

# 1. Introduzione

## 1.1 Le malattie a trasmissione sessuale

Le STDs comprendono malattie acute e/o croniche causate da agenti infettanti (batteri, virus, protozoi, funghi, ectoparassiti) acquisiti principalmente attraverso i rapporti sessuali. Il contagio avviene tramite il contatto con epitelio cutanei o mucosi infetti e/o fluidi organici infetti (saliva, sperma, secreto vaginale). Molte STDs sono trasmesse, inoltre, dalla madre al figlio per via transplacentare, durante il passaggio attraverso il canale del parto o durante l'allattamento. L'OMS dà una stima di circa un milione di nuovi casi al giorno, più di 340 milioni all'anno, dei quali il 75-85% nei Paesi in via di sviluppo (Mayaud e Mabey, 2004). Ricostruire la reale epidemiologia delle STDs è, tuttavia, assai difficile, essendo poche le malattie notificabili e spesso queste non sono riportate alle autorità competenti (Da Ros e Schmitt, 2008). Alla sottostima concorre anche il fatto che alcune STDs possono decorrere in maniera asintomatica o paucisintomatica, così da non poter essere correttamente diagnosticate e controllate, anche i sistemi di sorveglianza risultano inadeguati, soprattutto nei Paesi in via di sviluppo (Da Ros e Schmitt, 2008; Mayaud e Mabey, 2004). Le STDs rappresentano un grande problema sociale sia per gli elevati costi che esse richiedono, ma anche perché gli individui più giovani (15-24 anni), che costituiscono il 25% della popolazione sessualmente attiva, sono responsabili di circa il 50% delle trasmissioni (Chesson et al., 2004; Da Ros e Schmitt, 2008; Tilson et al., 2004). Sia le STDs ulcerative che quelle infiammatorie possono aumentare il rischio di trasmissione dell'HIV. Nel primo caso ciò può essere dovuto alla rottura della normale barriera epiteliale, oltre che all'accumulo nel sito infiammato di linfociti T CD4<sup>+</sup>, target dell'infezione da HIV (Risbud, 2005). L'acquisizione di una malattia sessualmente trasmessa può portare gravi conseguenze agli apparati riproduttivi maschile e femminile, come sterilità,

malattia infiammatoria pelvica e cancro ano-genitale (Tilson et al., 2004). Le donne sembrano essere biologicamente più suscettibili e in esse le conseguenze si manifestano maggiormente e in maniera peggiore, con rischi in gravidanza e per il nascituro (Mitsui e Tsukahara, 2009; Mullick et al., 2005; (Risbud, 2005). Con l'avvento degli antibiotici, negli anni '50, si è assistito ad una diminuzione delle STDs batteriche classiche (sifilide, gonorrea) nei Paesi industrializzati, pur rimanendo alto il tasso di incidenza nelle frange più povere della popolazione e nei Paesi in via di sviluppo, a causa degli elevati costi delle terapie (Barrow et al., 2008; Newman e Berman, 2008). Al contrario sono comparse STDs di nuovo interesse epidemiologico a partire dagli anni '70, come le infezioni da *Chlamydia trachomatis* e da HSV e più recentemente le infezioni da Papillomavirus (HPV), l'AIDS e l'epatite B. L'infezione da HSV e in particolare l'herpes genitale, che costituisce il 10% dei nuovi casi di STDs, è una delle più importanti a livello sociale, a causa dell'elevata prevalenza nella popolazione e nel singolo individuo, dove non può essere completamente eradicata una volta acquisita e può causare problemi anche gravi.

## 1.2 Classificazione

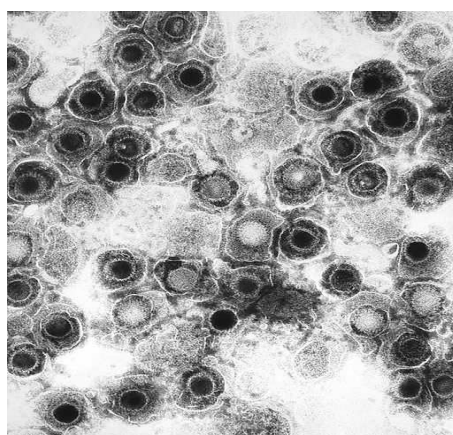


Figura 1.1: immagine di virioni di HSV ottenuta mediante microscopia elettronica a trasmissione

Da: [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d0/Herpes\\_simplex\\_virions\\_TEM.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d0/Herpes_simplex_virions_TEM.jpg)

HSV (Figura 1.1) appartiene alla famiglia *Herpesviridae*, che comprende tre sottofamiglie: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*. I generi di ciascuna sottofamiglia, oltre a similarità genetiche, condividono target cellulare e sedi di latenza. Alla prima famiglia appartengono i generi *Simplexvirus*, di cui fanno parte le specie HSV-1 e HSV-2, e *Varicellavirus*, di cui fa parte il varicella-zoster virus (VZV). Nella famiglia *Betaherpesviridae* sono presenti i generi *Cytomegalovirus*, che comprende il Citomegalovirus (CMV) e *Roseolovirus*, con le specie virus erpetico umano di tipo 6 (HHV-6) e virus erpetico umano di tipo 7 (HHV-7). Nella terza famiglia si trovano i generi *Lymphocryptovirus*, di cui fa parte il virus di Epstein-Barr (EBV) e *Rhodinovirus*, con la specie virus erpetico umano di tipo 8 (HHV-8). Il target cellulare dei *Simplexvirus* è rappresentato dalle cellule muco-cutanee e le sedi di latenza sono i gangli dei nervi sensitivi.

### 1.3 Morfologia

HSV è un virus a DNA lineare e a doppio filamento di circa 150 Kb e dimensioni tra i 150 e i 200 nm. Presenta un pericapside contenente fosfolipidi, glicoproteine di derivazione cellulare e 11 glicoproteine virali. Il capside a simmetria icosaedrica è costituito da 162 capsomeri, tra capside e pericapside si trova il tegumento, di natura proteica (Figura 1.2).

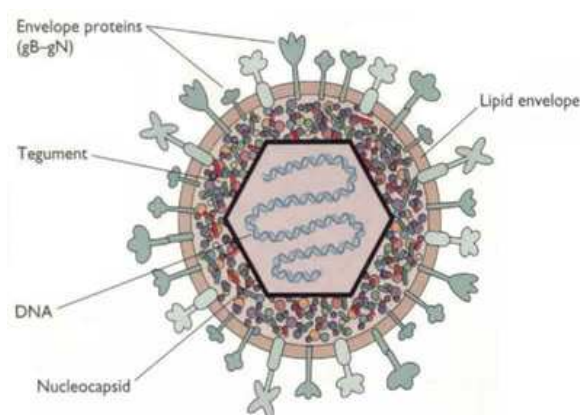


Figura 1.2: struttura schematica di HSV

Da: <http://www.healthoma.com/vaccine-brings-some-relief-for-shingles-sufferers/>, modificato

Il DNA è costituito da due componenti legate covalentemente, una più lunga, L, una più corta S, ciascuna costituita da una sequenza unica U fiancheggiata da sequenze ripetute invertite. A seconda di come le due componenti si dispongono l'una rispetto all'altra, si possono distinguere quattro isomeri. Ciascun virione contiene uno solo di questi isomeri ed è ugualmente infettante.

## 1.4 Ciclo di replicazione

L'adsorbimento di HSV sulle cellule epiteliali è dovuto al legame della glicoproteina B (gB) e/o della glicoproteina C (gC) dell'*envelope* virale all'eparansolfato o a glicosamminoglicani correlati presenti sulla superficie cellulare (Figura 1.3).

