



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Istologia, Microbiologia e Biotecnologie Mediche

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN BIOMEDICINA

CICLO XXIV

*Studi di immunogenicità ed efficacia di vettori HSV per lo
sviluppo di un vaccino contro l'infezione da
Herpes Simplex.*

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Giorgio Palù

Supervisore: Ch.mo Prof.ssa Antonella Caputo

Dottoranda: Mariaconcetta Sicurella

INDICE GENERALE

RIASSUNTO

ABSTRACT

1 HERPES SIMPLEX VIRUS

<i>1.1 Classificazione</i>	pag 1
<i>1.2 Struttura e organizzazione genomica di un virus dell'Herpes Simplex</i>	pag 2
<i>1.3 Ciclo replicativo</i>	pag 5
<i>1.4 Latenza</i>	pag 9
<i>1.5 Patologia e patogenesi</i>	pag 11
<i>1.6 Epidemiologia</i>	pag 12
<i>1.7 Risposta immune</i>	pag 14
<i>1.8 Terapia e profilassi</i>	pag 17

2 RAZIONALE PER UN VACCINO CONTRO L'INFEZIONE CAUSATA DA HSV

<i>2.1 Virus uccisi o inattivati</i>	pag 20
<i>2.2 Vaccini basati su peptidi</i>	pag 22
<i>2.3 Vaccini a subunità</i>	pag 23
<i>2.4 Vaccini basati su virus vivi</i>	pag 26
<i>2.5 Vaccini a DNA</i>	pag 28
<i>2.6 Vettori non replicativi a genoma plasmidico: Ampliconi</i>	pag 29

3 SCOPO DELLA RICERCA

4 MATERIALI E METODI

<i>4.1 Batteri e trasformazione batterica</i>	pag 33
<i>4.2 Terreni per batteri</i>	pag 33
<i>4.3 Estrazione del DNA plasmidico</i>	pag 34
<i>4.4 Estrazione del DNA plasmidico su piccola scala</i>	pag 34
<i>4.5 Estrazione del DNA plasmidico su larga scala</i>	pag 35
<i>4.6 Quantificazione del DNA</i>	pag 36
<i>4.7 Congelamento dei batteri</i>	pag 36
<i>4.8 Digestione con enzimi di restrizione</i>	pag 36
<i>4.9 Metodi generali di clonazione dei frammenti di DNA in plasmidi</i>	pag 37
<i>4.10 Linee cellulari</i>	pag 38

<i>4.11 Strategia generale per la creazione di vettori replicativi e non replicativi basati su HSV-1</i>	Pag38
<i>4.12 Costruzione di vettori replicativi e non replicativi basati su HSV-1</i>	pag 39
<i>4.13 Trasfezione con fosfato di calcio</i>	pag 40
<i>4.14 Limiting dilution</i>	pag 41
<i>4.15 Preparazione del DNA virale su piccola scala</i>	pag42
<i>4.16 Colorazione con cristal violetto</i>	pag 42
<i>4.17 Colorazione X-gal</i>	pag 43
<i>4.18 Analisi dell'espressione di EGFP (enhanced green fluorescent protein)</i>	pag 43
<i>4.19 Preparazione di stock virali</i>	pag 44
<i>4.20 Purificazione degli stock virali</i>	pag 44
<i>4.21 Western Blot per caratterizzare i virus replicativi</i>	pag 45
<i>4.22 Western Blot per caratterizzare i virus replicativi attenuati</i>	pag 46

5 ANIMALI E STABILIZZAZIONE

<i>5.1 Titolazione in vivo dei virus HSV-1 e HSV-2 wild-type</i>	pag 46
<i>5.2 Determinazione delle dosi ottimali di virus replicativo HSV1-LacZ o HSV1-Tat per il prime del sistema immune</i>	pag 46
<i>5.3 Protocolli sperimentali</i>	pag 46
<i>5.4 Prime intravaginale (i.vag) o intradermico (ID) con HSV1-LacZ o HSV1-Tat e challenge intravaginale con HSV-1 wild-type</i>	pag 46
<i>5.5 Prime intravaginale (i.vag) con HSV1-LacZ o HSV1-Tat e challenge intravaginale con HSV-2 wild-type</i>	pag 49
<i>5.6 Prime intradermico (ID) con HSV1-LacZ, in presenza o assenza della proteina Tat esogena, e challenge intravaginale con HSV-1 wild-type</i>	pag 50
<i>5.7 Prime/boost intravaginale (i.vag) con 10⁶ pfu del vettore non replicativo HSV1B5gJHE o HSV1B5gJTat e challenge intravaginale con HSV-1 wild-type</i>	pag 51
<i>5.8 Prime/boost intravaginale (i.vag) con 10⁷ pfu del vettore non replicativo HSV1B5gJHE o HSV1B5gJTat e challenge intravaginale con HSV-1 wild-type</i>	pag 52
<i>5.9 Prelievo oculare</i>	pag 53
<i>5.10 Lavaggi vaginali</i>	pag 54
<i>5.11 Peptidi di HSV</i>	pag 54
<i>5.12 Proteina TAT</i>	pag 54
<i>5.13 Purificazione degli splenociti</i>	pag 54

6 ANALISI DELLE RISPOSTE CELLULARI E UMORALI ANTI-HSV

<i>6.1 Saggio Elispot</i>	pag 55
<i>6.2 Saggio ELISA</i>	pag 55
<i>6.3 Analisi dell'isotipo IgG</i>	pag 57
<i>6.4 Analisi della presenza di IgA</i>	pag 57

7 RISULTATI

<i>7.1 Costruzione del vettore replicativo attenuato ed analisi dell'espressione della proteina Tat</i>	pag 59
<i>7.2 Costruzione del vettore HSVTB5gJHE non replicativo</i>	pag 60
<i>7.3 Costruzione del vettore HSVTB5gJTat non replicativo</i>	pag 62
<i>7.4 Determinazione della dose letale di virus HSV-1 e HSV-2 wild-type da utilizzare in vivo negli esperimenti di challenge</i>	pag 63
<i>7.5 Determinazione della dose di HSV1-LacZ e HSV1-Tat per il prime della risposta immune HSV-1 specidica</i>	pag 65
<i>7.6 La presenza di Tat nel vettore HSV migliora le risposte cellulari contro HSV-1</i>	pag 67
<i>7.7 La co-somministrazione della proteina Tat associata al vettore attenuato HSV1-Lac Z migliora le risposte cellulari contro HSV-1</i>	pag 70
<i>7.8 La presenza di Tat migliora la risposta anticorpale contro HSV-1</i>	pag 71
<i>7.9 La presenza di Tat media la protezione da challenge letale contro HSV-1 wild-type</i>	pag 73
<i>7.10 La presenza di Tat media la protezione da challenge letale contro HSV-1 wild-type</i>	pag 76
<i>7.11 La presenza di Tat nel vettore HSV non replicativo media la protezione da challenge letale contro HSV-1 wild-type</i>	pag 78

8 DISCUSSIONE	pag 82
----------------------	--------

9 RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI	pag 85
------------------------------------	--------

Introduzione

Herpes simplex virus (HSV) è un patogeno molto diffuso nella popolazione mondiale umana. Il virus utilizza le cellule epiteliali come portale d'ingresso, in tali cellule replica e raggiunge le terminazioni nervose, nelle quali instaura la latenza. I due genotipi HSV-1 e HSV-2 possono causare diverse patologie cliniche, compresi l'herpes labiale, cheratiti, meningiti, encefaliti e infezioni genitali, caratterizzate da dolore, ulcere e aumento del rischio di sviluppare il cancro del collo dell'utero e l'acquisizione di altre infezioni sessualmente trasmissibili, tra cui l'infezione da HIV. Negli ultimi 30 anni diversi studi sono stati dedicati allo sviluppo di vaccini anti-HSV. Purtroppo, e nonostante numerosi tentativi, un vaccino anti-HSV non è ancora disponibile. Per la realizzazione del vaccino sono stati proposti e sperimentati diversi sistemi: Adenovirus, vaccinia virus, virus ricombinanti esprimenti le glicoproteine di HSV, virus vivi attenuati, ma nessuno a portato ai risultati sperati. L'identificazione di adiuvanti in grado di promuovere dei segnali atti a favorire l'emergere di una risposta immunitaria Th1 non solo contro epitopi dominanti, ma anche contro epitopi subdominanti, che sono cruciali per bloccare la riattivazione virale è un punto chiave per lo sviluppo di nuove strategie di vaccino contro l'infezione da HSV.

Scopo

In questo studio l'obiettivo principale è stato quello di costruire e caratterizzare in vitro e in vivo dei vettori HSV a replicazione attenuata e non replicativi deleti di più geni regolatori precoci e/o contenenti una delezione del locus non essenziali U_L41. Abbiamo studiato la capacità di vettori replicativi e non di codificare per la proteina Tat di HIV-1, per indurre risposte immunitarie HSV-specifiche a lungo termine in un modello murino. In questo contesto, abbiamo valutato se la proteina Tat di HIV-1 potesse agire come molecola in grado di generare un'immunità ad ampio spettro contro l'infezione da HSV. Inoltre è stata valutata la capacità dei vettori (HSV1-Tat o HSV1-LacZ, HSV1-TB5gJTat o HSV1-TB5gJHE) di indurre una risposta immunitaria protettiva nei topi Balb/C e C57BL/6 in seguito ad un'infezione con una dose letale di HSV-1 o HSV-2 wild-type.

Metodi

Costruzione e Caratterizzazione dei vettori replicativi attenuati e non replicativi, Colture cellulari, Analisi Western Blot, Purificazione di stock virali, Animali e protocolli di immunizzazione, Purificazione degli splenociti, Saggio Elispot, Saggio ELISA.

Risultati

I vettori HSV replicativi attenuati e non replicativi conservano la capacità di infettare cellule in divisione e non di diverse specie, comportandosi come virus wild-type, ma risultano più sicuri a causa della loro incapacità di replicare e esprimere proteine virali dopo l'infezione. I risultati indicano che la proteina Tat svolge un ruolo importante nel conferire protezione immunitaria contro l'infezione da HSV in entrambi i ceppi di topi in quanto solo i topi vaccinati con i vettori replicativi attenuati (HSV1-Tat) o non replicativi (HSVTB5gJTat) esprimenti Tat risultavano protetti dalla morte dopo aver ricevuto una dose letale di HSV-1 o HSV-2 wild-type. La somministrazione dei vettori per via intravaginale o intradermica genera specifiche risposte immunitarie nei topi, media un incremento della risposta cellulare anti-HSV caratterizzata dalla presenza di alti livelli di IFN- γ , un incremento della risposta umorale anti-HSV rispetto al vettore di controllo (HSV1LVLacZ) caratterizzato dalla presenza di elevati livelli di IgG, più precisamente del sottotipo IgG2a. Questo lavoro dimostra che i vettori HSV associati alla proteina ricombinante Tat di HIV possono essere combinati per aumentare e ampliare la risposta di tipo Th1 e CTL contro epitopi immunodominanti e subdominanti di HSV. I nostri risultati indicano che la co-espressione della proteina Tat è importante per indurre una risposta protettiva in entrambi i modelli murini scelti, anche se le risposte sono diverse a seconda del background genetico. In questi topi la risposta immunitaria contro epitopi subdominanti di HSV è risultata essere fondamentale per indurre una maggiore protezione

Conclusione

Questi studi indicano che l'utilizzo di vettori replicativi attenuati e non replicativi di HSV esprimenti la proteina Tat sono sicuri, in quanto non hanno mostrato effetti avversi durante gli esperimenti e al sacrificio. Questi risultati sono molto promettenti per lo sviluppo di una nuova generazione di vaccini efficaci HSV.

Introduction

Herpes simplex virus (HSV) is a relevant human pathogen widespread in the human population worldwide. The virus multiplies in the epithelial cells at the portal of entry, infects sensory nerve endings innervating the site of multiplication, where it establishes a latent infection. HSV-1 and HSV-2 genotypes can cause a variety of recurrent clinical illnesses including cold sores, keratitis, meningitis, encephalitis and genital infections that are characterized by pain, ulceration and increased risk of developing cervical cancer and acquiring other sexually transmitted infections, including HIV infection. In the last, 30 years several studies were devoted to the development of anti-HSV vaccines. Unfortunately, and in spite of numerous attempts with recombinant non-replicating viral vectors based on HSV, Adenovirus, vaccinia virus, recombinant HSV glycoproteins, attenuated live viruses, no anti-HSV vaccine is still available. Identification of adjuvants that can promote Th1 immune response induction, not only against dominant epitopes but also against subdominant epitopes, is a key point for the development of novel vaccine strategies against HSV infection.

Aim

In the present study, we describe the construction and the *in vitro* and *in vivo* characterization of a replication-defective or non-replicative HSV-1-based vectors deleted of multiple immediate early regulatory genes and containing a deletion in the non essential U_L41 locus. We investigated the ability of a recombinant replication-defective or non replicative HSV-1 vectors encoding the HIV-1 Tat protein to induce long-term HSV-specific immune responses in a murine model. In this context, in the present study we have investigated whether the HIV-1 Tat protein may act as the molecule capable of inducing such broad and protective immunity against HSV. The ability of the vectors (HSV1-Tat or HSV1-LacZ, HSVTB5gJTat or HSVTB5gJHE) to elicit protective immune responses in Balb/C and C57BL/6 mice upon challenge with wild-type HSV-1 or HSV-2 will be described.

Method

Generation of recombinant replication-defective or non replicative HSV-1 vectors, Western blot analysis, virus stock purification, immunization protocols, splenocyte purification, Elispot assay, ELISA assay.

Results

The replication-defective or non-replicative HSV-1 vectors maintain the capacity to infect both dividing and non dividing cells of different species. They are safer compare to wild-type herpes virus because they are unable to replicate. The results indicate that Tat plays a major role in conferring protective immune-responses against HSV infection in both mice strains since only mice primed with the live attenuated (HSV1-Tat) or non replicative (HSVTB5gJTat) vectors, were protected from death after receiving a lethal dose of wild-type HSV-1 or HSV-2. The vectors administration by the intravaginally or intradermic route elicit specific immune responses in mice, mediating an increase of anti-HSV cellular immune responses characterized by the presence of high levels of IFN- γ . Moreover the vectors mediate an increase of anti-HSV humoral immune responses, as compared to control (HSV1LVLacZ) vector, characterized by the presence of high levels IgG, subtype IgG2a. This work demonstrates that HSV recombinant vectors and HIV Tat protein, selected for this study, can be combined to increase and broad Th1-like and CTL responses against HSV epitopes. Our results indicate that the co-expression of Tat protein is important to induce a protective response in both mice strain even if the responses are different depending on the genetic background. In these mice stronger and broader immune responses against HSV subdominant epitopes are crucial for protection from death.

Conclusion

This study shows that the replicative or non replicative vectors expressing Tat are safe since no adverse effects were observed during the experimental protocols. These outcomes are very promising for the development of a novel generation of effective HSV vaccines.

1 HERPES SIMPLEX VIRUS

1.1 Classificazione

Gli herpes virus costituiscono una numerosa famiglia di virus a DNA (Herpes-viridae) in grado di infettare sia l'uomo sia diverse specie animali. Attualmente sono stati caratterizzati più di 100 virus appartenenti a tale famiglia, otto dei quali in grado di infettare naturalmente l'uomo. Gli Herpesvirus sono stati raggruppati in tre sottofamiglie (α , β , γ), diversificate in base alla struttura del genoma, al tropismo tissutale, alla citopatologia e alla sede di infezione latente.

La sottofamiglia degli α Herpesvirus comprende:

- il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (*HSV-1*) normalmente associato ad infezioni oro-facciali ed encefaliti;
- il virus dell'herpes simplex di tipo 2 (*HSV-2*) associato ad infezioni di tipo genitale o trasmesse verticalmente da madre a figlio;
- il virus dell'herpes umano di tipo 3 (*virus della varicella zoster, VZV*), agente eziologico della varicella e dell'herpes-zoster.

La sottofamiglia dei β Herpesvirus comprende:

- i virus dell'herpes umano di tipo 5 (*Citomegalovirus*), 6 e 7 (*HHV-6 e HHV-7*).

La sottofamiglia dei γ Herpesvirus comprende:

- il virus dell'herpes umano di tipo 4 (*virus di Epstein-Barr*), agente eziologico della mononucleosi infettiva e il virus dell'herpes umano di tipo 8 (*HHV-8 o virus di Kaposi*)¹.

Tutti gli herpes virus conosciuti hanno caratteristiche biologiche comuni quali:

- capacità di codificare un ampio numero di enzimi coinvolti nel metabolismo degli acidi nucleici, nella sintesi del DNA e nella sintesi e modificazione post-traduzionale delle proteine;
- sintesi del DNA virale e assemblaggio del capsido nel nucleo della cellula;
- lisi della cellula infettata come esito della infezione produttiva;

- capacità di stabilire infezione latente² durante la quale il genoma virale assume la forma di molecola circolare (stato episomale), solo una parte dei geni virali viene espressa e ciò si traduce in infezione produttiva dando, nel caso delle infezioni causate da HSV-1, HSV-2 e VZV, lesioni recidivanti localizzate vicino al sito di infezione primaria.

1.2 Struttura e organizzazione genomica di un virus herpes simplex

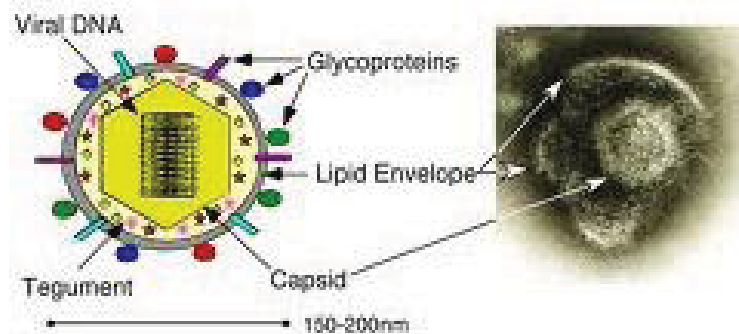


Figura 1: Rappresentazione schematica della struttura di un virus erpetico (pannello di sinistra) ed immagine al microscopio elettronico di una particella virale (pannello di destra).

Gli herpes virus sono tra i più grandi e complessi virus animali. Il virione maturo degli HSV-1 e HSV-2 ha una dimensione che varia dai 150 ai 200 nm. Le particelle virali degli HSV (Fig. 1) sono costituite da quattro elementi morfologici fondamentali³, rappresentati dall'esterno verso l'interno da:

- un pericapside (envelope) che costituisce il rivestimento esterno, ed è composto da un doppio strato lipidico, derivante dalla membrana cellulare, in cui sono inserite varie glicoproteine virali, responsabili del legame con specifici recettori cellulari e della penetrazione del virus nel citoplasma⁴;
- il tegumento che è composto da una matrice proteica di 12 proteine virali, alcune delle quali responsabili dell'induzione dei geni virali⁵, dello shutt-off delle proteine dell'ospite⁶ e dell'assemblaggio del virione;
- il capsid che rappresenta una struttura simmetrica icosaedrica formata da 162 capsomeri (150 esoni e 12 pentoni), circondato dal tegumento e contenenti il "core";

- il core che rappresenta una struttura proteica centrale associata al genoma virale costituito da DNA a doppia elica (dsDNA).

Il genoma degli HSV è costituito da una molecola lineare di DNA bicatenario lungo circa 152Kb e con un peso molecolare di 96×10^6 DA, che circularizza al momento della sua entrata nel nucleo. Il genoma presenta due sequenze uniche, una lunga ed una corta chiamate, rispettivamente, U_L e U_S (Unique Long e Unique Short), separate da sequenze interne ripetute, denominate IR_L e IR_S (Internal Repeats long e short). Queste ultime sono invertite rispetto alle sequenze ripetute poste all'estremità 5' e 3' del genoma, denominate TR_L e TR_S (Terminal Repeats long e short), che interagiscono tra loro al momento della circularizzazione del genoma⁴. Il genoma comprende almeno 84 geni, dei quali ICP0, ICP4, ICP34.5 e LAT mappano nelle sequenze ripetute e sono presenti in duplice copia. Tra gli 84 geni 38 sono “essenziali” per la replicazione virale e 46 sono “non essenziali”, o accessori, per la replicazione in vitro, perché l'eventuale mancanza di questi geni non interferisce con il processo replicativo (Fig. 2).

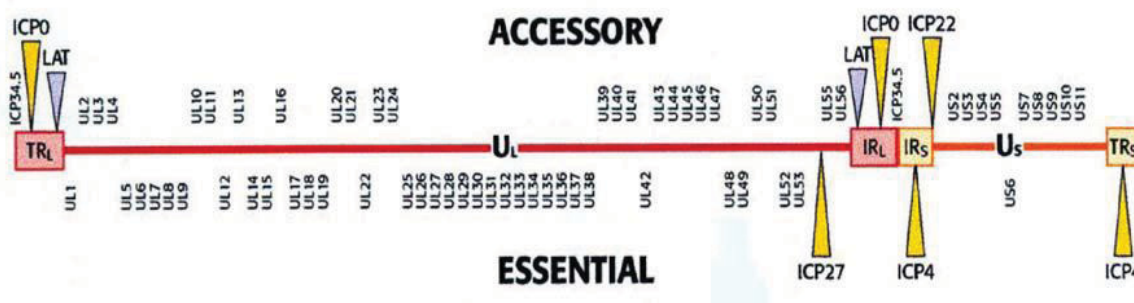


Figura 2: Rappresentazione schematica dell'organizzazione genomica di un HSV.

Tra i geni essenziali per la replicazione sono inclusi quelli codificanti per le glicoproteine pericapsidiche gB, gD e l'etero-dimero gH-gL responsabili dell'entrata e della penetrazione di HSV all'interno della cellula, al contrario della glicoproteina pericapsidica gC che è invece codificata da un gene accessorio. L'espressione genica di HSV è regolata in modo ordinato e sequenziale secondo un meccanismo di regolazione a cascata. In base alla cinetica di espressione i geni di HSV possono essere suddivisi in tre classi:

- I geni α o precocissimi (*Immediate Early-IE*), codificanti le proteine ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47, i cui prodotti (ad eccezione di ICP47) sono proteine transattivanti che permettono l'espressione dei geni β .
- I geni β o precoci (*Early-E*), estremamente eterogenei perché codificanti in parte le proteine necessarie per la replicazione del genoma virale, ed in parte proteine transattivanti che permettono l'espressione di geni γ e delle prime proteine strutturali.
- I geni γ o tardivi (*Late-L*), codificanti proteine prevalentemente strutturali, classificati in γ_1 e γ_2 , di cui i geni:
 - γ_1 sono espressi indipendentemente dalla replicazione virale. (ad esempio i geni codificanti le glicoproteine B e D ed il gene codificante la proteina ICP34.5);
 - γ_2 vengono espressi solo dopo la replicazione virale (ad esempio il gene codificante la glicoproteina C).

1.3 Ciclo replicativo di HSV

Il principale target cellulare dell'infezione causata da HSV è rappresentato dalle cellule epiteliali della cute e delle mucose. In queste cellule il virus instaura una infezione produttiva che porta alla produzione di nuova progenie virale. In particolare, una serie di passaggi portano dall'infezione della cellula da parte di HSV, alla replicazione e alla produzione di nuove particelle virali, che infetteranno altre cellule. Tali passaggi sono: adsorbimento, penetrazione, replicazione, assemblaggio e fuoriuscita. Le fasi di adsorbimento e di penetrazione del virus all'interno della cellula ospite coinvolgono alcune glicoproteine virali ed un certo numero di recettori di membrana⁵ come brevemente descritto di seguito.

- *La fase di adsorbimento* (Fig. 3) è mediata dalle glicoproteine presenti sul pericapside virale attraverso il legame con specifici recettori cellulari. In particolare, è stato dimostrato che le glicoproteine B e C (gB e gC) sono coinvolte nella fase iniziale di adsorbimento mediante interazione con glucosaminoglicani (GAG) localizzati sulla superficie cellulare e costituiti principalmente dall'eparan-solfato (HS), dal dermatan-solfato e dal condroitin-solfato⁶⁻⁷. Questo legame posiziona la particella virale sulla cellula in modo da facilitare un secondo legame a più alta affinità tra la gD e specifici recettori cellulari che appartengono a tre diverse classi molecolari. Il primo di tali recettori, denominato HVEM o HveA (herpes virus entry mediator), è un membro della famiglia di recettori per il Tumor necrosis factor (TNF/aNGF), ristretto solo ad alcuni tipi di cellule⁷. Il secondo tipo di recettori, chiamato HveC o nectina-1, è un membro della famiglia delle nectine, molecole di adesione intercellulare appartenenti alla superfamiglia delle immunoglobuline e ampiamente espressi da numerosi tipi cellulari⁸⁻⁹. Il terzo tipo di recettori è invece costituito dal 3-O-S HS, molecola derivata dall'attività enzimatica di alcune D-glucosaminil O-solfotransferasi presenti sull'HS⁸⁻¹⁰.

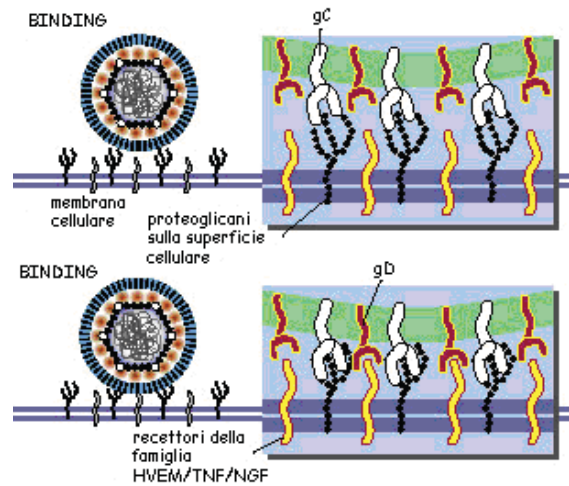


Figura 3: Rappresentazione schematica della fase di adsorbimento di un HSV sulla superficie cellulare.

- *La fase di penetrazione:* si svolge in seguito al legame dell'envelope con i recettori cellulari e consiste nella fusione del pericapside con la membrana cellulare, e conseguente liberazione del nucleocapside all'interno del citoplasma. La glicoproteina D (gD) è la principale responsabile del processo di fusione tra il pericapside virale e la membrana cellulare. Recenti studi biochimici e strutturali hanno, infatti, dimostrato che le due funzioni della gD, quali il legame con Hve e il meccanismo di fusione risiedono in domini differenti. Nel momento in cui la gD si lega al proprio recettore si verificano modificazioni nella sua struttura che la portano ad interagire con il complesso fusogeno costituito dalla glicoproteina B (gB) e dall'etero-dimero gH-gL, innescando così la fusione del pericapside con la membrana cellulare⁸⁻¹¹. Dopo la fusione dell'envelope con la membrana cellulare il nucleocapside è inoculato nel citoplasma.

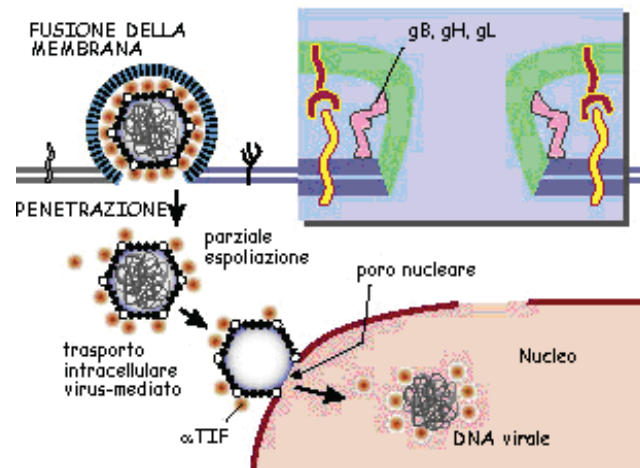


Figura 4: Rappresentazione schematica del processo di fusione dell'envlope di un virus erpetico con la membrana cellulare ed ingresso del virus nella cellula.

- *La fase di replicazione e trascrizione:* si verifica dopo la penetrazione del nucleocapside nel citoplasma e il suo trasporto in corrispondenza dei pori nucleari dove avviene la liberazione del genoma virale all'interno del nucleo. In questa sede avvengono la trascrizione e la replicazione del DNA virale. Quest'ultima si realizza secondo il modello di cerchio rotante, portando alla formazione di strutture concatameriche che sono poi suddivise in monomeri, ciascuno dei quali è impacchettato all'interno dei capsidi. Il DNA virale è trascritto dall'RNA polimerasi II dell'ospite, ma con la partecipazione di fattori virali a tutti gli stadi dell'infezione.

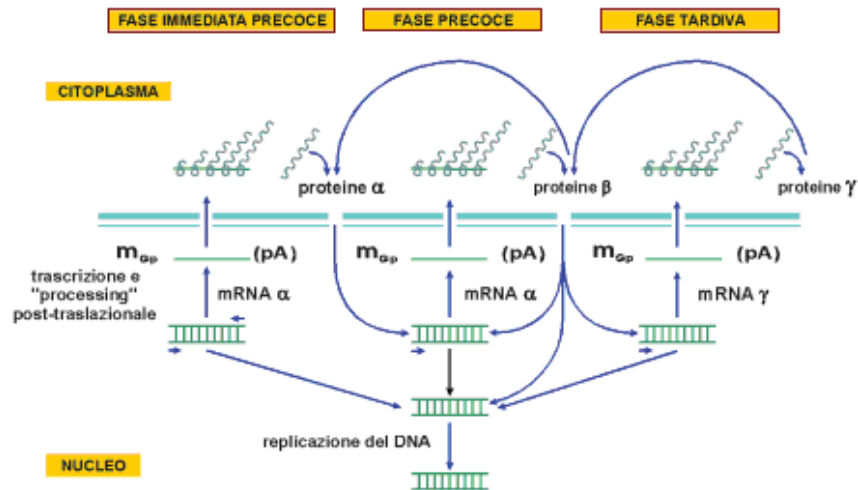


Figura 5: Rappresentazione schematica del processo a cascata di trascrizione del DNA virale.

