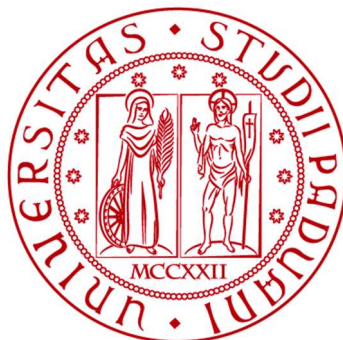


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biotecnologie**



**ELABORATO DI LAUREA**

**Valutazione dell'azione patogenetica della  
nucleoproteina del virus della febbre emorragica della  
Crimea-Congo**

**Tutor: Prof. Cristiano Salata**  
**Dipartimento di Medicina Molecolare**

**Co-tutor: Dott. Denis Pasqual**  
**Dipartimento di Medicina Molecolare**

**Laureanda: Arianna Reolon**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022**



# INDICE

<b>1. ABSTRACT</b> .....	3
<b>2. INTRODUZIONE</b> .....	4
2.2 Agente eziologico: struttura del CCHFV e ciclo replicativo .....	6
2.3 Processo patogenetico della CCHF .....	7
2.4 Caratteristiche e struttura della nucleoproteina.....	9
2.5 HAZARA VIRUS: modello di studio del CCHFV .....	11
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	12
3.1 Plasmidi.....	12
3.2 Linee cellulari.....	13
3.3 Tecniche della biologia molecolare.....	14
3.3.1 Preparazione dei batteri competenti.....	14
3.3.2 Trasformazione dei batteri competenti.....	14
3.3.3 Maxi-purificazione del DNA plasmidico .....	15
3.4 Tecniche della biologia cellulare.....	15
3.4.1 Cotrasfezione delle cellule HEK293T con calcio-fosfato.....	15
3.4.2 Raccolta e filtrazione del surnatante contenente le particelle lentivirali .....	16
3.4.3 Trasduzione delle cellule Huh7 con le particelle lentivirali.....	17
3.4.4 Citofluorimetria.....	17
<b>4. RISULTATI</b> .....	18
4.1 Valutazione dei protocolli di trasduzione.....	18
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	19
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	21



## 1.ABSTRACT

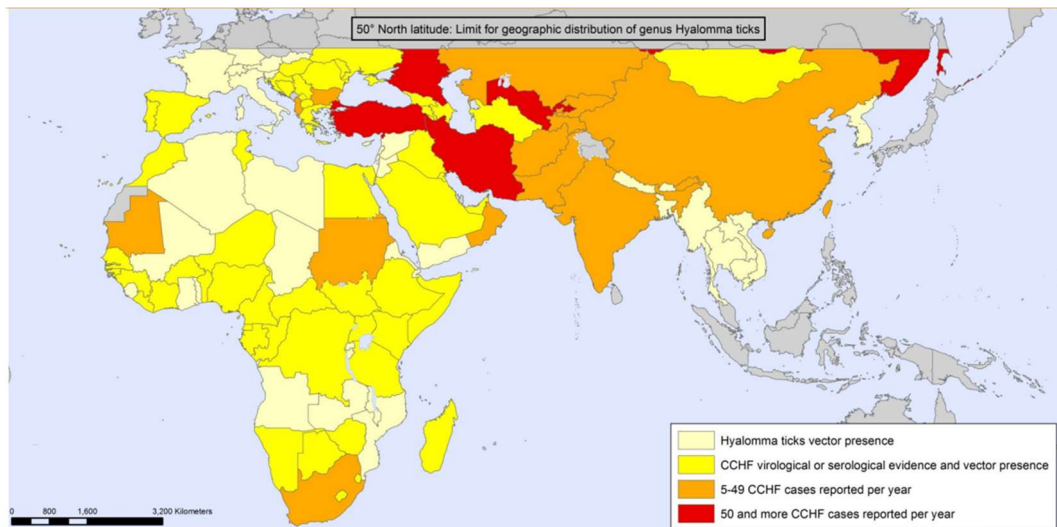
La febbre emorragica della Crimea-Congo (CCHF) è la più diffusa malattia trasmessa dalle zecche, ha un tasso di mortalità che varia dal 30% al 70% ed è causata dal virus della febbre emorragica della Crimea-Congo (CCHFV). Considerando l'elevata patogenicità del CCHFV, la manipolazione del virus richiede l'uso di laboratori di biosicurezza di livello 4 (BSL-4). La sua patogenesi rimane ancora poco conosciuta e non è ancora stata individuata una terapia specifica. La nucleoproteina (NP) del virus sembra svolgere un ruolo nella patogenesi della malattia, con un meccanismo non ancora chiarito. Questa tesi si inserisce in un progetto più ampio volto a investigare il ruolo della NP nella patogenesi virale attraverso la valutazione dell'induzione di citochine infiammatorie, che rappresentano un marker di infezione virale, e l'identificazione di eventuali interattori cellulari che possono interagire con la nucleoproteina. A tal fine, sono state selezionate le due varianti di NP derivanti dal ceppo CCHFV IbAr 10200, un ceppo adattato in laboratorio considerato non patogeno, e il ceppo altamente patogeno Hoti-WT. Come controllo, è stata anche inclusa la NP del virus Hazara, un virus non patogeno considerato essere un buon surrogato del CCHFV. Lo scopo della tesi è sviluppare un efficiente protocollo di trasduzione, con l'obiettivo finale di utilizzare il protocollo in cellule bersaglio dell'infezione virale in cui far esprimere le differenti varianti di nucleoproteina e valutarne quindi l'effetto sulla cellula. In particolare, nel lavoro di tesi è stata valutata l'efficienza di tre protocolli di trasduzione, per selezionare il metodo che garantisca i maggiori livelli di espressione della NP.



## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 Introduzione della patologia della febbre emorragica della Crimea Congo, trasmissione ed ecologia del virus

Il virus della febbre emorragica della Crimea-Congo (CCHFV) è un patogeno appartenente al genere *Orthonairovirus*, famiglia *Nairoviridae* dell'ordine *Bunyvirales* (Shayan et al., 2015). È l'agente eziologico della febbre emorragica della Crimea-Congo, malattia così denominata in seguito alla sua identificazione in Crimea nel 1944 e nell'attuale Repubblica Democratica del Congo nel 1956. La CCHF è una zoonosi caratterizzata da un quadro clinico variabile che va da una sintomatologia di tipo influenzale non grave fino a perdite di sangue per emorragie interne e che può culminare nell'insufficienza multiorgano, shock e morte (Haddock et al., 2018). La CCHFV ha un tasso di mortalità che varia dal 30% al 70% nei paesi in cui è endemica, quali alcuni stati dell'Africa e del Medio Oriente, dell'Asia e dell'Europa (Fig. 1). La distribuzione geografica di questa zoonosi coincide con l'areale di distribuzione di alcuni generi di zecche, in particolare del genere *Hyalomma* spp., più comunemente note come zecche dure; si tratta dei principali responsabili della trasmissione del virus all'uomo.

