

Università degli Studi del Piemonte Orientale “Amedeo Avogadro”



Dottorato di Ricerca in Medicina Molecolare *Ciclo XXIII*

Relazione 3° anno

Produzione di una linea stabile di cellule eucariotiche in grado di secernere la particella ricombinante di Dane (HBV, capside virale e envelope virale) non infettiva

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 ≥ 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:

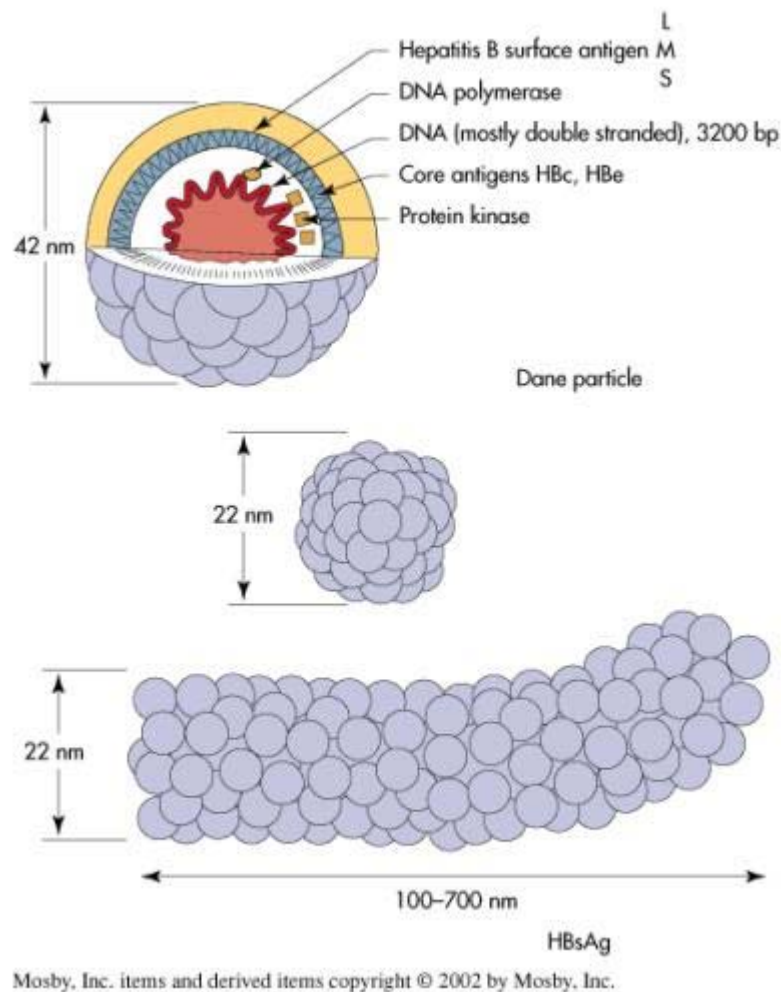
- il virus dell'epatite della marmotta (woodchuck hepatitis virus: WHV);
- il virus dell'epatite dello scoiattolo (ground squirrel hepatitis virus: GSHV);
- il virus dell'epatite B dell'anatra (duck hepatitis B virus: DHBV);
- altri virus ancora non bene caratterizzati capaci di infettare sia mammiferi (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.



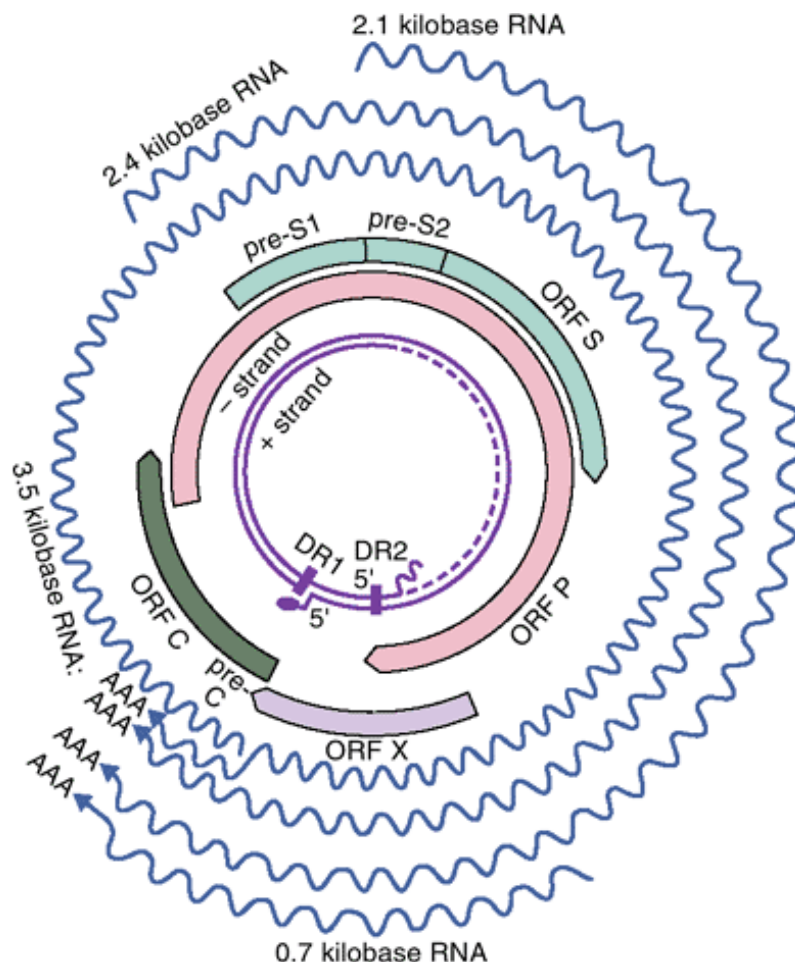
Le "particelle di Dane" altro non sono che i virioni infettanti dell'HBV e la loro presenza nel siero è indicativa di attiva replicazione virale nel fegato. Sono costituite da un involucro esterno lipoproteico (envelope) di 7 nm, contenente tutti gli antigeni di superficie del virus e da un rivestimento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

