

3. Materiali e metodi

3.1 Produzione dei costrutti

I costrutti utilizzati per la produzione del vettore sono stati precedentemente caratterizzati *in vitro* nei nostri laboratori (Pistello et al., 2007). Per ottenerne le quantità necessarie sono state trasformate cellule Max Efficiency STBL2 (Life Technologies, Gaithersburg, Md.), adatte per il clonaggio di inserti instabili come sequenze retrovirali e ripetizioni dirette. Le cellule sono state piastrate su piastre Petri contenenti LB agar (1% bacto-triptone, 0,5% estratto di lievito, 1% NaCl, 1,5% agar batteriologico) e appositamente preparate con ampicillina 50µg/ml che permette la crescita delle sole cellule che hanno incorporato i plasmidi, poiché questi contengono un gene per la resistenza all'antibiotico. Per discriminare le colonie effettivamente positive è stata fatto uno *screening* mediante *polymerase chain reaction* (PCR *screening*) utilizzando le seguenti condizioni:

Temperatura	Tempo	
94°C	10'	
94°C	30''	25 cicli
T _m °C	30''	
72°C	T _{ext}	
72°C	5'	
4°C	∞	

Tabella 3.1: condizioni per la PCR *screening*

La Temperatura di *melting* (T_m) è la temperatura opportuna per l'appaiamento dei primer, che è stata calcolata in base alla concentrazione delle basi con la formula:

$$T_m = [(A/T \times 2) + (G/C \times 4)] - 2^\circ C$$

Il tempo di estensione, T_{ext} , che dipende dalla lunghezza del frammento da amplificare, è stato calcolato considerando che la Taq DNA polimerasi (Polymed, Firenze) utilizzata impiega circa 1 minuto per amplificare un frammento di 1Kb di DNA. Sono stati utilizzati inoltre i seguenti primer che si legano rispettivamente su inserto e vettore:

Primer	Sequenza da 5' a 3'
Blpw S	ttaccaaagcaggaatatctagtgtcgacaatcaacctctggattac
PacIw AS	atccttaattaagggtccagggcggggaggcggcccaaagg
ClaI CMV S	atcgatgtacgggccagatatacg
Nru CMV AS	ctgcttactggcttatcgaaatttcgcgc

Tabella 3.2: sequenze dei primer utilizzati per la PCR screening

Dopo controllo su gel di agarosio 1% dei frammenti amplificati aventi le dimensioni di interesse, le colonie positive sono state fatte crescere *overnight* a 37°C in LB (1% bacto-triptone, 0,5% estratto di lievito, 1% NaCl) e ampicillina 100X. Il DNA plasmidico è stato estratto seguendo il protocollo Maxi plasmid kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) e quantificato allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 260 nm, calcolando la concentrazione in base alla densità ottica (O.D.) secondo la formula:

$$A = O.D. = \epsilon c l$$

Nella quale ϵ rappresenta il coefficiente di estinzione molare, l il cammino ottico e c la concentrazione.

3.2 Colture cellulari

Trasfezione e trasduzione sono state fatte su linee cellulari 293T, che sono cellule renali embrionali umane, trasformate con il DNA dell'adenovirus umano 5. Le 293T contengono inoltre l'antigene T grande del virus di scimmia 40 (SV40). Per la trasduzione sono stati utilizzati anche le linee di fibroblasti renali felini Crandell (CrFk) e fibroblasti murini di derivazione embrionale (NIH/3T3). HSV-2 è stato prodotto e titolato su cellule epiteliali renali di scimmia africana verde (VERO). Per l'*intracellular staining* (ICS) sono stati utilizzati linfociti T CD8⁺ primari di topo. Tutte le cellule sono state mantenute in coltura a 37°C in atmosfera umidificata con il 5% di CO₂ con terreni diversi a seconda del tipo cellulare: *Dulbecco Modified Eagle's Medium* (DMEM, Sigma Aldrich, S.Louis; USA) per le 293T, le CrFk e le NIH/3T3, *Minimum Essential Medium* (MEM, Sigma Aldrich, S.Louis, USA) per le VERO. A tutti i terreni sono stati addizionati: 10% di siero bovino fetale scomplementato (FCS; Sigma Aldrich), 1% di aminoacidi essenziali, 1% di penicillina/streptomina, 1% di glutammina (Sigma Aldrich S.Louis, USA). Per la propagazione in coltura una volta raggiunta la confluenza, le cellule sono state lavate con PBS (PBS 10X: 80g di NaCl, 2g di KCl, 14,4g di Na₂HPO₄, 2,4g di KH₂PO₄, HCl a pH 7,4), quindi è stata aggiunta tripsina (Eurobio, Francia) per favorire il distacco delle cellule. Dopo centrifugazione a 1200 rpm per 5 minuti, sono state risospese e seminate nelle opportune diluizioni.