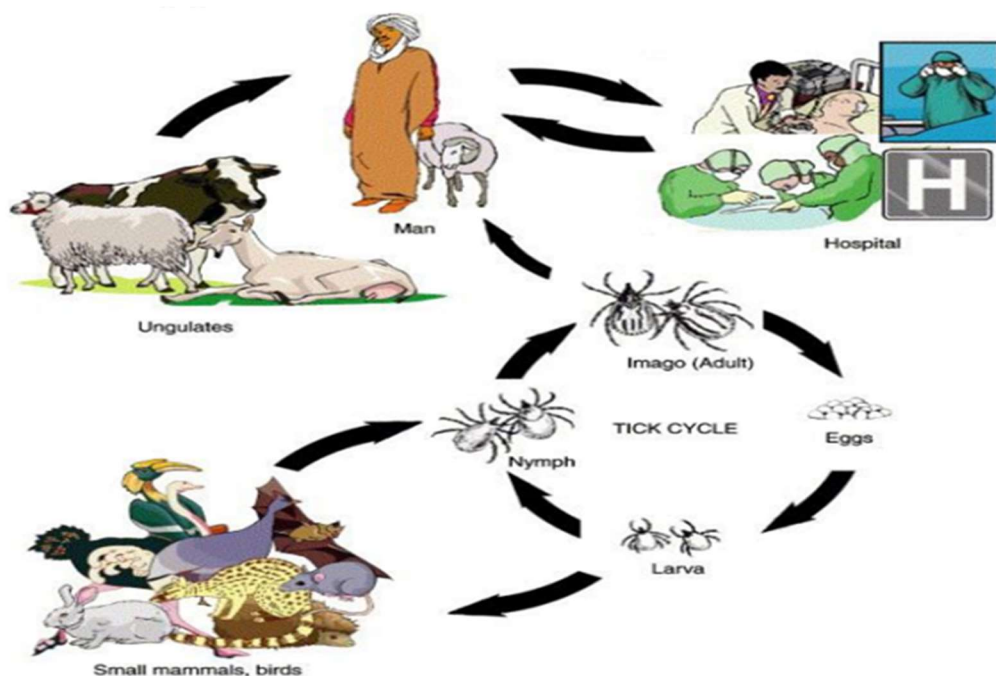


**Fig.1** La mappa mostra la distribuzione geografica globale della CCHF e la diffusione degli artropodi vettori del virus (WHO, Introduction to Crimean-Congo hemorrhagic fever).

In *Homo sapiens*, sono state identificate quattro fasi distinte della malattia: l'incubazione, avente una durata di 1-14 giorni dopo l'esposizione, la fase pre-emorragica, caratterizzata da sintomi lievi e aspecifici quali mal di testa, febbre, dolori e più raramente diarrea, nausea e vomito; la fase emorragica vera e propria (di durata 3-6 giorni), sviluppata nei casi gravi, si concretizza con la presenza di emorragie tra cui petecchie o ecchimosi, sanguinamenti gengivali, ematuria e può

progredire fino a insufficienza multiorgano. I pazienti che sopravvivono dopo la fase emorragica entrano nella fase della convalescenza, che dura fino a un anno e include sintomi a carico del sistema nervoso centrale, oltre a tachicardia e difficoltà respiratorie (Shayan et al., 2015). Non è mai stata registrata ricomparsa di sintomi in seguito alla guarigione.

I casi umani sono in genere eventi stagionali riportati soprattutto nelle zone rurali e agricole di paesi in via di sviluppo, dove si trova una maggiore interazione dell'uomo con il bestiame e l'ambiente. Altre fonti di infezione, anche se meno frequenti, riguardano l'esposizione dell'uomo a tessuti e fluidi biologici viremici, sia nei macelli che in ambito nosocomiale; inoltre l'uomo può infettarsi anche attraverso il consumo di latte non pastorizzato. Dati recenti dimostrano che l'areale delle zecche del genere *Hyalomma* si sta espandendo a causa dei cambiamenti climatici, siano essi naturali o di origine antropogenica, con conseguente aumento della diffusione del virus (Shayan et al., 2015). Questo genere di zecche predilige climi caldi e secchi, condizione che favorisce il loro ciclo vitale, costituito da quattro fasi sequenziali: uovo-larva-ninfa-adulto. Larve e ninfe parassitano mammiferi e uccelli di piccola taglia, mentre le zecche adulte si nutrono su mammiferi più grandi quali ovini e bovini (Fig. 2). Si ritiene che sostanze anticoagulanti e alcune proteine immunomodulanti presenti nella saliva dell'artropode favoriscano l'ingresso di eventuali patogeni in un ospite permissivo (Bente et al., 2013).



**Fig. 2** L'immagine mostra la circolazione del CCHFV. Si nota come le larve parassitano i mammiferi e gli uccelli di piccola taglia, mentre gli esemplari adulti si nutrono su mammiferi di maggiori dimensioni ed eventualmente sull'uomo. La trasmissione all'uomo avviene attraverso il contatto con liquidi corporei o tessuti appartenenti a un individuo o un animale infetto. In ambito ospedaliero,



*la trasmissione può avvenire per sterilizzazione impropria di apparecchiature mediche, riutilizzo di aghi e contaminazione di forniture mediche e medicinali (Preethi, 2020).*

Mentre i vertebrati parassitati dalle zecche presentano una viremia transitoria, esse sono caratterizzate da una viremia permanente: difatti si tratta non solo del vettore, ma anche del serbatoio del virus. Tuttavia, gli animali infettati da CCHFV a differenza dell'uomo, non presentano alcuna sintomatologia (Haddock et al., 2018). Il CCHFV può essere trasmesso da zecca a zecca mediante trasmissione transovarica (trasmissione verticale), trasmissione transtadiale (trasmissione orizzontale) e trasmissione venerea (fase di accoppiamento).

## **2.2 Agente eziologico: struttura del CCHFV e ciclo replicativo**

Il CCHFV presenta una struttura sferica di circa 100 nm di diametro; il virione è ricoperto da un envelope a doppio strato fosfolipidico derivante dalla gemmazione dalla cellula ospite. Il genoma virale è costituito da tre segmenti di RNA a polarità negativa di diversa lunghezza (S, M ed L), associati alla RNA polimerasi RNA dipendente (RdRp) e alla nucleoproteina (NP). Alle estremità 3' e 5' di ciascun frammento sono presenti le NCRs (complementary non coding regions), sequenze ripetute invertite non codificanti di 9 paia di basi che permettono la circolarizzazione dell'RNA e fungono da promotori trascrizionali e per la replicazione virale (Bente et al., 2013).

