

Università degli Studi di Padova

Corso di Laurea in Biologia Molecolare



Elaborato di Laurea

**PRODUZIONE DI VIRUS-LIKE PARTICLES INFLUENZALI  
TRAMITE L'ESPRESSIONE DI PROTEINE STRUTTURALI  
VIRALI INGEGNERIZZATE**

Tutor: Dottor Cristiano Salata  
Dipartimento di Medicina Molecolare  
Università degli Studi di Padova

Co-tutor: Dottoressa Marta Toffoletto  
Dipartimento di Medicina Molecolare  
Università degli Studi di Padova

Laureanda: Sara Burato

Anno Accademico 2011/2012



# INDICE

<b>ABSTRACT</b>	1
<b>1. INTRODUZIONE</b>	
1.1 Il virus dell'influenza	2
1.2 Ciclo replicativo	3
1.3 Terapia e vaccinazione: stato dell'arte	4
1.4 VLPs come vaccino anti-influenzale	5
<b>2. MATERIALI E METODI</b>	
2.1 PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )	8
2.2 Elettroforesi su gel di agarosio	8
2.3 Estrazione da gel mediante <i>QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)</i>	9
2.4 Clonaggio	9
2.5 Purificazione del DNA plasmidico tramite <i>QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)</i>	10
2.6 Restrizione enzimatica	10
2.7 Sequenziamento	10
2.8 Preparazione di plasmidi da maxi inoculi tramite <i>Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)</i>	11
2.9 Trasfezione	11
2.10 Purificazione delle particelle simil-virali (VLP) dai surnatanti di trasfezione ( <i>Virion Pelleting</i> ) e preparazione dei lisati cellulari	12
2.11 Elettroforesi di proteine (SDS-PAGE) e Western Blotting	12
<b>3. RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	
3.1 Preparazione dei costrutti codificanti le proteine di fusione	14
3.2 Valutazione dell'espressione delle proteine di fusione e della produzione di VLPs	16
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	19



## ABSTRACT

Il virus dell'influenza è l'agente eziologico di patologie respiratorie acute e infetta cellule epiteliali delle vie aeree superiori, della trachea e dei bronchi, causando epidemie stagionali ed occasionali pandemie.

Il virus dell'influenza è soggetto ad un elevato tasso di mutazione, che ne promuove una continua evoluzione incrementando la capacità di eludere l'immunità e di sviluppare mutazioni che conferiscono farmaco-resistenza. La vaccinazione è pertanto lo strumento più efficace per diminuire l'incorrenza di infezioni dovute al virus influenzale.

Fra le varie metodiche di produzione vaccinale attualmente in fase di studio, una molto promettente è quella basata sulle particelle simil-virali (*VLPs, Virus-like Particles*), formate da proteine virali strutturali capaci di autoassemblarsi e quindi non infettive in quanto prive del corredo genomico virale.

In particolare la proteina di matrice M1 è una proteina molto conservata e promuove la gemmazione del virus *in vivo*. Tuttavia, recenti studi hanno dimostrato che la proteina M1 da sola non riesce a produrre particelle simil-virali in quanto non possiede un segnale intrinseco di indirizzamento alla membrana cellulare e richiede l'interazione con altre proteine virali. Al contrario, è stato ampiamente dimostrato che la proteina di matrice M2 è in grado di generare particelle simil-virali quando espressa in linee cellulari stabilizzate.

In questo lavoro di tesi, è stata valutata la possibilità di produrre VLPs basate sull'espressione della proteina M1 tramite fusione con la proteina di matrice M2.

I risultati ottenuti dimostrano che la proteina di fusione M2-M1 è in grado di formare VLPs e potrebbe rappresentare così un piattaforma per la produzione di vaccini contro il virus dell'influenza.

## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 Il virus dell'influenza

Il virus dell'influenza appartiene alla famiglia degli *Orthomyxoviridae* ed è l'agente eziologico di patologie respiratorie acute a carattere epidemico. In particolare, il virus dell'influenza A può dar luogo ad occasionali pandemie, associate ad un alto tasso di mortalità (Kang S. *et al.*, 2009; Rossman J.S. *et al.*, 2010). Il virus dell'influenza è trasmissibile attraverso contatto diretto od inalazione di secrezioni respiratorie infette e si replica nelle cellule epiteliali di rivestimento delle vie respiratorie superiori, della trachea e dei bronchi.

Esistono tre tipi di virus influenzale: A, B e C, caratterizzati sulla base delle differenze antigeniche delle proteine interne: la nucleoproteina (NP) e la proteina di matrice (M1). Solo i tipi A e B infettano l'uomo. Il virus dell'influenza A, inoltre, è classificabile in ulteriori sottotipi caratterizzati dalla combinazione delle diverse strutture antigeniche delle due glicoproteine di superficie emoagglutinina (HA) e neuraminidasi (NA). Ad oggi sono stati identificati 16 differenti tipi di HA e 9 tipi di NA. HA ed NA sono i principali antigeni verso cui viene scatenata la risposta immunitaria dell'organismo ospite.

Il genoma del virus dell'influenza A è costituito da otto segmenti di RNA monocatenario a polarità negativa, codificanti 11 proteine totali.

PB2, PB1, PA	Tre subunità dell' <i>RNA-polimerasi-RNA-dipendente</i> virale: PB2 recluta l'oligonucleotide d'innescio per la trascrizione dell'RNA virale in RNA a polarità positiva, substrato per i ribosomi della cellula ospite; PB1 è deputata all'allungamento del trascritto
HA	Emoagglutinina, glicoproteina localizzata sull' <i>envelope</i> del virus, coinvolta nei processi di adsorbimento e di penetrazione
NP	Nucleoproteina virale, strettamente associata ai segmenti di RNA genomico
NA	Neuraminidasi, enzima responsabile dell'efficiente liberazione dei virus appena formati
M1 ed M2	Proteine di matrice: M1 oligomerizza a formare un'impalcatura interna al di sotto dell' <i>envelope</i> , M2 è una pompa protonica coinvolta nella scapsidazione; entrambe intervengono nel processo di gemmazione del virus
NS1 ed NS2	Proteine non strutturali: coinvolte nell'esportazione dell'RNA virale dal nucleo verso il citoplasma, nell'evasione della risposta immunitaria, etc

*In tabella sono riportate le proteine funzionali del virus dell'influenza.*

Ogni segmento codifica una singola proteina funzionale, fatto salvo per il segmento 7, da cui derivano entrambe le proteine di matrice, e il segmento 8, che codifica NS1 ed NS2. Infatti, i trascritti ottenuti da questi segmenti genomici subiscono un processo di splicing. Anche il segmento 1, codificante PB1, in alcuni sottotipi di influenza A, dà origine ad un secondo peptide, detto PB1-F2 (Rossman J.S. *et al.*, 2010).

I vari segmenti sono associati alla nucleoproteina (NP) per formare otto complessi virali ribonucleoproteici (vRNP). Il nucleocapside risultante da tali associazioni presenta simmetria elicoidale e al suo interno contiene anche le proteine PB1, PB2 e PA. Esso è connesso all'*envelope* tramite un reticolo proteico formato dall'oligomerizzazione della proteina di matrice M1, che funge da vero e proprio ponte tra *core* e proteine di membrana, interagendo con le code citoplasmatiche di HA, NA ed M2. Pertanto, M1 ha una funzione essenziale nel mantenimento dell'integrità strutturale e morfologica della particella virale.

