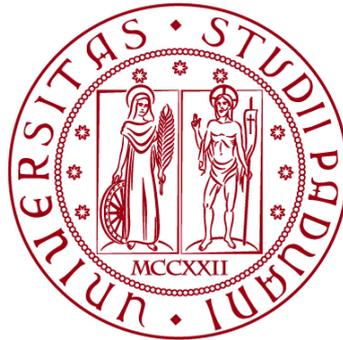


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Validazione e applicazione di metodiche di RT-qPCR
per la quantificazione dell'espressione genica di
mediatori dell'infiammazione in polli infettati con
diversi genotipi di IBDV**

Tutor: Prof Giovanni Franzo

Dipartimento di Medicina Animale, Produzione e Salute (MAPS)

Laureando: Alessandro Condorelli

Matricola n° 1238111

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

INDICE

ABSTRACT

1 INTRODUZIONE

1.1 Il virus della bursite infettiva (IBDV)

1.2 Ingresso del virus:

1.3 Trasmissione

1.4 Patologia e funzioni proteine virali

1.4.1 Funzione VP2

1.4.2 Funzione VP5

1.4.3 Funzione VP4

1.4.4 Funzione VP3

1.4.5 Effetti immunità innata

1.5 Variazione ceppo ITA

1.6 Ruolo delle citochine durante l'infezione

1.7 Apoptosi

1.8 Quantificazione genica

1.9 Rt-qPCR

1.10 Metodo $\Delta\Delta Ct$

2 MATERIALI E METODI

2.1 Parte sperimentale

2.2 Validazione del metodo

2.3 Retrotrascrizione

2.4 Scelta Geni

3 RISULTATI E DISCUSSIONE

BIBLIOGRAFIA

Abstract

Lo studio si propone di validare e applicare metodiche di RT-qPCR per la quantificazione dell'espressione genica di mediatori dell'infiammazione in polli infettati con diversi genotipi di IBDV (Virus della malattia di Gumboro). La RT-qPCR (Reverse Transcription-Quantitative Polymerase Chain Reaction) è una tecnica di biologia molecolare che consente di amplificare e quantificare degli RNA target. Nel contesto di questo studio la metodica è stata utilizzata per ottenere la quantificazione relative dei geni di interesse rispetto ai geni housekeeping di riferimento actina e GAPDH. A tal fine, la validazione della metodica di RT-qPCR implica la verifica di vari parametri, quali l'efficienza dell'amplificazione, la specificità della reazione, la linearità della curva standard, l'accuratezza e la riproducibilità delle misure. Durante questo studio è stata verificata l'espressione di geni che codificano proteine che hanno un ruolo chiave nella risposta immunitaria innata e adattiva. Lo scopo ultimo è stato quello di valutare e quantificare le differenze nell'interazione virus-ospite indotta dai genotipi di IBDV ITA e STC, confrontando appunto l'espressione di geni coinvolti durante la risposta (BAX, BCL2, CASP3, CASP9, INF-B, INF-G, IL1, IL6, OAS e PKR).

1. Introduzione:

1.1 Il virus della bursite infettiva (IBDV) è un virus privo di envelope appartenente alla famiglia *Birnaviridae*, genere *Avibirnavirus*, avente come genoma un doppio filamento di RNA. Esistono due sierotipi: i sierotipi 1 e 2; entrambi i sierotipi possono infettare naturalmente polli, tacchini, anatre, faraone e struzzi; tuttavia, solo il sierotipo 1 è patogeno per i polli. Il genoma del virus può essere suddiviso in due frammenti di diverse dimensioni (A, B); il frammento A, che conta 3.17 kb, è il più grande e codifica le proteine VP2-3-4-5 mentre il segmento B (2.8kb) codifica la VP1 (RNA-dependent RNA-polymerase). Le proteine VP2 e VP3 sono le principali proteine strutturali, esse formano rispettivamente il 51% e il 40% del virione. Il VP2 maturo con una quantità variabile di pVP2 e VP3 assemblano il capsido icosaedrico caratteristico di IBDV. I peptidi rilasciati derivanti dalla pVP2 scissa vengono anche assemblati nel virus, contribuendo alla vitalità del virus e alla perforazione della membrana cellulare. [1]

1.2 Ingresso del virus:

Essendo un virus privo di envelope, l'IBDV non potrà fondersi direttamente con la membrana delle cellule bersaglio. Il primo passo sarà l'attacco del virus alla superficie della membrana cellulare delle cellule bersaglio legandosi a recettori specifici. Le modalità con cui avviene questo processo, tuttavia, non sono ancora state pienamente definite. È stato però dimostrato che diverse proteine sulla superficie cellulare bersaglio si vanno a legare a VP2 permettendo l'adesione del virus. [2]

L'immunoglobulina M di superficie (sIgM) è il primo recettore cellulare segnalato per l'IBDV. Successivi studi hanno dimostrato che la catena leggera λ di sIgM può legarsi alle particelle virali in modo indipendente dalla virulenza [2]. È stato scoperto che HSP90 di pollo presente nella superficie della membrana cellulare di fibroblasti di embrioni di pollo DF-1 interagisce con la particella subvirale VP2 (SVP subviral particle), agendo come un presunto recettore. Possiamo quindi affermare che, anche senza una certezza dei precisi meccanismi, la proteina VP2 svolge un ruolo fondamentale nell'ingresso del virus. Una volta avvenuta l'adesione cellulare il virus deve essere internalizzato per endocitosi. Questo processo viene mediato dall'interazione tra la sequenza proteica Ila-Asp-Ala (presente in VP2 virale) e l'integrina $\alpha\beta 1$. Questa interazione permette la fosforilazione di c-Src che a sua volta attivando la cascata di riarrangiamento Akt-RhoA-actina permette l'endocitosi di IBDV [3]. L'abbondanza di $\alpha\beta 1$ nei linfociti non maturi contribuisce al tropismo virale nei confronti di animali giovani. Dopo l'ingresso del virus nella cellula ospite, al fine di poter rompere la membrana endosmiale, il virus rilascia Pep46 (un peptide associato al capsido generato dal terminale C di pVP2 mediante scissione mediata dalla VP4). Studi svolti (Galloux, Marie et al. "Infectious bursal

disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes.” The Journal of biological chemistry vol. 282,28 2007) su questa molecola hanno dimostrato la sua capacità di formare dei pori nella membrana. [9]

1.3 Trasmissione

L'IBDV è altamente contagioso, esso può essere trasmesso attraverso il contatto diretto tra polli infetti e sani, oppure attraverso l'esposizione a materiali contaminati come acqua, mangimi, attrezzature agricole e superfici. Le persone possono anche veicolare il virus attraverso indumenti, attrezzi o calzature.