- *L'assemblaggio:* dei virioni avviene nel nucleo della cellula ospite con l'inserimento del DNA virale di neosintesi nei capsidi vuoti preformati. I nucleocapsidi acquisiscono, infine, l'involucro pericapsidico e gemmano attraverso le membrane nucleari modificate dall'inserzione di specifiche glicoproteine virali. A questo punto le particelle virali mature escono per escitosi dal nucleo, attraverso il reticolo endoplasmatico e l'apparato del Golgi, lasciando la cellula infettata. Il processo di replicazione si completa dopo circa 18 ore con la lisi della cellula infettata³⁻⁴.

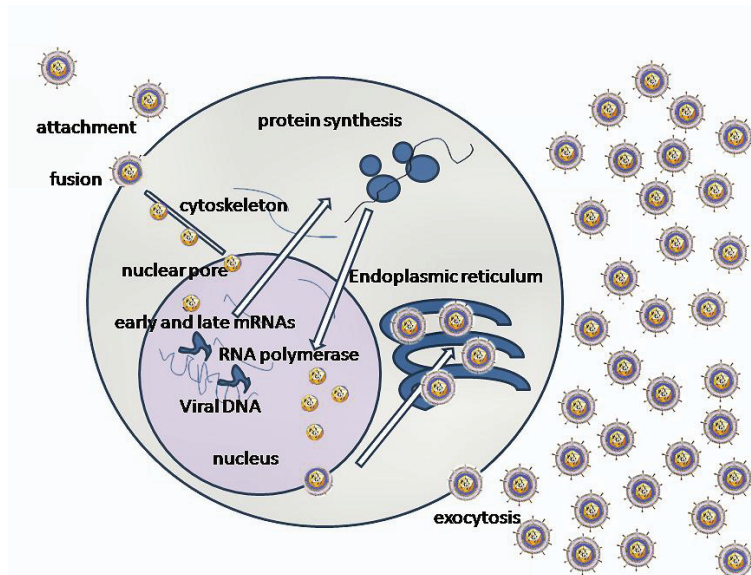


Figura 6: Rappresentazione schematica del processo di assemblaggio e di fuoriuscita dei virioni di HSV dalla cellula infettata.

1.4 Latenza

Dopo l'infezione primaria, HSV persiste nell'organismo in uno stato di latenza. Durante l'infezione primaria, infatti, alcune particelle di virus prodotto e rilasciato dalle cellule epiteliali infettano le terminazioni nervose dei nervi sensitivi che innervano la zona di cute e di mucosa in cui si è stabilita l'infezione virale. In questo tipo di cellula il virus non essendo in grado di replicarsi attivamente, come nella cellula epiteliale né di instaurare una infezione produttiva, stabilisce una infezione latente. Il virus percorre in senso centripeto gli assoni dei nervi periferici e raggiunge i gangli sensitivi stabilendo l'infezione latente nei neuroni gangliari¹². Generalmente HSV-1 si localizza a livello del ganglio trigemino e cervicale, mentre HSV-2 nei gangli sacrali. Durante lo stato di latenza il genoma virale è associato agli istoni senza interagire con il genoma dell'ospite e non è espresso, ad eccezione dei geni associati alla latenza (geni LAT). In presenza di determinati stimoli, sia ambientali, come l'esposizione prolungata ai raggi UV, sia soggettivi, come fattori ormonali, stress, malattie febbrili, temporanea immunosoppressione, interventi chirurgici a carico della sede neurologica della latenza, in una frazione dei neuroni che ospitano l'infezione latente, il virus può essere riattivato e dar luogo ad un ciclo completo di replicazione con la produzione di progenie virale infettante. Il virus prodotto in seguito a riattivazione migra in direzione centrifuga, lungo le terminazioni nervose, sino a raggiungere le zone cutanee o mucose sede dell'infezione primaria. A seconda dello stato di integrità funzionale del sistema immunitario

dell'ospite, l'infezione che ne risulta può essere rapidamente dominata e risultare clinicamente inapparente (anche se si accompagna quasi sempre alla eliminazione di virus infettante dalle superfici mucose), oppure presentarsi in forma sintomatica e nei soggetti immunodepressi, può dare luogo a forme disseminate anche con esito fatale. La frequenza di riattivazione sembra correlata alla gravità dell'infezione primaria e presumibilmente, al numero dei neuroni infetti latentemente.

Come anticipato prima, durante la latenza non si ha trascrizione del genoma virale poiché questa attività è impedita dalla conformazione circolare (forma episomiale) complessa assunta dal DNA in associazione con gli istoni. Vengono però trascritti alcuni messaggeri i cui geni si trovano nelle sequenze palindromiche che fiancheggiano la regione U_L (trascritti del gene LAT (*Latency Associated Transcript*)), che giocano un ruolo importante nell'efficienza con cui si instaura lo stato di latenza¹³. Essi sono parzialmente sovrapposti e in antisenso rispetto al gene precocissimo ICP0 e si pensa siano in grado di sequestrare la proteina ICP0, fondamentale per l'attivazione della trascrizione del genoma virale.

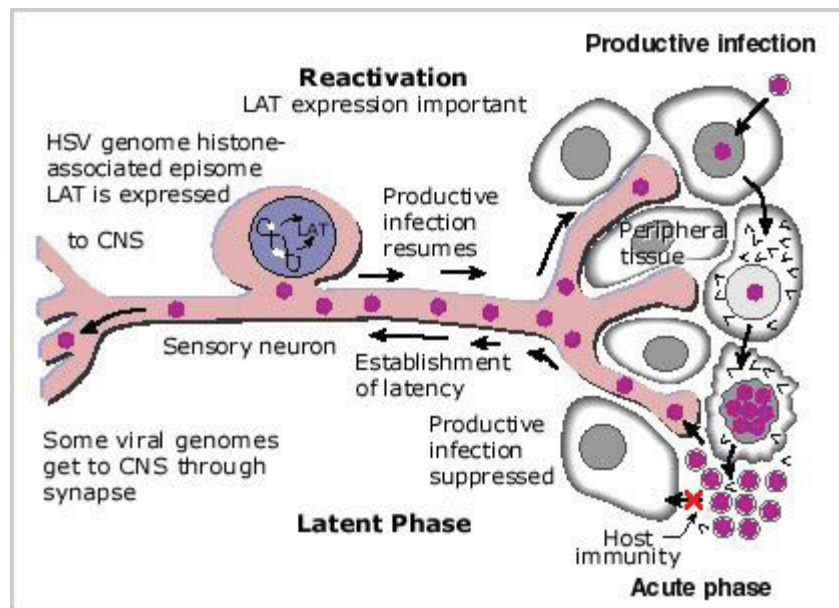


Figura 7: Rappresentazione schematica del ciclo di latenza di HSV.

1.5 Patologia e Patogenesi

La trasmissione del virus avviene per contatto diretto. L'infezione primaria causata da HSV-1 si verifica normalmente in bambini di età compresa tra i 6 e i 18 mesi e nella maggior parte dei casi è asintomatica. Tuttavia, nel 10%-15% dei soggetti l'infezione primaria è sintomatica e si manifesta come infezione dell'orofaringe (gengivo-stomatite erpetica) caratterizzata dalla presenza di vescicole multiple sulla mucosa orale e nella porzione interna del labbro, e più raramente come infezione oculare (cherato-congiuntivite erpetica). Durante l'infezione primaria, lesioni vescicolari sono osservabili, seppur raramente, in altre regioni, quali le narici, l'esofago, i genitali esterni, l'uretra o sedi di traumi. Il fluido vescicolare contiene molte particelle virali, detriti cellulari, cellule infiammatorie e spesso anche cellule giganti multinucleate. All'interno delle cellule infettate si verifica un addensamento cromatinico con successiva degenerazione dei nuclei cellulari, soprattutto nelle cellule parabasali ed intermedie dell'epitelio. I siti comuni d'infezione sono le cellule epiteliali della cute e delle mucose per entrambi i virus (HSV-1 e HSV-2). L'area coinvolta solitamente è localizzata. In molti pazienti le vescicole persistono solo 48 ore, mentre in altri individui le lesioni durano più a lungo, anche oltre le 72-96 ore, ed evolvono in pustole o ulcere. Le lesioni oro-labiale sono precedute da dolore, bruciore, formicolio, prurito solo agli esordi dell'infezione e questi sintomi diminuiscono rapidamente in 96-120 ore¹⁴⁻¹⁵. Allo stesso modo, la liberazione di virus dalle lesioni diminuisce progressivamente, la guarigione avviene in 2 o 3 giorni e la ristabilizzazione completa si ha generalmente in 8-10 giorni. Mentre le ulcere orali rappresentano i segni dell'infezione primaria, le lesioni alle labbra suggeriscono una riattivazione virale (Fig. 8)¹⁶⁻¹⁷. La frequenza di riattivazione varia da soggetto a soggetto. Infine, l'infezione con HSV-1 può generare dermatiti, eczema erpetico, eritema multiforme, e più raramente può essere a carico dell'encefalo (spesso a partenza da una lesione oculare) dove causa lesioni-necrotico-emorragiche che possono portare a morte o a danni neurologici permanenti. Per quanto riguarda l'infezione causata da HSV-2, essa è spesso a trasmissione sessuale e, quindi, generalmente tipica dell'età adulta. Nel caso della patologia genitale, la manifestazione clinica più grave si ha durante l'infezione primaria associata a lesioni nelle mucose genitali, caratterizzate da vescicole, pustole ed ulcere. La durata media delle lesioni è di 3 settimane. L'infezione primaria è caratterizzata da una grande produzione di particelle virali e da un periodo di rilascio del virus che può perdurare anche per settimane. In questa fase si può avere febbre, adenopatia inguinale, malessere, parestesia e disestesia delle estremità inferiori e del perineo.

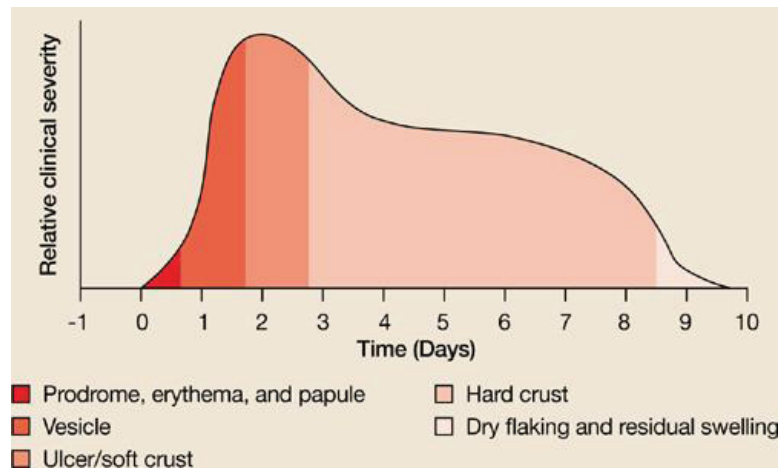


Figura 8: Progressione dell'infezione causata da HSV associata alle manifestazioni cliniche.

Clinicamente l'infezione primaria nella donna è in genere più grave e spesso associata a complicazioni diverse. Normalmente l'infezione genitale viene trasmessa durante i rapporti sessuali, in cui il partner non manifesta i sintomi dell'infezione. Nel caso in cui l'infezione primaria avvenga in gravidanza, si può trasmettere al neonato durante il passaggio nel canale del parto. L'infezione neonatale può causare nel neonato gravi forme di infezione erpetica generalizzata, infezioni oculari ed inoltre può essere causa di encefaliti e meningiti.

I pazienti immuno-compromessi come ad esempio quelli che hanno ricevuto un trapianto d'organo sono particolarmente a rischio, in quanto l'infezione da herpes simplex può causare patologie molto gravi che coinvolgono il tratto respiratorio, esofageo ed il tratto gastrointestinale. In questi soggetti inoltre una forte infezione da HSV-1 a livello del sistema nervoso può causare meningiti e mieliti, portando spesso alla morte del paziente.

1.6 Epidemiologia

I virus dell'Herpes simplex sono ubiquitari sia nei paesi industrializzati sia in quelli in via di sviluppo¹⁸. Più del 90% degli individui che vivono in aree sottosviluppate possiedono anticorpi specifici già all'età di due anni. Non sono presenti variazioni stagionali nell'incidenza dell'infezione. Essendo questi virus in grado di instaurare una infezione latente, oltre metà della popolazione mondiale è infetta ed è quindi potenzialmente in grado di trasmettere HSV¹⁹.

L'herpes genitale è una delle più frequenti malattie sessualmente trasmesse (STD) ed è in continuo aumento a causa della promiscuità sessuale, della elevata frequenza di infezioni asintomatiche e dello scarso utilizzo di protezioni sessuali. L'agente principale dell'herpes

genitale è l'HSV-2, ma il numero di casi di herpes genitale dovuto ad HSV-1 è in continua ascesa²⁰. Le infezioni genitali associate ad HSV-1 hanno comunque meno ricorrenze di quelle causate da HSV-2. L'herpes genitale è più frequente nelle donne rispetto agli uomini, essendo l'infezione diagnosticata approssimativamente in una donna su quattro rispetto agli uomini nei quali l'infezione genitale è rilevata in un uomo su cinque. Questa differenza può essere dovuta al fatto che la trasmissione uomo-donna sia più efficiente della trasmissione donna-uomo²¹. Da un'analisi dei pattern prodotti dai frammenti di DNA di HSV è stato dimostrato che un soggetto può essere infettato da più ceppi contemporaneamente²². Indipendentemente dal sesso del soggetto infettato, l'infezione causata da HSV-2 è associata ad un rischio tre volte maggiore di acquisire il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), a causa della rottura delle barriere epiteliali e dall'infiammazione dovuta all'infezione erpetica²³. Ciò suggerisce che, nelle aree di alta prevalenza di HSV-2, l'elevata proporzione di casi di AIDS (oltre il 47%), possa essere attribuita proprio ad una maggiore suscettibilità all'infezione da HIV in presenza di infezione erpetica genitale²⁴. Numerosi studi hanno dimostrato *in vitro* la capacità di HIV e HSV di attivarsi reciprocamente anche se in realtà non è noto se tale fenomeno si verifichi anche *in vivo*. In un recente studio è stato dimostrato che una terapia anti-HSV, basata sull'uso di valaciclovir, induce dei risultati positivi in soggetti con una doppia infezione (HSV-HIV). In particolare, il trattamento con valaciclovir riduceva i valori di plasma-viremia di HIV e la quantità media di virus nella sede genitale²⁵ in 68 donne trattate rispetto a 68 donne di controllo non trattate. Questi risultati suggeriscono che le terapie o i vaccini contro HSV potrebbero favorire la riduzione della trasmissione di HIV-1, soprattutto negli individui più esposti ad infezioni miste. A conferma di questa ipotesi, in un altro studio in cui sono stati determinati i fattori di rischio per la trasmissione di HIV in coppie sposate dell'Africa sub-sahariana è stato dimostrato che, tra i vari fattori analizzati, l'infezione causata da HSV-2 rappresenta l'unico fattore di rischio significativo in grado di aumentare la trasmissione di HIV in quanto generando lesioni genitali favorisce l'ingresso di HIV²⁶⁻²⁷.

1.7 Risposta Immune

L'evoluzione dell'infezione naturale causata da HSV è influenzata dai meccanismi di difesa specifici e non specifici dell'ospite. Il background genetico, l'attivazione di macrofagi, delle cellule natural killer (NK), di specifiche sottopopolazioni cellulari e di anticorpi, rappresentano i meccanismi di difesa più importanti per contrastare l'infezione²⁸. In seguito all'infezione virale si attivano due meccanismi di difesa immunitaria dei quali, in ordine temporale di comparsa, il primo è rappresentato dall'immunità innata ed è in grado di riconoscere, a bassa specificità, molecole comuni a diversi virus, mentre il secondo è rappresentato dall'immunità adattativa e comporta un meccanismo di riconoscimento più ricercato e flessibile, basato sulla variabilità di recettori presenti sui linfociti B e T in grado di riconoscere specifici motivi antigenici virali.

I principali mediatori cellulari dell'immunità innata sono i monociti e i macrofagi, i granulociti neutrofilici, le cellule natural killer (NK) e le cellule dendritiche (DC). Queste ultime svolgono un ruolo fondamentale e funzionano da ponte fra l'immunità innata e l'immunità adattativa. La risposta adattativa all'infezione da HSV comprende la risposta cellulare mediata da linfociti CD4⁺ e CD8⁺, la risposta umorale mediata dagli anticorpi. Le chemochine e le citochine svolgono un ruolo importante nel coordinamento e nello sviluppo della risposta immune, innata e adattativa, nei confronti di HSV. In particolare gli interferoni α e β , limitano la replicazione di HSV nelle prime fasi dell'infezione, mentre l'interferone γ e la presenza di CD4⁺ e CD8⁺ sono dei regolatori cruciali della "clearance" virale durante l'infezione acuta. La funzione specifica degli interferoni α e β è quella di inibire la replicazione virale nelle cellule, di impedirne la trasmissione ad altre cellule e di potenziare l'attività delle cellule preposte alle difese immunitarie, come quella dei linfociti T e dei macrofagi.

E' noto che HSV è trasmesso da persona a persona mediante delle lesioni sulla superficie della pelle. Teoricamente, anticorpi locali potrebbero neutralizzare il virus prima della sua penetrazione nella cellula ospite, evitando lo sviluppo di infezioni neuronali e la trasmissione orizzontale²⁹. Tuttavia, la risoluzione dell'infezione litica dipende ed è temporaneamente associata alle infiltrazioni delle cellule CD8 nella zona infettata, le quali hanno un ruolo fondamentale sia nel controllo dell'infezione durante lo stadio iniziale, sia nella soppressione e nel controllo della riattivazione virale. Nonostante l'immunità innata e adattativa svolgano un ruolo importante per il contenimento dell'infezione produttiva, esse non sono in grado né

di prevenire lo stabilizzarsi dell'infezione latente, in un numero variabile di neuroni gangliari, né la riattivazione virale.

Studi sulla risposta immune hanno dimostrato che chemochine come CXCL9 e CXCL10 sono potenti fattori chemiotattici per le cellule T attivate, le cellule NK, monociti, le cellule dendritiche e le cellule B.³⁰⁻³¹⁻³² Sia CXCL9 e CXCL10 si legano selettivamente al recettore CXCR3 che è altamente espresso sulle cellule T attivate, ed è essenziale per generare una risposta antivirale efficace contro molte infezioni virali, promuovendo una risposta Th1³³⁻³⁴ (Fig. 9). Molte chemochine e i loro recettori sono espressi in modo tessuto specifico³⁵⁻³⁶. Diverse ricerche hanno dimostrato che CXCL10 è espressa nelle prime fasi di risposta alle infezioni virali nel sistema nervoso centrale (SNC)³²⁻³³. L'espressione iniziale di CXCL10 nei tessuti infetti è fondamentale per il reclutamento di cellule effettrici (NK e le cellule T). Infatti, in alcuni studi è stato osservato che CXCL10 ma non CXCL9 è espresso ad alti livelli fino a 24 ore dopo l'infezione, al contrario, CXCL9 ma non CXCL10 aumentava in modo significativo dopo 72 ore all'interno dei linfonodi drenanti in seguito all'infezione genitale con HSV-2. Per dimostrare quanto detto sono stati condotti studi di confronto tra topi deleti del CXCL9 (CXCL9-/-) e CXCL10 (CXCL10-/-) con topi wild type per valutare la resistenza all'infezione con HSV-2, concentrandosi sulla risposta infiammatoria immunitaria, l'analisi fenotipica dei leucociti, e l'analisi funzionale delle cellule effettrici. I risultati suggeriscono che l'espressione sia di CXCL9 che di CXCL10 è necessaria per il richiamo ottimale di cellule NK e CTL.

Gli HSV però hanno evoluto diversi meccanismi per poter eludere le risposte immuni innate e adattative. In *vitro* è stato osservato che HSV è in grado di ridurre la maturazione, l'espressione di molecole costimolatorie e la capacità di presentazione antigenica delle cellule dendritiche. Inoltre, HSV è in grado di:

- evadere l'azione dell'IFN- α , utilizzando la proteina *vhs*, la quale antagonizza gli effetti antivirali dell'IFN- α favorendo un'accelerazione del turnover dell'IFN- α ;
- infettare una grande varietà di cellule immunocompetenti, inducendo quello che viene definito "fratricidio" in cui le cellule T infettate vengono lisate da CTL specifici per HSV, alterando in questo modo l'omeostasi e la risposta CTL verso HSV;

- inibire la presentazione antigenica sia degli HLA di classe I sia di quelli di classe II, attraverso l'interazione del prodotto genico US12 (ICP47) con il trasportatore associato alla presentazione antigenica (TAP).

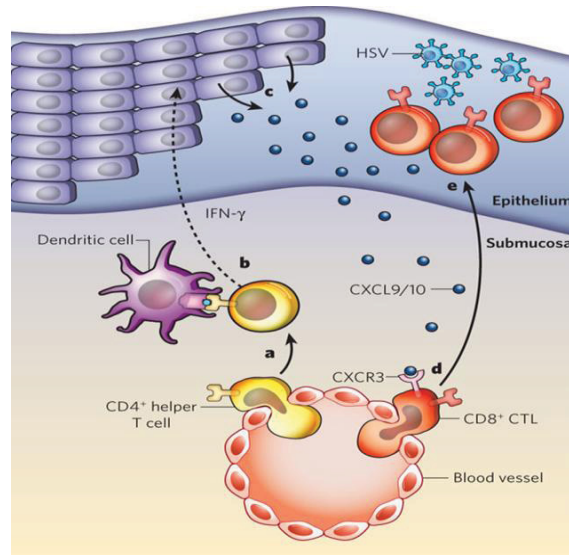


Figura 9: Attivazione della risposta immunitaria in seguito ad infezione con HSV.

1.8 Terapia e Profilassi

La maggior parte delle infezioni da HSV sono auto-limitanti. Tuttavia la terapia antivirale riduce la durata dei sintomi e può prevenire la disseminazione e la trasmissione del virus. Esistono diversi farmaci ad azione anti-erpetica a base di analoghi dei nucleosidi. Molti di questi farmaci sono ad alta specificità per il virus in quanto sfruttano la trasformazione del pro-farmaco in farmaco attivo da parte dell'enzima timidina chinasi virale. In questo modo il pro-farmaco è attivato unicamente nelle cellule infettate, e pertanto gli effetti collaterali della terapia sono molto ridotti³⁷.

L'analogo dei nucleosidi più utilizzato è l'aciclo-guanosina (acyclovir). Tuttavia esistono diversi farmaci approvati come, ad esempio, il gancyclovir e il valacyclovir che hanno lo stesso meccanismo d'azione³⁸. Dopo somministrazione, la molecola penetra nella cellula infetta e viene attivata dall'enzima virale timidina chinasi che mono-fosforila il farmaco. Successivamente, l'aciclovir- monofosfato viene fosforilato prima nella forma bifosfato e poi nella trifosfato dalle chinasi della cellula ospite. L'aciclovir trifosfato blocca in modo competitivo la polimerasi del DNA virale ed esplica la sua azione farmacologica attraverso l'inibizione della sintesi e della replicazione del virus. Il farmaco attivato si sostituisce alla desossi-guanosina-trifosfato, che il virus utilizza normalmente per duplicare il DNA bloccando l'allungamento della catena (Fig.10). Sebbene i virus erpetici siano geneticamente stabili, tuttavia è stato osservato che la terapia, specialmente se prolungata nel tempo, con questi farmaci può indurre l'insorgenza e la selezione di mutanti resistenti. È importante sottolineare il fatto che questi farmaci agiscono solo contro il virus durante l'infezione produttiva mentre sono del tutto inefficaci contro il virus latente e non sono in grado di impedirne la riattivazione.

Altri farmaci ad azione anti-erpetica sono rappresentati, ad esempio, dal cidofovir, un analogo nucleotidico che, in contrasto agli analoghi nucleosidici, contiene un gruppo fosfonato che non richiede la fosforilazione virus-dipendente. Gli enzimi cellulari convertono il cidofovir nella forma attiva difosfato, che ha una lunga emivita intracellulare ed ha un'attività inibitoria contro un ampio spettro di virus, inclusi HSV-1 e HSV-2.

Il foscarnet invece è un analogo organico di un pirofosfato inorganico. Esso inibisce selettivamente la DNA polimerasi virus specifica. Non viene fosforilato dalla timidino-chinasi virale e perciò è attivo contro i ceppi acyclovir-resistenti di HSV. L'insorgenza di mutanti resistenti a questo farmaco è rara, ma può insorgere come risultato di mutazioni nella DNA polimerasi virale.

Una nuova classe di farmaci ancora in fase di studio è rappresentata dal BAY 57-1293 che ha come bersaglio il complesso elicasi-primasi virale, e che, sulla base dei risultati fino ad ora raccolti, sembrerebbe più efficace rispetto all'aciclovir nel trattamento dell'infezione erpetica in modelli murini. Sono in fase di sperimentazione preclinica anche farmaci agonisti del TLR, in grado di stimolare la risposta immune e di modificare la patologia indotta da HSV. Un agonista del TLR3, l'acido poli-inosinico-poli-citilico (Poly I:C) somministrato prima dell'infezione virale nel modello murino dei topi Balb/C induce un aumento della risposta immune attivando tutti i meccanismi necessari per la neuro-protezione con entrambi i ceppi di HSV. Le ricerche attuali sono indirizzate allo sviluppo sia di un trattamento individuale per coloro che sono affetti, sia di un vaccino per la prevenzione dell'infezione da HSV³⁸.

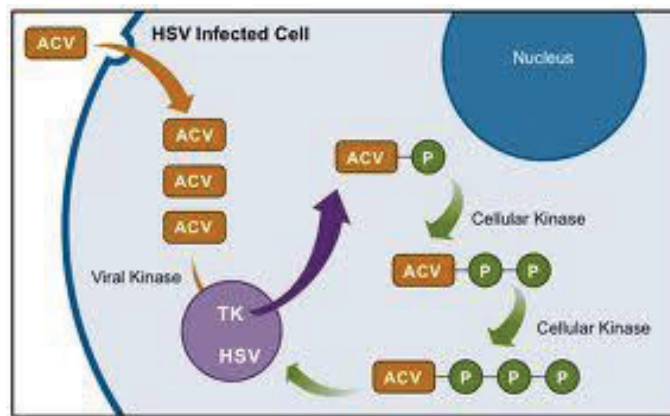


Figura 10: Meccanismo d'azione dell'aciclovir contro l'infezione causata da HSV.

2 RAZIONALE PER UN VACCINO CONTRO L'INFEZIONE CAUSATA DA HSV

Un vaccino preventivo contro HSV-1 e HSV-2 dovrebbe essere somministrato in uno stadio precoce della vita visto che l'infezione primaria è generalmente acquisita in giovane età¹⁶. dovrebbe prevenire completamente l'infezione, con un adeguata risposta immune ed inoltre dovrebbe:

- ridurre gli episodi clinici primari;
- prevenire la colonizzazione a livello dei gangli;
- prevenire la frequenza e la severità dell'infezione;
- ridurre i segni dell'infezione nei soggetti sintomatici e non.

Caratteristica fondamentale per il successo del vaccino è inoltre rappresentata dall'abilità di prevenire la trasmissione virale da persona a persona. Un vaccino che non prevenisse l'infezione, ma solo la malattia, lascerebbe aperta al virus la possibilità di diffondersi³⁹. Un vaccino terapeutico invece potrebbe ridurre i segni, i sintomi e soprattutto la diffusione virale. (Tab. 1).

<i>Vaccino Terapeutico</i>	<i>Vaccino Preventivo</i>
<i>Ridurre i sintomi</i>	<i>Prevenire l'infezione (replicazione virale soprattutto nel tratto genitale)</i>
<i>Ridurre i segni clinici</i>	<i>Prevenire i segni clinici della patologia</i>
<i>Ridurre la diffusione virale</i>	<i>Prevenire o ridurre l'infezione latente</i>
	<i>Prevenire o ridurre l'insorgenza di recidive</i>

Tabella 1: Schema delle caratteristiche ideali di un vaccino contro HSV.

Nel corso degli anni sono stati sviluppati candidati vaccinali (Tab. 2) tra cui vaccini a subunità, basati sulle glicoproteine gB e gD, ii) vaccini basati su virus vivi attenuati (con mutazioni nella regione coinvolta nella neurovirulenza o con delezione di una glicoproteina H (gH), essenziale per la replicazione virale³⁹⁻⁴⁰), iii) vaccini basati su virus uccisi (inattivati), iv) vaccini basati su peptidi e v) vaccini a DNA.