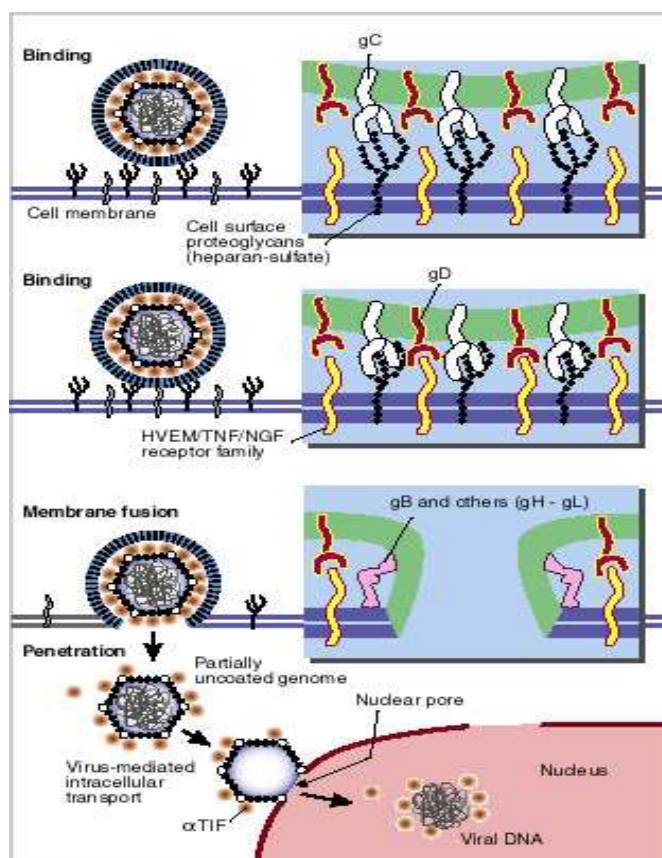


Figura 1.3: adsorbimento e meccanismo di ingresso di HSV nella cellula

Da: <http://darwin.bio.uci.edu/~faculty/wagner/hsv4f.html>, modificata

Per garantire l'entrata del virus nella cellula è inoltre necessaria l'interazione della glicoproteina D (gD) con un altro recettore cellulare, che può essere il mediatore dell'entrata del virus erpetico (HVEM), appartenente alla famiglia del recettore del fattore di necrosi tumorale. Altri possibili recettori sono: la nectina-1, la nectina-2, una molecola di adesione cellulare della superfamiglia delle immunoglobuline o siti sull'eparansolfato generati dalla 3-O-solfotransferasi (3-O-S-HS) (Figura 1.3). Il legame di gD con uno di questi recettori induce cambiamenti conformazionali nella glicoproteina che sembrano portare all'attivazione del trimero gB e/o dell'eterodimero costituito dalla glicoproteina H (gH) e dalla glicoproteina L (gL), coinvolti nell'attività fusogena (Spear, 2004; Taylor et al., 2007). Recenti studi hanno evidenziato come HSV possa entrare per endocitosi in alcuni tipi cellulari e venga quindi rilasciato nel citosol mediante fusione con il compartimento endosomiale (Clement et al., 2006; Nicola e Straus, 2004). Il capside penetrato nel citosol viene trasportato ai pori nucleari mediante i microtubuli e il genoma viene così rilasciato nel nucleoplasma (Dohner et al., 2006). La proteina del tegumento VP-16 (o  $\alpha$ -TIF), interagendo con specifici fattori di trascrizione cellulari a livello di siti *enhancer* del genoma virale, dà inizio alla trascrizione degli RNA-messaggeri (mRNA) virali (Thompson et al., 2009), che avviene ad opera della RNA polimerasi II cellulare. Vengono quindi trascritti gli *immediate-early* mRNA (IE) o  $\alpha$ -mRNA, che vengono poi tradotti nel citosol nelle rispettive proteine. Queste sono proteine regolatrici che, da una parte, inibiscono la trascrizione degli  $\alpha$ -mRNA, dall'altra promuovono la trascrizione degli *early* mRNA (E) o  $\beta$ -mRNA. Le proteine E comprendono sia ulteriori proteine regolatrici coinvolte nell'attivazione della replicazione del DNA virale (DNA polimerasi, timidina chinasi, complesso primasi-elicasi e ulteriori proteine che legano il DNA), sia fattori di trascrizione che promuovono la trascrizione dei *late* mRNA (L) o  $\gamma$ -mRNA. Le proteine L e alcune proteine E sono definite strutturali, poichè vengono assemblate nel

nucleo per formare i procapsidi vuoti, o glicosilate nel citosol per andare a far parte dell'*envelope*. La replicazione del DNA virale avviene in una prima fase come molecola circolare e successivamente mediante un meccanismo a cerchio rotante, che permette la formazione di concatameri, tagliati e incorporati nei procapsidi sempre a livello nucleare. Sono stati proposti due possibili meccanismi per l'acquisizione dell'*envelope* da parte di HSV. Secondo un primo modello il virus acquisterebbe l'*envelope* dalla membrana nucleare interna, quindi, data la continuità luminale tra spazio perinucleare e reticolo endoplasmatico, raggiungerebbe il Golgi e successivamente la membrana plasmatica mediante trasporto vescicolare (Hofemeister e O'Hare, 2008). L'altro modello prevede la perdita dell'*envelope* appena acquisito mediante fusione di questo con la membrana nucleare esterna, il capsido nudo raggiunge quindi il Golgi, in cui l'*envelope* viene recuperato nuovamente (Remillard-Labrosse et al., 2006). Il virus esce dalla cellula per esocitosi, lisi cellulare, o tramite ponti citoplasmatici che si creano tra cellule vicine ad opera di glicoproteine virali ad attività fusogena localizzate sulle membrane plasmatiche. La cellula che replica produttivamente il virus va quindi incontro a lisi, anche in conseguenza del blocco della sintesi cellulare, che avviene a tre-cinque ore dall'infezione, dell'aumento della permeabilità della membrana plasmatica e della formazione di corpi inclusi a livello nucleare.

## 1.5 Patogenesi

Il virus, acquisito mediante intimo contatto con pelle o mucose infette, si replica inizialmente nell'epitelio muco-cutaneo del sito di inoculo. Da qui l'infezione può eventualmente disseminarsi o, come avviene generalmente nei soggetti immunocompetenti, può rimanere localizzata ed essere autolimitante. HSV non viene però eliminato dall'organismo, ma persiste mediante elusione del sistema immunitario attraverso l'inibizione della presentazione dell'antigene da parte del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I

e II (MHC-I e II), la produzione di fattori che inibiscono l'apoptosi nelle cellule infette ed il blocco di alcuni fattori del complemento (Han et al., 2007). Dal sito di ingresso HSV migra in genere verso le terminazioni nervose dei neuroni sensitivi che innervano l'epitelio e, mediante trasporto retrogrado lungo gli assoni, raggiunge i gangli sensitivi (Figura 1.4).

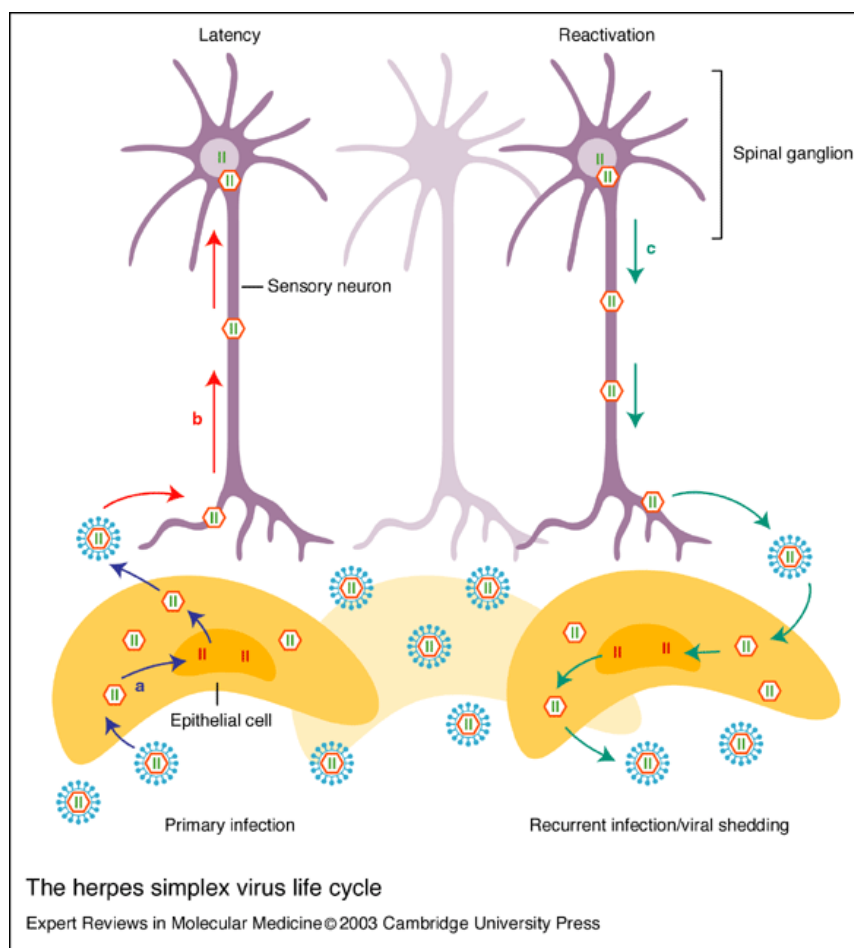


Figura 1.4: Meccanismo di infezione primaria, ricorrente e latenza

Da:

[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM5\\_29/S1462399403006975sup002.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM5_29/S1462399403006975sup002.htm), modificato

In particolare HSV-1 si va a localizzare prevalentemente a livello del trigemino e HSV-2 del ganglio lombosacrale (Anzivino et al., 2009). Dopo una breve replicazione nei neuroni il virus va in latenza, ovvero viene mantenuto in uno stato di quiescenza, in cui il suo genoma rimane in forma episomiale e gli unici mRNA prodotti sono i trascritti associati alla latenza

(LAT) (Giordani et al., 2008). In seguito a stress ormonali o ambientali il virus si può riattivare: dopo una breve replicazione, migra nuovamente lungo gli assoni dei neuroni sensitivi dirigendosi verso le terminazioni nervose e raggiungendo la sede dell'infezione primaria o sedi vicine, dando origine ad un'infezione ricorrente (Figura 1.4).

## **1.6 Patologie da HSV**

L'infezione da HSV può essere asintomatica o può dare luogo ad una serie di manifestazioni cliniche la cui gravità dipende dalla sede di infezione e da fattori diversi dell'ospite. Nel caso dell'herpes genitale, l'infezione sintomatica, dopo un periodo di incubazione di 2-20 giorni, può essere preceduta da prodromi, quali prurito, bruciore e dolore localizzato (Martin et al., 2009). Entro le successive 24 ore compaiono vescicole, in genere a grappolo e dolorose, che si ulcerano e formano croste senza lasciare cicatrici, talvolta associate a linfadenopatia. Generalmente nei soggetti immunocompetenti l'infezione primaria può durare fino a 21 giorni. Gli episodi ricorrenti possono avvenire con una media di circa 4 all'anno e sono in genere meno severi e di minor durata rispetto all'infezione primaria (Beauman, 2005). In genere nella donna le lesioni sono localizzate nei genitali esterni e nella cervice uterina, nell'uomo a livello del glande e del pene. In entrambi i sessi possono tuttavia essere osservate lesioni anche a livello della parte interna della coscia, dei glutei e della cute perianale (Beauman, 2005). Talvolta la patologia può essere associata a sintomi sistemici come febbre, mal di testa, mialgia, ritenzione urinaria e, occasionalmente, meningite. Quest'ultima ha una maggior prevalenza nel sesso femminile (Fatahzadeh e Schwartz, 2007). Nelle infezioni più importanti si può avere radiculite, una forma di ipersensibilità cutanea dovuta a un danno ai nervi periferici.