## 1.2 Ciclo replicativo

L'infezione ha inizio con il riconoscimento e l'interazione dell'emoagglutinina (HA) con le porzioni di acido acetilneuraminico di alcuni recettori posizionati sulla superficie della cellula bersaglio. Tale legame dà inizio ad un processo che porta all'endocitosi dell'intera particella virale. Il pH acido interno all'endosoma attiva la proteina M2, che funge da canale ionico e trasporta ioni idrogeno all'interno del lume abbassandone il pH. L'ambiente acido determina l'attivazione della componente fusogena di HA, che permette la fusione tra la membrana endosomale e l'*envelope* virale, con il successivo rilascio dei complessi vRNP nel citoplasma.

Successivamente, i complessi ribonucleoproteici vengono trasportati nel nucleo dove avviene la loro replicazione e trascrizione. In particolare, l'RNA-polimerasi-RNA-dipendente virale necessita di inneschi oligonucleotidici sintetizzati da una polimerasi cellulare per iniziare la trascrizione del genoma in segmenti di RNA a polarità positiva. Tali prodotti di trascrizione vengono in parte trasportati nel citoplasma dove vengono tradotti in proteine, in parte fungono da stampo per la sintesi dell'RNA genomico della nuova progenie virale. L'assemblaggio del *core* avviene nel nucleo (Rossman J.S. *et al.*, 2010). La maturazione del virione, invece, ha luogo a livello della membrana cellulare apicale, dalla quale si forma l'*envelope*. L'emoagglutinina HA e la neuraminidasi NA, infatti, posseggono un segnale intrinseco di indirizzamento verso zone della membrana particolarmente ricche di colesterolo e sfingolipidi, denominate *lipid rafts*. Le porzioni citoplasmatiche delle due glicoproteine interagiscono con M1, e sembra ne agevolino l'oligomerizzazione (Rossman J.S. *et al.*, 2010). M1 è considerata la *driving force* del processo di gemmazione, in quanto stabilisce interazioni anche con i vRNP, garantendo la corretta incorporazione del genoma nei virioni neoformati.

M1 è la proteina più abbondante nel virus dell'influenza; essa è associata internamente alla membrana plasmatica. È costituita da 252 aminoacidi organizzati in tre domini elicoidali, di cui il centrale è responsabile dell'oligomerizzazione e dell'associazione con i vRNP (Rossman J.S. *et al.*, 2010). La proteina di matrice M2 è il secondo prodotto del gene M, è una proteina integrale di membrana, tetramerica. Ogni monomero è costituito da tre domini: uno extracellulare, un dominio transmembrana, che è il canale protonico, e un endodominio. Quest'ultimo è in parte costituito da un'elica anfipatica, la cui porzione idrofobica è perpendicolare alla membrana plasmatica, e in parte da una coda che interagisce con M1 in fase di morfogenesi (Veit M. *et al.*, 2011).

L'interazione di M1 con M2 sembra svolgere un ruolo importante nel reclutamento di M1 e nell'assemblaggio dei virioni neoformati (Haynes *et al.*, 2009). Infatti, la proteina M2 causa una strozzatura alla base del virione gemmante, portando alla fusione dei due lembi di membrana adiacenti, con conseguente rilascio del virione maturo. La neuraminidasi (NA) svolge un ruolo fondamentale nel rilascio della progenie virale dalla cellula infettata. Questa proteina funge da enzima e catalizza la scissione dell'acido acetilneuraminico dei recettori cellulari o dei glicani del muco, facilitando il distacco dei virioni neoformati.

Il virus dell'influenza è soggetto a un elevato tasso di mutazione dei due antigeni di superficie HA e NA che, essendo i più esposti, sono continuamente soggetti alla selezione dovuta alla risposta immunitaria degli organismi ospite. L'accumulo

di mutazioni puntiformi sui geni che codificano le due glicoproteine (*antigenetic drift*) porta alla comparsa di un nuovo ceppo, geneticamente correlato alle varianti già circolanti del sottotipo a cui appartiene, ma in grado di infettare individui che già erano stati infettati da tale sottotipo. Queste nuove varianti sono responsabili delle epidemie stagionali. Inoltre, il virus dell'influenza A può mutare anche per mezzo dell'*antigenetic shift*, dovuto al fenomeno di riassortimento che occasionalmente si verifica quando due virus che normalmente infettano specie differenti si trovano a coinfectare la stessa cellula di un organismo serbatoio. Questo rimescolamento genetico, permesso dalla segmentazione naturale del genoma, genera un virus totalmente nuovo verso il quale la specie ospite non possiede un'immunità specifica. La conseguenza diretta è la diffusione del virus con modalità pandemiche.

### **1.3 Terapia e vaccinazione: stato dell'arte**

I farmaci più utilizzati nella terapia contro il virus dell'influenza posseggono la capacità di inibire: l'attività di pompa protonica di M2 (amantadina e rimantidina), o quella enzimatica di NA (oseltamivir e zanamivir). Tuttavia, a causa dell'alta frequenza di fenomeni di farmaco-resistenza, dovuti all'alto tasso di variabilità del virus dell'influenza, si ritiene che la vaccinazione rimanga lo strumento più efficace per diminuire l'incidenza di infezioni dovute al virus dell'influenza (Cheng P. *et al.*, 2009).

In Italia, i vaccini fino ad oggi autorizzati sono suddivisi nelle seguenti categorie:

- ⤴ vaccino split, contenente virus influenzali frammentati;
- ⤴ vaccino a subunità, contenente solo gli antigeni di superficie HA e NA;
- ⤴ vaccino virosomiale, contenente gli antigeni di superficie HA e NA legati a virosomi come sistema carrier/adiuvante;
- ⤴ vaccino adiuvato, contenente gli antigeni di superficie emulsionati ad adiuvante oleoso metabolizzabile (MF59);
- ⤴ vaccino intradermico, un vaccino split confezionato in modo da consentirne l'inoculazione nel derma.

Attualmente, le preparazioni vaccinali anti-influenzali contengono le proteine antigeniche HA e NA purificate da diversi isolati appartenenti a vari sottotipi di virus dell'influenza A, circolanti nell'uomo nella specifica stagione d'interesse, insieme a quelle derivate da ceppi del tipo B. Pertanto il vaccino risulta rinnovato ogni anno ed è atto a prevenire l'infezione dei soli ceppi le cui HA ed NA siano rappresentate nel vaccino stesso. Fino ad oggi, queste preparazioni sono state ottenute da virus coltivati in uova embrionate di pollo. Le limitazioni tecnico-economiche associate a tali substrati hanno indotto la comunità scientifica ad incentivare lo sviluppo di piattaforme vaccinali alternative.

Una metodica molto promettente è quella basata sulle particelle simil-virali (*VLPs, Virus-like Particles*), ovvero strutture che mimano il virione, ma che non risultano infettive in quanto sono prive del corredo genomico virale. Queste particelle hanno la capacità di autoassemblarsi e possono essere utilizzate



anche per esporre antigeni sulla loro superficie. La loro produzione avviene in sistemi basati su *baculovirus* oppure tramite l'utilizzo di colture cellulari.

Attualmente, sono già in commercio vaccini basati su VLPs. Nella fattispecie si tratta di vaccini contro l'infezione dal virus dell'Epatite B, virus dotato di envelope come il virus dell'influenza, e contro il Papilloma virus (HPV), a capsido nudo.

#### 1.4 VLPs come vaccino anti-influenzale

È già stato dimostrato come sia possibile produrre VLPs contenenti solamente emoaagglutinina e neuraminidasi (Chen B. J. *et al.*, 2007). Entrambe le proteine, infatti, posseggono un peptide segnale all'N-terminale che le indirizza verso la membrana plasmatica, dove sono strettamente associate a zone altamente ordinate e ad elevato contenuto di colesterolo (Veit M. *et al.*, 2011). La repentina differenza di composizione lipidica della membrana scatena una variazione nella curvatura del doppio strato con conseguenti gemmazione e rilascio di particelle simil-virali contenenti le due glicoproteine di superficie.

