

## 4. Risultati

### 4.1 Vettori e loro caratterizzazione *in vitro*

I vettori utilizzati nel protocollo vaccinale sono LAW34 ed il suo derivato LAW34-gB1. LAW34 è stato prodotto mediante cotrasfezione delle cellule 293T con tre costrutti: costrutto vettore, costrutto di *packaging* e costrutto *envelope* (Figure 4.1a, b, c). I primi due sono stati sviluppati da p $\Delta$ 00, clone molecolare replicazione-competente del ceppo Petaluma di FIV, derivato a sua volta dal plasmide p34TF10. Il costrutto vettore (Figura 4.1b) presenta la sostituzione dell'elemento U3 dell'LTR in 5' con il promotore ubiquitario CMV, che permette l'espressione genica anche in cellule non feline. LTR di FIV è infatti costitutivamente attivo solo in cellule feline. Sono stati, inoltre, eliminati tutti i geni virali, eccetto un frammento di 120 nucleotidi di *gag* contenente il segnale  $\psi$ , necessario per il corretto incapsidamento del genoma virale nella particella neoformata. Un promotore CMV interno controlla l'espressione di geni eterologhi (transgeni) clonati nel *multiple cloning site*. A monte di CMV è presente la sequenza RRE, che consente il trasporto di mRNA *unspliced* e *single-spliced* fuori dal nucleo. A valle del sito di clonaggio del transgene si trova l'elemento WPRE, che stabilizza l'espressione del transgene stesso. LAW34 è un vettore di tipo SIN, avente cioè una delezione nell'U3 in 3', che impedisce la rigenerazione dell'LTR in 5' durante la retrotrascrizione. Le LTR risultano pertanto inattive, quindi incapaci di modulare l'espressione di geni cellulari adiacenti al sito di integrazione, riducendo così anche il rischio di mutagenesi inserzionale.

Nel costrutto di *packaging* (Figura 4.1a) sono presenti le sequenze di espressione dei geni *gag* e *pol*, ma manca il segnale  $\psi$  per evitare che il prodotto di espressione venga incorporato nelle particelle virali. Le LTR in 5'

e in 3' sono state sostituite rispettivamente dal promotore CMV, per avere espressione anche in cellule non feline e dalla sequenza di poliadenilazione dell'ormone della crescita bovino, necessario per il corretto riconoscimento dell'RNA messaggero. Il costrutto *env* codifica per le glicoproteine del pericapside. Nel nostro caso (Figura 4.1c) sono stati utilizzati i geni codificanti VSV-G e RD114/TR. In LAW34-gB1 è stato clonato il gene codificante la proteina gB1. Questa proteina presenta una sequenza simile alla gB di HSV-2 (Li et al., 2006) ed è in grado di indurre risposta immunocrociata nei confronti di HSV-2 (Gierynska et al., 2002).

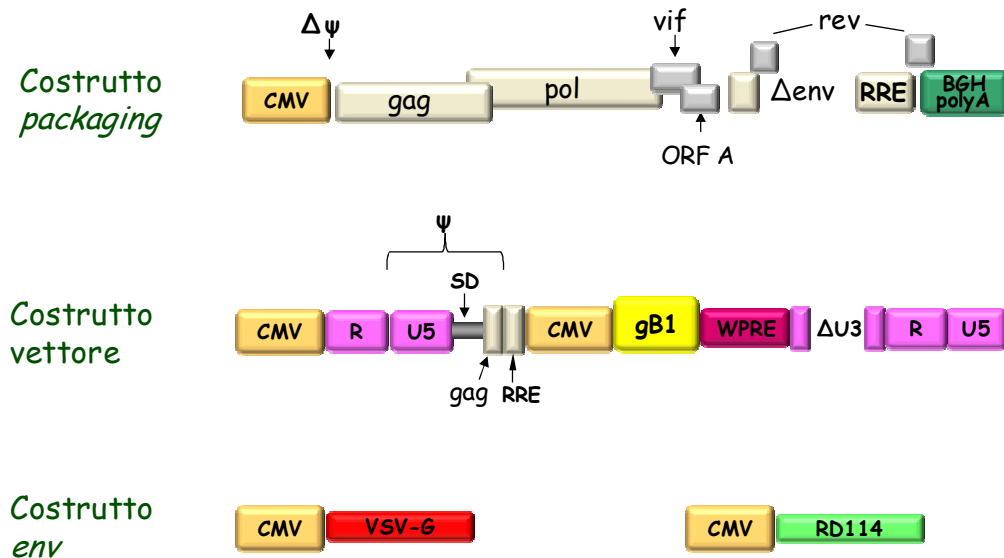


Figura 4.1: Componenti di LAW34-gB: a) costrutto di packaging; b) costrutto vettore c) costrutti *env*