<i>Vaccini contro HSV</i>
<i>Virus Uccisi o Inattivati</i>
<i>Vaccini con Peptidi</i>
<i>Vaccini a Subunità</i>
<i>Virus Vivi</i>
<i>Vaccini a DNA</i>
<i>Ampliconi</i>

Tabella 2: Tipologie di vaccini contro HSV.

2.1 Virus uccisi o inattivati

Il primo vaccino contro HSV risale al 1920-1930 ed era costituito da una preparazione virale inattivata attraverso un trattamento con formalina, mentre successivamente l'inattivazione venne effettuata usando le radiazioni ultraviolette. Esempi di questi prodotti includono Eli Lilly vaccine (USA), Lupidon vaccine (Germania), Skinner vaccine (UK)²⁹. I prodotti ottenuti dall'inattivazione virale erano stati presi in considerazione sia per lo sviluppo di un vaccino terapeutico sia per quello preventivo³⁹. Sfortunatamente questi prodotti non hanno dimostrato effetti protettivi a lungo termine. Questa tipologia di vaccino presenta dei problemi per ciò che riguarda l'inattivazione completa del virus, la presenza di eventuali contaminanti che possono risultare potenzialmente oncogenici e soprattutto l'elevato costo di produzione. Dopo i primi risultati positivi, ottenuti da studi condotti in diversi modelli animali, il vaccino è stato sperimentato su volontari con una pre-esistente infezione da HSV, per ridurre la ricorrenza delle manifestazioni virali. Purtroppo in molti studi in cui è stato utilizzato il vaccino basato su virus uccisi, non era incluso un gruppo di controllo, e quindi i risultati della ricerca risultano poco confrontabili. Successivi lavori inclusero dei gruppi di controllo. I risultati di una sperimentazione condotta su 20 bambini di cui 10 trattati e 10 non trattati, mostrò un uguale sviluppo di gengivostomatite indotta dall'infezione con HSV. Questo tipo di vaccino induce una risposta immunitaria debole e transiente, nonostante le ripetute somministrazioni infatti, il titolo anticorpale tende sempre a livelli bassi. L'utilizzo di questa tipologia vaccinale sembrava essere sicura, ma non vengono riportate informazioni circa la sua efficacia. Altri

studi in cui furono utilizzati virus inattivati come preparati vaccinali consistevano nell'infezione di cellule con HSV-2 successivamente trattate con un detergente e DNAsi per inattivare il virus. In questo caso il vaccino conteneva le glicoproteine gD2 e gB2 ed altre glicoproteine di HSV-2, il tutto era associato all' Alum come adiuvante. Per questo studio vennero utilizzati soggetti sieropositivi per HSV-1 e HSV-2, ai quali veniva somministrata una dose di 50µg di vaccino per tre volte (0, 4, 22 settimane). I risultati della vaccinazione mostrarono che i vaccinati sieropositivi per HSV-2 sviluppavano risposte anticorpali contro HSV-2, ma nei vaccinati sieropositivi per HSV-1 non si osservava un incremento della risposta immune. Ulteriori preparazioni vaccinali caratterizzate da inattivazione con detergenti, trattamenti con formaldeide e marcatura di frazione di proteine virali furono utilizzate in soggetti con herpes genitale. I soggetti reclutati per lo studio venivano trattati per tre volte con una dose di 300µg di questo preparato vaccinale, nel quale l' Alum era sempre l'adiuvante scelto. Come risultato si osservò un modesto aumento della risposta anticorpale nei soggetti trattati, rispetto ai non trattati. Il trattamento risultava sicuro, ma non ci sono evidenze sperimentali che dimostrano che la vaccinazione possa indurre degli effetti benefici a lungo termine⁴¹⁻⁴². In fasi successive per la ricerca di un vaccino contro l'infezione da HSV, vennero utilizzati virus inattivati caratterizzati da mutazioni o delezioni che hanno l'effetto di impedire o diminuire sia la replicazione sia la tossicità virale. Questi virus quindi possono replicarsi solo in linee cellulari complementanti che forniscono il prodotto dei geni deleti dal genoma di HSV⁴³. Le principali delezioni sono a carico dei geni precocissimi (immediate early, IE) codificanti le proteine ICP0, ICP4, ICP22, ICP27 e ICP47 che attivano la trascrizione dei geni precoci (early, E) e dei geni tardivi (late, L). In questo modo è possibile bloccare la cascata di eventi che determinano il ciclo litico del virus⁴⁴⁻⁴⁵⁻⁴⁶⁻⁴⁷. La prima generazione di virus non replicativi è rappresentata da quelli deleti in uno solo dei due geni IE essenziali per la replicazione (ICP4 o ICP27), mentre la seconda generazione di virus non replicativi è rappresentata da virus in cui coesistono delezioni multiple di più geni IE o di altri geni che contribuiscono alla tossicità virale.

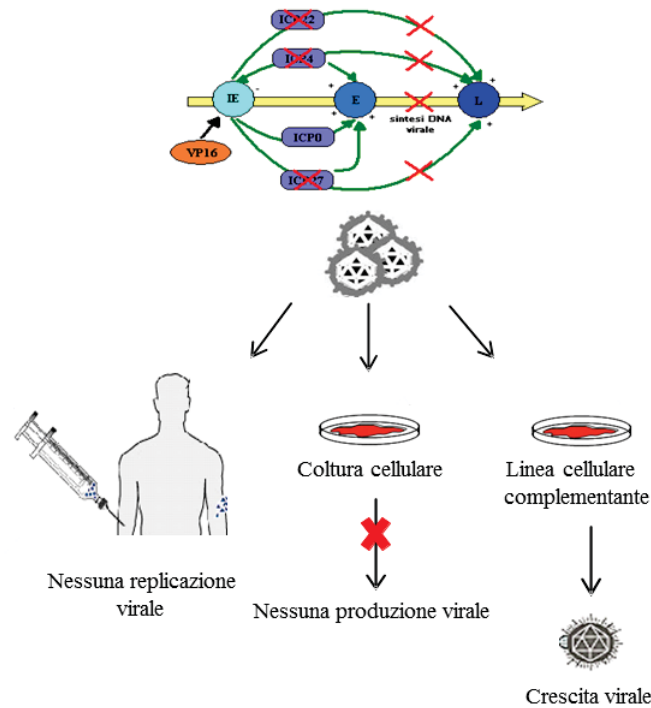


Figura 11: Rappresentazione del ciclo a cascata di HSV-1 (in alto), la delezione dei geni essenziali blocca l'intera sequenza di eventi. In basso è evidenziato come la delezione dei geni IE impedisca la replicazione del virus in vivo e in vitro, tranne che in cellule complementanti.

2.2 Vaccini basati su peptidi

L'ipotesi che la risposta immune ad un singolo epitopo potesse proteggere contro la patologia è stata testata su un modello murino inbred. Il trattamento consisteva in una singola immunizzazione con un epitopo CTL immunodominante o un epitopo neutralizzante, in modo da valutare la protezione. Questo tipo di trattamento risultava positivo sul modello inbred, ma la natura outbred della popolazione umana sicuramente rende le cose più complicate, soprattutto per l'identificazione dell'epitopo specifico capace di indurre protezione. La fase I del trial è stata progettata per determinare se il concetto del peptide può provocare un'ampia risposta CD8⁺. Nel corso degli anni sono stati condotti diversi studi utilizzando questa tipologia vaccinale per contrastare l'infezione da HSV, includendo nella sperimentazione sia soggetti sieropositivi che soggetti sieronegativi²⁹. In uno studio rappresentativo di popolazione donne di età compresa tra i 18 e i 30 anni, sono state sottoposte ad un trattamento con un vaccino sperimentale, costituito da 20 mg di glicoproteina D (gD) di HSV-2 con Alum come adiuvante. Ai mesi 0, 1 e 6, alcuni soggetti hanno ricevuto il vaccino mentre i soggetti

di controllo hanno ricevuto un vaccino contro l'epatite A. L'end point primario riguardava l'osservazione della comparsa dei segni di infezione da HSV. Questo tipo di trattamento non è risultato efficace, contro la malattia da herpes genitale, il vaccino risultava efficace nel prevenire l'infezione e la malattia da HSV-1 genitale, ma non nel prevenire l'infezione o la malattia indotta da HSV-2⁴⁸. Ulteriori studi si sono basati sulla scelta di nuovi epitopi, specifici per le cellule B (EQDRKPRN; GRTDRPSA; DPSLKMADPNRFR; DPPERPDSF; EPPDDDDS; CRRRYRRPRG), per le cellule T CD4⁺ (NLPVLDQL; KDVTVSQVWFGHRYSQ; KAYQQGVTVD SIGMLPRFIP; KPPYTSTLLPPELSD); e per la cellule T CD8⁺ (KMADPNRFRGK; ALLEDPAGT). Di questi peptidi è stata valutata la capacità di indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti, che conferiscono un'immunità protettiva per l'ospite. In questo studio, tutti gli epitopi sopra citati sono stati inseriti nel frammento extracellulare (aminoacidi 1-290) della glicoproteina D (gD) di HSV-2 per la costruzione di un multi-epitopo (MEAPs). La sua efficacia protettiva contro l'HSV-2 è stata studiata in topi Balb/C. I risultati hanno mostrato che il MEAP era altamente immunogenico e potrebbe indurre un alto titolo di anticorpi neutralizzanti, in grado di fornire una protezione completa contro l'infezione da HSV-2. Naturalmente tale dato dovrà dimostrare lo stesso tipo risultato anche sull'uomo, perciò lo studio è ancora in corso⁴⁹.

2.3 Vaccini a subunità

I vaccini a subunità hanno il vantaggio di essere sicuri in quanto contengono solo proteine virali evitando in questo modo eventuali problemi di sicurezza associati alla somministrazione del virus ucciso o vivo e alla presenza di DNA virale contaminante. Tuttavia, anche questa tipologia di vaccini può presentare alcuni aspetti negativi. Innanzitutto, contenendo solo alcuni antigeni presenti in una particella virale, il vaccino a subunità indurrà una risposta immunitaria solo verso un numero limitato di epitopi. Il rationale per la scelta dell'utilizzo delle glicoproteine di superficie (gB e gD) è principalmente correlato al fatto che questi antigeni sono il target dominante per la produzione di anticorpi contro HSV nei soggetti infettati²⁹, inoltre tali proteine presentano un elevato grado di omologia in entrambi i virus erpetici sia di tipo I che di tipo II, e quindi potrebbero indurre protezione contro le due infezioni virali. Possono indurre una risposta immunitaria basata sulla produzione di anticorpi neutralizzanti, che correlano con il grado di protezione in seguito a challenge. Nel corso degli anni quindi queste glicoproteine sono state utilizzate come componenti dei formulati vaccinali scegliendo diverse vie di somministrazione e dosaggio, su diversi modelli animali (topi, cavie,

primati non umani) per gli studi di challenge. In generale sui modelli animali inducono una riduzione della replicazione virale, delle manifestazioni cliniche, interpretata come miglioramento e riduzione di mortalità degli animali trattati, della replicazione virale e della latenza, ma non prevengono l'infezione. Per poter indurre tale protezione è richiesta la presenza di un adiuvante e più somministrazioni. Vaccini basati su subunità contenenti la gD o la combinazione di gD e gB, sembrano essere immunogenici sia nei modelli animali che nell'uomo. Questi prodotti sono stati utilizzati in modelli animali infettati con un herpes genitale. Gli animali dopo l'infezione genitale sviluppano un'infezione acuta caratterizzata da vescicole e pustole. Quando venivano trattati con il vaccino a subunità costituito dalla gD o dalla combinazione gB/gD, risultano protetti dallo sviluppo della patologia clinica, il trattamento non preveniva l'infezione⁵⁰, ma riduceva la replicazione virale a livello vaginale. Inoltre questi studi iniziali hanno stabilito che risulta importante il mantenimento della conformazione naturale delle proteine per incrementare l'efficacia del vaccino stesso. Recentemente alcune case farmaceutiche hanno provato a sviluppare un vaccino da utilizzare sull'uomo basandosi sui risultati di questi esperimenti preclinici. Due vaccini basati su subunità, molto simili tra loro hanno completato la fase III dei trial clinici. Uno di questi formulati sviluppato dalla Chiron Corporation è costituito dalla combinazione delle due glicoproteine HSV-2 gD (troncata nell'aminoacido 320) e gB (troncata nell'aminoacido 696) associate all'adiuvante MF59 (un emulsione olio-acqua, contenente squalene, sorbitano mono e trioleato,), per potenziare la risposta immune⁵¹⁻⁵²⁻⁵³⁻⁵⁴⁻⁵⁵. L'MF59 viene internalizzato dai macrofagi e dalle cellule dendritiche dopo iniezione intramuscolare e trasportato nei linfonodi, in questo modo induce una risposta di tipo Th2⁵⁶⁻⁵⁷. In uno degli esperimenti dei trial è stata confrontata la somministrazione di 30µg del formulato vaccinale contenente entrambe le glicoproteine troncate associate all'MF59, con la somministrazione del solo adiuvante. Il trattamento è stato ripetuto al tempo 0, 1 e 6 mesi. Dopo l'ultima somministrazione i soggetti trattati sono stati monitorati per un anno. Il vaccino in questa fase dello studio sembrava essere immunogenico, ma i risultati di protezione, lo spettro di attivazione della risposta immune risultò limitato, così come la durata della protezione stessa. La risposta anticorpale indotta dal trattamento in alcuni soggetti risultava simile a quella generata dall'infezione naturale con HSV. Il vaccino proposto dalla Chiron basato su gD e gB con MF59 induce una protezione transiente con una durata massima di 6 mesi. Un nuovo adiuvante contenente MF59 ed un derivato del muramil-dipeptide l' MTP-PE⁵⁸ è stato testato in associazione alle glicoproteine gB e gD ricombinanti. In particolare questo adiuvante

associato alla gD risultava attivo sia nel vaccino terapeutico che in quello preventivo in modelli di cavie infettate con HSV-2. Il prodotto ottenuto sembrava immunogenico nell'uomo, mostrando degli effetti positivi contro l'infezione virale nei soggetti infettati con HSV-1, ma la durata della protezione era comunque limitata ad un breve periodo.

Studi di fase I utilizzando la gD e Alum²⁹⁻⁵⁹ come adiuvante, stabilirono che questa combinazione vaccinale poteva indurre la produzione di anticorpi neutralizzanti in soggetti sieronegativi e potenziare una preesistente risposta in soggetti sieropositivi per HSV-1 e/o per HSV-2.

La seconda casa farmaceutica interessata allo sviluppo di un vaccino contro l'infezione da HSV è la SmithKline Beecham Biologicals⁵⁰⁻⁶⁰⁻⁶¹ che propone un vaccino basato sulla glicoproteina D (gD) espressa in cellule CHO associata con Alum e MPL (3-O-acetilato-monofosforil lipide A) come adiuvante, essi sono dei potenti induttori della risposta di tipo Th1. Il vaccino veniva somministrato ad una dose di 20µg per via intramuscolare al tempo 0, 1 e 6 mesi. Negli studi preliminari sembrava immunogenico, capace di indurre una risposta cellulare e umorale. I linfociti dei soggetti immunizzati erano in grado di riconoscere la gD e di produrre IL-2 e IFN-γ. Il trattamento portava ad un 73-75% di protezione per entrambi i virus (HSV-1 e HSV-2) ed il 43% di efficacia nel contenimento dell'infezione. La protezione però risultava maggiore nelle donne rispetto agli uomini. Lo studio ha raggiunto la fase III dei trial, e successivamente è stato sospeso in quanto nei soggetti sieropositivi per HSV-1 non sono stati osservati particolari effetti positivi quando venivano confrontati con i gruppi di controllo. I due modelli vaccinali basati sulla gD, proposti sia dalla Chiron Corporation che dalla SmithKline Beecham Biologicals, risultano essere molto simili, ma la differenza sostanziale riguarda l'uso di adiuvanti. Vaccini a subunità contenenti le glicoproteine di HSV-2 troncate sono stati utilizzati anche come immunoterapici in soggetti adulti con infezione da HSV-2. In questi soggetti non si osserva una consistente correlazione tra l'immunità e la severità dell'infezione. Il trattamento consisteva nella somministrazione per due mesi di 100µg di gD associata all'Alum. Da questo studio si osservò una riduzione nel numero di riattivazioni virali, un incremento nella produzione di anticorpi neutralizzanti e della risposta linfo-proliferativa, solo nei soggetti trattati, ma non si osservò una diretta correlazione tra la risposta immune e l'efficacia del vaccino tra i soggetti trattati. Successivamente fu condotto uno studio molto simile in cui però venne utilizzato come adiuvante l'MF59. In questo caso i soggetti venivano trattati con una combinazione di gD e gB (10µg), anche con questo tipo di

trattamento non si osservò correlazione diretta tra i livelli di anticorpi indotti e l'efficacia del vaccino stesso⁶²⁻⁶³.

2.4 Vaccini basati su virus vivi

I vaccini basati su virus vivi in generale sono considerati la miglior tipologia di vaccino (rispetto a quelli basati su virus uccisi o a subunità) in quanto, contenendo organismi vivi o attenuati, che sono in grado di infettare e di replicarsi *in vivo* senza dare malattia, inducono una risposta immunitaria umorale e cellulare a più ampio spettro e più duratura rispetto a quella indotta dai vaccini a virus inattivato o a subunità, e sono in grado di conferire “herd immunity”⁴⁰. Questi vaccini sono in grado di indurre una forte risposta immune (risposta CD4, CD8 e anticorpale) e alti livelli di protezione, richiedono piccole quantità di virus e sono relativamente economici da produrre. Tuttavia, un potenziale svantaggio di questa tipologia di vaccini è rappresentata dal fatto che il virus vivo attenuato possa revertare al fenotipo selvatico o possa stabilire latenza, riattivarsi e ricombinarsi con virus wild-type virulenti circolanti nella popolazione. Un altro svantaggio potrebbe anche essere rappresentato dalla eventuale capacità di indurre la neuro-virulenza.

Per creare nuovi vaccini anti-HSV in grado di indurre protezione, Roizman ed i suoi colleghi hanno proposto l'uso di ceppi di HSV mutati, ovvero deleti in alcuni geni non essenziali per la replicazione virale, ma coinvolti nella latenza, nella neuro-virulenza e nella riattivazione. Sono virus in cui vengono indotte mutazioni o delezioni di geni non essenziali per la replicazione cellulare *in vitro*, al fine di ridurre la patogenicità nei confronti delle cellule ospiti. Tali virus non necessitano di una linea complementante (che esprima il prodotto del gene virale mancante) per crescere *in vitro*, sono in grado di infettare ma non causano alcuna patologia e inducono una immunità umorale e cellulo-mediata che proteggono dall'infezione con dosi letali di HSV wild-type in modelli preclinici⁶⁴⁻⁶⁵. *In vivo* inducono risposte immuni. Alcuni esempi di questi virus sono quelli contenenti mutazioni a carico dei geni ICP34.5, UL41 e VP16 e i vettori con mutazioni nei geni codificanti la timidina chinasi (TK) e la ribonucleotide riduttasi (RR1). Sono caratterizzati da una ridotta attività replicativa nelle cellule nervose e una quasi totale incapacità di riattivazione dopo l'instaurarsi dell'infezione latente⁶⁶, mostrano comunque una certa citotossicità⁶⁷. Pur essendosi dimostrata efficace come strategia vaccinale, permangono seri dubbi riguardo la sicurezza e la potenziale oncogenicità di molti geni di HSV. Il primo lavoro basato su questo sistema si è focalizzato sul gene timidina chinasi (Tk). I due mutanti presi in esame R7017 e l'R7020 derivanti dall'HSV strain

F, contenevano la delezione a livello del gene Tk e un'ulteriore delezione a livello delle giunzioni tra la regione U_L e U_S, in modo da eliminare alcuni geni responsabili della neurovirulenza³⁹⁻⁵⁰⁻⁶⁸⁻⁶⁹. R7020 era considerato un virus attenuato in diversi modelli animali, incluse le scimmie, ed era risultato protettivo in esperimenti di challenge. In una prima fase di studio era il candidato ottimale per lo sviluppo di un vaccino. Entrambi i costrutti (R7017 ed R7020), risultavano capaci di indurre un'immunità protettiva, anche se erano attenuati nella loro patogenicità e abilità di stabilire latenza. Questo dato venne confermato dalla produzione di placche virali, in seguito alla somministrazione dei virus wild-type e dei ricombinanti su primati non umani. La somministrazione del ricombinante utilizzando vie di somministrazione diverse risultava innocua, o generava delle lievi infezioni, cosa che non accadeva nel caso in cui si utilizzava il virus wild-type. Purtroppo tale modello non è approvato per condurre uno studio sull'uomo, in quanto la dose da utilizzare sull'uomo è di 10⁵ pfu, ed il numero di due somministrazioni massime è due. Più tardi l'attenzione si è focalizzata sulla delezione del gene 34.5 γ il quale sembra essere coinvolto nella neurovirulenza, la sua delezione risulta essere associata al calo della virulenza, ma non alla totale eliminazione virale, in quanto anche se ridotta viene comunque stabilita la latenza³⁹⁻⁷⁰⁻⁷¹⁻⁷²⁻⁷³. Studi condotti su modelli animali utilizzando questo prodotto vaccinale hanno dimostrato effetti protettivi in modelli di challenge. Ma il suo utilizzo sull'uomo è da valutare con più attenzione. Il costrutto G207 rappresenta un ottimo candidato per un vaccino terapeutico, è delecto in entrambi le copie del gene 34.5 γ , includendo anche il gene per RR1. Studi di fase I del trial riguardanti la sicurezza, sono stati condotti su 22 soggetti affetti da patologia tumorale. I pazienti sono stati sottoposti al trattamento con dosi scalari di vaccino, ma nessuno dei soggetti trattati sviluppava encefaliti causate da herpes⁴⁰. Altre mutazioni coinvolgono il gene ribonucleotide reduttasi (RR1). Nel corso degli anni sono stati creati altri modelli basati sempre su virus vivi, ma a replicazione attenuata. Tra questi troviamo i virus a replicazione discontinua (DISC)⁴⁰⁻³⁹⁻⁷⁴⁻⁷⁵, la loro mutazione coinvolge la glicoproteina H (gH). Tali virus sono in grado di indurre una risposta CD8 CTL nel modello murino dopo una singola infezione, inducono protezione in seguito a challenge con HSV-2, risultano essere avirulenti soprattutto nel modello dei Balb/C⁷⁶⁻⁷⁷. L'unico problema riguarda la loro incapacità di impedire lo sviluppo della latenza. Un ulteriore approccio è basato sull'utilizzo del DNA nudo, inoculato direttamente. Il vantaggio di questo sistema si manifesta con una risposta immune migliore.

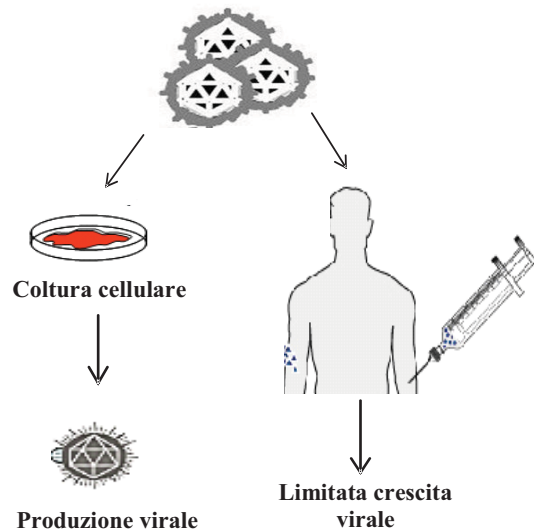


Figura 12: Virus replicativi attenuati. Portano delezioni in geni non essenziali per il ciclo replicativo *in vitro*, che si traducono in una ridotta patogenicità *in vivo*.

2.5 Vaccini a DNA

L'innovazione nell'ambito dello sviluppo dei vaccini contro HSV è rappresentata dall'utilizzo degli acidi nucleici (DNA). E' stato osservato che la diretta inoculazione del plasmide DNA codificante per geni virali, guida l'attivazione di specifiche proteine capaci di indurre una forte risposta immune cellulo-mediata, con il vantaggio che non necessitano ne della presenza di un adiuvante, ne di essere inattivati. Questo tipo di trattamento offre gli stessi vantaggi dei vaccini basati su virus vivi inattivati, senza dover indurre l'inattivazione, ed inoltre i vaccini a DNA non replicano nell'ospite. L'immunizzazione di animali utilizzando il plasmide esprime le glicoproteine di HSV sembra indurre delle specifiche risposte umorali e cellulari e proteggere gli animali durante un challenge con HSV. Studi condotti su modelli animali infettati con herpes genitale, mostrano che i vaccini a DNA basati su HSV-2gD e HSV-2gB, sono immunogenici, proteggono gli animali da patologie acute ed inoltre riducono la replicazione virale nel tratto genitale. Gli animali immunizzati con il vaccino a DNA HSV-2 gD mostrano una significativa riduzione dell'infezione latente e meno infezioni ricorrenti, ma non la totale scomparsa del virus³⁹⁻⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁸⁰⁻⁸¹. Questi studi suggeriscono che i vaccini a DNA possono proteggere dall'infezione ed inoltre potrebbero proteggere dalle infezioni latenti. Gli studi di trial di fase I sono in corso. Uno studio, ha sviluppato un vaccino a DNA

capace di esprimere la glicoproteina D di HSV-1 e interleuchina-21 di topo. Il trattamento degli animali è stato condotto utilizzando la via intramuscolare con tre somministrazioni ad una distanza di due settimane con un totale di 300µg/topo. Due settimane dopo l'ultima immunizzazione gli anticorpi specifici, la risposta proliferativa IFN-γ e IL-4 come pure l'attività citotossica di splenociti e cellule natural killer (NK) sono stati analizzati. I risultati hanno mostrato che il vaccino ha generato alti livelli di anticorpi, migliorato l'attività citotossica e la risposta di splenociti e delle cellule NK rispetto agli animali non immunizzati. I risultati suggeriscono che il vaccino può indurre una risposta immunitaria che può limitare l'infezione da HSV-1 nei topi immunizzati. Ulteriori studi sono stati condotti da Hu ed i suoi collaboratori. In questo lavoro topi Balb/C sono stati suddivisi in diversi gruppi i quali hanno ricevuto trattamenti con: finto plasmide (PRSC) quindi rappresentavano il gruppo di controllo PRSC-gD, PRSC-gD-IL-21 e gruppo PRSC-gD-IL-21 associato a nanoparticelle Fe₃O₄ coattate con acido glutammico. Dodici topi per ogni gruppo sono stati utilizzati di routine. Nel gruppo di nanoparticelle 40 mg DNA delle nanoparticelle contenenti vaccino a DNA PRSC-gD-IL-21 sono stati inseriti nell'occhio di ciascun animale ai giorni 0, 14 e 28. In altri gruppi, ciascuno dei topi è stato inoculato con 40 mg vaccino DNA PRSC-GD-IL-21 o PRSC-gD o PRSC (controllo), per tre 3 volte a intervalli di due settimane. Tre settimane dopo l'ultima immunizzazione, 6 topi per gruppo sono stati sacrificati e utilizzati per rilevare l'efficienza immunitaria, e gli altri 6 topi sono stati utilizzati per esperimenti di challenge con HSV-1, valutando così la comparsa e la progressione dei segni di infezione. La somministrazione del formulato vaccinale associato alle nanoparticelle conferisce una forte risposta immunitaria specifica ed efficace su modelli murini infettati con HSV-1. L'aumentata produzione di IFN-γ migliora l'attività citotossica dei linfociti T e delle cellule NK. Inoltre la concentrazione di interferon-γ nel siero risultava più alta nel gruppo trattato con le nanoparticelle associate al formulato vaccinale (PRSC-GD-IL-21). Il trasporto del vaccino mediante le nanoparticelle favorisce una maggiore efficienza che correla con un'inibizione dell'infezione virale. Inoltre è stato osservato che l'IL-21 è un promettente coadiuvante immunitario capace di migliorare l'immunogenicità del vaccino a DNA generando potenti risposte immunitarie⁸²⁻⁸³.

2.6 Vettori non replicativi a genoma plasmidico: Ampliconi

Questa tipologia di vettore è costituita da un'origine di replicazione batterica (E.Coli ori) che conferisce al vettore la capacità di riprodursi all'interno dei batteri come DNA plasmidico, da un'origine di replicazione virale (HSV ori) che garantisce la replicazione del vettore nelle

cellule eucariotiche e la possibilità di dare origine ad una progenie virale in presenza di un virus helper, e un segnale di packaging (pac) che consente l'incapsidamento del vettore in un virione⁸⁴⁻⁸⁵.

L'amplicone per essere usato come vettore virale per il trasferimento genico, necessita della presenza di un virus helper che fornisca le proteine strutturali necessarie per l'incapsidamento dell'amplicone all'interno di una particella virale infettante. Il vantaggio di tale sistema è rappresentato dalla facile manipolazione del DNA e dal clonaggio dei transgeni. Per molto tempo l'uso di questi vettori è stato limitato dall'incapacità di preparare ampliconi privi di virus helper, potenzialmente tossico e dall'impossibilità di clonare nel plasmide sequenze di DNA esogeno di grandi dimensioni. I vettori replicativi attenuati, non replicativi e gli ampliconi sono stati di recente utilizzati come vettori vaccinali per esprimere antigeni di HIV-1. I dati preliminari dimostrano che i vaccini basati su questi vettori inducono una risposta CTL forte e protettiva verso infezioni causate da patogeni intracellulari⁸⁶⁻⁸⁷⁻⁸⁸⁻⁸⁹.