Purtroppo, VLPs contenenti solo HA ed NA non sono la soluzione più efficace in quanto i *rafts* lipidici in cui sono inserite sono complessi transienti, che *in vivo* non determinano la loro gemmazione a meno che non intervengano le proteine di matrice del virus (Haynes J. R., 2009). Inoltre, le VLPs che si formano sono poco stabili e non riproducono fedelmente la reale morfologia del virus, con conseguente ridotta immunogenicità.

L'interesse si sta rivolgendo sempre di più verso antigeni interni che siano cross-protettivi e caratterizzati da un basso tasso di mutazione, al fine di conferire una protezione più duratura rispetto a quella fornita dagli antigeni di superficie. In particolare, l'attenzione ricade sulla proteina di matrice M1. Recenti studi condotti con il sistema di espressione basato su *baculovirus* ricombinanti hanno dimostrato come la sola M1 sia in grado di gemmare formando VLPs dalla morfologia molto simile alla particella virale (Kang S. *et al.*, 2009). Tuttavia, la trasfezione di cellule di mammifero con plasmidi recanti la sola sequenza codificante M1 non dà origine a VLPs (Haynes J. R., 2009). Tale evento è imputabile al fatto che M1 non possiede un segnale di localizzazione che ne promuova l'indirizzamento alla membrana plasmatica e probabilmente nel sistema del *baculovirus* ricombinante M1 sfrutta qualche componente caratteristico, per ora ancora sconosciuto, di cui non può usufruire nelle cellule di mammifero.

Sempre dai dati presenti in letteratura, è noto che M2 è sufficiente per generare particelle simil-virali, anche in cellule di mammifero (Rossman J.S. *et al.*, 2010; Song J. *et al.*, 2011). Infatti, se localizzata in aree a bassa concentrazione di colesterolo, dove viene indirizzata *in vivo*, M2 ha dimostrato di saper promuovere curvature positive del doppio strato, con successiva gemmazione. L'azione che scatena la destabilizzazione della membrana è l'inserzione nella stessa della porzione idrofobica dell'elica intracellulare, la cui sequenza è altamente conservata fra i vari sottotipi di influenza A.

Sembra anche che qualora si trovi presso zone con alti livelli di colesterolo, come i *rafts*, M2 promuova invece una curvatura negativa che porta poi ad una strozzatura alla base della gemma, causandone il rilascio. In tal caso, però, il processo di gemmazione deve essere già stato innescato da HA e/o da M1.

Sulla base delle considerazioni sopra esposte, è possibile pensare di sfruttare il segnale di indirizzamento alla membrana di M2, non ancora chiaramente caratterizzato, per veicolare M1 presso il suo sito di oligomerizzazione.

Esprimendo M1 ed M2 come un'unica proteina di fusione, il peptide segnale che

indirizza M2 dovrebbe orientare M1 presso la membrana plasmatica e permettere la formazione di VLPs.

Lo scopo ultimo dell'intero lavoro di ricerca in cui si inserisce questo lavoro di tesi è quindi lo sviluppo di vaccini anti-influenzali basati su un'efficiente produzione di VLPs, non infettive, e ad alto potere immunogeno e anche cross-protettive, producibili su larga scala. Inoltre, tali particelle simil-virali potrebbero divenire piattaforme per montare in membrana, oltre agli antigeni di superficie di influenza, anche antigeni di virus differenti, aprendo la strada a future produzioni di VLPs pseudotipizzate.

## 2. MATERIALI E METODI

**Linea cellulare 293T:** cellule derivanti dal rene di embrione umano, ingegnerizzate con il gene codificante l'antigene T del virus vacuolante della scimmia (SV40), utile per la replicazione di plasmidi presentanti l'origine di replicazione di tale virus. Sono cellule aderenti, dalla morfologia stellata, e crescono in terreno DMEM (*Dulbecco's modified eagle's medium*, Gibco®), addizionato con siero fetale bovino al 10% (FBS, *Invitrogen*), inattivato a 56°C per 30 minuti.

Le colture cellulari vengono mantenute in incubatore a 37°C, al 90% di umidità e 5% di CO<sub>2</sub> (*Hera Cell*, Hereaus).

**DH5α** [F<sup>-</sup> φ80lacZΔ(lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17 (rk-mk<sup>+</sup>) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ<sup>-</sup>] (*Invitrogen*): ceppo di *E. coli* chimicamente competente. Tali cellule crescono sia su piastra che in sospensione in terreno LB (Luria-Bertani) composto come segue: 1% NaCl, 1% Bactotripton, 0,5% Estratto di lievito. Nel caso della coltura su piastra, il terreno è addizionato con 1.5% di agar. Conservate a -80°C.

**pcDNA3.1<sup>TM</sup> (+)** 5.4Kb (*Invitrogen*): Vettore di espressione. Tra le varie caratteristiche, presenta più origini di replicazione, sia per cellule eucariotiche (SV40) sia per *E. coli* (f1 ori, colE1); gene per la resistenza all'ampicillina; siti per gli oligonucleotidi T7 e BGH, necessari per la PCR da sequenziamento; il promotore di *Cytomegalovirus umano*.

**Oligonucleotidi** (*SIGMA Life Science*):

*Primers per la fusione M1-M2*

5'-**BamHI** M1: ATCGTAGGATCCATGAGTCTTCTAACC

3'-**EcoRV** M1: AAGACTGATATCCTTGAATCGTTGCATCTGCACCCCCATT  
CGTTTCTG

5'-**EcoRV** M2: ATCGTAGATATCAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGCCT  
ATC

3'-**NotI** Flag M2: ATCGTAAGCGGCCGCCTACTTATCGTCGTCATCCTTGT  
AATCCTCCAGCTCTAT

*Primers per la fusione M2-M1*

5'-**BamHI** M2: ACGCATGGATTCGCCACCATGAGTCTTCTAACCGAGGTC  
GAA

3'-**EcoRV** M2: AAGAACTGATATCCTCCAGCTCTATGTTGACAAAATGAC  
CATCGTCAAC

5'-**EcoRV** M1: CTGGAGGATATCAGTCTTCTAACCGAGGTCGAAACGTAC  
GTTCTC

3'-**XhoI** Flag M1: ATCGTACTCGAGCTACTTATCGTCGTCATCCTTGTAATC  
CTTGAATCGTTG

*Primers universali per la PCR di sequenziamento*

T7 TAATACGACTCACTATAGGG

BGH TAGAAGGCACAGTCGAGG

La parte sottolineata corrisponde al Flag.

## 2.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

La reazione di PCR ha la funzione di amplificare esponenzialmente un frammento di DNA d'interesse e viene condotta ad opera dell'enzima DNA Polimerasi (*PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase, Agilent technologies*) in termociclatore (*Veriti 96 Well, Applied Biosystems*), secondo il programma che segue:

95°C per 2' (denaturazione)

Per 30 cicli:

95°C per 30" (denaturazione)

$T_m$  per 30" (annealing)

72°C per 1' (elongazione)

72°C per 1' (completamento elongazione)

Blocco della reazione e conservazione del DNA a 4°C

$T_m$  = 54°C per l'amplificazione di M1

$T_m$  = 63°C per l'amplificazione di M2

La miscela di reazione è così composta: 1µl DNA (100 ng/µl), 4µl dNTPs 250mM, 5µl Buffer 5X, 1µl primer forward, 1µl primer reverse, 1µl *PfuUltra High-Fidelity DNA Polymerase*, portando a volume finale di 50µl con acqua.

