungo dominio extracellulare contenente 4 siti di glicosilazione.

La struttura cristallografica della porzione extracellulare ha mostrato che in essa possono essere identificati due domini distinti. Il dominio N-terminale più prossimo alla membrana comprende i residui 45-118 e 144-200 che si organizzano a formare 5  $\alpha$ -eliche e 2 foglietti- $\beta$ . Il dominio C-terminale è costituito dai residui 119-143 e 201-300 e consiste in 4 foglietti- $\beta$  paralleli circondati da 4  $\alpha$ -eliche. Questi domini sono collegati da una regione cerniera composta da 3 peptidi (residui 118-119, 143-144 e 200-201) e costituiscono una tasca contenente il sito catalitico (27), in grado di mediare la funzione ADP-ribosil ciclasica.

L'estremità N-terminale della porzione extracellulare presenta la sequenza amminoacidica RWRQWTW che, in virtù della sua carica positiva, conferisce a CD38 la capacità di interagire con le teste idrofiliche dei fosfolipidi di membrana (28).



**Figura 4. Struttura della porzione extracellulare di CD38:**

**A-rappresentazione “a nastri”.** Sono indicati: in rosso il dominio N-terminale e in blu il dominio C-terminale. Il sito catalitico è localizzato tra i due domini ed è costituito dalle eliche  $\alpha 5$  e  $\alpha 6$  del dominio N-terminale e dall'elica  $\alpha 7$  e dal foglietto  $\beta 5$  del dominio C-terminale. Il nastro blu indica il peptide 52GPGTTK57 responsabile della interferenza con l'infezione da HIV-1 (35, 36).

**B-Orientamento di CD38 sulla membrana plasmatica ed interazione con i rafts lipidici.** Il dominio N-terminale di CD38 interagisce con i gruppi polari di glicerofosfolipidi, sfingolipidi e colesterolo dei rafts lipidici. Sono indicate le cariche elettrostatiche della porzione extracellulare di CD38: in rosso le cariche negative, in bianco quelle neutre e in blu quelle positive.

## La funzione di CD38

Come altri markers linfocitari (CD26, CD39 e CD73), CD38 è anche un ecto-enzima. Il suo dominio extracellulare possiede infatti attività ADP-ribosil ciclasica e cADPR idrolasica essendo capace di generare ADP ribosio ciclico (cADPR) a partire da NAD<sup>+</sup> (Nicotine Adenine Dinucleotide) e di degradare il cADPR ad ADPR. CD38 è anche in grado di generare NAADP (Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate) a partire da NADP<sup>+</sup> (29). Questi prodotti sono coinvolti nella mobilizzazione del calcio intracellulare, con un meccanismo distinto da quello indotto dall'IP3 sia funzionalmente sia farmacologicamente (30). Di essi il cADPR è il secondo messaggero più studiato. Esso gioca un ruolo chiave in diversi processi fisiologici tra cui la proliferazione cellulare, la contrazione muscolare, la rigenerazione delle cellule staminali e la secrezione ormonale (30, 31).

CD38 è una molecola d'adesione che interagisce con CD31. Tale funzione si esplica, non solo durante l'infiammazione, ma anche in diverse fasi dello sviluppo e maturazione dei linfociti.

Ad esempio, nel midollo osseo, CD38 permette le interazioni indispensabili per la linfopoiesi tra le cellule stromali e i precursori leucocitari. Gli esperimenti effettuati da Campana e coll. hanno infatti mostrato che il legame di CD38 con anticorpi agonisti blocca la linfopoiesi dei linfociti B (32) traducendosi sia nella inibizione della sintesi del DNA sia nella induzione di apoptosi (33).

Il ruolo di CD38 come molecola di adesione è suggerito dal fatto che essa è espressa sulla superficie di cellule che presentano una spiccata capacità migratoria. Ad esempio esso è espresso sulla superficie dei monociti circolanti ma non sui macrofagi residenti (34). Inoltre l'espressione in membrana della molecola, varia nelle diverse fasi di sviluppo dei leucociti per cui CD38 è considerato un buon marcatore di ontogenesi. Sui linfociti B CD38 è deregolato durante la maturazione quando sono preferenzialmente residenti nei linfonodi ed è riespresso sulle plasmacellule. Nei linfociti T la molecola è espressa a livelli crescenti nel corso della maturazione timica, per poi abbassarsi nei linfociti naïve. E' inoltre assente sui linfociti memoria quiescenti ed espressa ad alti livelli sui linfociti T attivati.

Oltre alla sua funzione adesiva, CD38 è in grado di trasdurre segnali proliferativi mediante la sua associazione laterale con recettori "professionisti" come il complesso CD3/TCR sui linfociti T o il BCR sui linfociti B.

Esperimenti effettuati in passato nel nostro laboratorio hanno inoltre dimostrato che CD38 è in grado di inibire la replicazione di HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus-1*) negli stadi precoci

dell'infezione, interferendo a livello dell'interazione tra la glicoproteina virale gp120 e il suo recettore CD4 **(35)**. Tale inibizione è mediata dal peptide  $_{52}\text{GPGTTK}_{57}$  localizzato nella porzione N-terminale di CD38 che ha un'omologia di sequenza (GPG) con il loop V3 di gp120 **(36)**.

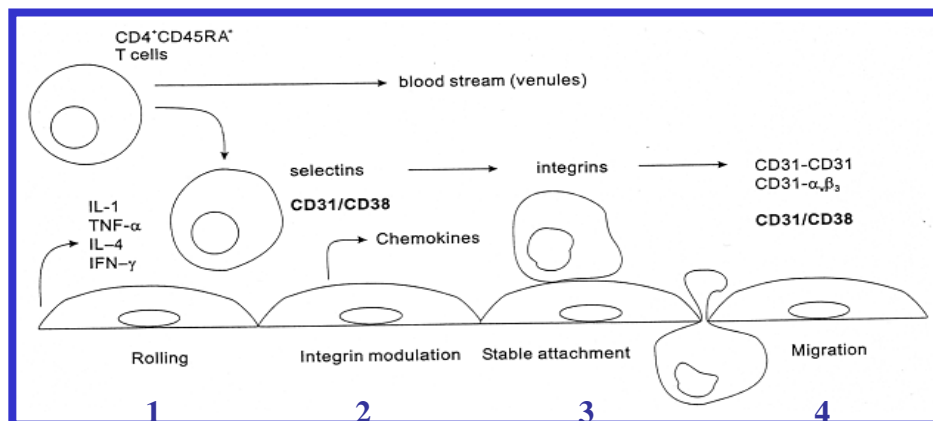
## Il ruolo dell'interazione tra CD31 e CD38.

In letteratura, l'interazione fra CD31 e CD38 è stata analizzata a livello biochimico, utilizzando forme solubili ricombinanti di entrambe le molecole e in sistemi biologici in grado di mimare la parete dei vasi.

Sulle cellule CD38<sup>+</sup> questo legame è seguito da rapidi e complessi eventi intracellulari che portano a variazioni nella concentrazione del calcio (37), attivazione di NF-κB (34) e attivazione e secrezione di un pannello di citochine quali IL-6, IL-10, IFN-γ e GM-CSF (38, 39). Inoltre esso determina internalizzazione di CD38 (40) e aumento dell'espressione di altre molecole di superficie tra cui CD29 e CD54 (34).

Ancora oscura è la via di trasduzione del segnale trasmesso via CD31, sulle cellule endoteliali. Indicazioni indirette derivano da esperimenti effettuati utilizzando anticorpi specifici che inducono fosforilazione di proteine citoplasmatiche, mobilitazione del calcio intracellulare e rilascio di prostaciline (41).

Nel processo di adesione linfocitaria alle cellule endoteliali l'interazione CD31/CD38 sembra intervenire nelle fasi iniziali, durante il rolling dei leucociti e nelle fasi successive inducendo l'espressione delle integrine e la secrezione di citochine. Il contatto tra queste molecole potrebbe inoltre giocare un ruolo importante durante la fase di stravasamento vera e propria.