1.4 Patologia

Dato il particolare tropismo virale per la borsa di Fabrizio, la malattia clinica è associata all'età degli uccelli. Tra le 3 e le 6 settimane di età si ha la massima massa della borsa e si ha un'ampia popolazione di linfociti B portatori di IgM (linfoblasti) in maturazione, principale bersaglio del virus. I giovani uccelli di età compresa tra le 2 e le 8 settimane, che hanno una borsa di Fabrizio altamente attiva, sono quindi più suscettibili alla malattia. Gli uccelli di età superiore sono resistenti al virus e non mostrano segni clinici a meno che non siano infettati da ceppi altamente virulenti. [4]

Dopo l'ingestione, il virus distrugge i follicoli linfoidi nella borsa di Fabrizio e le cellule B presenti nei tessuti linfoidi secondari come GALT, BALT e CALT. La malattia acuta e la morte dell'organismo sono dovute alla capacità di indurre necrosi nei tessuti. I soggetti che superano la fase acuta possono egualmente manifestare immunosoppressione e quindi maggiore suscettibilità ad altri agenti infettivi. In sintesi, i principali meccanismi patogenetici sono:

1. **Danno alla Borsa di Fabrizio:** L'IBDV attacca principalmente la borsa di Fabrizio, un organo linfatico responsabile della produzione e della maturazione delle cellule del sistema immunitario (linfociti B). Il virus infetta le cellule della borsa di Fabrizio, causando danni diretti e riducendo la capacità dell'organo di svolgere la sua funzione.
2. **Soppressione immunitaria:** A causa dell'attacco alle cellule della borsa di Fabrizio, l'IBDV provoca una soppressione del sistema immunitario. Questo indebolisce la risposta immunitaria dell'uccello, rendendolo più suscettibile alle infezioni batteriche, virali e parassitarie.
3. **Sintomi clinici:** L'infezione da IBDV può portare a una serie di sintomi clinici, che includono depressione, debolezza, perdita di piumaggio, ridotta crescita, diarrea e in alcuni casi alta mortalità. I sintomi possono variare in base al ceppo virale, all'età dell'uccello e alle condizioni ambientali.

Fra i meccanismi patogenetici responsabili del danno e dell'immunosoppressione figura l'apoptosi.

Durante l'infezione da IBDV, oltre alla rapida perdita di cellule B nella borsa di Fabrizio, si è notato un alto livello di apoptosi nei linfociti del sangue periferico di pollo. Inizialmente si pensava che questa apoptosi fosse un sistema di difesa cellulare utilizzato dall'organismo contro l'invasione virale, poiché l'apoptosi delle cellule infette limita la replicazione e la diffusione virale [5]. Successivi studi hanno però messo in evidenza il contrario. Sembra infatti che l'apoptosi che si verifica nell'infezione da IBDV sia indotta dal virus stesso e non sia una delle risposte antivirali dell'ospite, poiché l'apoptosi della cellula ospite contribuisce al rilascio virale nelle fasi avanzate del ciclo replicativo, il che è ovviamente vantaggioso per la proliferazione dell'IBDV piuttosto che per la sopravvivenza dell'ospite. Quindi gli studiosi si sono concentrati su quelle proteine virali che manipolano o inducono questo processo. In particolare, la proteina strutturale VP2 e la proteina non strutturale VP5 sono le armi impiegate dall'IBDV per indurre il processo di morte cellulare programmata.

Una rappresentazione grafica della complessa rete di interazioni che coinvolgono le diverse proteine virali è riportata in Figura 1.

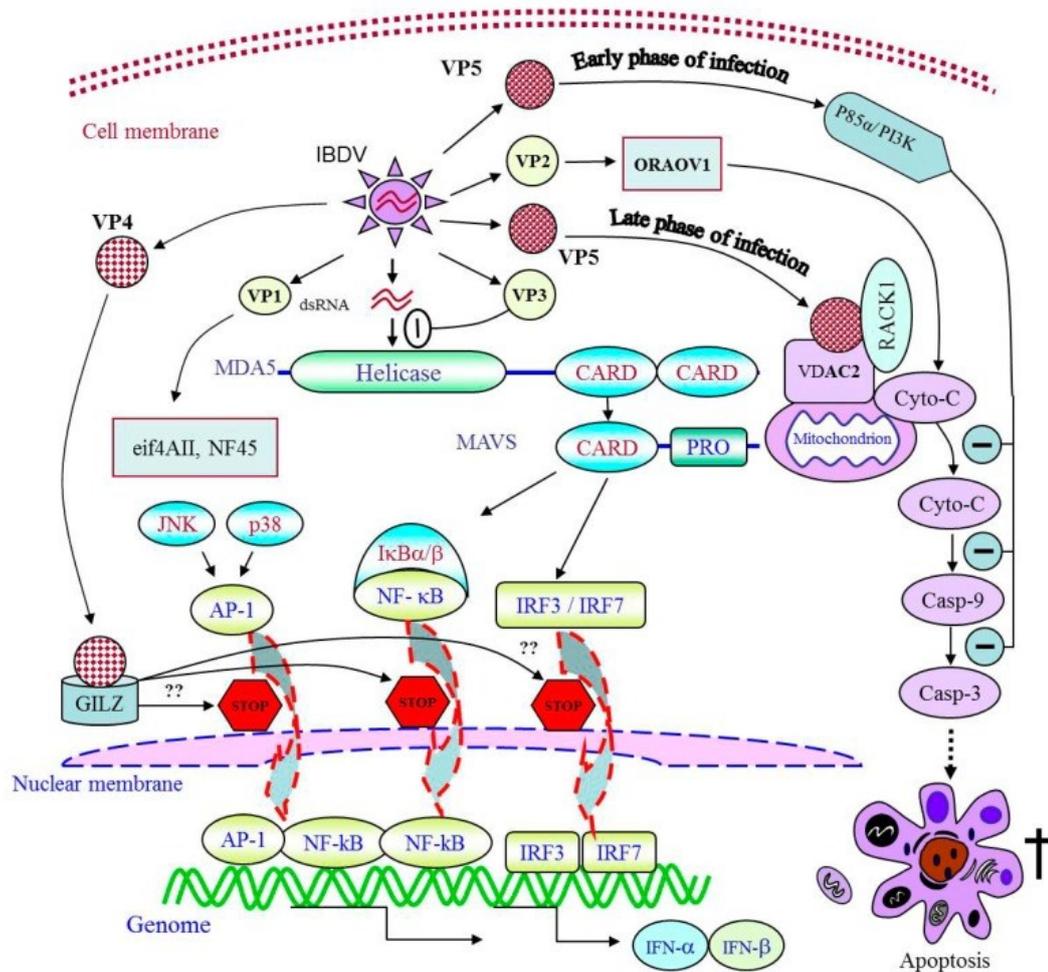


Figura 1. Riassunto delle interazioni che coinvolgono le diverse proteine virali. Ottenuto da <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5297794/figure/ijms-18-00161-f001/>