## 2.2 Elettroforesi su gel di agarosio

Prima di procedere con il clonaggio, l'amplificato viene sottoposto a corsa elettroforetica su gel di agarosio. Le molecole di DNA migrano attraverso le maglie del gel grazie all'applicazione di un campo elettrico. La separazione avviene sulla base del peso molecolare, in quanto il rapporto massa/carica è pressoché identico per tutte le molecole di DNA. Le molecole più piccole migrano più velocemente e si ritrovano verso il fondo del gel, poiché costituite da un minor numero di nucleotidi. Per visualizzare il DNA si aggiunge al gel, in fase di preparazione, il colorante GelRed™ (*BIOTIUM*): irradiando il gel a fine corsa con raggi ultravioletti (*Gel Doc 1000, BioRad*), il colorante emette fluorescenza, evidenziando in tal modo la posizione esatta del DNA, confrontabile con un marker opportuno caricato sullo stesso gel.

Il gel risulta quindi così composto: Agarosio per gel elettroforesi 1%, TBE 1X (TBE 5X: 54g TRIS base, 27.7g Acido Borico, in 20 ml EDTA 0.5M pH 8.0 per 500ml di soluzione finale), GelRed™ (0,5 µg/ml).

Prima di essere trasferiti nei pozzetti i campioni ed il marker vengono miscelati ad un Buffer di caricamento (Loading buffer 6x: glicerolo 5%, Blu di bromofenolo 0.15%, Xilene cianolo 0.02%, EDTA 0.002M).

### **2.3 Estrazione da gel mediante QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)**

La banda d'interesse viene tagliata ed asportata dal gel di agarosio. Dopo essere stata pesata, viene solubilizzata in un volume di Buffer QG pari a tre volte il volume della banda stessa e incubata in termoblocco per 10 minuti alla temperatura di 50°C.

Viene successivamente aggiunto un volume di isopropanolo per precipitare il DNA. Il campione viene caricato in una colonnina del kit e centrifugato per 1 minuto a 13000 rpm a temperatura ambiente (*Microcentrifuge MC-13*, Millipore). Il DNA rimarrà trattenuto tra le maglie della resina di silice della colonnina. I passaggi successivi comprendono: l'aggiunta di 0.5ml Buffer QG con centrifuga di un minuto per rimuovere le tracce di agarosio; il lavaggio con 0.75ml di Buffer PE (contiene etanolo 96%) per 2-5 minuti con successiva centrifuga per 1 minuto; un'ulteriore centrifuga a secco per eliminare l'etanolo residuo.

Il DNA può essere ora eluito con 50µl di Buffer EB e centrifuga da 1 minuto.

### **2.4 Clonaggio**

#### *Ligazione*

L'amplificato e il vettore vengono ristretti con la stessa coppia di endonucleasi, in presenza del Buffer di restrizione specifico 1X ed eventuale albumina di siero bovino (BSA) 1X, in un volume di circa 30µl. La reazione avviene a 37°C e lasciata procedere per tutta la notte.

Le concentrazioni di vettore e inserto vengono quantificate dopo restrizione allo spettrofotometro (*NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, Thermo Scientific®), che rileva il valore di assorbanza a 260nm (picco massimo di assorbimento delle basi azotate) e ne restituisce il valore di concentrazione di DNA associato. Lo strumento fornisce informazioni anche sulla purezza della soluzione. Infatti, un rapporto  $A_{260}/A_{280}$  compreso tra 1.8 e 2.0 indica che il campione è sufficientemente pulito da eventuali residui contaminanti del processo di purificazione.

In base ai valori di concentrazione e alla lunghezza in paia di basi di inserto e vettore, vengono calcolati i volumi da utilizzare per la ligazione secondo opportuno rapporto scelto dall'operatore. In un volume finale di 10µl, quindi, sono presenti: 1µl di T4 DNA ligasi, che catalizza la reazione nel suo buffer d'elezione (Buffer 1X: 50mM Tris-HCl pH 7.5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM ditiotreitolo, 1mM ATP), inserto e vettore nelle proporzioni precedentemente calcolate. La reazione procede a 16°C per tutta la notte.

#### *Trasformazione*

Il giorno seguente la reazione di ligazione viene trasferita in un' aliquota di 50µl di cellule DH5α competenti. La miscela di trasformazione viene lasciata in ghiaccio per 30 minuti, e subisce un successivo shock termico per 2 minuti a 37°C. Vengono aggiunti 200µl di terreno LB (Luria-Bertani). La coltura viene lasciata in bagno termico a 37°C per 40 minuti. Al termine i batteri vengono piastrati su piastra contenente LB-Agar addizionato di Ampicillina (100ng/µl) e lasciati crescere a 37°C per tutta la notte.

Dopo aver selezionato alcune colonie cresciute, queste sono state inoculate in 3ml LB addizionato di Ampicillina (100ng/µl) a 37°C per tutta la notte, si procede con

la purificazione del DNA plasmidico, che verrà prima sottoposto a controllo mediante digestione enzimatica e successivamente verrà sequenziato.

## **2.5 Purificazione del DNA plasmidico tramite *QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)***

Con questo protocollo si ottengono preparazioni di DNA ad elevato grado di purezza, ottime anche come substrato per l'eventuale successivo sequenziamento. Innanzitutto, le sospensioni batteriche vengono centrifugate a temperatura ambiente a 13000 rpm per 10 minuti (*Microcentrifuge MC-13*, Millipore). Il pellet viene risospeso in 250µl di Buffer P1, contenente RNAasi A. Quindi, vengono aggiunti 250µl di Buffer P2 per effettuare una lisi alcalina, che viene bloccata dopo 5 minuti d'azione aggiungendo 350µl di Buffer N3. Una centrifuga a 13000 rpm per 10 minuti sedimenta le carcasse lisate sul fondo della provetta e il surnatante contenente il DNA viene trasferito sulla colonnina cromatografica a scambio anionico fornita col kit. Una breve centrifuga di un minuto aiuterà il DNA a legarsi alla resina. Successivamente si effettua un lavaggio con Buffer PB (500µl) e Buffer PE (750µl), entrambi seguiti da 1 minuto di centrifuga. Si avvia un'ultima centrifuga a secco e si eluisce il DNA in una nuova provetta aggiungendo 50µl di Buffer di eluizione EB, sempre accompagnando l'operazione con una centrifuga di un minuto.

## **2.6 Restrizione enzimatica**

Il DNA plasmidico ottenuto dalla purificazione precedentemente descritta è stato digerito con opportuni enzimi, scelti per verificare che il vettore ricombinante contenga il frammento inserito.

La reazione di digestione avviene in una miscela contenente: i due enzimi in uguale volume, il DNA purificato, BSA se necessaria per almeno una delle due endonucleasi, il Buffer specifico, acqua a volume. La reazione viene condotta a 37°C per due ore circa.

I prodotti della restrizione vengono fatti migrare in gel di agarosio 1%. Se è presente una banda all'altezza prevista, il DNA plasmidico viene fatto sequenziare per avere una verifica più accurata.

## **2.7 Sequenziamento**

Il metodo di sequenziamento utilizzato è il metodo di Sanger modificato (Sanger et al., 1977). I terminatori di catena sono dideossinucleotidi (ddNTPs) coniugati con un cromoforo fluorescente diverso per ognuno dei quattro possibili ddNTPs. Il sequenziatore separa i vari frammenti di diversa lunghezza mediante elettroforesi capillare, discriminandoli con una precisione di una singola base. Le quattro diverse lunghezze d'onda delle emissioni permettono di costruire un profilo di fluorescenza, detto elettroferogramma, costituito da picchi corrispondenti al tipo di ddNTP terminatore, consentendo la ricostruzione della sequenza di DNA.

