



Valutazione dell'espressione della L1 del BPV1 ricombinante in sistema baculovirus: risultati preliminari



Autori: Anzalone, L., Colabella, C., Severi G., Manuali, E., Cagiola, M. e §De Giuseppe, A.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche "Togo Rosati", via G. Salvemini 1, 06126 Perugia

§ presenting author: a.degiuseppe@izsum.it

INTRODUZIONE

I papillomavirus bovini (BPV) sono un gruppo di virus epiteliotropi di notevole importanza in quanto, oltre a rappresentare gli agenti eziologici di patologie veterinarie, costituiscono dei validi modelli applicabili allo studio dei papillomavirus umani e non [1]. Le malattie causate dai BPV hanno un forte impatto economico, poiché gli animali vengono abbattuti prematuramente a causa del loro deterioramento fisico-funzionale e soprattutto per prevenire la diffusione della malattia stessa [2]. Per contrastare le problematiche associate a questi agenti biologici, almeno in ambito umano, è stato allestito e consolidato l'impiego di un vaccino ricombinante basato sulle *Virus-Like Particles* (VLPs). Queste strutture simil-virali, prodotte sinteticamente, presentano struttura, morfologia e potere immunogeno molto simili a quelli del virus parentale [3-5]. L'allestimento di un presidio immunizzante ricombinante per la papillomatosi bovina, basato sulle capacità autoassemblanti della proteina L1 a formare le VLPs, può rappresentare una valida alternativa ai vaccini autogeni, impiegati attualmente per la profilassi.

MATERIALI E METODI

Sono stati progettati due costrutti, in vettore pBAC1, contenenti il gene codificante una forma deleta della proteina L1 del BPV1 in fusione con lo Strep-tag II: il primo recante la sequenza nucleotidica della L1 *wild-type*, il secondo con sequenza ottimizzata per l'espressione in baculovirus. I baculovirus ricombinanti sono stati ottenuti utilizzando il FlashBAC™ Baculovirus Expression System (Mirus Bio), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice. L'espressione della L1 deleta ricombinante in cellule d'insetto Sf21 è stata verificata in Western blot.

RISULTATI

L'amplificazione plasmidica sui ceppi di *E. coli* TOP10 ha mostrato una differenza nella resa in termini quantitativi tra i due costrutti. Infatti, il costrutto recante il gene della L1 ottimizzato per il sistema baculovirus è stato prodotto in quantità superiori rispetto a quello contenente il gene L1 *wild-type*. Differenze significative sono state osservate anche in fase di espressione della proteina ricombinante nelle cellule d'insetto. In effetti, il baculovirus ricombinante recante il gene con i codoni ottimizzati ha prodotto livelli quantitativi della L1 ricombinante decisamente superiori rispetto al medesimo con il gene *wild-type*. Infine, le prime indagini sperimentali hanno evidenziato che l'anticorpo policlonale anti-AU1 tag, specifico per la sequenza amino-acidica DTYRYI della L1 del BPV1 (Figura 1A) e il Mab anti-StrepTag II (Figura 1B) riconoscono una banda proteica di circa 55-60 kDa, in accordo con quanto atteso.

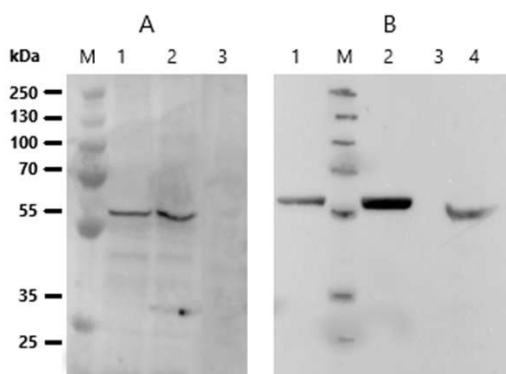


Figure 1. Analisi in Western blot della proteina L1 di BPV1 deleta espressa da baculovirus recante il gene della L1 con sequenza *wild-type* (linee 1A e 1B) e del gene con i codoni ottimizzati (linee 2A e 2B); estratto cellulare di cellule Sf21 non infette (controllo negativo, linee 3A e 3 B); proteina LipL32-StrepTag II (controllo positivo del Mab anti-StrepTag II, linea 4); Prestained Protein Ladder marker (linee M)

DISCUSSIONI

I risultati ottenuti in merito all'espressione della proteina L1 deleta ricombinante sono stati molto soddisfacenti. Tuttavia, ulteriori studi sono necessari al fine di valutare le capacità della L1 deleta ricombinante a formare le VLPs e soprattutto la messa a punto di un protocollo di purificazione capace di preservare le caratteristiche antigenico-strutturali della L1 prodotta in sistema baculovirus.

Bibliografia

1. Araldi, R. P., Assaf, S. M. R., Carvalho, R. F. D., Carvalho, M. A. C. R. D., Souza, J. M. D., Magnelli, R. F., Módolo, D. G., Roperto, F. P., de Cassia Stocco, R. and Beçak, W. (2017). Papillomaviruses: a systematic review. *Genetics and molecular biology*, 40, 1-21.
2. Campo, M. S. (2002). Animal models of papillomavirus pathogenesis. *Virus research*, 89(2), 249-261.
3. Guo, H., Zhu, J., Tan, Y., Li, C., Chen, Z., Sun, S., & Liu, G. (2016). Self-assembly of virus-like particles of rabbit hemorrhagic disease virus capsid protein expressed in *Escherichia coli* and their immunogenicity in rabbits. *Antiviral Research*, 131, 85-91.
4. Wetzel, D., Rolf, T., Suckow, M., Kranz, A., Barbian, A., Chan, J. A., Leitsch, J., Jenzelewski, V., Kouskousis, B., Palmer, C., Beeson, J. G., Schembecker, G., Merz, J. and Piontek, M. (2018). Establishment of a yeast-based VLP platform for antigen presentation. *Microbial cell factories*, 17(1), 1-17.
5. Nooraei, S., Bahrulolum, H., Hoseini, Z. S., Katalani, C., Hajizade, A., Easton, A. J., & Ahmadian, G. (2021). Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *Journal of nanobiotechnology*, 19(1), 1-27.

Il progetto RC IZSUM 04/2023 è stato finanziato dal Ministero della Salute



Quest'opera è stata rilasciata sotto la licenza Creative Commons Attribuzione-Non commerciale-Non opere derivate 2.5 Italia. Per leggere una copia della licenza visita il sito web <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/it/> o spedisci una lettera a Creative Commons, 171 Second Street, Suite 300, San Francisco, California, 94105, USA.



**XXIII Congresso Nazionale S.I.D.I.L.V., Isola delle Femmine, Palermo
15-17 Ottobre 2025**