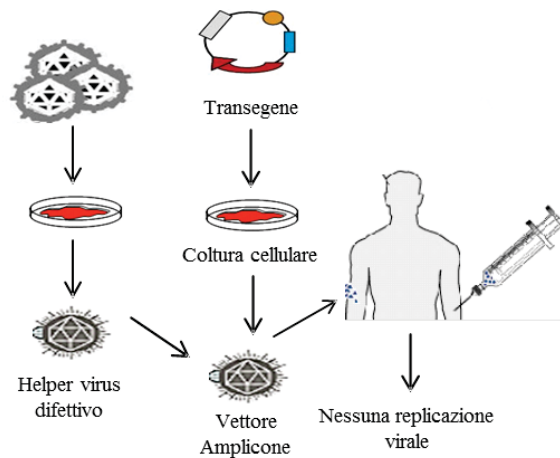


Figura 13: Amplicone

3 SCOPO DELLA RICERCA

Il lavoro oggetto di questa tesi è diretto allo sviluppo di un nuovo vaccino contro l'infezione causata da HSV. E' noto che l'immunità cellulo-mediata gioca un ruolo fondamentale nel controllo delle infezioni virali, inclusa l'infezione da HSV. Fino ad oggi i dati ottenuti da studi clinici con vaccini anti-HSV basati sulle glicoproteine dell'envelope virale hanno portato a risultati insoddisfacenti. Recenti studi dimostrano che gli epitopi riconosciuti dalle cellule T di pazienti sintomatici infettati da HSV sono diversi rispetto a quelli riconosciuti dai pazienti asintomatici⁹⁰, suggerendo che un vaccino capace di promuovere un'adeguata risposta da parte delle cellule T nei confronti degli epitopi riconosciuti dai soggetti infettati, ma asintomatici, potrebbe rappresentare la soluzione per il trattamento della malattia erpetica ricorrente⁹⁰⁻⁹¹. Quindi l'efficacia di un vaccino contro HSV dipende principalmente dalla sua capacità di indurre una forte immunità cellulare attraverso una corretta presentazione antigenica, che sia diretta contro specifici epitopi virali.

L'identificazione di adiuvanti in grado di promuovere lo sviluppo di una risposta immunitaria di tipo Th1 non solo contro epitopi dominanti, ma anche contro epitopi subdominanti, fondamentali per bloccare la riattivazione virale, rappresenta un punto chiave per lo sviluppo di un nuovo vaccino contro l'infezione da HSV^{91-92-28,93,94}.

In questo contesto, lo scopo di questo lavoro è stato quello di saggiare la sicurezza e l'efficacia di nuovi vaccini basati sul virus dell'Herpes simplex di tipo 1, a replicazione attenuata e non replicativi, esprimenti la proteina Tat del virus di HIV-1 e confrontare le risposte immuni da essi indotte (nonché l'efficacia della vaccinazione) a quelle indotte dagli stessi vettori non esprimenti la proteina Tat. La scelta della proteina Tat è principalmente legata alla sua capacità di indurre una risposta immune di tipo Th1 e di modulare le risposte immuni dirette verso altri antigeni. In particolare, è stato dimostrato che la co-immunizzazione dei topi con le proteine Ova e Tat induce risposte CTL verso epitopi di Ova subdominanti e criptici che non sono indotte dalla vaccinazione con la proteina Ova da sola⁹⁵. In modo analogo, topi co-vaccinati con la proteina Tat e le proteine Gag, Env o Env-V2-deleta di HIV-1 sviluppano risposte cellulari Th1 e CTL dirette verso un maggior numero di epitopi T rispetto a quelle indotte dalla vaccinazione con le proteine Gag, Env o Env-V2-deleta da sole. Inoltre, Tat possiede proprietà auto-adiuvanti collegate alla sua capacità di dimerizzare⁹⁶, incrementa il numero di cellule T regolatorie (Treg)⁹⁷ e induce immunità protettiva contro *Leishmania Major*⁹⁸⁻⁹⁹⁻¹⁰⁰. Queste sue proprietà possono essere particolarmente rilevanti nelle strategie di vaccinazione contro l'infezione da HSV.

La nostra attenzione si è quindi focalizzata sui vettori di HSV-1, a replicazione attenuata e non replicativi, sviluppati in collaborazione con la Dr. Peggy Marconi (Università di Ferrara) allo scopo di utilizzarli come possibili vaccini contro l'infezione causata da entrambi i ceppi di HSV.

Con questi vettori sono stati eseguiti studi *in vitro* e successivamente *in vivo* (modello murino) per valutare:

- la loro capacità di generare in modelli murini (Balb/C e C57BL/6) una risposta immunitaria sia cellulare che umorale (in quanto gli epitopi di HSV-1 nel modello murino sono già stati caratterizzati ed ampiamente descritti in letteratura);
- l'effetto protettivo delle vaccinazioni dopo challenge degli animali immunizzati con dosi letali di virus wild-type HSV-1 o HSV-2.

E' stata quindi valutata se l'espressione della proteina Tat da parte dei vettori a replicazione attenuata e non replicativi fosse in grado di generare-modulare-migliorare le risposte immuni adattative e memoria dirette verso HSV.

4. MATERIALI E METODI

4.1 Batteri e trasformazione batterica

La trasformazione è una procedura che consente di introdurre DNA plasmidico in ceppi batterici, precedentemente resi competenti per la trasformazione mediante l'utilizzo di sali, quali ad esempio CaCl_2 , che danneggiano la parete batterica favorendo l'internalizzazione del DNA. I batteri incubati con il DNA plasmidico sono poi fatti crescere in terreni solidi contenenti un antibiotico (quello verso cui il plasmide conferisce resistenza) per selezionare ed isolare le cellule che hanno subito la trasformazione.

Le cellule batteriche utilizzate in questo studio sono cellule di *E. Coli* (ceppo DH5 α), acquistate come cellule già competenti per la trasformazione dalla ditta Gibco-BRL Life Thecnology in aliquote da 50 μl e conservate a -80°C .

Dopo scongelamento in ghiaccio, i batteri sono stati incubati in presenza del DNA plasmidico aggiunto in una quantità pari ad 1/10 del volume batterico (es. 5 μl su 50 μl), in ghiaccio per 30 minuti, favorendo così l'adesione del DNA alla parete batterica. Successivamente le cellule sono state sottoposte ad uno "shock" termico ponendo la miscela di reazione a 37°C per 20 secondi, al fine di provocare l'apertura di pori sulla parete dei batteri permettendo l'entrata del DNA. Le cellule sono state poi incubate in ghiaccio per 1-2 minuti, trasferite in un tubo da 5 ml contenente terreno Brodo di Luria (LB), privo di antibiotico, incubate per 1 ora a 37°C in agitazione ed, infine, piastrate in piastre agar contenenti l'antibiotico ampicillina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a cui i batteri sono resistenti. Dopo incubazione a 37°C per 16-18 ore, le colonie batteriche cresciute sulle piastre sono state raccolte e cresciute in 5 ml di LB contenente ampicillina a 37°C per 12-24 ore in agitazione. Da queste colonie si è proceduto ad estrarre e purificare il DNA plasmidico secondo la metodica di preparazione su piccola o larga scala descritte di seguito.

4.2 Terreni per batteri

Il terreno liquido per la crescita dei batteri è il brodo di Luria Broth (LB), in cui i batteri crescono in sospensione. Il terreno LB è composto di 5 g di NaCl, 10 g di triptone e da 5 g di estratto di lievito disciolti in un litro di H_2O . Per isolare invece singole colonie batteriche si sono utilizzati terreni solidi preparati in piastre Petri. Questi terreni si ottengono mediante aggiunta, al terreno liquido LB, di agar alla concentrazione di 15 grammi/litro.

Tutti i terreni, liquidi e solidi, sono stati preparati mescolando i reagenti in bottiglie di vetro e, quindi, sterilizzati al calore mediante autoclavatura a 121°C per 30 minuti. I terreni liquidi

sono stati, quindi, conservati a 4°C fino al momento dell'uso. Invece, il terreno contenente agar è stato raffreddato brevemente e quindi versato sterilmente, come tale o previa aggiunta dell'opportuno antibiotico, in piastre Petri. Non appena solidificate a temperatura ambiente, le piastre sono state conservate a 4°C fino al momento dell'uso.

Tutti i plasmidi da noi impiegati conferiscono resistenza all'ampicillina, che è stata aggiunta alla concentrazione di 100 µg/ml sia al terreno LB sia alle piastre agar.

4.3 Estrazione del DNA plasmidico

Il procedimento di preparazione del DNA plasmidico, sia esso su piccola o su larga scala, prevede tre principali fasi operative:

- la lisi cellulare che si esegue sul pellet batterico, raccolto mediante centrifugazione, utilizzando una soluzione alcalina; in queste condizioni il DNA e le proteine batteriche risultano denaturate;
- la neutralizzazione, che prevede l'aggiunta di una soluzione contenente sodio acetato che determina la precipitazione delle grosse molecole cellulari, incluse le proteine e il DNA cromosomico, ad eccezione del DNA plasmidico che in queste condizioni si rinatura e rimane in soluzione, anche dopo centrifugazione del lisato cellulare;
- la purificazione del DNA plasmidico mediante l'uso di colonne contenenti resine in grado di trattenere le molecole di DNA plasmidico, da cui il DNA viene eluito successivamente.

4.4 Estrazione del DNA plasmidico su piccola scala

Per purificare il DNA plasmidico su piccola scala si è utilizzato il kit commerciale “*High Pure Plasmid Isolation*” (Roche) e si sono seguite le istruzioni della Ditta. In breve, a partire da ciascuna colonia batterica selezionata dopo la trasformazione si è allestita una coltura liquida di 4-5 ml di terreno, contenente l'antibiotico opportuno, che è stata incubata a 37°C in agitazione per 16 ore. Le cellule sono state poi raccolte mediante centrifugazione a 6000 rpm per 30 secondi in centrifuga (Biofuge, Heraeus), risospese in 250µl di *Suspension Buffer* contenente RNasi e successivamente in 250 µl di *Lysis Buffer*. Dopo incubazione per 5 minuti a temperatura ambiente, è stato aggiunto *Binding Buffer* (350µl) precedentemente raffreddato. La sospensione così ottenuta è stata incubata in ghiaccio per 5 minuti, centrifugata per 10 minuti a 15000 rpm in microcentrifuga, e il surnatante così ottenuto (contenente il DNA plasmidico) è stato trasferito su colonna di silice. Dopo centrifugazione della colonna per

15000 rpm in microcentrifuga, l'eluato è stato scartato e la colonna lavata con 700µl di *Wash Buffer II*. Il tubo è stato sottoposto a ulteriore centrifugazione a 13000 rpm per 1 min, l'eluato così ottenuto è stato scartato e il DNA infine è stato eluito dalla colonna mediante l'aggiunta di 100µl di *Elution Buffer* e centrifugazione della colonna per 1 minuto in microcentrifuga a velocità massima. Il DNA plasmidico contenuto nell'eluato è stato precipitato mediante l'aggiunta di un ugual volume di isopropanolo e centrifugazione a 15000 rpm per 10 minuti in microcentrifuga. Il pellet di DNA plasmidico infine è stato risospeso in 50-100µl di *buffer TE* (10 mM Tris-HCl, 1 Mm EDTA pH 8.0) e conservato a -20°C fino al momento dell'uso. In particolare, aliquote di ciascun DNA sono state digerite con opportuni enzimi di restrizione e, quindi, analizzati in gel di agarosio. Le colonie contenenti il DNA plasmidico con le dimensioni e le caratteristiche attese sono state utilizzate per produrre nuove colture di 4-5 ml, una aliquota (1-2ml) è stata congelata a -80°C (per ottenere uno stock) e il restante volume è stato utilizzato per produrre colture liquide di 500-1000µl per la produzione e purificazione su larga scala di ciascun DNA plasmidico.

4.5 Estrazione del DNA plasmidico su larga scala

Per ciascun DNA plasmidico si è scelta una delle tre colonie analizzate mediante preparazione del DNA su piccola scala e si è proceduto alla produzione del DNA plasmidico in grande quantità. Per preparare il DNA plasmidico su larga scala (maxiprep) ad elevato grado di purezza è stato utilizzato il kit commerciale QIAGEN® *Plasmid MAXI Kit* (QIAGEN, Venlo, Netherlands) che utilizza colonne dotate di resine a scambio anionico. Attraverso questo procedimento il DNA plasmidico si lega alla resina della colonna utilizzando tamponi a bassa concentrazione salina, mentre viene purificato da RNA, proteine e impurità ad alto peso molecolare. Si è partiti da una coltura di cellule batteriche ottenuta seminando i batteri in 1 litro di terreno contenente lo specifico antibiotico. Dopo la semina la coltura è stata coltivata in agitazione a 37°C e la crescita batterica seguita mediante prelevamento di aliquote della coltura e lettura della densità ottica (OD) a 600 nm. Quando la OD della coltura batterica raggiungeva un valore di 0.8-0.9, venivano aggiunti 2.5 ml di una soluzione di cloramfenicolo la cui concentrazione era di 34mg/ml in etanolo, e quindi la coltura veniva incubata in agitazione per ulteriori 16 ore. L'aggiunta del cloramfenicolo serve per bloccare la crescita batterica senza interferire con la replicazione del DNA plasmidico, rendendo possibile l'amplificazione di grandi quantità di DNA plasmidico.

Al termine della incubazione, le cellule sono state raccolte mediante centrifugazione a 6000 rpm (Megafuge, Heraeus) per 15 minuti a 4°C. Il pellet cellulare è stato sospeso in 10 ml di

Buffer P1 e successivamente in 10ml di *Buffer P2*. Dopo 5 minuti d'incubazione a temperatura ambiente e' stato aggiunto *Buffer P3* (10ml) precedentemente raffreddato. La sospensione cellulare ottenuta in questo modo è stata caricata sulla colonna fornita dal kit e filtrata attraverso la resina per gravità. Il DNA è stato infine eluito con 15ml di *Buffer QF*, precipitato aggiungendo 10.5 ml di isopropanolo, e raccolto mediante centrifugazione 15000 rpm per 30 min a temperatura ambiente. Il pellet di DNA è stato lavato infine con 5ml di etanolo al 70%, centrifugato (Megafuge, Heraeus) a 15000 rpm per 10 minuti, risospeso in 500-1000µl di *buffer TE* (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8.0) e conservato a -20°C fino al momento dell'uso.

4.6 Quantificazione del DNA

La concentrazione di DNA è stata quantificata allo spettrofotometro mediante lettura dell'Assorbanza alla lunghezza d'onda di 260 nm, alla quale si ha il massimo assorbimento delle basi azotate. La concentrazione di ciascun campione si è ricavata quindi sfruttando la legge di Lambert-Beer, secondo la formula seguente: $A = C \times l \times \epsilon$, dove A è il valore di assorbanza del campione, C è la concentrazione del campione, l è la lunghezza del cammino ottico della cuvetta in cui si esegue la lettura, ed ϵ è il coefficiente di estinzione molare del campione. La presenza di eventuali contaminazioni proteiche è stata rilevata mediante successiva lettura del campione a 280 nm, alla quale il legame peptidico ha il massimo assorbimento. Il rapporto tra A260/A280 indica, quindi, la qualità della preparazione di DNA e per una preparazione di DNA ben purificato deve essere compreso tra 1,8 e 2.

4.7 Congelamento dei batteri

Per il congelamento delle cellule batteriche, si utilizzano colture ottenute inoculando i batteri prelevati da una colonia cresciuta in piastre di LB agar in 1-2 ml di terreno contenente l'antibiotico verso cui i batteri sono resistenti. Dal momento dell'inoculo i batteri sono cresciuti a 37°C per 16 ore in agitazione. La coltura è successivamente diluita con un uguale volume di glicerolo sterile per ottenere una sospensione al 50% di glicerolo. Aliquote (400-500µl) di questa sospensione sono poi trasferite in opportuni tubi per congelamento (Nunc) e conservate a -80°C.

4.8 Digestione con enzimi di restrizione

Ogni DNA plasmidico è stato digerito con opportuni enzimi di restrizione. Gli enzimi di restrizione sono endonucleasi che riconoscono specifiche sequenze nucleotidiche sulle

molecole di DNA. Gli enzimi di restrizione si legano in modo specifico a queste sequenze che sono poi tagliate dall'enzima stesso generando frammenti di dimensioni note determinati sulla base della sequenza nucleotidica del plasmide mediante il programma Nbcutter disponibile on-line. La separazione di questi frammenti si ottiene in base alle differenze in peso molecolare mediante elettroforesi in gel di agarosio. La verifica delle dimensioni dei frammenti e dello stato del DNA è un importante controllo per valutare se durante le procedure di trasformazione e produzione del DNA non si siano verificati riarrangiamenti o delezioni grossolane del DNA. Una reazione di digestione, in genere, si esegue in H₂O in un volume finale di 20-30µl utilizzando 0.5-1µg di DNA plasmidico, il tampone per l'enzima e 1-2 Unità di enzima. Gli enzimi sono stati forniti dalla Ditta New England Biolabs assieme ai rispettivi tamponi concentrati 10X. I tamponi sono utilizzati alla concentrazione finale 1X. La reazione di digestione è eseguita alla temperatura di 37°C per circa due ore.

4.9 Metodi generali di clonazione di frammenti di DNA in plasmidi

I frammenti di DNA contenenti il gene di interesse sono stati ottenuti mediante digestione con opportuni enzimi di restrizione dei plasmidi in cui erano inseriti, separati mediante migrazione elettroforetica su gel di agarosio allo 0,8% in un tampone TAE 1X (Tris-HCl 40 mM pH 7.9, EDTA 1 mM pH 7.7 e sodio acetato 5 mM), elettroeluiti dal gel di agarosio e purificati mediante estrazione con fenolo-cloroformio-alcol-isoamilico (25:24:1) e cloroformio-alcol-isoamilico (24:1). Il DNA è stato, infine, raccolto mediante precipitazione in etanolo 95% a -80°C per 30 minuti, centrifugazione a 12000 rpm per 15 minuti, lavato con etanolo 70%, e risospeso in acqua in un volume di circa 20-30µl.

I plasmidi, in cui i frammenti così ottenuti dovevano essere clonati, erano digeriti con opportuni enzimi di restrizione e de-fosforilati con l'enzima CIP (Calf Intestinal Phosphatase), per impedirne la ligazione su se stessi senza inserzione del frammento esogeno, in presenza di 1/10 del volume totale di tampone specifico per la fosfatasi a 37°C per 30 min. Successivamente, i DNA plasmidici digeriti e defosforilati sono stati migrati in gel di agarosio, elettroeluiti e purificati come descritto sopra. I frammenti contenenti i geni di interesse sono stati infine ligati ai rispettivi plasmidi, secondo rapporti molecolari di 1:2 e 1:5 a favore dell'inserto, utilizzando l'enzima DNA ligasi del fago T4 (NEB) alla concentrazione di 5- 8 unità per µg di DNA ed 1/10 del volume totale di tampone di ligazione. Le reazioni di ligazione sono avvenute a 16°C per 12-24 ore. I prodotti della ligazione erano infine utilizzati per trasformare cellule batteriche competenti, come descritto nel precedente paragrafo, per la selezione e caratterizzazione delle colonie contenenti il plasmide ricombinante desiderato.

4.10 Linee cellulari

I vettori erpetici replicativi attenuati e quelli non replicativi sono stati prodotti, rispettivamente, in cellule *Vero*, che sono fibroblasti di rene di scimmia africana (ATCC, Rockville, MD; USA; CCL-81), e in cellule *E5*, che sono cellule Vero esprimenti il gene ICP4 di HSV-1.

Entrambe le linee cellulari crescono in monostrato a 37°C in presenza di CO₂ al 5% in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high glucose DMEM/HIGH) contenente glutammina 2 mM, 1% di penicillina e streptomina e il 10% di siero fetale di bovino (SFB).

4.11 Strategia generale per la creazione dei vettori replicativi e non replicativi basati su HSV-1

Per l'inserimento di un gene esogeno in un *locus* prefissato del genoma di HSV-1 è stata utilizzata una metodica basata sulla ricombinazione tra sequenze di DNA omologhe, definita "sistema PacI"¹⁰¹ combinata con quella detta "sistema PmeI". Questa strategia è stata ideata per favorire la generazione e la selezione di HSV-1 con delezioni in *locus* prescelti e l'inserzione di geni esogeni nei locus deleti. Innanzitutto si crea una delezione nel *locus* prescelto del genoma di HSV-1 mediante inserimento di un gene reporter (*lacZ* o *EGFP*) nel *locus*. La delezione si genera come conseguenza della ricombinazione omologa fra sequenze del genoma virale e le sequenze omologhe di un plasmide ricombinante, in cui è stato precedentemente inserito (nei siti di restrizione PacI o PmeI assenti nel genoma virale wild-type) il gene reporter (*lacZ* o *EGFP*) fiancheggiato, a 5' e 3', dalle sequenze di HSV-1 derivanti dal *locus* virale in cui si desidera inserire il gene reporter. Come conseguenza della ricombinazione omologa il gene reporter si inserisce nel backbone di HSV-1 generando una interruzione e inattivazione del *locus* prescelto. I virus ricombinanti sono quindi identificati e selezionati mediante colorazione del monostrato cellulare con X-gal (se il gene inserito è *lacZ*), o mediante analisi della fluorescenza (se il gene inserito è *EGFP*), e caratterizzati in dettaglio come descritto nel paragrafo successivo. Se al posto del gene reporter si vuole poi inserire un gene di interesse (ad esempio un gene terapeutico), si procede con la realizzazione di una nuova ricombinazione omologa tra il virus ricombinante HSV1-LacZ o HSV1-EGFP e un DNA plasmidico contenente il gene di interesse. In particolare, i virus HSV1-LacZ o HSV1-EGFP, contenenti il gene reporter nel *locus* prescelto, sono poi digeriti con gli enzimi PacI e /o PmeI per originare due segmenti lineari di DNA virale, uno contenente il gene reporter e l'altro corrispondente al restante genoma di HSV-1, che verranno co-trasfettati, in cellule Vero (per i vettori replicativi) o in cellule trans-complementanti E5 (per i vettori non

replicativi), insieme ad un plasmide ricombinante contenente il gene di interesse che si vuole inserire nel *locus* prescelto di HSV-1 (al posto del gene reporter) fiancheggiato dalle sequenze virali omologhe alle sequenze del *locus* in cui è stato inserito il gene reporter. Come conseguenza di un secondo evento di ricombinazione omologa tra le sequenze del virus ricombinante contenente LacZ o EGFP e le sequenze di HSV-1 fiancheggianti il gene del plasmide si otterrà l'inserzione del gene di interesse nel genoma virale.

4.12 Costruzione di vettori non replicativi e replicativi basati su HSV-1

Per la costruzione del vettore HSV-1 non replicativo (HSVTB5gJHE o HSVTB5gJTat) è stato utilizzato il plasmide pJW60420, contenente la sequenza codificante la proteina di fusione TB5Ag, fornitoci dal Prof. G. Delogu (Istituto di Microbiologia-Università del Sacro Cuore–Roma). La sequenza TB5Ag è stata ottenuta dal plasmide pJW60420 mediante digestione con gli enzimi BamHI e HindIII, elettroeluita e purificata come prima descritto e clonata nel plasmide pCDNA 3.1 Hygro⁺, precedentemente digerito con gli enzimi BamHI e HindIII, sotto il controllo trascrizionale del promotore del citomegalovirus umano (HCMV) a monte della sequenza di poliadenilazione. L'intera cassetta di espressione è stata poi "excisa" dal pCDNA 3.1 Hygro⁺ tB5Ag mediante digestione con l'enzima SpeI e clonata nei siti SpeI/XbaI del plasmide pBlueScript-HCMV-LacZ-PacI-41flank, chiamato p41LacZPacI. Questo plasmide contiene una sequenza di HSV-1 di 3100 bp (NotI-HindIII) corrispondente al *locus* U_L41 (posizioni genomiche 93858-90145), successivamente deleta di 500bp mediante digestione con SmaI e sostituita con il gene reporter LacZ delimitato a 5' e 3' dalla sequenza del sito per l'enzima di restrizione PacI, sotto il promotore HCMV. Il cDNA codificante per la proteina Tat di HIV-1 è stato ottenuto dal plasmide pCVtat¹⁰² mediante digestione con l'enzima di restrizione PstI e clonato nel sito PstI del plasmide pTZ18U. In seguito la sequenza *tat* è stata "excisa" dal plasmide pTZ18U_{tat} mediante digestione con gli enzimi HindIII e XbaI e clonata nei siti HindIII/XbaI del plasmide pCDNA 3.1 Hygro⁺ sotto il controllo trascrizionale del promotore di HCMV e a monte della sequenza di poliadenilazione BGH. L'intera cassetta di espressione è stata poi "excisa" dal plasmide così ottenuto mediante digestione con gli enzimi di restrizione NruI e SphI e clonata nei siti NruI-SphI del plasmide pTZ18UgJ1, chiamato pgJ1. Il plasmide pgJ1 deriva dal plasmide commerciale (Clontech), in cui è stata inserita una sequenza di HSV-1 di 2000 bp (Sall-HindIII) corrispondente al *locus* U_S5 (posizioni genomiche 136308-138345).

Per quanto riguarda, invece, il virus ricombinante a replicazione attenuata HSV1-LacZ, contenente il gene reporter LacZ nel *locus* U_L41 sotto il controllo del promotore del

citomegalovirus (HCMV), esso è stato generato mediante ricombinazione omologa tra il DNA di HSV-1 wild-type e quello del plasmide pB41-LacZ contenente il gene *LacZ* clonato all'interno del gene U_L41 nel sito unico *PacI*. A questo scopo, le cellule Vero sono state co-transfettate con il DNA di HSV-1 (ceppo LV) e con il DNA plasmidico pB41-LacZ, a concentrazioni diverse. Il virus ricombinante HSV1-LacZ è stato identificato mediante la colorazione delle placche con X-gal, come descritto successivamente. Il virus HSV1-LacZ è stato purificato dalle placche con il metodo della "limiting dilution", descritto in dettaglio nel successivo paragrafo, ed infine il DNA virale è stato estratto dai lisati di cellule Vero infettate con una soluzione contenente 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 0,6% SDS e proteinasi K (0,25 mg/ml), e purificato con fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (25:25:1) e cloroformio-alcool isoamilico (25:1).

Il virus ricombinante attenuato HSV1-Tat è stato successivamente ottenuto mediante ricombinazione omologa tra le sequenze U_L41 del plasmide pB41-tat e quelle del virus HSV1-LacZ. Il cDNA del gene *tat* (350 bp) di HIV-1, ottenuto dal plasmide pCV-tat, è stato inserito nei siti *EcoRI/XbaI* del plasmide pB41 (nelle posizioni genomiche (90145-91631 e 92230-93854 del locus U_L41), sotto il controllo trascrizionale del promotore del citomegalovirus. Le cellule Vero sono state poi co-trasfettate con il DNA di HSV1-LacZ, digerito con *PacI* (al fine di excidere il gene *LacZ*), e il DNA plasmidico pB41-tat linearizzato con *NotI*, a diverse concentrazioni. Il ricombinante HSV1-Tat contenente il cDNA del gene *tat* è stato poi identificato con la colorazione X-gal. Il processo di purificazione delle placche è stato condotto mediante 3-4 cicli di diluizione limite, ognuna seguita da analisi mediante Southern-Blot (SB), al fine di confermare la presenza del gene *tat*. Le aliquote di DNA virale, estratto dalle cellule infette come descritto prima, sono state digerite 16-18 ore a 37°C con *XbaI*, analizzate mediante elettroforesi su gel di agarosio 0,8% e Southern blot.

4.13 Trasfezione con fosfato di calcio

Questa tecnica è utilizzata per permettere la ricombinazione tra il plasmide contenente il gene d'interesse e il DNA virale. Il sale di fosfato di calcio facilita l'entrata di DNA nel citoplasma cellulare e la sua successiva traslocazione nucleare. Il giorno prima della co-trasfezione del DNA virale e di quello plasmidico si seminano 8×10^5 cellule Vero o E5 in piastre petri da 60 mm in modo da avere, il giorno successivo, un monostrato cellulare alla confluenza del 70-80% della confluenza massima, che rappresenta la condizione ottimale per la trasfezione delle cellule. Il DNA virale e il DNA plasmidico (in quantità che variano di volta in volta) sono risospesi assieme in 500 μ l di soluzione HBS (HEPES 200 mM, NaCl 135 mM, KCl 5 mM,

destrosio 5 mM, Na₂HPO₄ 0.7 mM, pH 7.05). Di solito si preparano più tubi contenenti concentrazioni diverse di DNA plasmidico rispetto al DNA virale (ad esempio con un rapporto 1:10 e 1:30). Successivamente, a ciascun tubo si aggiungono goccia a goccia 30µl di una soluzione di CaCl₂ 2M e si incuba a temperatura ambiente per 20 minuti al fine di consentire la formazione di un precipitato visibile ad occhio nudo.