Pertanto, prima di procedere con il sequenziamento, è necessario effettuare una reazione di PCR, nella quale, a differenza delle normali PCR, ogni campione viene amplificato in due miscele separate, una contenente il primer *forward* ed una contenente il *reverse*. Ogni miscela è costituita da: 250ng di DNA, 1µl di Buffer di sequenziamento 5x (Tris-HCl 200 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM), 1µl di BigDye Terminator v3.1 (contenente DNA polimerasi AmpliTaq®, dNTPs, ddNTPs coniugati), 1µl di primer *forward* (T7) o *reverse* (BGH).

La quantità di volume di DNA da prelevare per inserire esattamente 250ng viene calcolata conoscendo la concentrazione del campione di DNA, misurata al NanoDrop.

Ad amplificazione terminata, per ogni campione si prepara una miscela così costituita: 2µl di Sodio Acetato 3M pH 5.2, 50µl di Etanolo 100%, 10µl di amplificato. Il tutto viene centrifugato per 20 minuti a 4°C e 13000 rpm (*Centrifuge 5415R*, Eppendorf). Al pellet vengono aggiunti 150µl di etanolo 70%. A seguito di una seconda centrifuga di 5 minuti, il pellet viene fatto asciugare, anche con l'aiuto di un termoblocco (65°C). Infine vengono aggiunti 15µl di formamide; la denaturazione avviene a 95°C per 4 minuti. I campioni vengono poi aliquotati in una piastra apposita e caricati in un sequenziatore automatico (*ABI PRISM 3130xl*, Applied Biosystems).

## **2.8 Preparazione di plasmidi da maxi inoculi tramite *Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN)**

Dopo aver identificato il clone corretto, si effettua una preparazione su ampia scala del DNA plasmidico, trasferendo l'inoculo corrispondente in 200ml di LB addizionato di ampicillina e incubato in agitazione a 37°C per tutta la notte.

Innanzitutto, le colture in sospensione vengono centrifugate a 4900rpm (*Sorvall*® *RC 5C PLUS*) a 4°C per 20 minuti seguendo il protocollo di purificazione del DNA plasmidico su larga scala (*Plasmid Maxi Kit*, QIAGEN).

Il pellet viene risospeso in 10ml di Buffer P1, a cui vengono aggiunti altri 10ml di Buffer P2; si lascia agire 5 minuti. Dopo l'aggiunta di 10ml di Buffer P3, i campioni vengono lasciati 15-20 minuti in ghiaccio.

Successivamente i campioni vengono caricati per una seconda centrifuga a 14900 rpm per 30 minuti. Il surnatante che si ottiene viene filtrato e caricato su una colonna fornita con il kit, la cui resina è stata precedentemente equilibrata con 10ml di Buffer QBT. Seguono due lavaggi da 30ml ciascuno con Buffer QC. Per l'eluizione vengono versati 15ml di Buffer QF.

All'eluato vengono aggiunti 10.5ml di isopropanolo, centrifugando successivamente a 7500rpm per circa 60 minuti a 4°C. Il pellet, quindi, viene trattato con 5ml etanolo 70% e centrifugato per 30 minuti a 7000rpm. Una volta asciutto lo si risospende in 200µl di TE sterile (10 mM Tris HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA).

## **2.9 Trasfezione**

Per introdurre il DNA esogeno all'interno delle cellule 293T è stato utilizzato il metodo di trasfezione basato su lipofectamine (*Lipo2000*, Invitrogen). Le lipofectamine sono una classe di molecole formate da una coda policationica a cui si lega il DNA carico negativamente, e da una porzione lipidica che facilita il passaggio del complesso DNA-lipofectamina attraverso la membrana cellulare.

Il giorno prima della trasfezione, le cellule 293T vengono seminate ad una densità di  $1.5 \times 10^6$  in fiasche di 25 cm<sup>2</sup> di superficie (T25) in terreno DMEM addizionato con il 10% (v/v) di siero fetale bovino (FBS). Dopo 24 ore, viene controllata l'avvenuta confluenza dell'80-90% delle cellule e si procede quindi con la trasfezione. Si preparano due miscele differenti una contenente il DNA (8µg) diluito nel terreno DMEM senza siero, l'altra con lipofectamine (20µl) in DMEM senza siero. Si attendono 5 minuti e quindi le due miscele si uniscono, lasciandole poi ad incubare a temperatura ambiente per 20 minuti in modo che si formino i complessi DNA-liposomi.

Infine, la miscela ottenuta di DNA/lipofectamine viene aggiunta al monostrato cellulare con l'aggiunta di 4ml di terreno DMEM addizionato con il 10% (v/v) di FBS. Le cellule 293T così trattate vengono mantenute nell'incubatore (*HeraCell*, Hereaus) a 37°C per 48 ore.

### **2.10 Purificazione delle particelle simil-virali (VLP) dai surnatanti di trasfezione (Virion Pelleting) e preparazione dei lisati cellulari**

A 48 ore dalla trasfezione il monostrato di 293T viene staccato dalla fiasca con PBS. Le cellule in sospensione vengono quindi centrifugate per 8 minuti a 1100rpm (*Megafuge 1.0R*, Heraeus). Il pellet ottenuto viene sottoposto a tre lavaggi con PBS 1X, quindi viene effettuata la lisi delle cellule mediante l'aggiunta di RIPA 1% [NP-40 (*Sigma*), Sodio Deossicolato 0,5% (*Sigma*) SDS 0,05% (*Bio-Rad*)] insieme agli inibitori della proteasi 1X (0.1 mM N-p-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone e 0.1mM tosylsulfonyl phenylalanyl chloromethyl ketone). Dopo aver lasciato riposare in ghiaccio per circa 30 minuti, si separano le carcasse (pellet) dal contenuto del citosol (surnatante) mediante centrifugazione, tali surnatanti costituiranno quindi i lisati.

La valutazione della presenza di eventuali particelle simil-virali (VLP) viene effettuata raccogliendo e analizzando i surnatanti delle trasfezioni di cellule 293T. Si procede ad effettuare una centrifuga a 1100 rpm per 8 minuti a 4°C dei mezzi di coltura, quindi vengono filtrati con filtri da 0.45µm (Millipore) per eliminare i detriti cellulari.

Le VLP vengono ultracentrifugate su cuscino di saccarosio al 20% (p/v) per 2 ore a 27000 rpm e 4°C con rotore SW55Ti (*Ultracentrifuga BECKMAN COULTER optima™ L-90K*, Beckman). Le particelle simil-virali vengono risospese in 25µl di tampone di lisi RIPA (1% (v/v) NP40 (*Sigma*), 0.5% (v/v) Sodio Deossicolato (*Sigma*), 0.05% (v/v) SDS (*Biorad*)) e 25 µl Laemmli Buffer 2X (Tris-HCl 100mM pH 6.8, SDS 4%, glicerolo 20%, blu di bromofenolo 0.2%, DTT 200mM).

### **2.11 Elettroforesi di proteine (SDS-PAGE) e Western Blotting**

Per separare e visualizzare le proteine d'interesse presenti in una miscela si può ricorrere alla tecnica del Western blot.