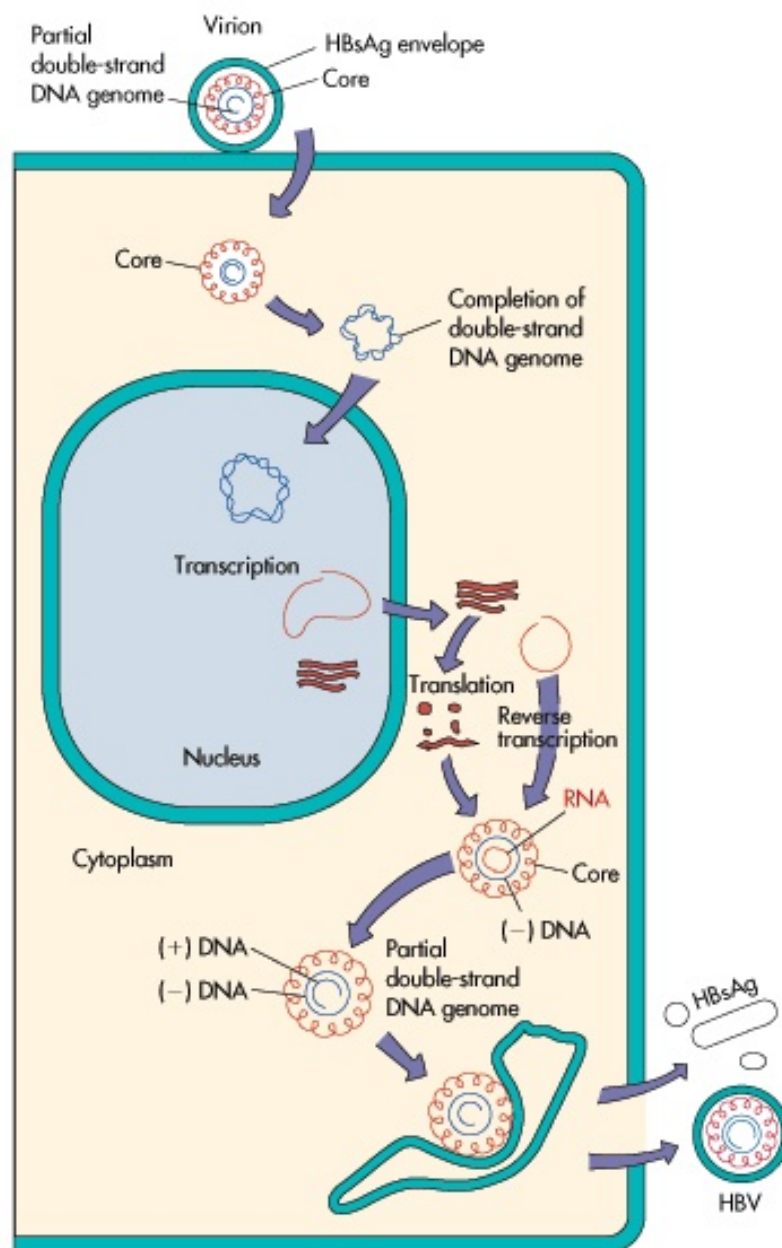
Il cccDNA viene quindi trascritto, ad opera di una RNA-polimerasi DNA-dipendente della cellula dell'ospite, in forme multiple di RNA genomico e subgenomico, tutte a polarità positiva, le quali si distinguono per la differente lunghezza e funzione. Nell'evolversi del ciclo riproduttivo, una parte dell'RNA 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 2×10^5 sostituzioni/per sito/per anno è nettamente inferiore a quello di altri virus con meccanismi replicativi simili quali l'HIV. E' verosimile che l'estrema compattezza del genoma virale sia uno dei fattori limitanti per la produzione di mutanti biologicamente efficienti. [30,31]

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

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

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

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

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

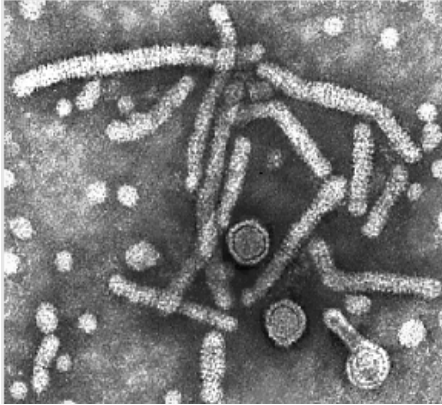
- Le varianti della regione preC si caratterizzano per l'incapacità di esprimere l'antigene nucleocapsidico "e" che rappresenta, assieme all'antigene del core, il naturale bersaglio della risposta cellulomediata dell'ospite, mantenendo comunque conservate le più importanti funzioni biologiche del virus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

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

- Mutazioni nel motivo conservato YMDD del sito catalitico della trascrittasi inversa codificata dal gene P alterano la sintesi del DNA virale e sono state correlate alla resistenza alla lamivudina, un farmaco antivirale utilizzato per la terapia delle epatopatie HBV-relate. Sempre a carico del gene P altre mutazioni puntiformi sembrano interferire con la sintesi delle catene di DNA.
- Rare e ancora senza particolare significato sono le mutazioni a carico del gene X in corrispondenza del quale sono state descritte sequenze integrate troncate, associate a delezioni, fusioni con il gene C e sviluppo di carcinoma epatocellulare.[47]

SCOPO DEL LAVORO

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 sferiche e filamentose sono costituite solo dall'involucro lipoproteico e mancano di nucleocapside 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. 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 capsido, il genoma e la DNA-polimerasi formano il core della particella virale.[17]

In letteratura sono state identificate, nel siero di pazienti con infezione da HBV, particelle di Dane DNA-negative, ovvero con la stessa struttura delle particelle di Dane vere e proprie (sono infatti costituite dall'involucro lipoproteico esterno di HBsAg e del rivestimento proteico interno HBcAg), ma mancanti sia del DNA che della polimerasi virale, risultando di fatto incapaci di infettare. Il significato biologico di queste particelle è ancora sconosciuto. [48]

Il progetto nato dalla collaborazione tra l'Università del Piemonte Orientale e la DiaSorin spa si occuperà dello sviluppo di una strategia che permetta la produzione, da parte di un sistema eucariotico, di particelle di Dane DNA-negative ricombinanti, che saranno successivamente utilizzate come controllo positivo in un test capace di identificare le proteine HBcAg.

Nel dettaglio il programma di ricerca prevede l'utilizzo di diverse strategie al fine di individuare la migliore per ottenere cloni stabili di cellule eucariotiche in grado di produrre particelle di Dane DNA negative.

MATERIALI E METODI-1

1. TRASFORMAZIONE

Come recipiente dei plasmidi originati sarà utilizzato il ceppo batterico *Escherichia coli*, specie JM109 (Promega). A 100 µl di batteri competenti saranno aggiunti 10 µl del prodotto di ligazione e incubati 10' in ghiaccio. Successivamente sarà indotto uno shock termico (42°C per 45'') per permettere l'ingresso del vettore nella cellula batterica. Le cellule saranno poi incubate 2' in ghiaccio e 30' con 900 µl di LB broth a 37°C ed infine verranno piastrati su piastre Petri contenenti terreno selettivo (LB-agar-ampicillina 50 µg/ml) e lasciati crescere 12-18 ore a 37°C.

2. SCREENING COLONIE

Le colonie cresciute saranno screenate mediante PCR per verificare la presenza del DNA codificante le proteine di interesse all'interno del vettore utilizzando una coppia di primers specifici per pcDNA3.1:

➤ For -TGGGAGGTCTATATAAGCAGA-

➤ Rev -GCAACTAGAAGGCACAGTCGA-

che appaiano a circa 100 bp prima e dopo il multiple cloning site, 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 MgCl₂.

Le condizioni di amplificazione utilizzate saranno le seguenti:

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

I prodotti di amplificazione saranno controllati su gel di agarosio.

3. ESTRAZIONE

Una colonia positiva sarà fatta crescere in 300 ml di LB brothAmp⁺ per 16 pre a 37° e il DNA estratto utilizzando il kit QIAGEN seguendo le indicazioni del produttore.

4. TRASFEZIONE

Le linee cellulari HeLa (a) ed HepG2 (c) saranno trasfettate con Lipofectamina seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

La linea cellulare 293T (b) sarà trasfettata con il metodo del calcio fosfato:

- il giorno prima della trasfezione le cellule saranno piastrate in capsule Petri, in terreno DMEM + 10% FBS, alla concentrazione di 4×10^6 .
- 20 µg di DNA saranno miscelati a 50 µl di CaCl₂ (0,2M) e portati al volume di 500 µl con acqua milli Q.
- alla soluzione di calcio e DNA saranno aggiunti goccia a goccia su vortex, 500 µl di tampone HBS (NaCl 280mM, Hepes 50mM, Na₂HPO₄ 1,5mM).
- la miscela di trasfezione (1ml finale) sarà aggiunta al terreno di coltura.
- dopo 4 ore dalla trasfezione il terreno sarà cambiato con DMEM senza FBS
- i surnatanti saranno raccolti (punto 5)
- analizzati inizialmente in cinetica (24-48-72 ore) (punto 6).