Il monostrato di cellule seminate il giorno precedente è quindi lavato per 2-3 volte con HBS ed incubato con la soluzione di trasfezione, aggiunta goccia a goccia a 37°C per 10-15 min quindi con 3 ml di terreno completo (contenente il 10% FBS) per 4-6 ore. Trascorso questo periodo si procede con lo “shock al glicerolo”, che consiste nella rimozione dell’inoculo, nel lavaggio delle cellule con terreno fresco e nell’ incubazione delle cellule con 3ml di glicerolo al 15% in terreno a temperatura ambiente per 3 minuti esatti. Si procede quindi con la rimozione del glicerolo, seguita da 4 lavaggi con terreno completo facendo attenzione che il monostrato cellulare rimanga intatto ed incubazione delle cellule in 3ml di terreno completo a 37°C per 2-3 giorni. Trascorso questo intervallo, si osservano le cellule al microscopio per verificare la formazione di placche di lisi, indice della presenza di foci d’infezione. A questo punto le cellule ed il terreno sono raccolti in un tubo da 5 ml e sottoposti a 3 cicli di congelamento-scongelo per favorire la lisi delle cellule con la conseguente liberazione dei virioni. La sospensione è poi centrifugata 5 minuti a 2000 rpm per far precipitare i detriti cellulari e il supernatante, contenente i virioni, è raccolto e conservato per l’isolamento e la caratterizzazione del nuovo virus ricombinante.

4.14 Limiting dilution

Le cellule *E5 o Vero* (2x10⁶ cellule in 2 ml) sono infettate con una quantità di virus tale da dare circa 30 placche (quantità calcolata in base al titolo virale). Le cellule e il virus sono incubati in un tubo a 37°C per 1 ora in agitazione per favorire l’adesione del virus alle cellule. Si aggiungono poi 8 ml di terreno fresco e si seminano le cellule in una piastra da 96 pozzetti, in modo tale da avere circa 20.000 cellule/100µl. La piastra è quindi incubata a 37°C fino alla comparsa dell’effetto citopatico (2-5 giorni). A questo punto si osserva l’andamento dell’infezione al microscopio cercando i pozzetti contenenti una sola placca (generata quindi da una singola particella virale infettante). Le cellule e il terreno di questi pozzetti sono raccolti e sottoposti a tre cicli di congelamento a -80°C e scongelamento a 37°C per favorire la lisi cellulare ed il conseguente rilascio del virus. Il virus così ottenuto è utilizzato per infettare nuove colture di cellule Vero o E5 (1x10⁵) seminate in piastre da 24 pozzetti. A questo scopo, si incuba la piastra a 37°C fino alla comparsa dei segni d’infezione. Il contenuto

di ogni pozzetto è poi raccolto e trasferito in tubi eppendorf, e sottoposto a tre cicli di congelamento-scongelo. Dopo aver sonicato brevemente per disgregare ulteriormente le cellule, si preleva una parte del contenuto di ogni eppendorf (circa 250 µl) e s'infezano nuovamente le cellule ($2,5 \times 10^5$ cellule) in piastre da 12 pozzetti a 37°C fino alla comparsa dei segni di infezione, in modo tale da ottenere campioni da cui estrarre il DNA dei virus ricombinanti isolati. La restante parte di virus che non viene utilizzata è conservata a -80°C come stock

4.15 Preparazione del DNA virale su piccola scala

Dopo il terzo ciclo di infezione, si procede con l'isolamento del DNA virale per analizzare mediante Southern Blot la presenza del gene d'interesse all'interno del virus ricombinante. Le cellule infettate nelle piastre da 12 pozzetti con i ricombinanti virali isolati con la "limiting dilution" (come descritto nella precedente sezione) sono raccolte in tubi eppendorf, centrifugate per 15 minuti a 12000 rpm, e lisate in 200µl di tampone di lisi (Tris 10 mM pH 8.0, SDS 0.6%, EDTA 10 mM, proteinasi K 0.25mg/ml) per 16-18 ore a 37 °C in agitazione. Il DNA è poi estratto e purificato con fenolo-cloroformio-alcool isoamilico (25:25:1) e cloroformio-alcool isoamilico (25:1), ed infine raccolto mediante precipitazione con un doppio volume di etanolo 95% freddo e 0,3 M Na-Citrato per almeno 30 minuti a -80 °C e successiva centrifugazione per 20 minuti a 12000 rpm. Il DNA è lavato con etanolo 70%, centrifugato a 12000 rpm per 5 minuti, asciugato all'aria e risospeso in acqua sterile, la cui quantità (30-100µl) dipenderà dalle dimensioni del pellet. Un'aliquota di questa sospensione, corrispondente ad 1/10 del volume finale, è poi digerita con enzimi di restrizione, migrata in gel di agarosio ed analizzata mediante Southern Blot

4.16 Colorazione con cristal violetto

Questa metodica permette di visualizzare le placche di infezione in monostrati cellulari e determinare il titolo di uno stock virale.

I monostrati di cellule Vero sono infettate con 1 ml di diverse diluizioni di una sospensione virale (ad esempio da 10^{-1} a 10^{-12}) per un'ora a 37° C. Dopo rimozione dell'inoculo, le cellule sono incubate a 37°C con terreno contenente lo 0,3% di agar o metilcellulosa fino alla comparsa dei segni di infezione (2-5 giorni). Le cellule sono lavate due volte con phosphate buffer saline (PBS) (Gibco), fissate e colorate con una soluzione di etanolo (50%) e acqua (50%) contenente Cristal violetto al 1% per 15-30 minuti a temperatura ambiente. Al termine dell'incubazione il colorante colorerà le cellule di viola permettendo di evidenziare per

contrasto i foci di infezione o le placche di lisi. Dopo incubazione, si elimina la soluzione, si lava bene con acqua distillata e si asciuga all'aria. Infine, si procede al conteggio delle placche per risalire al titolo virale. Il titolo virale si ottiene moltiplicando il numero delle placche e moltiplicandolo per l'inverso della rispettiva diluizione e si esprime come numero di particelle formanti placca (pfu)/ml, essendo ciascuna placca derivante da una singola particella virale infettante.

4.17 Colorazione con X-Gal

Il gene *LacZ* codifica l'enzima β -galattosidasi che scinde il substrato 5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galattoside (X-gal) in un prodotto colorato. Le placche prodotte dai virus ricombinanti HSV1-*LacZ* assumono perciò colore blu. Con questo tipo di colorazione si distingue una placca generata da un virus ricombinante contenente il gene *LacZ* da una placca generata da un virus che non ha subito ricombinazione in quanto una placca indotta da un virus HSV-1 non ricombinante genera una placca bianca. Questa tecnica è utile sia per titolare sia per valutare la frequenza di ricombinazione.

Le cellule infettate sono lavate con PBS, fissate con glutaraldeide all' 1.5% in PBS per un minuto, lavate due volte con PBS ed incubate a 37 °C al buio con 14 mM $K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$, 12 mM $K_3Fe(CN)_6$, X-gal (28,6 μ l /ml, Sigma). per qualche ora. Si contano quindi le placche blu e bianche e si calcola il rapporto tra di esse per ottenere la frequenza di ricombinazione.

4.18 Analisi dell'espressione di EGFP (Enhanced green fluorescent protein)

L'Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP), utilizzata come marcatore per la costruzione dei ricombinanti virali, è una variante della proteina wild-type (GFP) fluorescente verde isolata dalla medusa *Aequorea victoria*. EGFP possiede due aminoacidi diversi rispetto a GFP, ovvero una leucina al posto di una fenilalanina e una treonina al posto di una serina in posizione. L'espressione fenotipica differisce di poco dalla proteina GFP wild-type in quanto EGFP è una proteina che emette una fluorescenza verde più brillante e luminosa.

Lo screening dei virus contenenti il gene che codifica la proteina EGFP è stato eseguito mediante l'utilizzo di un microscopio a fluorescenza Nikon Eclipse TE2000-S. L'EGFP è visibile a lunghezze d'onda comprese tra 488 e 509 nm, ed è in grado di riemettere luce di colore verde brillante, perciò i virus ricombinanti in cui il gene EGFP è stato sostituito dal gene di interesse come conseguenza della ricombinazione omologa genereranno placche non fluorescenti.

4.19 Preparazione di stock virali

Gli stock dei virus replicativi attenuati HSV1-Tat, HSV1-LacZ, dei virus non replicativi HSVTB5gJHE e HSVTB5gJTat e dei virus HSV wild-type (ceppi LV di HSV-1 e ceppo G di HSV-2) sono stati preparati mediante infezione di cellule (4×10^8) Vero (per i virus wild-type e per i virus vivi attenuati) ed E5 (per i virus inattivati) con dosi crescenti di ciascun virus in 15 ml di terreno per 1 ora a 37 °C e in leggera agitazione. L'inoculo virale è stato poi rimosso e le cellule sono state coltivate a 37 °C fino ad osservare il 100% dell'effetto citopatico. Le cellule sono state poi raccolte, centrifugate a 2000 rpm per 15 minuti, risospesi in 2 ml di terreno e sottoposti a tre cicli di congelamento e scongelamento (-80°C/37°C) e successiva sonicazione in ghiaccio per liberare le particelle virali. I surnatanti invece sono stati prelevati, trasferiti in nuovi tubi e centrifugati a 20000 rpm per 30 minuti nel rotore JA20 (Beckman) per raccogliere il virus. Infine, il virus raccolto dal surnatante e dalle cellule è stato purificato attraverso la centrifugazione in gradiente di densità (Opti Prep; Life Technologies, Inc.), come descritto nel successivo paragrafo, e risospeso in PBS senza calcio e magnesio. Lo stock virale ottenuto è stato titolato in vitro, come prima descritto, e conservato a -80°C fino al momento dell'uso.

4.20 Purificazione degli stock virali

La purificazione degli stock virali da un estratto di cellule infettate è realizzata mediante stratificazione degli estratti cellulari su gradienti Optiprep. In questo modo è possibile purificare il virus dai detriti cellulari, dalle proteine del siero e dai componenti del terreno di coltura. Il gradiente OptiPrep si ottiene unendo l'Optiprep (soluzione al 60% di Iodixanolo in acqua) e soluzioni saline che generano un gradiente di densità. Le soluzioni utilizzate sono:

- Soluzione B:
2.8 ml di NaCl 5 M, 6 ml di HEPES 1 M (pH 7.3), 1.2 ml di EDTA 0.5 M (pH 8.0) in 100 ml di H₂O; questa soluzione è filtrata sterilmente e conservata a +4°C.
- Soluzione C:
2.8 ml di NaCl 5 M, 1 ml di HEPES (pH 7.3), 200 ml di EDTA 0.5 M in 100 ml di H₂O; questa soluzione è filtrata sterilmente e conservata a + 4°C.
- Soluzione D:
5 volumi di OptiPrep™ (soluzione acquosa al 60% p/v, sterile e priva di endotossine, di Iodixanolo) e un volume di soluzione B.
- Soluzione E:
2.4 ml di soluzione C, 500 µl di virus; il volume totale deve essere sempre di 2.9 ml.

- Soluzione F:

840 µl di soluzione C; 660 µl di soluzione D.

A questo punto all'interno di tubi da ultracentrifuga si aggiungono 2.2 ml di soluzione D e 2.9 ml di soluzione E, tubi bilanciati con la soluzione F.

Si centrifuga a 58000 rpm per 3 ore e 20 minuti alla temperatura di 4°C usando il rotore (Beckman). In seguito alla centrifugazione, il virus forma una banda opaca di sedimentazione che è prelevata sterilmente con una siringa. Il virus purificato è diluito in PBS al fine di eliminare i residui di Iodixanolo, centrifugato a 20000 rpm per 30 minuti a 4°C ed il pellet ottenuto risospeso in PBS, aliquotato e conservato a -80°C.

4.21 Western Blot per caratterizzare i virus non replicativi

Sono state infettate 1×10^6 cellule E5 con 1 MOI (molteplicità media di infezione) di virus HSVTB5gJHE proveniente dalla limiting dilution. Dopo 24, 48 e 72 ore, le cellule sono state raccolte e centrifugate per 10 minuti a 1500 rpm in una centrifuga. Il pellet è stato risospeso in suspension buffer (NaCl 0,1M, Tris-HCl 0,01 M pH 7,6, EDTA 0,001 M pH 8, inibitori delle proteasi), SDS al 4%, blu di bromofenolo allo 0,2% e DTT (ditiotreitolo) 200 mM. Al surnatante invece si sono aggiunti Aprotinin (Sigma), SDS al 4%, blu di bromo fenolo allo 0,2% e DTT 200 mM. I campioni (15-20 µl) sono stati analizzati in gel di SDS-poliacrilamide al 10% assieme ad un marcatore di pesi molecolari (High-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham), migrati a corrente costante di 100 V in running buffer (Tris 25 mM, glicina 250 mM pH 8.3, SDS 0.1%), e trasferiti su membrane di PVDF (poliviniliden difluoride, Immuno-Blot, BIORAD) in transfer buffer (glicina 39 mM, Tris base 48 mM, SDS 0.037%, metanolo 20%) per 1 ora a 100 V. Dopo il trasferimento delle proteine, le membrane sono state incubate con blocking buffer (TBS 1X, non-fat dry milk, Biorad e successivamente con l'anticorpo primario diretto verso (Monoclonal anti-HA Clone HA-7, SIGMA) diluito 1:1000 in soluzione contenente TBS 1X, Tween20 0.1%, non-fat-dry-milk 1% per 2 ore a temperatura ambiente. Dopo incubazione con l'anticorpo primario, le membrane sono state lavate 3 volte con washing buffer (TBS 1X, 0.1% Tween 20) per eliminare l'eccesso di anticorpo primario, ed incubate con l'anticorpo secondario coniugato con perossidasi di rafano (anti-mouse IgG peroxidase conjugated, Pierce) diluito 1:2500 in soluzione contenente TBS 1X, 0.1% Tween 20 per 1 ora a temperatura ambiente. Dopo tre lavaggi, la presenza degli immunocomplessi è stata evidenziata mediante una reazione di chemiluminescenza trattando la membrana con una soluzione ottenuta mescolando in rapporto 1:1 i due reagenti presenti nel kit di rilevamento ECL, (Detection Reagent 1 Peroxide Solution e Detection

Reagent 2 Luminol Enhancer Solution, Pierce). La membrana è stata bagnata per 2 minuti con questa soluzione e quindi messa a contatto con una lastra autoradiografica. Il primo reagente libera H₂O₂ che viene trasformato dalla perossidasi, coniugata all'anticorpo anti-topo, in O₂ e H₂O, e il secondo reagente contiene luminolo che in presenza di O₂ si ossida ed emette luce impressionando la lastra.

4.22 Western Blot per caratterizzarei virus replicativi attenuati

Cellule Vero (1x10⁶) sono state infettate con HSV1-Tat a diverse concentrazioni. Gli estratti cellulari, corrispondenti a 10µg di proteine totali, sono stati caricati su gel SDS-poliacrilammide al 12% ed analizzati mediante Western blot, utilizzando un siero di coniglio antiTat, diluito 1:1000, e un anticorpo secondario di topo (mouse anti-rabbit IgG) coniugato con perossidasi di rafano (Sigma) alla diluizione 1:4000. Gli immunocomplessi sono stati rilevati mediante kit ECL (Detection Reagent 1 Peroxide Solution e Detection Reagent 2 Luminol Enhancer Solution, Pierce), come detto nel paragrafo precedente. Come controllo sono state utilizzate cellule non infettate e cellule infettate con 1 MOI di HSV-LacZ (vettore di controllo). Inoltre si è utilizzata la proteina ricombinante Tat (1 µg), ottenuta dalla Ditta Diatheva (Urbino, Italia).

5 ANIMALI E STABULAZIONE

Sono stati utilizzati topi femmine (Balb/C, C57BL/6) di 6 settimane di età (Charles-River, Calco-Milano, Italia). I topi sono stati ordinati di 5 settimane e mantenuti nello stabulario per una settimana prima dell'inizio dei protocolli sperimentali. Dopo l'infezione con HSV1-LacZ o con HSV1-Tat (per il virus replicativo attenuato), con HSV1TB5gJHE e HSV1TB5gJTat (per il virus non replicativo) o con i HSV-1 e HSV-2 wild-type, tutti gli animali sono stati controllati giornalmente per valutare le loro condizioni di salute, vitalità, lucentezza del pelo e motilità e la comparsa dei segni tipici dell'infezione (come descritto più in dettaglio di seguito). Per tutta la durata del protocollo di sperimentazione la stabulazione degli animali è avvenuta sotto stretto controllo veterinario, all'interno di apposite gabbie inserite in moduli con aria purificata e con un massimo di 6 topi per ciascuna gabbia.

5.1 Titolazione in vivo dei virus HSV-1 e HSV-2 wild-type

La dose letale (LD₁₀₀) di HSV-1 e HSV-2 wild-type è stata determinata mediante un'infezione intravaginale di topi Balb/c e C57BL/6. Una settimana prima dell'infezione, gli animali venivano trattati con 2mg/100µl di Depo-Provera (Depo-medrossiprogesterone acetato;

Pfizer), per via sottocutanea nel collo, per sincronizzare il ciclo estrale, facilitare ed uniformare l'infezione. Successivamente, gruppi di topi Balb/C (n=7) sono stati inoculati per via intravaginale con 10^5 , 10^6 e 10^7 pfu di HSV-1 wild-type (ceppo LV) oppure con 10^4 , 10^5 e 10^6 pfu di HSV-2 (ceppo G). Per il modello dei C57BL/6, invece, i topi sono stati inoculati con 10^7 e 10^8 pfu di HSV-1 e di HSV-2. Prima della inoculazione i virus sono stati scongelati in ghiaccio e sonicati per 5 secondi in ghiaccio per disgregare eventuali aggregati di particelle virali. I topi sono stati quindi anestetizzati con isofluorano al 5%. Mediante l'uso di uno scovolino, precedentemente sterilizzato con isopropanolo al 70% ed asciugato sotto cappa per tutta la notte in presenza di luce UV, sono state create delle lievi abrasioni a livello vaginale per facilitare la successiva infezione virale. Dopo l'infezione, i topi sono stati osservati quotidianamente per monitorare la comparsa di segni clinici locali e/o sistemici di infezione secondo i seguenti parametri arbitrari: 0 (assenza di segni di infezione), 1 (pelo arruffato), 2 (comparsa di pustole a livello vaginale), 3 (paralisi degli arti posteriori) e 4 (morte dell'animale). Ciascun esperimento è stato ripetuto per 3 volte. La LD₁₀₀ scelta per i successivi esperimenti di challenge dei topi Balb/C è stata 10^6 pfu per HSV-1 e 10^5 pfu per HSV-2, mentre LD₁₀₀ scelta per i topi C57BL/6 è stata di 10^8 pfu per HSV-1 e 10^7 pfu per HSV-2.

5.2 Determinazione delle dosi ottimali di virus replicativo HSV1-LacZ o HSV1-Tat per il prime del sistema immune

Per determinare quale sia la dose minima di virus ricombinante in grado di indurre una buona risposta immune cellulare sono stati eseguiti alcuni esperimenti preliminari.

Al giorno -7, topi femmine C57BL/6 e Balb/C di 6 settimane di età sono stati sottoposti a trattamento con depoprovera (2mg/topo in 100µl di soluzione fisiologica) al fine di sincronizzare l'estro di tutti gli animali. Quindi, il giorno dell'inizio del protocollo sperimentale (giorno 0), gli animali sono stati suddivisi in gruppi (5 topi per gruppo) ed infettati con diverse dosi (10^2 o 10^3 pfu in 10µl) di virus HSV1-LacZ o HSV1-Tat somministrato per via intravaginale (i.vag) o per via intradermica (ID). Per l'infezione intravaginale gli animali sono stati anestetizzati brevemente con isofluorano prima dell'infezione e trattati con uno scovolino come descritto nella precedente sezione.

Alternativamente, le stesse dosi di virus sono state somministrate per via intradermica (ID). In questo caso non è stato necessario sincronizzare il ciclo dei topi con depoprovera né anestetizzare gli animali, ma si è proceduto direttamente facendo una piccola iniezione nel dorso dell'animale. Dopo 7 giorni dall'infezione, i 5 topi appartenenti a ciascun gruppo sono

stati sacrificati per eseguire l'analisi delle risposte immuni cellulari al fine di scegliere la dose di inoculo virale per i successivi studi.

Sulla base di questi esperimenti, la dose scelta per il "prime" efficace del sistema immune senza che questa causi malattia, è stata: 10^3 pfu per entrambe le vie di somministrazione.

5.3 Protocolli sperimentali

Topi femmine Balb/ C e C57BL/6 di 6 settimane di età sono state divise in gruppi, pre-trattati con depoprovera ed in base al protocollo sperimentale trattati con i vettori HSV-1 a replicazione attenuata (HSV1-Tat e HSV1-LacZ) oppure con i virus HSV-1 non replicativi (HSVTB5gJHE) esprimenti il gene di controllo o (HSVTB5gJTat) esprimente il gene *tat* di HIV-1, ed infine sottoposti a challenge con una dose letale di HSV-1 o HSV-2 wild-type.

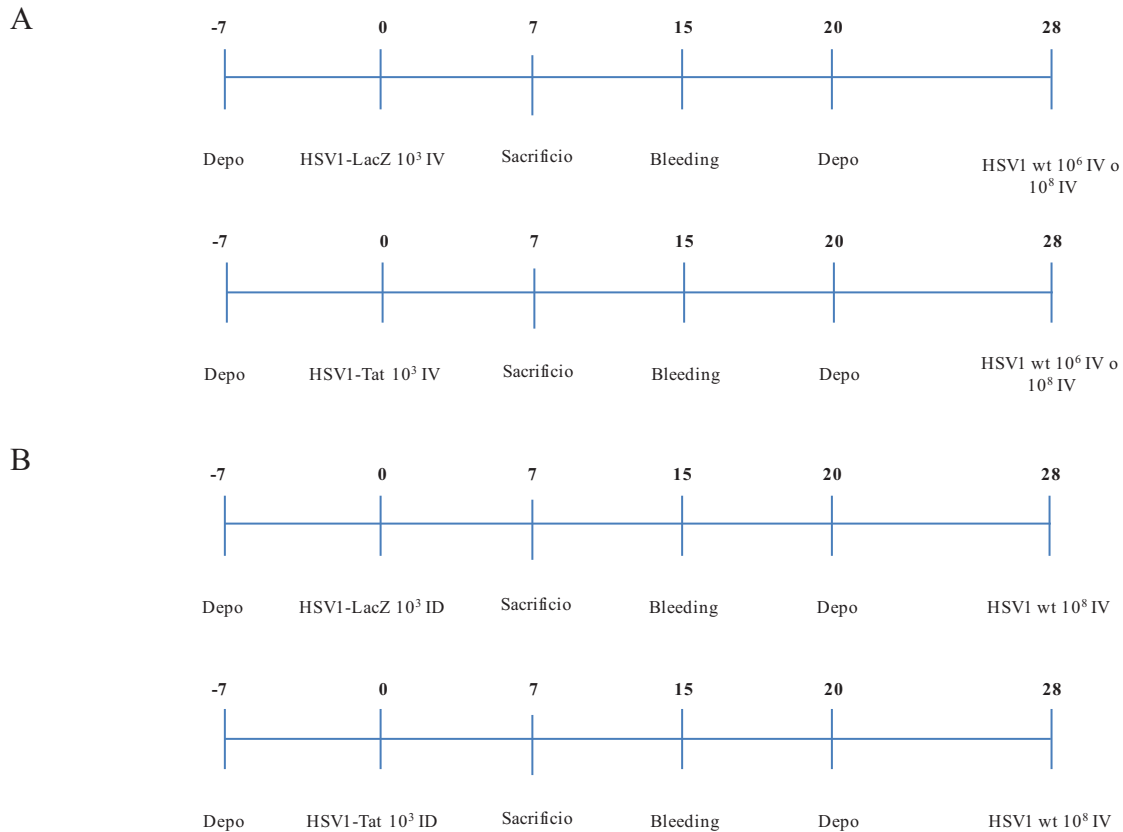
5.4 Prime intravaginale (i.vag) o intradermico (ID) con HSV1-LacZ o HSV1-Tat e challenge intravaginale con HSV-1 wild-type

In questa serie di esperimenti si è valutato l'effetto della immunizzazione (i.vag e ID) con un virus erpetico replicativo attenuato (esprime o non esprime il gene *tat*) sul controllo dell'infezione intravaginale di una dose letale di HSV-1 wild-type. Gli animali (Balb/C e C57BL/6) sono stati infettati i.vag o ID con i virus HSV1-LacZ e HSV1-Tat a replicazione attenuata e successivamente sottoposti a challenge intravaginale con HSV-1 wild-type secondo il seguente schema:

- *giorno 0*: infezione i.vag o ID in base al gruppo di appartenenza (n =15/gruppo) con il vettore replicativo attenuato HSV1-LacZ o HSV1-Tat alla dose di 10^3 pfu in 10 μ l.
- Per il trattamento i.vag gli animali (Balb/C e C57BL/6) sono stati anestetizzati brevemente con isofluorano prima dell'infezione e trattati con uno scovolino come descritto nel precedente paragrafo.
- Nel caso dell'infezione ID è stato utilizzato solo il modello dei C57BL/6, in quanto al momento del sacrificio è possibile valutare una risposta cellulare sicuramente migliore rispetto a quella ottenuta dal sacrificio del modello murino dei Balb/C. Non è stato necessario anestetizzare gli animali, ma si è proceduto direttamente facendo una piccola iniezione sul dorso dell'animale, come descritto nel precedente paragrafo;
- *giorno 7*: una parte degli animali (n=5) appartenenti a ciascun gruppo è stata sacrificata per eseguire l'analisi della risposta cellulare sugli splenociti mediante saggi Elispot (IFN- γ e IL-4). Prima del sacrificio è stato prelevato del sangue dall'occhio per verificare anche l'eventuale presenza di anticorpi nel siero;

- *giorno 15*: 10 topi appartenenti a ciascun gruppo sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue dall'occhio per l'analisi delle risposte umorali;
- *giorno 28*: tutti gli animali (n=10) sono stati sottoposti a challenge i.vag con una dose letale di HSV-1 wild-type, diversa in base al ceppo murino come descritto nel precedente paragrafo.

Nei giorni successivi gli animali sono stati controllati per verificare le loro condizioni generali di salute, e la formazione di pustole o croste come descritto nel precedente paragrafo.



Schema 1: Protocollo sperimentale per gli studi in vivo con il vettore replicativo attenuato HSV1-Tat e HSV1-LacZ inoculato per la via intravaginale in topi Balb/C e C57BL/6 (A), e in topi C57BL/6 inoculati solo via intradermica (B). Tutti i topi dopo il prime venivano sottoposti a challenge con una dose letale di HSV-1 wild-type.

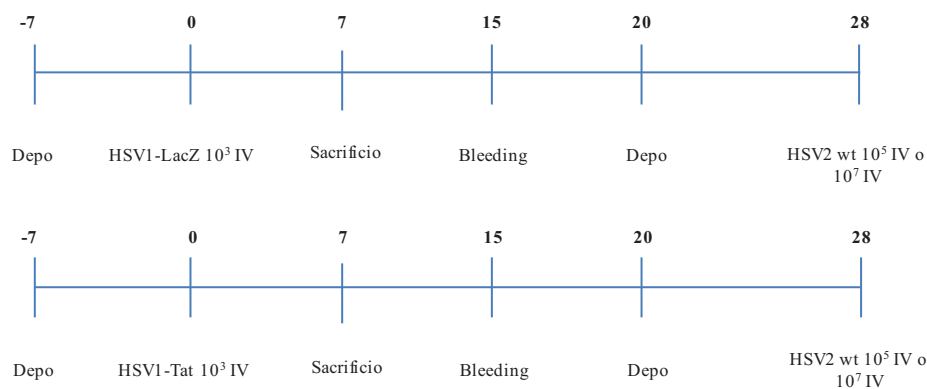
5.5 Prime intravaginale (i.vag) con HSV1-LacZ o HSV1-Tat e challenge intravaginale con HSV-2 wild-type.

In questa serie di esperimenti si è valutato l'effetto della immunizzazione intravaginale con un virus erpetico replicativo attenuato (esprime o non esprime il gene *tat*) sul controllo dell'infezione intravaginale di una dose letale di HSV-2 wild-type. Gli animali (Balb/C e C57BL/6) sono stati infettati i.vag con i virus HSV1-LacZ e HSV1-Tat a replicazione

attenuata e successivamente sottoposti a challenge i.vag con HSV-2 wild-type secondo il seguente schema:

- *giorno 0*: infezione i.vag in base al gruppo di appartenenza (n=12 topi per il modello C57BL/6 e 12 per il modello dei topi Balb/C) con 10^3 pfu in 10 μ l dei vettori replicativi attenuati HSV1-LacZ o HSV1-Tat . Per il trattamento i.vag gli animali sono stati trattati come descritto in precedenza;
- *giorno 15*: i topi appartenenti a ciascun gruppo sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue dall'occhio per l'analisi delle risposte umorali;
- *giorno 28*: tutti gli animali (n=24) sono stati sottoposti a challenge i.vag con una dose letale di HSV-2 wild-type, diversa in base al ceppo murino (10^5 pfu per i Balb/C e 10^7 pfu per i C57BL/6).

Nei giorni successivi gli animali sono stati controllati per verificare le loro condizioni generali di salute, e la formazione di pustole o croste.