In presenza di herpes genitale l'individuo può essere maggiormente suscettibile ad infezioni secondarie sia batteriche che virali. Diversi studi



hanno dimostrato un aumentato rischio di contrarre l'AIDS (Celum et al., 2004; Freeman et al., 2006; Risbud, 2005) per l'accumulo di linfociti T CD4<sup>+</sup> a livello delle lesioni erpetiche (Sen e Barton, 2007). HSV inoltre può aumentare l'attività trascrittiva di HIV e ciò spiegherebbe gli elevati livelli di RNA di quest'ultimo nelle lesioni erpetiche e nel plasma, oltre all'elevata infettività di HIV nei soggetti infettati da entrambi i virus. L'infezione da HIV invece aumenterebbe il rilascio di HSV a livello delle mucose (Abu-Raddad et al., 2008). In considerazione di ciò ed in conseguenza dell'elevata diffusione, HSV contribuirebbe all'acquisizione di HIV in Paesi in via di sviluppo (§ 1.6).

L'infezione da HSV in gravidanza è spesso associata a manifestazioni più gravi, quali malattia disseminata, epatite, encefalite, trombocitopenia, leucopenia e coagulopatia (Anzivino et al., 2009). In questi casi la mortalità per la gestante è di circa il 50%. Problemi maggiori, però, si hanno nel nascituro (Figura 1.5) che può acquisire l'infezione in utero (5% dei casi), durante il passaggio attraverso il canale del parto (85-90% dei casi) o dopo la nascita (5-10% dei casi) (Handsfield et al., 2005).



Figura 1.5: Neonato con herpes neonatale

Da: <http://www.zambon.es/areasterapeuticas/03mujer/atlas/fichas/7095.htm>

I rischi per il neonato sono più alti e le conseguenze più gravi nell'infezione primaria piuttosto che nelle infezioni ricorrenti (Anzivino et al., 2009).

L'infezione acquisita in utero favorisce l'aborto, o malattie congenite localizzate (lesioni oculari) (Chong et al., 2004), o sistemiche quali danni neurologici, ritardo nella crescita e nello sviluppo psicomotorio (Figura 1.5). Nei casi più gravi possiamo avere infezione disseminata, quasi sempre mortale, o encefalite erpetica (Kimberlin D., 2004). Quest'ultima può lasciare gravi danni neurologici in coloro che sopravvivono, poiché si ha un interessamento globale dell'encefalo con gravi alterazioni tissutali, a causa dell'effetto sinciziogeno del virus (Figura 1.6). Nei soggetti immunodepressi, rispetto a quelli immunocompetenti, le lesioni sono in genere più estese, più dolorose, maggiormente persistenti e resistenti alle terapie (Martin et al., 2009). In soggetti HIV positivi, ad esempio, possono essere riscontrati noduli verrucosi dolorosi, a cui si accompagnano linfadenopatia, ritenzione urinaria e costipazione (Nadal et al., 2005; Simonsen et al., 2008). Si può avere, inoltre, una malattia simile alla varicella, che può essere disseminata e coinvolgere più organi (Dinotta et al., 2009).

Una delle più comuni patologie da HSV è l'*herpes labialis*, chiamata anche febbre sorda. Questa è la forma prevalente di infezione oro-facciale ricorrente (Arduino e Porter, 2008) ed è caratterizzata da vescicole a grappolo a livello delle labbra o ai lati della bocca che permane per circa due settimane. La comparsa dell'*herpes labialis* è preceduta da prodromi, come prurito, bruciore, dolore nel sito della lesione, dovuti alla replicazione del virus nelle terminazioni nervose sensitive innervanti i dermatomi muco-cutanei (Fatahzadeh and Schwartz, 2007). La gengivostomatite primaria colpisce tipicamente i bambini e solo occasionalmente gli adulti. Nella maggior parte dei casi il responsabile è HSV-1, ma può essere dovuta anche ad HSV-2 (Arduino e Porter, 2008). Si manifesta con comparsa di vescicole dolorose e ulceranti sulla mucosa orale. Le gengive appaiono infiammate, eritematose ed edematose. La guarigione avviene in 10-14 giorni.

Una grave complicanza di un'infezione primaria o più raramente di una ricorrente è rappresentata dall'encefalite erpetica dell'adulto (Figura 1.6) che si manifesta quando il virus raggiunge il SNC (Riera-Mestre et al., 2009). La patologia interessa il lobo temporale dell'encefalo (Figura 1.6) e presenta una elevata mortalità se non curata precocemente.

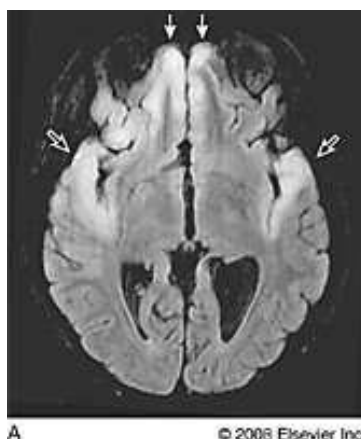


Figura 1.6: risonanza magnetica di un paziente con encefalite erpetica; le frecce indicano le aree di interessamento.

Da: <http://imaging.consult.com/imageSearch?query=lobe&thes=true&resultOffset=81>

## 1.7 Epidemiologia

A causa dell'elevato numero di casi non diagnosticati, malattie atipiche e diffusione asintomatica del virus (Paz-Bailey et al., 2008), l'herpes genitale è un'infezione diffusa e altamente prevalente sia nei paesi industrializzati che in quelli in via di sviluppo (Figure 1.7a e 1.7b). L'uomo è l'unico *reservoir*, non sono stati trovati vettori animali per la trasmissione delle infezioni erpetiche umane (Kimberlin DW., 2004), infatti per la trasmissione del virus occorre un intimo contatto tra individuo suscettibile ed individuo infetto (Kimberlin DW., 2004). I due sierotipi, HSV-1 e HSV-2, oltre che da un punto di vista sierologico, sono comunemente distinti anche in base al sito di infezione, essendo HSV-1 responsabile prevalentemente di infezioni oro-facciali e HSV-2 di infezioni genitali (Beauman, 2005). Il primo viene generalmente acquisito nell'infanzia, il secondo in età più avanzata, in corrispondenza con l'inizio dell'attività sessuale. Ad oggi però, a causa del cambiamento nelle

abitudini sessuali, questa distinzione non è più così netta, infatti HSV-1 può essere responsabile anche di infezioni genitali e HSV-2 di infezioni oro-facciali (Arduino e Porter, 2008). Per quanto riguarda l'herpes genitale sembra che HSV-2 sia maggiormente responsabile di casi ricorrenti (Fatahzadeh and Schwartz, 2007). HSV-1, che ha una prevalenza mondiale molto elevata (45-98%) (Fatazadeh e Schwartz, 2007) (Figura 1.7a) sembra responsabile di circa la metà dei nuovi casi di herpes genitale nei Paesi industrializzati (Gupta et al., 2007; Kawana, 2009). Nei Paesi in via di sviluppo e nelle minoranze etniche invece, dove l'infezione è contratta molto precocemente, la trasmissione di herpes genitale da sierotipo 1 è più bassa (Xu et al., 2006). L'herpes genitale da HSV-1 ha sintomi meno severi ed è ridotta la frequenza delle ricorrenze rispetto all'herpes genitale da HSV-2 (Holub et al., 2008; Sen e Barton, 2007).

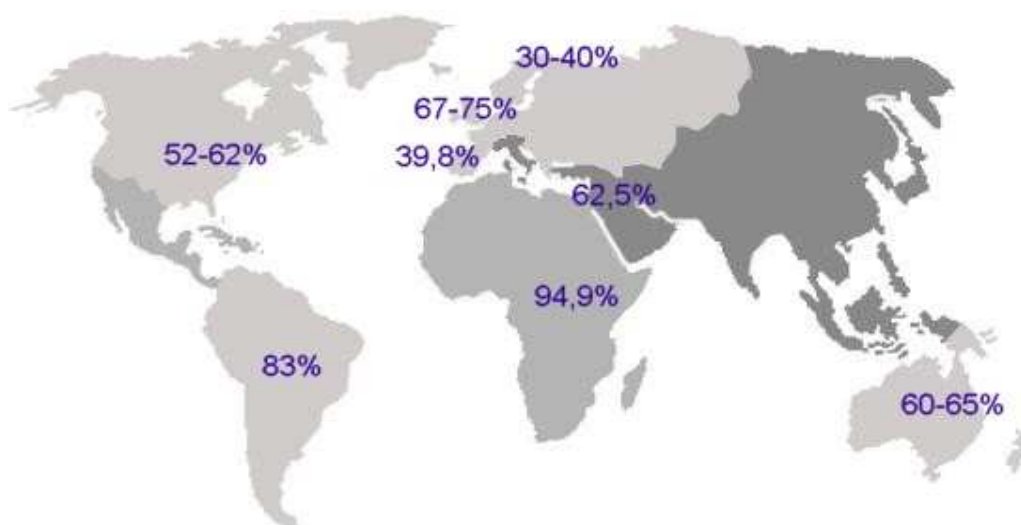


Figura 1.7a: Prevalenza di infezione da HSV-1 nel mondo

Da: <http://igiene.unipa.it/sezioneigiene/Herpes.ppt>, modificato

Per quanto riguarda HSV-2 il più alto tasso di prevalenza si ha nell'Africa sub-Sahariana (intorno al 70%), mentre il più basso in Europa occidentale (13-18%) (Looker et al., 2008). In Italia si aggira intorno al 5-7% (Figura 1.7b) ed è in genere più prevalente tra le donne (Anzivino et al., 2009).