5. RACCOLTA SURNATANTI

I surnatanti delle cellule trasfettate saranno trattati secondo il seguente protocollo:

- Raccolti in tubi
- Centrifugati 5 min a 1500 rpm per eliminare eventuali residui cellulari
- Filtrati con filtri 0,2 µm
- Conservati a 4°C

6. ANALISI SURNATANTI

I surnatanti saranno analizzati sia in western blot sia in ELISA utilizzando anticorpi forniti dalla DiaSorin

Per valutare la positività all'HBsAg e all'HBcrAg dei surnatanti ottenuti dopo la trasfezione, i campioni sono stati analizzati tramite due kit ELISA prodotti e forniti direttamente dalla ditta DiaSorin.

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

7. SELEZIONE DI CLONI STABILI

La linea cellulare che, utilizzando le metodiche al punto 6, sarà identificata come quella che produce in maggiore quantità le particelle di Dane DNA-negative, sarà quindi ritrasfettata e dopo 48/72 ore dalla trasfezione messa in selezione con Neomicina (come indicato dalla ditta produttrice del vettore di espressione pcDNA3.1).

Saranno così identificati cloni di cellule in grado di sopravvivere alla selezione, ovvero che avranno integrato il DNA plasmidico contenente le sequenze nucleotidiche che codificano per le proteine HBsAg e HBcrAg.

I cloni saranno :

- posti in coltura separatamente in piastre petri
- i surnatanti saranno ritestati per confermare la produzione delle particelle di Dane DNA-negative
- congelati e posti in azoto liquido per la conservazione.

8. FOTO PARTICELLE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO

Le foto al microscopio elettronico saranno effettuate presso il CNR di Torino, dipartimento di Virologia Vegetale.

MATERIALI E METODI-2

1. AMPLIFICAZIONE DNA

Il DNA codificante le proteine HBsAg e HBcrAg sarà amplificato mediante PCR a partire da quello ottimizzato dalla ditta GeneArt secondo le seguenti modalità:

HBsAg = 1200bp

HBsAg_synth_FW -CCC**AAGCTT**ATGGGCGGCTGG- Tm68°

HBsAg_synth_RW -GGC**CTCGAGTC**AGATGTACACCCACAGGCAGAAG- Tm68°

NB In rosso è indicato il sito di taglio per HindIII; in verde il sito di taglio di XhoI; in grassetto sono evidenziate le basi che appaiano sul DNA, in azzurro il codone di stop.

La miscela di reazione sarà composta dal tampone (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 M di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA polimerasi (5U/l) (Invitrogen) e 1-1,5-2mM di MgCl₂ (una prima reazione indicherà la concentrazione di magnesio ottimale da utilizzare per amplificare questo segmento).

Le condizioni di amplificazione utilizzate saranno :

94° 5'
94° 30''
63° 30''
72° 45''
72 10' } 30 cicli

Qualora la temperatura di annealing non dovesse risultare corretta potrà essere modificata magari utilizzando un touchdown 65°-55°.

HBcrAg = 580bp

HBcrAg_synth_FW - CCC**AAGCTT**ATGCAGCTGTTCCACCTGTGTC- Tm68°

HBcrAg_synth_RW -CGC**CTCGAGTC**ATCAGCGC- Tm52°

NB In rosso è indicato il sito di taglio per HindIII; in verde il sito di taglio di XhoI; in grassetto sono evidenziate le basi che appaiano sul DNA.

La miscela di reazione sarà composta dal tampone (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 M di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA

polimerasi (5U/l) (Invitrogen) e 1-1,5-2mM di MgCl₂ (una prima reazione indicherà la concentrazione di magnesio ottimale da utilizzare per amplificare questo segmento).

Le condizioni di amplificazione utilizzate saranno :

94° 5'
94° 30''
TD64-54° } 30'' 30 cicli
72° 30''
72° 5'

Qualora la temperatura di annealing non dovesse risultare corretta potrà essere modificata magari utilizzando un touchdown 65°-55°.

I prodotti di PCR saranno controllati su gel di agarosio e successivamente purificati mediante kit QIAGEN secondo le indicazioni del produttore.

2. DIGESTIONE

Il DNA amplificato e il vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1 saranno digeriti per 2 ore 37°C con gli enzimi di restrizione: HindIII e XhoI (Buffer 2). I frammenti di DNA ottenuti saranno separati tramite elettroforesi su gel di agarosio e purificati mediante QIAquick Gel Extraction (QIAGEN) secondo le indicazioni del produttore.

3. LIGASI

I DNA codificanti per HBsAg e HBcrAg e il vettore di espressione digeriti come descritto in precedenza saranno ligati mediante azione della T4 DNA ligasi (1-2 U; Invitrogen), la reazione di ligasi sarà condotta a 22° C per 2 ore.

4. TRASFORMAZIONE

Come recipiente dei plasmidi originati sarà utilizzato il ceppo batterico *Escherichia coli*, specie JM109 (Promega). A 100 µl di batteri competenti saranno aggiunti 10 µl del prodotto di ligazione e incubati 10' in ghiaccio. Successivamente sarà indotto uno shock termico (42°C per 45'') per permettere l'ingresso del vettore nella cellula batterica. Le cellule saranno poi incubate 2' in ghiaccio e 30' con 900 µl di LB broth a 37°C ed infine verranno piastrati su piastre Petri contenenti terreno selettivo (LB-agar-ampicillina 50 µg/ml) e lasciati crescere 12-18 ore a 37°C.

5. SCREENING COLONIE

Le colonie cresciute saranno screenate mediante PCR per verificare la presenza del DNA codificante le proteine di interesse all'interno del vettore utilizzando una coppia di primers specifici per pcDNA3.1:

➤ For -TGGGAGGTCTATATAAGCAGAG-

➤ Rev -GCAACTAGAAGGCACAGTCGAG-

che appaiano a circa 100 bp prima e dopo il multiple cloning site, in una miscela di reazione composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 μ M di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA polimerasi (5U/ μ l) (Invitrogen) e 2mM di $MgCl_2$.

Le condizioni di amplificazione utilizzate saranno le seguenti:

94° 5'

94° 30''

TD 60-50° 30''

72° 30''

72° 10'

} 35 cicli

I prodotti di amplificazione saranno controllati su gel di agarosio.

6. ESTRAZIONE

Una colonia positiva sarà fatta crescere in 300 ml di LB brothAmp+ per 16 pre a 37° e il DNA estratto utilizzando il kit QIAGEN seguendo le indicazioni del produttore.

7. SEQUENZIAMENTO DEL DNA

Il DNA ottenuto sarà sequenziato da una ditta esterna, come da accordi con DiaSorin.

8. TRASFEZIONE

Le linee cellulari HeLa (a) ed HepG2 (c) saranno trasfettate con Lipofectamina seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

La linea cellulare 293T (b) sarà trasfettata con il metodo del calcio fosfato:

- il giorno prima della trasfezione le cellule saranno piastrate in capsule Petri, in terreno DMEM + 10% FBS, alla concentrazione di 4×10^6 .
- 20 μg di DNA (10 μg di HBsAg e 10 μg di HBcrAg) saranno miscelati a 50 μl di CaCl_2 (0,2M) e portati al volume di 500 μl con acqua milli Q.
- alla soluzione di calcio e DNA saranno aggiunti goccia a goccia su vortex, 500 μl di tampone HBS (NaCl 280mM, Hepes 50mM, Na_2HPO_4 1,5mM).
- la miscela di trasfezione (1ml finale) sarà aggiunta al terreno di coltura.
- dopo 4 ore dalla trasfezione il terreno sarà cambiato con DMEM senza FBS
- i surnatanti saranno raccolti (punto 9)
- analizzati inizialmente in cinetica (24-48-72 ore) (punto 10).