Schema 2: Protocollo sperimentale per gli studi in vivo con il vettore replicativo attenuato HSV1-Tat e HSV1-LacZ inoculato per la via intravaginale in topi Balb/C e C57BL/6 sottoposti a challenge con una dose letale di HSV-2 wild-type.

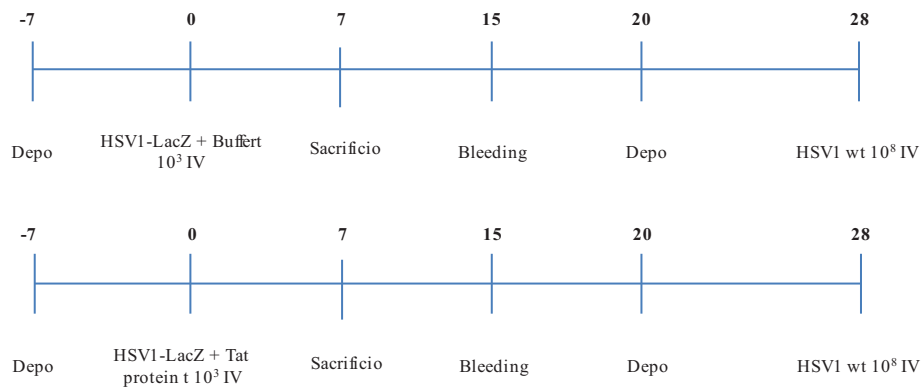
5.6 Prime intradermico (ID) con HSV1-LacZ, in presenza o assenza della proteina Tat esogena, e challenge intravaginale con HSV-1 wild-type.

In questa serie di esperimenti si è valutato l'effetto della immunizzazione ID con un virus replicativo attenuato (HSV1-LacZ), in presenza o assenza della contemporanea somministrazione della proteina Tat, sul controllo dell'infezione con una dose letale di HSV-1 wild-type, utilizzando il modello dei topi C57BL/6 secondo il seguente schema:

- *giorno 0*: i topi (n=15/gruppo) sono stati infettati ID con il vettore HSV1-LacZ alla dose di 10^3 pfu in 100 μ l associato alla proteina Tat (5 μ g/100 μ l/topo). Il virus e la proteina Tat sono stati somministrati ID a distanza di qualche minuto, cercando di

iniettare la proteina nello stesso sito di inoculazione del virus. I topi di controllo sono stati infettati ID con la stessa dose di virus HSV1-LacZ (10^3 pfu in 100 μ l) e quindi inoculati con 100 μ l tampone fosfato (senza la proteina Tat).

- *giorno 7*: una parte degli animali appartenenti a ciascun gruppo (n=5) è stata sacrificata per effettuare l'analisi delle risposte immuni cellulari contro HSV, mediante saggi Elispot (IFN- γ e IL-4).
- *giorno 15*: 10 topi per gruppo sono stati sottoposti ad un prelievo di sangue dall'occhio per eseguire l'analisi delle risposte immuni umorali;
- *giorno 28*: gli animali (n=10), sono stati sottoposti ad un challenge i.vag con una dose letale di HSV-1 wild-type (10^8 pfu in 10 μ l, come descritto nel precedente paragrafo).



Schema 3: Protocollo sperimentale per gli studi in vivo con il vettore replicativo attenuato (HSV1-LacZ associato al Tat proteina o al Buffer) somministrato ID, in topi C57BL/6.

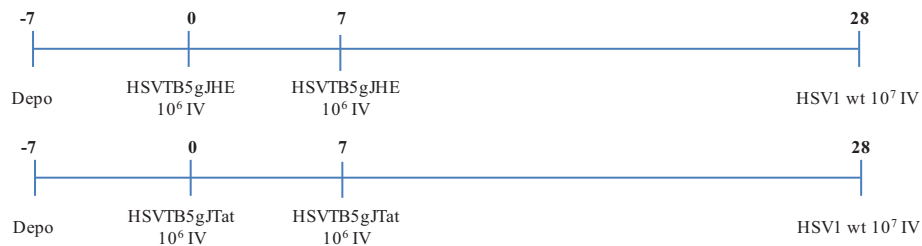
5.7 Prime/boost intravaginale (i.vag) con 10^6 pfu del vettore non replicativo HSVTB5gJHE o HSVTB5gJTat e challenge intravaginale con HSV-1 wild-type

In questi esperimenti si è valutato l'effetto della immunizzazione i.vag con 10^6 pfu di un virus erpetico non replicativo (esprime o non esprime tat), seguito da un boost, sul controllo dell'infezione i.vag con una dose letale di HSV-1 wild-type. I topi Balb/C sono stati infettati i.vag con i virus HSVTB5gJHE e HSVTB5gJTat non replicativi ad alla dose 10^6 pfu e poi sottoposti a challenge i.vag con HSV-1 wild-type secondo il seguente schema:

- *giorno 0*: infezione i.vag (n=10/gruppo) con il vettore HSVTB5gJHE o HSVTB5gJTat alla dose di 10^6 pfu in 10 μ l.
- *giorno 7*: una parte degli animali (n=5/gruppo) è stata sottoposta ad un ulteriore infezione (*Boost*) per via intravaginale con la dose di 10^6 pfu in 10 μ l . Qualche giorno

dopo la seconda infezione è stato effettuato un prelievo di sangue dall'occhio per la valutazione della risposta umorale;

- *giorno 28*: gli animali (n =10/gruppo) sono stati sottoposti ad un challenge intravaginale con una dose letale di HSV-1 wild-type (10^6 pfu in 10 μ l). Anche in questa caso gli animali sono stati controllati giornalmente, per monitorare le loro condizioni di salute, come detto in precedenza.



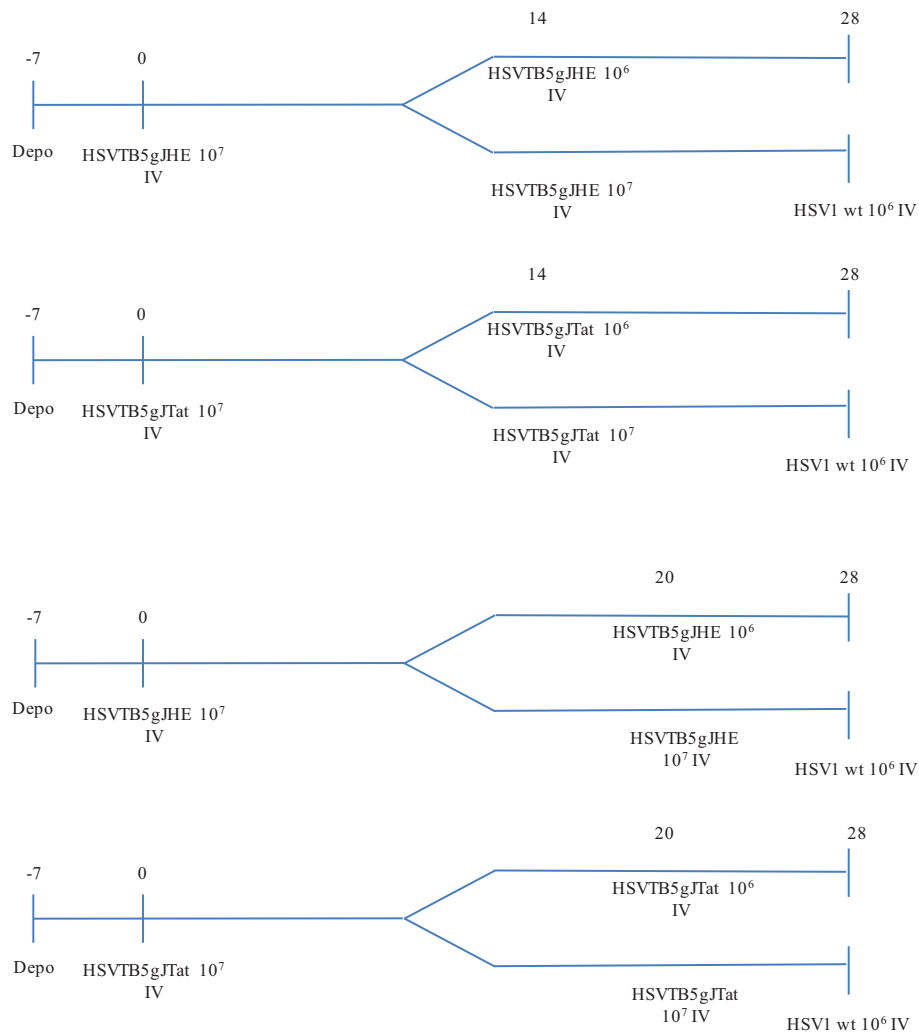
Schema 4: Protocollo sperimentale per gli studi in vivo con il vettore non replicativo nei topi Balb/C 10^6 pfu

5.8 Prime/boost intravaginale (i.vag) con 10^7 pfu del vettore non replicativo HSVTB5gJHE o HSVTB5gJTat e challenge intravaginale con HSV-1 wild-type.

In questi esperimenti si è valutato l'effetto della immunizzazione i.vag con 10^7 pfu un virus erpetico non replicativo (esprime o non esprime il gene *tat*), seguito da un boost, sul controllo dell'infezione intravaginale con una dose letale di HSV-1 wild-type. Gli animali (Balb/C) sono stati infettati i.vag con i virus HSVTB5gJHE e HSVTB5gJTat non replicativi alla dose di 10^7 pfu e poi sottoposti a challenge i.vag con HSV-1 wild-type secondo il seguente schema:

- *giorno 0*: infezione per via intravaginale (n totale=40) con il vettore HSVTB5gJHE o HSVTB5gJTat alla dose di 10^7 pfu in 10 μ l.
- *giorno 14 e 20*: una parte degli animali (n=10/gruppo) è stata sottoposta ad un'ulteriore infezione (*Boost*), sempre per via intravaginale con la dose 10^6 pfu e/o 10^7 pfu in 10 μ l. Qualche giorno dopo la seconda infezione è stato effettuato un prelievo di sangue dall'occhio per la valutazione della risposta umorale.
- *giorno 28*: gli animali di tutti i gruppi sono stati sottoposti ad un challenge i.vag con una dose letale di HSV-1 wild-type di 10^6 pfu in 10 μ l.

Anche in questo caso gli animali sono stati controllati giornalmente, per monitorare le loro condizioni di salute, come detto in precedenza.



Schema 5: Protocollo sperimentale per gli studi in vivo con il vettore non replicativo nei topi Balb/C 10⁶ pfu e 10⁷ pfu, sottoposti a challenge intravaginale con HSV-1 wild-type.

5.9 Prelievo oculare

Il sangue è stato prelevato dall'occhio del topo precedentemente anestetizzato con isofluorano per almeno 4-5 minuti utilizzando cannule simili ad un capillare di vetro (FISCHER SCIENTIFIC, Pittsburg, PA) Dopo ogni intervento sull'animale la ferita è stata pulita con PBS. Ciascun campione di sangue (circa 500 µl/topo) è stato raccolto in una provetta eppendorf, incubato a 4°C per 16 ore, centrifugato a 10.000 rpm in una centrifuga microfuge per 10 minuti ed il siero così ottenuto aliquotato e conservato a – 80°C fino al momento dell'uso.

5.10 Lavaggi vaginali

Al momento del sacrificio, la cavità vaginale è stata lavata con 250 µl di tampone (PBS contenente il 5% di siero fetale bovino (Invitrogen) raccolto in una provetta eppendorf ed incubato per 1 ora in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 10.000 rpm per 10 minuti a 4°C, sono stati aggiunti al surnatante 5 µl di PMSF 1 M (inibitore delle serin-proteasi) e 5 µl di 1% NaN₃ (Sodio Azide; Sigma). Ciascun campione è stato, quindi, aliquotato e conservato a – 20°C fino al momento dell'uso.

5.11 Peptidi di HSV

I peptidi di HSV-1 utilizzati nei saggi Elispot per analizzare le risposte dei topi C57BL/6 sono sequenze peptidiche di 8 aminoacidi, rispettivamente, della **glicoproteina B** (*SSIEFARL*), della **glicoproteina K** (*ITAYGLVL*) e della **ribonucleotide reduttasi 1** (*QTFDFGRL*). Per analizzare le risposte dei topi Balb/C, i peptidi utilizzati sono sequenze di 16 e 9 aminoacidi, rispettivamente, della **glicoproteina D** (*SLKMADPNRFRGKDLP*) e di **ICP27** (*DYATLGVG*) (IEDB Epitope). Tutti i peptidi sono stati sintetizzati e purificati dal Prof. Remo Guerrini (Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università di Ferrara). I peptidi sono stati risospesi in DMSO alla concentrazione di 10⁻² M, conservati a -20 ° C, e diluiti in RPMI 1640 immediatamente prima dell'uso. Le sequenze di questi peptidi risultano essere conservate in entrambi i virus HSV-1 e HSV-2.

5.12 Proteina TAT

La proteina Tat di HIV-1 è stata prodotta in *E.Coli* e conservata a -80°C . Tale proteina è stata fornita dall'Istituto Superiore di Sanità in tampone fosfato 0,15 M alla concentrazione di 30µg/500µl. Al momento dell'uso è stata mantenuta in ghiaccio ed al buio, ed è stata diluita in base alle esigenze sperimentali. Tutto il materiale plastico comprese le siringhe è stato avvinato con lo stesso tampone in cui è risospesa la proteina Tat.

5.13 Purificazione degli splenociti

Le milze prelevate dai topi sono poste su appositi filtrini (Cell Strainer, 70µm, Nylon, Becton Dickinson) precedentemente bagnati con RPMI 1640 e spremute utilizzando lo stantuffo di una siringa da 5 ml. Dopo la spremitura della milza, ogni filtrino è stato lavato con RPMI 1640, e la sospensione cellulare ottenuta dalla spremitura e il terreno di lavaggio sono stati raccolti in un tubo falcon da 50 ml e centrifugati a 1200 rpm per 10 minuti. Il pellet cellulare è

stato quindi risospeso in 5 ml di tampone per la lisi dei globuli rossi (Sigma). Dopo 4 minuti di lisi in ghiaccio, la sospensione cellulare è stata diluita con terreno di lavaggio RPMI 1640 contenente il 10% di FBS e centrifugata per 10 minuti a 1200 rpm. Gli splenociti purificati sono stati risospesi in terreno di coltura RPMI 1640 contenente il 10% di FBS, contati con il metodo del trypan blue exclusion e risospesi in terreno di coltura. Generalmente da una milza si ottengono $70-100 \times 10^6$ di splenociti.

6 ANALISI DELLE RISPOSTE CELLULARI ANTI-HSV

6.1 Saggio ELISPOT

Gli splenociti purificati dalle milze sono stati utilizzati per determinare la presenza di cellule secernenti le citochine IFN- γ e IL-4, mediante la metodica Elispot. A questo scopo si sono utilizzati kit commerciali (Becton Dickinson) seguendo le istruzioni della ditta. Gli splenociti ($0,5 \times 10^6$ /pozzetto) sono stati incubati in presenza dei singoli peptidi di HSV-1 (ciascuno alla concentrazione finale di 10^{-6} M), diluiti in terreno RPMI 1640 contenente il 10% FBS per 24 ore a 37°C in piastre da 96 pozzetti, precedentemente pretrattati con un anticorpo anti-citochina. Ogni campione è stato anche incubato con Concavalina A (5 μ g/pozzetto; controllo positivo di stimolazione), e solo con terreno in assenza di stimolo (controllo negativo di stimolazione). Ogni condizione è stata analizzata in duplicato. Dopo l'incubazione, le cellule sono state rimosse ed i pozzetti lavati con PBS contenente lo 0,5% di Tween 20. Il rilascio di citochine da parte delle cellule è stato quindi determinato mediante l'aggiunta di un anticorpo anti-citochina marcato con perossidasi di rafano e successiva aggiunta del substrato dell'enzima. Il numero degli spots (corrispondenti al numero di cellule secernenti la citochina) è stato infine contato con lo strumento AELVIS 4-Plate Elispot Reader. Il numero degli spots netti per ciascuna condizione è stato calcolato sottraendo al numero degli spots ottenuti nei pozzetti stimolati con i peptidi il numero degli spot delle stesse cellule non stimolate e quindi, rapportando il valore ottenuto ad un milione di cellule (n° spots/ 10^6 cellule). I campioni con numero di spot netti superiore a 50/ 10^6 cellule sono stati considerati positivi.

ANALISI DELLE RISPOSTE IMMUNI ANTICORPALI

6.2 Saggio ELISA

La presenza di anticorpi anti-HSV-1 nel siero dei topi immunizzati è stata valutata mediante saggi ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Piastre da 96 pozzetti (Nunc Maxi Sorp) sono state pre-adsorbite con 100 ng/100 μ l di lisato virale (Herpes-Simplex Type1

Purified Viral Lysate, Tebu-bio), risospeso in tampone PBS completo contenente 0,05% NaN₃ e lo 0,5% di latte (Sigma), ed incubate a 4°C per 16 ore. I pozzetti sono stati quindi lavati 5 volte con 200 µl di PBS completo contenente lo 0,05% di Tween 20, utilizzando un washer automatico (BioRad Model 1575 UmmunoWash). Per evitare la formazione di legami aspecifici degli anticorpi con la plastica, le piastre sono state incubate con 200 µl di PBS completo contenente lo 0,05% NaN₃ e lo 0,5% di latte, ed incubate a 37°C per 90 minuti. Dopo 5 lavaggi, in ciascun pozzetto è stato aggiunto il siero del topo da analizzare (100µl/pozzetto) diluito in PBS completo contenente lo 0,05% NaN₃ e lo 0,5% di latte. Ogni campione è stato saggiato in duplicato. Le piastre sono state incubate a 37°C per 90 minuti. Dopo 5 lavaggi, nei pozzetti è stato aggiunto l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano (anti-mouse IgG, o anti IgM, Sigma) diluiti, rispettivamente, 1:1000 e 1:7500 in PBS completo contenente lo 0,05% Tween 20 e l'1% di albumina sierica bovina (BSA). Dopo incubazione per 90 minuti a 37°C, le piastre sono state ulteriormente lavate ed incubate con il substrato della perossidasi ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) (Roche Diagnostics, Mannheim-Germany) per 50 minuti a 37°C. L'assorbanza dei campioni è stata, infine, determinata alla lunghezza d'onda di 405 nm utilizzando uno spettrofotometro per piastre (SUNRISE TECAN Salzburg-Austria). In ciascuna piastra sono stati inseriti 3 controlli negativi diluiti 1:100 (rappresentati da sieri di topi inoculati solo con tampone), ed un controllo positivo (rappresentato da un pool di sieri di topi positivi). Il valore di reazione di ciascun campione è stato calcolato come differenza tra i valori di assorbimento del campione e del bianco. Il valore di cutt-off di ciascuna piastra è stato calcolato come media dei valori OD dei controlli negativi addizionata del valore 0,05. I titoli anticorpali sono stati calcolati come il reciproco della prima diluizione superiore al cutt-off interpolato per regressione lineare alla retta che congiunge i punti rappresentati dalla prima diluizione sopra il cutt-off e la prima diluizione sotto il cutt-off, secondo la formula sotto riportata:

$$a = \bar{Y} - b\bar{X} \quad \text{dove } b \text{ è calcolata:}$$

$$b = \frac{n \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

Formula applicata utilizzando il programma excel.

6.3 Analisi dell'isotipo delle IgG

Per l'analisi dell'isotipo delle IgG anti-HSV, piastre da 96 pozzetti sono state pre-adsorbite, lavate e incubate per 90 minuti a 37°C con PBS completo contenente lo 0,05% NaN₃ e lo 0,5% di latte, come è descritto nella sezione precedente. Successivamente, si è proceduto alla aggiunta dei campioni di siero (diluiti 1:100 per lo screening e successivamente diluiti serialmente per la titolazione). Anche in questo caso nella piastra sono stati inseriti tre campioni di controllo negativo ed un campione di controllo positivo a titolo noto. Le piastre sono state incubate a 37°C per 90 minuti. Dopo lavaggio della piastra, ciascun campione di siero è stato saggiato per l'eventuale presenza di IgG₁ e IgG_{2a}, usando anticorpi specifici anti-IgG1 e anti-IgG2a di topo (Sigma) diluiti 1:1000 in PBS completo contenente lo 0,05% Tween 20 e l'1% di BSA. Dopo un'incubazione di 90 minuti a 37°C e successivo lavaggio della piastra, per la rilevazione dell'immunocomplesso è stato aggiunto un anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano, diluito 1:30000. Dopo un ulteriore incubazione di 90 minuti a 37°C la piastra è stata lavata e si è poi proceduto con l'aggiunta del substrato della perossidasi ABTS (2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) (Roche Diagnostics, Mannheim-Germany) per 50 minuti a 37°C. Al termine dell'incubazione, la reazione è stata bloccata con 100 µl di acido citrico 0,1 M. L'assorbanza dei campioni è stata infine determinata alla lunghezza d'onda di 405 nm utilizzando uno spettrofotometro per piastre (SUNRISE TECAN Salzburg-Austria). Il titolo anticorpale è stato determinato come descritto nel paragrafo precedente.

6.4 Analisi della presenza di IgA

La presenza di IgA HSV-1 specifiche nei campioni vaginali è stata ricercata mediante saggio ELISA. Piastre (Nunc Maxi Sorp) sono state pre-trattate con 100 µl per pozzetto di lisato virale (Herpes-Simplex Type1 Purified Viral Lysate, Tebu-bio) risospeso in PBS completo contenente lo 0,05% NaN₃ (per la ricerca di IgA antigene specifiche). Per ciascun campione da analizzare, altri pozzetti sono stati pretrattati con un anticorpo anti-IgA (goat anti-mouse IgA, 1µg/µl, Sigma) per la quantificazione delle IgA totali. Le piastre sono state quindi incubate per 16 ore a 4°C. I pozzetti sono stati lavati 5 volte con 200 µl di PBS completo contenente lo 0,1% di Tween 20, utilizzando un washer automatico (BioRad Model 1575 UmmunoWash). I lavaggi mucosali (100µl/pozzetto) sono stati opportunamente diluiti in PBS completo contenente lo 0,05% NaN₃ e lo 0,5% latte e successivamente aggiunti in ciascun pozzetto (preadsorbito con HSV e con l'anticorpo anti-IgA) ed incubati per un ora a 37°C. Ogni campione è stato saggiato in duplicato contemporaneamente nella stessa piastra per la

presenza di IgA totali ed IgA specifiche anti HSV-1, caricando per le prime una diluizione 1:40 e per le seconde una diluizione 1:8. In ciascuna piastra è stata inclusa una curva di taratura standard rappresentata da diluizioni seriali (da 100 ng/ml a 1.5625 ng/ml) di IgA di topo (Sigma) aggiunta ai pozzetti pre-adsorbiti con anti-IgA. Dopo l'incubazione le piastre sono state lavate cinque volte con PBS completo contenente lo 0,1% di Tween 20 mediante washer automatico (BioRad Model 1575 UmmunoWash). Infine, ad ogni pozzetto è stato aggiunto l'anticorpo secondario coniugato con la perossidasi di rafano (Anti-IgA-StrepHRP-coniugato, goat anti-mouse Sigma), diluito 1:3000 in PBS completo contenente lo 0,1% di Tween 20 e l'1% di BSA, (100 µl per pozzetto). Dopo incubazione delle piastre a 37°C per 1 ora, le piastre sono state lavate ed incubate per 30 minuti a temperatura ambiente con 100 µl per pozzetto di ABTS. La reazione è stata bloccata con acido citrico 0,1 M, 100 µl per pozzetto. L'assorbanza dei campioni è stata infine determinata alla lunghezza d'onda di 405 nm utilizzando uno spettrofotometro per piastre (SUNRISE TECAN Salzburg-Austria). In ciascuna piastra sono stati inseriti due pozzetti trattati con tutti i reagenti tranne i lavaggi vaginali (bianchi). Il valore di reazione di ogni campione è stato calcolato come differenza tra i valori di assorbimento di ogni campione e quello dei bianchi. La quantificazione delle IgA totali presenti nei lavaggi è stata determinata per interpolazione dalla curva standard delle IgA prendendo come riferimento una diluizione di IgA totali del campione che ricadesse nella fase lineare della curva di taratura. La quantificazione delle IgA specifiche anti-HSV-1 è stata elaborata come percentuale rispetto alle IgA totali calcolando il rapporto di diluizione e di OD tra IgA specifiche e totali nello stesso campione.

7 RISULTATI

7.1 Costruzione del vettore replicativo attenuato HSV1-Tat ed analisi dell'espressione della proteina Tat

I vettori replicativi attenuati esprimenti il gene di controllo LacZ ed il gene codificante per la proteina Tat, sono stati costruiti mediante la metodica PacI o PmeI.

Tali geni sono stati inseriti nel locus U_L41 del genoma di HSV-1 (ceppo LV). Il vettore HSV1-LacZ è stato ottenuto mediante ricombinazione omologa tra il virus HSV-1 wild-type ed il plasmide pB41-LacZ contenente il gene reporter lacZ sotto il controllo del promotore del citomegalovirus umano, inserito nell'U_L41 di HSV-1. Successivamente, è stato costruito il vettore HSV1-Tat mediante ricombinazione omologa tra il plasmide pB410-tat ed il virus HSV1-LacZ DNA.

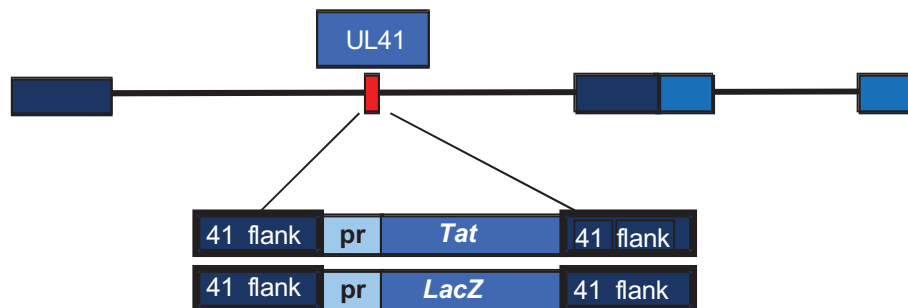


Figura 14: Rappresentazione schematica del genoma di HSV1-LacZ ed HSV1-Tat.

La presenza dei geni lacZ e tat nel locus U_L41 di entrambi i virus ricombinanti è stata confermata dall'analisi Southern blot (dati non riportati). L'espressione della proteina Tat è stata inoltre confermata dall'analisi Western blot (Fig. 15). A questo scopo, linee cellulari di fibroblasti appartenenti al modello dei Balb/C sono state infettate con il vettore HSV1-Tat. La presenza di Tat è stata analizzata 12 e 24 ore post-infezione. Le cellule non infettate, quelle infettate con HSV-1 wild-type (ceppo LV) o con il vettore HSV1-LacZ rappresentano il controllo negativo, mentre la proteina Tat ricombinante da sola è stata utilizzata come controllo positivo. Come mostrato nella figura 17, l'espressione di Tat all'interno del vettore è stata individuata sia 12 che 24 ore dopo l'infezione.

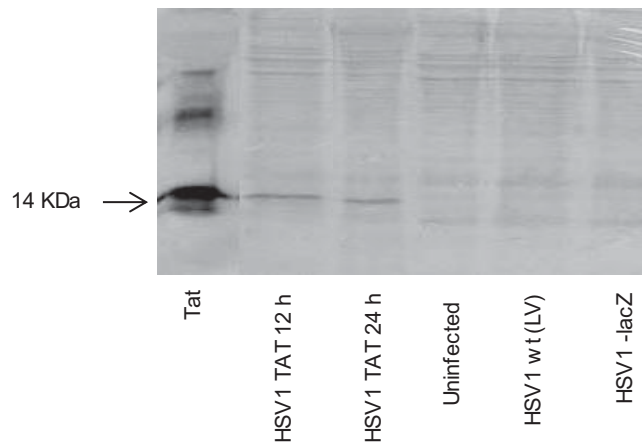


Figura 15: Analisi dell'espressione della proteina Tat, mediante western blot.

7.2 Costruzione del vettore HSVTB5gJHE non replicativo

Per la costruzione del ricombinante esprime la proteina di fusione TB5Ag è stato utilizzato il virus non replicativo S0ZgJHE (Fig.16), precedentemente prodotto nel nostro laboratorio.

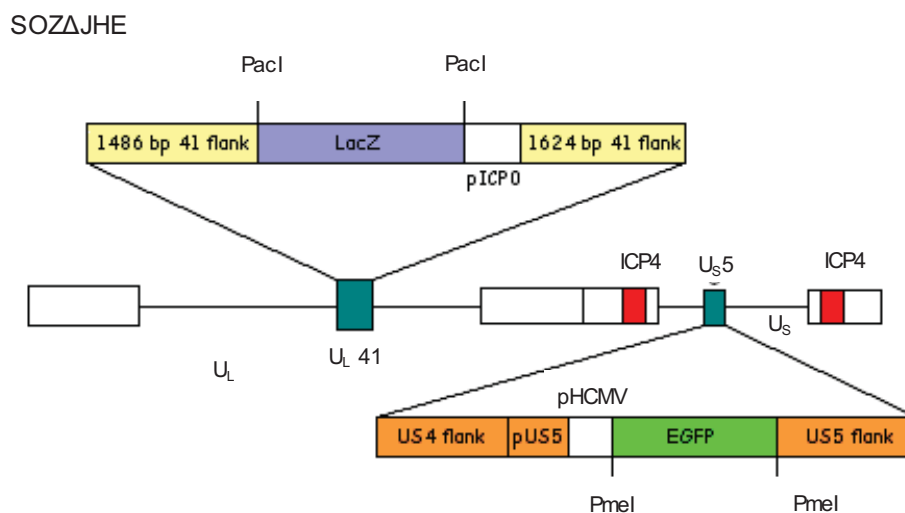


Figura 16: Rappresentazione schematica del genoma di S0ZgJHE. La linea nera rappresenta il DNA virale, i rettangoli bianchi le sequenze palindromiche, i rettangoli rossi i geni per ICP4 deleti. Si nota come i due geni reporter lacZ e EGFP siano stati inseriti rispettivamente nei locus U_L41 e U_S5 .