Innanzitutto viene effettuata un' elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di Sodio dodecil solfato (SDS-PAGE); tale tecnica si basa sulla proprietà che hanno le proteine di migrare attraverso le maglie di un gel se sottoposte a campo elettrico costante. La separazione avviene per differenza fra pesi molecolari, in quanto il sodio dodecil solfato conferisce carica negativa alle proteine in maniera proporzionale al loro stesso peso molecolare, legandosi circa ogni due residui amminoacidici. Esse avranno pertanto un rapporto massa/carica simile.

I campioni dei lisati cellulari vengono mescolati nelle giuste proporzioni a Laemmli Buffer 2X (Tris-HCl 100mM pH 6.8, SDS 4%, glicerolo 20%, blu di bromofenolo 0.2%, DTT 200mM) e β-mercaptoetanolo. L'azione di quest'ultimo è quella di rompere i legami disolfuro delle proteine, che, coniugata alla bollitura di 5 minuti precedente al caricamento in gel, contribuisce alla denaturazione delle proteine, impedendo che la loro stessa morfologia vada ad influire sulla migrazione. I gel di acrilammide utilizzati sono così composti:

*Separating gel (12%)*: Acqua deionizzata 8,3ml; Tris 0.5 M pH 6.8 6.3ml; SDS 10% 250µl; acrilammide 10ml; TEMED 20µl; APS 10% 100µl;



*Stacking gel (4,5 %):* Acqua deionizzata 9.4ml; Tris 0.5 M pH 6.8 4ml; SDS 10% 160µl; acrilammide 2.4ml; TEMED 20µl; APS 10% 80µl;

I campioni sono stati fatti correre a voltaggio costante (100Volt) ed in presenza di un tampone di corsa (Glicina 1.9 M; Tris 0.25 M; SDS 0.1%).

Terminata la corsa si procede con il trasferimento su membrana, che avviene a freddo ed in presenza di Transfer Buffer (Running Buffer 1X, metanolo 20%), nel quale viene anche equilibrata la membrana di nitrocellulosa (*Hybond<sup>TM</sup>-Ecl<sup>TM</sup>*, Amersham Biosciences), dopo essere stata attivata in acqua deionizzata. Il trasferimento procede per due ore a 50Volt.

A trasferimento avvenuto, la membrana subisce una serie di trattamenti: un primo lavaggio di 5 minuti con la soluzione di lavaggio PBS 1X-TWEEN 0,1%; successivamente viene immersa in soluzione di saturazione di latte in polvere al 5% PBS 1X-TWEEN 0,1%, e lasciata in agitazione per circa 45 minuti. Dopo la saturazione dei siti aspecifici, la membrana viene immersa in una soluzione costituita da latte al 5% in PBS 1X-TWEEN 0,1% a cui viene aggiunto l'anticorpo primario mouse  $\alpha$ -flag diluito 1:1000 (Sigma) per tutta la notte a 4°C.

La mattina successiva, dopo una serie di tre lavaggi con PBS 1X-TWEEN 0,1%, la membrana viene immersa per due ore con la soluzione contenente l'anticorpo secondario  $\alpha$ -mouse coniugato con l'enzima perossidasi HRP (*Horse Radish Peroxidase, perossidasi di rafano*, GE Healthcare) sempre diluito 1:1000. Seguono nuovamente tre lavaggi con PBS 1X-TWEEN 0,1%; e PBS 1X.

La membrana viene poi ricoperta di soluzione ECL (*Amersham, ECL Western blotting detection Reagents GE Healthcare*), che contiene il substrato della perossidasi di rafano (HRP). La reazione di ossidazione catalizzata dalla perossidasi causa un'emissione di luce (Chemiluminescenza), grazie alla quale è possibile individuare la presenza delle proteine di interesse sulla lastra fotografica impressionata (*Kodak BioMax light film*, Sigma-Aldrich).

### 3. RISULTATI E DISCUSSIONE

Fra le grandi limitazioni degli attuali vaccini contro l'influenza, gioca un ruolo determinante l'alto tasso di mutazione delle glicoproteine HA e NA, che vanifica l'azione neutralizzante degli anticorpi indotti dai vaccini.

I più recenti studi riguardanti le strategie di produzione vaccinale hanno come fine l'ottenimento di vaccini basati su *Virus-like Particles*, particelle simil-virali prive di genoma e quindi non infettive, costituite dalle proteine antigeniche più conservate fra i vari ceppi influenzali, come le proteine di matrice M1 ed M2. Tali vaccini conferirebbero pertanto una cross-protezione verso i differenti ceppi virali. Dati presenti in letteratura evidenziano come M2 sia in grado di formare VLPs in seguito a trasfezione di linee cellulari stabilizzate (Rossmann J.S. *et al.*, 2010; Song J. *et al.*, 2011). M1, al contrario, sebbene sia considerata importante nella fase di gemmazione della particella virale, non possiede un segnale intrinseco di indirizzamento alla membrana cellulare, per cui non ha la capacità di produrre VLPs (Haynes J. R., 2009).

Questo lavoro di tesi si è focalizzato sul tentativo di produrre VLPs basate sull'espressione di proteine chimeriche ottenute dalla fusione delle proteine di matrice M1 e M2, e si inserisce all'interno di un progetto più ampio che mira alla produzione di vaccini altamente immunogeni, cross-protettivi, basati su di un efficiente processo di formazione di VLPs.

#### 3.1 Preparazione dei costrutti codificanti le proteine di fusione

Per ottenere le sequenze codificanti le proteine di fusione ci si è serviti di:

▲ Stampo per la reazione di PCR: due differenti plasmidi, precedentemente ottenuti in questo laboratorio, in cui erano state clonate separatamente M1-*flag* ed M2-*flag* del ceppo A/WSN/33 (H1N1).

▲ Primers per la reazione di PCR: oligonucleotidi opportunamente progettati (vedasi pagg. 7 e 8) allo scopo di ottenere una proteina di fusione recante il flag in coda alla seconda proteina della fusione, mancante di codone di stop al termine della sequenza codificante la prima proteina (per permettere al ribosoma la sintesi continua), e presentante siti di restrizione enzimatica compatibili alla corretta esecuzione dei successivi passaggi.

▲ Vettore di espressione pcDNA3.1™ (+)

##### *Costrutto M1-M2*

A seguito della reazione di PCR (condotta secondo il programma descritto a pag. 8), l'amplificato di M1 e il plasmide sono stati sottoposti a digestione enzimatica mediante le endonucleasi BamHI ed EcoRV. Le estremità che si vengono a creare facilitano la successiva reazione di ligazione.

Il prodotto di ligazione e l'amplificato di M2 sono stati poi digeriti con EcoRV e NotI, per permettere l'inserimento di M2 a valle di M1, separata da quest'ultima dal solo sito di EcoRV che, essendo composto da sei paia di basi, mantiene corretto il frame di lettura. Di seguito è riportata una rappresentazione schematica del costrutto.



### Costrutto M2-M1

Il plasmide e l'amplificato di M2 sono stati digeriti con la stessa coppia di enzimi di restrizione, BamHI ed EcoRV, e sottoposti a ligazione.

Il prodotto di ligazione, in seguito, ha subito una seconda digestione, questa volta ad opera di EcoRV e XhoI, endonucleasi con le quali è stato digerito anche il prodotto di amplificazione di M1, ed è stata effettuata la seconda ligazione. Di seguito è riportata una rappresentazione schematica del costrutto.



I prodotti dell'amplificazione venivano sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio 1% per verificarne l'effettiva presenza e successivamente estratti dal gel mediante *QIAquick Gel Extraction Kit* (QIAGEN).

Le modalità con cui sono state condotte le reazioni di ligazione sono descritte nella sezione 2.4.