9. RACCOLTA SURNATANTI

I surnatanti delle cellule trasfettate saranno trattati secondo il seguente protocollo:

- Raccolti in tubi
- Centrifugati 5 min a 1500 rpm per eliminare eventuali residui cellulari
- Filtrati con filtri 0,2 μm
- Conservati a 4°C

10. ANALISI SURNATANTI

I surnatanti saranno analizzati sia in western blot sia in ELISA utilizzando anticorpi forniti dalla DiaSorin

Per valutare la positività all'HBsAg e all'HBcrAg dei surnatanti ottenuti dopo la trasfezione, i campioni sono stati analizzati tramite due kit ELISA prodotti e forniti direttamente dalla ditta DiaSorin.

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

11. SELEZIONE DI CLONI STABILI

La linea cellulare che, utilizzando le metodiche al punto 6, sarà identificata come quella che produce in maggiore quantità le particelle di Dane DNA-negative, sarà quindi ritrasfettata e dopo 48/72 ore dalla trasfezione messa in selezione con Neomicina (come indicato dalla ditta produttrice del vettore di espressione pcDNA3.1).

Saranno così identificati cloni di cellule in grado di sopravvivere alla selezione, ovvero che avranno integrato il DNA plasmidico contenente le sequenze nucleotidiche che codificano per le proteine HBsAg e HBcrAg.

I cloni saranno :

- posti in coltura separatamente in piastre petri
- i surnatanti saranno ritestati per confermare la produzione delle particelle di Dane DNA-negative
- congelati e posti in azoto liquido per la conservazione.

12. FOTO PARTICELLE AL MICROSCOPIO ELETTRONICO

Le foto al microscopio elettronico saranno effettuate presso il CNR di Torino, dipartimento di Virologia Vegetale

MATERIALI E METODI-3

1. AMPLIFICAZIONE DNA

Il DNA codificante le proteine HBsAg e HBcrAg sarà amplificato mediante PCR a partire dal DNA di HBV clonato in pCR2.1 e fornito dalla DiaSorin secondo le seguenti modalità:

LHBsAg = 1200bp

HBsAg_wt_FW -CCC**AAGCTT**ATGGGAGGTTGGTCATCAA**AACC**- Tm68°

HBsAg_wt_RW-GGC**CTCGAGT**TAAATGTATACCCAGAGACAA**AAG**- Tm66°

NB In rosso è indicato il sito di taglio per HindIII; in verde il sito di taglio di XhoI; in grassetto sono evidenziate le basi che appaiano sul DNA.

La miscela di reazione sarà composta dal tampone (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 M di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA polimerasi (5U/l) (Invitrogen) e 1-1,5-2mM di MgCl₂ (una prima reazione indicherà la concentrazione di magnesio ottimale da utilizzare per amplificare questo segmento).

Le condizioni di amplificazione utilizzate saranno :

94° 5'

94° 30''

62° 30''

72° 1'

} 30 cicli

72 10'

Qualora la temperatura di annealing non dovesse risultare corretta potrà essere modificata magari utilizzando un touchdown 65°-55°.

HBcrAg = 580bp

HBcrAg_wt_FW- CCC**AAGCTT**ATGCAACTTTTT**CACCTCTGCCTAATCATCTC**-Tm74°

HBcrAg_wt_RW - CGC**CTCGAGTCA**TCTAACAACAGTAGTT**TCCGGAAGT**-Tm70°

NB In rosso è indicato il sito di taglio per HindIII; in verde il sito di taglio di XhoI; in grassetto sono evidenziate le basi che appaiano sul DNA.

La miscela di reazione sarà composta dal tampone (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 M di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA polimerasi (5U/l) (Invitrogen) e 1-1,5-2mM di MgCl₂ (una prima reazione indicherà la concentrazione di magnesio ottimale da utilizzare per amplificare questo segmento).

Le condizioni di amplificazione utilizzate saranno :

94° 5'

94° 30''

65° 30''

72° 30''

30 cicli

72 5'

Qualora la temperatura di annealing non dovesse risultare corretta potrà essere modificata magari utilizzando un touchdown 65°-55°.

I prodotti di PCR saranno controllati su gel di agarosio e successivamente purificati mediante kit QIAGEN secondo le indicazioni del produttore.

Per i punti dal 2 al 13 vedere la strategia 2.

MATERIALI E METODI-4

1. AMPLIFICAZIONE DNA

Il DNA codificante le proteine HBsAg e HBcrAg sarà amplificato mediante PCR a partire dal DNA di HBV clonato in pCR2.1 e fornito dalla DiaSorin secondo le seguenti modalità:

LHBsAg = 1200bp

HBsAgFW-CCCAAGCTT**ATGGGAGGTTGGTCATCAAAACC-** Tm64°

HBsAgRW-GGCGCGCGCTTAAATGTATACCCAGAGACAAAAG- Tm66°

In rosso è evidenziata la sequenza codificante per il sito di taglio di HindIII; in viola è evidenziata la sequenza codificante per il sito di taglio di BsshII; in grassetto i nucleotidi che appaiano.

Miscela di reazione composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 M di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA polimerasi (5U/l) (Invitrogen) e 1-1,5-2mM di MgCl₂ (una prima reazione indicherà la concentrazione di magnesio ottimale da utilizzare per amplificare questo segmento).

Le condizioni di amplificazione utilizzate saranno:

94° 5'

94° 30''
*61° 30''
72° 30''

30 cicli

72 5'

*La temperatura di annealing è stata scelta tenendo conto delle T_m dei primers utilizzati. Qualora non dovesse risultare corretta potrà essere modificata magari utilizzando un touchdown 65°-55°.

HBcrAg = 582bp

HBcrAgFW1-cttctcaagttggcgggagacgtggagtccaaccagggcc**ATGCAACTTTTTTCACCTCTGCC-**
Tm64°

HBcrAgRW -CGCCTCGAG**CTAACATTGAGATTCCCGAGATTG-** Tm68°

In rosso è evidenziata la sequenza codificante per un primo tratto di peptide 2A; in verde è evidenziata la sequenza codificante per il sito di taglio di XhoI; in grassetto i nucleotidi che appaiano.

Miscela di reazione composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 M di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA polimerasi (5U/l) (Invitrogen) e 1-1,5-2mM di MgCl₂ (una prima reazione indicherà la concentrazione di magnesio ottimale da utilizzare per amplificare questo segmento).

Le condizioni di amplificazione utilizzate saranno:

94° 5'
94° 30''
*61° 30'' } 30 cicli
72° 30''
72° 5'

*La temperatura di annealing è stata scelta tenendo conto delle T_m dei primers utilizzati. Qualora non dovesse risultare corretta potrà essere modificata magari utilizzando un touchdown 65°-55°.

HBcrAg = 634bp

HBcrAgFW2-

GGCGCGCGCC**GGAAAGCGGAGA***gcaccgggtgaaacagactttgaatttgac***cttctcaagttggcgggagac**- Tm66°

HBcrAgRW -CGCCTCGAGCTAACATTGAGATTCCCGAGATTG- Tm68°

In corsivo è evidenziata la sequenza codificante per un tratto di peptide 2A(in grassetto nero la porzione che appaia), in rosa è evidenziata la sequenza codificante per il sito di taglio della Furina; in viola è evidenziata la sequenza codificante per il sito di taglio di BsshII.

Miscela di reazione composta dal tampone di reazione (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), 0,5 M di ciascun oligonucleotide, 0,2 mM di una miscela dei quattro nucleotidi, e 1,25 U Taq DNA polimerasi (5U/l) (Invitrogen) e 1-1,5-2mM di MgCl₂ (una prima reazione indicherà la concentrazione di magnesio ottimale da utilizzare per amplificare questo segmento).