**Figura 5. Ruolo dell'interazione CD31/CD38 nel contesto dell'adesione dei leucociti alle cellule endoteliali:** (1) Rotolamento del leucocita sull'endotelio mediato da molecole di adesione costitutivamente funzionali, come selectine e molecole mucino-simili; (2) attivazione di recettori di adesione inattivi da parte di molecole presenti sulle cellule endoteliali; (3) attacco stabile del linfocita mediato dalle integrine attivate nella fase precedente; (4) diapedesi mediata da CD31 e integrine che guidano la motilità del leucocita attraverso la parete endoteliale. L'interazione CD38/CD31 si ha durante il rotolamento e promuove le fasi successive inducendo l'espressione di integrine e la secrezione di citochine. È stato ipotizzato un ruolo per l'interazione CD38/CD31 anche durante la diapedesi.

Approfondire il funzionamento del complesso CD31/CD38 riveste un ruolo importante in relazione al loro possibile coinvolgimento in stati patologici.

CD38, infatti, è implicato nella patogenesi di diverse malattie, incluse il diabete mellito non insulino-dipendente (42,43) e la X-linked Agammaglobulinemia (XLA) (44, 45). È stato individuato nelle placche neurofibrillari che rappresentano il principale marcatore della sindrome di Alzheimer (46). La molecola è aumentata nella grande maggioranza di leucemie e linfomi (47, 48, 49) ed è coinvolta nella formazione di tumori solidi come il carcinoma prostatico (50). Inoltre è un indicatore prognostico in corso di infezione da HIV-1 poiché i livelli di espressione della molecola sono utilizzati come indicatore della risposta alla terapia HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) (51).

L'azione di CD31 è implicata in malattie caratterizzate da condizioni infiammatorie accompagnate da aumento dell'adesione e marcato stravasamento leucocitario.

CD31 e CD38 sono spesso co-espressi dalla stessa cellula e co-localizzati a livello dei microdomini lipidici della membrana plasmatica (rafts). Pertanto il cross-talk recettore/ligando tra queste due molecole si può realizzare anche in *cis*. A questo proposito è stato riportato che uno sbilanciamento nella co-espressione di CD31 e CD38 rappresenta un fattore prognostico negativo in corso di mieloma (52) poiché, mentre le plasmacellule normali sono prevalentemente CD38<sup>+</sup>/CD31<sup>+</sup>, la trasformazione neoplastica si accompagna ad una perdita selettiva di CD31.

L'espressione relativa di CD31 e CD38 è implicata inoltre nella mobilitazione delle cellule leucemiche nella Leucemia Mieloide Acuta (AML). Infatti essi sono espressi ed associati in tutti i sottotipi leucemici di AML, ma con una considerevole variabilità tra i diversi pazienti. Gallay e coll. hanno dimostrato che in questo contesto un eccesso di CD38 (CD31/CD38<1) permette alle cellule leucemiche di essere intrappolate all'interno del midollo osseo attraverso l'adesione allo ialuronato, mentre un eccesso di CD31 (CD31/CD38>1) promuove l'interazione omotipica delle cellule leucemiche con l'endotelio del midollo osseo traducendosi in un elevato tasso di migrazione transendoteliale (53).

La comprensione dell'interazione CD31/CD38 è complicata dalla presenza di forme alternative di entrambe le molecole che possono influenzarne l'attività ed il rispettivo legame.

In particolare Umar e coll. (54) hanno identificato una forma di superficie di CD38 di 190kDa in cellule di leucemia linfocitica trattate con acido retinoico che potrebbe derivare da un cross-linking post-traduzionale di CD38 catalizzato dalle transglutaminasi. Una forma di 78kDa è stata identificata in linfociti B immortalizzati con Epstein-Barr Virus (EBV) di persone affette da XLA. Questa forma è rilasciata nel surnatante di coltura, mantiene l'attività enzimatica e sembra essere patognomica di XLA (44).

Una forma solubile di CD38 (sCD38) che mantiene la capacità di legame è rintracciabile nei fluidi biologici in condizioni normali e risulta aumentata in corso di alcune malattie **(55)**.

Una forma solubile di CD31 (sCD31) si ritrova nel siero di soggetti Caucasici ed aumenta di 2-3 volte in soggetti affetti da sclerosi multipla **(56)**, in soggetti colpiti da infarto del miocardio **(57)**, ed in soggetti HIV-positivi **(58)**. Benché il suo significato fisio/patologico non sia ancora chiarito è interessante notare che la forma solubile ricombinante di CD31 è capace di bloccare la migrazione transendoteliale di neutrofili, monociti e cellule natural killer *in vitro* e di inibire i processi infiammatori acuti *in vivo* **(59, 60)**.

## Scopo del lavoro

L'interazione tra CD31 e CD38 riveste un ruolo importante nell'adesione tra le cellule del sistema immunitario e le cellule endoteliali, evento cardine per la maturazione, il differenziamento e la migrazione leucocitaria.

Varie linee di ricerca hanno dimostrato che i diversi domini Ig di CD31 conferiscono alla molecola la specificità di legame per i diversi ligandi. In particolare l'interazione eterofila con CD38 coinvolge il dominio Ig-2, mentre l'interazione omofila è mediata dal dominio Ig-1.

Non è invece nota la porzione di CD38 implicata nella interazione con CD31. Lo scopo di questa tesi era identificare il dominio di CD38 coinvolto in tale interazione. A tal fine, nel nostro laboratorio, sono stati preparati 8 diversi costrutti, codificanti per porzioni tronche nel dominio extracellulare di CD38: CD38<sub>1-285</sub>, CD38<sub>1-219</sub>, CD38<sub>1-191</sub>, CD38<sub>1-142</sub>, CD38<sub>1-114</sub>, CD38<sub>1-90</sub>, CD38<sub>1-74</sub>, CD38<sub>1-49</sub>. Tali plasmidi sono stati trasfettati in una linea cellulare di derivazione linfocitaria incapace di esprimere CD38 endogeno (MT2) e per ciascun costrutto, compresi il CD38 full-length (CD38 wt) e il plasmide vuoto (mock), si sono ottenuti dei cloni stabili.



## MATERIALI E METODI

### Linee cellulari

Cellule HeLa e 293T sono state coltivate in terreno DMEM (Gibco Life Technologies, Gaithersutg, MD) addizionato con antibiotici (Penicillina, Streptomina, Gentamicina) e 10%FBS .

Cellule di derivazione linfocitaria MT2 sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (Gibco Life Technologies, Gaithersutg, MD) +10%FBS alla concentrazione di  $5 \times 10^5$  cellule/ml.

Cellule HUVEC, isolate da vene del cordone ombelicale, sono state coltivate in terreno M199 addizionato di 20% FCS (fetal calf serum) e 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomina, 5 UI/ml eparina, 12 µg/ml estratto di cervello bovino e 200 mM glutamina. Queste cellule sono state cresciute a confluenza in fiasca e utilizzate dal secondo al quinto passaggio.

Tutte le linee cellulari utilizzate sono state incubate a 37°C in atmosfera umidificata al 5% CO<sub>2</sub>.

