



**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE
DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA**
“BRUNO UBERTINI”
(ENTE SANITARIO DI DIRITTO PUBBLICO)

Sede Legale: Via Bianchi, 9 – 25124 Brescia
Tel 03022901 – Fax 0302425251 – Email info@izsler.it
C.F. - P.IVA 00284840170
N. REA CCIAA di Brescia 88834

RELAZIONE FINALE PROGETTO DI RICERCA CORRENTE PRC2018003

“Terapia innovativa delle infezioni influenzali e respiratorie sostenute da virus mediante l’utilizzo di siRNAs (short interfering RNAs)”

Responsabile scientifico del progetto:

Riccardo Villa

Telefono 030/2290248

E-mail: riccardo.villa@izsler.it

Ente di appartenenza dell’Unità Operativa Coordinatrice:

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna.

Data di inizio del progetto: 18/12/2018

Data di fine del progetto: 18/05/2022

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Dipartimento della Sanità Pubblica Veterinaria, della Sicurezza Alimentare e degli Organi Collegiali per la Tutela della Salute

Data di stampa della relazione: 18/5/2022

Sommario

1. ELENCO DEI COLLABORATORI	3
2. SINTESI DEL PROGETTO.....	4
3. SUMMARY	5
4. INTRODUZIONE.....	6
5. MATERIALI E METODI	8
5.1. Coltura cellulare.....	8
5.2. Biotipi influenzali	8
5.2.1. <i>Titolazione virale</i>	9
5.2.2. <i>Emoagglutinazione.....</i>	10
5.2.3. <i>Reazione di biologia molecolare - Real Time PCR</i>	11
5.3. Sintesi dei siRNAs	12
5.3.1. <i>Analisi bioinformatica.....</i>	12
5.3.2. <i>Preparazione del primo vettore di espressione.....</i>	12
5.3.3. <i>Clonaggio delle regioni target.....</i>	14
5.3.4. <i>Allestimento dei vettori reporter</i>	14
5.3.5. <i>Preparazione del secondo vettore di espressione</i>	15
5.3.6. <i>Espressione e purificazione dei siRNAs.....</i>	15
5.4. Trasfezione delle colture cellulari.....	16
5.5. Determinazione dell'attività dei siRNAs.....	17
5.5.1. <i>Infezione dei cloni di MDCK trasfettate con i biotipi influenzali scelti.....</i>	17
6. RISULTATI	18
6.1. Titolazione virale.....	18
6.2. Cloni cellulari esprimenti siRNAs	18
6.3. Infezione dei cloni cellulari con i biotipi del virus dell'Influenza A.....	19
6.4. Analisi di biologia molecolare	22
6.4.1. <i>Infezione sperimentale con A/Milano/224/2015</i>	23
6.4.2. <i>Infezione sperimentale con A/Milano/53/2013</i>	23
6.4.3. <i>Infezione sperimentale con A/Parma/9/2014.....</i>	24
6.4.4. <i>Infezione sperimentale con A/Parma/56/2014.....</i>	24
6.4.5. <i>Infezione sperimentale con A/Parma/79/2014.....</i>	25
7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI.....	26
8. BIBLIOGRAFIA	28
9. MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI.....	29

1. Elenco dei collaboratori

Nominativo	UO	Ruolo
Riccardo Villa Responsabile U.O.	1	Coordinatore del Progetto
Giulia Valli	1	Borsista
Andrea Franzo'	1	Borsista

2. Sintesi del progetto

Il virus dell'Influenza è stato nel corso degli ultimi anni responsabile di eventi pandemici che hanno causato problematiche sanitarie rilevanti sia in campo veterinario che umano. Infatti, è evidente come questo virus sia in grado di andare in contro a ricombinazione virale nell'animale ospite, che funge così da reservoir per la trasmissione della patologia all'uomo. Questo fenomeno può determinare la comparsa di nuovi biotipi estremamente virulenti e sempre più resistenti, in grado di rendere inefficace il protocollo standard di vaccinazione.

L'aspetto zoonotico della malattia comporta quindi la necessità di approntare specifiche azioni mirate sia in ambito profilattico che terapeutico, preparando il terreno allo studio di nuove molecole con funzione antivirale a rapida azione.

In tal contesto si inserisce con massimo interesse la tecnologia dell'RNA interference (RNAi), portando l'attenzione sullo sviluppo di una nuova generazione di farmaci a RNA con la specifica funzione di regolare l'espressione genica del virus.

L'RNAi è un processo biologico in cui piccole molecole di RNA sintetico a doppia elica (siRNA) inibiscono l'espressione e la traduzione genica, neutralizzando in modo mirato molecole di RNA messaggero (mRNA). I siRNA svolgono un ruolo chiave nel fenomeno dell'RNAi, poiché possono agire sia a livello pre- che post-trascrizionale causando la degradazione delle molecole di mRNA, riducendone l'attività e prevenendo la traduzione. Questo meccanismo può quindi essere utilizzato per bloccare l'espressione sia di geni endogeni propri della cellula, che di quelli esogeni, derivanti per esempio dall'infezione virale. A tale proposito, è quindi possibile considerare questo approccio per l'inibizione in vitro ed in vivo della replicazione del virus dell'Influenza A, grazie alla capacità dei siRNA di inibire la traduzione di determinate sequenze ribonucleotidiche e quindi la sintesi di proteine essenziali per la replicazione virale.

In particolare, nel presente studio sono stati individuati i biotipi influenzali caratterizzati dalla stessa sequenza codificante la Nucleoproteina (NP) grazie ad indagine bioinformatica. Su questa regione sono state selezionate specifiche sequenze target su cui sono stati disegnati i siRNA.

I biotipi selezionati sono stati amplificati sulla linea cellulare MDCK, così da poter disporre di stock virali controllati e titolati per le fasi successive del progetto.

Parallelamente i siRNA selezionati sono stati impiegati per ingegnerizzare i vettori plasmidici utilizzati successivamente per trasformare ceppi competenti di E. coli. I ceppi batterici sono stati coltivati e selezionati al fine di poter disporre di una coltura pura in grado di esprimere i siRNA di interesse.

I plasmidi sono stati estratti e, per verificare l'assenza di eventi di ricombinazione, sottoposti a digestione con un enzima di restrizione.

I tre plasmidi contenenti i siRNA sono stati impiegati per trasfettare la linea cellulare MDCK, ed ottenere tre diverse tipologie di cloni che in seguito sono state sottoposte in vitro ad infezione con i biotipi influenzali selezionati.

I cloni cellulari esprimenti i siRNA sono stati successivamente infettati con i biotipi virali scelti, consentendo di valutare la capacità dei singoli siRNA di inibire la replicazione virale dei diversi ceppi testati.

I risultati di inibizione in coltura sono stati infine confermati con le metodiche di emoagglutinazione ed in Real Time PCR.

3. Summary

Recently Influenza virus has been responsible of pandemic events that have caused significant health problems in both veterinary and human fields.

It has been noticed that this virus could be subject to viral recombination in the animal host that represents the reservoir for the disease transmission to humans.

This phenomenon could determine the appearance of new, extremely virulent and increasingly resistant biotypes, able to make the standard vaccination protocol ineffective.

The zoonotic aspect of the disease requires the identification of specific prophylactic and therapeutic actions, which should prepare the ground for the study of innovative molecules with fast-acting antiviral functions.

In this context RNA interference (RNAi) technology plays an important role for the development of a new generation RNA drugs able to regulate viral gene expression.

RNAi is a biological process where small molecules of synthetic double-stranded RNA (siRNA) inhibit gene expression and translation, neutralizing specific messenger RNA (mRNA) molecules.

SiRNAs play a key role in the RNAi phenomenon since they can act at pre- and post-transcriptional levels causing the degradation of mRNA molecules, reducing their activity and preventing translation.

This mechanism can therefore be used to block the expression of both the cell's own endogenous genes and exogenous ones, resulting for example from viral infection. For this reason, it is possible to consider this approach for *in vitro* and *in vivo* inhibition of Influenza A virus replication, thanks to the ability of siRNAs to inhibit the translation of specific ribonucleotide sequences and therefore the synthesis of proteins essential for viral replication.

In particular, in the present study Influenza biotypes characterized by the same sequence encoding the Nucleoprotein (NP) were identified by bioinformatics investigation. On these encoding regions, specific target sequences were selected and siRNAs drawn.

The selected biotypes were amplified on MDCK cell line, in order to have controlled and titrated viral stocks for the subsequent phases of the project.

At the same time selected siRNAs have been used to engineer the plasmid vectors, subsequently used to transform competent *E. coli* strains. Bacterial strains have been cultured and selected in order to have a pure culture capable of expressing siRNAs of interest.

The plasmids have been extracted and digested with a restriction enzyme, in order to verify the absence of recombination events.