Le condizioni di amplificazione utilizzate saranno:

94° 5'
94° 30''
*61° 30'' } 30 cicli
72° 30''
72° 5'

*La temperatura di annealing è stata scelta tenendo conto delle T_m dei primers utilizzati. Qualora non dovesse risultare corretta potrà essere modificata magari utilizzando un touchdown $65^\circ-55^\circ$.

Per i punti dal 2 al 13 vedere la strategia 2

LINEE CELLULARI

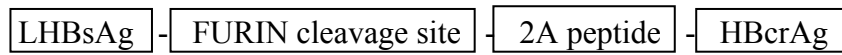
HeLa: cellule tumorali immortalizzate altamente stabilizzate derivanti da un cancro della cervice uterina; **HepG2:** cellule derivanti da epatocarcinoma; **HEK 293T:** cellule embrionali di rene umano che contengono stabilmente integrato nel genoma la sequenza genica codificante l'antigene T del Virus Vacuolante della Scimmia (SV40), necessaria per un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici recanti l'origine di replicazione di SV40.

STRATEGIA 1

La prima strategia per il clonaggio e l'espressione dell' HBsAg e HBcrAg si basa sulla possibilità di clonare entrambe le proteine nello stesso vettore di espressione eucariotica (nel nostro caso pcDNA3.1) inserendo tra queste il peptide 2A (derivante da una sequenza del virus FMDV) che permette di ottenere un unico trascritto di RNA, poi tradotto nelle due proteine. Una volta tradotta la prima fusa al peptide, il ribosoma continuerà con la traduzione della seconda determinando una produzione bilanciata delle proteine. Nel nostro caso, potendo il peptide 2A modificare la struttura tridimensionale della proteina cui è fuso, sarà inserito un sito specifico di taglio per la furina (RKRR), che nel processamento delle proteine nell'apparato di Golgi staccherà il peptide dalla nostra proteina di interesse.

A tale scopo le sequenze per l'HBsAg e per l'HBcrAg naturali sono state inviate alla ditta GeneArt che le ha ottimizzate per l'espressione in cellule umane, interponendo tra le due la sequenza del peptide 2A da noi fornita.

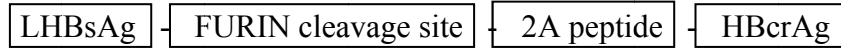
Come da accordi la sequenza nucleotidica:



è stata clonata dalla stessa GeneArt nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1 inserendo anche i siti unici di restrizione HindIII al 5' e XhoI al 3' al fine di permetterne un successivo sub clonaggio qualora se ne presenti la necessità.

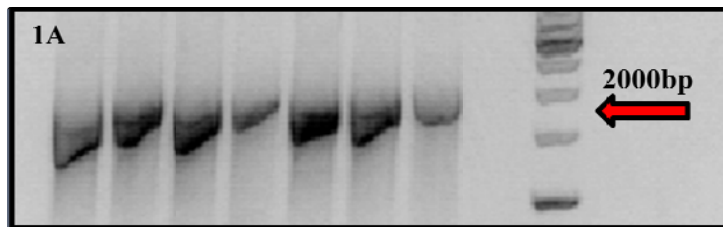
RISULTATI-1

Il DNA fornito dalla GeneArt :



è stato utilizzato per trasformare batteri competenti al fine di ottenere una riserva dello stesso da utilizzare nel corso del progetto.

Colonie di batteri competenti trasformati con il DNA sopracitato sono state screenate mediante PCR (Fig.1A)



Il DNA è stato estratto da una delle colonie positive e utilizzato per trasfettare cellule 293T , HeLa ed HepG2 come indicato nei metodi.

I surnatanti raccolti a 24h-48h-72h sono stati analizzati con kit ELISA specifici per le proteine HBsAg e HBcrAg (DiaSorin) con i seguenti risultati:

- ❖ ANALISI PER LA PRESENZA DI HBsAg: negativo per tutti i surnatanti raccolti
- ❖ ANALISI PER LA PRESENZA di HBeAg:

SURNATANTI		SURNATANTI			
293T+FBS	293T-FBS	293T	HepG2	HeLa	HeLa li
72h	72h	72h			
2,072	2,063	2,038	0,03	1,904	1,99

Nella tabella sono mostrati i risultati ottenuti mediante test ELISA specifico per HBcrAg su surnatanti raccolti dopo 72h dalla trasfezione. Come si può notare la linea cellulare HepG2 ha dato esito prossimo allo zero per la presenza di HBcrAg, per questo motivo si è deciso di non utilizzarla più per i successivi esperimenti. Al contrario sia le 293T che le HeLa trasfettate con il calcio fosfato o la lipofectamina hanno dato valori di OD superiori al controllo positivo dello stesso test. Le prime due colonne della tabella inoltre mettono a confronto i risultati ottenuti analizzando i surnatanti di una trasfezione su 293T in presenza di siero, con una in assenza di siero. Come si può vedere non è apprezzabile nessuna differenza.

Il risultato negativo nel test ELISA per HBsAg su tutti i surnatanti raccolti per ogni linea cellulare, probabilmente dipendente dall'utilizzo del costrutto complesso sopraindicato, però ha portato alla decisione di non proseguire con gli esperimenti programmati per la strategia 1.

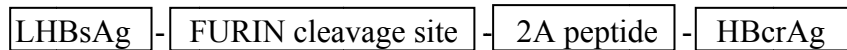
STRATEGIA 2

La strategia 1 potrebbe non rappresentare la migliore strategia per il clonaggio delle proteine HBsAg e HBcrAg poiché la produzione in quantità proporzionali delle due proteine potrebbe rivelarsi non solo non indispensabile, ma anche penalizzante per il corretto assemblamento delle particelle di Dane DNA-negative.

Per questo motivo parallelamente alla strategia 1, le due proteine sono state clonate separatamente, ottenendole per amplificazione dal DNA fornito dalla GeneArt, nel vettore di espressione eucariotico pcDNA3.1 sfruttando appositi siti di restrizione.

RISULTATI-2

La sequenza nucleotidica :



fornita dalla GeneArt è stata utilizzata come stampo per ottenere il DNA codificante per le singole proteine LHBsAg e HBcrAg mediante specifici primers in PCR. (Fig. 2A, 2B)

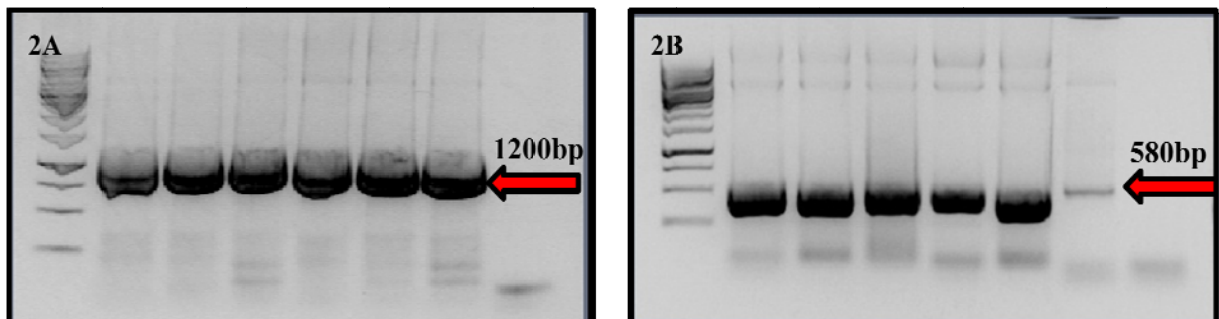
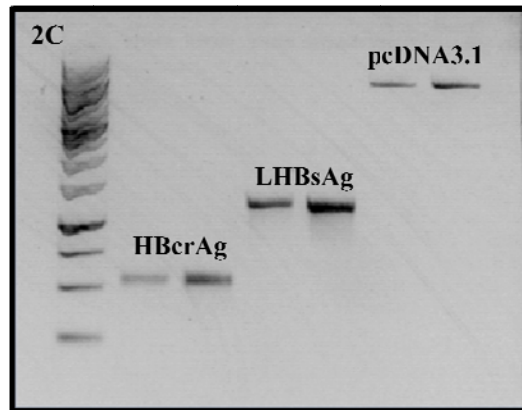
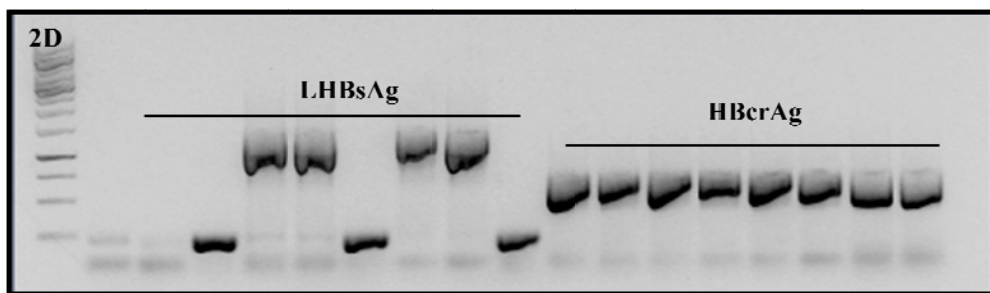