### Costrutti e trasfettanti

Il cDNA di CD38 *full-length* e delle forme mutanti codificanti per le molecole tronche, mancanti di 15, 81 e 109 aminoacidi nella porzione COOH-terminale della molecola (chiamate rispettivamente CD38<sub>285</sub>, CD38<sub>219</sub>, CD38<sub>191</sub>) sono state ottenute da Hoshino et al. (61). Un protocollo simile è stato utilizzato per ottenere le forme tronche CD38<sub>142</sub>, CD38<sub>114</sub>, CD38<sub>90</sub>, CD38<sub>74</sub>, CD38<sub>49</sub>. Questi cDNA sono stati clonati nel plasmide pcDNA3/neo dopo digestione per mezzo degli enzimi di restrizione HindIII e NotI (sequenze in grassetto nei primer). Una sequenza *myc-tag* è stata aggiunta alla porzione NH<sub>2</sub>-terminale della molecola per mezzo di PCR utilizzando il primer1 (forward) 5'-TTTAAGCTTATGGAGCAGAAGCTGATCTCCGAGGAGGACCTGATGGCCAAGTGCAGTTC-3' e un primer reverse specifico per ogni mutante:

- CD38<sub>285</sub>:5'-CAGACCTGACAAGTTTCTTTGAG**CGGCCGC**-3'
- CD38<sub>219</sub>:5'-GTAAAATCTTGACAAAACTGAG**CGGCCGC**-3'
- CD38<sub>191</sub>:5'-GTTTCAGTATTCTGGAAAACGTGAG**CGGCCGC**-3'
- CD38<sub>142</sub>:5'-CATGTCCCGCTGGACCTGTGAG**CGGCCGC**-3'
- CD38<sub>114</sub>:5'-AGTCCCAACTTCATTAGTGAG**CGGCCGC**-3'
- CD38<sub>90</sub>:5'-CTTGAAAGCATCCCATACTGAG**CGGCCGC**-3'
- CD38<sub>74</sub>:5'-ATGAATTTTCAGTGTACTTGACGCTGAG**CGGCCGC**-3'
- CD38<sub>49</sub>:5'-CCACTGCTGGCGCCACC TGAG**CGGCCGC**-3'

I prodotti di PCR sono stati digeriti con gli enzimi HindIII ed EcoRI e ligati nei plasmidi codificanti per CD38 intero e per le forme tronche, a loro volta digeriti con HindIII ed EcoRI. Ciascun

amplificato è stato purificato con Exo-SAP-IT (GE Healthcare) e sequenziato per escludere la presenza di mutazioni mediante ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems).

I plasmidi (10µg) sono stati linearizzati con l'enzima PvuI e trasfettati nella linea cellulare MT2 (5x10<sup>6</sup> cellule/0,8 ml PBS) mediante elettroporazione a 260V e 960µF.

Il costrutto CD31-hIg è stato generato clonando il cDNA della porzione extracellulare di CD31 nel vettore hpHYGRO, gentilmente fornito dal prof. Sblattero (le cui caratteristiche sono descritte nella ref. 62), contenente le sequenze CH2-CH3 delle IgG1 umane e il tag SV5.

In particolare il cDNA della porzione extracellulare di CD31 è stato suddiviso in tre frammenti sfruttando la presenza dei siti di restrizione degli enzimi XhoI e PstI, come schematizzato in figura 6. Il frammento *a* è stato ottenuto per PCR utilizzando i primers: forward1 (5'-GGTGGCGCGCATGCCCAAGAAACTCTTTC-3') contenente la sequenza riconosciuta dall'enzima di restrizione BssHII e reverse1 (5'-AATTCTGGTCTCGAGAATTCTTC-3') contenente la sequenza per l'enzima di restrizione XhoI. Il frammento *b* è stato ricavato per digestione enzimatica utilizzando gli enzimi XhoI e PstI. Il frammento *c* è stato ottenuto per PCR utilizzando i primers forward2 (5'-GGACGTATATCTGCACTGCAGG-3') contenente la sequenza per l'enzima di restrizione PstI e reverse2 (5'-ACAACCGCTAGCTTTCTTCCATGGGGCAAGAATG-3') contenente il sito per l'enzima di restrizione NheI. La reazione di amplificazione è stata eseguita mediante PCR *Touch-Down* 60°C-50°C.

I frammenti di CD31 e il plasmide hpHYGRO sono stati digeriti con i rispettivi enzimi di restrizione (1-2U/µg DNA). I prodotti di digestione sono stati purificati da gel d'agarosio utilizzando il kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA) e ligati mediante T4 DNA Ligasi (Invitrogen, San Diego, CA) secondo il protocollo fornito dalla ditta.

I prodotti della ligazione sono stati utilizzati per trasformare batteri competenti del ceppo E. Coli JM109 competenti (Promega, San Jose, CA). Le colonie cresciute sono state analizzate per PCR per la presenza/assenza dei frammenti *a* e *c* utilizzando i primers:

pHYGROsense 5'-CGATTTCTAGATGCCACCATGGGCTGGAGCCTGATCCTCC-3' e reverse2 per il frammento *a* e forward2 e CH2antisense 5'-CGGTCCCCCAGGAGTTCAGGTGC-3' per il frammento *c*.

La presenza di eventuali mutazioni nei costrutti è stata esclusa mediante sequenziamento come descritto in precedenza.

Una colonia batterica positiva per ogni costrutto è stata cresciuta in LB con Ampicillina (100µg/ml) a 37°C e il DNA plasmidico estratto mediante il kit NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel).

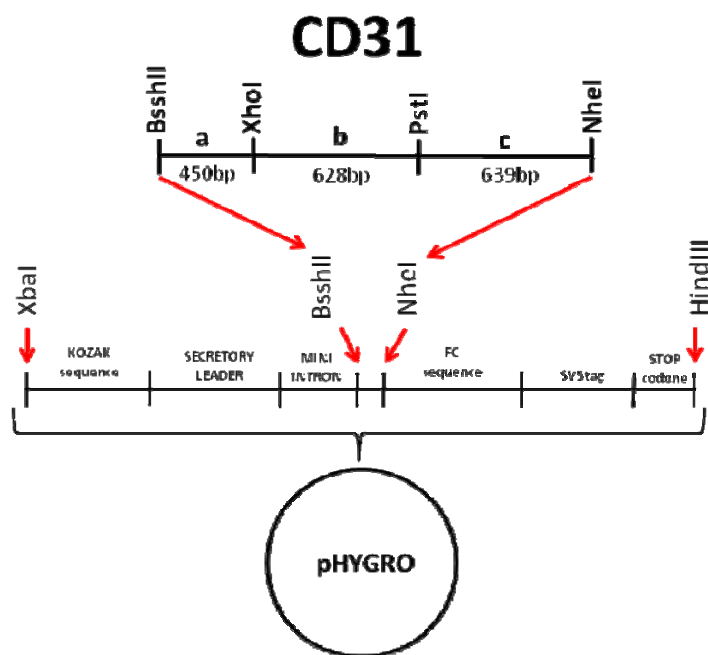


Figura 6. Schema del clonaggio della porzione extracellulare di CD31 nel vettore human-pHYGRO.

## IMMUNOFLUORESCENZA

L'espressione di CD38 wild-type e degli 8 mutanti è stata valutata tramite immunofluorescenza utilizzando il kit Fix & Perm (CALTAG Laboratories). In breve,  $2 \times 10^5$  cellule per campione sono state incubate con 100 $\mu$ l di buffer A (Fixation Medium) per 15min e successivamente con 100 $\mu$ l di buffer B (Permeabilization Medium) contenente 400ng di anticorpo anti-c-myc (Santa Cruz Biotechnology) marcato FITC per altri 15min. Anche cellule MT2 trasfettate con il solo vettore vuoto (MT2.mock) sono state trattate come indicato sopra. L'espressione basale di queste ultime è stata utilizzata come controllo negativo. I campioni sono stati infine analizzati mediante citofluorimetro FACSCalibur (sono stati acquisiti 10.000 eventi per campione) con software CellQuest (Becton Dickinson).

## **ATTIVITA' ECTO-CICLASICA**

L'attività ecto-GDPR ciclasica delle cellule MT2 mock e MT2 trasfettate con le forme tronche di CD38 è stata determinata come precedentemente descritto (63). Sono state utilizzate  $5 \times 10^5$  cellule MT2 per ml di PBS per ogni campione. Le cellule sono state risospese in 1ml di NGT buffer (NaCl 0.15M, glucosio 5mM, Tris-Cl 10mM pH7.4). Successivamente sono stati aggiunti 0,1-1-10 $\mu$ l di NGD 10mM (Sigma) in 20mM Tris, pH7.4 o 0,1-1-10 $\mu$ l di buffer come controllo. Dopo un'incubazione di 30min a 37°C, i campioni sono stati centrifugati e il surnatante raccolto è stato analizzato mediante uno spettrometro a fluorescenza impostando l'eccitazione a  $\lambda=300$  nm e l'emissione a  $\lambda=410$  nm. Le cellule sono state analizzate in triplicato in tre diversi esperimenti.