3.3 Trasfezione

Il vettore veicolante la gB1 (LAW34-gB1), il vettore utilizzato come controllo negativo (LAW34) e il vettore veicolante la *Green Fluorescent Protein* (GFP) (LAW34-GFP) sono stati prodotti mediante trasfezione delle

293T con i costrutti di interesse mediante l'utilizzo del polietilenimine (PEI). Il giorno precedente sono state seminate 3×10^6 cellule in piastre da 100mm con 10 ml di terreno DMEM. Il giorno della trasfezione i costrutti sono stati mescolati in quantità equimolecolari (per un totale di 35 μ g di DNA), secondo un rapporto di 1:2:4 (*envelope*, *packaging* e vettore). Alla miscela è stato aggiunto NaCl 150mM fino ad un volume finale di 700 μ l. È stata preparata, inoltre, un'altra miscela contenente 100 μ l di PEI 10 μ M 25 kDa (Sigma Aldrich, S. Louis, USA) e 600 μ l di NaCl 150mM, questa è stata poi aggiunta alla prima e la nuova soluzione è stata lasciata a temperatura ambiente per 15 minuti. Intanto è stato cambiato il terreno alle cellule e sostituito con DMEM senza siero, né antibiotici. La soluzione è stata poi aggiunta alla piastra goccia a goccia, distribuendola in maniera uniforme. Dopo 6h di incubazione è stata sostituita con DMEM fresco e dopo 48h è stato prelevato il sovrinatante contenente il vettore. Per valutare l'efficienza di trasfezione è stata eseguita la lettura delle cellule esprimenti la GFP al citofluorimetro (FACScan, Becton Dickinson). Per lo stesso scopo è stato eseguito il saggio RT in 150 μ l di sovrinatante. Questo saggio verifica la presenza del vettore tramite la valutazione dell'attività polimerasica dell'enzima RT utilizzando un substrato biotinilato, a cui si lega la streptavidina. La rivelazione avviene con substrato tetrametilbenzedina (TMB)-H₂O₂ in rapporto 1:1, la reazione viene bloccata con H₂SO₄ 1N e l'assorbanza letta mediante processore ELISA (Behring).

3.4 Titolazione del vettore

Per l'inoculo di quantità opportune di vettore nei nostri animali, è stato necessario ricorrere alla sua titolazione con *Real Time* PCR. Il sovrinatante delle trasfezioni è stato perciò ultracentrifugato (ultracentrifuga Optima™ L-90K, Beckman Coulter) a 40000 rpm per 2h a 4°C per concentrare il vettore.

Il pellet ottenuto è stato risospeso in 500µl di soluzione fisiologica. Una diluizione 1:10 del risospeso è stato utilizzata per l'estrazione di RNA, il resto è stato aliquotato e conservato a -80°C in attesa dell'inoculo. Il campione è stato estratto con il *kit QIAmp Viral RNA Mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) e trattato con DNAsi (Ambion), al fine di eliminare eventuale DNA plasmidico rimasto dalla trasfezione. L' RNA è stato retrotrascritto con la trascrittasi inversa del virus della mieloblastosi aviaria (*AMV reverse transcriptase* Finnzymes Oy, Finland), mediante incubazione a 42°C per 1h e successiva inattivazione dell'enzima a 95°C per 5 minuti. Il campione di cDNA ottenuto è stato conservato a -20°C in attesa della reazione di PCR. I primer e la sonda utilizzati nella *real time* PCR sono stati disegnati con il *software File Builder 3.1* (Applied Biosystem, Roche, New Jersey, USA) sulla sequenza WPRE, perché è un elemento eterologo e riduce il rischio di contaminazione.