Figura 1.7b: Prevalenza di infezione da HSV-2 nel mondo

Da: <http://igiene.unipa.it/sezioneigiene/Herpes.ppt>, modificato

## 1.8 Terapia

Il farmaco antierpetico di prima scelta è la guanosina aciclica, o Acyclovir. Ha una struttura simile alla guanosina, ma la molecola di zucchero è sostituita da una struttura a catena aperta (Figura 1.8).

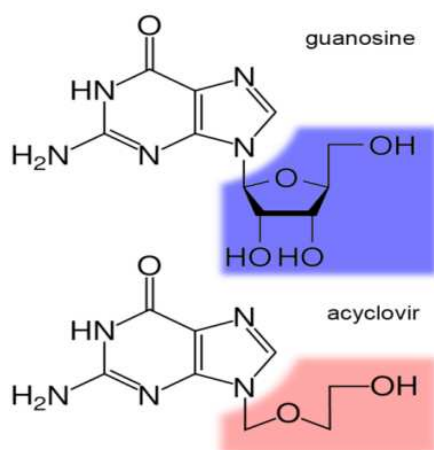


Figura 1.8: Guanosina e acyclovir a confronto

Da: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Guanosine-acyclovir-comparison.png>, modificato

Viene somministrato per via orale ed è attivo solo nelle cellule infette dove, una volta entrato, viene fosforilato in acyclo-guanosina monofosfato dalla timidina chinasi erpetica ed è successivamente convertito in trifosfato dalle

chinasi cellulari. In questa forma agisce inibendo la DNA polimerasi virale e cellulare comportandosi da terminatore di catena (Ziyaeyan et al., 2007), perché una volta aggiunto alla catena polinucleotidica nascente blocca l'ulteriore attacco di nucleotidi alla stessa, a causa della struttura aperta e aciclica (Figura 1.9). Poiché l'attivazione per fosforilazione avviene solo ad opera della timidina chinasi erpetica, l'acyclovir è attivo solo nelle cellule infette.

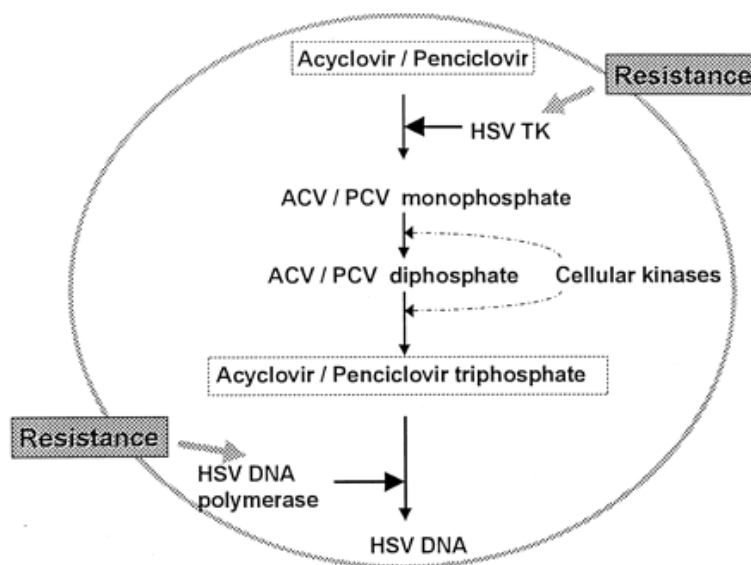


Figura 1.9: meccanismo di azione di acyclovir e derivati

Da: <http://www.herpex-device-that-works.com/acyclovir.html>, modificato

Altro analogo guanosinico efficace è il penciclovir, che ha una emivita più lunga e una più alta concentrazione cellulare. Agisce con lo stesso meccanismo, ma la sua azione è meno potente dell'acyclovir. Fanciclovir, ovvero l'estere diacetilico di penciclovir, è utilizzato principalmente nella cura dell'herpes oro-labiale nei soggetti immunocompromessi (Fatahzadeh e Schwartz, 2007). L'estere valinico di acyclovir, valacyclovir, viene metabolizzato in acyclovir e valina nel fegato e nell'intestino, ha una maggiore biodisponibilità ed è stato approvato nel trattamento dell'*herpes labialis* (Arduino e Porter, 2008). Questi quattro farmaci possono ridurre la diffusione di HSV, oltre che la severità e la durata dei sintomi dell'herpes

genitale primario. Se somministrati nella fase prodromica possono impedire lo sviluppo delle lesioni o comunque favorirne una rapida guarigione (Fatahzadeh e Schwartz, 2007). L'herpes neonatale, sia sospetto che diagnosticato, richiede il trattamento con acyclovir per via endovenosa e in tempi rapidi, specialmente in caso di malattia disseminata o encefalite. Sembra che questa terapia sia efficace, tuttavia esiste sempre un certo rischio di letalità e morbidità, perché acyclovir può sopprimere ma non eradicare il virus (Anzivino et al., 2009).

Già fin dai primi trial clinici con acyclovir (è stato introdotto nel 1983) sono state dimostrate delle resistenze. Ceppi di HSV acyclovir-resistenti compaiono soprattutto nei soggetti immunocompromessi, come i malati di AIDS (Lolis et al., 2008). Ciò può essere dovuto sia all'uso estensivo del farmaco e dei suoi derivati nella profilassi e nel trattamento delle infezioni ricorrenti (Danve-Szatanek et al., 2004; Ziyaeyan et al., 2007), sia al deficit linfocitario conseguente all'infezione da HIV (Levin et al., 2004). Nel 95% dei casi la resistenza è dovuta a mutazioni nel gene della timidina chinasi (Frobert et al., 2007), che ne possono impedire la funzionalità visto che questo enzima non è essenziale per la replicazione virale (Chibo et al., 2004). Meno frequenti sono invece le mutazioni a livello della DNA polimerasi virale (Chibo et al., 2004).

## **1.9 Vaccini contro HSV**

Data la diffusione dell'infezione e la ridotta efficacia della terapia, nasce l'esigenza di un vaccino efficace contro l'instaurarsi dell'infezione, piuttosto che l'insorgenza della malattia. Infatti prevenendo i sintomi c'è il rischio che aumenti il *reservoir* di individui con infezioni asintomatiche e quindi in grado di trasmettere il virus, a discapito dei soggetti non vaccinati (Stanberry, 2004). A tal proposito sono stati fatti numerosi tentativi resi poco efficaci dal fatto che il tipo di risposta immunitaria attiva contro l'infezione erpetica è la

cellulo-mediata (Aurelian, 2004; Johnson et al., 2008). I vaccini possono essere distinti in inattivati e vivi. Tra i primi troviamo vaccini a virus interi inattivati con formalina, con raggi UV, con fenolo o con calore. Lo scarso successo di questi è dovuto all'incapacità di indurre risposta cellulo-mediata (Rupp et al., 2005). Per questo gli studi si sono successivamente concentrati su componenti del virione, in particolare le glicoproteine (gE, gB, gD, gC), perché situate sulla superficie virale ed altamente immunogeniche. Con la tecnologia del DNA ricombinante è possibile prepararne grandi quantità senza la presenza di contaminanti, amplificando e clonando il gene di interesse in un vettore. Due sperimentazioni sono state effettuate utilizzando preparati con le glicoproteine gD2 e gB2 e opportuni adiuvanti per aumentare la risposta immunitaria, tuttavia la protezione si è rivelata transiente o parziale (Jones e Cunningham, 2004; Stanberry, 2004).

I vaccini a virus vivo, essendo capaci di una limitata replicazione in vivo, sono in grado di indurre una più ampia e duratura risposta sia umorale che cellulo-mediata, sono tuttavia meno sicuri di quelli inattivati perché possono stabilire latenza e successivamente riattivarsi; altro problema è rappresentato da una possibile ricombinazione con il virus *wild-type* o una reversione al fenotipo patogeno (Rupp et al., 2005). I primi vaccini attenuati sono stati prodotti mediante passaggi seriali di virus virulenti in colture cellulari, ma si sono rivelati geneticamente instabili. Gli esperimenti successivi si sono concentrati sulla delezione di uno o più geni, producendo ceppi difettivi nella replicazione o replicazione competenti, ma meno virulenti. Il problema legato ai primi è la difficoltà nel produrne grandi quantità. Un esempio è fornito dai *disabled infectious single-cycle virus* (DISC), mancanti di un gene essenziale, perciò prodotti in colture cellulari opportunamente ingegnerizzate per fornire la proteina mancante (Stanberry, 2004). Il virus ottenuto può dar luogo ad un solo ciclo di replicazione, risultando più sicuro, tuttavia negli esperimenti finora effettuati non si è dimostrato in grado di fornire una buona protezione.