Il segmento S (1672 nucleotidi) codifica per la nucleoproteina, un'importante proteina multifunzionale del virus, e con un orientamento opposto codifica per una piccola proteina non strutturale (NSs), che sembra avere ruolo proapoptotico.

Il segmento M (5366 nucleotidi) contiene il gene per il precursore (GPC, poliproteina) delle glicoproteine virali, Gc o G1 (75kDa) e Gn o G2 (37kDa), che si localizzano sulla superficie del virione e mediano l'interazione con i recettori delle cellule sensibili, secondo un meccanismo non ancora del tutto noto. Tramite il processamento di GPC, che inizia nel RE e si conclude nel Golgi, avviene la formazione della proteina non strutturale m (NSm) e delle proteine non strutturali secrete (NSGs). I ruoli e il processo di maturazione delle proteine non strutturali non sono ancora chiari (Bente et al., 2013).

Il segmento genomico L (12108 nucleotidi) codifica per la proteina RpRd; essa presenta all'N terminale il dominio OTU (ovarian tumor cysteine protease), che ha un importante ruolo nell'evasione della risposta immunitaria dell'ospite. Il dominio RpRd è localizzato nella porzione C terminale della proteina ed è collegato al dominio OTU mediante una cerniera di leucine (leucine zipper), un motivo a dita di zinco (zinc finger) e un dominio endonucleasico.

Il ciclo replicativo del virus inizia in seguito al contatto tra le glicoproteine Gc e Gn e un recettore cellulare non ancora identificato. L'internalizzazione, che avviene tramite un processo di endocitosi in vescicole rivestite da clatrina, è dipendente dal colesterolo presente nelle membrane cellulari e dal pH. L'esposizione in superficie della nucleolina, una proteina multifunzionale coinvolta nel miglioramento dell'efficienza dell'ingresso anche di virus quali HIV e RSV, correla positivamente con la quantità di virus internalizzato (Shayan et al, 2015). Le vescicole rivestite contenenti i virioni migrano, grazie alle interazioni con il citoscheletro cellulare, presso gli endosomi precoci e successivamente ai corpi multivescicolari. In questi organelli, per variazione del pH, avviene la fusione dell'envelope virale con le membrane endosomiali, quindi la liberazione dei complessi ribonucleoproteici nel citoplasma. L'evento successivo è la trascrizione del genoma virale in un mRNA accessibile al macchinario di traduzione cellulare. Il processo è mediato dalla proteina L, che grazie al suo dominio endonucleolitico, è in grado di tagliare la porzione al 5' degli mRNA cellulare, aggiungerla a quello virale e utilizzare questo frammento double stranded come innesco.

La replicazione del genoma prevede un intermedio a RNA a con polarità positiva, e una volta conclusa la sintesi, si ha l'associazione di ciascun frammento genomico con la NP e l'RpRd. A livello dell'apparato di Golgi e del TGN si conclude l'assemblaggio e la gemmazione delle particelle virali, che saranno rilasciate per esocitosi.

### **2.3 Processo patogenetico della CCHF**

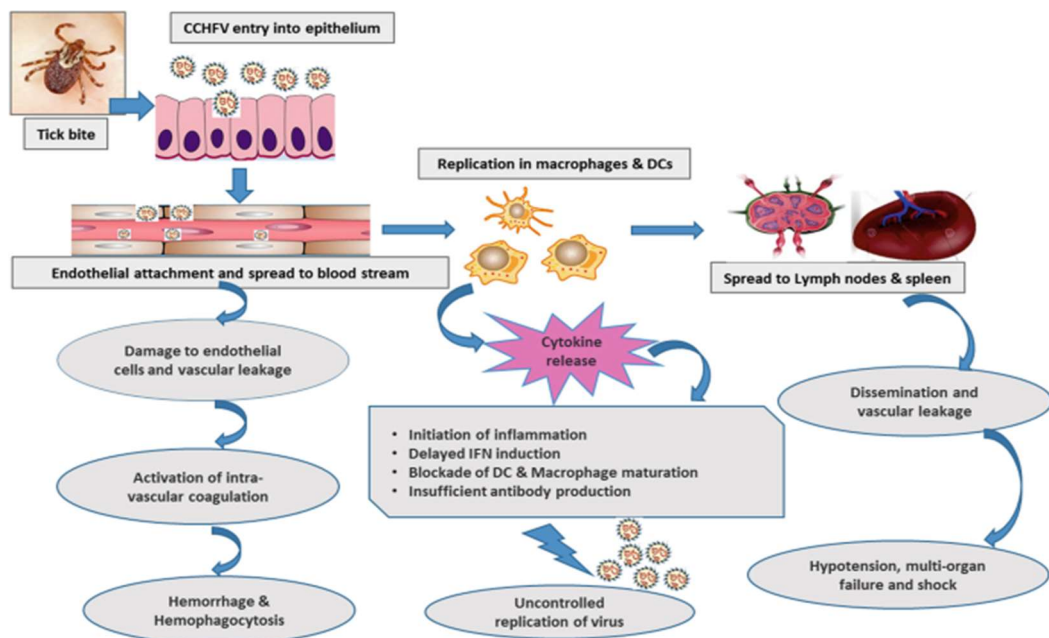
I dati riguardanti la patogenesi della CCHF sono limitati a causa della mancanza di animali modello per studiare la malattia, della necessità di manipolare il virus in laboratori BSL-4 e l'assenza di adeguate attrezzature per lo studio nei paesi endemici. Recentemente, è stato possibile approfondire le conoscenze riguardo la risposta immunitaria al virus grazie allo studio di esemplari modello quali i *Macaca fascicularis* (Haddock et al., 2018) e i topi deficienti nell'espressione dell'interferone di tipo I IFNAR<sup>-/-</sup> (Hawman et al., 2019), infettati dal ceppo Hoti-WT (isolato in Kosovo nel 2001, altamente patogeno).

È stato dimostrato che il CCHFV infetta per prime le cellule dendritiche (DCs) e i macrofagi, attori della risposta immunitaria innata; è così promossa la diffusione del virus ai tessuti linfoidei secondari (linfonodi e milza in particolare) e al circolo sanguigno (Rodriguez et al., 2022). Un altro tipo cellulare permissivo al virus è rappresentato dalle cellule endoteliali (ECs), le quali rivestono la superficie interna dei vasi sanguigni. Le cellule endoteliali possono essere attivate direttamente in seguito a infezione e replicazione virale, oppure indirettamente, come conseguenza

della produzione di citochine pro-infiammatorie, in particolare il TNF- $\alpha$  (Connolly-Andersen et al., 2011). L'attivazione delle ECs provoca un aumento della permeabilità dei vasi e, mediante l'upregolazione delle integrine ICAM-1, VCAM-1 e della E-selectina, è favorito il reclutamento di un gran numero di leucociti. Le DCs e i macrofagi attivati rilasciano citochine antinfiammatorie come IL-10, probabilmente necessarie nelle prime fasi dell'infezione per ritardare la risposta immunitaria, e citochine pro-infiammatorie quali TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1, IL-8. Un incremento troppo elevato di citochine pro-infiammatorie può provocare l'aumento della permeabilità dei vasi, quindi la fuoriuscita di liquido ematico, con rischio di shock e insufficienza multiorgano (Rodriguez et al., 2022) (Fig. 3).