The three plasmids containing siRNAs have been used to transfect MDCK cell line and to obtain three different cell clones that were subsequently subjected to *in vitro* infection with the selected Influenza biotypes.

The cell clones expressing siRNAs were finally infected with the selected viral biotypes, in order to evaluate the ability of siRNAs to inhibit viral replication of the tested strains.

The results of *in culture* inhibition were confirmed by hemagglutination and Real Time PCR methods.

4. Introduzione

L'Influenza A è considerata una pandemia a seguito delle problematiche sanitarie sostenute dal virus, rilevanti sia in campo umano che veterinario. L'ospite animale infatti è determinante nella trasmissione della patologia all'uomo, rivestendo un ruolo cruciale nella potenziale ricombinazione inter-specie del virus. Tale fenomeno porta alla nascita di differenti biotipi estremamente virulenti e sempre più resistenti alle terapie convenzionali in atto oggi. L'aspetto zoonotico della malattia comporta quindi la necessità di approntare specifiche azioni mirate sia in ambito profilattico che terapeutico, preparando il terreno allo studio di nuove molecole con funzione antivirale a rapida azione. In tale contesto si inserisce con massimo interesse la tecnologia dell'RNA *interference* (RNAi), portando l'attenzione sullo sviluppo di una nuova generazione di farmaci a RNA con la specifica funzione di regolare l'espressione genica. Nello specifico questo meccanismo può essere indotto sia introducendo nella cellula un vettore a DNA, sia introducendo direttamente molecole di RNA a doppia elica, come gli *short interfering RNAs* (siRNAs). Si tratta di corte molecole elicoidali di RNA di derivazione esogena o endogena [1], formate da almeno due singoli filamenti di RNA parzialmente complementari. Questi dsRNAs hanno una lunghezza di 19-23 paia di basi e vengono processati da un complesso proteico formato da un'endonucleasi chiamata *Dicer* e da una dsRNA *binding protein* (TRBP) [2, 3]. Uno dei filamenti neoformati (*leading strand*) viene successivamente incorporato dal

complesso di silenziamento indotto da RNA (RISC), mentre l'altro filamento (*passenger strand*) viene degradato nel citoplasma cellulare.

Il *leading strand* guida la degradazione specifica di sequenze di mRNAs *target* complementari e proprio grazie a questa loro caratteristica intrinseca, i siRNAs sono ampiamente studiati nell'ambito del silenziamento genico al fine di impedire l'espressione di specifici geni. Questo approccio può essere considerato una promettente strategia antivirale nei confronti delle più comuni infezioni nell'uomo.

In particolare, la rapida evoluzione dei virus dell'Influenza di tipo A e la comparsa di nuove varianti del virus creano limiti di efficacia clinica dei vaccini [4]. A questo problema può far fronte lo sviluppo di vari tipi di strategie che prevedono l'impiego di siRNAs, che possono rappresentare un nuovo mezzo per prevenire e trattare, ad esempio, gravi infezioni influenzali. Nello specifico, la terapia con i siRNAs, non dipendendo dal sistema immunitario dell'ospite, dovrebbe essere ugualmente efficace in tutti gli individui.

Negli ultimi vent'anni lo studio del processo di RNA interference ha evidenziato come questo meccanismo di regolazione post trascrizionale abbia un'enorme potenzialità nell'ambito della cura di patologie che comportano un'alterazione dell'espressione genica nelle cellule dell'organismo, come ad esempio le malattie su base genetica, le patologie oncologiche e le infezioni virali.

Il presente studio ha riguardato quest'ultimo aspetto e si è prefisso l'obiettivo di mettere a punto e valutare il potenziale di nuovi farmaci a base di RNA, i siRNAs, in grado di contrastare l'infezione da virus influenzale.

Nello specifico, sono state inizialmente individuate regioni relativamente conservate del genoma virale di diversi biotipi del virus per identificare siRNAs efficaci contro numerose varianti virali.

I siRNAs, sintetizzati in colture di *Escherichia coli*, sono stati successivamente impiegati per trasfettare cloni di linea cellulare Madin Darby Canine Kidney (MDCK).

I cloni cellulari esprimenti i siRNAs sono stati infettati con cinque biotipi di Influenza di tipo A, al fine di valutare la capacità dei siRNAs di inibire la replicazione virale dei diversi ceppi testati.

I risultati di inibizione in coltura sono stati infine confermati con le metodiche di emoagglutinazione e di Real Time PCR.

5. Materiali e metodi

5.1. Coltura cellulare

La linea cellulare *Madin Darby Canine Kidney* (MDCK, cod. BS CL 64), depositata nella biobanca (www.ibvr.org) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), è stata utilizzata quale substrato idoneo per la coltivazione dei biotipi influenzali.

In particolare, è stata scelta la linea MDCK perché molti studi hanno dimostrato la sensibilità di questa linea cellulare al virus dell'Influenza A. La linea cellulare, infatti, viene abitualmente utilizzata per l'isolamento e l'amplificazione del virus da campioni patologici parallelamente al metodo basato sull'utilizzo di embrioni di pollo considerato il *gold standard* [5].

La coltura cellulare MDCK è mantenuta in terreno *Minimum Essential Medium* (MEM), opportunamente ricostituito in laboratorio ed arricchito con il 10% di siero fetale bovino (SFB) e contenente antibiotici (penicillina, streptomina ed amphotericina B). Tutte le procedure di manipolazione del substrato cellulare sono state eseguite in condizioni asettiche, operando in cappa a flusso laminare verticale.

Tutte le linee cellulari sono state coltivate e mantenute a 37°C in presenza del 5% di CO₂. Al raggiungimento della confluenza, le colture sono state subcoltivate mediante tripsinizzazione, previo lavaggio con soluzione salina, secondo le metodologie usuali e basate sull'impiego di una soluzione enzimatica di tripsina-EDTA.

5.2. Biotipi influenzali

Fra i biotipi influenzali utilizzati inizialmente nello studio sono stati selezionati i seguenti biotipi di Influenza A a bassa patogenicità:

- A/swine/Italy/1513-1/1998 H1N1 (VIR RE RSCIC 187)
- A/swine/Italy/1521/1998 H1N2 (VIR RE RSCIC 185)
- A/swine/Italy/1523/1998 H3N2 (VIR RE RSCIC 186)
- A/swine/Italy/437/1976 H1N1 (VIR RE RSCIC 236)
- A/turkey/Italy/2676/2000 H7N1 (VIR RE RSCIC 188)

Successivamente, a seguito degli scarsi risultati ottenuti sui biotipi influenzali sopra indicati, ne sono stati presi in esame altri di derivazione umana, gli stessi sono stati isolati dalla sezione di Parma di IZSLER e conservati nella biobanca dell'Istituto:

- A/Milano/224/2015 H1N1 (cod. VIR RE RSCIC 326)
- A/Milano/53/2013 H1N1 (cod. VIR RE RSCIC 325)

- A/Parma/9/2014 H1N1 (cod. VIR RE RSCIC 322)
- A/Parma/56/2014 H1N1 (cod. VIR RE RSCIC 324)
- A/Parma/79/2014 H1N1 (cod. VIR RE RSCIC 323)

Ciascun biotipo di virus influenzale è stato adattato ed amplificato sulla linea cellulare MDCK; con questo processo è stato possibile mantenere scorte virali controllate e titolate da utilizzare per le fasi successive dello studio.

5.2.1. Titolazione virale

La linea cellulare MDCK è stata trasferita in piastre da 96 pozzetti alla concentrazione di 10^5 cellule/ml e le stesse sono state incubate per 24-48 ore per promuovere la crescita cellulare.

Successivamente, quando le cellule hanno raggiunto una confluenza di circa il 70%, è stato valutato il titolo infettivo dei diversi biotipi influenzali.

Il terreno di coltura è stato rimosso, le cellule lavate con soluzione salina tamponata (PBS) [6] e i pozzetti inoculati con 10 μ l delle diluizioni di ciascun virus utilizzato. Per ogni biotipo sono state allestite diluizioni esponenziali su base logaritmica (da 10^{-1} a 10^{-7}), risospendendo il virus nel terreno con un rapporto di 1:10 (1 parte di virus e 9 parti di terreno colturale) fino ad arrivare ad un rapporto di 1:10000000 alla diluizione 10^{-7} . Per ogni diluizione sono stati considerati 3 pozzetti, in maniera tale da avere un risultato quanto più preciso possibile.

Il controllo negativo era rappresentato dalla coltura cellulare non infettata.

La piastra è stata incubata per 45 minuti a 37°C in 5% CO₂ quindi addizionata di 90 μ l di terreno di coltura contenente tripsina (5 μ g/ml) e SFB (0.5% v/v). La tripsina viene utilizzata per favorire l'ingresso del virus nelle cellule [7]. Durante i 5 giorni di incubazione le piastre sono state osservate giornalmente al microscopio ottico per la valutazione dell'effetto citopatico (ECP).