Tra i virus replicazione competenti sono stati sperimentati ceppi di HSV-1 difettivi per geni non essenziali come  $\gamma_134.5$ , un gene che dà neurovirulenza e ceppi mutanti per la timidina chinasi (Brittle et al., 2008; Stanberry, 2004). Sono in corso le preparazioni di un ceppo di HSV-1 con delezione a livello del gene che codifica per gE (Brittle et al., 2008) e di un ceppo con una mutazione a livello del gene che codifica per gD (Awasthi et al., 2008). Ad oggi non si è andati oltre il modello animale, perché, oltre ai problemi già citati, questi vaccini possono presentare anche un'eccessiva attenuazione e quindi essere poco immunogenici (Rupp et al., 2005).

Un approccio profilattico innovativo è, invece, rappresentato dai vaccini vivi costituiti da vettori ricombinanti, ovvero da virus attivi o batteri vivi, non patogeni o resi non patogeni, ingegnerizzati in modo da veicolare uno o più geni di HSV, codificanti per proteine immunogene. Una volta inoculati nell'ospite, tali geni vengono espressi, inducendo la risposta immunitaria (Rupp et al., 2005). Questi vaccini mantengono i vantaggi dei vaccini vivi ma con rischi minori, inoltre in modelli animali hanno mostrato la capacità di indurre una risposta HSV-specifica, di proteggere dalla malattia (Rupp et al., 2005) e di prevenire la latenza (Jones e Cunningham, 2004). Sono in corso numerose sperimentazioni con vettori batterici, come *Salmonella*, *Yersinia pestis* (Macmillan et al., 2007) e vettori virali, come adenovirus, virus vaccinico, VZV (Jones e Cunningham, 2004) e vettori lentivirali.

## **1.10 I vettori virali**

I virus hanno una connaturata capacità di trasferire il loro materiale genetico all'interno della cellula bersaglio. Sfruttando questa loro proprietà è possibile eliminare la loro patogenicità e, mantenendo l'efficienza di trasferimento genico e di espressione genica, creare dei vettori virali in grado di veicolare geni terapeutici in cellule target specifiche. L'espressione di tali geni in cellule target (trasduzione) ha permesso il loro impiego nella terapia genica e

nella vaccinazione. A differenza dei vettori non virali (costituiti di solito da complessi DNA-lipide o DNA-polimero) che, pur offrendo maggior sicurezza, risultano meno efficienti nel trasferimento genico (Schaffer et al., 2008), sono stati sviluppati diversi tipi di vettori virali, ognuno con i propri vantaggi e svantaggi, per questo non esiste un unico vettore adatto a tutte le applicazioni. I vettori oncoretrovirali e lentivirali integrano il loro genoma in quello della cellula ospite, per cui possono essere utilizzati per trasdurre in maniera più duratura anche cellule in attiva proliferazione. Vettori adenovirali, adeno-associati, HSV-derivati non sono in grado di integrarsi, ma rimangono in forma episomiale, consentendo un'espressione transiente, creando però meno problemi di mutagenesi inserzionale. Le principali classi di vettori oggi utilizzati sono: gli adenovirali, adenoassociati, HSV-derivati, retrovirali e lentivirali.

### **1.10.1 I vettori adenovirali**

Gli Adenovirus sono appartenenti alla famiglia *Adenoviridae*, hanno un DNA a doppio filamento lineare, di circa 36 kb e sono privi di pericapside. Esistono circa 50 sierotipi di Adenovirus umani, i più usati per produrre i vettori sono il sierotipo 2 e 5 (Campos e Barry, 2007). Questi sierotipi sono i più prevalenti nella popolazione, per cui un limite nell'utilizzo dei vettori da essi derivati è l'immunità pre-esistente. Ciò ha portato allo sviluppo di più generazioni di vettori adenovirali. I vettori di prima generazione (Figura 1.10b), sono stati prodotti inserendo il gene terapeutico al posto della regione precoce 1 (E1), che codifica per proteine necessarie per l'espressione della regione E2 e di altri geni richiesti per la replicazione virale. Questo tipo di vettori, però, non essendo replicazione competente, ha richiesto lo sviluppo di linee cellulari che forniscano in *trans* la funzione mancante (Jozkowicz e Dulak, 2005). Altra regione che può essere deleta è E3, che, codificando per proteine non essenziali per la replicazione virale, permette la produzione di

vettori senza l'utilizzo di cellule ausiliari. La risposta immune indotta e in particolare la distruzione delle cellule trasdotte da parte dei linfociti T CD8<sup>+</sup>, ha evidenziato una capacità residua di questi vettori di esprimere geni virali precoci e tardivi (Campos e Barry, 2007). Per risolvere questo problema sono stati sviluppati vettori di seconda generazione che presentano ulteriori delezioni a livello della regione E2 e/o E4, ma senza miglioramenti per quanto riguarda la tossicità. Infine è stata prodotta una terza generazione di vettori, chiamati “*gutless*” o “*helper-dependent*” (Figura 1.10c), i quali mancano di tutti i geni virali. Essi contengono solo le sequenze ripetute invertite presenti alle due estremità del genoma con funzioni regolatorie, il gene terapeutico e il segnale di *packaging*, che permette al genoma di essere correttamente impacchettato nei capsidi virali (Campos e Barry, 2007).

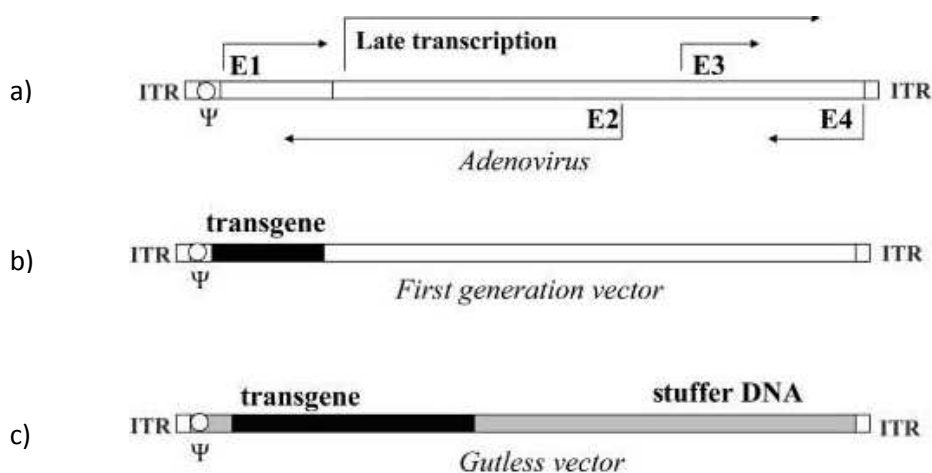


Figura 1.10: a) genoma di Adenovirus *wild-type*, b) vettore di prima generazione e c) vettore “*gutless*” a confronto

Da (Jozkowicz e Dulak, 2005), modificato

Per la loro produzione occorrono adenovirus *helper* cotrasfettanti nelle stesse cellule e contenenti tutti i geni adenovirali mancanti eccetto il segnale di *packaging*. A parte le difficoltà nell’ottenere il vettore puro senza una minima contaminazione da parte dell’*helper* (Alba et al., 2005), studi su animali hanno evidenziato l’induzione di una risposta immune, nonostante l’assenza di geni virali. Questo ha dimostrato che tale risposta non è tanto innescata dall’espressione di proteine virali, quanto piuttosto da molecole capsidiche del

vettore stesso, responsabili anche della sua tossicità (Bangari e Mittal, 2006). I vettori adenovirali, inoltre, pur essendo efficienti nel trasferimento genico e capaci di trasdurre sia cellule quiescenti che in replicazione, non consentono un'espressione genica duratura nelle cellule target, anche perché il loro genoma rimane in forma episomiale (Jozkowicz e Dulak, 2005).

### 1.10.2 I vettori derivati dai virus adeno-associati (AAV)

I virus adeno-associati sono piccoli virus, appartenenti alla famiglia *Parvoviridae*, con acido nucleico costituito da DNA a singolo filamento e polarità positiva o negativa. Sono state isolate, da tessuti umani e non, più di cento varianti, distinte sierologicamente o tramite variazioni nella sequenza del DNA (Flotte, 2005), tra queste il sierotipo umano AAV2 è quello maggiormente studiato e utilizzato nella produzione dei vettori (Hildinger e Auricchio, 2004). Il genoma è costituito da sequenze ripetute invertite terminali (ITR) alle due estremità e da due geni: *rep* e *cap* (Figura 1.11a).