## **SAGGI DI BINDING**

Al fine di minimizzare l'adesione mediata dalle integrine l'interazione tra cellule MT2 trasfettate con i mutanti di CD38 e cellule HUVEC esprimenti elevati livelli di CD31 è stata valutata utilizzando un Dynamic Binding Assay. In questo test il legame è stato valutato in una piastra da 24 pozzetti, a 4°C in agitazione per evitare l'interazione statica tra cellule. Human Umbelical Vein Endothelial Cells (HUVEC) sono state isolate da vene del cordone ombelicale e poste in coltura in terreno contenente PMA (5ng/ml) per 2 giorni. Il trattamento con PMA potenzia l'adesione delle HUVEC alle piastre di coltura e riduce il rischio di distacco durante i lavaggi previsti dal protocollo. Le cellule adese alla piastra sono state lavate tre volte con RPMI+10%FCS. Le cellule MT2 mock e MT2 trasfettate con le forme tronche di CD38 sono state marcate con 50 $\mu$ l di  $^{51}\text{Cr}$  (Amersham, UK) per 1 ora, lavate due volte il PBS e seminate alla concentrazione di  $5 \times 10^5$  cellule per pozzetto, in piastre da 24 pozzetti in cui sono state precedentemente seminate le HUVEC in RPMI+10%FCS. Dopo 15min di incubazione le piastre sono state centrifugate a 800rpm per 30sec e lasciate in incubazione per altri 20 min. Gli esperimenti sono stati condotti a 4°C, lavorando in camera fredda, ponendo le cellule in ghiaccio e utilizzando terreno freddo (0,5ml/pozzetto). Successivamente i pozzetti sono stati lavati 3 volte con 1ml di RPMI+10%FCS freddo. Le cellule

sono poi state lisate con 1ml di 2% TritonX100 e la radioattività misurata usando un  $\gamma$ -counter. Il legame assoluto è stato calcolato come segue:

$$\frac{\text{legame assoluto del campione}}{\text{legame assoluto del controllo}} \quad \times 100$$

## **TRASFEZIONE**

Cellule HeLa e 293T sono state trasfettate con 20 $\mu$ g di DNA plasmidico utilizzando il metodo del calcio-fosfato che richiede  $\text{Ca}_2\text{PO}_4$  2,5mM, HBS (NaCl 280mM, HEPES 100mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,5mM pH7.1) e acqua sterile. La trasfezione è stata eseguita utilizzando sia il vettore hpHYGRO-CD31 sia il vettore vuoto come controllo. Dopo 4h dalla trasfezione il terreno di coltura è stato sostituito con DMEM addizionato di antibiotici, ma privo di FBS.

Il mezzo di coltura contenente la proteina chimerica CD31-hIg è stato raccolto a diversi tempi di incubazione (24h, 48h o 72h) e centrifugato per 5min a 3500rpm allo scopo di eliminare i detriti cellulari. Il surnatante così ottenuto è stato raccolto, filtrato con filtri da 0,22 $\mu$ m e addizionato di inibitori di proteasi (Aprotinina 10 $\mu$ g/ml, Leupeptina 10 $\mu$ g/ml, Pepstatina 1 $\mu$ g/ml, PMSF 0,5mM,  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  1mM).

Il mezzo di coltura contenente la proteina chimerica CD31-hIg è stato raccolto e sottoposto a cromatografia per affinità su protein A-Sepharose (GE Healthcare, UK). La proteina è stata eluita mediante Glicina 0,1M pH2,7, neutralizzata con 20% vol/vol di Tris Base 2M e dializzata contro PBS.

## **WESTERN BLOT**

I surnatanti di coltura trattati come descritto precedentemente sono stati caricati su gel 8% SDS-PAGE e trasferiti su membrana di nitrocellulosa Hybond (Amersham) incubata per 12h a 4°C con gli anticorpi: Moon-1 ( $\alpha$ -CD31) alla concentrazione di 10 $\mu$ g/ml o  $\alpha$ -SV5tag prodotto

dall'Università di Trieste. Il legame degli anticorpi primari è stato visualizzato utilizzando l'anticorpo secondario  $\alpha$ -mouse coniugato HRP (GE Healthcare, UK) ed il kit ECL (GE Healthcare, UK).

## **SAGGIO ELISA**

Un saggio ELISA è stato utilizzato per valutare l'interazione tra il costrutto chimerico CD31-hIg e i diversi mutanti di CD38.

A questo scopo 2 $\mu$ g/ml della proteina CD31-hIg purificata sono stati adsorbiti su piastre ELISA mediante una incubazione overnight a 4°C. Ogni pozzetto è stato saturato con PBS-1%BSA e incubato per 1h a temperatura ambiente con 600 $\mu$ g di lisato proteico totale di cellule MT2 esprimenti stabilmente i mutanti di CD38 fusi al *myc-tag*. Il legame è stato visualizzato mediante l'impiego di 300ng/ml di anti-c-myc (Santa Cruz Biotechnology) e di un anti-mouse coniugato HRP (BIO-RAD). La reazione è stata visualizzata con TMB (*Tetramethyl Benzidine*) (Sigma) e l'assorbanza letta a 450nm mediante BS1000 SpectraCount (Packard).

I lisati cellulari utilizzati nel test ELISA sono stati ottenuti incubando le cellule per 30 min in ghiaccio in un buffer contenente HEPES 10mM pH7.9, KCl 10mM, EDTA 0,1mM, EGTA 0,1mM, NP40 10% e centrifugando a 13000rpm per 30min. I lisati sono stati quantizzati mediante BCA e portati alla stessa concentrazione.

## RISULTATI

### Mutanti CD38

Con il fine di mappare il sito di CD38 coinvolto nell'adesione dei linfociti alle cellule endoteliali è stata valutata la capacità delle MT2, trasfettate con i mutanti di delezione di CD38, di aderire a cellule endoteliali che esprimono elevati livelli di CD31 (HUVEC). La percentuale di adesione dei cloni mutanti è stata confrontata con quella delle MT2 trasfettate con il CD38wt e delle MT2 trasfettate con il plasmide vuoto (mock). (**Figura 7**). Affinchè tale esperimento dia risultati attendibili, è fondamentale che il livello di espressione in membrana, dei singoli cloni di MT2, sia comparabile. Per tale ragione, l'espressione della molecola CD38 e delle forme mutanti è stata valutata mediante analisi citofluorimetrica, utilizzando un pannello di anticorpi specifici per CD38, diretti verso epitopi diversi. Poiché non è stato possibile individuare un anticorpo in grado di riconoscere i mutanti maggiormente deleti (CD38<sub>1-191</sub>, CD38<sub>1-142</sub>, CD38<sub>1-114</sub>, CD38<sub>1-90</sub>, CD38<sub>1-74</sub>, CD38<sub>1-49</sub>), è stato utilizzato un anticorpo diretto verso il peptide *myc-tag* posto all'estremità N-terminale (intracitoplasmatica) di ciascun costrutto. Vista la localizzazione citosolica dell'epitopo, le cellule sono state fissate, permeabilizzate e colorate utilizzando il suddetto anticorpo coniugato con il FITC. La **figura 8** mostra l'analisi al citofluorimetro di tutti i cloni e dimostra che essi esprimono quantità paragonabili di proteina.

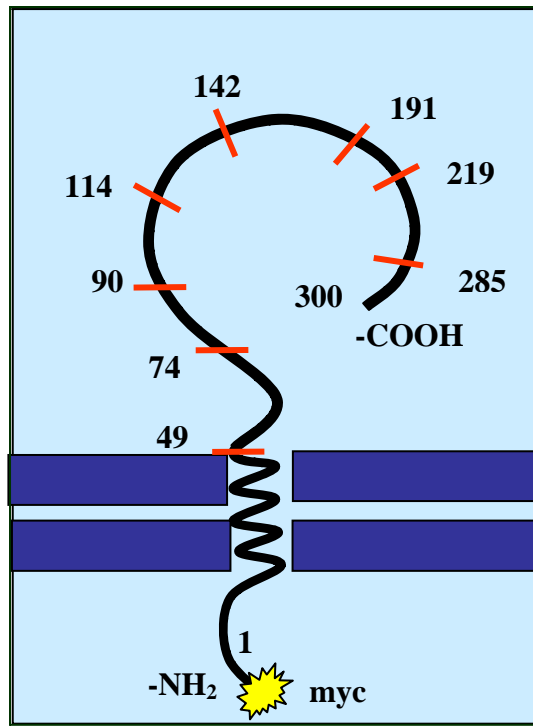


Figura 7. Schema mutanti di CD38.