Sulla base dell'ECP rilevato alle varie diluizioni è stato determinato il titolo infettivo secondo la formula di Reed e M \ddot{u} nch, che rappresenta la concentrazione minima di virus in grado di produrre effetto citopatico sulle cellule. Nello specifico la formula di Reed e M \ddot{u} nch [8] ha consentito di calcolare la TCID₅₀.

5.2.2. Emoagglutinazione

Alcuni virus, tra i quali il virus dell'Influenza, hanno la capacità di riconoscere, attraverso proteine localizzate sulla loro superficie, l'emoagglutinina e l'acido sialico presenti nella membrana dei globuli rossi, formando un legame che si concretizza in un processo di agglutinazione.

Il saggio viene eseguito sulle colture cellulari infettate e congelate dopo l'osservazione dell'ECP, al fine di confermare il titolo virale valutato su coltura cellulare.

Il sangue è stato prelevato da polli Specific Pathogen Free (SPF) di IZSLER, raccolto in fiale contenenti EDTA, centrifugato a 800 g per 10 minuti a 4°C. Successivamente il surnatante è stato rimosso, il pellet diluito in 10 ml di PBS e ricentrifugato nelle stesse condizioni. Il processo è stato ripetuto 3 volte ed il pellet finale è stato diluito allo 0.5% in PBS; infine la sospensione di globuli rossi è stata conservata a +4°C.

La verifica dell'attività emoagglutinante è stata eseguita sulle colture cellulari infettate, congelate a -80°C e scongelate a temperatura ambiente. Il contenuto di tre pozzetti inoculati con ciascun virus è stato analizzato per la valutazione dell'attività emoagglutinante, utilizzando piastre da 96 pozzetti con fondo a V. Per ogni campione in esame sono stati distribuiti 50 µl in tre pozzetti, mantenendo lo stesso ordine utilizzato nella piastra utilizzata per la determinazione del titolo infettante. Ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 50 µl di emazie di pollo allo 0.5%. I pozzetti di controllo negativo contenevano 50 µl di PBS e 50 µl di emazie.

La piastra è stata quindi incubata a temperatura ambiente per circa 45 minuti, al termine dei quali è stata eseguita la lettura.

In assenza di virus gli eritrociti sedimentano nel fondo a V del pozzetto formando un "bottone", mentre in caso di presenza di virus, esso si lega alle emazie agglutinandole ed inducendo la rottura della membrana. La lisi dei globuli rossi è quindi testimoniata da un colore rosso diffuso nel pozzetto e dall'assenza del classico "bottone".

5.2.3. Reazione di biologia molecolare - Real Time PCR

L'allineamento delle sequenze del gene NP dei 5 ceppi virali di origine umana ha consentito di disegnare il *primer forward* ed il *primer reverse* su regioni conservate.

A/Milano/224/2015/H1N1_PDM_NP	GCATCTGCAGGCCAGATCAGTGTGCAGCCTACATTCTCAGTGCAGCGAAATCTCCCTTTT
A/Milano/53/2013_H1N1_NP	GCATCCGCAGGCCAGATCAGTGTGCAGCCTACATTCTCAGTGCAGCGAAATCTCCCTTTT
A/Parma/9/2014_H1N1_NP	GCATCCGCAGGCCAGATCAGTGTGCAGCCTACATTCTCAGTGCAGCGAAATCTCCCTTTT
A/Parma/56/2014_H1N1_NP	GCATCCGCAGGCCAGATCAGTGTGCAGCCTACATTCTCAGTGCAGCGAAATCTCCCTTTT
A/Parma/79/2014_H1N1_NP	GCATCCGCAGGCCAGATCAGTGTGCAGCCTACATTCTCAGTGCAGCGAAATCTCCCTTTT
A/Milano/224/2015/H1N1_PDM_NP	GAAAGAGCAACCATTATGGCAGCATTAGCGGGAACAATGAAGGACGGACATCCGACATG
A/Milano/53/2013_H1N1_NP	GAAAGAGCAACCGTTATGGCAGCATTAGCGGGAACAATGAAGGACGGACATCCGACATG
A/Parma/9/2014_H1N1_NP	GAAAGAGCAACCGTTATGGCAGCATTAGCGGGAACAATGAAGGACGGACATCCGACATG
A/Parma/56/2014_H1N1_NP	GAAAGAGCAACCGTTATGGCAGCATTAGCGGGAACAATGAAGGACGGACATCCGACATG
A/Parma/79/2014_H1N1_NP	GAAAGAGCAACCATTATGGCAGCATTAGCGGGAACAATGAAGGACGGACATCCGACATG
A/Milano/224/2015/H1N1_PDM_NP	CGAACAGAAATTATAAGGATGATGGAAAGTGCAAAGCCAGAGGATTTGTCCTTCCAGGGG
A/Milano/53/2013_H1N1_NP	CGAACAGAAATTATAAGGATGATGGAAAGTGCAAAGCCAGAGGATTTGTCCTTCCAGGGG
A/Parma/9/2014_H1N1_NP	CGAACAGAAATTATAAGGATGATGGAAAGTGCAAAGCCAGAGGATTTGTCCTTCCAGGGG
A/Parma/56/2014_H1N1_NP	CGAACAGAAATTATAAGGATGATGGAAAGTGCAAAGCCAGAGGATTTGTCCTTCCAGGGG
A/Parma/79/2014_H1N1_NP	CGAACAGAAATTATAAGGATGATGGAAAGTGCAAAGCCAGAGGATTTGTCCTTCCAGGGG
A/Milano/224/2015/H1N1_PDM_NP	CGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCCTTTGAC
A/Milano/53/2013_H1N1_NP	CGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCCTTTGAC
A/Parma/9/2014_H1N1_NP	CGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCCTTTGAC
A/Parma/56/2014_H1N1_NP	CGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCCTTTGAC
A/Parma/79/2014_H1N1_NP	CGGGGAGTCTTCGAGCTCTCGGACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCCCTTTGAC
A/Milano/224/2015/H1N1_PDM_NP	ATGAGTAATGAAGGGTCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTGA
A/Milano/53/2013_H1N1_NP	ATGAGTAATGAAGGGTCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTGA
A/Parma/9/2014_H1N1_NP	ATGAGTAATGAAGGGTCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTGA
A/Parma/56/2014_H1N1_NP	ATGAGTAATGAAGGGTCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTGA
A/Parma/79/2014_H1N1_NP	ATGAGTAATGAAGGGTCTTATTTCTTCGGAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTGA

Nello specifico sono stati identificati i seguenti *primer*:

- **Primer NPflu_FOR** GAAAGAGCGACCATTATGGC
- **Primer NPflu_REV** TCCTCTGCATTGTCTCCGAA

Dal criolisato ottenuto dalle colture cellulari sottoposte alle prove di infezione *in vitro*, è stato estratto l'RNA utilizzando il kit *RNeasy® Mini Kit (Qiagen)*. L'acido nucleico ottenuto è stato utilizzato per l'allestimento della reazione di retrotrascrizione (*GeneAmp® RNA PCR Core Kit, ThermoFisher*), al fine di ottenere il cDNA, che è stato successivamente amplificato in *Real Time PCR* utilizzando il kit *SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Biorad)* con i *primers* sopra riportati e secondo quanto indicato dalle ditte produttrici.

5.3. Sintesi dei siRNAs

5.3.1. *Analisi bioinformatica*

Presso il Centro Ricerche Biotecnologiche dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Cremona è stata effettuata la ricerca bioinformatica che ha permesso la sintesi dei siRNAs.

Le sequenze corrispondenti al gene NP dei virus dell'Influenza A riportati al paragrafo 3.2 sono stati ottenuti da *Genbank* e analizzati con il software *AlignX* (*Life Technologies*) per identificare le regioni più conservate. Sulle stesse sono state selezionate tre sequenze, utilizzando il server *siDirect 2.0* (<http://design.RNAi.jp/>) e l'algoritmo del *Whitehead Institute's* [9, 10], impiegate per disegnare i siRNAs da utilizzare nello studio.

Nello specifico sono state individuate tre regioni sulle quali sono stati disegnati i tre siRNA impiegati nello studio (tabella 1):

Nome siRNA	Sequenza
NP6	GCAGAGGAGTATGACAATT
NP7	CAGAGGAGTATGACAATTA
NP8	GAGGAGTATGACAATTA AAA

Tab. 1: siRNAs selezionati.

5.3.2. *Preparazione del primo vettore di espressione*

Al fine di produrre i siRNAs di interesse in *Escherichia coli*, è stato utilizzato il vettore plasmidico di espressione pGEX-4T-1-p19-T7-EGFPFL (*ADDDGENE*, cat. #46310) [11].