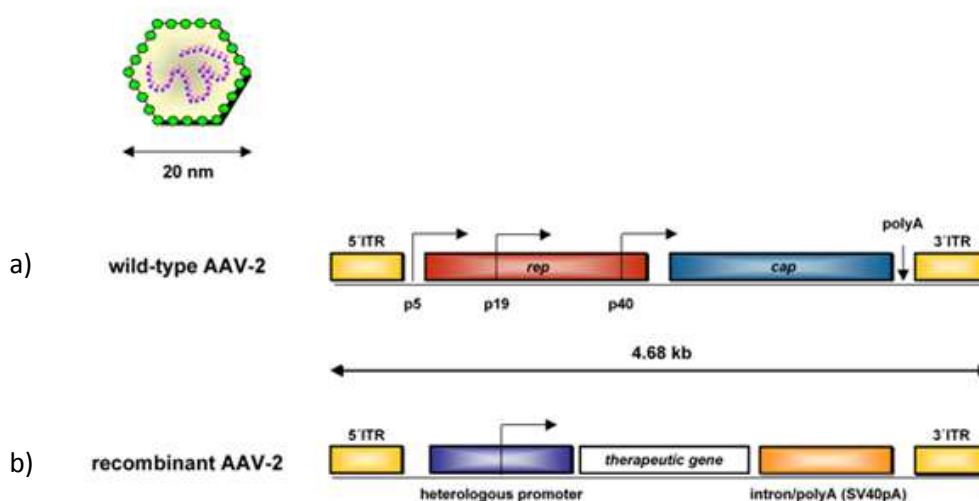


Figura 1.11: a) AAV2 *wild-type* e b) vettore AAV2 derivato a confronto

Da: <http://www.genetherapyreview.com/images/stories/AAV.jpg>, modificato

Il gene *rep* codifica per proteine coinvolte nella replicazione del DNA virale, il gene *cap* codifica per proteine strutturali. Gli AAV non sono in grado di dare luogo ad una infezione litica, se non interviene un virus *helper*,

adenovirus o herpes virus, che superinfetti la stessa cellula e complementi il genoma di AAV, consentendone l'escissione dal sito di integrazione. In assenza di virus *helper*, AAV, infatti, si integra nel DNA dell'ospite e nel caso di AAV2 il sito di integrazione è costante ed è stato individuato in una regione del braccio lungo del cromosoma 19 (Hildinger e Auricchio, 2004). Questa caratteristica, oltre al fatto che AAV non è patogeno, ha reso appetibile lo sviluppo di vettori da esso derivati. Per la loro produzione vengono utilizzati due costrutti: il costrutto vettore e un plasmide con le funzioni mancanti. Data la ridotta capacità di impacchettamento di questo virus (che non supera i 4,5 kb), il costrutto vettore contiene solo il gene terapeutico fiancheggiato dalle ITR (Figura 1.11b), mentre i geni *rep* e *cap* vengono veicolati dall'altro plasmide. Le funzioni *helper* vengono fornite da un adenovirus o da un costrutto veicolante i geni adenovirali necessari per il vettore (Goncalves, 2005). A causa della mancanza di *rep*, il vettore prodotto perde la capacità di integrazione sito-specifica e, una volta infettata la cellula ospite, vi rimane in forma episomiale oppure si integra nel suo genoma in maniera *random* (Bouard et al., 2009). Sebbene l'integrazione avvenga con una bassa frequenza, esiste il rischio di una mutagenesi inserzionale (Goncalves, 2005). Dall'ampio utilizzo di questi vettori in esperimenti su varie malattie, tra cui la fibrosi cistica, sono emersi ulteriori limiti (Flotte, 2005). Uno di questi è rappresentato dal fatto che, essendo AAV2 altamente prevalente nella popolazione (intorno all'80%), in soggetti trattati con i vettori derivati si possono sviluppare risposte immuni specifiche contro gli antigeni capsidici, diminuendo di conseguenza l'efficienza di trasduzione ed aumentandone la tossicità (Flotte, 2005; Mingozzi e High, 2007; Zaiss e Muruve, 2008). Inoltre alcuni istotipi cellulari non sono trasducibili, a causa della scarsa presenza dei recettori e corecettori utilizzati dal virus (Flotte, 2005; Muzyczka e Warrington, 2005). La ricerca attuale si sta perciò concentrando su possibili soluzioni, quali l'apporto di modifiche sulle

molecole capsulari di AAV2 o l'impiego di altri sierotipi umani e non (Goncalves, 2005).

### 1.10.3 I vettori HSV derivati

HSV-1 è l'herpes virus più utilizzato in terapia genica. Contiene circa 80 geni, la metà dei quali sono non-essenziali per la replicazione virale e che quindi possono essere deleti, permettendo vettori, in cui inserire DNA eterologo fino a 50 Kb (Goverdhana et al., 2005). Un primo tipo è rappresentato dai vettori replicazione-incompetenti che presentano ulteriori delezioni a livello dei geni IE e che vengono prodotti in linee cellulari che forniscono le funzioni mancanti in *trans*. Gli altri geni virali, a parte il gene eterologo, non vengono espressi e i vettori non risultano, perciò, citotossici (Lachmann, 2004). Un altro modo per produrre vettori HSV-derivati si avvale dell'uso di ampliconi, ovvero plasmidi contenenti l'origine di replicazione di HSV, il segnale di *packaging* e il DNA eterologo. Gli ampliconi vengono trasfettati in linee cellulari opportune, superinfettate successivamente da HSV *helper*, che forniscono in *trans* gli elementi necessari alla loro replicazione e al loro corretto impacchettamento nei vettori. Assieme a questi ultimi si formano, però, anche virus *helper* citotossici, rendendone difficile la purificazione (Lachmann, 2004). Per ridurre al minimo la contaminazione, gli ampliconi possono essere cotrasfettati con genomi di HSV-1, clonati in cromosomi batterici artificiali (BAC) o sottoforma di set di cosmidi (Epstein, 2009). Nei BAC viene eliminato il segnale di *packaging* e deleto un gene essenziale come ICP 27 (fornito in *trans* da un ulteriore plasmide), sostituendolo con del DNA di riempimento (*stuffer*), così che possa raggiungere dimensioni tali da non poter essere impacchettato nei virioni. I cosmidi sono privi del segnale di *packaging*, sono parzialmente sovrapponibili e veicolano frammenti diversi del genoma, in questo modo, una volta all'interno delle cellule trasfettate, mediante ricombinazione omologa ricostituiscono l'intero genoma di HSV,

che, tuttavia, non può essere impacchettato. In questi sistemi permane comunque il rischio di formazione di minime quantità di virus citotossici, per eventi di ricombinazione tra ampliconi e genomi di HSV e le quantità di vettori prodotti sono estremamente basse (Epstein, 2009). I vettori HSV-derivati mantengono la capacità del *wild-type* di migrare per trasporto retrogrado in siti distanti da quello di inoculo e possono persistere in maniera latente a livello neuronale (Berges et al., 2007). Vengono infatti sperimentati in malattie neurologiche come il Parkinson, in tumori cerebrali, neuropatie periferiche e nella cura del dolore cronico (Berges et al., 2007; Fink e Mata, 2008; Goverdhana et al., 2005). La durata di espressione del transgene è però di breve durata, perché questi vettori rimangono in forma episomiale, perché inducono una risposta immune nell'ospite e per l'alta prevalenza di immunità anti-HSV-1 nella popolazione (Goverdhana et al., 2005)

#### **1.10.4 I vettori retrovirali**

I Retrovirus appartengono alla famiglia *Retroviridae*, tre gruppi della quale vengono utilizzati in terapia genica: oncoretrovirus (di cui fa parte il virus della leucemia murina o MLV), spumavirus e lentivirus (come HIV). Hanno un genoma costituito da due molecole identiche di RNA a singolo filamento e a polarità positiva, di 7-11 Kb ciascuna. Queste, una volta introdotte nel citoplasma della cellula infetta, vengono retroscritte in DNA a doppio filamento, ad opera di una trascrittasi inversa (RT) presente nel capsido virale. Al DNA si associano proteine cellulari ed elementi cariofilici, che formano un complesso di preintegrazione (PIC) e che permettono la sua migrazione a livello nucleare, dove si integra nel genoma dell'ospite (Barquinero et al., 2004). In tutti i retrovirus il DNA provirale è costituito da due sequenze *cis*-regolatrici chiamate *long terminal repeats* (LTR), presenti alle due estremità e generate durante il processo di retrotrascrizione. A partire dall'estremità 5' seguono tre *open reading frame* (ORF), *gag*, *pol* e *env*, e geni accessori

specifici per ciascun gruppo. *Gag* codifica per proteine strutturali, *pol* per retrotrascrittasi (RT), integrasi (IN) e proteasi (PR) ed *env* per le glicoproteine di membrana (Pages e Bru, 2004). La semplicità della struttura genomica, con le sequenze *cis*-agenti alle estremità, permette, nello sviluppo dei costrutti vettore, la rimozione di tutti i geni virali e l'inserimento di frammenti di DNA eterologo fino a 8kb (Thomas et al., 2003).