I prodotti delle ligazioni sono stati utilizzati per trasformare cellule DH5 $\alpha$  competenti, seminate a fine processo su piastra contenente LB-agar selettivo per la presenza di Ampicillina. Fra le colonie cresciute ne sono state selezionate alcune per la crescita in sospensione.

Il DNA plasmidico è stato purificato tramite *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN) e sottoposto ad una restrizione di controllo, mediante taglio con BamHI e NotI (per M1-M2) e BamHI e XhoI (per M2-M1).

Di seguito (figura 3.1) è riportato il gel del controllo dei due clonaggi. Nelle corsie 7 e 8 sono visibili gli inserti M2-M1 e M1-M2, della lunghezza totale di circa 1200 paia di basi, ed il vettore tagliato, riconoscibile con un opportuno marker di peso molecolare (*Marker VII*).

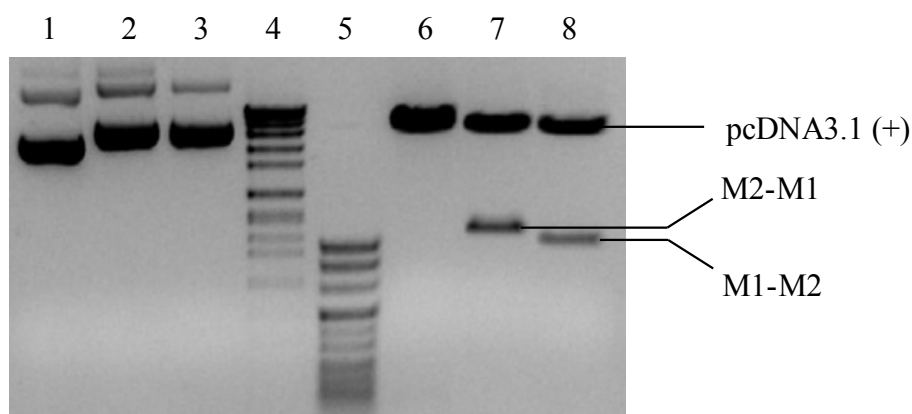


Figura 3.1 – Analisi su gel di agarosio delle digestioni di controllo

Corsie 1,2,3: I plasmidi non sono stati tagliati efficientemente e si sono richiusi prima di assumere l'inserto, pertanto nella restrizione di controllo non è visibile la banda relativa all'inserto, e il DNA plasmidico migra secondo le tre isoforme.

Corsia 4: M VII (Molecular Weight Marker, Roche): discrimina all'interno di un range compreso fra 8576 e 359 pb)

Corsia 5: M VIII (Molecular Weight Marker, Roche): discrimina all'interno di un range compreso fra 1114 e 67 pb)

Corsia 6: pcDNA3.1(+) linearizzato

Corsia 7: pcDNA3.1(+) linearizzato e inserto M2-M1

Corsia 8: pcDNA3.1(+) linearizzato e inserto M1-M2

Per verificare che non fossero state introdotte mutazioni e che il frame di lettura si fosse conservato, i plasmidi sono stati sequenziati, e le sequenze di M1 ed M2 confrontate con quelle di riferimento di A/WSN/33.

### 3.2 Valutazione dell'espressione delle proteine di fusione e della produzione di VLPs

Appurata la correttezza dei costrutti, i cloni da cui i plasmidi erano stati purificati sono stati utilizzati per la crescita su larga scala; la preparazione del DNA plasmidico è stata condotta per mezzo di *Plasmid Maxi Kit* (QIAGEN).

La trasfezione è stata effettuata col metodo delle lipofectamine, secondo il protocollo descritto a pagina 11.

In tabella 1 sono riportati i vari costrutti trasfettati, un tipo differente per ogni fiasca, e in quale quantità.

Oltre ai due vettori di espressione in cui sono state clonate le due sequenze codificanti le proteine di fusione, infatti, sono stati trasfettati come controlli anche i vettori recanti il DNA codificante M1 singolarmente, che in base ai dati presenti in letteratura ci si aspetta non gemmi; M2 singolarmente, che invece dovrebbe essere in grado di formare VLPs; la cotrasfezione di M1 ed M2, per la quale ognuna delle due proteine è svincolata dall'altra, essendo prodotte separatamente in due eventi di sintesi proteica distinti.

Tipo di costrutto	Quantità di costrutto trasfettata (µg)	Riempimento (µg)
pcDNA3.1 M1-M2- <i>flag</i>	8	-
pcDNA3.1 M2-M1- <i>flag</i>	8	-
pcDNA3.1 M1- <i>flag</i>	7	1
pcDNA3.1 M2- <i>flag</i>	1	7
pcDNA3.1 M1- <i>flag</i> + pcDNA3.1 M2- <i>flag</i>	7+1	-

*Tabella 1 - Come già descritto, 8 µg di DNA sono la quantità ideale da aggiungere ai 20 µl di lipofectamine. Nella cotrasfezione i due diversi costrutti non sono stati aggiunti in uguale quantità perché da precedenti esperimenti effettuati in questo laboratorio era noto come M2 fosse molto più espressa rispetto a M1. Le proporzioni vengono mantenute nelle trasfezioni singole, portando a riempimento con pcDNA3.1™.*

Al fine di verificare l'espressione delle diverse proteine ricombinanti o meno, a 48 ore dalla trasfezione le cellule sono state separate dal surnatante, lisate con RIPA 1X e le carcasse rimosse per centrifugazione. Ciò che rimane, il contenuto dell'intracellulare, comprende anche le proteine d'interesse.

I surnatanti delle trasfezioni invece sono stati filtrati, ultracentrifugati e le VLPs risospese in 25µl di tampone di lisi RIPA (vedasi sezione 2.10).

I campioni dei lisati e delle VLPs opportunamente trattati sono stati fatti migrare in due differenti SDS-PAGE al 12%, trasferiti su membrana e visualizzati mediante *immunoblotting* (vedasi sezione 2.11).

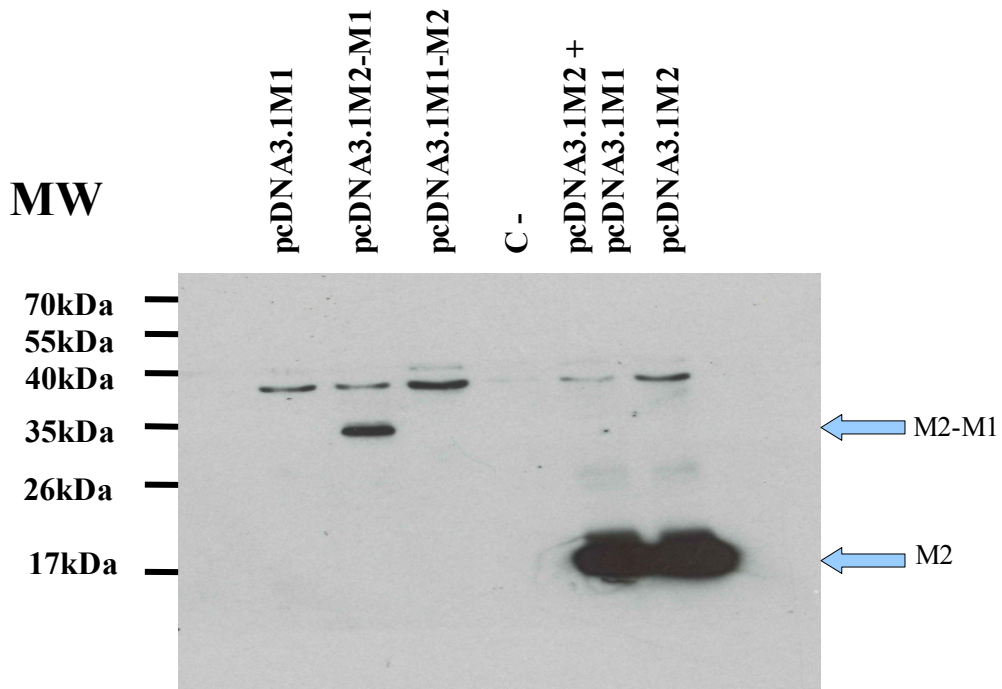


Figura 3.2 – Valutazione della capacità delle proteine ricombinanti di formare VLPs.