Primer	Sequenza 5'-3'
WPRE S	gcttcccgtatggctttcatt
WPRE AS	tgacaacgggccacaact
WPRE probe	FAM-tctcctccttgataaatcctggttgctgtctc-TAMRA

Tabella 3.3: sequenze dei primer utilizzati per la Real Time PCR

All'estremità 5' della sonda è stata utilizzata come fluoroforo la 6-carbossi-fluoresceina (FAM), che emette a 520 nm, mentre come *quencher* in 3' la 6-carbossi-tetrametilrodamina (TAMRA). Lo standard scelto è stato il vettore LAW34-GFP. L'analisi è stata effettuata con il *software* SDS 1.9 (Applied Biosystem, Roche, New Jersey, USA), per il calcolo del numero di copie di RNA/ml è stata applicata la formula:

$$\text{Copie RNA/ml} = (\text{Mean} \times 1000 \times V \text{ estrazione}) / (V \text{ campione} \times V \text{ RT})$$

dove il volume finale dell'estratto (V estrazione) è 60 μ l, il volume iniziale del campione prima dell'estrazione (V campione) è 140 μ l e il volume di campione estratto usato per la retrotrascrizione (V RT) è 10 μ l.

3.5 Trasduzione

Il giorno precedente alla trasduzione sono state seminate 6 x 10⁴ 293T e 3 x 10⁴ CrFk e NIH/3T3 in una piastra *multiwell* 24 con 1 ml di DMEM 10% FCS. Il giorno successivo è stato rimosso il terreno da ciascun pozzetto e sostituito con 1 ml del sovrnatante delle trasfezioni, precedentemente chiarificato a 1800 rpm per 7 minuti. Dopo 6h si è provveduto alla sostituzione con terreno fresco e le cellule sono state incubate per 48h-72h prima di valutare con diversi metodi l'efficienza di trasduzione.

3.6 Lettura al FACS

Le cellule trasfettate e trasdotte con LAW34-GFP sono state esaminate al FACS, sfruttando la metodica della citofluorimetria a flusso. È stato analizzato lo spostamento delle cellule esprimenti la GFP verso valori di fluorescenza più elevati rispetto a cellule di controllo.

3.7 Western blot

Per valutare l'efficienza di trasduzione di LAW34-gB1 su cellule 293T e sulle NIH/3T3, è stato effettuato il *western blot* con un gel acrilamide/bisacrilammide al 10%. Come anticorpo primario è stato usato un anticorpo policlonale anti-gB derivato da siero di coniglio (per gentile concessione del Prof. Manservigi, Università di Ferrara), diluito 1:500 e come anticorpo secondario un anti-*rabbit* coniugato con enzima perossidasi (Sigma Aldrich, S.Louis, USA) e diluito 1:1000. Questa tecnica è servita anche per valutare la risposta umorale sviluppata nei topi dopo il *challenge*, utilizzando

come campione VERO infettate da HSV-2. In questo caso è stato preparato un gel acrilamide/bisacrilammide all'8%. L'anticorpo primario, diluito 1:100, è stato ottenuto da topi su cui è stato effettuato il *challenge*, mediante prelievo di sangue dal cuore e successiva separazione del siero. L'anticorpo secondario, un anti-*mouse* coniugato con enzima perossidasi (Sigma Aldrich, S.Louis, USA), è stato diluito 1:2000. La rivelazione è stata effettuata con il kit *Horseradish peroxidase conjugate substrate* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.8 Produzione di HSV-2 per *challenge*

Per la produzione di HSV-2 cellule VERO sono state messe in coltura in fiasche da 175cm² con MEM 2% FCS e il giorno successivo sono state infettate con 1 ml di HSV-2 in MEM 5% FCS. Una volta raggiunta la completa lisi cellulare, è stato recuperato il sovrinatante. Dopo centrifugazione a 1800 rpm per 5 minuti il nuovo sovrinatante ottenuto è stato lasciato a 4°C *overnight*, invece il pellet cellulare è stato sottoposto a tre cicli di congelamento in metanolo ghiacciato a -80°C e scongelamento per recuperare il virus intracellulare, poi è stato lasciato a -80°C *overnight*. Le cellule sono state quindi nuovamente scongelate e centrifugate, il sovrinatante è stato aggiunto a quello del giorno precedente e ultracentrifugato a 20000 rpm per 1h. Il pellet è stato risospeso in 1/100 del volume iniziale, aliquotato e conservato a -80°C.