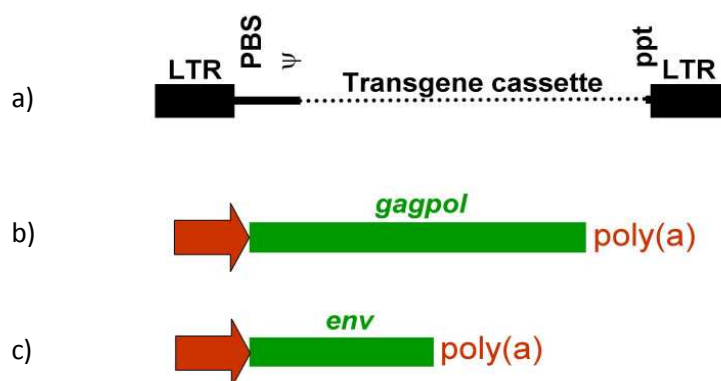


Figura 1.12: Schema dei componenti necessari per la produzione di un vettore retrovirale: a) vettore di trasferimento, b) costruito di *packaging* e c) costruito *env*

Da: <http://www.genetherapyreview.com/viral-vectors/retrovirus.html>, modificato

Questi, cotrasfettando linee cellulari opportune assieme ai plasmidi che forniscono in *trans* le funzioni mancanti, generano i vettori retrovirali (Anson, 2004) (Figure 1.12a,b,c). Da oltre venti anni questi sono i vettori virali più utilizzati. Una delle chiavi dell'enorme successo è data dalla loro capacità di integrarsi nel genoma dell'ospite, permettendo una più duratura espressione del transgene (Barquinero et al., 2004; Goverdhana et al., 2005). Poiché il PIC dei retrovirus non è capace di raggiungere il nucleo quando l'involucro nucleare è intatto, ne consegue che i vettori derivati possano trasdurre solo cellule in divisione al momento della loro entrata (Barquinero et al., 2004). Sono utilizzati, perciò, in esperimenti *ex-vivo*, in cui cellule espianate (linfociti, epatociti, cellule progenitrici della linea ematopoietica) vengono stimulate a replicarsi, trasdotte con i vettori veicolanti il gene di interesse e quindi re-impianate (Aiuti et al., 2009; Barquinero et al., 2004; Emoto et al., 2005; Johnson et al., 2009). Le varie patologie trattate vi sono



immunodeficienze, come la SCID, malattie monogeniche (Barquinero et al., 2004) e tumori (Johnson et al., 2009). Il caso di alcuni pazienti affetti da una forma di SCID e che dopo trattamento con i vettori retrovirali hanno sviluppato disordini linfoproliferativi, ha posto, però, l'accento su uno dei rischi connessi con l'uso di questi vettori, ovvero la mutagenesi inserzionale, dovuta alla loro integrazione in prossimità dei promotori di geni cellulari (De Palma M, 2005).

### **1.10.5 I vettori lentivirali**

I lentivirus rappresentano un genere della famiglia *Retroviridae* che, a differenza degli altri virus della stessa famiglia, sono in grado di infettare anche cellule quiescenti, poiché il loro PIC riesce a penetrare nel nucleo sfruttando un meccanismo di trasporto attivo a livello dei pori nucleari (Pages e Bru, 2004). In questo modo i vettori lentivirali, rispetto agli altri vettori retrovirali, presentano uno spettro d'ospite più esteso, essendosi dimostrati efficienti nel veicolare geni *in vivo* a livello di cervello, retina, fegato, muscolo e a livello delle cellule staminali ematopoietiche che si replicano a lungo termine (Naldini, 1998). Vengono sperimentati in malattie come il Morbo di Parkinson (Lundberg et al., 2008), distrofie muscolari (Muir e Chamberlain, 2009), emoglobinopatie (Jacome et al., 2009; Sadelain et al., 2008) e in immunoterapie anti-tumorali (Breckpot et al., 2007; Zhang et al., 2008). La loro produzione prevede un sistema *split-component*, in cui vengono utilizzati tre costrutti separati per cotrasfettare una determinata linea cellulare: il costrutto vettore, il costrutto di *packaging* e il costrutto necessario per la formazione dell'*envelope*. Questa separazione consente di ridurre il rischio di formazione di ricombinanti, per la quale occorrerebbero ben tre eventi di ricombinazione (Chong et al., 1998; Naldini, 1998). I primi vettori prodotti sono stati quelli HIV-derivati utilizzati per trasdurre inizialmente solo le cellule esprimenti il recettore CD4, ospiti naturali del *wild-type* (Kay et al.,

2001). Un importante passo avanti è stato l'introduzione della pseudotipizzazione. Con questa tecnica è stato possibile estendere il tropismo cellulare dei vettori, mediante sostituzione del gene codificante per l'*envelope* proprio del virus con quello di un altro virus a più ampio spettro d'ospite (Cronin et al., 2005; Johnson et al., 2000). La tendenza nei vettori di terza generazione è quella di aumentare il più possibile il fattore sicurezza, legato alla formazione di virus replicazione competenti. La rimozione dei geni accessori ha consentito il mantenimento nel costrutto vettore di meno del 5% del genoma parentale e nel costrutto di packaging di meno del 25% (Goverdhanan et al., 2005). In questo modo il costrutto vettore risulta essere costituito dal transgene, dalle sequenze LTR, necessarie per la corretta replicazione e integrazione e dal segnale di impacchettamento ( $\psi$ ), che consente la sua incorporazione nel capsido del vettore. Nel costrutto di *packaging*, invece, sono presenti gli elementi *trans*-agenti per la produzione delle proteine strutturali e degli enzimi necessari alla replicazione e integrazione, ovvero i geni *gag* e *pol*. Infine il terzo costrutto contiene i geni che codificano per le glicoproteine costituenti l'*envelope*. Negli ultimi due costrutti manca  $\psi$ , così che non possano essere incorporati nel vettore e non si formino ricombinanti (Kappes e Wu, 2001; Naldini, 1998). Il problema di una mutagenesi inserzionale, dovuta all'integrazione e all'attività promotrice delle LTR, può essere ridotto con l'impiego dei vettori autoinattivanti (SIN), in cui le LTR risultano inattive. I vettori SIN, infatti, vengono costruiti con una delezione nell'LTR in 3' in modo tale che con il processo di retrotrascrizione, la delezione è trasferita anche in quella in 5' (Kappes e Wu, 2001; Kay et al., 2001; Zufferey et al., 1998). Con essi vengono rimossi ulteriori siti di omologia, tuttavia rimane un rischio residuo di ricombinazioni (Kappes e Wu, 2001), che ha indotto la ricerca a concentrarsi anche verso vettori lentivirali derivati da virus non umani, come il virus dell'immunodeficienza felina

(FIV), il virus dell'anemia infettiva equina (EIAV), il virus dell'immunodeficienza della scimmia (SIV).

## 1.11 FIV e i vettori derivati

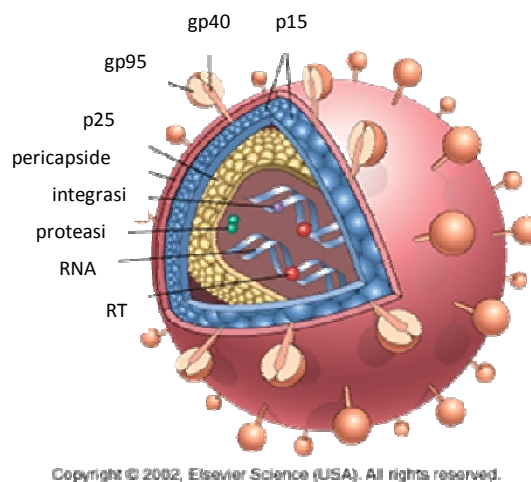


Figura 1.13: Struttura di FIV

FIV (Figura 1.13) appartiene al genere *Lentivirus* della famiglia *Retroviridae*, ha un tropismo cellulare simile a quello di HIV, infettando i linfociti T, ma anche la linea monocito-macrofago-microglia e gli astrociti (Bandinelli et al., 1995). Si trasmette da un gatto all'altro principalmente attraverso le ferite da morso (Matteucci et al., 1993) e causa una malattia simile all'AIDS, che come questa è costituita da più fasi. Dopo una fase acuta di 1-4 settimane con vari sintomi come febbre, linfoadenopatia e anoressia, segue la fase asintomatica che può perdurare alcuni anni, finché non si manifesta la grave immunodeficienza con infezioni secondarie, tumori e anomalie a livello neurologico (Bandinelli et al., 1995; Elder et al., 2008). Il virione maturo ha un diametro di 100-125 nm, è rivestito da un pericapside, costituito da lipidi e da due glicoproteine: la proteina superficiale (SU) o gp95 e la proteina transmembrana (TM) o gp40. SU è coinvolta nel legame con il recettore, in seguito al quale avviene la fusione tra pericapside virale e membrana cellulare, mediata da TM. Al di sotto del pericapside si trova la matrice, composta dalla proteina di matrice (MA) o p15. Il core ha forma conica ed è

costituito dall'antigene del *core* (CA) o p25. All'interno si trova il nucleocapside con due molecole identiche di RNA a singolo filamento e polarità positiva, la proteina nucleocapsidica (NC) o p10 e alcune molecole di RT, IN, dUTPasi (DU) e PR. Il genoma ha una lunghezza di circa 9400 nucleotidi. Come negli altri lentivirus, alle due estremità del DNA provirale si trovano le LTR, formate dalle regioni *unique 3'* (U3), *repeat* (R) e *unique 5'* (U5), generate nell'evento di retrotrascrizione. In questo processo infatti, a causa dei salti dell'RT durante la sintesi dei due filamenti di DNA, U5 viene rigenerata anche in 5' e U3 in 3'. U3 contiene sequenze importanti per la trascrizione come TATA box e siti di legame per fattori di trascrizione (AP-1, NF- $\kappa$ B, AP-4). In R sono presenti sequenze coinvolte nella replicazione e retrotrascrizione, mentre U5 è necessaria per l'inizio della retrotrascrizione e contiene parte del segnale  $\psi$ . A partire dall'estremità 5' si ritrovano il gene *gag*, che codifica per le proteine NC, MA e CA; il gene *pol* che codifica per RT, IN, DU e PR e il gene *env* che codifica per SU e TM (Figura 1.14). FIV ha un numero inferiore di proteine regolatrici e accessorie rispetto ad HIV e agli altri lentivirus (Bendinelli et al., 1995; Sauter e Gasmi, 2001). Sono stati identificati solo tre geni non-strutturali: *rev*, *vif* e *ORF-A* o *ORF-2* (Figura 1.14).