La funzionalità del vettore è stata preliminarmente valutata mediante test *in vitro*. A tale scopo è stato utilizzato il vettore LAW34-GFP, sia pseudotipizzato con VSV-G che con RD114/TR. Per valutare la capacità del vettore di trasdurre cellule effettrici del sistema immune, LAW34-GFP è stato utilizzato per trasdurre linfociti primari e cellule dendritiche murine, dimostrando una buona efficienza di trasduzione (dati non mostrati). È stata inoltre valutata l'espressione di gB1 da parte di LAW34-gB1 mediante *western blot* sulle 293T e NIH/3T3 trasdotte (Figura 4.2).

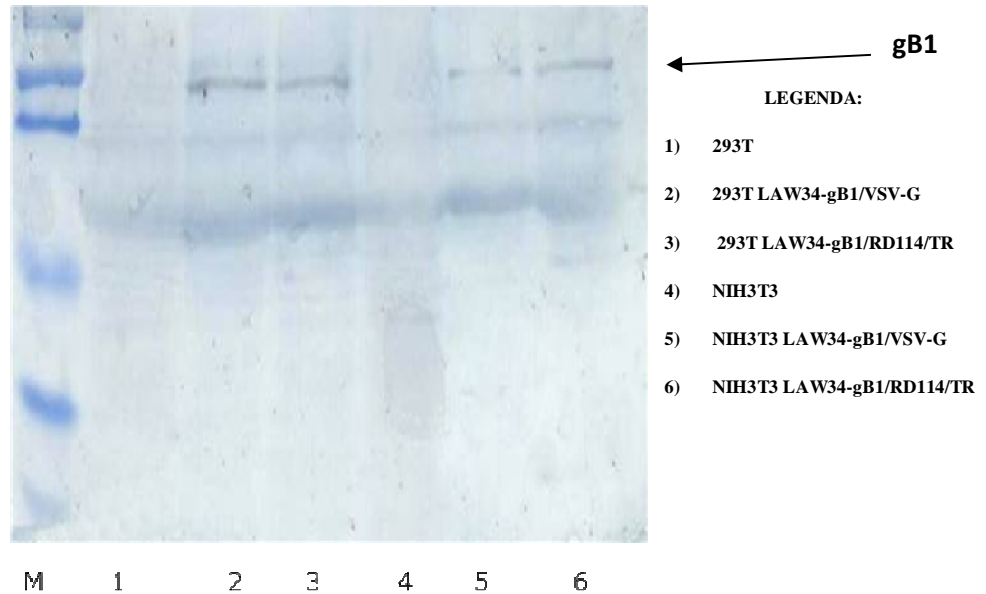


Figura 4.2: Western blot su 293T e NIH/3T3 trasdotte con LAW34-gB1

Come atteso, dal confronto con le cellule non trasdotte (*mock*) è stata rilevata la presenza della banda del giusto peso molecolare, corrispondente a gB1, in entrambi gli isotipi cellulari trasdotti con il vettore, pseudotipizzato sia con VSV-G che con RD114/TR.

## 4.2 Valutazione del titolo del vettore

Al fine di inoculare quantità note ed equivalenti di LAW34 e LAW34-gB1 in vivo, entrambi i vettori sono stati titolati tramite *Real Time* PCR, eseguita sui sovrinatanti delle trasfezioni sulle 293T, come descritto nel paragrafo § 3.4. Il numero di copie ottenuto è risultato appartenente ad un range compreso tra  $10^6$ - $10^7$  copie di RNA /ml. Sugli stessi sovrinatanti è stato effettuato il saggio RT, che ha permesso di valutare la presenza di particelle virali integre dotate di attività retrotrascrittasi.

### 4.3 Base di partenza

Precedentemente al mio internato di tesi sono stati condotti alcuni test in vivo tesi a valutare l'efficacia del protocollo vaccinale contro HSV-1. Vengono qui riportate le principali fasi.