3.9 Titolazione di HSV-2

3.9.1 Titolazione *in vitro*

Per la titolazione *in vitro* di HSV-2 è stato allestito un saggio di placca, seminando in piastre da 24 1 x 10⁵ VERO a pozzetto, con 500 µl di MEM

10% FCS. Dopo 24h le cellule sono state infettate in triplicato con 200µl di diluizioni scalari dell'isolato virale, quindi incubate per 3-4 ore a 37°C. Dopo lavaggio in PBS, a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200 µl di una soluzione di MEM 5% FCS e agarosio seaplaque 0,4%, in seguito le cellule sono state incubate a 37°C per 48-72 ore. Trascorso il tempo opportuno per la comparsa delle placche, le cellule sono state fissate con 1 ml di formalina al 10% per 1h a temperatura ambiente. Formalina e agarosio sono stati poi rimossi ed è stato aggiunto il blu di metilene, diluito 1:10, per la colorazione e la visualizzazione della placche al microscopio ottico. Dalla diluizione più alta contenente placche si è risaliti al titolo virale, mediante la formula:

$$N^{\circ} \text{ PFU/ml} = N^{\circ} \text{ di placche/diluizione del volume}$$

3.9.2 Titolazione *in vivo*

Nella titolazione *in vivo* sono state testate 4 diverse diluizioni, da $2,5 \times 10^7$ a $2,5 \times 10^{10}$ PFU/topo, su topi C57BL/6. I topi sono stati divisi in 4 gruppi da 7 animali ciascuno e quindi infettati con il virus per via vaginale. Sono stati monitorati giornalmente, in modo da valutare la mortalità in funzione del numero di copie. Con $2,5 \times 10^{10}$ PFU/topo sono morti 7/7 animali, con $2,5 \times 10^9$ PFU/topo i morti sono stati 3/7. 1/7 animali sono morti con $2,5 \times 10^8$ PFU/topo e non si sono avuti morti inoculando $2,5 \times 10^7$ PFU/topo. È stato quindi scelto il titolo virale capace di causare una letalità del 50%, ovvero $2,5 \times 10^9$ PFU/topo.

3.10 Protocollo vaccinale

Per l'allestimento del protocollo vaccinale sono stati presi 42 topi C57BL/6 dell'età di circa 5 settimane, mantenuti nelle opportune condizioni nello stabulario del nostro laboratorio. Gli animali sono stati suddivisi in tre gruppi,

due costituiti da 16 animali e uno da 10 femmine. In particolare un gruppo è stato inoculato con 10^6 copie di vettore vuoto LAW34 e un gruppo con le stesse copie di LAW34-gB1. Le 10 femmine sono state invece utilizzate come controllo non trattato. Il primo e il secondo inoculo sono stati effettuati alla distanza di una settimana l'uno dall'altro sulla pianta del piede, il terzo inoculo, a distanza di due settimane dal secondo, a livello intradermico. Dopo 3 settimane dall'ultimo inoculo i topi dei due gruppi e i 10 topi *naive* sono stati sfidati per via vaginale con HSV-2, il challenge è stato preceduto dal trattamento sottocutaneo con 2mg/topo di depoprovera (Pfizer), avvenuto 5 giorni prima. Per la valutazione della risposta cellulo-mediata 3 topi maschi di ciascun gruppo sono stati sacrificati ad una settimana da ciascuno dei primi due inoculi e pochi giorni prima del *challenge*.