Funzione VP2

La VP2 è stato il primo induttore apoptotico identificato nell'infezione da IBDV. Questa proteina causa citotossicità nelle cellule ospiti e anche in una varietà di linee cellulari di mammiferi [6]. Questo ci suggerisce che il meccanismo che lega VP2 e l'apoptosi include segnali di morte cellulare conservati tra specie diverse. Si è notato che l'azione della VP2 nella downregulation della sintesi proteica cellulare si localizzi a monte della catena che porta alla produzione BCL2. Tale processo è accompagnato dall'attivazione della via della proteina chinasi R (PKR). Nelle cellule infettate con IBDV si è notato un aumento dello stress ossidativo e quindi formazione di ROS quando viene attivata la via PKR. I ROS accumulati possono anche prendere parte alla morte cellulare attraverso l'attivazione della via PKR. I radicali dell'ossigeno o ROS sono delle specie estremamente reattive come conseguenza della presenza, in esse, di un elettrone spaiato. Nello specifico, essi sono in grado di reagire con le seguenti macromolecole cellulari inducendone la degradazione:

- gli acidi nucleici, promuovendo l'insorgenza di nick, DSB o mutazioni
- i fosfolipidi delle membrane, inducendone la perossidazione lipidica e il danneggiamento
- le proteine, causando un'alterazione della loro funzione e/o struttura (le modifiche più frequenti comprendono ossidazione delle catene laterali degli aa o carbonilazione del carbonio alfa presente del legame peptidico).

Ruolo di VP5

Al fine di dimostrare il ruolo di VP5 nell'apoptosi sono stati fatti studi su cellule infettate da ceppi di IBDV che non esprimevano VP5. Questi studi hanno messo in evidenza la capacità della VP5 di frammentare il DNA della cellula. Il danno al DNA induce apoptosi attraverso il coinvolgimento della proteina p53. In presenza di un danno al genoma, difatti, si osserva un accumulo di questa proteina che, inizialmente, si comporta come fattore di trascrizione promuovendo l'espressione di geni coinvolti nella riparazione della lesione e garantendo l'arresto del ciclo cellulare alla fase G1. Se però il danno è irreversibile, allora essa rivolge la sua attività trascrizionale verso geni pro-apoptotici come quelli codificanti per BAX e BAK e per alcuni sensori BH3-only. Incrementa quindi la quantità di proteine pro-apoptotiche presenti nella cellula. Questo fa sì che i segnali di morte prendano il sopravvento su quelli di sopravvivenza. Si osserva quindi la formazione di pori sulla membrana mitocondriale esterna che ne aumentano la permeabilità e favoriscono il rilascio di altre molecole pro-apoptotiche dallo spazio intermembranoso al citosol. Si attiva quindi la via intrinseca apoptotica. VP5 interagendo con i canali VDAC2 favorisce il rilascio di citocromo C e la conseguente attivazione della caspasi 3 e 9.

Si è anche notato che VP3 ha un ruolo anti-apoptotico, impedendo la fosforilazione di PKR e eIF2 (fattore di inizio eucariotico). Si ipotizza quindi che VP3 possa essere usato da IBDV per moderare l'apoptosi

Funzione VP4

VP4 è una proteasi virale utilizzata per scindere le poliproteine, essa ha la capacità di sopprimere l'espressione degli interferoni di tipo 1, mediante l'interazione con la cerniera leucina indotta da glucocorticoidia GILZ (Glucocorticoid-Induced Leucine Zipper). GILZ è una proteina in grado di bloccare la risposta infiammatoria sopprimendo in diversi punti la trascrizione dei geni responsabili della produzione di INF α e β (figura).

Funzione VP3

VP3 come precedentemente detto è in grado di stabilizzare la struttura del virus legando l'RNA a doppio filamento. Esso sfrutta proprio questa capacità al fine di aggirare la risposta immunitaria innata dell'ospite, ciò avviene bloccando

l'interazione tra il dsRNA e il MDA5, recettore in grado di riconoscere RNA virale presente nel citosol avviando la risposta immunitaria innata grazie al legame che riesce a creare con MAVS.

Effetti IBDV sull'immunità innata

L'apoptosi indotta da IBDV contro le cellule B non è l'unico strumento che utilizza il virus per sopprimere le risposte immunitarie dell'ospite, considerato che l'IBDV ritarda anche la via di presentazione dell'antigene. Si è dimostrato che un organismo infettato da IBDV esprime numerosi trascritti per le citochine pro-infiammatorie. Si osserva anche una diminuzione del numero di macrofagi. Possiamo quindi ipotizzare che IBDV possa portare a una riduzione dei macrofagi residenti in vivo. È stato osservato che l'infezione da IBDV porta anche al danneggiamento delle cellule dendritiche (presenti nel midollo osseo di pollo), e ad una diminuzione del livello di espressione di CD40 e CD86. Come visto precedentemente VP4 e VP3 hanno un ruolo essenziale per l'attività di soppressione immunitaria data da IBDV.

1.5 Variazione ceppo ITA

Non è ancora del tutto chiaro come IBDV riesca ad influire nella risposta immunitaria contro l'infiammazione e se vi sia una variabilità in tale azione da parte di ceppi con caratteristiche genetiche diverse. Le variazioni tra ceppi di IBDV riguardano maggiormente la proteina VP2. La variante presa da noi in esame è stata isolata in Italia e per questo è stata denominata ITA, sebbene formalmente appartenga al genotipo 6. Il sequenziamento del suo genoma ha messo in evidenza la presenza di residui amminoacidici comuni ai ceppi precedentemente studiati, nello specifico sono stati evidenziati residui in comune con i ceppi *very virulent* nelle proteine VP1, VP2 e VP5, che come precedentemente esposto hanno un ruolo chiave nella patogenesi (Lupini, Caterina et al. "Comparative in vivo pathogenicity study of an ITA genotype isolate (G6) of infectious bursal disease virus." *Transboundary and emerging diseases* vol. 67,2020). Dal confronto del segmento A del genoma si è evidenziato una somiglianza maggiore con il sierotipo 2 [7]. Studi successivi (Felice, V et al. "Genome sequence analysis of a distinctive Italian infectious bursal disease virus." *Poultry science* vol. 96,12 2017) effettuati sull'espressione relativa del gene TLR-3, hanno messo in evidenza una maggiore e più persistente carica virale del ceppo ITA rispetto al ceppo classico, probabile conseguenza ad una risposta del sistema immunitario ritardata [8].