Il virus S0ZgJHE è un ricombinante non-replicativo che porta una delezione in entrambe le copie del gene precocissimo ICP4, contiene il gene reporter lacZ, fiancheggiato dai siti di restrizione PacI, sotto il promotore ICP0, all'interno del locus virale U_L41 che codifica per la proteina Vhs (Viral host shut-off) e contiene il gene reporter EGFP, fiancheggiato dai siti di

restrizione PmeI, sotto il promotore HCMV, all'interno del locus virale U_S5 che codifica per la glicoproteina virale J (gJ). Il virus S0ZgJHE, poiché manca del gene essenziale ICP4, è in grado di replicarsi solo nella linea cellulare E5, che esprime costitutivamente la proteina ICP4 complementante la delezione. Questo tipo cellulare è stato co-trasfettato con 1 μg di DNA plasmidico p41tB5Ag linearizzato con NotI e 5 μg di DNA virale S0ZgJHE digerito con PacI in modo da perdere il gene lacZ e facilitare l'evento di ricombinazione omologa. Questo ha permesso di ottenere un virus ricombinante denominato SHtB5Ag/gJHE contenente il multigene tB5Ag sotto il promotore HCMV al posto del gene lacZ nel locus U_L41. A distanza di 3 giorni dalla co-trasfezione sono comparse delle placche di infezione. È stato possibile riconoscere e isolare il ricombinante SHtB5Ag/gJHE dal virus S0ZgJHE dopo colorazione con X-gal in quanto i nuovi ricombinanti non presentavano più una colorazione azzurra data la sostituzione nel genoma virale, del gene reporter lacZ con il multigene di interesse. Le placche apparivano verdi al microscopio a fluorescenza indicando la presenza del gene reporter EGFP, (Fig.17).

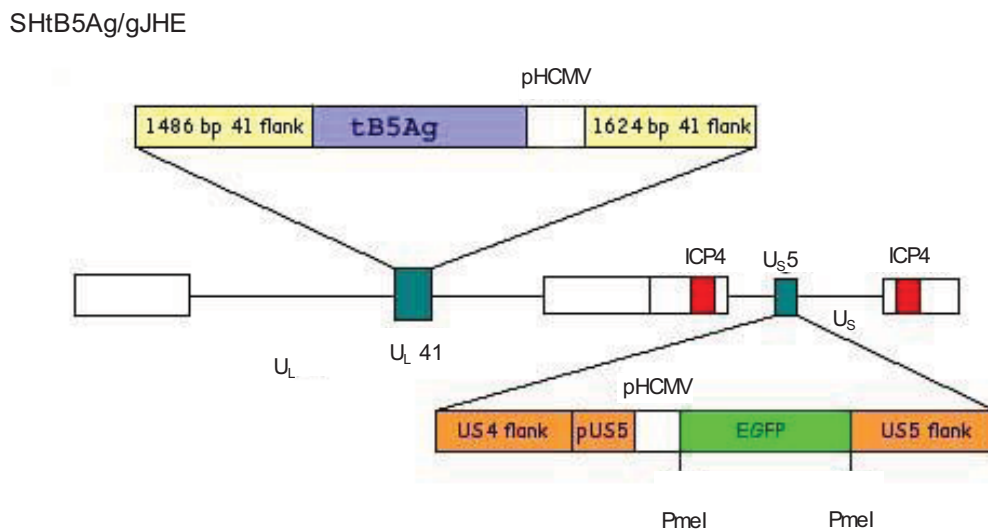


Figura 17: Rappresentazione schematica del genoma di SHtB5Ag/gJHE. La linea nera rappresenta il DNA virale, i rettangoli bianchi le sequenze palindromiche, i rettangoli rossi i geni per ICP4 deleti. Si noti come al posto del gene reporter lacZ sia presente il multigene tB5Ag sotto il promotore HCMV.

7.3 Costruzione del vettore *HSVTB5gJtat non replicativo*

Il vettore virale SHtB5Ag/gJHE presenta la possibilità di subire ulteriori modifiche poiché, possiede un secondo gene reporter, EGFP, che è stato sostituito con il gene che codifica per la proteina Tat di HIV-1. Per costruire questo ricombinante è stata utilizzata la stessa metodica impiegata per la costruzione del vettore SHtB5Ag/gJHE. E' stato costruito il plasmide pgJ1tat in cui la cassetta di espressione, contenente la sequenza tat guidata dal promotore HCMV, è stata clonata tra le sequenze omologhe virali fiancheggianti il locus U_{S5}.

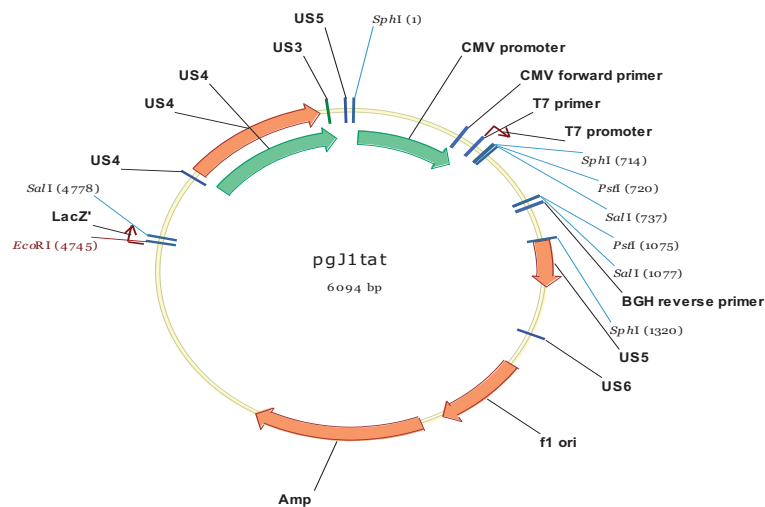


Figura 18: Mappa genica del plasmide *pgJ1tat*.

Le cellule E5 sono state quindi co-trasfettate con 1 µg di DNA plasmidico *pgJ1tat* linearizzato con EcoRI e 5 µg di DNA virale SHtB5Ag/gJHE digerito con PmeI in modo da perdere il gene EGFP. E' stato dunque possibile, attraverso ricombinazione omologa, l'inserzione della sequenza *tat* al posto del gene reporter EGFP nel ricombinante SHtB5Ag/gJHE. Questo ha permesso di ottenere un nuovo ricombinante contenente il multigene tB5Ag sotto il promotore HCMV al posto del gene per il lacZ nel locus U_{L41} e il gene codificante per la proteina Tat sotto il promotore HCMV al posto del gene per la EGFP nel locus U_{S5}. Il nuovo ricombinante SHtB5Ag/gJtat è stato inizialmente discriminato dal virus SHtB5Ag/gJHE grazie all'osservazione al microscopio a fluorescenza: tutte le placche singole ottenute dalla prima limiting dilution apparivano bianche. Questo era dovuto al fatto che i nuovi ricombinanti non codificano più per la proteina EGFP responsabile della colorazione verde.

7.4 Determinazione della dose letale 100 (LD₁₀₀) di virus (HSV-1 e HSV-2) wild-type da utilizzare in vivo negli esperimenti di challenge

La dose letale (LD₁₀₀) di HSV-1 e HSV-2 wild-type è stata determinata su topi di sesso femminile Balb/C e C57BL/6 di 6 settimane (Charles River Laboratories-Calco-Lecco, Italia), mediante un'infezione intravaginale a diverse dosi in base al ceppo murino. Gli animali sono stati precedentemente trattati (una settimana prima) con 2 mg/100 µl di Depo-Provera (Depo-medrossiprogesterone acetato), per via sottocutanea nel collo, per far sì che tutti possano trovarsi nella stessa fase estrale, allo scopo di rendere gli animali più suscettibili alle infezioni da HSV. Gruppi di 7 topi Balb/C sono stati inoculati per via intravaginale con un range di 10⁵, 10⁶, 10⁷ pfu di HSV-1(ceppo LV) wild-type e 10⁴, 10⁵ 10⁶ pfu di HSV-2 (ceppo G), per determinare la dose letale ottimale. Prima dell'uso i virus sono stati scongelati in ghiaccio, sonicati per 5 secondi, e rimessi in ghiaccio. Nella figura 19 (A-B) è mostrata la percentuale di sopravvivenza dopo l'infezione con HSV-1 e HSV-2 wild-type a diverse dosi, da cui si evince che la dose letale sul modello dei Balb/C risulta essere 10⁶ pfu per HSV-1, mentre per HSV-2 è 10⁵ pfu.

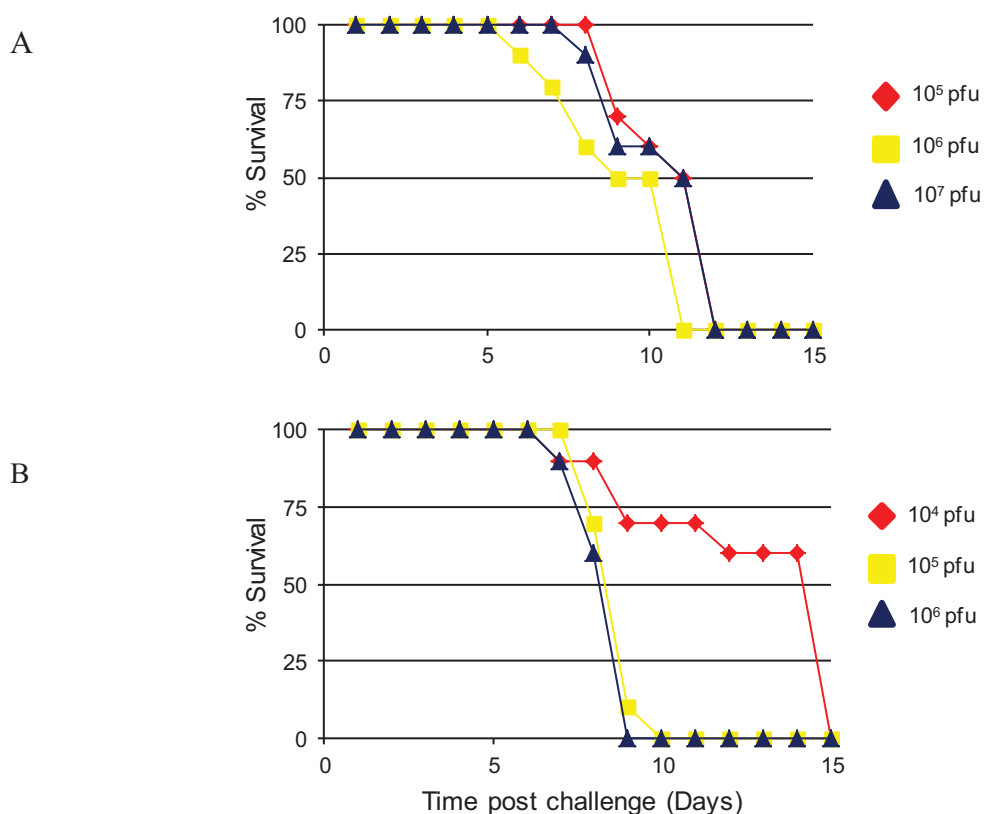


Figura 19: Percentuale di sopravvivenza dei topi Balb/C sottoposti a challenge (i.vag) con HSV-1 (ceppo LV) alle dosi 10⁵, 10⁶ e 10⁷ pfu, (A) e HSV-2 (ceppo G) alle dosi 10⁴, 10⁵ e 10⁶ pfu, (B).

La stessa procedura è stata utilizzata per determinare la dose di virus HSV-1 e HSV-2, da utilizzare per gli esperimenti di challenge sul modello dei C57BL/6. Come è possibile osservare dalla figura 20 (A-B), la dose letale di HSV-1 per questi animali è risultata essere 10^8 pfu e per HSV-2 è 10^7 pfu.

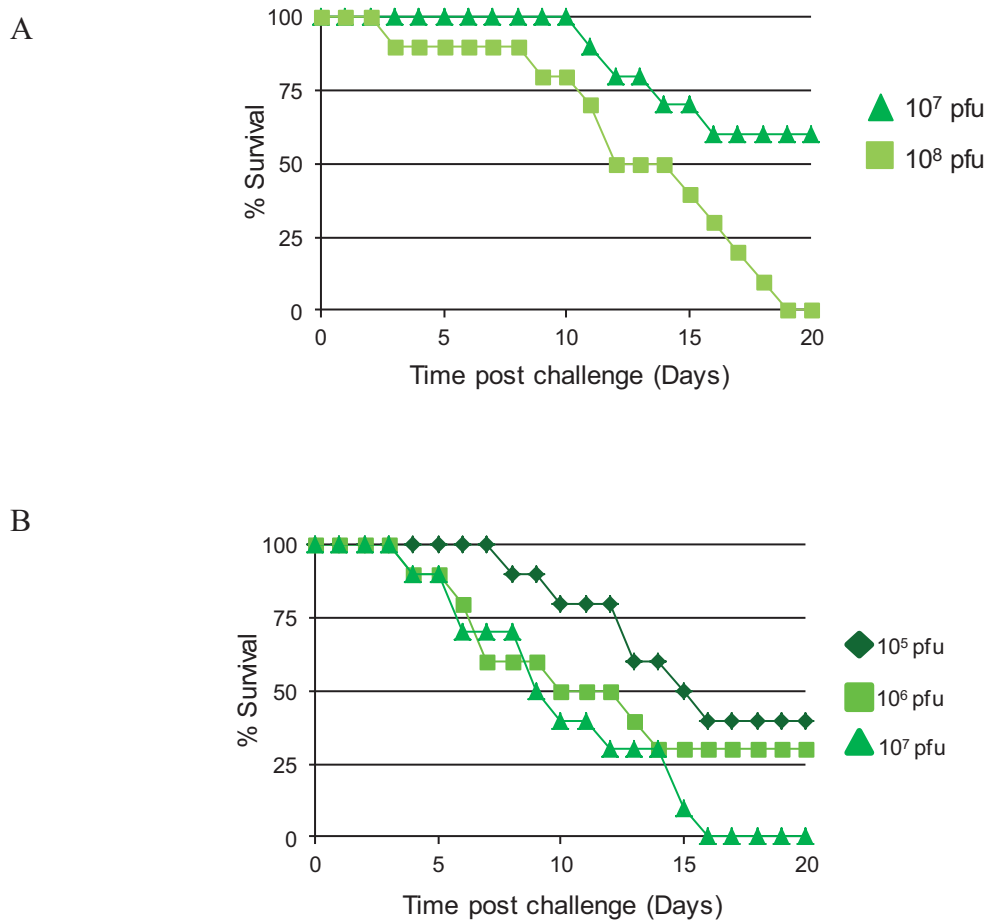


Figura 20: Percentuale di sopravvivenza dei topi C57BL/6 sottoposti a challenge (i.vag) con HSV-1 (ceppo LV) alle dosi 10^7 e 10^8 pfu, (A) e HSV-2 (ceppo G) alle dosi 10^5 , 10^6 e 10^7 pfu, (B).

7.5 Determinazione della dose di HSV1-LacZ e HSV1-Tat per il “prime” della risposta immune HSV-1 specifica

Per determinare la dose minima di virus per immunizzare i topi e generare una risposta immunitaria specifica, senza indurre manifestazioni cliniche nell'animale, sono stati eseguiti esperimenti preliminari di immunizzazione per via intravaginale (i.vag) o intradermica (ID). A questo scopo, topi C57BL/6 sono stati immunizzati i.vag o ID con HSV1-LacZ o con HSV1-Tat, alle dosi di 10^2 e 10^3 pfu/animale. Dopo sette giorni, 5 topi per gruppo sono stati sacrificati per valutare la risposta cellulare diretta verso specifici epitopi conservati in HSV-1 e HSV-2, mediante saggi IFN- γ e IL-4 Elispot. In particolare, è stata valutata la risposta diretta contro due epitopi immunodominanti, SSIEFARL (SSI) ed ITAYGLVL (ITA), derivati rispettivamente, dalla glicoproteina B e dalla glicoproteina K ed un epitopo subdominante, QTDFGRL (QTF), derivato dalla ribonucleotide reduttasi 1.

Come riportato nella figura 21, l'immunizzazione con HSV1-LacZ induceva una risposta IFN- γ verso l'epitopo immunodominante SSI, ed in minor misura verso l'epitopo ITA, solo negli animali immunizzati con una dose di 10^3 pfu i.vag. Nessuna risposta era invece generata dopo inoculazione di entrambe le dosi (10^2 e 10^3 pfu) di HSV1-LacZ per via ID. Al contrario, la dose di 10^3 pfu di HSV1-Tat generava risposte IFN- γ evidenti sia dopo immunizzazione i.vag che ID. In particolare, dopo l'immunizzazione i.vag le risposte verso gli epitopi SSI ed ITA erano molto più elevate rispetto a quelle generate dall'immunizzazione i.vag della stessa dose del virus di controllo HSV1-LacZ, ed inoltre compariva una risposta anche verso l'epitopo subdominante QTF. Sulla base di questi risultati è stata quindi scelta la dose di 10^3 pfu per le successive immunizzazioni. Nessuna delle dosi somministrate (10^2 e 10^3 pfu) in entrambe le vie (i.vag e ID) sono state in grado di indurre una risposta IL-4.

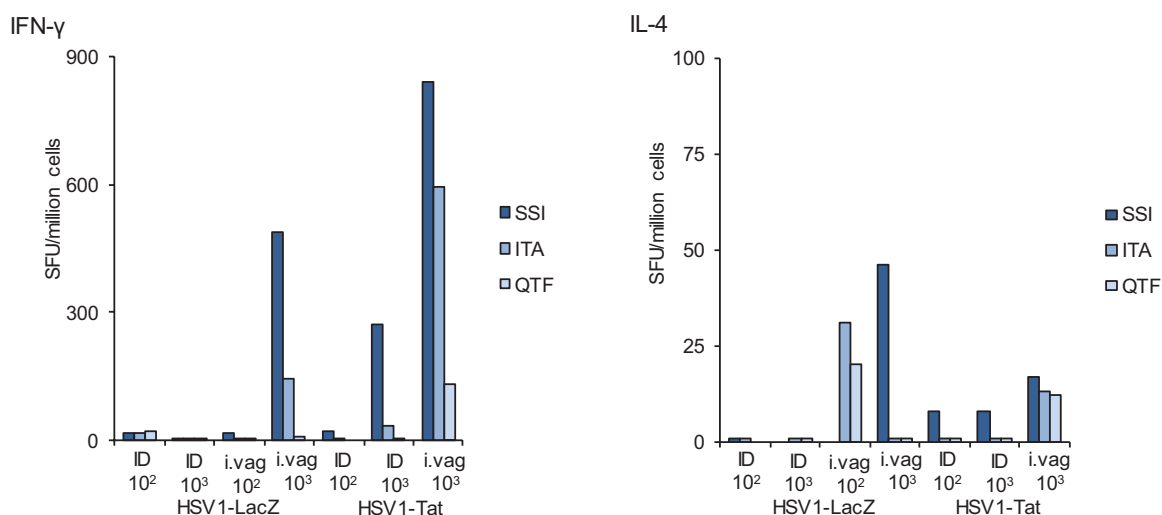


Figura 21: Analisi della risposta cellulare mediante saggi IFN- γ e IL-4 Elispot in topi C57BL/6. I topi sono stati immunizzati per via intravaginale (i.vag) o intradermica (ID) con HSV1-LacZ o HSV1-Tat alle dosi di 10² e 10³ pfu/animale e sacrificati 7 giorni dopo l'immunizzazione.

Analoghi esperimenti sono stati condotti sul modello dei Balb/C. In questo caso è stata valutata solo la dose 10³ pfu somministrata per via intravaginale (i.vag), tuttavia in nessun animale è stata evidenziata una risposta IFN- γ ed IL-4, ma è stata osservata solo una debole risposta all'epitopo DYA nei topi immunizzati con HSV1-LacZ, (Fig.22).

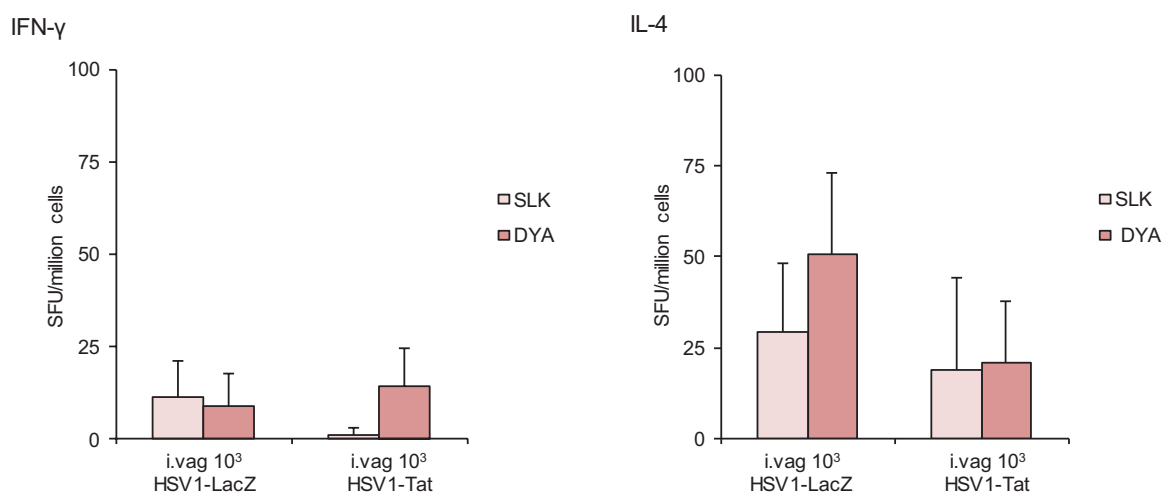


Figura 22: Analisi della risposta cellulare mediante saggi IFN- γ e IL-4 Elispot in topi Balb/C. I topi sono stati immunizzati per via intravaginale (i.vag), con HSV1-LacZ o HSV1-Tat alla dose 10³ pfu per animale e sacrificati 7 giorni dopo l'immunizzazione.

7.6 La presenza di Tat nel vettore HSV migliora le risposte cellulari contro HSV-1

Per determinare l'effetto di Tat sull'induzione della risposta cellulare specifica anti-HSV, topi C57BL/6 sono stati immunizzati per via intravaginale e per via intradermica con la dose di 10^3 pfu dei virus ricombinanti attenuati esprimenti HSV1-Tat o HSV1-LacZ. Dopo 7 giorni dall'infezione è stata valutata la risposta cellulare mediante saggi IFN- γ ed IL-4 Elispot su splenociti fresh.

Come mostrato in figura 23, l'immunizzazione di HSV1-LacZ per via intravaginale induceva una risposta IFN- γ agli epitopi immunodominanti SSI e ITA, ma non verso l'epitopo subdominante QTF. Al contrario, l'immunizzazione con HSV1-Tat induceva una risposta IFN- γ diretta contro tutti e tre gli epitopi, incluso l'epitopo subdominante QTF. Inoltre le risposte ai due epitopi SSI e ITA risultavano significativamente più elevate rispetto a quelle sviluppate nei topi di controllo immunizzati con HSV1-LacZ. Il rilascio di IL-4 risultava invece completamente assente in entrambi i gruppi di topi immunizzati con HSV1-Tat o HSV1-LacZ, indicando quindi l'assenza di una risposta di tipo Th2. Per ciò che riguarda i risultati delle risposte immuni indotte dall'immunizzazione per via intradermica come riportato in figura 24, i topi C57BL/6 immunizzati con HSV1-Tat sviluppavano una risposta significativa diretta contro l'epitopo SSI a differenza dei topi immunizzati con HSV1-LacZ nei quali non si osservava nessuna risposta. La via di somministrazione ID non induceva risposte dirette contro gli altri due epitopi (ITA - QTF), sia nei topi immunizzati con HSV1-Tat che in quelli immunizzati con HSV1-LacZ. Infine, il rilascio di IL-4 risultava completamente assente in entrambi i gruppi in accordo con i precedenti risultati. Questi risultati dimostrano che la presenza di Tat in vettori erpetici attenuati modula la risposta immune cellulare Th1 HSV-1 specifica, aumentandone l'intensità e favorendo la risposta verso epitopi subdominanti, verso i quali in assenza di Tat tale risposta è assente.

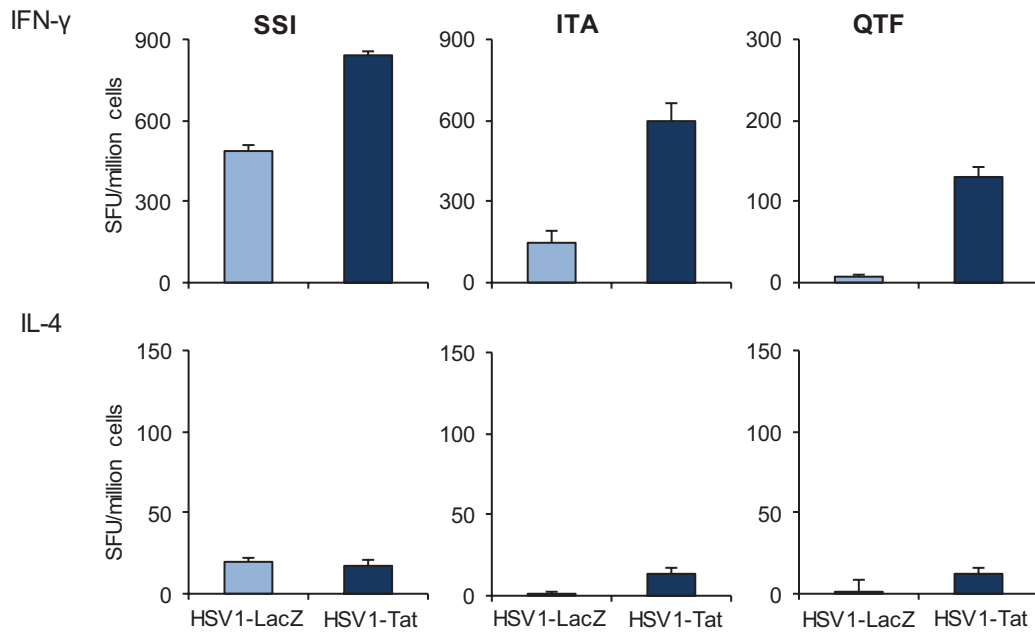


Figura 23: Analisi delle risposte immuni cellulari mediante saggi IFN- γ ed IL-4 Elispot in splenociti isolati da milze di topi C57BL/6 immunizzati per via intravaginale con 10^3 pfu di HSV1-LacZ e HSV1-Tat e sacrificati 7 giorni dopo l'immunizzazione. Media di tre esperimenti.

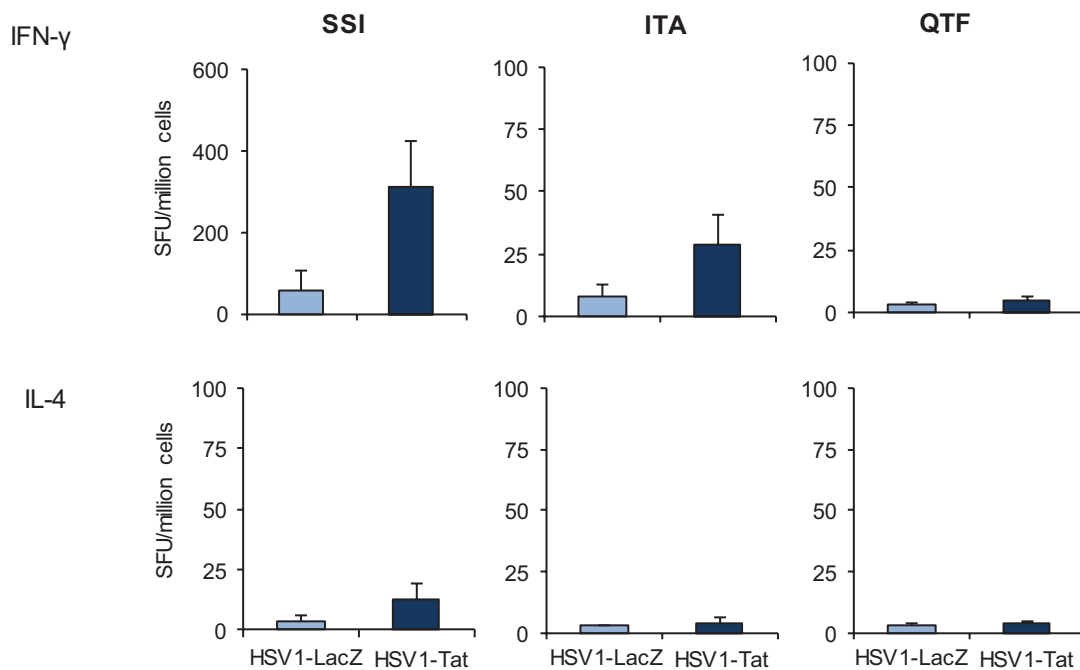


Figura 24: Analisi delle risposte immuni cellulari mediante saggi IFN- γ ed IL-4 Elispot in splenociti isolati da milze di topi C57BL/6 immunizzati per via intradermica con 10^3 pfu di HSV1-LacZ e HSV1-Tat e sacrificati 7 giorni dopo l'immunizzazione. Media di tre esperimenti.