Il fegato è un altro importante bersaglio dell'infezione e una delle principali sedi di replicazione; sono infettati dal virus sia gli epatociti, sia cellule epatiche non parenchimali come le cellule di Kupffer e le cellule endoteliali. La lesione epatica dovuta a infezione di CCHFV consiste in necrosi cellulare, iperplasia delle cellule di Kupffer e formazione dei corpi di Councilman (Lindsquit et al., 2018).

È stato inoltre dimostrato che proteine del CCHFV sono in grado di interagire con il meccanismo apoptotico (Karlberg et al., 2015). L'infezione da CCHFV impedisce il taglio della poli-ADPribosio polimerasi (PARP), evento necessario affinché avvenga l'apoptosi. Anche le caspasi-3 e 9 risultano inibite dall'infezione di CCHFV, e inoltre la nucleoproteina del virus è in grado di prevenire o ritardare l'apoptosi mediante meccanismi non del tutto chiariti.



**Fig. 3** L'immagine illustra schematicamente la patogenesi della CCHF. L'infezione delle ECs a carico del virus comporta il danneggiamento dell'endothelium vascolare, che può culminare nella coagulazione intravascolare disseminata (CID), quindi in emorragie nei casi più gravi. I macrofagi e le cellule dendritiche infette rilasciano una serie di citochine antinfiammatorie che ritardano la risposta immunitaria favorendo la replicazione virale, e citochine pro-infiammatorie in maniera

*incontrollata; la cytokine storm ha come conseguenza un'elevata risposta infiammatoria e una bassa risposta anticorpale. I macrofagi e le DCs infette diffondono il virus ai tessuti linfoidi secondari quali linfonodi e milza e nel circolo sanguigno, provocando perdita di sangue dai vasi, ipotensione e shock (A. A. Raut et al., 2020).*

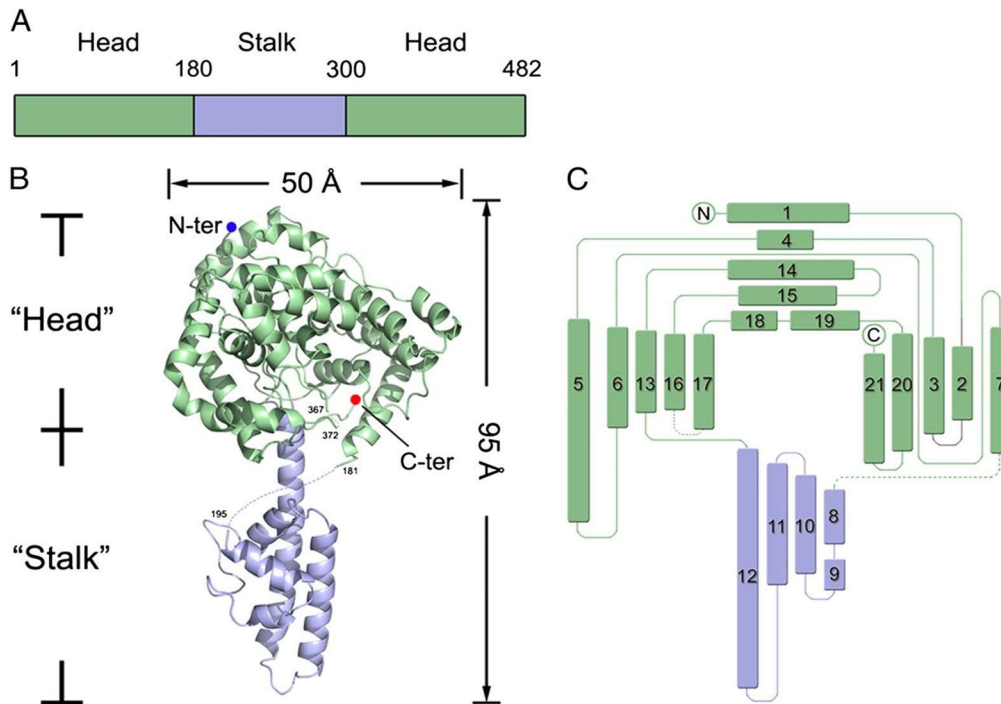
## **2.4 Caratteristiche e struttura della nucleoproteina**

La nucleoproteina è una proteina di 482 amminoacidi che si sviluppano in una struttura secondaria costituita da 18  $\alpha$ -eliche, comprendenti il 54% degli amminoacidi totali, e strutture a  $\beta$ -foglietto (2,5% degli amminoacidi totali). La conformazione tridimensionale è a "padella", con un dominio globulare e un braccio sporgente che presenta un sito di taglio per la caspasi-3 (DEVD), conservato nelle NP dei diversi ceppi virali. I due domini sono uniti da un motivo a cerniera, con dimensioni 40x50x95 Å (Dayer et al., 2015) (*Fig. 4*).

La NP è una proteina multifunzionale: svolge un ruolo strutturale, avvolgendo i segmenti genomici ed evitandone la degradazione, grazie alla maggiore affinità per RNA (-) dovuta alla presenza di regioni ricche di amminoacidi carichi positivamente. Diversi studi suggeriscono che la NP abbia anche una funzione elicastica, in grado di prevenire l'appaiamento dell'RNA genomico e l'RNA neosintetizzato, in modo tale da garantire una trascrizione e traduzione efficienti (Dayer et al., 2015). La nucleoproteina ha inoltre un importante ruolo regolatorio, che si concretizza nell'inibizione dell'apoptosi mediante diversi meccanismi: in primo luogo, la NP è un soppressore della proteina proapoptotica BAX, che permette la formazione del complesso per l'apertura del poro mitocondriale e il passaggio al citosol dei fattori necessari alla via delle caspasi (Karlberg et al., 2015); in secondo luogo, il taglio proteolitico del dominio DEVD, a carico della caspasi-3, porta alla formazione di due prodotti di clivaggio che si ritiene possano prevenire o ritardare l'apoptosi.

La NP risulta importante per l'evasione della risposta immunitaria, in quanto funge da soppressore del promotore dell'IFN- $\beta$ , fattore importante nella risposta antivirale.

Inoltre, la NP è proteina virale contro la quale è indotta risposta umorale maggiore, come risulta da uno studio in cui primati non umani sono stati vaccinati con DNA codificante gli antigeni della nucleoproteina e della poliproteina GPC e hanno sviluppato una quantità maggiore di IgG specifiche per NP (Rodriguez et al., 2022). La nucleoproteina induce risposta immunitaria cellulare, e potrebbe essere dunque considerata come antigene candidato per la formulazione di un vaccino.