Il principio di funzionamento del vettore (figura 3) è legato alla capacità di produrre la proteina p19, in grado di sequestrare il siRNA, che è stata a sua volta modificata con l'aggiunta di una regione esaistidinica (p19-His), in grado di agevolarne la purificazione cromatografica. Una seconda unità trascrizionale sullo stesso vettore trascrive una sequenza *inverted-repeat* (*EGFPFL-linker-EGFPFL*) che genera una molecola di RNA a doppia elica che viene idrolizzata a produrre i piccoli siRNAs. La sequenza di questa regione è complementare al *target* di interesse e definisce pertanto la specificità dei siRNAs generati.

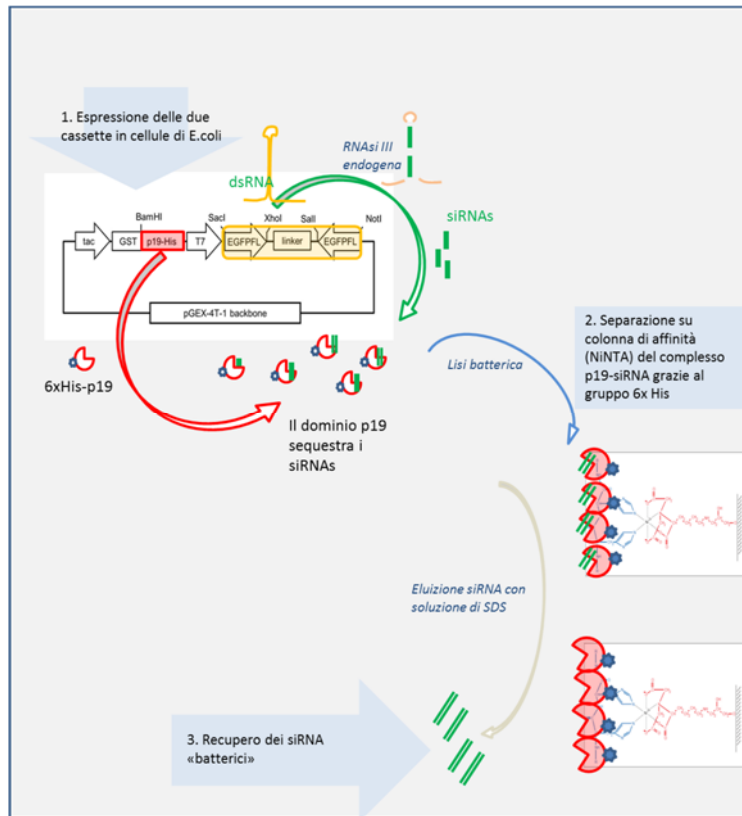


Fig. 3: schema del principio della procedura di Huang per la generazione dei siRNAs.

Il vettore originale è stato modificato tramite inserzione di un oligonucleotide nel sito SacI con la conseguente sostituzione del sito SacI con un sito SpeI per generare il vettore pGEX-deltaSacI (figura 4).

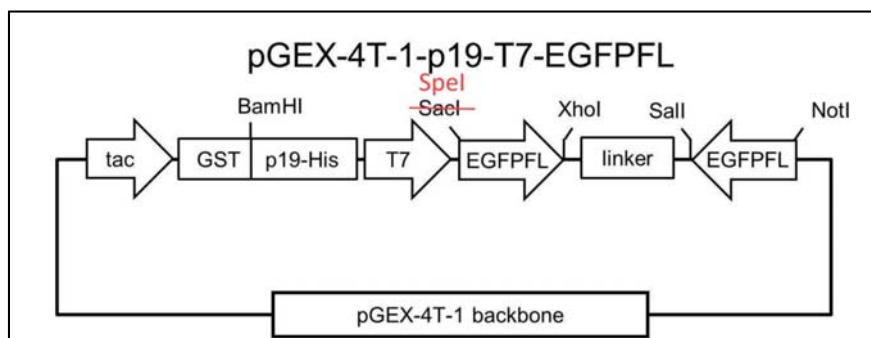


Fig. 4: vettore plasmidico modificato.

5.3.3. Clonaggio delle regioni target

Utilizzando come origine il cDNA del virus influenzale A/swine/Italy/1513/1998 (H1N1) sono stati amplificati mediante PCR i tre frammenti di DNA corrispondenti rispettivamente ai siRNAs NP6, NP7 e NP8.

I tre segmenti di DNA così ottenuti sono stati clonati nel sito SmaI del vettore *Pbk-Silencer*, impiegato successivamente per la trasfezione cellulare, e sequenziati. I clonaggi sono stati effettuati nel ceppo di *E. coli* SURE (*Stratagene*). In questo modo con tecniche di clonaggio classico sono stati inseriti i siRNAs nei tre vettori di espressione per la generazione di *pools* di siRNAs definiti NP6, NP7 e NP8, in funzione delle rispettive regioni *target*.

I frammenti di nostro interesse sono stati quindi tagliati indistintamente sia con gli enzimi SpeI e XhoI, sia con NotI e Sall ed inseriti nel vettore pGEX-4T-1-p19-T7 nei due orientamenti necessari per ottenere la struttura ad *Inverted Repeat*.

5.3.4. Allestimento dei vettori reporter

Tutti i vettori *reporter* sono stati allestiti a partire dal plasmide *psiCHECK-2* (*Promega*, figura 5), che garantisce un approccio rapido ed ottimale dal punto di vista quantitativo al fenomeno del RNAi.

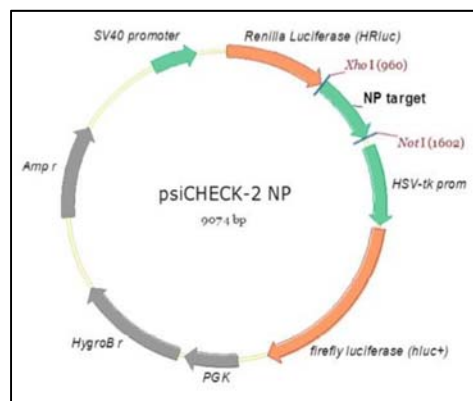


Fig. 5: vettore contenente i due reporter ed il frammento cDNA del bersaglio NP.

Questi vettori consentono di monitorare eventuali alterazioni dell'espressione del gene *target* associato al gene *reporter*. Ogni vettore presenta due unità trascrizionali distinte e codificanti rispettivamente per l'enzima *Renilla Luciferase* e per l'enzima *Firefly Luciferase*. Il gene *reporter* primario è rappresentato da *Renilla Luciferase* ed al 3' UTR della cassetta codificante per l'enzima sono stati clonati i segmenti di cDNA corrispondenti alle sequenze *target* virali. *Firefly Luciferase* rappresenta il gene reporter secondario e viene inserito al fine di poter normalizzare il segnale emesso dal *reporter* primario. In seguito alla co-trasfezione del vettore *reporter* con un siRNA efficace, il trascritto codificante la *Renilla Luciferase* viene degradato,

provocando una ridotta attività dell'enzima, mentre l'attività della *Firefly Luciferase* non è influenzata dall'intervento e viene utilizzata come parametro di normalizzazione. Le variazioni del rapporto tra le attività dei due enzimi rivelano perciò l'efficacia del siRNA stesso. Un siRNA funzionale sarà quindi in grado di legarsi al mRNA bersaglio e di promuovere il fenomeno di RNAi, in questo caso il gene di interesse viene scisso e degradato diminuendo il segnale emesso da *Renilla Luciferase*.

Partendo da questo vettore, sono stati generati *reporter* con le sequenze *target* del gene NP del virus A/swine/Italy/1513/1998 (H1N1) clonate in orientamento + e – per simulare sia l'RNA messaggero che il genoma virale. Sono stati inoltre allestiti *reporter* con la regione *target* del gene NP di virus influenzali non omologhi, quali A/turkey/Italy/2676/2000 (H7N1) e A/swine/Italy/437/1976 (H1N1).

5.3.5. Preparazione del secondo vettore di espressione

Per la costruzione del secondo vettore di espressione, tutto il frammento codificante la p19 e l'*inverted repeat* è stato escisso dal vettore *pGEX* e trasferito in un vettore *pBAD-6xHis*, ottenendo tre vettori analoghi ai precedenti.

Tutti i vettori finali sono stati trasformati in cellule di *E. coli* di ceppo SURE.

5.3.6. Espressione e purificazione dei siRNAs

Per la produzione dei siRNA, i vettori sono stati trasferiti nel ceppo *BL-21(DE3)-RecB*, ospite ottimale per l'espressione corretta del vettore [11].