#### 4.3.1 Titolazione di HSV-1 *in vivo*

La titolazione è servita a valutare la dose letale del virus prodotto precedentemente *in vitro* e determinare quindi la quantità da iniettare al *challenge*, in base alla letalità osservata. I topi sono stati divisi in tre gruppi, a cui sono state inoculate dosi scalari di HSV-1, da  $5 \times 10^7$  a  $5 \times 10^{10}$  PFU/topo. Cinque giorni prima i topi sono stati trattati con depoprovera, che, oltre a regolarizzare l'estro, aumenta la suscettibilità all'infezione assottigliando l'epitelio vaginale. Dopo monitoraggio, il numero di copie capace di causare una letalità del 50% è risultato essere  $5 \times 10^9$  PFU/topo.

#### 4.3.2 Protocollo vaccinale

Nel protocollo vaccinale i topi sono stati divisi in cinque gruppi: inoculati con LAW34 (gruppo di controllo) e vaccinati con LAW34-gB1 pseudotipizzati con RD114/TR, inoculati con LAW34 e vaccinati con LAW34-gB1 pseudotipizzati con VSV-G e non vaccinati (*naïve*). Ogni gruppo era costituito da 10 animali, di cui 5 femmine, il *naïve* da 4 femmine. L'esperimento è stato condotto testando in parallelo LAW34-gB1 pseudotipizzato con VSV-G e con RD114/TR. Dopo alcune prove preliminari, il protocollo finale ha previsto tre inoculi: due sulla pianta del piede a una settimana di distanza uno dall'altro e il terzo inoculo per via intradermica due settimane dal secondo. Questi siti sono stati scelti per la

maggior presenza di cellule presentanti l'antigene (APC), fondamentali per l'induzione della risposta immune (Jazayeri et al., 2009; Kim et al., 2004).

#### 4.3.3 Monitoraggio risposta immune

È stata valutata la risposta cellulo-mediata sia in linfociti T CD4<sup>+</sup> che CD8<sup>+</sup>. Data la negatività dei primi, come atteso dalla letteratura (Toka et al., 2005), sono stati esaminati i soli linfociti CD8<sup>+</sup>. A tale scopo è stato eseguito l'*intracellular staining* sacrificando, dopo ogni inoculo, topi vaccinati con LAW34-gB1 e topi trattati con LAW34. I sieri prelevati dagli stessi animali sono serviti per la valutazione della risposta umorale mediante ELISA, volta a dimostrare la presenza di IgG anti-HSV. Solo nei topi vaccinati con LAW34-gB1 pseudotipizzato con VSV-G si è ottenuta una risposta significativa rispetto ai controlli.

#### 4.3.4 Risultati del challenge

Il challenge è stato eseguito inoculando  $5 \times 10^9$  PFU/topo di HSV-1 in cinque animali per ciascun gruppo e nelle quattro *naïve*. Mentre il vettore LAW34-gB1 pseudotipizzato con RD114/TR non ha dimostrato protezione, si sono ottenuti risultati incoraggianti con LAW34-gB1 pseudotipizzato con VSV-G rispetto ai controlli. In particolare tutti gli animali *naïve* si sono ammalati, con sintomi anche gravi e uno è morto. Lo stesso risultato si è avuto con i topi di controllo inoculati con LAW34. Al contrario non si sono avuti morti tra i topi vaccinati con LAW34-gB1, i sintomi della malattia si sono manifestati in pochi animali e in maniera lieve. Dal grafico in Figura 4.3 si nota infatti un andamento simile nelle curve dei topi *naïve* e LAW34, mentre nei topi LAW34-gB1 l'infezione ha un andamento significativamente più benigno. La tabella della stessa figura riporta inoltre la situazione degli animali al giorno 9 dal *challenge* mostrando assenza di malattia nei topi vaccinati con LAW34-

gB1, a differenza degli altri due gruppi in cui sono presenti sintomi anche gravi.