Per completare una panoramica generale sul patogeno e al fine di offrire una migliore comprensione delle diverse fasi dello studio, propongo una digressione verso i principali meccanismi immunitari e le metodiche utilizzate

1.6 Ruolo delle citochine durante l'infezione

Durante l'infezione da IBDV, si verifica una complessa interazione tra il virus e le cellule immunitarie, che porta alla produzione e alla regolazione delle citochine.

- **Infiammazione:** L'infezione da IBDV provoca una risposta infiammatoria nell'organismo. Le citochine come l'interleuchina-1 (IL-1) e il fattore di necrosi tumorale-alfa (TNF-alfa) vengono rilasciate come parte di questa risposta, contribuendo all'infiammazione e all'attivazione delle cellule immunitarie.

- **Regolazione dell'immunosoppressione:** L'IBDV è responsabile di immunosoppressione attraverso diversi meccanismi, indebolendo il sistema immunitario e rendendo gli animali più suscettibili ad altre infezioni. Le citochine come l'interleuchina-10 (IL-10) sono coinvolte nella regolazione di questa risposta immunosoppressiva.

- **Risposta delle cellule T e B:** Le citochine come l'interleuchina-2 (IL-2) e l'interleuchina-4 (IL-4) possono influenzare la risposta delle cellule T e B durante l'infezione da IBDV. Queste citochine sono coinvolte nell'attivazione e nella differenziazione delle cellule immunitarie.

- **Risposta delle cellule NK:** Le cellule natural killer (NK) sono coinvolte nella difesa innata contro le infezioni virali. Le citochine come l'interleuchina-15 (IL-15) possono stimolare l'attività delle cellule NK durante l'infezione da IBDV. [1]

1.7 Apoptosi

L'apoptosi è un suicidio cellulare regolato: essa, difatti, consiste in una serie di eventi ben definiti temporalmente che culmina con la digestione delle proteine e del DNA cellulare grazie all'attività di diversi enzimi e con la formazione di corpi apoptotici. Essendo un meccanismo di morte cellulare ordinato, essa può essere regolata e quindi inibita. Inoltre, una caratteristica importantissima dell'apoptosi è che essa, in contesti fisiologici, non altera l'omeostasi tissutale: i corpi apoptotici vengono infatti riconosciuti, grazie ad opportuni segnali presenti sulla propria superficie di membrana, dai fagociti (prevalentemente macrofagi) che procedono con la loro fagocitosi ed eliminazione, evitando che si abbia l'attivazione di una risposta infiammatoria. L'apoptosi è un processo fisiologico in diversi contesti. Ad esempio, è importante per l'eliminazione di cellule durante l'embriogenesi, l'ottenimento della tolleranza immunologica, l'eliminazione delle cellule che hanno completato la loro funzione e per l'eliminazione di quelle cellule che non ricevono più la stimolazione da parte di ormoni o fattori di crescita. L'apoptosi, però, può diventare patologica; quando, infatti, si osserva uno stimolo lesivo (ad esempio un danno a livello del DNA oppure l'assenza patologica di stimolazione

ormonale) che danneggia irreversibilmente le cellule incrementando il tasso di morte cellulare. Questo causa un eccesso di corpi apoptotici rispetto alla disponibilità di fagociti e quindi questi vanno incontro a necrosi portando all'attivazione della risposta infiammatoria. L'apoptosi presenta due differenti vie di attivazione, una intrinseca e una estrinseca; ovvero i segnali responsabili dell'attivazione di questo fenomeno possono provenire dall'esterno o dall'interno della cellula.

Il processo apoptotico si può dividere in tre fasi principali:

1. Induzione: la fase di inizio consiste nell'attivazione delle caspasi iniziatrici.

Esistono due differenti vie con cui può avvenire questa attivazione. Seguendo la via intrinseca, il segnale che determina l'attivazione delle prime caspasi proviene dall'interno della cellula. Nello specifico, è l'aumento della permeabilità della membrana mitocondriale interna che permette l'attivazione di queste (infatti l'aumento della permeabilità comporta il rilascio di proteine proapoptotiche verso il citosol con conseguente formazione dell'apoptosoma che attiva la procaspasi 9)

Nel caso della via estrinseca il segnale che induce la morte proviene dall'esterno della cellula. Esso viene recepito grazie alla presenza di specifici recettori di morte che, tramite una proteina adattatrice, promuovono l'attivazione della caspasi 8/10

2. Esecuzione: le caspasi iniziatrici attivano quelle esecutrici (6 e 3). La via di esecuzione è comune a entrambe le vie precedenti.

3. Degradazione: le caspasi effettrici degradano diversi substrati proteici ottenendo quelle modifiche necessarie per l'apoptosi cellulare

1.8 Quantificazione genica

La quantificazione genica durante l'infezione è una tecnica utilizzata in campo biomedico e di ricerca per comprendere al meglio le dinamiche dell'infezione, riuscendo a identificare i meccanismi molecolari coinvolti nella risposta dell'ospite e contemporaneamente studiare il comportamento dei patogeni durante l'infezione. Questa tecnica consiste nel misurare la quantità di RNA messaggero (mRNA) prodotto da specifici geni coinvolti nella risposta immunitaria e nella replicazione virale o batterica.

1. Comprensione della risposta immunitaria: misurando l'espressione genica dei geni coinvolti nella risposta immunitaria, è possibile capire come il sistema immunitario dell'organismo ospite risponde all'infezione. Ciò include l'attivazione di geni coinvolti nella produzione di citochine, chemochine, recettori immunitari e altre molecole che regolano la risposta infiammatoria.