Le cellule batteriche sono state inoculate in 50 ml di *Terrific Broth* a 32°C, ricco terreno colturale che supporta un'abbondante crescita di *E. coli* ed un più elevato recupero di DNA plasmidico. In questo terreno, le cellule ricombinanti di *E. coli* mantengono una fase di crescita più lunga.

Le cellule sono state mantenute in coltura fino a raggiungere una OD₆₀₀ compresa tra 0.6 e 0.8, sono state quindi indotte ad esprimere i siRNA con l'aggiunta di un induttore, l'arabinosio 2 mM, e coltivate in agitazione a 25°C per ulteriori 16 ore.

Al termine dell'incubazione il *pellet* batterico è stato recuperato mediante centrifugazione e processato, come descritto nel protocollo citato in precedenza [12]. I siRNA eluiti con soluzione di SDS 0.5% sono stati purificati mediante il metodo guanidina/fenolo acido di *Chomczynski* [13].

Il *pellet* di siRNA è stato risospeso in acqua ultrapura, il prodotto è stato quantificato mediante fluorimetria (*Qubit, Life Technologies*) ed analizzato mediante elettroforesi su gel di Acrilamide-TBE-Urea.

5.4. Trasfezione delle colture cellulari

Il vettore *pBKSilencer* (figura 5) che esprime i siRNA NP6, NP7 e NP8 è stato scelto per generare cloni di MDCK ricombinanti e stabili.

Le cellule MDCK sono state seminate in piastre da 6 pozzetti e coltivate per 24 ore in terreno MEM con l'aggiunta di SFB al 10%, glutammina 1 mM e gentamicina 50 µg/ml.

Al raggiungimento di una confluenza pari al 80% è stata eseguita la trasfezione utilizzando *Lipofectamine 2000* (*Life Technologies*), secondo il protocollo suggerito dalla casa produttrice.

Le trasfezioni sono state effettuate in piastre da 48 pozzetti, mediante il protocollo di *reverse-transfection* ed ogni trattamento sperimentale è stato effettuato in triplicato.

In ogni pozzetto sono stati dispensati 50 µl di soluzione composta da *OptiMEM* (*Life Technologies*) con l'aggiunta di 1 µl di *Lipofectamine 2000*, 80 ng di vettore *reporter* e 20 ng di siRNA. Nei pozzetti sono quindi stati dispensati 200 µl di terreno completo contenente 5×10^4 cellule in sospensione.

Quarantotto ore dopo la trasfezione, la selezione dei cloni è stata avviata sostituendo il terreno con MEM fresco contenente 500 µg/ml di G418 (*Calbiochem*). Dopo due settimane, i cloni sono stati isolati ed espansi manualmente. In questo caso, l'attività di siRNA nei cloni isolati è stata testata mediante osservazione al microscopio ottico a fluorescenza.

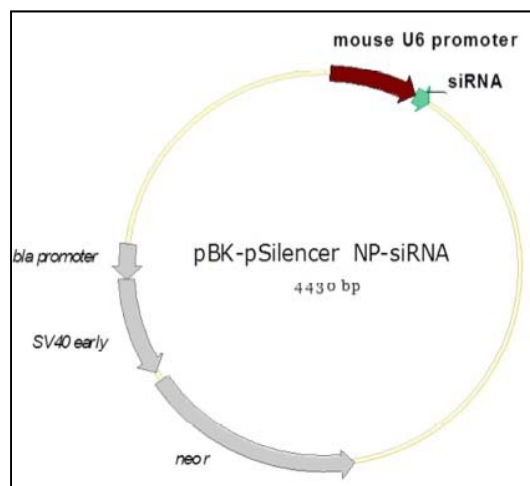


Fig. 5: vettore di espressione pBKSilencer-NP siRNA.

5.5. Determinazione dell'attività dei siRNAs

Per effettuare la determinazione dell'attività luciferasica è stato utilizzato il kit *Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega)*. La lettura dei valori di luminescenza è stata effettuata con un luminometro *Lumac Biocounter M1500*. Le variazioni del rapporto tra il valore di luminescenza generato dalla *Renilla Luciferase* rispetto a quello prodotto dalla *Firefly Luciferase* sono state assunte come indici dell'attività dei diversi siRNAs.

5.5.1. Infezione dei cloni di MDCK trasfettate con i biotipi influenzali scelti

Le tre linee cellulari di MDCK trasfettate con i tre siRNAs in esame e la linea cellulare MDCK non trasfettata (controllo positivo) sono state sottoposte all'infezione virale.

Per ogni biotipo influenzale è stata considerata una piastra da 96 pozzetti, in totale sono state allestite 5 piastre.

In ogni piastra, ogni coltura cellulare è stata inoculata in 24 pozzetti così che in ognuna delle cinque piastre allestite fossero presenti tutti e quattro i cloni cellulari in esame.

Le cellule sono state seminate alla concentrazione di 10^5 cellule/ml ed incubate per 24-48 ore per favorire la crescita cellulare.

Successivamente, quando le cellule hanno raggiunto una confluenza di circa il 70%, è stata allestita la prova di infezione virale. Nello specifico, il terreno di coltura è stato rimosso, le cellule lavate con PBS e i pozzetti inoculati con 10 μ l delle diluizioni di ciascun virus utilizzato. Per ogni biotipo sono state allestite in terreno colturale diluizioni esponenziali su base logaritmica (da 10^{-1} a 10^{-7}) a partire da 100 dosi citopatiche dello *stock* depositato nella biobanca di IZSLER. Per ogni diluizione sono stati considerati 3 pozzetti di ogni linea cellulare, come descritto al paragrafo 5.2.1.

Tre pozzetti per ogni clone cellulare non sono stati sottoposti ad infezione e sono stati utilizzati come controllo negativo (C-), per verificare lo stato di salute del substrato cellulare.

La piastra è stata incubata per 45 minuti a 37°C in 5% CO₂, quindi addizionata di 90 μ l di terreno di coltura contenente tripsina (5 μ g/ml) e SFB (0.5% v/v).

Le piastre di coltura sono state osservate quotidianamente al microscopio ottico per 7 giorni, al fine di verificare l'eventuale comparsa dell'ECP e la distruzione del monostrato cellulare.

Al termine del periodo di osservazione, la coltura è stata congelata a -80°C, scongelata e il criolisato ottenuto è stato utilizzato per il test di emoagglutinazione (HA) e per le analisi di biologia molecolare, eseguite con le modalità indicate ai paragrafi 5.2.2 e 5.2.3, rispettivamente.

6. RISULTATI

6.1. Titolazione virale

I biotipi di Influenza A considerati sono stati adattati e titolati su coltura cellulare MDCK utilizzando la metodica di Reed e Munch.

Di seguito viene riportato il titolo infettante calcolato in piastre da 96 pozzetti ed espresso come TCID₅₀:

A/Swine/Italy/1513-1/1998 H1N1: 10^{9.56} TCID₅₀/ml

A/Swine/Italy/1521/1998 H1N2: 10^{9.68} TCID₅₀/ml

A/Swine/Italy/1523/1998 H3N2: 10^{7.51} TCID₅₀/ml

A/Swine/Italy/437/1976 H1N1: 10^{9.21} TCID₅₀/ml

A/Turkey/Italy/2676/2000 H7N1: 10^{8.27} TCID₅₀/ml

A/Milano/224/2015 H1N1: 10^{5.75} TCID₅₀/ml;

A/Milano/53/2013 H1N1: 10^{6.24} TCID₅₀/ml;

A/Parma/9/2014 H1N1: 10^{6.50} TCID₅₀/ml;

A/Parma/56/2014 H1N1: 10^{4.75} TCID₅₀/ml;

A/Parma/79/2014 H1N1: 10^{7.24} TCID₅₀/ml.

Gli *stock* virali così allestiti e titolati sono stati depositati nella biobanca di IZSLER.

Per le prove successive sono stati utilizzati i biotipi di origine umana essendosi dimostrati maggiormente idonei, per le analisi successive sono state utilizzate 100 dosi citopatiche degli stessi.

6.2. Cloni cellulari esprimenti siRNAs

Basandosi sulla letteratura [14] sono state utilizzate tre sequenze siRNAs, prodotte dal gruppo del Dottor Lucchini, dell'U.O. Università Cattolica del Sacro Cuore, sede di Cremona. Tali sequenze hanno dimostrato efficacia nei confronti del *target* individuato, la nucleoproteina (NP) del virus dell'Influenza A:

NP6: GCAGAGGAGTATGACAATT

NP7: CAGAGGAGTATGACAATTA

NP8: GAGGAGTATGACAATTTAA

Le sequenze siRNAs sono state inserite nel vettore di espressione *pBKSilencer* utilizzato per la successiva trasfezione della linea cellulare MDCK. I cloni ottenuti sono stati amplificati (figura 6) e conservati in vapori di azoto liquido per la successiva infezione *in vitro*.