Figura 2: A mostra un gel di agarosio su cui sono stati separati i prodotti di amplificazione ottenuti per la proteina LHBsAg; B mostra un gel di agarosio su cui sono stati separati i prodotti di amplificazione ottenuti per la proteina HBcrAg

Il DNA ottenuto è stato quindi digerito con specifici enzimi di restrizione (HindIII e XhoI) per permetterne il clonaggio nel vettore di espressione pcDNA3.1.(Fig.2C)



I due inserti ottenuti sono stati ligati all'interno di pcDNA3.1 e con il DNA sono stati trasformati batteri competenti. Le colonie cresciute sono state scenate mediante PCR (Fig. 2D)



Il DNA estratto da una colonia positiva per proteina è stato sequenziato e successivamente utilizzato per trasfettare cellule 293T, HeLa ed HepG2 come indicato nei metodi.

I surnatanti raccolti ogni 24 ore fino a 6 giorni sono stati analizzati in ELISA.

ELISA per HBsAg		24 h				48 h				72 h				96 h				6 days			
		293T	HEP	HeLa	HeLa li	293T	HEP	HeLa	HeLa li	293T	HEP	HeLa	HeLa li	293T	HEP	HeLa	HeLa li	293T	HEP	HeLa	HeLa li
L-HBsAg synt	15µg	0	0	0	0	0,598	0	0	0	1,901	0	0	0	1,988	0	0	0	1,942	0	0	0
HBcrAg synt	15µg	2,021	0,075	1,44	2,024	2,045	0,221	2,028	2,033	2,025	0,424	2,008	2,018	2,019	0,472	2,016	2,017	2,038	0,471	2,032	2,038
S-HBsAg mut 404	15µg	0,037	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-HBsAg synt+ HBcrAg synt	10µg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L-HBsAg synt+ HBcrAg synt+S-HBsAg	10+10+10µg	1,998	0,022	0,238	0,989	2,045	0,066	1,587	2,028	2,019	0,118	2,004	2,014	2,02	0,158	2,016	2,043	2,037	0,199	2,028	2,028
L-HBsAg synt+ HBcrAg synt+S-HBsAg	5+10+15µg	1,699	0,025	0,052	1,885	2,028	0,083	0,167	2,046	1,999	0,101	0,273	2,014	2,021	0,17	0,317	2,031	2,016	0,282	0,349	0

ELISA per HBcrAg		24 h				48 h				72 h				96 h				6 days			
		293T	HEP	HeLa	HeLa li	293T	HEP	HeLa	HeLa li	293T	HEP	HeLa	HeLa li	293T	HEP	HeLa	HeLa li	293T	HEP	HeLa	HeLa li
L-HBsAg synt	15µg	0	0	0	0,002	0	0	0,004	0	0	0	0	0	0,006	0	0	0	0	0	0	0
HBcrAg synt	15µg	0,037	0	0,018	0	0,095	0	0,03	0,156	0	0,016	0,061	0,185	0,006	0,021	0,062	0,103	0,001	0,017	0,055	
S-HBsAg mut 404	15µg	2,012	0,042	1,126	2,014	2,029	0,197	1,963	2	2,038	0,278	2,016	2,044	2,048	0,492	2,012	2,03	2,037	0,465	1,976	2,032
L-HBsAg synt+ HBcrAg synt	10µg	2,014	0,042	0,335	2,005	2,026	0,173	0,942	2,009	2,05	0,286	0,969	2,034	2,044	0,327	1,197	2,058	2,039	0,321	0,827	2,03
L-HBsAg synt+ HBcrAg synt+S-HBsAg	10+10+10µg	2,003	0,029	0,181	0,295	2,021	0	1,194	0,637	2,04	0,01	0,446	0,854	2,041	0,015	0,527	1,124	2,039	0,015	0,458	0,733
L-HBsAg synt+ HBcrAg synt+S-HBsAg	5+10+15µg	2,013	0,014	0,626	1,736	2,045	0,086	1,376	2,035	2,04	0,142	1,592	2,028	2,052	0,179	1,786	2,032	2,05	0,192	1,578	2,026

Come si può osservare nelle tabelle, la linea HepG2 ha sempre valori molto bassi di OD, ad indicare che probabilmente questa linea cellulare non è adatta alla produzione di HBsAg e HBcrAg con queste metodiche, per questo motivo è stato deciso di non utilizzarle per gli esperimenti successivi. I valori di OD ottenuti trasfettando le cellule HeLa con calcio fosfato o con lipofectamina sono del tutto paragonabili. Si è quindi deciso di proseguire gli esperimenti trasfettando questa linea solo con calcio fosfato. Sarebbe interessante il dato secondo cui a parità di DNA trasfettato, nelle HeLa il sesto punto di trasfezione (ultima riga, tabella gialla, colonna HeLa 6 days, tripla trasfezione) mostra un'OD di molto inferiore rispetto al secondo punto di trasfezione (sHBsAg da sola); in questa condizione infatti, potrebbero essersi formate le particelle di Dane, il cui assemblamento rende meno disponibile al riconoscimento da parte del test delle sHBsAg. In ultimo non è ancora sufficientemente evidente una differenza tra la resa di trasfezione su 293T rispetto alle HeLa, cosa che non permette di identificare la migliore linea cellulare da utilizzare in questo progetto di ricerca. Per questo motivo sono state trasfettate nuovamente sia 293T che HeLa con calcio fosfato.