**Fig. 4** Struttura della nucleoproteina di CCHFV. A) Schematizzazione dell'organizzazione in domini nella struttura primaria. B) Struttura tridimensionale della NP. Le porzioni tratteggiate corrispondono agli amminoacidi non identificati. C) Diagramma topologico. Il verde corrisponde al dominio globulare della NP, l'azzurro al braccio (Dayer et al., 2015).

## 2.5 HAZARA VIRUS: modello di studio del CCHFV

Per far fronte alla limitazione dovuta al biocontenimento del CCHFV, è stato individuato un modello surrogato, il virus Hazara (HAZV). Quest'ultimo appartiene al medesimo genere (*Orthonairovirus*), alla stessa famiglia (*Nairoviridae*) e allo stesso ordine (*Bunyvirales*) del CCHFV; presenta un genoma a RNA tri-segmentato a polarità negativa, costituito da un segmento S di 1677 nucleotidi (nt), M di 4575nt ed L di 11980nt. L'infezione da parte di HAZV porta alla produzione di anticorpi che proteggono contro un'infezione a carico di CCHFV: i due virus appartengono dunque allo stesso sierogruppo (Fuller et al., 2019). Inoltre, HAZV non causa malattie negli esseri umani ma in alcuni animali modello quali i topi knock-out per la risposta interferonica e le uova embrionate di pollo. Nei due esempi riportati, le caratteristiche patogenetiche e istopatologiche dell'infezione da HAZV rimandano all'infezione di CCHFV nell'uomo.

La nucleoproteina di HAZV ha la stessa struttura tridimensionale a "padella" della NP di CCHFV; i due polipeptidi condividono il 59% della sequenza, ma la NP di HAZV presenta 3 amminoacidi in più. Anche NP di HAZV, presenta un dominio in

grado di interagire con le caspasi (si parla in questo caso di DQVD) (Fuller et al., 2019).

Sulla base delle omologie tra i due tipi di virus, in particolare per quanto riguarda la nucleoproteina, si può concludere che HAZV è un buon modello surrogato per lo studio più agevole di CCHFV.

## 3. MATERIALI E METODI

### 3.1 Plasmidi

- **pcDNA 2.1 kit TOPO® TA-Cloning** (Invitrogen™)

Mediante l'uso del plasmide pcDNA TOPO® è possibile sfruttare il meccanismo di clonaggio TA, evitando l'utilizzo degli enzimi di restrizione. Grazie all'attività 3' transferasica della Taq polimerasi utilizzata nella reazione di PCR, una adenina è aggiunta all'estremità 3' del frammento amplificato; in questo modo, l'inserito potrà appaiarsi alle timine terminali sporgenti presenti nel vettore di clonaggio.

- **pRRLsin.PPTs.hCMV.eGFPpre**

Vettore lentivirale di terza generazione, derivato dal virus dell'immunodeficienza umana di tipo 1 (HIV-1); è Tat-indipendente e Self-Inactivating (SIN). Di seguito le componenti del vettore:

- LTR (*Long Term Repeat*) chimerica all'estremità 5': essa consiste, per quanto concerne la regione U3, nella sequenza del promotore/enhancer derivante dal genoma del virus del Sarcoma di Rous (RSV). La regione U5 della LTR deriva da HIV-1 ed è Tat-indipendente (la proteina Tat è un transattivatore dell'espressione genica virale);

- il segnale di incapsidamento  $\psi$  dell'HIV-1;

- i primi 653 amminoacidi del gene gag, la cui presenza assicura un'elevata efficienza di trasferimento genico;

- la sequenza RRE (*Rev Responsive Element*) che, grazie all'interazione con la proteina Rev, assicura il trasporto dell'RNA virale dal nucleo al citoplasma;

- la sequenza cPPT (*central Poly-Purine Tract*) del genoma di HIV-1 la cui presenza si è dimostrato aumentare l'efficienza dell'espressione genica in cellule con crescita arrestata;

- il promotore IE (Immediate Early) dell'HCMV (*Human Cytomegalo virus*) a monte del transgene;

- il gene reporter eGFP (*enhanced Green Fluorescent Protein*), codificante per una proteina di 238 amminoacidi e con un peso molecolare di 27 kDa;

- la sequenza WPRE (*Woodchuck Hepatitis C Virus Post-transcriptional Regulatory Element*), che garantisce stabilità ai trascritti virali;

- LTR in 3' con una delezione nella regione U3. La delezione rende il vettore Self-Inactivating (SIN) in seguito alla retrotrascrizione. Il vettore SIN impedisce l'attivazione di eventuali oncogeni adiacenti al sito di integrazione del vettore.

Plasmidi di packaging di terza generazione per vettori lentivirali:

- **pMDLg/pRRE**

Plasmide che codifica per i geni gag e pol di HIV-1, posti sotto il controllo trascrizionale del promotore IE di HCMV, un promotore forte che ne permette un elevato tasso di espressione. pol codifica per proteine non strutturali quali la proteasi, la trascrittasi inversa e l'integrasi; gag codifica per le proteine del capside. Questo elemento genetico presenta la sequenza RRE (Rev Responsive Element) che permette il trasporto dell'mRNA corrispondente al citoplasma. Sono inoltre presenti la sequenza di poliadenilazione della  $\beta$ -globina umana, l'origine di replicazione batterica e la cassetta di resistenza all'ampicillina.

- **pREV**

Plasmide contenente il gene Rev di HIV-1 sotto il controllo trascrizionale del promotore di RSV. La proteina Rev riconosce e lega la sequenza RRE presente in alcuni mRNA, permettendone un efficiente trasporto al citosol. Inoltre, pREV presenta la sequenza di poliadenilazione del gene della  $\beta$ -globina umana, l'origine di replicazione batterica e la cassetta di resistenza all'ampicillina.

- **pVSV-G**

Il plasmide contiene il gene vsv-g di VSV (virus della stomatite vescicolare) posto sotto il controllo trascrizionale del promotore Immediate Early di HCMV. Il gene vsv-g codifica per la glicoproteina G del pericapside di VSV, e la sua espressione sulla superficie virale conferisce un ampio spettro di infezione. Analogamente agli altri plasmidi di packaging, pVSV-G presenta l'introne e la sequenza di poliadenilazione del gene della  $\beta$ -globina umana, l'origine di replicazione batterica e la cassetta di resistenza all'ampicillina.

### 3.2 Linee cellulari

- **Cellule HEK293T**

Linea cellulare immortalizzata derivante da cellule embrionali di rene umano che esprimono costitutivamente l'antigene T del virus vacuolante della scimmia (SV40).