Fig. 6: cellule MDCK trasfettate con siRNA NP6 (A), NP7 (B), NP8 (C).

6.3. Infezione dei cloni cellulari con i biotipi del virus dell'Influenza A

I tre cloni cellulari disponibili sono stati infettati con i biotipi di Influenza A di derivazione umana:

- A/Milano/224/2015 H1N1;
- A/Milano/53/2013 H1N1;
- A/Parma/9/2014 H1N1;
- A/Parma/56/2014 H1N1;
- A/Parma/79/2014 H1N1.

Nello specifico ogni biotipo virale è stato inculato sui tre substrati cellulare trasfettati e sulle MDCK non trasfettate, alle diluizioni seriali da 10^{-1} a 10^{-7} partendo da 100 dosi citopatiche calcolate sugli *stock* virali depositati nella biobanca di IZSLER.

Tutti i virus sono risultati in grado di replicare dando esito ad alterazioni cellulari, che comparivano dopo 48 ore dall'infezione; alcune diluizioni virali portavano alla distruzione completa del substrato relativo al controllo positivo in 5-7 giorni.

Il controllo negativo, rappresentato da cellule MDCK trasfettate con i siRNAs e non sottoposte ad infezione, non ha evidenziato la distruzione del monostrato cellulare (figura 7).

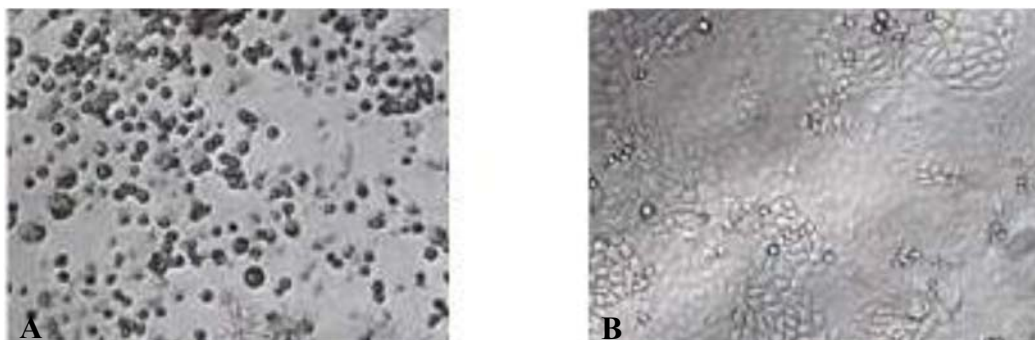


Fig. 7: alterazione del monostrato cellulare sottoposto ad infezione (A) rispetto al controllo negativo (B).

Al termine del periodo di osservazione di 7 giorni, le colture cellulari sono state congelate e scongelate rapidamente e sul criolisato ottenuto è stato eseguito il saggio di emoagglutinazione, al fine di confermare il titolo virale valutato su coltura cellulare.

I risultati ottenuti relativi alla valutazione dell'ECP per i biotipi virali esaminati ed il relativo esito del test HA sono riportati nelle tabelle 2, 3, 4, 5, 6.

NP6								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	---	---	---	---	---	---	---	---
HA	+++/-	---	---	---	---	---	---	---
NP7								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	+++	+++	---	---	---	---	---
HA	+++	+++	+++	---	---	---	---	---
NP8								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	---	---	---	---	---	---	---	---
HA	+++	+++	---	---	---	---	---	---
MDCK								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---
HA	+++	+++	+++	+++	+++	---	---	---

Tab. 2: cloni cellulari infettati con il virus A/Milano/224/2015 H1N1 e coltura cellulare MDCK impiegata quale controllo negativo. (-) assenza di ECP/HA, (+) presenza di ECP/HA, (+/-) risultato non conclusivo.

NP6								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	---	---	---	---	---	---	---	---
HA	---	---	---	---	---	---	---	---
NP7								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	---	---	---	---	---	---	---
HA	+ - +	---	---	---	---	---	---	---
NP8								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	---	---	---	---	---	---	---	---
HA	---	---	---	---	---	---	---	---
MDCK								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	+++	---	---	---	---	---	---
HA	+++	+++	---	---	---	---	---	---

Tab. 3: cloni cellulari infettati con il virus A/Milano/53/2014 H1N1 e coltura cellulare MDCK impiegata quale controllo negativo. (-) assenza di ECP/HA, (+) presenza di ECP/HA, (+/-) risultato non conclusivo.

NP6								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	---	---	---	---	---	---	---	---
HA	---	---	---	---	---	---	---	---
NP7								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	+++	---	---	---	---	---	---
HA	---	---	---	---	---	---	---	---
NP8								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	---	---	---	---	---	---	---	---
HA	+++	---	---	---	---	---	---	---
MDCK								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	+++	+++	---	---	---	---	---
HA	+++	+++	+++	---	---	---	---	---

Tab. 4: cloni cellulari infettati con il virus A/Parma/9/2014 H1N1 e coltura cellulare MDCK impiegata quale controllo negativo. (-) assenza di ECP/HA, (+) presenza di ECP/HA, (+/-) risultato non conclusivo.

NP6								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	-- +/-	---	---	---	---	---	---	---
HA	+++	---	---	---	---	---	---	---
NP7								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	+++	+++	-- +	---	---	---	---
HA	+++	+++	+ --	---	---	---	---	---
NP8								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	---	---	---	---	---	---	---	---
HA	+++	+++	---	---	---	---	---	---
MDCK								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	+++	+++	+ - +	-- +	---	---	---
HA	+++	+++	+++	+ - +	-- +	---	---	---

Tab. 5: cloni cellulari infettati con il virus A/Parma/56/2014 H1N1 e coltura cellulare MDCK impiegata quale controllo negativo. (-) assenza di ECP/HA, (+) presenza di ECP/HA, (+/-) risultato non conclusivo.

NP6								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	---	---	---	---	---	---	---	---
HA	+/-+/-+/-	---	---	---	---	---	---	---
NP7								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	+++	-- +/-	---	---	---	---	---
HA	+++	-+-	---	---	---	---	---	---
NP8								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	+++	---	---	---	---	---	---
HA	+++	---	---	---	---	---	---	---
MDCK								
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	C-
ECP	+++	+++	-+-	---	---	---	---	---
HA	+++	---	---	---	---	---	---	---

Tab. 6: cloni cellulari infettati con il virus A/Parma/79/2014 H1N1 e coltura cellulare MDCK impiegata quale controllo negativo. (-) assenza di ECP/HA, (+) presenza di ECP/HA, (+/-) risultato non conclusivo.

Dalle tabelle sopra riportate, si osserva che i diversi cloni mostrano un comportamento differente nei confronti dei biotipi influenzali utilizzati.

Per questo motivo, al fine di confermare l'effettiva inibizione dei ceppi virali ad opera dei cloni NP6, NP7 e NP8, si è provveduto ad integrare i risultati ottenuti con l'analisi di biologia molecolare.

6.4. Analisi di biologia molecolare

Sugli stessi campioni impiegati per la valutazione dell'ECP e del test HA, sono state allestite reazioni di biologia molecolare al fine di valutare i livelli di espressione della proteina NP.

Per una corretta interpretazione dei risultati si è scelto di analizzare in PCR *Real Time* non solo i campioni di dubbia positività ai test di ECP e HA, ma anche tutte le linee cellulari in esame infettate con i 5 virus di derivazione umana, alle diluizioni dalla -1 a -7 delle 100 dosi citopatiche calcolate sullo *stock* virale.

L'analisi dell'espressione genica prevedeva inizialmente la valutazione dell'espressione del gene della beta-actina quale gene normalizzatore, ma questa strategia si è rivelata inefficace poiché all'aumentare della dose infettante si è assistito a un incremento della mortalità cellulare con conseguente riduzione dell'espressione del gene *housekeeping*. Per tale motivo l'espressione della beta-actina non è stata considerata ed i valori osservati sono stati normalizzati mantenendo costante la quantità di cellule in ogni pozzetto, in tutte le infezioni sperimentali allestite.

Per ogni campione è stato estratto l'RNA ed è stata valutata l'espressione del gene NP così da valutare il titolo molecolare del virus in esame, le prove sono state effettuate in triplicato e i dati ottenuti sono sintetizzati nei paragrafi seguenti. Nei grafici da 1 a 12 sono rappresentate in ascissa la diluizione del virus testato ed in ordinata il valore di Ct (ciclo *threshold*), inversamente proporzionale al titolo virale.

6.4.1. Infezione sperimentale con A/Milano/224/2015

Dal grafico n°1 è possibile osservare come il clone cellulare NP6 sia risultato resistente all'infezione anche a dosi di virus elevate (pari alla terza diluizione in base 10). Tale resistenza è particolarmente evidente a dosi inferiori (pari alla quinta diluizione in base 10). NP8 ha invece mostrato un andamento variabile, permettendo la replicazione virale anche a dosi molto basse, risultando più permissivo della linea cellulare di riferimento MDCK.