2. Identificazione di biomarcatori: la quantificazione genetica può rivelare biomarcatori specifici dell'infezione, che possono essere utilizzati per la diagnosi precoce, il monitoraggio e la prognosi dell'infezione. Questi biomarcatori possono essere geni associati all'agente patogeno stesso o geni dell'ospite che vengono modulati in risposta all'infezione.
3. Valutazione della gravità dell'infezione: misurando l'espressione di geni legati a processi infiammatori, apoptotici o altri meccanismi cellulari, è possibile valutare la gravità dell'infezione e la risposta dell'ospite. Queste informazioni possono aiutare a determinare se l'infezione è in corso di risoluzione o se sta progredendo verso condizioni più gravi.
4. Sviluppo di terapie e valutazione dell'efficienza: la quantificazione genetica può aiutare nella scoperta e nello sviluppo di nuove terapie. Identificando i geni o le vie di segnalazione chiave coinvolte nell'infezione è possibile individuare potenziali bersagli terapeutici per lo sviluppo di farmaci, inoltre, può essere utilizzata per valutare l'efficacia delle terapie. Monitorando l'espressione genetica nel tempo, è possibile valutare come la terapia influisce sulla risposta dell'ospite e sulla patogenesi.
5. Studi di Patogenesi: analizzando i cambiamenti nell'espressione genica dei patogeni e degli ospiti durante l'infezione, è possibile ottenere una comprensione più approfondita dei meccanismi di patogenesi. Ciò può rivelare come il patogeno manipola le vie cellulari dell'ospite per favorire la propria sopravvivenza e diffusione.

In generale, la quantificazione genetica durante l'infezione fornisce una panoramica molto più dettagliata dei processi molecolari che avvengono nell'ospite in risposta all'agente patogeno. Queste informazioni andranno a migliorare la nostra comprensione delle dinamiche dell'infezione e per sviluppare strategie di diagnosi e trattamenti terapeutici sempre più efficienti.

1.9 RT-qPCR:

La reazione a catena della polimerasi quantitativa di trascrizione inversa (RT-qPCR) è una tecnica di biologia molecolare che viene utilizzata al fine di misurare la quantità di molecole di RNA in un campione. Fra le diverse applicazioni vi è la possibilità di valutare i livelli di espressione di specifici geni. Essa combina due processi: la trascrizione inversa e la reazione a catena della polimerasi quantitativa.

-Trascrizione inversa (RT): è il primo passo nel processo RT-qPCR. Esso consiste nella conversione delle molecole di RNA in DNA complementare (cDNA) tramite utilizzo di un enzima chiamato trascrittasi inversa. Questo enzima sintetizza un filamento di DNA complementare basato sull'RNA modello. Il cDNA risultante è più stabile rispetto all'RNA e permette di utilizzare il cDNA come modello per la successiva amplificazione PCR.

-Reazione a catena della polimerasi quantitativa (qPCR): è il secondo passaggio, esso prevede l'utilizzo del cDNA come modello per l'amplificazione PCR. La PCR è una tecnica che amplifica esponenzialmente una specifica sequenza di DNA, con l'utilizzo di una DNA polimerasi e primer specifici. Il processo è "quantitativo" perché consente di quantificare la quantità iniziale di DNA nel campione. Durante la fase qPCR, viene utilizzato una sonda fluorescente o un agente intercalante al fine di monitorare la quantità di DNA che viene amplificata in tempo reale. Con il progredire dell'amplificazione del DNA, l'intensità della fluorescenza aumenta proporzionalmente alla quantità di prodotto PCR formato. Monitorando l'aumento della fluorescenza durante ogni ciclo di PCR, è possibile determinare la quantità iniziale di DNA target nel campione.

L'efficienza della RT-qPCR misura la capacità del processo di retro trascrivere e successivamente amplificare il cDNA, raddoppiandolo (andamento esponenziale) a ogni ciclo di amplificazione. L'efficienza è un parametro critico poiché influisce sulla sensibilità del metodo e sulla possibilità di comparare risultati di test diversi. Un'efficienza del 100% significherebbe che la quantità di DNA si raddoppia ad ogni ciclo di amplificazione. Tuttavia, nella pratica, l'efficienza è spesso diversa dal 100% a causa di vari fattori, tra cui la formazione di eterodimeri, l'inibizione della reazione e problemi di calibrazione. Per determinare l'efficienza della RT-qPCR viene spesso utilizzato il "metodo del diluente in serie". Questo approccio prevede che un campione di RNA venga diluito in una serie di diluizioni note (nel nostro esperimento abbiamo adottato delle diluizioni in base 10), che vengono poi sottoposte alla RT-qPCR. Dall'analisi dei dati di amplificazione, è possibile costruire una curva di amplificazione da cui si può estrarre l'efficienza. Questo calcolo oramai attualmente eseguito con l'utilizzo di software appositi.

Nell'ambito della quantificazione relativa dell'espressione genica è importante considerare l'efficienza durante l'analisi dei dati, ad esempio utilizzando metodi di normalizzazione come il $\Delta\Delta C_t$, che tiene conto delle differenze di efficienza tra le diverse metodiche. [10]

1.10 Metodo $\Delta\Delta C_t$

il metodo $\Delta\Delta C_t$ si basa sui seguenti principi:

- Ct (Cycle Threshold): Nella qPCR, è la misura del numero di cicli necessari affinché la fluorescenza generata dal marcatore si alzi al di sopra di una soglia predefinita e riflette l'abbondanza del bersaglio genico iniziale nel campione.
- ΔCt : Per calcolare ΔCt , si sottrae il valore di Ct del gene bersaglio dal valore di Ct del gene di riferimento (solitamente chiamato gene *housekeeping* o gene di controllo). Il gene di riferimento dovrebbe essere espresso a livelli costanti tra i diversi campioni.
- $\Delta\Delta Ct$: Consiste nella normalizzazione relativa. Si sottrae il valore di ΔCt di un campione di riferimento (che può essere uno dei campioni del gruppo di controllo o un valore di riferimento noto) dai valori di ΔCt dei campioni di interesse. Questo calcolo mira a confrontare l'espressione genica relativa tra i campioni, considerando le variazioni nel gene di riferimento e nel gene bersaglio.
- Fold-Change: Il valore finale rappresenta il fold-change dell'espressione genica tra i campioni di interesse rispetto al campione di riferimento. Può essere calcolato usando la formula $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

È importante notare che il metodo $\Delta\Delta Ct$ presuppone che l'efficienza di amplificazione sia simili tra il gene bersaglio e il gene di riferimento. In caso contrario, tale differenza deve essere inclusa nel calcolo. Inoltre, è fondamentale selezionare geni di riferimento adeguati che non subiscano variazioni significative nelle diverse condizioni sperimentali. (10)

La quantificazione dell'espressione genica dei mediatori dell'infiammazione riveste un'importanza fondamentale per comprendere i meccanismi immunopatologici che sono coinvolti durante l'infezione da IBDV. Ad oggi la RT-qPCR si è dimostrata uno strumento altamente sensibile e specifico per quantificare in modo accurato l'espressione dei mediatori dell'infiammazione in risposta all'infezione da IBDV.