- **Cellule Huh7**

Linea cellulare derivata da carcinoma epatico, originariamente prelevata da un individuo maschio giapponese di 57 anni; è spesso utilizzata per lo studio del virus dell'epatite C e del virus Dengue.



Le cellule sono state coltivate in terreno di crescita DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco) a cui è stato addizionato il 10% volume su volume di FBS (Fetal Bovin Serum, Gibco) inattivato preventivamente a 56°C per 30 minuti. Le cellule poi sono state mantenute in incubatore a temperatura (37°C) e umidità relativa (95%) controllate, in atmosfera addizionata con il 5% di anidride carbonica.

### **3.3 Tecniche della biologia molecolare**

#### **3.3.1 Preparazione dei batteri competenti**

Per rendere competenti i batteri *E. coli* DH5 $\alpha$  è stato utilizzato il metodo chimico del cloruro di calcio. Un'aliquota di batteri (50  $\mu$ L) è stata fatta crescere in 3 mL di terreno LB (Luria Bertani) privo di ampicillina, addizionato di cloruro di magnesio 15 mM, alla temperatura di 37°C, fino al raggiungimento di una densità ottica (OD) di 0.4-0.6 alla lunghezza d'onda di 600 nm. Successivamente, l'inoculo è stato trasferito in un volume di 400 mL dello stesso terreno e i batteri sono stati lasciati crescere fino al raggiungimento della medesima OD.

Al fine di arrestare la crescita batterica alla OD desiderata, la coltura è stata posta rapidamente in ghiaccio. Segue uno step di centrifugazione a 3500 rpm per 15 minuti a 4°C e risospensione in soluzione fredda contenente MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O 10 mM, CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O 50 mM e acido 2-(N-morfolino)-etansolfonico (MES) 10 mM a pH 6.3. Dopo un ulteriore ciclo di centrifugazione (4°C, 15 minuti) ed eliminazione del surnatante, i batteri sono stati risospesi in una soluzione analoga a quella descritta, con l'aggiunta di glicerolo al 15% v/v. Il glicerolo funge da crioprotettore ed è necessario in quanto i batteri competenti sono in ultimo aliquotati (1 aliquota=50  $\mu$ L) e conservati a -80°C fino al loro utilizzo.

#### **3.3.2 Trasformazione dei batteri competenti**

I plasmidi sono stati amplificati mediante trasformazione con shock termico di cellule competenti di *E. coli* DH5 $\alpha$ . Il processo di trasformazione è stato condotto tramite shock termico sui batteri competenti. A un'aliquota di 50  $\mu$ L sono stati addizionati 50-100 ng di DNA, e la soluzione è stata posta in ghiaccio per 30 minuti. In seguito, i batteri sono stati incubati a 37°C per 2-3 minuti e poi nuovamente in ghiaccio. Dopo aver aggiunto 200 mL di terreno LB alla soluzione a temperatura ambiente, i batteri sono riposti alle condizioni di temperatura ottimali per la crescita (37°C) per 1 ora e 30 minuti. I batteri sono poi stati piastrati su capsule Petri contenenti terreno LB con agarosio, al quale è aggiunta ampicillina. Dopo un'incubazione a 37°C overnight, cresceranno sulle piastre solo le colonie

batteriche resistenti all'antibiotico, ovvero quelle trasformate con il plasmide di interesse. Si è quindi proceduto con la selezione di una colonia e il suo inoculo in un tubo con terreno liquido. Segue crescita overnight.

### **3.3.3 Maxi-purificazione del DNA plasmidico**

Per ottenere la maxi-prep è stato seguito il protocollo “QUIAGEN® Plasmid Maxi Kit”, che prevede l'utilizzo della tecnica cromatografica a scambio ionico per l'isolamento del DNA. L'acido nucleico è stato estratto dalla colonia batterica contenente il plasmide di interesse, lasciata crescere overnight in un tubo ventilato, in 3 mL di terreno LB con l'agente di selezione (amp=100 µg/mL), in agitazione (115-120 rpm). La colonia batterica è stata poi trasferita in 250 mL di terreno di coltura con Ampicillina e lasciata crescere in agitazione (115-120 rpm) a 37°C per 16 h. I batteri, trasferiti in appositi tubi, sono centrifugati a 4900 rpm per 15 minuti e risospesi nella soluzione P1 del kit (50 mM glucosio, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA pH 8.0). Segue l'aggiunta di 10 mL di soluzione P2 (0.2M NaOH, 1% SDS) e un'incubazione di 5 minuti a RT. Infine, sono stati aggiunti 10 mL di soluzione P3 (60% potassio acetato 5 M, 11.5% acido acetico glaciale) e la soluzione finale è stata quindi incubata in ghiaccio per 20 minuti. E' stata poi condotta una centrifugazione di 30 minuti a 14900 rpm (SORVALL® RC5 PLUS | *Marshall Scientific*) per isolare gli acidi nucleici nel surnatante; quest'ultimo è quindi trasferito in una colonna a scambio ionico, precedentemente equilibrata con 10 mL di Buffer QBT. Per permettere solo alla molecola di interesse di restare unita alla matrice della colonnina, sono stati effettuati due lavaggi con 30 mL di Buffer QC, seguiti da un lavaggio con 15 mL di buffer di eluizione QF, che permette l'eluizione del DNA. L'acido nucleico raccolto è successivamente precipitato mediante l'azione dell'isopropanolo (10.5 mL) e uno step di centrifugazione di 60 minuti a 8300 rpm a 4°C. Il pellet è lavato con 5 mL di EtOH al 70% e centrifugato per altri 15-20 minuti a 8300 rpm a 4°C (Biofuge Primo R | Thermo Scientific™). In seguito all'eliminazione del surnatante, il DNA sedimentato è stato risospeso in 300 µL di TE sterile.

## **3.4 Tecniche della biologia cellulare**

### **3.4.1 Cotrasfezione delle cellule HEK293T con calcio-fosfato**

La trasfezione con calcio-fosfato è un metodo chimico che permette il trasferimento di una molecola di DNA all'interno delle cellule, tramite un meccanismo ancora poco noto. Le cellule HEK293T sono utilizzate come cellule di packaging per la

produzione delle particelle lentivirali, e devono quindi essere cotrasfettate con i 3 plasmidi helper (pREV, pVSV, pMDL) e con il vettore lentivirale. Le cellule sono seminate su 2 piastre contenenti 20 mL di terreno e incubate per un giorno a 37°C, 95% di umidità relativa e 5% v/v di CO<sub>2</sub>, prima della trasfezione.

Per preparare la miscela di trasfezione sono state allestite 2 eppendorf contenenti 450 µL di acqua MilliQ. A ciascuna provetta sono poi stati aggiunti i 3 costrutti di packaging (2 µg di pREV, 3.5 µg di pVSV e 7µg di pMDL in totale) opportunamente diluiti in acqua MilliQ fino al volume finale di 50 µL.