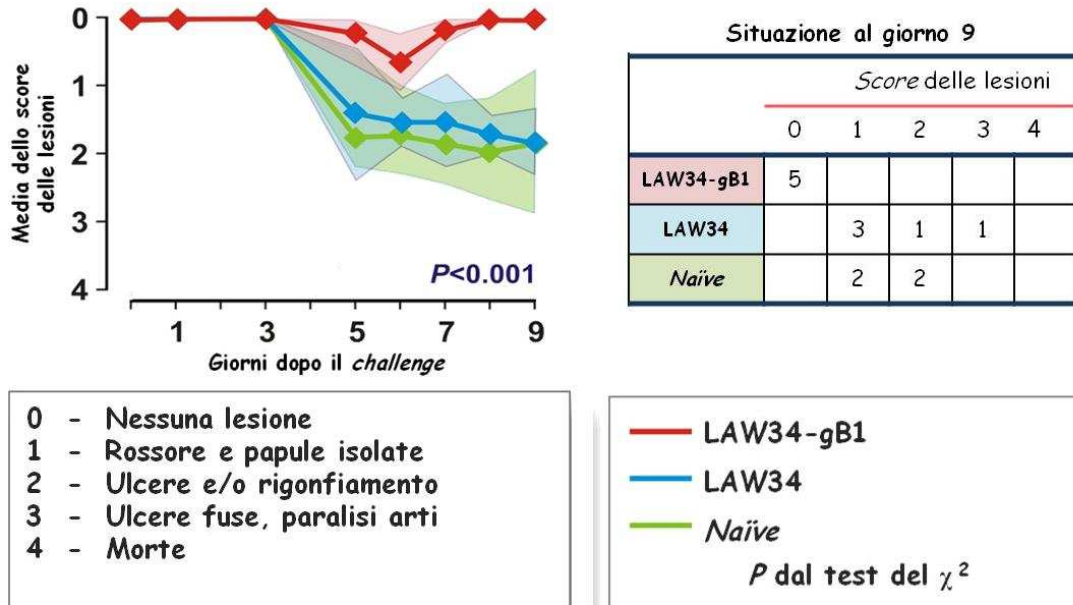


Figura 4.3: Risultati del challenge su HSV-1

#### 4.3.5 Considerazioni e informazioni per successivi esperimenti

La metodologia sviluppata per HSV-1 è stata applicata contro HSV-2 in virtù anche della risposta immunocrociata verso questo sierotipo indotta da gB1 (§ 4.1). Considerata la mancanza di protezione con RD114/TR, evidenziata sia nei test immunologici che in seguito al *challenge* con HSV-1, è stato scelto di utilizzare solo il vettore pseudotipizzato con VSV-G.

#### 4.4 Titolazione di HSV-2 *in vivo*

HSV-2 è stato titolato secondo il protocollo descritto nel § 3.9.2. I topi sono stati divisi in quattro gruppi da 7 animali ciascuno, a cui sono state inoculate quantità scalari del virus, da  $2,5 \times 10^7$  a  $2,5 \times 10^{10}$  PFU/topo. I risultati della titolazione sono mostrati in Figura 4.4. Come si può vedere, tutti i 7 topi sfidati con il maggior numero di PFU ( $2,5 \times 10^{10}$ ) sono morti. Con  $2,5 \times 10^9$

PFU/topo sono morti invece 3/7 animali e 4/7 si sono ammalati. Solo un topo dei 7 a cui sono state inoculate  $2,5 \times 10^8$  PFU del virus è morto, mentre se ne sono ammalati 3/7. Nessuno dei topi che ha ricevuto  $2,5 \times 10^7$  PFU è morto e solo 1/7 si è ammalato. Considerato ciò, è stato scelto per il protocollo vaccinale il numero di PFU/topo di HSV-2 ottimale che causano una letalità e una morbosità intorno al 50%, quindi  $2,5 \times 10^9$  PFU/topo.