HeLa	T1	T2	T3	T4 no FBS	T5	T6 no FBS	T7
	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK
SMALL	1,251	1,962	1,850	0,819	0,707	0,804	2,040
L10+C10+S10	0,836	0,311	0,210	0,074	0,139	0,198	1,296
L5+C10+S15	0,303	0,239	0,163	1,988	0,062	0,035	0,902

293T	T1	T2	T3	T4 no FBS	T5	T6 no FBS	T7
	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK
SMALL	1,889	2,004	1,942	1,965	2,021	1,979	1,995
L10+C10+S10	1,891	0,913	0,841	0,460	1,678	1,625	0,838
L5+C10+S15	0,478	1,209	1,082	1,741	1,594	1,634	1,587

HeLa	T1	T2	T3	T4 no FBS	T5	T6 no FBS	T7
	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK
CORE	1,46	0,87	1,17	0,00	1,99	0,03	1,95
LARGE+CORE	0,88	0,76	0,31	0,87	2,04	0,00	1,42
L10+C10+S10	0,99	0,55	0,31	0,13	0,17	0,19	1,20
L5+C10+S15	0,20	0,17	0,12	1,77	0,05	0,02	0,49

293T	T1	T2	T3	T4 no FBS	T5	T6 no FBS	T7
	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK	OD-BLK
CORE	1,894	2,019	1,961	0,396	2,054	1,511	1,503
LARGE+CORE	2,015	1,999	1,978	1,913	2,037	1,785	1,118
L10+C10+S10	2,004	1,586	1,547	0,863	1,107	1,495	1,089
L5+C10+S15	0,500	1,208	1,133	1,671	0,613	0,702	1,129

In arancione sono evidenziate le OD dei surnatanti di cellule 293T ed HeLa analizzati con Kit per HBsAg; in verde sono evidenziate le OD dei surnatanti di cellule 293T ed HeLa analizzati con Kit per HBcrAg

Come si può facilmente osservare le cellule hanno risposto in maniera variabile alle trasfezioni condotte in tempi differenti, sia nel caso delle 293T che delle HeLa.

E' però evidente che nell'ultima trasfezione (T7) le OD ottenute analizzando i surnatanti della linea cellulare HeLa dopo 72 ore dalla trasfezione sono più alte in entrambi i test rispetto a quelle precedenti .

Per avere un dato più significativo sulla resa delle trasfezioni sulle 293T rispetto alle HeLa, i surnatanti trasfettati con smallHBsAg sono stati quantizzati, sempre in ELISA confrontando le OD ottenute con quelle di una curva di taratura a concentrazione nota.

HeLa	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
SMALL	29,46	38,14	21,15	25,08	50,65	24,41	606,82

293T	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng/ml
SMALL	18,41	33,05	22,44	0,4	0,35	0	34,99

Come si può osservare nella tabella, le effettive concentrazioni della proteina HBsAg sono molto basse in tutti i surnatanti analizzati per quanto riguarda le trasfezioni condotte su cellule 293T, mentre nei surnatanti delle trasfezioni condotte su cellule HeLa la concentrazione di HBsAg risulta evidentemente aumentata nel surnatante T7 (in giallo).

In seguito a questa analisi è stato deciso di non procedere con le trasfezioni su cellule 293T in quanto non in grado di produrre elevate concentrazioni in particolare delle proteina HBsAg.

E' stato inoltre deciso di procedere con le trasfezioni su cellule HeLa con l'obiettivo di arrivare ad una concentrazione di proteina nel surnatante di circa 1µg/ml (già ottenuta per un precedente progetto), prima di procedere con le foto al microscopio elettronico per verificare l'eventuale presenza delle particelle di Dane DNA-negative. Qualora non fosse possibile raggiungere la concentrazione desiderata si procederà con metodiche di concentrazione dei campioni quali:

- ultracentrifugazione
- centrifugazione su gradiente di cesio o saccarosio

Sono stati condotti preliminari esperimenti in western blot utilizzando gli anticorpi specifici per HBsAg e HBcrAg forniti dalla DiaSorin.

Al momento non sono stati ottenuti risultati positivi, probabilmente a causa della scarsa concentrazione dei surnatanti utilizzati.

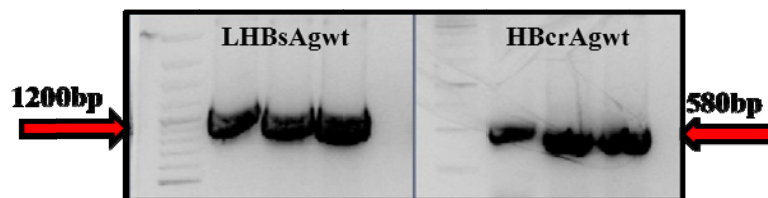
STRATEGIA 3

Potrebbe infine essere interessante paragonare i risultati ottenuti utilizzando il DNA delle proteine HBsAg e HBcrAg ottimizzato con quelli ottenuti partendo dal DNA naturale delle stesse.

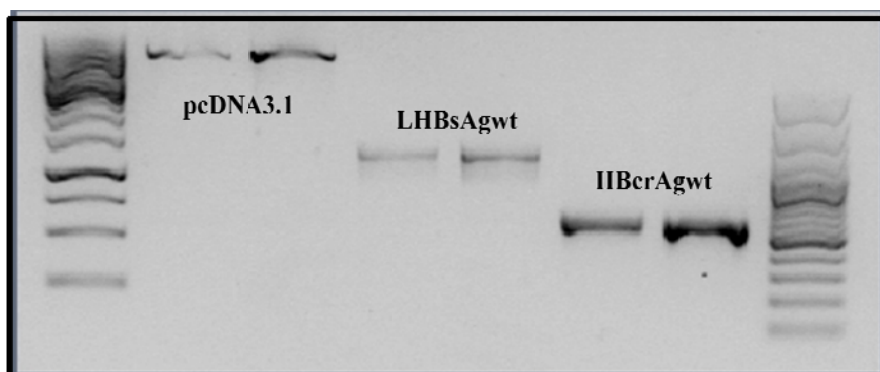
Per questo scopo è stato necessario amplificare le sequenze codificanti le proteine wt a partire dal genoma di HBV (amplificato per PCR e clonato nel vettore pCR2.1) fornito dalla DiaSorin , utilizzando appositi primers recanti specifici siti di restrizione per permetterne il clonaggio nel vettore pcDNA3.1.

RISULTATI-3

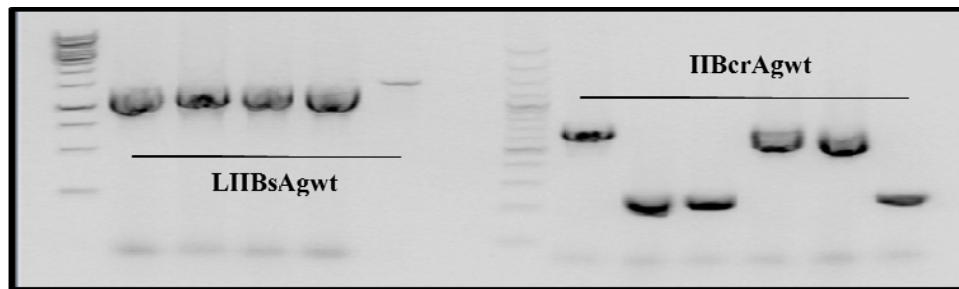
Partendo dal DNA wt del virus dell'Epatite B fornito dalla DiaSorin, mediante specifici primers recanti siti di restrizione utili per il successivo clonaggio in pcDNA3.1, sono state amplificate le sequenze codificanti per la LHBsAg wt e l'HBcrAg .



Dopo essere stato purificato il DNA è stato digerito con gli enzimi di restrizione HindIII e XhoI.



I due inserti ottenuti sono stati ligati all'interno di pcDNA3.1 e con il DNA sono stati trasformati batteri competenti. Le colonie cresciute sono state scenate mediante PCR.



Il DNA estratto da una colonia positiva per proteina è stato sequenziato e successivamente utilizzato per trasfettare cellule 293T, HeLa ed HepG2 come indicato nei metodi.

I surnatanti raccolti a 24h-48h-72h sono stati analizzati con ELISA specifici per le proteine HBsAg e HBcrAg (kit forniti dalla DiaSorin) con i seguenti risultati:

- ❖ ANALISI PER LA PRESENZA DI HBsAg: negativo per tutti i surnatanti raccolti
- ❖ ANALISI PER LA PRESENZA di HBeAg: negativo per tutti i surnatanti raccolti

Il risultato negativo in entrambi i test ha portato alla decisione di non procedere con gli esperimenti riguardanti l'utilizzo delle proteine LHBsAgwt e HBcrAgwt.