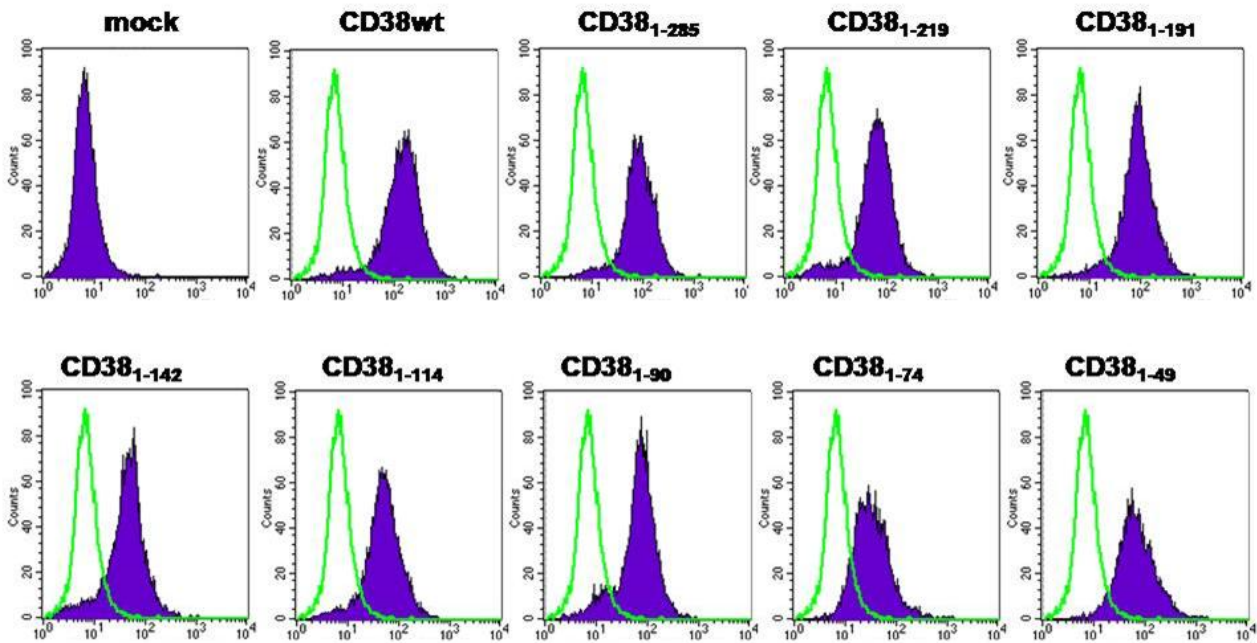


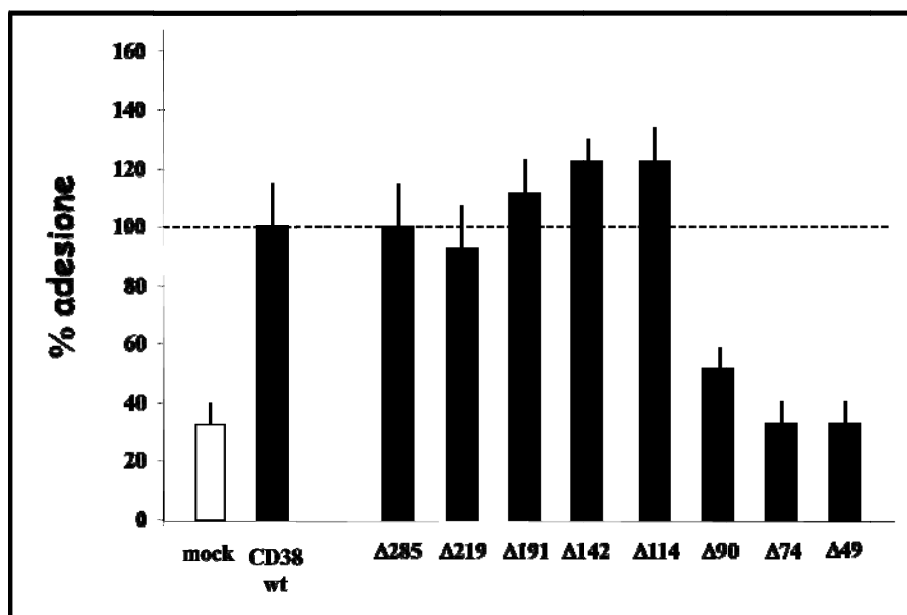
Figura 8. Analisi al citofluorimetro dei cloni stabili di MT2. Cellule MT2 trasfettate con CD38 full-length e i mutanti di delezione : CD38<sub>1-285</sub>, CD38<sub>1-219</sub>, CD38<sub>1-191</sub>, CD38<sub>1-142</sub>, CD38<sub>1-114</sub>, CD38<sub>1-90</sub>, CD38<sub>1-74</sub>, CD38<sub>1-49</sub> fusi al myc-tag e cellule MT2.mock sono state colorate mediante intrastaining con anticorpo anti-myc coniugato FITC. All'espressione di tutti i mutanti (in viola) è sovrapposto il controllo negativo (in verde) costituito dalle cellule MT2.mock.



### Test di adesione dei cloni MT2 alle cellule HUVEC

Poiché l'adesione CD38-mediata è estremamente debole e dinamica il suo studio richiede l'utilizzo di condizioni sperimentali in cui le interazioni statiche mediate dalle integrine siano minimizzate. A tale scopo è stato utilizzato un *saggio di adesione dinamica*. Il grafico riportato in **figura 9** mostra che le cellule MT2 trasfettate con i mutanti CD38<sub>1-285</sub>, CD38<sub>1-219</sub>, CD38<sub>1-191</sub>, CD38<sub>1-142</sub>, CD38<sub>1-114</sub> mantengono la stessa capacità di legare le HUVEC delle cellule trasfettate con il CD38wt. Viceversa, quelle trasfettate con il mutante CD38<sub>1-90</sub> mostrano una sostanziale diminuzione di adesione alle HUVEC rispetto al CD38wt, ulteriormente ridotta nei mutanti CD38<sub>1-74</sub>, CD38<sub>1-49</sub>. In questi ultimi due mutanti la percentuale di adesione ottenuta è confrontabile con quella rilevata per le MT2 mock di controllo, prive di CD38.

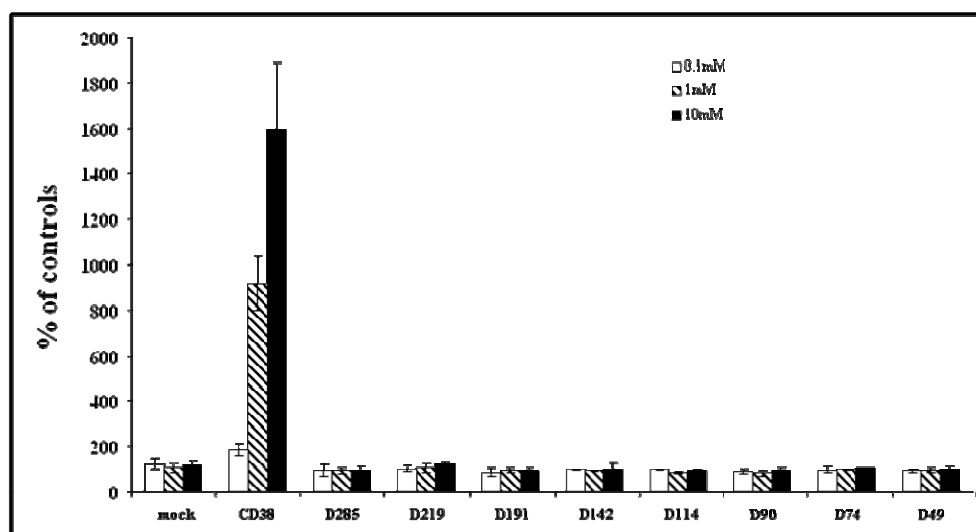
Questo dato indica che la sequenza aminoacidica compresa tra la posizione 114 e 74 risulta cruciale per la funzione adesiva di CD38.