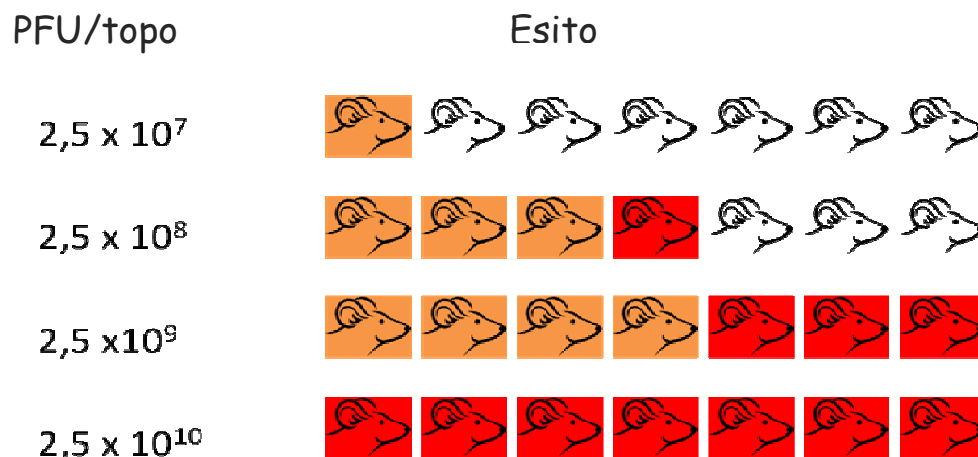


Figura 4.4: Titolazione di HSV-2 *in vivo*: in arancione sono indicati gli animali malati, in rosso i morti, in bianco i sani

## 4.5 Protocollo vaccinale

Come già descritto nel paragrafo 3.10, sono stati presi 42 topi C57BL/6, così suddivisi: 10 *naïve*, 16 vaccinati con LAW34-gB1 e 16 controlli trattati con il vettore vuoto LAW34. Sono stati scelti 10 topi *naïve* tutti di sesso femminile, così da avere un sufficiente numero di animali non trattati per il *challenge*. Per gli altri due gruppi, invece, poiché non avevamo un numero di femmine sufficiente, sono stati utilizzati 7 femmine e 9 maschi. I maschi sono stati utilizzati per verificare la risposta immune indotta, le femmine per valutare la protezione indotta. Lo schema vaccinale ha previsto 3 inoculi: i primi due sulla pianta del piede e a distanza di una settimana tra loro e l'ultimo intradermico a distanza di due settimane dal secondo. A ciascun topo, esclusi i

dieci *naïve*, è stato inoculato un volume massimo di 50µl contenente  $10^6$  copie del vettore in soluzione fisiologica.

#### 4.6 *Intracellular staining*

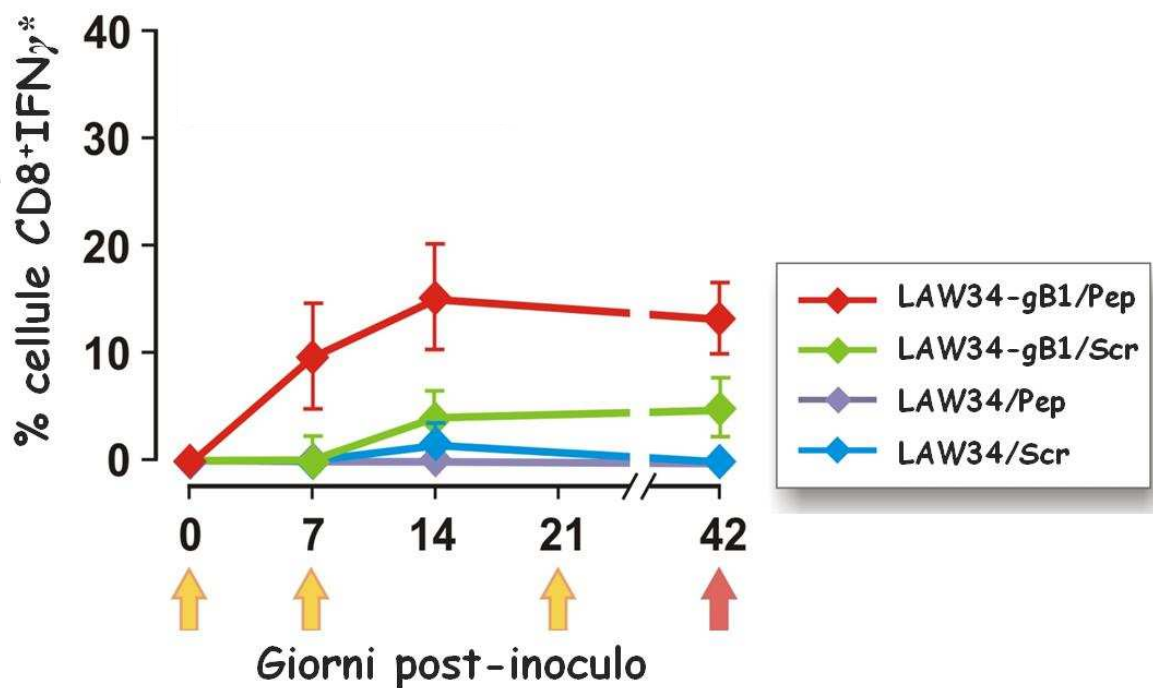
Ad una settimana da ciascuno dei primi due inoculi e poco prima del *challenge* 3 maschi trattati con LAW34 e 3 maschi vaccinati con LAW34-gB1 sono stati sacrificati ed è stata prelevata la milza, da cui sono stati ricavati i linfociti per il saggio di *intracellular staining* (§ 3.11). Questo saggio permette di monitorare la risposta CTL sviluppata dagli animali vaccinati mediante marcatura contemporanea dei linfociti esprimenti CD8<sup>+</sup> sulla superficie cellulare ed attivati, perché produttori IFN $\gamma$  quando esposti all'antigene vaccinale. Per una più corretta interpretazione dei risultati è stato utilizzato un controllo positivo costituito da linfociti esposti a PMA/ionomicina, entrambi in grado di indurre una forte stimolazione policlonale dei linfociti. Come controllo negativo è stato utilizzato invece il campione non stimolato. Per discriminare tra risposta specifica e non specifica alcuni linfociti sono stati stimolati con il peptide, costituito dall'epitopo immunodominante di gB1 (Orr et al., 2007), altri con uno *scramble*, che presenta la stessa composizione aminoacidica del primo, ma con sequenza casuale. Considerato ciò, nel grafico in figura 4.5 sono state riportate le medie dei risultati ottenuti ad ogni sacrificio, per ciascun gruppo di topi, in seguito a stimolazione con il peptide e con lo *scramble*. Queste sono state portate in scala percentuale mediante la proporzione:

$$(PMA-NS) : 100 = S : x$$

Dove PMA è la media dei valori ottenuti dalla lettura dei campioni stimolati con PMA/ionomicina di ciascun gruppo, NS è la media dei valori ottenuti dalla lettura dei campioni non stimolati e S è la media dei valori ottenuti dai



campione stimolati con il peptide o con lo *scramble*. Si può notare (Figura 4.5) come i topi vaccinati con LAW34-gB1 mostrino una risposta cellulo-mediata che aumenta progressivamente al numero di stimolazioni con gB1, fino ad un massimo (15,5%) raggiunto ad una settimana dal secondo inoculo, dopo il quale si arriva ad un *plateau*. Nei topi trattati con il vettore vuoto, in seguito a stimolazione con gB1, la percentuale di linfociti CD8<sup>+</sup> e secernenti IFN $\gamma$  non varia, mantenendosi a valori prossimi allo 0.



\* Normalizzato sul numero di cellule T stimulate da PMA/ionomicina

Figura 4.5: Andamento della risposta dei linfociti CD8<sup>+</sup> dopo ciascun inoculo

#### 4.7 Ig-G anti-HSV

Il test ELISA anti-HSV/IgG, descritto nel § 3.12, è stato eseguito sul siero dei tre topi maschi trattati con LAW34 e dei tre vaccinati con LAW34-gB1, sacrificati dopo ogni inoculo. Con il test è stata valutata la presenza di una risposta umorale, oltre a quella cellulo-mediata, in seguito a vaccinazione. Si

cercano le IgG, perchè, a differenza delle IgM che sono transitorie e vengono prodotte in basse quantità nella risposta primaria alle infezioni, compaiono più tardivamente, ma in quantità maggiori e mantengono titoli elevati a lungo.