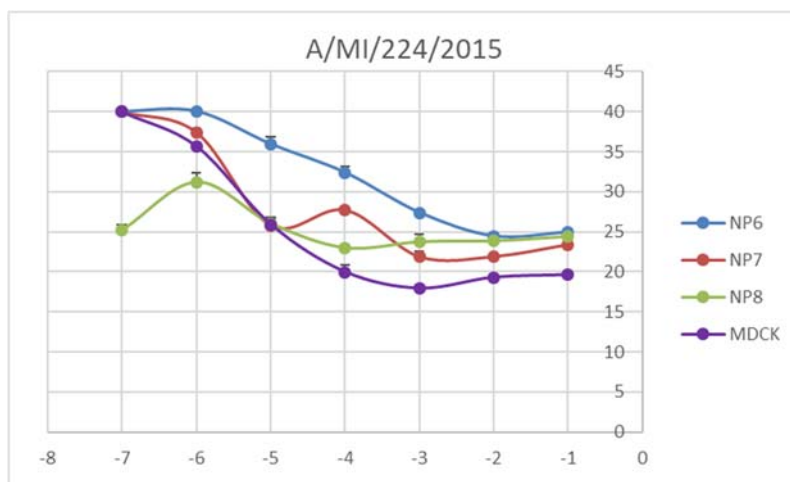


Grafico n°1: infezione dei cloni cellulari con il biotipo A/Milano/224/2015.

6.4.2. Infezione sperimentale con A/Milano/53/2013

Tutti e tre i cloni si sono rivelati resistenti all'infezione virale. Tale resistenza è specialmente evidente dopo infezione sperimentale con il virus al titolo pari alla seconda diluizione in base 10 (grafico 2).

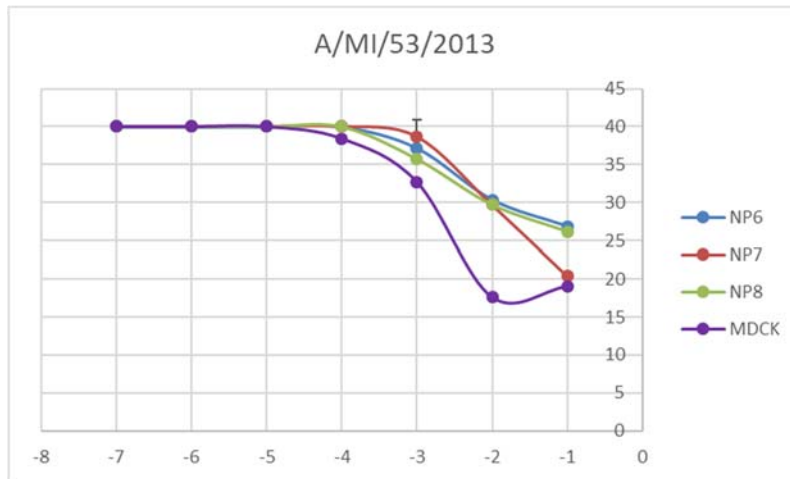


Grafico n°2: infezione dei cloni cellulari con il biotipo A/Milano/53/2013.

6.4.3. Infezione sperimentale con A/Parma/9/2014

Anche in questo caso il clone cellulare trasfettato con NP6, come evidenziato nel grafico n°3, si è rivelato il più efficace nel controllo dell'infezione. In generale, tutti e tre i cloni riducono la carica del virus quando infettati con una dose pari alla quinta diluizione in base 10.

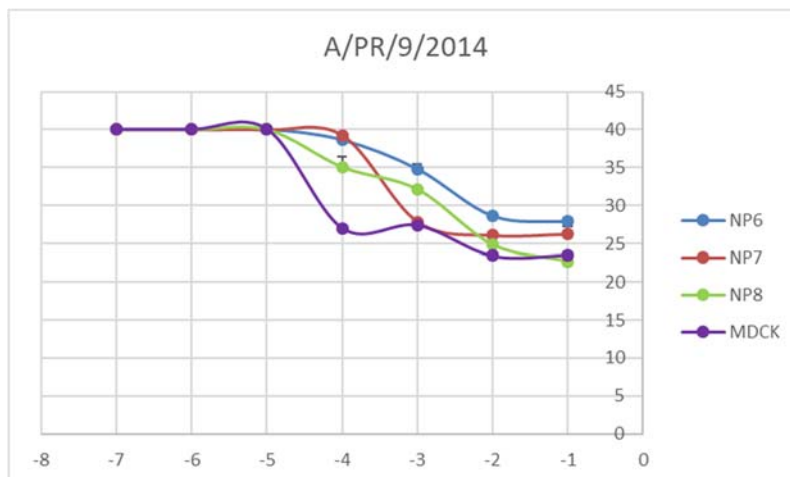


Grafico n°3: infezione dei cloni cellulari con il biotipo A/Parma/9/2014.

6.4.4. Infezione sperimentale con A/Parma/56/2014

Il grafico n°4 evidenzia la resistenza di tutti e tre i cloni all'infezione virale con il biotipo in esame. Tale resistenza è specialmente evidente dopo infezione sperimentale con il virus al titolo pari alla quarta e quinta diluizione in base 10.

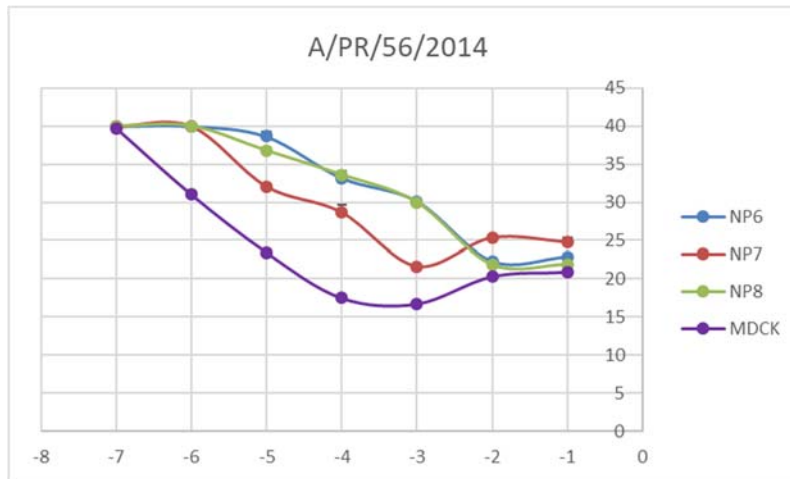


Grafico n°4: infezione dei cloni cellulari con il biotipo A/Parma/56/2014

6.4.5. Infezione sperimentale con A/Parma/79/2014

Tutti e tre i cloni si sono rivelati resistenti all'infezione virale con il biotipo in esame (grafico n°5). Tale resistenza è specialmente evidente dopo infezione sperimentale con il virus al titolo pari alla quarta diluizione in base 10.

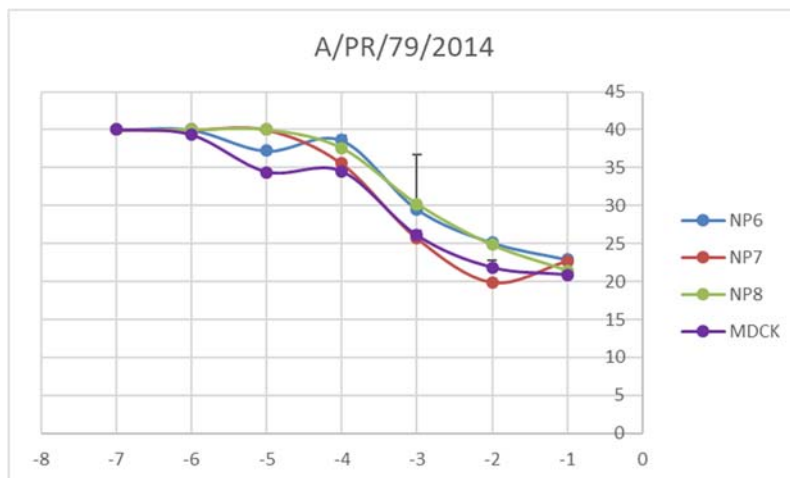


Grafico n°5: infezione dei cloni cellulari con il biotipo A/Parma/79/2014

In generale, la metodica di PCR *Real Time* si è rivelata più sensibile rispetto alla valutazione di ECP e di HA. NP6 è risultato inoltre essere il clone con più ampio spettro di resistenza alle diverse infezioni virali. Tutti i cloni hanno mostrato efficacia crescente al diminuire della dose infettante applicata.

7. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il virus dell'Influenza A è il principale agente responsabile delle infezioni del tratto respiratorio negli esseri umani ed animali. Annualmente si presentano nuove epidemie influenzali sostenute da biotipi virali modificati rispetto a quelli delle precedenti stagioni invernali e tale evento è attribuibile alle caratteristiche genetiche del virus e degli eventi di ricombinazione che si manifestano durante il processo replicativo. Questo fenomeno nell'ospite animale rappresenta un problema di grande interesse, in quanto quest'ultimo funge da *reservoir* per la trasmissione della patologia all'uomo. L'insorgenza di nuovi biotipi influenzali comporta la necessità di aggiornare periodicamente il vaccino, spesso reso inefficace dalle modificazioni adattative virali, al fine di mantenerne l'efficacia protettiva.

A livello terapeutico, una delle strategie considerata è rappresentata dalla terapia antivirale e proprio in questo contesto si colloca il meccanismo del RNA *interference* (RNAi). Numerose pubblicazioni hanno dimostrato come gli *short interfering* RNAs (siRNAs) abbiano la capacità di svolgere la funzione di agenti antivirali, inibenti appunto la replicazione dei virus all'interno dell'ospite.

L'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la capacità di tre siRNAs costruiti *ad hoc*, denominati NP6, NP7, NP8, e disegnati su una specifica regione conservata della nucleoproteina (NP) del genoma virale dell'Influenza di tipo A, di inibire la replicazione virale di 5 biotipi influenzali umani a bassa patogenicità, presenti nella biobanca di IZSLER (www.ibvr.org):

- A/Milano/224/2015 H1N1 (cod. VIR RE RSCIC 326)
- A/Milano/53/2013 H1N1 (cod. VIR RE RSCIC 325)
- A/Parma/9/2014 H1N1 (cod. VIR RE RSCIC 322)
- A/Parma/56/2014 H1N1 (cod. VIR RE RSCIC 324)
- A/Parma/79/2014 H1N1 (cod. VIR RE RSCIC 323)

I tre siRNAs sono stati impiegati per trasfettare la linea cellulare MDCK, che rappresenta il substrato cellulare ideale per la crescita dei virus influenzali. Le cellule trasfettate con i tre siRNAs sono state amplificate *in vitro* così da ottenere tre *stock* di cloni cellulari da impiegare nello studio.

La resistenza delle tre linee cellulari all'infezione da parte dei cinque biotipi virali è stata valutata mediante l'osservazione dell'effetto citopatico (ECP) e tramite saggio di emoagglutinazione (HA). I risultati osservati con queste due metodiche sono stati confrontati con saggi di biologia molecolare, infatti tramite le reazioni di *Real Time* PCR è stato possibile verificare la presenza del virus integro.

Nello specifico, i cloni utilizzati nel presente lavoro hanno mostrato una diversa sensibilità nei confronti dei biotipi virali considerati. I risultati ottenuti hanno mostrato una buona capacità dei cloni ad inibire la replicazione virale, in particolare il clone NP6 è risultato il più promettente. Infatti NP6 e NP8 si sono dimostrati essere i cloni più efficienti, in grado di ridurre drasticamente la carica virale. Al contrario, il clone NP7 ha evidenziato un'attività inibente nei confronti della replicazione virale superiore al controllo positivo (MDCK non trasfettate) ma tra tutti i cloni, si è dimostrato il più sensibile all'infezione anche a basso titolo virale.

Dai grafici n°1 e n°4 è possibile notare un parallelismo, dove NP6 e NP8 risultano essere resistenti ad alte dosi di A/Milano/224/2015 e A/Parma/56/2014.

Nel grafico n°2 si può osservare che NP6 e NP8 non permettono la replicazione di A/Milano/53/2013, mentre NP7 è resistente alla diluizione -2 del suddetto virus.

Come evidenziato nel grafico n°3, NP6 risulta più resistente a A/Parma/9/2014 rispetto a NP7 e NP8, i quali a loro volta mostrano più resistenza rispetto alla linea MDCK.

Come evidenziato nel grafico n°5, NP6 è risultato essere leggermente più resistente all'infezione con A/Parma/79/2014, mentre non sono stati riscontrati livelli di espressione significativamente differenti tra NP7, NP8 e la linea cellulare di controllo MDCK.

Alla luce di quanto sopra descritto possiamo affermare che NP6 si è rivelato essere il clone cellulare con maggiore potenziale nel biocontrollo dei cinque biotipi virali di origine umana esaminati in questo studio.

Inoltre, è stato dimostrato che l'analisi di PCR *Real Time* è un sistema più valido nella determinazione dell'efficacia dei singoli cloni rispetto al metodo colturale.

Visti i risultati ottenuti, specialmente dal costrutto NP6 nei confronti degli stipiti virali di origine umana, si può confermare la potenziale efficacia dell'utilizzo dei siRNAs quale promettente strategia nell'inibizione della replicazione del virus dell'Influenza in alternativa agli attuali farmaci antivirali. In particolare si prevede di testare i siRNAs in esame anche su altri biotipi influenzali sia di origine suina sia aviare.

Quanto emerso da questo studio pone le basi per una più ampia sperimentazione; ci si propone infatti di coltivare su larga scala le colture cellulari trasfettate e risultate resistenti ai ceppi virali, impiegando dei bio-fermentatori "*single use*", in grado di consentire l'amplificazione della coltura cellulare. Questa strategia consentirà di svolgere l'intero processo produttivo in condizioni completamente asettiche riducendo così eventuali rischi di contaminazione accidentale e di potenziali cross-contaminazioni con altri processi produttivi. Lo stesso sistema di produzione potrà essere adottato anche facendo ricorso a colture batteriche trasformate con plasmidi codificanti i siRNAs identificati.

Il cronogramma stabilito nel progetto non è stato rispettato e completato in quanto non si è potuto attivare per tempo, per motivazioni legate agli adempimenti amministrativi interni ed all'emergenza COVID, le borse di studio con la figure professionali richieste dal Progetto di Ricerca.

8. BIBLIOGRAFIA

[1] Sakamoto KM. Knocking Down Human Disease: Potential Uses of RNA Interference in Research and Gene Therapy. *Pediatric Research* 2004, 55 (6): 912–913.

[2] Krol J, Loedige I, Filipowicz W: The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews. Genetics* 2010, 11 (9): 597–610.

[3] Roberts APE, Lewis AP, Jopling CL. miR-122 activates hepatitis C virus translation by a specialized mechanism requiring particular RNA components. *Nucleic Acids Research* 2011, 39 (17): 7716–7729.

[4] Krammer F, Palese P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature Reviews. Drug Discovery* 2015, 14 (3): 167–182.

[5] Clavijo A, Tresnan DB, Jolie R, Zhou EM. Comparison of embryonated chicken eggs with MDCK cell culture for the isolation of swine influenza virus. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2002, 66 (2): 117–121.

[6] Dulbecco R, Vogt M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. *The Journal of Experimental Medicine* 1954, 99 (2): 167-182.

[7] Lombardo T, Dotti S, Renzi S, Ferrari M. Susceptibility of different cell lines to avian and swine Influenza viruses. *Journal of Virological Methods* 2012, 185: 82-88.

[8] Reed LJ, Münch H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 1938, 27: 493–497.

[9] Naito Y, Yamada T, Ui-Tei K, Morishita S, Saigo K. siDirect: highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Research* 2004, 32: W124–W129.

[10] Yuan B, Latek R, Hossbach M, Tuschl T, Lewitter F. SiRNA selection server: an automated siRNA oligonucleotide prediction server. *Nucleic Acids Research* 2004, 32: W130–W134.

[11] Huang L, Lieberman J. Production of highly potent recombinant siRNAs in Escherichia coli. Nature Protocols 2013, 8 (12): 2325-2336.

[12] Yosef I, Goren MG, Qimron U. Proteins and DNA elements essential for the crispr adaptation process in Escherichia coli. Nucleic Acids Research 2012, 40 (12): 5569-5576.

[13] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochemistry 1987, 162 (1): 156-159.

[14] Stoppani E, Bassi I, Dotti S, Lizier M, Ferrari M, Lucchini F. Expression of a single siRNA against a conserved region of NP gene strongly inhibits in vitro replication of different Influenza A virus strains of avian and swine origin. Antiviral Research 2015, 120: 16 –22.

9. MODALITÀ DI DIVULGAZIONE DEI RISULTATI

I risultati ottenuti sono stati presentati nelle seguenti occasioni:

- Tesi finale per la Scuola di Specializzazione in Patologia Clinica e Biochimica Clinica di Sabrina Renzi “Impiego di siRNA (short interfering RNAs) come potenziale strategia antivirale nei confronti del virus influenzale”. Università degli Studi di Brescia.

Brescia, 18/05/2022

Il Responsabile Scientifico del Progetto

Dr. Riccardo Villa