**Figura 9. Saggio di binding:** % di adesione alle HUVEC rispetto al controllo delle cellule MT2.CD38 wt e trasfettate con CD38<sub>1-285</sub>, CD38<sub>1-219</sub>, CD38<sub>1-191</sub>, CD38<sub>1-142</sub>, CD38<sub>1-114</sub>, CD38<sub>1-90</sub>, CD38<sub>1-74</sub>, CD38<sub>1-49</sub>. La barra tratteggiata rappresenta il binding massimale ottenuto incubando le HUVEC con le cellule MT2.CD38 wt.

## Valutazione dell'attività ectociclasica

CD38 è un ectoenzima poiché possiede nella porzione extracellulare un dominio ADP-ribosil ciclasico. Allo scopo di verificare se il dominio enzimatico di CD38 fosse implicato nell'interazione con CD31 è stata valutata l'attività ecto-ciclasica sia nella molecola full-length che in tutti i mutanti di delezione. Le cellule trasfettate sono state incubate con Nicotinammide Guanina Dinucleotide (NGD), un analogo del NAD, che viene convertito ad opera delle ADP-ribosil ciclasi come CD38 in GDP ribosio ciclico (cGDPR). A differenza del cADPR, il cGDPR è un prodotto fluorescente stabile che può essere rilevato nel surnatante (63). In **figura 10** si può osservare come l'attività ecto-enzimatica di CD38 sia rilevabile solo nelle cellule trasfettate con la molecola wild-type e risulti invece totalmente assente nelle cellule trasfettate con tutte le forme tronche. Ciò indica che il dominio enzimatico di CD38 non partecipa all'attività adesiva della molecola. Infatti i mutanti CD38<sub>1-285</sub>, CD38<sub>1-219</sub>, CD38<sub>1-191</sub>, CD38<sub>1-142</sub>, CD38<sub>1-114</sub> pur avendo perso tale attività, mostrano una capacità di aderire alle HUVEC completa. Tale dato è sorprendente in quanto dati di letteratura avevano individuato l'attività catalitica di CD38 in diversi residui amminoacidici compresi tra la posizione 125 e la posizione 226. I nostri esperimenti suggeriscono un ruolo anche per i residui dal 226 al 285.



**Figura 10. Attività enzimatica di CD38 wt e dei mutanti di delezione:** L'attività ecto-ciclasica è stata valutata misurando la conversione dell'NGD ( $\square$  = 0.1nM,  $\square$  = 1nM,  $\blacksquare$  = 10nM) nell'analogo fluorescente GDPR da parte di cellule MT2 trasfettate con il cDNA di CD38 wt e delle forme mutanti. Ciascuna barra rappresenta la media  $\pm$  DS di 3 esperimenti indipendenti. Eccitazione  $\lambda=300$  nm ed emissione  $\lambda=410$  nm. Asse Y= % di fluorescenza rispetto al controllo non trattato a  $\lambda=410$  nm.

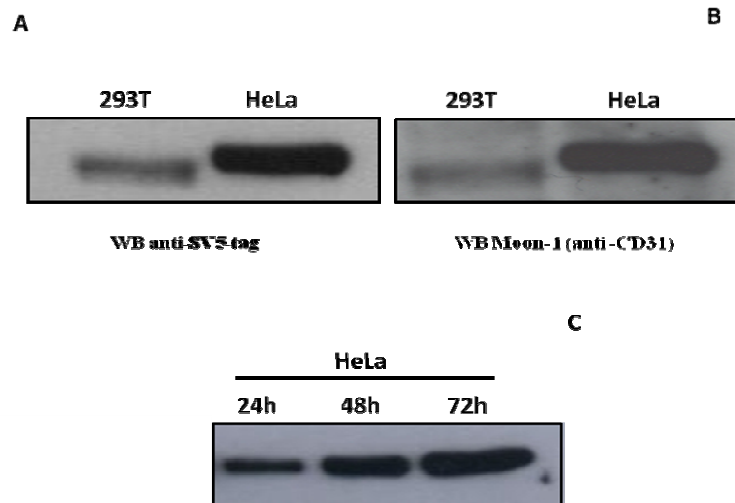
## **Produzione e caratterizzazione del costrutto CD31-hIg**

L'adesione cellulare è un processo molto complesso che prevede la partecipazione di diverse molecole. Per validare i risultati ottenuti negli esperimenti di adesione delle MT2, esperimenti i mutanti di CD38, alle HUVEC, l'interazione tra CD31 e CD38 è stata testata in un sistema privo di altre molecole in grado di influenzare il legame fra le due cellule utilizzate nello studio.

A questo scopo la porzione extracellulare di CD31 è stata fusa con i domini CH2 e CH3 delle IgG1 umane e con il tag SV5. Il cDNA di CD31 è stato clonato a valle della sequenza segnale delle IgG umane, con il vantaggio di ottenere, dopo trasfezione, la proteina chimerica direttamente nel terreno di coltura.

Al fine di identificare il sistema cellulare con la migliore resa di trasfezione l'espressione del costrutto CD31-hIg è stata valutata in due diverse linee cellulari comunemente utilizzate all'interno del nostro laboratorio (HeLa e 293T). L'analisi dei surnatanti di coltura ottenuti dalla trasfezione delle due linee cellulari è stata eseguita mediante western blot. La membrana è stata decorata con due anticorpi diretti verso porzioni diverse della proteina ricombinante: un anticorpo specifico per il tag SV5 (**figura 11A**) e Moon1, un anticorpo specifico per la proteina CD31 (**figura 11B**). Entrambi hanno mostrato che cellule HeLa producono una maggiore quantità di proteina rispetto alle cellule della linea 293T. Le cellule HeLa sono state successivamente utilizzate per esperimenti di cinetica, in cui il surnatante di coltura è stato raccolto a tempi diversi dalla trasfezione (24h, 48h, 72h) e sottoposto ad analisi mediante western blot. La **figura 11C** mostra che la quantità di proteina nel surnatante si accumula nel tempo, raggiungendo il livello massimo a 72h dalla trasfezione. Per tale ragione negli esperimenti successivi la produzione della proteina chimerica è stata effettuata sempre in cellule HeLa raccogliendo il surnatante di coltura dopo 72h dalla trasfezione.

La proteina CD31-hIg così prodotta è stata purificata mediante cromatografia per affinità, quantizzata allo spettrofotometro ed utilizzata per valutare il legame con i vari mutanti di delezione.