STRATEGIA 4

Alla luce di quanto ottenuto applicando le strategie 1 e 2, qualora fosse la strategia 1 a dare il miglior risultato, potrebbe essere interessante interporre alle due sequenze nucleotidiche codificanti per HBsAg e HBcrAg naturali la sequenza del peptide 2A e ottenerne una produzione bilanciata.

Per questo scopo sarà necessario amplificare le sequenze codificanti le proteine a partire dal genoma di HBV (amplificato per PCR e clonato nel vettore pCR2.1) fornito dalla DiaSorin , utilizzando appositi primers recanti sia specifici siti di restrizione per permettere il clonaggio nel vettore pcDNA3.1 sia la sequenza codificante il peptide 2A.

Il DNA così ottenuto sarà poi trasfettato in diverse linee cellulari: HeLa, HepG2 e 293T.

I surnatanti di coltura saranno raccolti e analizzati con anticorpi specifici anti-HBsAg e anti-HBcrAg in western blot e ELISA per verificare la presenza delle proteine, per quantificarle e quindi individuare sistema cellulare tra quelli sopra citati, più adatto alla produzione delle particelle e infine la corretta formazione delle particelle.

Identificata la linea cellulare in grado di produrre in quantità maggiore le particelle di Dane DNA-negative, si procederà con la selezione di cloni trasfettati stabilmente.

Le particelle di Dane DNA-negative saranno successivamente fotografate al microscopio elettronico.

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. Kimura T, Ohno N, Terada N, Rokuhara A, Matsumoto A, Yagi S, Tanaka E, Kiyosawa K, Ohno S, Maki N. "Hepatitis B virus DNA-negative dane particles lack core protein but contain a 22-kDa precore protein without C-terminal arginine-rich domain" *J Biol Chem.* 2005 Jun 10;280(23):21713-9.

SEMINARI INTERNI AL DIPARTIMENTO DI SCIENZE MEDICHE

Anno Accademico 2009/10

Use of MAR epigenetic regulators for therapeutic expression

Prof. Nicolas Mermod

30/11/09

Riunione scuola Dianzani

11-12/12/2009

Controllo funzionale dei linfociti T da parte di adenosina trifosfato (ATP) extracellulare

Dott. Fabio GRASSI

14/12/09

Tecnologia MACS® La soluzione completa per la separazione immunomagnetica

Enrico Gherzi

Product Specialist - Miltenyi Biotec

21/12/09

LSD1, Lysine Specific Demethylase1: insight into a new epigenetic regulator involved in neuronal gene regulation

DR. Elena Battaglioli

20/01/10

Cellule mesenchimali stromali fetali ed adulte: potenziali applicazioni in patologie ischemiche

Prof. Giulio Alessandri

21/01/10

Dal difetto genetico all'infiammazione

Dott. Luigi Maiuri

28/01/10

R & D of magnetic-nanoparticles and carriers for drugs

Dott. Giovanni Baldi

09/02/10

A novel antiviral mechanism mediated by the chemokine receptor CCR6

Prof. Alfredo GARZINO-DEMO

11/02/10

Computational analysis of protein-protein interactions

Prof. Stefano Pieraccini

17/02/10

Il recupero del cammino dopo lo stroke, mediante utilizzo di mezzi robotici, farmacologici e chirurgici

Dott. Stefano CARDA

18/02/10

LE MALATTIE AUTOIMMUNI: DAL LABORATORIO AL PAZIENTE.

La ricerca scientifica a Novara (Convegno IRCAD)

26/02/10 (8,30-18,30)

Basi genetiche del diabete di tipo 1 e della sclerosi multipla: l'esempio della popolazione sarda.

Prof. Francesco Cucca

03/03/10

4D IMAGING OF TUMOR PROTEOLYSIS:IMPACT OF MICROENVIRONMENT

Dott. Bonnie F. Sloane

10/05/10

Prediction of RNA-RNA interaction

Dr. Hakim Tafer

26/05/10

Functional nanocomposite for pharmaceutical application from physicochemical viewpoints

Prof. Mamoru Senna

04/06/10

Nuove strategie anticancro: i microRNA come agenti differenziativi per i tumori solidi

Dott. Carola Ponzetto

10/06/10

Fenotipo e cellule staminali tumorali nei gliomi maligni

Dott.ssa Marta Mellai

Dott.ssa Valentina Cardera

14/06/10

Combating Bioterrorism: New Antidotes for an Old Poison

Dr. Steven R. Ellis

17/06/10

Identificazione di antigeni per la diagnosi e la terapia del carcinoma pancreatico mediante l'analisi sierologica del proteoma

Dott. Franco Novelli

30/06/10

Role of membrane lipids in neuronal synapses organization

Dott. Paola Camoletto

05/07/10

Tissue Transglutaminase, a polyhedric enzyme: friend or foe?

Dott. Dario Fortunati

06/07/10

Ruolo delle micro vescicole nella comunicazione tra cellule

Dott. Giovanni Camussi

06/09/10

Le cellule staminali tumorali: dalla biologia alla clinica

Dott. Ruggero De Maria
22/09/10

New aspects of Cathepsin E functions in host defense mechanisms
Prof. Kenji Yamamoto
22/09/10

Preventing Persisters: Targeting Epigenetic Changes in Cancer Chemotherapy
Dr. Steven R. Ellis
23/09/10

Low-dose Bafilomycin is cytoprotective against Lysosome dysfunction, Implication of an Autophagy-associated therapeutic target for Neurodegenerative disease
Dott. John Shacka
24/09/10

A self-antigen peptidome carried by the human lymph
Prof. Laura Santambrogio
24/09/10

Lezioni introduttive Oncologia
Prof. Albano E
21/05/10-31/05/10-18/06/10

CONGRESSI FREQUENTATI III ANNO :

Fourth European Congress of Virology
Cernobbio, Italy
April 7 – 11, 2010

COMUNICAZIONI A CONGRESSI III ANNO :

Fourth European Congress of Virology Cernobbio, Italy April 7 – 11, 2010

“A NOVEL PANEL OF RECOMBINANT HEPATITIS B SURFACE ANTIGENS MUTANTS”

Sarasso C.^a, Dianzani U.^a, Chiocchetti A.^a, Rigamonti V.^b, Dal Corso A.^c, Capuano F.^c and Osborne S.J.^c

a: Department of Medical Sciences, Università del Piemonte Orientale A. Avogadro, Novara, Italy.

b: Department of Biotechnology and Biosciences, University of Milano-Bicocca, Milan, Italy

c: DiaSorin Research Centre c/o Nerviano Medical Sciences, Viale Pasteur, 10 Nerviano, Milan, Italy

Congresso SIP 2010 Salerno, 14-17 ottobre

“B7h Triggering Inhibits Umbilical Vascular Endothelial Cell Adhesiveness to Tumor Cell Lines and Polymorphonuclear Cells”

Dianzani C, Minelli R, Mesturini R, Chiocchetti A, Barrera G, Boscolo S, **Sarasso C**, Gigliotti CL, Sblattero D, Yagi J, Rojo JM, Fantozzi R, Dianzani U.

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.

Dianzani C, Minelli R, Mesturini R, Chiocchetti A, Barrera G, Boscolo S, **Sarasso C**, Gigliotti CL, Sblattero D, Yagi J, Rojo JM, Fantozzi R, Dianzani U.

“B7h Triggering Inhibits Umbilical Vascular Endothelial Cell Adhesiveness to Tumor Cell Lines and Polymorphonuclear Cells”. J Immunol. 2010 Sep 3.