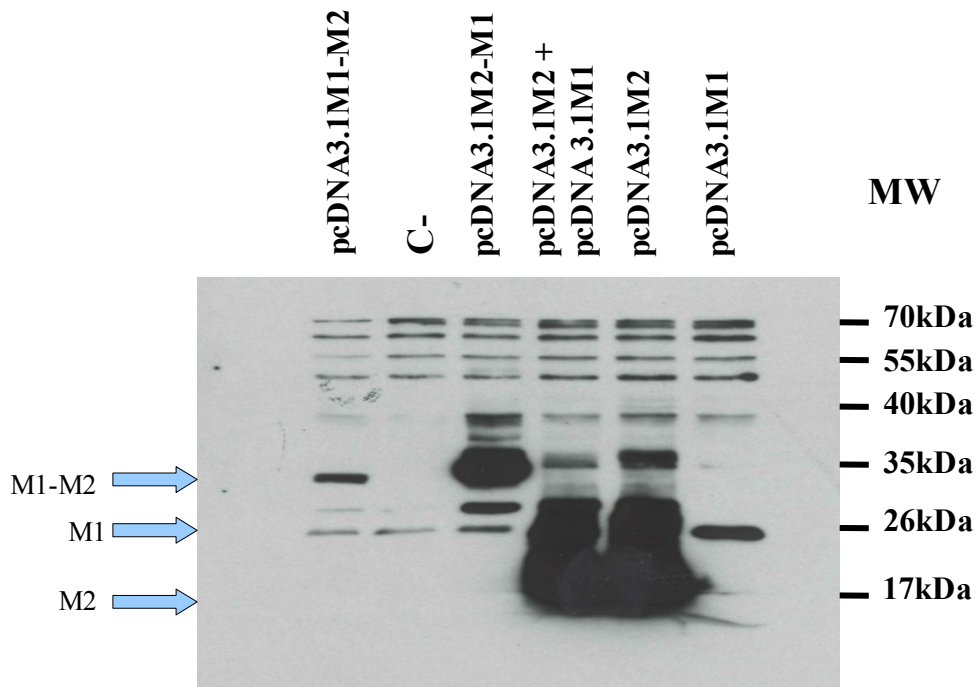


Figura 3.3 – Valutazione dell'espressione delle proteine ricombinanti nei lisati cellulari

MW: PageRuler™ (FERMENTAS)

Com'è possibile notare dai risultati riportati nelle fig.3.2 e fig. 3.3, in accordo con i dati di letteratura, l'espressione della proteina M2 da sola è in grado di produrre VLPs; essa è visualizzabile nella parte bassa del gel, essendo molto piccola (p.m.  $\approx$  17 KDa).

Anche i risultati per M1 confermano i dati di letteratura: infatti, pur essendo espressa a livello intracellulare, visualizzabile ad un'altezza di circa 28 KDa, M1 non è stata rilevata a livello extracellulare, indice che M1 non è in grado da sola di produrre VLPs.

Interessante il risultato ottenuto nella cotrasfezione: entrambe le proteine vengono espresse all'interno della cellula ma nel surnatante è riscontrabile la sola presenza di M2, segno che la semplice interazione tra le due proteine sintetizzate indipendentemente l'una dall'altra non è sufficiente per orientare M1 verso la membrana; tale risultato costituisce anche un'ulteriore conferma delle conclusioni tratte finora, riguardo le singole trasfezioni di M1 e di M2.

Per quanto concerne le due proteine di fusione, è possibile notare chiaramente che:

1. La proteina di fusione M1-M2 è espressa a livello intracellulare, ma non è stata rilevata all'esterno della cellula, quindi tale costrutto non è stato in grado di produrre VLPs.
2. La proteina di fusione M2-M1 è molto rappresentata nei lisati, e ne è stata rilevata una discreta quantità anche nell'extracellulare, indice che il segnale di indirizzamento di M2 ha promosso la veicolazione dell'intera proteina di fusione verso il sito di gemmazione, e quindi la formazione di VLPs contenenti entrambe le proteine fuse insieme.

È stato ipotizzato che la fusione M1-M2 non riesca a dirigersi in membrana il funzionamento della sequenza segnale di M2, al suo N-terminale, verrebbe impedita dalla presenza di M1. Diversamente, ponendo M1 a valle di M2, il peptide segnale è visibile, come se M2 fosse espressa separatamente, perciò l'intera proteina di fusione viene indirizzata correttamente alla membrana.

Questo lavoro ha dimostrato come fornendo ad M1 un segnale di indirizzamento alla membrana tramite la fusione con M2 sia possibile ottenere Virus-like Particles. I prossimi passi consisteranno nel verificare il potere immunogeno e cross-protettivo delle VLPs così formate nel modello murino.

Ulteriori sviluppi potranno avere luogo incorporando nelle VLPs, formatesi grazie ad M2-M1, altre proteine virali influenzali, come NA o HA, per incrementare il potere immunogeno delle VLPs. Sembra infatti che l'efficacia del vaccino anti-influenzale sia direttamente correlata ad una multivalente composizione antigenica (Haynes J. R., 2009).

In conclusione, i risultati ottenuti in questo studio sono importanti a livello di ricerca di base e offrono interessanti spunti per il futuro per una sempre migliore strategia di prevenzione contro il virus dell'influenza.

## BIBLIOGRAFIA

**(1) Rossman J. S., Lamb R. A.**

2011. Influenza virus assembly and budding. *J. Virol.* 411: 229-236.

**(2) Haynes J. R.**

2009. Influenza Virus-like Particles vaccines. *Expert Rev vaccines* 8: 435-45

**(3) Veit M., Thaa B.**

2011. Association of influenza virus proteins with membrane rafts. *Adv. Virol.* 2011:370606.

**(4) Rossman J. S., Jing X., Leser G. P., Lamb R. A.**

2010. Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell* 142, 902-913

**(5) Song J., Wang B., Park K., Van Rooijen N., Quan F., Kim M., Jin H., Pekosz A., Compans R. W., Kang S.**

2011. Influenza Virus-like Particles containing M2 induce broadly cross protective immunity. *PloS one* 6: e14538

**(6) Kang S., Song J., Quan F., Compans R. W.**

2009. Influenza vaccines based on Virus-like Particles. *Virus Res.* 143: 140-146

**(7) Ellebedy A.H., Webby R.J.**

2009. Influenza vaccines. *Vaccine* 27: D65-D68

**(8) Chen B. J., Leser G. P., Morita E., Lamb R. A.**

2007. Influenza virus Hemagglutinin and Neuraminidase, but not the matrix protein, are required for assembly and budding of plasmid-derived Virus-Like Particles. *J. Virol.* 81: 7111–7123.

**(9) Cheng P., Leung T., Ho E., Leung P., Lai M., Lim W.**

2009. Oseltamivir- and Amantadine-Resistant Influenza Viruses A (H1N1). *Emerg Infect Dis.* 15: 966–968.