In seguito, in una eppendorf è stato aggiunto il vettore lentivirale pRRLsin.PPTs.Hcmv.eGFPpre, mentre nell'altra provetta è aggiunto lo stesso volume di acqua come controllo. Infine, in ciascuna provetta sono stati posti 50 µL di CaCl<sub>2</sub>.

In altre 2 eppendorf vuote sono stati posti 500 µL della soluzione salina HBS, e in ognuna di esse sarà versato l'intero contenuto di una delle provette allestite in precedenza. La soluzione è stata lasciata incubare per 20-30 minuti a temperatura ambiente per permettere la formazione dei precipitati di DNA fosfato di calcio. Dopo l'incubazione, la miscela è trasferita goccia a goccia su ciascuna delle 2 piastre contenenti le cellule 293T da trasfettare. Dopo 6-8 h, il terreno di coltura è rimosso e le cellule sono lavate con PBS prima dell'aggiunta di terreno privo di sali (DMEM 10% FBS).

### **3.4.2 Raccolta e filtrazione del surnatante contenente le particelle lentivirali**

Le particelle lentivirali sono state raccolte dal surnatante a 48 h dalla trasfezione. Il surnatante è stato centrifugato per 10 minuti a 1200 rpm in modo tale da eliminare le cellule che avrebbero potuto staccarsi dal monostrato. Per purificare le particelle lentivirali, è stata eseguita una filtrazione con filtri da 0.45 µm. Il filtrato contenente le particelle lentivirali è stato successivamente aliquotato in eppendorf da 2 mL e conservato a -80°C.

### **3.4.3 Trasduzione delle cellule Huh7 con le particelle lentivirali**

La trasduzione del segnale mediata da particelle lentivirali è un metodo biologico di trasferimento genico che sfrutta la capacità dei virus di veicolare materiale genetico all'interno della cellula infettata.

Le cellule Huh7 sono state trasdotte con particelle lentivirali contenenti il vettore pRRLsin.PPTs.hCMV.eGFPpre, esprime il gene reporter eGFP, prima di attuare la trasduzione con i virioni ricombinanti esprimenti la nucleoproteina. Questo passaggio è stato effettuato per valutare l'efficienza di tre protocolli di trasduzione:

- **singola trasduzione:**  $4 \times 10^5$  cellule sono state incubate per 24 h con 500  $\mu\text{L}$  di particelle lentivirali. A seguire, le cellule sono state sottoposte a due lavaggi con PBS e incubazione in terreno DMEM (10% FBS) per 48 h;
- **spin inoculation:** le cellule, incubate con 500  $\mu\text{L}$  di particelle lentivirali, sono state centrifugate per 2 h a 2000 rpm a  $25^\circ\text{C}$ , e incubate per 24 h. In seguito, sono stati aggiunti 500  $\mu\text{L}$  di terreno fresco e incubate nuovamente per 24 h;
- **doppia trasduzione:** 24 h dopo una trasduzione secondo il processo indicato per primo, le cellule sono state sottoposte a una seconda trasduzione analoga e successivamente incubate per altre 24 h.

#### 3.4.4 Citofluorimetria

Trascorse 48 h dalla trasduzione con le particelle lentivirali esprimenti la proteina fluorescente, le cellule Huh7 sono state raccolte e centrifugate a 1200 rpm per 10 minuti a  $4^\circ\text{C}$ . In seguito a due lavaggi in PBS freddo, le cellule sono risospese in 500  $\mu\text{L}$  PBS per essere analizzate al citofluorimetro (FACSCALIBUR; Beckton & Dickson). La Green Fluorescent Protein assorbe a una lunghezza d'onda di 395 nm nel visibile e ha il suo picco massimo di emissione a 508 nm, pertanto non è necessaria la presenza di un substrato o cofattore.

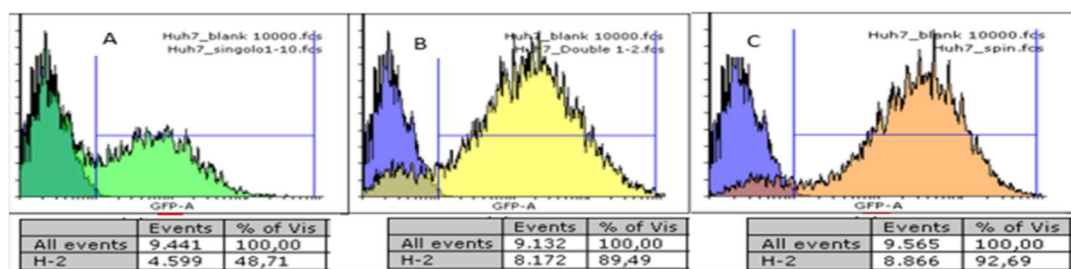
I dati ottenuti dal citofluorimetro sono stati analizzati dal programma Flowing Software 2 e rappresentati sotto forma di *Histogram Plot*.

## 4. RISULTATI

### 4.1 Valutazione dei protocolli di trasduzione

Prima di trasdurre le cellule Huh7 con i virioni ricombinanti esprimenti la nucleoproteina di CCHFV, è stata valutata l'efficienza di tre diversi protocolli di trasduzione (singola trasduzione, spin inoculation e doppia trasduzione) mediante l'utilizzo di particelle lentivirali che portassero il gene della eGFP.

Le cellule Huh7 trasdotte con il plasmide contenente il gene reporter sono state sottoposte ad analisi citofluorimetrica. L'intensità di fluorescenza è stata misurata nel canale dell'FL-1 (verde), in cui l'emissione della proteina ha il suo picco massimo (508 nm). Come controllo negativo sono state utilizzate le cellule non trasdotte.



**Fig. 5** A) Singola trasduzione B) Doppia trasduzione C) Spin inoculation. Ciascun grafico mostra l'emissione della fluorescenza della popolazione di controllo (area di sinistra, verde scuro nel grafico A, azzurro nei grafici B e C), a confronto con la fluorescenza della popolazione campione. Il marker dell'area H-2 evidenzia la percentuale di cellule positive alla eGFP. Sull'asse delle ascisse è rappresentata l'intensità della fluorescenza, mentre l'asse delle ordinate indica gli eventi di fluorescenza.

Dai risultati si evince che il metodo di trasduzione più efficiente in questo caso è la spin inoculation, con il 92.69% delle cellule positive per l'espressione della eGFP. Anche la doppia trasduzione sembra essere un protocollo efficiente: l'89.49% delle cellule trasdotte sono risultate positive per l'espressione della eGFP. Per quanto riguarda i picchi di fluorescenza, nel caso della singola trasduzione si evidenzia un picco più basso rispetto agli altri due e riflette quindi una minore efficienza del metodo di trasduzione delle cellule. Nei grafici ottenuti analizzando le cellule che hanno subito doppia trasduzione o spin inoculation il picco risulta quasi coincidere. Ciò si accorda con la migliore espressione della fluorescenza nel caso della doppia trasduzione e della spin inoculation.