3.11 Intracellular staining

Dai topi maschi sacrificati è stata estratta la milza che, dopo lavaggio in fisiologica è stata incisa per il recupero degli splenociti. I campioni sono stati centrifugati a 1800 rpm per 7 minuti, il pellet cellulare è stato risospeso in RPMI 1640 (Sigma Aldrich), addizionato con 10% FCS. Per ciascun campione le cellule sono state portate alla concentrazione di 3×10^6 /ml e aliquotate in 4 tubini trattati rispettivamente con PMA, peptide, *scramble* o non trattati. Il mix PMA è stato preparato con: 107 μ l di PMA 1000X (sciolto in RPMI 10% FCS), 142 μ l di RPMI 10% FCS e 19 μ l di ionomicina (Sigma Aldrich), in ciascun campione ne sono stati aliquotati 25 μ l. Il peptide e lo *scramble* sono stati aggiunti nei rispettivi tubini alla concentrazione di 1 μ g/ml. Dopo incubazione a 37°C per 1h, in ciascun tubino sono stati aggiunti 2,5 μ l di brefeldina A (Sigma Aldrich) ed è seguita un'incubazione di altre 5 ore. In seguito i campioni sono stati fissati con 1ml di FACS FIX (PBS, 0,2% BSA, 0,1% Sodio Azide, paraformaldeide 1%), mantenuti in

ghiaccio per 20 minuti e lavati con 1ml di FACS buffer (PBS, 0,2% BSA, 0,1% Sodio Azide). Dopo centrifugazione a 1800 rpm per 8 minuti, sono stati risospesi in 200µl di FACS buffer e mantenuti a 4°C *overnight*. Il giorno successivo sono stati nuovamente lavati, centrifugati e risospesi in 100µl di FACS buffer con saponina 0,1% (FBS). Dopo 20 minuti a temperatura ambiente sono stati marcati con anticorpi anti-*mouse* CD8 FITC e IFN γ PE (eBioscience, San Diego, USA) e lasciati al buio per 1h. Un campione PMA/ionomicina è stato suddiviso in 4: uno marcato CD8/IFN γ ; gli altri, marcati con solo CD8, con solo IFN γ e non marcato, sono serviti per il settaggio del FACS. All'ulteriore lavaggio in FACS buffer con saponina 0,1% e centrifugazione, è seguita la risospensione in 400µl di FACS buffer per la lettura.

3.12 ELISA

La presenza di IgG, a seguito della vaccinazione, è stata valutata mediante un test ELISA con il kit Enzygnost Anti-HSV/IgG (Dade Behring, Marburg, GmbH). L'anticorpo primario, derivato dai sieri di topi sacrificati dopo ciascun inoculo, è stato diluito 1:400. Come anticorpo secondario è stato utilizzato un *rat anti-mouse* IgG1 *Heavy Chain*:HRP (AbD Serotec, UK), diluito 1:1000. La rivelazione è stata fatta con 100µl di substrato TMB-H₂O₂ in rapporto 1:1. Dopo 5-7 minuti di incubazione al buio, la reazione è stata bloccata con H₂SO₄ 1N, quindi è stata letta l'assorbanza a 450nm mediante processore ELISA (Dade Behring, Marburg, GmbH).

3.13 Monitoraggio animali

Gli animali su cui è stata effettuata la titolazione *in vivo* e quelli su cui è stato eseguito il *challenge* sono stati monitorati giornalmente, annotando gli stadi della malattia secondo uno *score* predefinito: assenza di sintomi (stadio 0),

rossore e papule isolate (stadio 1), ulcere e/o rigonfiamento (stadio 2), ulcere fuse e paralisi degli arti (stadio 3) e morte (stadio 4). Il tredicesimo giorno post-*challenge* da alcuni topi di ciascun gruppo è stato raccolto il tampone vaginale, attraverso cui è stata valutata la presenza di un'infezione da HSV-2. Per far ciò è stata eseguita una PCR *nested* con i seguenti 4 primer:

Primer	Sequenza 5'-3'
SVCR1ASN	gtggactggttcaccgtcc
SVCR1S	gcacaccaccgacctcaagta
SV2R1ASN	caacacccatctccacc
SV2R1SN	acgtactaccggctcac

Tabella 3.4: primer per la PCR nested