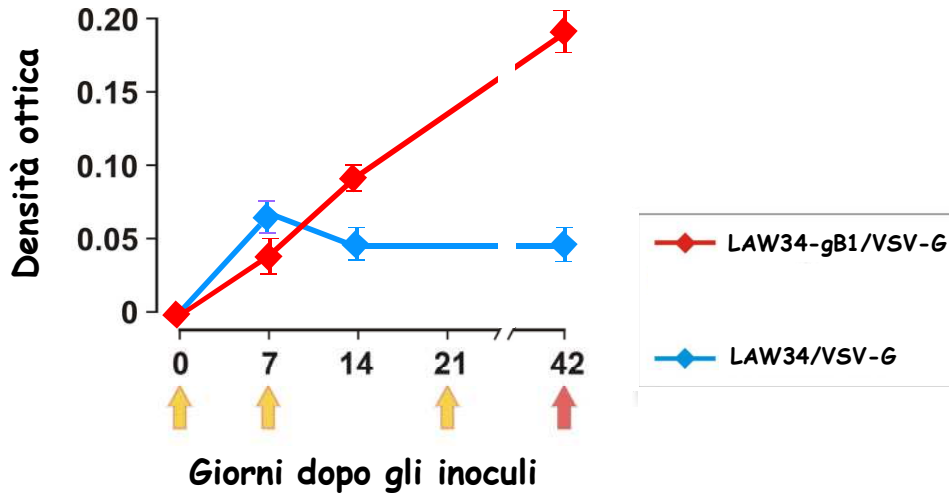


Figura 4.6: Andamento IgG anti-HSV-2 nel tempo

I topi vaccinati con il vettore esprime gB1 hanno dato una risposta IgG che aumenta con il numero di inoculi e nel tempo (Figura 4.6); nei topi inoculati con il vettore vuoto non si è avuto alcun incremento significativo. Si nota, infatti, come la curva dei LAW34-gB1 salga a partire dal tempo 0 e continui a salire successivamente per tutti i 42 giorni, a differenza della curva dei LAW34 in cui non si riscontrano aumenti significativi.

#### 4.8 Challenge e monitoraggio

A tre settimane dall'ultimo inoculo i gruppi LAW34 (*mock* vaccinati, 7 animali), LAW34-gB1 (vaccinati, 7 animali) e 10 femmine *naïve* sono state sfidate per via vaginale con  $2,5 \times 10^9$  PFU/ml di HSV-2 (cfr. § 4.4). Gli animali sono stati quindi monitorati a partire da una settimana fino a 25 giorni

dopo il *challenge*. Il grafico in figura 4.7 riporta la media dello *score* delle lesioni per ciascuno dei tre gruppi.