## 5. DISCUSSIONE

Il virus della febbre emorragica della Crimea-Congo è un virus trasmesso dagli artropodi (*Arbovirus, Arthropod-Borne Virus*), in particolare dalle zecche del genere *Hyalomma*. Il CCHFV è l'agente eziologico della febbre emorragica della Crimea-Congo, zoonosi caratterizzata da una letalità piuttosto elevata (fino al 70% nelle regioni in cui è endemica), fattore che rende il CCHFV classificabile come virus altamente patogeno per l'uomo. Al contrario, negli animali infettati dal virus, non si riscontra una sintomatologia ascrivibile a quella osservata in *Homo sapiens*, pertanto lo studio della patologia in animali modello risulta difficoltosa e i meccanismi patogenetici non sono ancora del tutto noti.

Il seguente lavoro di tesi si inserisce in un progetto finalizzato a valutare e confrontare la risposta immunitaria di cellule appartenenti a linee cellulari modello (ad esempio la linea cellulare di fegato Huh7), nei confronti della nucleoproteina del virus Hoti-WT (altamente patogeno, isolato in Kosovo nel 2001), del virus adattato in laboratorio, non patogeno IbAr 10200 (isolato in Nigeria nel 1996) e del virus HAZV, utilizzato come modello surrogato del CCHFV.

Nel progetto di tesi, è stato utilizzato il plasmide pcDNA TOPO®, nel quale era stato clonato il gene codificante la nucleoproteina, per trasformare i batteri *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante shock termico, permettendo l'amplificazione del costrutto genico. Dopo averne comprovato la presenza, l'inserito è stato clonato nel vettore lentivirale di terza generazione pRRLsin.PPTs.hCMV.eGFPpre, esprimente la eGFP (questo passaggio era stato eseguito precedentemente al progetto di tesi). Il trasferimento genico è stato effettuato grazie l'utilizzo di particelle lentivirali prodotte in cellule HEK293T, trasfettate mediante il metodo chimico del calcio fosfato con i tre plasmidi di packaging (pMDLg/pRRE, pREV e pVSV-G) e il vettore lentivirale pRRLsin.PPTs.hCMV.eGFPpre. I virioni ricombinanti ottenuti sono stati trasdotti in cellule Huh7 secondo tre protocolli differenti: la singola trasduzione, la spin inoculation e la doppia trasduzione. La spin inoculation è un metodo che prevede un passaggio di centrifugazione della soluzione, in seguito all'aggiunta delle particelle lentivirali alle cellule, mentre la singola trasduzione consiste nell'incubazione statica delle cellule con i virioni ricombinanti; la doppia trasduzione prevede la ripetizione dei passaggi della singola trasduzione, a distanza di 24 h.

Per valutare l'efficacia di trasferimento genico dei tre protocolli, sono stati messi a confronto i grafici ottenuti dall'analisi citofluorimetrica delle cellule trasdotte con le particelle lentivirali contenenti il plasmide pRRLsin.PPTs.hCMV.eGFPpre. Esaminando l'intensità della fluorescenza e la percentuale di cellule esprimenti la eGFP nei tre casi, si può concludere che la spin inoculation è il protocollo più efficiente, con il 92.69% delle cellule trasdotte.

Lo step successivo consisterà nel valutare le citochine prodotte dalle cellule trasdotte con le particelle lentivirali esprimenti le nucleoproteine del CCHFV Hoti-WT, IbAr 10200 e HAZV mediante test ELISA e confrontarle, con lo scopo di ampliare la conoscenza sulla patogenesi della febbre emorragica della Crimea-Congo. Oltre a questo, verranno messi a punto saggi di co-immunoprecipitazione con l'obiettivo di identificare gli interattori cellulari e comprendere meglio la risposta cellulare all'infezione. In questo modo sarà possibile contribuire a chiarire i meccanismi patogenetici del virus, tutt'oggi largamente sconosciuti.



## 6. BIBLIOGRAFIA

Bente D. A., Forrester N. L., Watts D. M., McAuley A. J., Whitehouse C. A., Bray M. (2013). **Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity.** *Antiviral Research*, 100, 159-89.

Connolly-Andersen A. M., Moll G., Andersson C., Akerström S., Karlberg H., Douagi I., Mirazimi A. (2011). **Crimean-Congo hemorrhagic fever virus activates endothelial cells.** *J Virol.*;85(15):7766-74

Dayer M. R., Dayer M. S., Rezatofghi S. E. (2015). **Mechanism of preferential packaging of negative sense genomic RNA by viral nucleoproteins in Crimean-Congo hemorrhagic Fever virus.** *Protein J.* 34(2):91-102.

Fuller J., Surtees R. A., Shaw A. B., Álvarez-Rodríguez B., Slack G. S., Bell-Sakyi L., Mankouri J., Edwards T. A., Hewson R., Barr J. N. (2019). **Hazara nairovirus elicits differential induction of apoptosis and nucleocapsid protein cleavage in mammalian and tick cells.** *J Gen Virol.* 100(3):392-402.

Haddock E., Feldmann F., Hawman D. W., Zivcec M., Hanley P. W., Saturday G., Scott D. P., Thomas T., Korva M., Avšič-Županc T., Safronetz D., Feldmann H. (2018). **A cynomolgus macaque model for Crimean-Congo haemorrhagic fever.** *Nat Microbiol.* 3(5): 556–562.

Hawman D. W., Meade-White K., Haddock E., Habib R., Scott D., Thomas T., Rosenke R., Feldmann H. (2019). **Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Mouse Model Recapitulating Human Convalescence.** *J Virol.* 93(18):e00554-19.

Karlberg H., Tan Y. J., Mirazimi A. (2015). **Crimean-Congo haemorrhagic fever replication interplays with regulation mechanisms of apoptosis.** *J Gen Virol.* 96(Pt 3):538-546.

Lindquist M. E., Zeng X., Altamura L. A., Daye S. P., Delp K. L., Blancett C., Coffin K. M., Koehler J. W., Coyne S., Shoemaker C. J., Garrison A. R., Golden J.W. (2018). **Exploring Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus-Induced Hepatic Injury Using Antibody-Mediated Type I Interferon Blockade in Mice.** *J Virol.* 92(21):e01083-18.

Rodriguez S. E., Hawman D. W., Sorvillo T. E., O'Neal T. J., Bird B. H., Rodriguez L. L., Bergeron É., Nichol S. T., Montgomery J. M., Spiropoulou C. F., Spengler J.

R. (2022). **Immunobiology of Crimean-Congo hemorrhagic fever.** *Antiviral Res.*199:105244.

Shayan S., Bokaeian M., Shahrivar M. R., & Chiknar S (2015). **Crimean-Congo Hemorrhagic Fever.** *Lab Medicine*, 46, 180-189.