PARTE SPERIMENTALE

2 Materiali e metodi

2.1 Descrizione estrazione

I campioni utilizzati provengono da 2 gruppi di polli (privi di patogeni) infettati sperimentalmente tramite inoculazione del virus IBDV del ceppo ITA, e STC. I campionamenti sono stati effettuati a 2-4-7-14-21-28 dpi post infezione. Questi campioni sono stati prelevati, successivamente omogenizzati in PBS e conservati a -80°.

L'estrazione è stata effettuata utilizzando il kit Viral DNA/RNA (A&A Biotechnology). Una volta ottenuto l'RNA, prima di effettuare la retrotrascrizione e quindi il passaggio da RNA a cDNA, il campione è stato sottoposto a digestione del DNA. Tale passaggio si è reso necessario per rimuovere il DNA, che, venendo co-amplificato assieme al RNA, avrebbe interferito con una accurata quantificazione dell'RNA.

2.2 Validazione del metodo

Nella parte iniziale del nostro esperimento ci siamo concentrati sulla selezione dei geni e sull'ottimizzazione del protocollo di retrotrascrizione e amplificazione.

Per questa fase abbiamo utilizzato del materiale genetico estratto da campioni di fegato. Ne è stata effettuata una diluizione in base 10 e ciascuna diluizione è stata retrotrascritta utilizzando il kit Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, with dsDNase (Thermo fisher scientific). Abbiamo preparato due differenti mix, uno contenente i primer specifici per ogni gene da noi selezionato più i due geni housekeeping (actina e GAPDH) e l'altro invece contenente dei primer random. Questo passaggio è stato utile per comprendere quale strategia permettesse una maggiore efficienza di retrotrascrizione ed eventualmente ottimizzare le concentrazioni dei reagenti. I cDNA sono stati poi amplificati usando delle specifiche qPCR (sezione 2.4).

2.3 RT

Il protocollo finale di retrotrascrizione prevedeva l'uso del kit Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, with dsDNase (Thermo fisher scientific), seguendo il protocollo suggerito dal produttore. Dai test effettuati precedentemente abbiamo notato che l'efficienza era più alta utilizzando dei primer random, rispetto ai primer specifici. Inoltre, abbiamo inserito una fase di arricchimento per permettere l'allineamento ottimale dei primer. Una volta ottenuto il cDNA è stata effettuata una diluizione in base 10 del campione al fine di poter costruire la curva standard per ciascun gene considerato, valutando quindi l'efficienza di reazione.

2.4 PCR

Le qPCR sono state effettuate tramite PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo fisher scientific) seguendo il protocollo descritto dal produttore, con minime modifiche. In particolare, per ciascuna coppia di primer è stata selezionata una concentrazione di $0.8\mu M$, utilizzando un volume di reazione finale di $10\mu L$, di cui $2\mu L$ di cDNA target. Il protocollo termico prevedeva una fase di attivazione di 2 minuti a $95^{\circ}C$, seguita da 45 cicli a $95^{\circ}C$ per 15 secondi, 60 gradi per 15 secondi e 72 gradi per un minuto. La specificità degli amplificati è stata valutata tramite l'esecuzione e l'analisi di curve di melting. Tutte le reazioni sono state effettuate in uno strumento LightCycler 96 (Thermo fisher scientific). Lo stesso protocollo è stato utilizzato durante le successive fasi per l'analisi dei campioni sperimentali.

La quantificazione dell'espressione di ciascun gene è stata analizzata tramite quantificazione relativa, paragonando i Ct ottenuti per i geni di interesse con i corrispettivi housekeeping del medesimo campione, utilizzando la metodica del ΔCt precedentemente descritto.

2.5 Scelta dei geni

La selezione dei geni da analizzare è stata fatta in base alla funzione delle proteine prodotte. Sono state infatti considerate proteine che partecipano ai processi di infiammazione e di apoptosi delle cellule. I geni selezionati sono stati: BAX, BCL2, CASP3, CASP9, INF-B, INF-G, IL1, IL6, OAS e PKR.

Le prime molecole (BAX, BCL2, CASP3, CASP9) sono molecole che intervengono durante il processo di apoptosi. Questo processo è già stato precedentemente descritto nell'introduzione, mentre le altre molecole prese in analisi intervengono durante la risposta infiammatoria. L'infiammazione è una risposta del corpo a danni o irritazioni, che può essere causata da vari fattori come infezioni di virus o batteri, lesioni, reazioni allergiche o stress. Questo processo fa parte del sistema immunitario e ha lo scopo di proteggere l'organismo ed eliminare l'agente nocivo con lo scopo finale di riparare i tessuti danneggiati.

Durante questa risposta immunitaria intervengono diverse molecole comprese quelle da noi prese in analisi.

IL1: è una citochina (e quindi un mediatore proteico) che viene sintetizzato prevalentemente dai macrofagi M1; la produzione di questa molecola richiede la formazione dell'inflammasoma, ovvero di un complesso multiproteico che agisce sul precursore dell'IL-1 ottenuto dalla sintesi proteica, effettuando un taglio proteolitico sullo stesso e quindi l'ottenimento di IL-1 richiede l'attivazione dei NOD-like receptors che si comportano da sensori del danno e che fanno parte dell'inflammasoma stesso. (Si richiede anche l'attivazione dei TLR per poter ottenere il precursore inattivo e le componenti dell'inflammasoma). Una volta prodotta, tale citochina viene rilasciata dalle cellule macrofagiche grazie alla

piroptosi delle stesse ovvero grazie ad un processo di morte cellulare regolata che consente la liberazione di questa citochina. A livello locale, IL-1 agisce prevalentemente favorendo il processo di reclutamento leucocitario; essa, infatti, induce l'attivazione delle cellule endoteliali, cioè induce l'esposizione da parte di queste di E selectina neosintetizzata e dei ligandi per le integrine. Inoltre, le cellule endoteliali assumono un fenotipo pro-coagulante e producono citochine e altri mediatori. IL-1 stimola anche la produzione di collagene da parte dei fibroblasti. A livello sistemico, invece, questa citochina collabora con TNF-alfa per promuovere l'insorgenza della febbre attraverso un incremento nella quantità di molecole di ciclossigenasi presenti a livello delle cellule vascolari e perivascolari dell'ipotalamo; inoltre incrementa la sintesi da parte del fegato di alcune proteine di fase acuta quali la proteina sieroamiloide. Ancora, essa può agire a livello del cervello inducendo sonnolenza e mancanza di appetito; infine stimola il rilascio dei precursori dei leucociti dal midollo osseo inducendo leucocitosi.