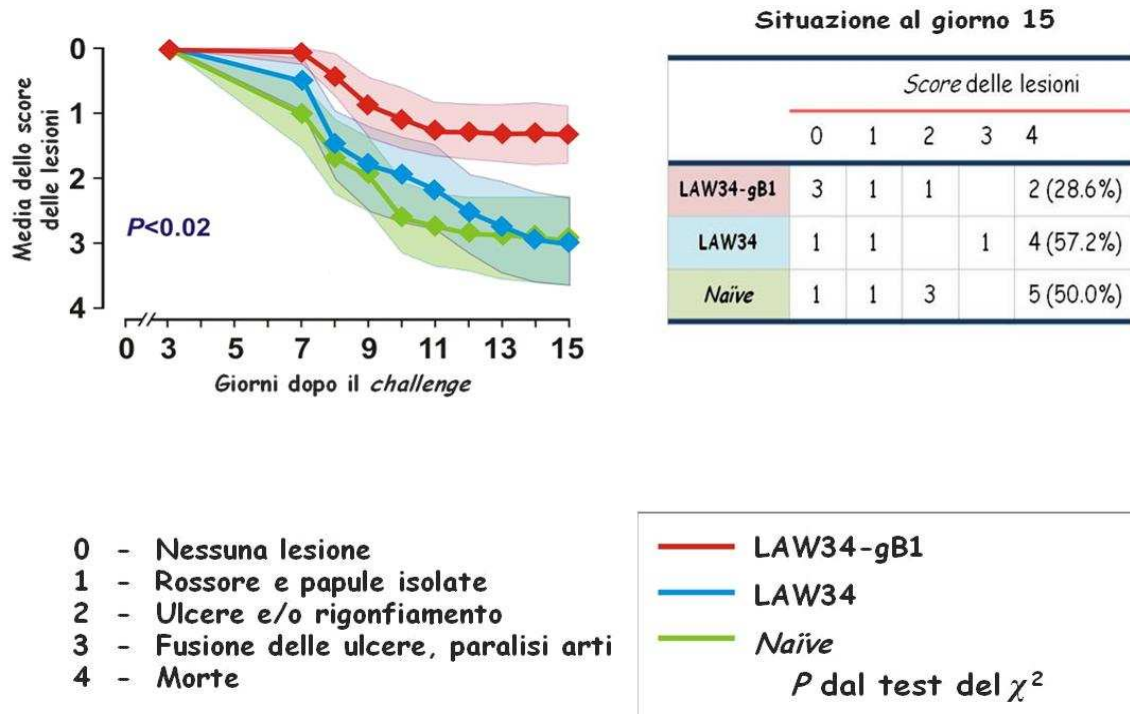


Figura 4.7: Evoluzione delle lesioni post-*challenge* con HSV-2

Già ad una settimana dal *challenge* nei topi *naïve* sono comparsi i segni tipici della malattia. Di questi 5/10 sono morti, 4/10 si sono ammalati e poi sono lentamente guariti e un solo topo non ha mai manifestato segni. Nel caso dei topi trattati con LAW34 5/7 sono morti, uno si è ammalato e uno è rimasto sano. Tra i vaccinati solo 2/7 sono morti, 2/7 si sono ammalati con sintomi comunque lievi e 3/7 sono rimasti sani, i sintomi inoltre sono comparsi più tardivamente rispetto agli altri due gruppi. Come si vede dal grafico, infatti, la curva dei LAW34-gB1 non si porta più in basso dello stadio 1, mentre le curve dei *naïve* e dei LAW34, che hanno un andamento simile, si portano anche un po' sotto lo stadio 2. La tabella della stessa figura riporta la situazione a 15 giorni dal *challenge* con il numero degli animali ai vari stadi

di malattia, si può notare una mortalità più bassa nei topi vaccinati rispetto agli animali di controllo.

#### 4.9 Risultati PCR post-*challenge*

Il tredicesimo giorno post-*challenge* sono stati eseguiti i tamponi vaginali da topi trattati con LAW34, vaccinati con LAW34-gB1 e da un *naïve*, quindi è stata eseguita una PCR *nested* (§ 3.13), volta a cercare il genoma di HSV-2 nei campioni. Lo scopo di questo test è stato quello di confermare *in vitro* i risultati delle osservazioni macroscopiche riguardanti la comparsa o meno della malattia negli animali. Come mostrato nella tabella in figura 4.8 nei topi che hanno manifestato la malattia, appartenenti a ciascun gruppo, la PCR ha dato esito positivo, tra questi è compreso anche il *naïve* di controllo. Nei topi vaccinati con LAW34-gB1 e risultati negativi al *challenge* la PCR non ha evidenziato presenza del virus, dando infatti esito negativo. Un topo trattato con LAW34 e negativo all'esame macroscopico è risultato negativo anche dopo PCR.

<b>Topi</b>	<b>Malattia</b>	<b>Esito PCR</b>
<i>Naïve</i> A	Sì	+
LAW34 A	Sì	+
LAW34 D	No	-
LAW34-gB1 E	Sì	+
LAW34-gB1 G	No	-

Figura 4.8: Tabella riassuntiva dell'esito della PCR comparata con la presenza o meno della malattia

#### 4.10 Western blot

Il *western blot* (§ 3.7) è stato effettuato su siero raccolto da topi sani, su cui era già stata effettuata la PCR, e sacrificati 24 giorni dopo il *challenge*, come antigene è stato utilizzato un lisato proteico di cellule VERO infettate da HSV-2. Un eventuale legame con antigeni virali presenti sulla superficie cellulare è stato poi evidenziato con anticorpo secondario marcato. Con questo test si è cercato di evidenziare la differente risposta anticorpale verso il virus in animali risultati negativi dopo il *challenge*, rispetto ad un controllo positivo e correlata alla vaccinazione. I risultati sono riassunti in tabella 4.9.

<b>Topi</b>	<b>Esito <i>western blot</i></b>
<i>Naïve</i> A	Anticorpi verso HSV-2
LAW34 D	Nessun anticorpo
LAW34-gB1 G	Anticorpi verso gB1

Figura 4.9: Tabella riassuntiva dei risultati del *western blot*

Nel topo vaccinato con LAW34-gB1 risultato negativo al *challenge* sono stati trovati anticorpi rivolti verso la sola gB vaccinale. Il topo di controllo vaccinato con il vettore vuoto (LAW34) e nel quale il *challenge* non ha attecchito (cfr. Figura 4.8) è risultato privo di anticorpi contro HSV-2. Al contrario il *naïve* di controllo, che ha contratto l'infezione, ha presentato invece, come atteso, anticorpi contro l'intero HSV-2.