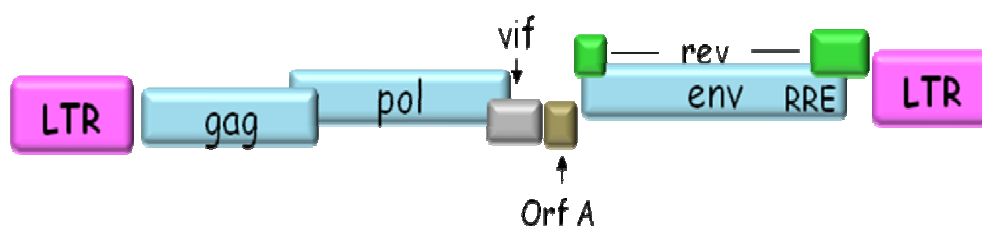


Figura 1.14: Genoma di FIV

Altri geni sono stati predetti in alcuni isolati, ma per ora non sono stati trovati (Pistello, 2008). Il gene *rev* è formato da due esoni, presenti alle due estremità di *env* e produce una proteina, che, in seguito al legame con la sequenza *rev-responsive-element* (RRE), trasporta l'RNA genomico e gli mRNA policistronici nel citosol (Elder et al., 2008; Sauter e Gasmi, 2001). *Vif* è

coinvolto nell'infettività virale (Paul et al., 2007; Pistello, 2008), *ORF-A* è una proteina multifunzionale, essenziale per la replicazione nelle cellule linfoidi, induce l'arresto del ciclo cellulare in G2 nella cellula infetta e sembra essere coinvolta nella formazione della particella virale e nel suo rilascio (Gemeniano et al., 2003; Pistello, 2008).

Evidenze epidemiologiche indicano che FIV non è patogeno per l'uomo, poiché non ci sono mai state malattie, né sier conversionsi, nonostante l'esposizione al virus attraverso la medesima via di trasmissione (Barraza e Poeschla, 2008). Il tropismo specie-specifico di FIV è legato all'attività trascrizionale dell'LTR. L'LTR di FIV infatti, a differenza di quella di HIV che necessita della proteina *trans*-attivante Tat, è costitutivamente attiva nelle cellule feline, ma non lo è in altri tipi cellulari. La sostituzione dell'elemento U3 nell'LTR in 5' con un forte promotore ubiquitario e costitutivamente espresso, come quello del gene *immediate-early* del CMV umano (hCMV), ha reso il primo vettore FIV capace di trasdurre anche cellule umane in divisione, quiescenti e cellule murine (Barraza e Poeschla, 2008). Lo sviluppo di vettori FIV, come per i vettori HIV, ha richiesto ottimizzazioni successive, al fine di aumentare l'efficienza di trasduzione e ridurre la possibilità di formazione di ricombinanti. Anche questi vettori vengono prodotti mediante un sistema *split-component*, che nei vettori di prima generazione è costituito solo da due costrutti: *packaging* e vettore (Curran et al., 2000). Nella seconda generazione viene aggiunto il terzo costrutto, che veicola il gene necessario per la formazione del pericapside, separandolo così dal *packaging* (Curran et al., 2000). Oltre a ciò, nei vettori attuali di terza generazione (Figura 1.15a,b,c) si ha l'eliminazione dei geni accessori *vif* e *ORF-A* dal costrutto di *packaging*, senza una diminuzione dell'efficienza rispetto alla generazione precedente (Sauter e Gasmi, 2001) (Figura 1.15a).

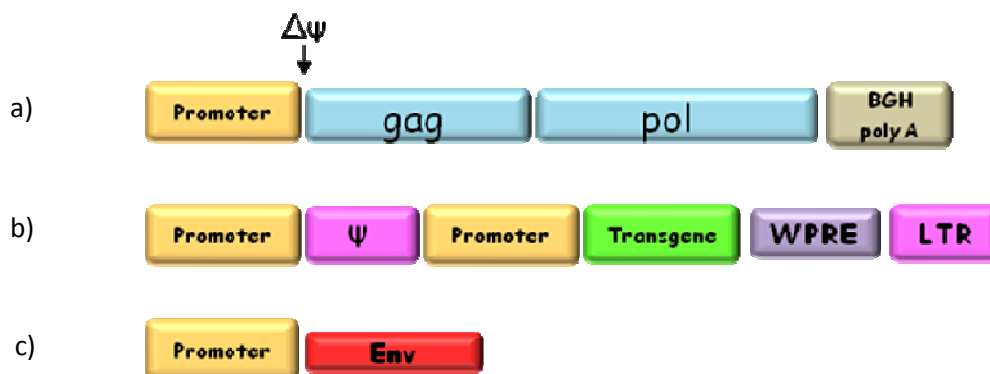


Figura 1.15: Sistema split-component in FIV: a) costruito di *packaging*, b) costruito vettore, c) costruito *env*

In alcuni vettori il sistema *rev/RRE* viene mantenuto, perché necessario per il trasporto dell'RNA *unspliced* o *singly spliced* fuori dal nucleo, in altri viene sostituito con il sistema *rev/RRE* di HIV, o con l'elemento di trasporto costitutivo del retrovirus di scimmia Mason-Pfizer (CTE) (Sauter e Gasmi, 2001). Il costrutto vettore è costituito solo dalle sequenze *cis*-agenti, necessarie per la retrotrascrizione e integrazione, il segnale  $\psi$  per il corretto incapsidamento nel vettore e il transgene. L'elemento U3 in 5' è sostituito con hCMV e il transgene è sotto il controllo di un promotore interno come CMV o EF1 $\alpha$ , che ne consente l'espressione (Barraza e Poeschla, 2008). L'inserimento della sequenza RRE prima del promotore interno permette la produzione di elevate quantità di vettore (Johnston et al., 1999). Un'ulteriore precauzione si ha nei vettori SIN, in cui le LTR sono rese inattive mediante una delezione a livello dell'elemento U3 in 3', che ne impedisce la rigenerazione in 5', questo per impedire l'attivazione di geni vicini al sito di integrazione (Khare et al., 2008). Per aumentare e stabilizzare i livelli di espressione del transgene possono essere incorporate sequenze *cis*-agenti, come l'elemento regolatore post-trascrizionale del virus dell'epatite di marmotta (WPRE) (Pistello et al., 2007; Zufferey et al., 1998). L'espressione contemporanea di due o più transgeni, sotto il controllo dello stesso promotore, può essere ottenuta clonando tra questi dei siti interni di entrata ribosomiale (IRES), ovvero sequenze che favoriscono il legame dell'apparato

di traduzione internamente all'mRNA (Galy, 2000), quindi con un meccanismo cap-indipendente (Camerini et al., 2008). Nei costrutti vettori di HIV sono incluse sequenze, quali il tratto centrale polipurinico (cppt) o la sequenza di terminazione centrale (CTS), che favoriscono la retrotrascrizione, la formazione del PIC e il suo importo a livello nucleare, aumentando l'efficienza di trasduzione (Barraza e Poeschla, 2008). Nei vettori FIV, invece, la loro presenza non ha dato risultati significativi (Pistello et al., 2007). Il costrutto di *packaging* veicola i geni *gag* e *pol* e non può essere incorporato nel virione perché manca del segnale  $\psi$ . La presenza delle LTR non è richiesta, per cui vengono sostituite in 5' da hCMV e in 3' da una sequenza di poliadenilazione, rimuovendo così possibili sequenze di omologia con il costrutto vettore, capaci di favorire eventi di ricombinazione (Barraza e Poeschla, 2008). Per aumentare il tropismo cellulare il vettore è pseudotipizzato con glicoproteine eterologhe, come la glicoproteina G del virus della stomatite vescicolare (VSV-G), la glicoproteina del virus felino endogeno (RD114), o l'envelope anfotropica di MLV, fornite dal costrutto *env*. VSV-G ha come recettore un fosfolipide di membrana ubiquitario, ciò permette al vettore di entrare in una grande varietà di cellule, tuttavia può non essere conveniente in esperimenti *in vivo*, in cui spesso si richiede la trasduzione di *target* cellulari specifici (Pistello et al., 2007). Il recettore di RD114 è un trasportatore di aminoacidi neutri sodio-dipendente, presente sulla superficie delle cellule della linea ematopoietica (Verhoeyen e Cosset, 2004). L'envelope anfotropica di MLV si lega ad un recettore di fosfato inorganico, che si trova in basse quantità nelle cellule ematopoietiche staminali (Verhoeyen e Cosset, 2004). I vettori FIV hanno la capacità di trasdurre sia cellule proliferanti che quiescenti, arrestate nelle fasi G0/G1, G1/S, o G2/M, cellule umane primarie come neuroni post-mitotici, cellule muscolari lisce dell'aorta, fibroblasti, cellule epiteliali respiratorie, epatociti, macrofagi, cellule dendritiche (Sauter e Gasmi, 2001). Sono stati utilizzati per

veicolare il gene CFTR in cellule epiteliali delle vie respiratorie nel trattamento della fibrosi cistica, mostrando *in vitro* un'espressione genica persistente (Wang et al., 1999). In un esperimento di trasduzione a livello della retina si sono dimostrati più promettenti rispetto ai vettori adenovirali per durata di espressione genica e per ridotta tossicità (Loewen et al., 2004). In seguito a somministrazione sistemica, i vettori FIV sono stati capaci di trasdurre epatociti in modelli animali di emofilia A e mucopolisaccaridosi (Stein et al., 2001), cellule del Purkinje e cellule del sistema immunitario nel SNC in modelli animali di malattia di Sandhoff (Kyrkanides et al., 2005). Infine la capacità di trasdurre efficacemente linfociti T e cellule dendritiche li rende impiegabili come vettore ad uso vaccinale (Pistello et al., 2007).