**Figura 11. Produzione del costrutto CD31-hIg da parte di cellule HeLa e 293T.** L'analisi western blot effettuata mediante un anticorpo anti-SV5 tag (A) e anti CD31 (Moon-1) (B) de surnatanti di coltura di cellule HeLa e 293T trasfettate con il cDNA codificante per CD31-hIg, produce per entrambi una banda a circa 130kDa come atteso. È evidente una maggiore concentrazione di CD31-hIg nel surnatante raccolto dopo trasfezione delle cellule HeLa. (C) **Time course di produzione della proteina CD31-hIg in cellule HeLa.** L'analisi Western blot anti-SV5 tag dei surnatanti di coltura di cellule HeLa trasfettate con il cDNA codificante per la proteina CD31-hIg, raccolti a 24h-48h-72h mostra una produzione massima della proteina chimerica a 72h dalla trasfezione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Newman, P., and Newman, D. (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23,953-964.
2. Albelda, S.M., Oliver, P.D, Romer, L.H, and. Buck, C.A. (1990) *J Cell Biol.* 110,1227-1237.
3. Nakada, M.T., Amin, K., Christofidou-Solomidou, M., O'Brien, C.D., Sun, J., Gurubhagavatula, I., Heavner, G.A., Taylor, A.H., Paddock, C., Sun, Q.H, Zehnder, J.L., Newman, P.J., Albelda, S.M., and DeLisser, H.M. (2000) *J. Immunol.* 164,452-462.
4. Vaporciyan, A.A., DeLisser, H.M., Yan, H.C., Mendiguren, I.I., Thom, S.R., Jones, M.L., Ward, P.A., and Albelda, S.M. (1993) *Science.* 262,1580-1582.
5. Newman P.J. (1994) The role of PECAM-1 in vascular cell biology. In Platelet-Dependent Vascular Occlusion. Fitzgerald, G.A., Jennings, L.K., and Patrono, C. editors. *The New York Academy of Science*, New York. 165-174.
6. Newman, P.J. (1997) *J. Clin. Invest.* 99,3-8.
7. Newman, P.J. (1999) *J. Clin. Invest.* 103,5-9.
8. Ilan, N., and Madri, J.A. (2003) *Curr. Opin. Cell. Biol.* 15,515-524.
9. Goldberger, A., Middleton, K.A, Oliver, J.A., Paddock, C., Yan, H.C., DeLisser, H.M., Albelda, S.M., and Newman, P.J. (1994) *J. Biol. Chem.* 269,17183-17191.
10. Albelda, S.M., Muller, W.A., Buck, C.A., and Newman, P.J. (1991) *J. Cell. Biol.* 114,1059-1068.
11. Muller, W.A., Weigl, S.A., Deng, X., and Phillips, D.M. (1993) *J. Exp. Med.* 178,449-460.
12. Liao, F., Huynh, H.K., Eiroa, A., Greene, T., Polizzi, E. and Muller, W.A. (1994) *J. Exp. Med.* 182,1337-1343.
13. Wakelin, M.W., Sanz, M.J., Dewar, A., Albelda, S.M., Larkin, S.W., Boughton-Smith, N., Williams, T.J., and Nourshargh, S. (1996) *J. Exp. Med.* 184,229-239.

14. Duncan, G.S., Andrew, D.P., Takimoto, H., Kaufman, S.A., Yoshida, H., Spellberg, J., Luis de la Pompa, J., Elia, A., Wakeham, A., Karan-Tamir, B., Muller, W.A., Senaldi, G., Zukowski, M.M., and Mak, T.W. (1999) *J. Immunol.* 162,3022-3030.
15. Thompson, R.D., Noble, K.E., Larbi, K.Y., Dewar, A., Duncan, G.S., Mak, T.W., and Nourshargh, S. (2001) *Blood.* 97,1854-1860.
16. Rainger, G.E., Buckley, C., Simmons, D.L., and Nash, G.B. (1997) *Curr. Biol.* 7,316-325.
17. Luu, N.T., Rainger, G.E., Buckley, C., and Nash, G.B. (2003) *J. Vasc. Res.* 40,467-479.
18. Wu, Y., Stabach, P., Michaud, M., and Madri, J.A. (2005) *J. Immunol.* 175,3484-3491.
19. Liao, F., Ali, J., Greene, T., and Muller, W.A. (1997) *J. Exp. Med.* 185,1349-1357.
20. Muller, W.A., Berman, M.E., Newman, P.J., DeLisser, H.M., and Albelda, S.M. (1992) *J. Exp. Med.* 175,1401-1404.
21. Piali, L., Hammel, P., Uherek, C., Bachmann, F., Gisler, R.H., Dunon, D., and Imhof, B.A. (1995) *J. Cell. Biol.* 130,451-460.
22. Buckley, C.D., Doyonnas, R., Newton, J.P., Blystone, S.D., Brown, E.J., Watt, S.M., and Simmons, D.L. (1996) *J. Cell. Sci.* 109,437-442.
23. Prager, E., Sunder-Plassmann, R., Hansmann, C., Koch, C., Holter, W., Knapp, W., and Stockinger, H. (1996) *J. Exp. Med.* 184,41-50.
24. Treutiger, C.J., Heddini, A., Fernandez, V., Muller, W.A., and Wahlgren, M. (1997) *Nat. Med.* 12,1405-1408.
25. Fernandez, J.E., Deaglio, S., Donati, D., Beusan, I.S., Corno, F., Aranega, A., Forni, M., Falini, B., and Malavasi, F. (1998) *J. Biol. Regul. Homeost. Agents.* 12,81-91
26. Jackson, D.G., and Bell, J.I. (1990) *J. Immunol.* 144,2811-2815.
27. Liu, Q., Kriksunov, I.A., Graeff, R., Munshi, C., Lee, H.C., and Hao, Q. (2005) 13,1331-1339.
28. Zubiaur, M., Fernandez, O., Ferrero, E., Salmeron, J., Malissen, B., Malavasi, F., and Rancho, J. (2002) *J. Biol. Chem.* 277,13-22.

29. Howard, M., Grimaldi, J.C., Bazan, J.F., Lund, F.E., Santos-Argumedo, L., Parkhouse, R.M., Walseth, T.F., and Lee, H.C. (1993) *Science*. 262,1056-1059.
30. Lee, H.C. (2001) *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41,317-345.
31. Guse, A.H. (2002) *Curr. Mol. Med.* 2,273-282.
32. Kumagai, M., Coustan-Smith, E., Murry, D.J., Silvennoinen, O., Murti, G.P., Evans, W.E., Malavasi, F., and Campana, D. (1995) *J. Exp. Med.* 181,1101-1110.
33. Silvennoinen, O., Nishigaki, H., Kitanaka, A., Kumagai, M., Ito, C., Malavasi, F., Lin, Q., Conley, M.E., and Campana, D. (1996) *J. Immunol.* 156,100-107.
34. Deaglio, S., Mallone, R., Baj, G., Arnulfo, A., Dianzani, U., and Malavasi, F. CD38/CD31, a receptor/ligand system ruling adhesion and signalling in human leukocytes. In: Mehta K., Malavasi, F. editors. (2000) Human CD38 and related molecules. *Basel:Karger.* 75:99-120.
35. Savarino, A., Bottarel, F., Calosso, L., Feito, M.J., Bensi, T., Bragardo, M., Rojo, J.M., Pugliese, A., Abbate, I., Capobianchi, M.R., Dianzani, F., Malavasi, F., and Dianzani, U. (1999) *FASEB J.* 13,2265-2276
36. Savarino, A., Bensi, T., Chiocchetti, A., Bottarel, F., Mesturini, R., Ferrero, E., Calosso, L., Deaglio, S., Ortolan, E., Buttò, S., Cafaro, A., Katada, T., Ensoli, B., Malavasi, F., and Dianzani, U. (2003) *FASEB J.* 17,461-463
37. Morra, M., Zubiaur, M., Terhorst, C., Sancho, J., and Malavasi, F. (1998) *FASEB J.* 12,581-592.
38. Ausiello, C.M., LaSala, A., Ramoni, C., Urbani, F., Funaro, A., and Malavasi, F. (1996) *Cell Immunol.* 92,197-201.
39. Ausiello, C.M., Urbani, F., LaSala, A., Funaro, A., and Malavasi, F. (1995) *Eur. J. Immunol.* 25,1477-1480.
40. Funaro, A., Reinis, M., Trubiani, O., Santi, S., Di Primio, R., and Malavasi, F. (1998) *J. Immunol.* 160,2238-2247.
41. Grubhagavatula, I., Amrani, Y., Pratico, D., Ruberg, F.L., Albelda, S.M., and Panettieri, R.A.Jr. (1998) *J. Clin. Invest.* 101,212-222.
42. Okamoto, H., Takasawa, S., and Nata, K. (1997) *Diabetologia.* 40,1485-1491.