IL6: è una citochina avente una multifunzione ed esercita appunto sia una funzione pro che antinfiammatoria. Essa viene prodotta sia dai macrofagi che dai linfociti T.

INF-β: svolge un ruolo cruciale nella risposta del sistema immunitario durante l'infezione di patogeni virali.

L'interferone beta ha specificamente proprietà antivirali, antinfiammatorie e immunomodulanti. È prodotto da vari tipi di cellule, tra cui i fibroblasti e cellule immunitarie come cellule dendritiche e macrofagi. Dopo l'infezione di un virus, le cellule possono rilasciare interferone-beta per avvisare le cellule vicine della presenza virale e indurre uno stato antivirale, rendendo più difficile la replicazione e la diffusione del virus.

INF-γ: anche essa una molecola di segnalazione, È prodotto da varie cellule immunitarie, principalmente cellule T e cellule natural killer (NK), in risposta a infezioni. L'IFN-γ svolge un ruolo chiave nella risposta immunitaria sia innata che adattativa ed è coinvolto in varie importanti funzioni

2'-5' oligo-adenilato sintetasi 1 (OAS1)

Proteina la cui sintesi è stimolata dall'interferone di tipo 1, è una molecola che si trova a bassi livelli nel citoplasma delle cellule ma che può essere poi up-regolata in presenza di interferone. Comunque, è presente una trascrizione costitutiva di questa proteina. OAS1 è in forma monomerica quando inattiva mentre quando attivata forma dei tetrameri con attività enzimatica. Queste strutture tetrameriche formano delle catene di poli A con legame 2'-5': queste molecole funzionano da attivatori per una RNAasi L che si trova anch'essa nel citoplasma in forma monomerica inattiva. Quando la RNAasi L riconosce queste catene oligo-

adenilate si attiva e forma dei dimeri che sono attivi e che degradano l'RNA (a doppio filamento preferenzialmente). In questo modo la cellula dovrebbe abbattere in maniera più o meno significativa la presenza di RNA virali che vengono degradati.

Protein kinase R (PKR)

Stimolata dall'interferone di tipo I. È presente in molti tipi di cellule in maniera costitutiva. Per essere attivata deve riconoscere le estremità di una dsRNA. L'attivazione della PKR vede un'auto-fosforilazione che è necessaria poi per formare le strutture dimeriche che sono quelle enzimaticamente attive, le quali vanno a fosforilare EIF2 α bloccando la sintesi proteica: questo fattore fosforilato non è in grado di essere utilizzato e quindi viene bloccata la sintesi delle proteine.

Quindi si genera un meccanismo che blocca la sintesi di proteine. Al contrario il target di azione di OAS1 prevedeva la degradazione degli dsRNA, impedendo la traduzione dei relativi trascritti. È chiaro che il meccanismo non è specifico contro il virus ma blocca la sintesi proteica in generale e quindi per questo spesso è associata a eventi di morte cellulare programmata.

3 Risultati e discussione

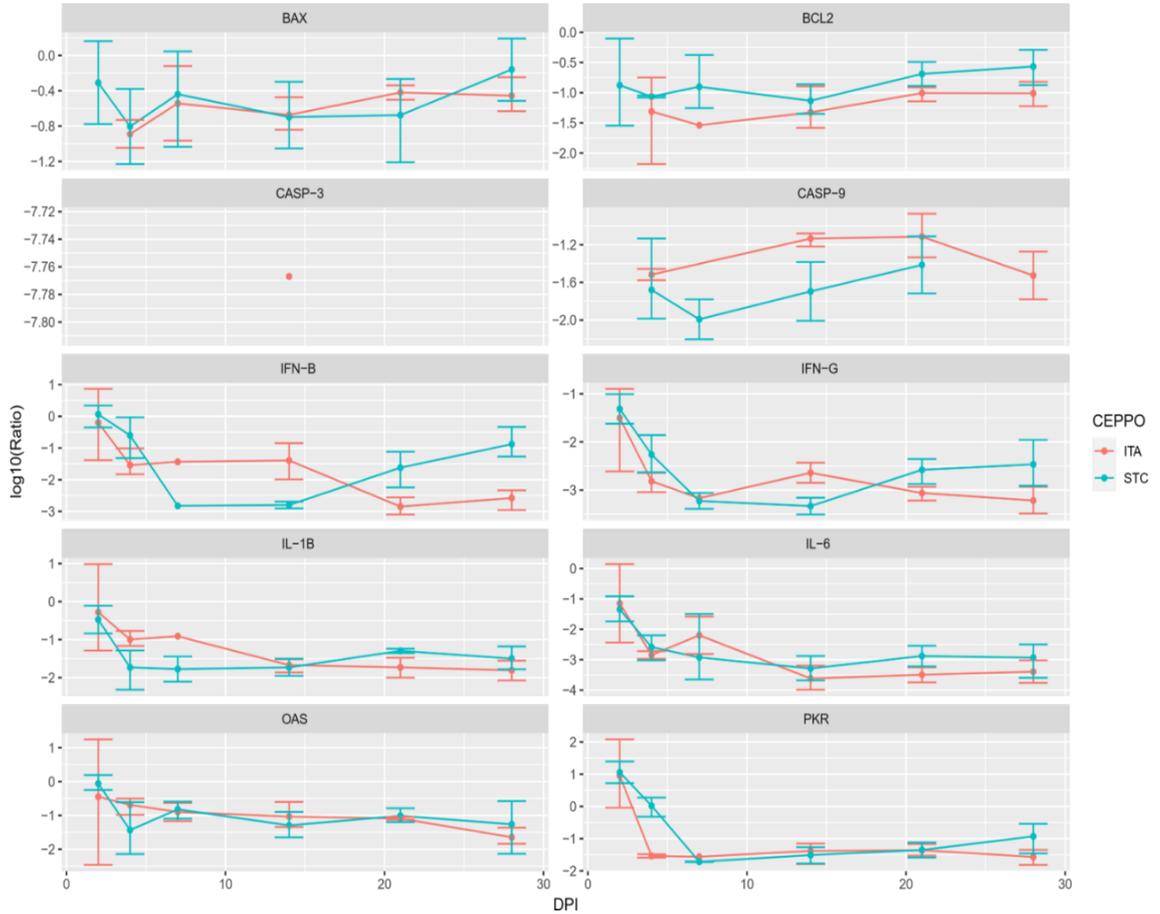


Figura 2. Grafico riportante il livello di espressione dei geni di interesse nel corso del tempo, normalizzato rispetto ai geni housekeeping. Per ciascun punto di campionamento sono riportati la media e l'intervallo di confidenza. I risultati dei gruppi infettati con il ceppo ITA e STC sono riportati rispettivamente in rosso e azzurro.