43. Ikehada, F., Satoh, J., Nata, K., Tohgo, A., Nakazawa, T., Kato, I., Kobayashi, S., Akiyama, T., Takasawa, S., Toyota, T., and Okamoto, H. (1998) *J. Clin. Invest.* 102,395-401.
44. Mallone, R., Ferrua, S., Morra, M., Zocchi, E., Mehta, K., Notarangelo, L.D., and Malavasi, F. (1998) *J. Clin. Invest.* 101,2821-2830.
45. Yasue, T., Nishizumi, H., Aizawa, S., Yamamoto, T., Miyake, K., Mizoguchi, C., Uehara, S., Kikuchi, Y., and Takatsu, K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94,10307-10312.
46. Yamada, M., Mizuguchi, M., Otsuka, N., Ikeda, K., and Takahashi, H. (1997) *Brain Res.* 756,52-60.
47. Zupo, S., Rugarli, E., Dono, M., Tamburelli, G., Malavasi, F., and Ferrarini, M. (1994) *Eur. J. Immunol.* 24,1218-1222.
48. Zupo, S., Isnardi, L., Megna, M., Massara, R., Malavasi, F., Dono, M., Cosulich, E., and Ferrarini, M. (1996) *Blood.* 88,1365-1374.
49. Goldmacher, V.S., Bourret, L.A., Levine, B.A., Rasmussen, R.A., Pourshadi, M., Lambert, J.M., and Anderson, K.C. (1998) *Blood.* 84,3017-3022.
50. Kramer, G., Steiner, G., Fodinger, D., Fiebiger, E., Rappersberg, C., Binder, S., Hofbauer, J., and Marberger, M. (1995) *J. Urol.* 154,1636-1641.
51. Vigano, A., Sarasella, M., Rusconi, S., Ferrante, P., and Clerici, M. (1998) *Lancet.* 352,1905-1906.
52. Vallario, A., Chiosi, M., Adami, F., Montagna, L., Deaglio, S., Malavasi, F., and Caligaris-Cappio, F. (1999) *Br. J. Hematol.* 105,441-444.
53. Gallay, N., Anani, L., Lopez, A., Colombat, P., Binet, C., Domenech, J., Weksler, B.B., Malavasi, F., and Herault, O. (2007) *Cancer Res.* 16,8624-8632.
54. Umar, S., Malavasi, F., and Mehta, K. (1996) *J. Biol. Chem.* 271,15922-15927.
55. Funaro, A., Horenstein, A.L., Calosso, L., Morra, M., Tarocco, R.P., Franco, L., De Flora, A., and Malavasi, F. (1996) *Int. Immunol.* 8,1643-1650.
56. Losy, J., Niezgoda, A., and Wender, M. (1999) *J. Neuroimmunol.* 99,169-172.
57. Serebruany, V.L., Murugesan, S.R., Pothula, A., Semaan, H., and Gurbel, P.A. (1999) *Cardiology.* 9,50-55.



58. Eugenin, E.A., Gamss, R., Buckner, C., Buono, D., Klein, R.S., Schoenbaum, E.E., Calderon, T.M., and Berman, J.W. (2006) *J. Leukoc. Biol.* 79,444-452.
59. Liao, F., Ali, J., Greene, T., and Muller, W.A. (1997) *J. Exp. Med.* 185,1349-1358.
60. Liao, F., Schenkel, A.R., and Muller, W.A. (1999) *J. Immunol.* 163,5640-5648.
61. Hoshino, S., Kukimoto, I., Kontani, K., Inoue, S., Kanda, Y., Malavasi, F., Katada, T. (1997) *J Immunol* 158(2),741-747.
62. Di Niro, R., Ziller, F., Florian, F., Crivella, S., Stebel, M., Bestagno, M., Burrone, O., Bradbury, A.R., Secco, P., Marzari R., Sblattero D. (2007) *BMC Biotechnol* 1,7-46;
63. Ferrero, E., Orciani, M., Vacca, P., Ortolan, E., Crivella, S., Titti, F., Saccucci, F., and Malavasi, F. (2004) *BMC Immunology* 5,21-34.

**SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE**

**Anno Accademico 2008/09**

*Production of bio-farmaceuticals in plants*

Prof. Luca Santi

05/12/08

*Le cellule Mesenchimali Staminali per il trattamento delle malattie neurologiche*

Dott. Antonio Uccelli

12/12/08

*Interazioni geni - ambiente nella eziologia della SM: studi sui gemelli*

Dott. Marco Salvetti

15/12/08

*Patologia della radice aortica: dalla clinica alla biologia molecolare"*

Prof. Giuseppe Faggian

18/12/08

*La malattia celiaca*

Dott. Riccardo Troncone

09/01/09

*Porpora trombocitopenica autoimmune: nuovi orientamenti fisiopatologici e terapeutici*

Dott. Francesco Zaja

13/01/09

*Interazioni geni - ambiente nella eziologia della sclerosi multipla:*

*studi sui gemelli*

Dott. Marco Salvetti

27/01/09

**NON SOLO MOTONEURONI:**

**IL CONTRIBUTO DEL MUSCOLO SCHELETRICO ALLA PATOGENESI DELLA SCLEROSI  
LATERALE AMIOTROFICA**

Prof. Antonio Musarò

12/02/09

*Ruolo dei polimorfismi dei geni della pigmentazione nell'induzione di mutazioni somatiche nei  
melanomi*

Prof.ssa G. Bianchi Scarra'

12/02/09

*Linee guida per il riscontro diagnostico sulla morte improvvisa*

Prof. Gaetano Thiene

25/02/09

**LA PROTEOMICA: UN NUOVO MODO DI GUARDARE AL MONDO DELLE PROTEINE**

Prof. Piero Pucci

CELLULE STAMINALI TUMORALI: IMPLICAZIONI TERAPEUTICHE

Prof. Giorgio Stassi

18/03/09

*Le nanotecnologie applicate alla medicina*

Prof. G. Peluso

19/03/09

*Enzima P e il Social Network per l'Innovazione*

Dott. Salvatore Timpanaro

28/03/09

*Patologia dei tumori cerebrali. Recenti acquisizioni in tema di diagnosi e prognosi*

Dott. Davide Schiffer

22/04/09

*Polycystin-1, the product of the PKD1 gene mutated in Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease (ADPKD), is an orphan receptor regulating cell migration and polarity*

Dott.ssa Anna Boletta

28/04/09

*Polarized inflammation in tumour development*

Prof. Antonio Sica

30/04/09

*Effetti anti-steatogeni ed anti-tumoriali degli agonisti del recettore dell'ormone tiroideo*

Prof. Amedeo Columbano

05/06/09

*Ipercolesterolemia e progressione di malattia in patologia umana*

Prof. Giuseppe Poli

*Neurotossicità delle proteine 'misfolded' nelle malattie del motoneurone*

Prof. Angelo Poletti

12/05/09

*The molecular bases of chromosome segregation*

dr. Andrea Musacchio

14/05/08

*Il Doping ormonale: aspetti clinici e legislativi*

Prof. L. Di Luigi

21/05/09

*Role of Raf in tumorigenesis*

Prof. M. Baccharini

03/06/09

*l Lupus Eritematoso Cutaneo: quadro clinico ed immunopatologico*

Prof. E. Berti

06/07/09

## **CONGRESSI FREQUENTATI II ANNO :**

- **22° ITALIAN MEETING ON ADP-RIBOSYLATION REACTIONS** FACOLTÀ DI FARMACIA, UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE LARGO DONEGANI 2, NOVARA, ITALY 8-9 OTTOBRE 2009

## **COMUNICAZIONI A CONGRESSI II ANNO :**

- **Platelets 2008: 5th International Symposium. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA. October 15-18.** “ESTROGEN AND ITS PRECURSOR DEHYDROEPIANDROSTERONE DIRECTLY AFFECT PLATELET FUNCTION WITH OPPOSITE EFFECTS”  
A. Rastoldo, C. Sarasso, S. Reneri, S. Baldassarri, M. Zanfa, A. Bagarotti, C. Di Vito, A. Bertoni, F. Sinigaglia
- **21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Shanghai 2-7 Agosto 2009**  
“*INHIBITION OF THROMBIN INDUCED PLATELET AGGREGATION BY DEHYDROEPIANDROSTERONE-SULFATE*”  
Rastoldo Alessandro, Sarasso Chiara, Bagarotti Alessandra, Bertoni Alessandra, Sinigaglia Fabiola

## **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-CB1/CB2 receptors”. J Thromb Haemost. 2008 Oct;6(10):1772-9. Epub 2008 Jul 19.