Dai grafici qui riportati (Figura 2) possiamo notare come il ceppo appartenente al genotipo ITA (rosso) deprime di più l'espressione di BCL2 che, come precedentemente detto, ha una funzione anti-apoptotica, ciò ci viene confermato dal grafico sottostante della CASP9 dove vediamo un'espressione maggiore della caspasi 9 in animali infettati da questo ceppo. Possiamo quindi ipotizzare che questo aumento dell'espressione della caspasi 9 sia dovuta ad una parziale inibizione di BCL2. Inoltre, analizzando le citochine (INF- β / γ) possiamo notare come nella fase iniziale il ceppo STC si associ a un'espressione delle citochine inferiore rispetto al ceppo ITA e questo potrebbe portare quindi ad un iniziale minore aggressività di quest'ultimo. Tuttavia, si può notare come i valori, risalgono rispetto al ceppo STC in un secondo momento. Potremmo quindi ipotizzare che il

ceppo STC inibisca in maniera più marcata il sistema immunitario nelle fasi iniziali dell'infezione. Tuttavia, il ceppo ITA, sembrerebbe avere un effetto più cronico e un recupero più tardivo della funzionalità immunitaria. Il genotipo ITA non causerebbe quindi una risposta immediata e forte del sistema immunitario, che potenzialmente gli permetterebbe di persistere di più all'interno dell'organismo. A conferma, possiamo notare lo stesso andamento, anche se minore, nel grafico riguardante IL1 e 6. Sulla base degli studi citati durante l'introduzione [7,8] e dai dati ottenuti è possibile speculare che il ceppo ITA potrebbe dare vita ad un quadro clinico meno grave rispetto ad altri ceppi. Ciò può portare ad una sua persistenza maggiore nel tempo all'interno dell'individuo ed aumentare quindi la possibilità di trasmissione ad altri individui. Questo potrebbe essere un argomento da approfondire in futuro tramite studi epidemiologici, studiando dal punto di vista statistico la diffusione dei diversi ceppi nel territorio italiano nonché la loro rilevanza clinica ed economica. Questo potrebbe indirizzare eventuali studi al fine di valutare la produzione di vaccini specifici per questa variante, considerando che la protezione indotta dai vaccini attualmente disponibili potrebbe essere parziale.

In fine possiamo notare solo un unico risultato positivo per la Caspasi 3. Poiché in altri studi è stata riportata l'espressione di Caspasi 3 durante l'infezione con IBDV, è probabile che la discordanza dei nostri risultati sia dovuta ad un problema nella metodica, non rivelandosi efficace, e quindi a dei problemi durante la reazione non emersi nella la validazione. Potremmo quindi provare ad aumentare i primer all'interno della mix oppure utilizzando una nuova e diversa coppia di primer disegnati appositamente per quel gene. Un'ulteriore ottimizzazione dei protocolli di reazione e dei kit utilizzati potrebbe inoltre essere considerata.

Bibliografía

1. REHMAN, Z., MENG, C., UMAR, S., MUNIR, M., & DING, C. (2016). Interaction of infectious bursal disease virus with the immune system of poultry. *World's Poultry Science Journal*, 72(4), 805-820. doi:10.1017/S0043933916000775
2. Lin, T. W., Lo, C. W., Lai, S. Y., Fan, R. J., Lo, C. J., Chou, Y. M., Thiruvengadam, R., Wang, A. H., & Wang, M. Y. (2007). Chicken heat shock protein 90 is a component of the putative cellular receptor complex of infectious bursal disease virus. *Journal of virology*, 81(16), 8730–8741. <https://doi.org/10.1128/JVI.00332-07>
3. Delgui, L., Oña, A., Gutiérrez, S., Luque, D., Navarro, A., Castón, J. R., & Rodríguez, J. F. (2009). The capsid protein of infectious bursal disease virus contains a functional alpha 4 beta 1 integrin ligand motif. *Virology*, 386(2), 360–372. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.12.036>
4. Franciosini, Maria Pia, and Irit Davidson. 2022. "A Walk through Gumboro Disease" *Poultry* 1, no. 4 299-242 <https://doi.org/10.3390/poultry1040020>
5. Koyama, A. H., Adachi, A., & Irie, H. (2003). Physiological significance of apoptosis during animal virus infection. *International reviews of immunology*, 22(5-6), 341–359. <https://doi.org/10.1080/08830180305210>
6. Fernández-Arias, A., Martínez, S., & Rodríguez, J. F. (1997). The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *Journal of virology* 71(10), 71(10), 8014–8018. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.10.8014-8018.1997>
7. Lupini, C., Felice, V., Silveira, F., Mescolini, G., Berto, G., Listorti, V., Cecchinato, M., & Catelli, E. (2020). Comparative in vivo pathogenicity study of an ITA genotype isolate (G6) of infectious bursal disease virus. *Transboundary and emerging diseases*, 67(2), 1025–1031. <https://doi.org/10.1111/tbed.13421>
8. Felice, V., Franzo, G., Catelli, E., Di Francesco, A., Bonci, M., Cecchinato, M., Mescolini, G., Giovanardi, D., Pesente, P., & Lupini, C. (2017). Genome sequence analysis of a distinctive Italian infectious bursal disease virus. *Poultry science*, 96(12), 4370–4377. <https://doi.org/10.3382/ps/pex278>
9. Galloux, M., Libersou, S., Morellet, N., Bouaziz, S., Da Costa, B., Ouldali, M., Lepault, J., & Delmas, B. (2007). Infectious bursal disease virus, a non-enveloped virus, possesses a capsid-associated peptide that deforms and perforates biological membranes. *The Journal of biological chemistry*, 282(28), 20774–20784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M701048200>
10. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem MolBiol Educ*. 2021; 49:800–812. <https://doi.org/10.1002/bmb.21552>