Simili esperimenti sono stati eseguiti in topi Balb/C immunizzati per via intravaginale con 10^3 pfu di HSV1-LacZ o HSV1-Tat. Tuttavia, in questo ceppo di topi le risposte cellulari dirette verso gli epitopi di HSV-1 non erano rivelabili utilizzando colture di splenociti fresh (in accordo con quanto riportato in letteratura). In particolare le risposte immuni sono state valutate verso gli epitopi T DYATLGVG (DYA) derivato dalla proteina ICP27 e SLKMADPNRFRGKDLP (SLK) derivato dalla glicoproteina D di HSV. Pertanto l'analisi delle risposte immuni cellulari dirette verso questi due epitopi è stata eseguita su colture di splenociti ristimolati *in vitro* per 5 giorni con questi peptidi. Da questa analisi è emerso che l'immunizzazione con HSV1-Tat induceva produzione di IFN- γ in risposta ai due peptidi (SLK - DYA) e che tale risposta era maggiore, soprattutto per quanto riguarda l'epitopo DYA, rispetto a quella osservata nei topi di controllo inoculati con HSV1-LacZ. I risultati di questi esperimenti inoltre dimostrano che in questo ceppo di topi l'immunizzazione con entrambi i virus HSV1-LacZ e HSV1-Tat induceva produzione di IL-4, quest'ultima risultava maggiore dopo l'immunizzazione con HSV1-LacZ (Fig 25).

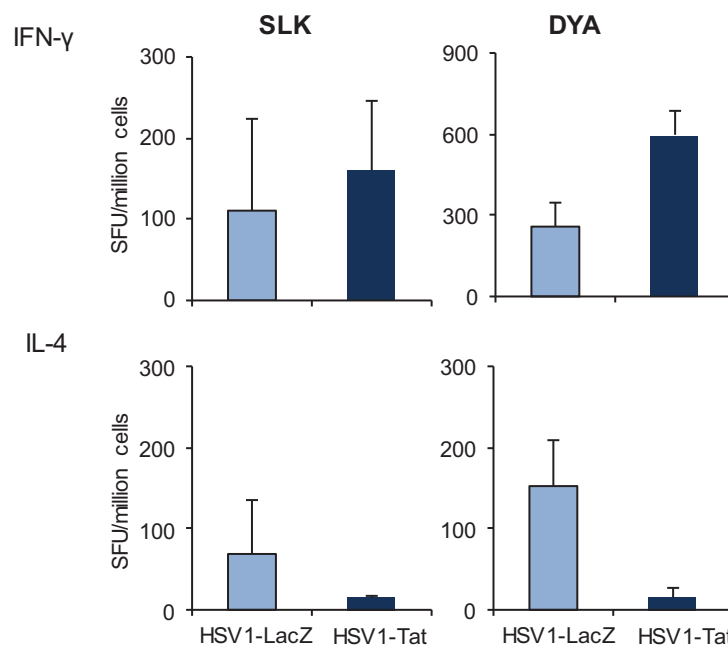


Figura 25: Analisi delle risposte immuni cellulari mediante saggi IFN- γ ed IL-4 Elispot in splenociti, ristimolati *in vitro* per 5 giorni, di topi Balb/c immunizzati per via intravaginale con 10^3 pfu di HSV1-LacZ e HSV1-Tat e sacrificati 7 giorni dopo l'immunizzazione. Media di tre esperimenti.

I risultati di questi esperimenti dimostrano che i vettori erpetici ricombinanti attenuati esprimenti la proteina Tat inducono risposte più intense ed ampie dirette contro HSV-1. Lo studio della risposta cellulare sui topi Balb/C è stato valutato solamente per la via

intravaginale, in quanto tale modello non è adatto per lo studio di tale risposta su splenociti fresh.

7.7 La co-somministrazione della proteina Tat associata al vettore attenuato HSV1-LacZ migliora le risposte cellulari contro HSV-1

In base ai risultati sopra riportati, ci siamo successivamente chiesti se anche la co-somministrazione della proteina Tat esogena con il virus HSV1-LacZ potesse indurre lo stesso tipo di effetto sulla risposta cellulare anti-HSV. Per questo tipo di studio sono stati utilizzati solo i topi C57BL/6 in quanto, come riportato nel precedente paragrafo, questo ceppo di topi sviluppa risposte immuni cellulari ben evidenziabili. Inoltre, in via preliminare è stata utilizzata come via di somministrazione di HSV1-LacZ e di Tat la via intradermica in due siti separati nel dorso. A questo scopo i topi sono stati inoculati con 10^3 pfu di HSV1-LacZ e con la proteina Tat (5 μ g/topo). I topi di controllo ricevevano solo HSV1-LacZ e il tampone in cui era risospesa la proteina (buffer). Al settimo giorno gli animali sono stati sacrificati per l'analisi delle risposte cellulari sugli splenociti fresh. I risultati di questi esperimenti dimostrano che i topi immunizzati con HSV1-LacZ ed il buffer rispondono solo all'epitopo immunodominante, mentre i topi immunizzati con HSV1-LacZ e la proteina Tat presentavano risposte più elevate IFN- γ dirette contro i due epitopi immunodominanti (SSI - ITA), non presenti nei topi di controllo (Fig. 26). In questi esperimenti, la risposta all'epitopo subdominante è risultata bassa in entrambi i gruppi. Infine, il rilascio di IL-4 risultava completamente assente per entrambi i gruppi indicando un'assenza della risposta Th2, in accordo con i precedenti risultati.

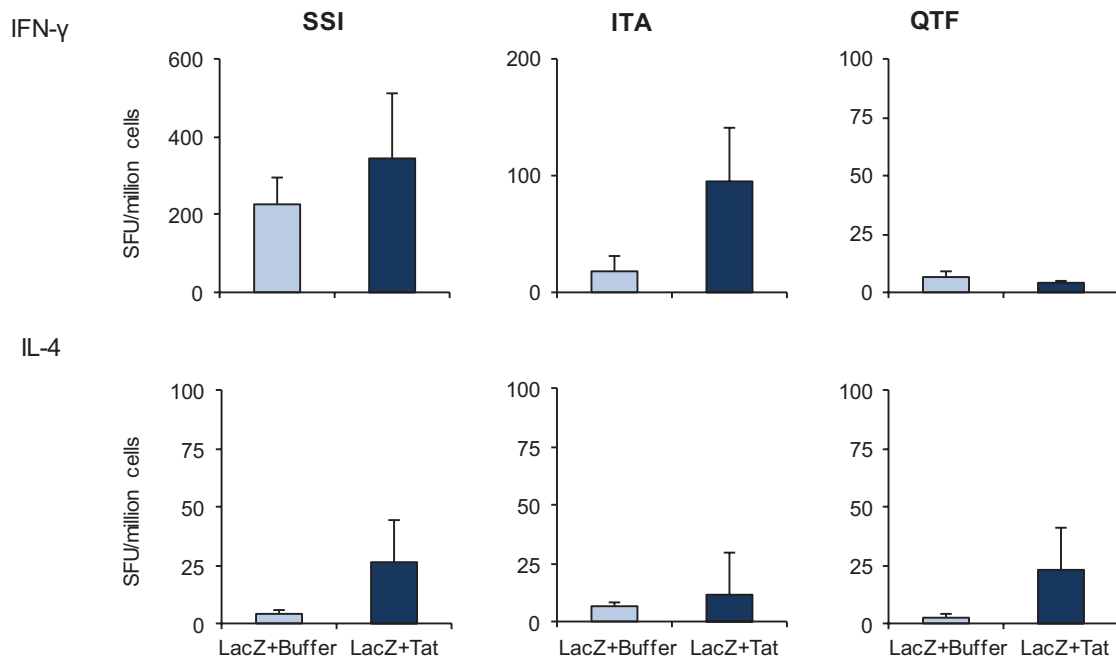


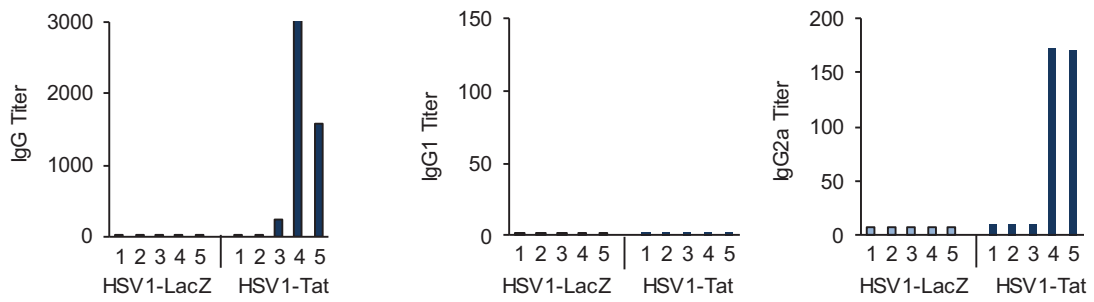
Figura 26: Analisi delle risposte immuni cellulari mediante saggi IFN- γ ed IL-4 Elispot in splenociti isolati da milze di topi C57BL/6 immunizzati per via intradermica con 10^3 pfu di HSV1-LacZ e proteina Tat esogena ($5\mu\text{g}/\text{topo}$), o HSV1-LacZ e buffer, sacrificati 7 giorni dopo l'immunizzazione.

7.8 La presenza di Tat migliora la risposta anticorpale contro HSV-1

Per valutare l'effetto di Tat sulla risposta anticorpale contro HSV-1, sono stati prelevati da ciascun animale in esame (Balb/C e C57BL/6, immunizzati per vie diverse e con trattamento diverso) campioni di siero e di lavaggi vaginali, dopo 15 giorni dall'immunizzazione. Su questi campioni è stata ricercata la presenza di IgM, IgG e IgA specifiche per HSV-1 mediante saggio ELISA. La presenza di IgG specifiche per HSV nel siero è stata osservata solo nei campioni dei topi immunizzati con HSV1-Tat per via intravaginale. Non è stata osservata la presenza di IgG specifiche per HSV nei campioni immunizzati per via intradermica e con Tat proteina esogena. In contrasto con la risposta cellulare i campioni ottenuti dai topi Balb/C immunizzati per via intravaginale, mostrano una risposta anticorpale decisamente più elevata rispetto a quella dei campioni dei topi C57BL/6. La presenza di Tat sembra quindi favorire la risposta umorale specifica contro HSV-1. L'analisi dell'isotipo IgG mette in evidenza la sola presenza delle IgG2a e non quella delle IgG1, indicando una risposta immune di tipo Th1, confermando quindi la capacità adiuvante di Tat nel direzionare la risposta immune verso il pattern Th1, (Fig. 27). Sui campioni di siero e sui lavaggi vaginali è

stata ricercata la presenza di IgM e IgA, ma nessun campione ottenuto dai diversi trattamenti è risultato positivo.

A



B

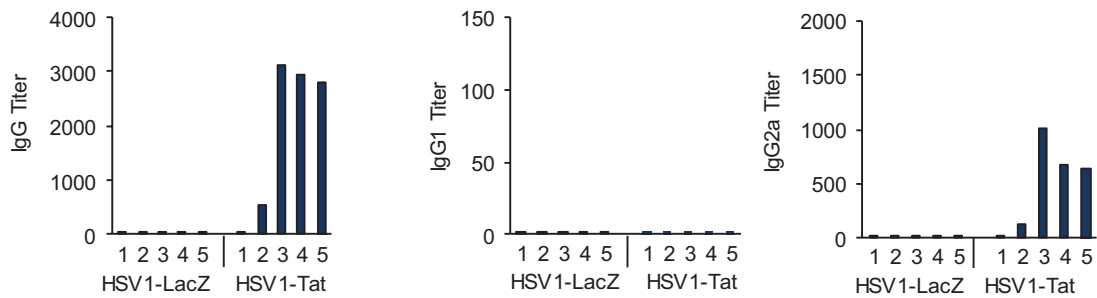


Figura 27: Valutazione della risposta anticorpale specifica per le IgG ed isotipo. (A): Analisi della risposta anticorpale per singolo topo sui sieri del modello murino dei C57BL/6 (i.vag), (B): Analisi della risposta anticorpale sui sieri del modello murino dei Balb/C (i.vag).

7.9 La presenza di Tat media la protezione da challenge letale contro HSV-1 wild-type

La valutazione della risposta immune nei topi C57BL/6 e nei Balb/C immunizzati con un virus HSV-1 ricombinante attenuato suggerisce che la presenza di Tat modula la risposta immune di tipo Th1 in entrambi i ceppi di topo. Per correlare tale risposta con la protezione dall'infezione con una dose letale (LD_{100}) di HSV-1 wild-type, dopo l'immunizzazione con 10^3 pfu di HSV1-Tat e HSV1-LacZ per via i.vag o ID, tutti gli animali (10 per gruppo) 28 giorni dopo l'immunizzazione sono stati sottoposti ad un challenge intravaginale con una dose letale di HSV-1 wild-type (Fig. 28). Dopo il challenge le condizioni di salute degli animali in esame sono state valutate giornalmente per verificare la comparsa dei segni tipici dell'infezione erpetica (nessun segno, pelo arruffato, formazione di pustole, paralisi delle zampe posteriori e morte). In entrambi i ceppi di topo si è osservato che gli animali immunizzati per via i.vag con HSV1-LacZ sviluppano dopo il challenge tutti i segni tipici dell'infezione erpetica che evolveva con la morte del 100% degli animali. Al contrario, i topi immunizzati per via i.vag con HSV1-Tat, dopo il challenge mostravano segni di infezione molto più attenuati, che regredivano spontaneamente dopo pochi giorni e il 100% di questi animali risultava protetto dalla morte. Questi risultati dimostrano che l'immunizzazione dei topi con il vettore esprimente Tat induce forti e ampie risposte cellulari e anticorpali che correlano con la protezione dalla malattia.

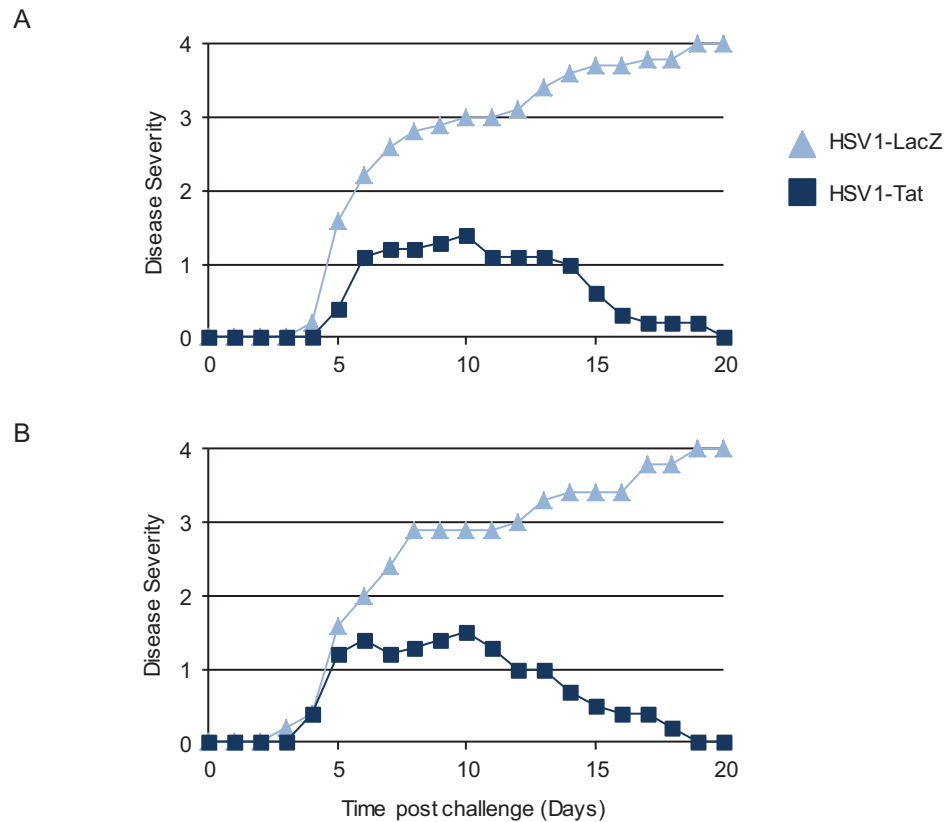


Figura 28: Progressione dell'infezione intravaginale causata da una dose letale di HSV-1 wild-type in topi C57BL/6 (A) e nei Balb/C (B) immunizzati con 10^3 pfu di HSV1-LacZ ed HSV1-Tat per via intravaginale.

Risultati simili sono stati ottenuti in topi C57BL/6 immunizzati per via ID con 10^3 pfu di HSV1-LacZ e HSV1-Tat (Fig. 29). In questo caso il risultato è molto eclatante in quanto i topi trattati con HSV1-LacZ sviluppano i segni tipici dell'infezione da HSV, mostrando la presenza delle pustole e in alcuni anche la paralisi degli arti, mentre gli animali immunizzati con HSV1-Tat non hanno mostrato nessun segno di malattia, per tutta la durata dell'esperimento.

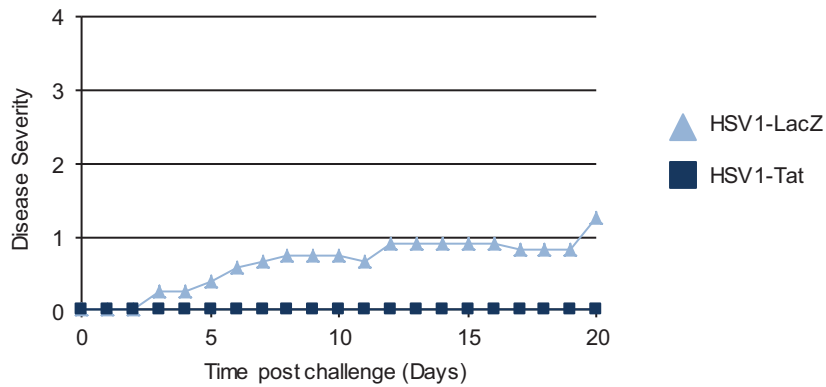


Figura 29: Progressione dell'infezione intravaginale causata da una dose letale di HSV-1 wild-type in topi C57BL/6 immunizzati con 10^3 pfu di HSV1-LacZ ed HSV1-Tat per via intradermica.

Nel caso dei topi immunizzati per via ID con HSV1-LacZ in presenza o in assenza di Tat proteina esogena (Fig 30), l'andamento dell' infezione è risultato molto simile, in quanto anche nei topi immunizzati con HSV1-LacZ associato alla proteina Tat esogena si osservano segni di infezione. Tuttavia, in accordo con i risultati dei precedenti esperimenti, la presenza della proteina Tat al momento del priming conferisce un vantaggio ai topi immunizzati in quanto i segni di infezione erano più lievi e al giorno 15 post challenge regredivano più velocemente rispetto ai controlli inoculati con HSV1-LacZ e il tampone. Questo dato si riferisce ad un singolo esperimento preliminare, quindi potrebbe essere ripetuto variando la via e la dose di somministrazione.

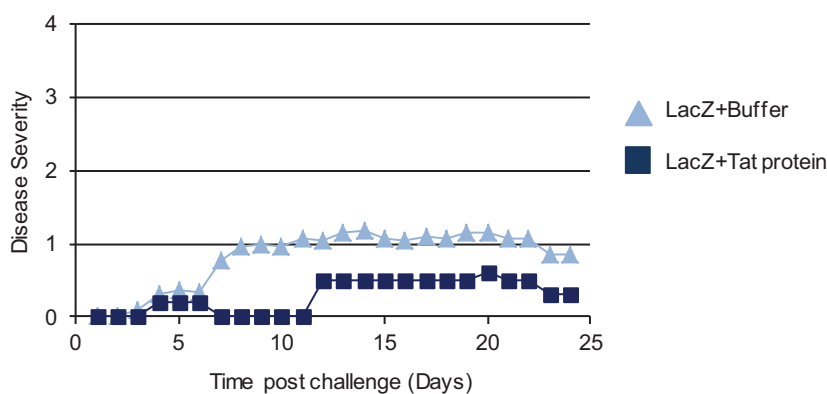
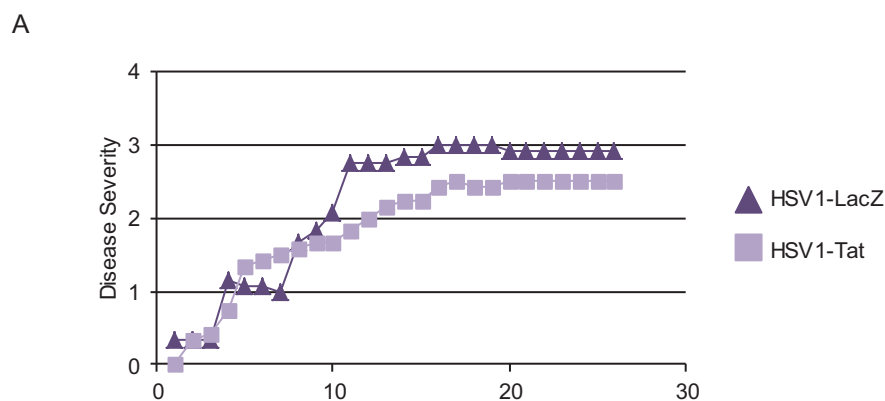


Figura 30: Progressione dell'infezione intravaginale causata da una dose letale di HSV-1 wild-type in topi C57BL/6 immunizzati per via intradermica con 10^3 pfu di HSV1-LacZ in presenza o assenza della proteina Tat. Dati relativi ad un singolo esperimento.

7.10 La presenza di Tat media la protezione da challenge letale contro HSV-2 wild-type

Topi C57BL/6 e Balb/C (6 per gruppo), sono stati infettati con i virus HSV-1 ricombinanti attenuati (HSV1-LacZ o HSV1-Tat) e al giorno 28 sono stati sottoposti ad un challenge intravaginale con una dose letale di HSV-2 wild-type, alla dose di 10^5 pfu per il modello murino dei Balb/C e alla dose di 10^7 pfu per il modello murino dei C57BL/6. Dopo il challenge le condizioni di salute degli animali in esame sono state valutate giornalmente per verificare la comparsa dei segni tipici dell'infezione erpetica (nessun segno, pelo arruffato, formazione di pustole, paralisi delle zampe posteriori e morte). La figura 31 mostra l'andamento dell'infezione intravaginale sul modello dei Balb/C sottoposti al challenge con HSV-2 10^5 pfu. Il gruppo di topi immunizzato con il vettore di controllo (HSV1-LacZ) mostra tutti i segni tipici dell'infezione virale, compresa la paralisi degli arti posteriori, mentre il gruppo di topi immunizzato con il vettore esprimente Tat (HSV1-Tat), sviluppa segni di infezione meno marcati, che tendono a regredire più velocemente rispetto alla controparte di controllo. Nel caso del modello dei C57BL/6 immunizzati con i vettori replicativi attenuati (HSV1-LacZ e HSV1-Tat) e sottoposti al giorno 28 al challenge con la dose letale 10^7 pfu di HSV-2, osserviamo che il gruppo immunizzato con HSV1-Tat sviluppa solamente alcuni segni di infezione molto lievi che tendono a scomparire velocemente, mentre gli animali immunizzati con il vettore HSV1-LacZ mostrano delle manifestazioni cliniche decisamente più gravi. Sulla base di questi dati possiamo affermare che la presenza del tat nel vettore replicativo attenuato conferisce una migliore protezione anche nei confronti dell'infezione con HSV-2 wild-type in entrambi i ceppi di topo. I dati riportati si riferiscono comunque ad un singolo esperimento.



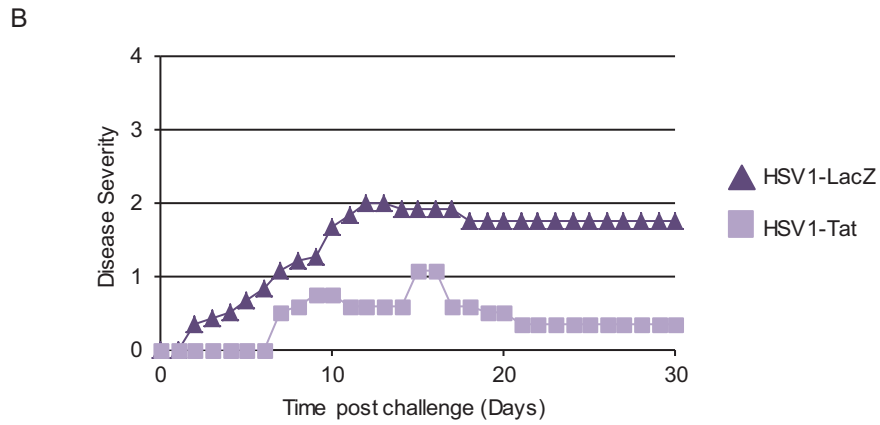


Figura 31: Progressione dell'infezione intravaginale causata da una dose letale (10^5 pfu) di HSV-2 wild-type in topi Balb/C (A). Progressione dell'infezione intravaginale causata da una dose letale (10^7 pfu) di HSV-2 wild-type in topi C57BL/6 (B), immunizzati per via intravaginale con 10^3 pfu di HSV1-LacZ o HSV1-Tat. Singolo esperimento.

7.11 La presenza di Tat nel vettore HSV non replicativo media la protezione da challenge letale contro HSV-1 wild-type

In un esperimento preliminare topi Balb/C sono stati immunizzati con i vettori non replicativi (HSVTB5gJHE o HSVTB5gJTat) per via intravaginale ad una dose 10^6 pfu in $10\mu\text{l}$. Abbiamo scelto come modello murino quello dei Balb/C e come via di immunizzazione solamente la via intravaginale. La scelta del ceppo Balb/C è correlata principalmente allo loro maggiore suscettibilità all'infezione con HSV rispetto al modello dei C57BL/6. In questo studio abbiamo valutato la sopravvivenza dopo il challenge con HSV-1 wild-type. Gli animali sono stati immunizzati con il vettore non replicativo esprimente o no la proteina Tat, dopo sette giorni gli animali hanno ricevuto un'ulteriore immunizzazione con il vettore sempre per via intravaginale e alla stessa dose 10^6 pfu. Al giorno 28 tutti gli animali sono stati sottoposti ad un challenge per via intravaginale con il virus HSV-1 wild-type 10^6 pfu. Da questo studio è emerso che i topi immunizzati con il vettore non replicativo esprimente Tat (HSVTB5gJTat) sviluppano segni visibili tipici dell'infezione erpetica, tranne quattro topi, nei quali l'infezione risulta meno evidente e nell'arco dei 15 giorni dopo il challenge tendeva a regredire, mentre i topi immunizzati con il vettore HSVTB5gJHE sviluppano tutti i segni dell'infezione e solo due topi mostrano segni meno accentuati di infezione.

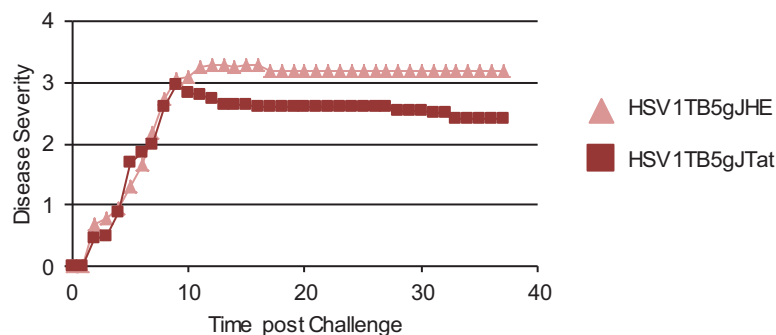


Figura 32: Progressione dell'infezione intravaginale con una dose letale del virus HSV-1-wild-type sul modello murino dei Balb/C immunizzati con il vettore non replicativo 10^6 pfu per via intravaginale.

Questo risultato iniziale ha suscitato un grande interesse, spingendoci ad approfondire la ricerca. A tal proposito abbiamo costruito un nuovo protocollo sperimentale, nel quale abbiamo apportato delle variazioni, riguardanti:

- la dose iniziale di prime, che quindi è passata da 10^6 a 10^7 pfu;

- due diverse dosi di boost 10^6 e 10^7 pfu;
- la tempistica per il boost, che è stata spostata dal giorno 7 ai giorni 14 e/o 20.

Nella figura 33 A viene mostrata la progressione dell'infezione con HSV-1 wild-type in topi immunizzati con HSVTB5gJTat alla dose 10^7 pfu, e successivo boost con la dose di 10^6 pfu al giorno 14. In questi animali osserviamo una maggiore protezione dall'infezione rispetto alla controparte immunizzata con il vettore non replicativo HSVTB5gJHE, nei quali i segni di infezione risultano più marcati. Negli animali che ricevono il boost al giorno 14 con la dose 10^7 pfu, l'andamento dell'infezione sembra molto simile in entrambi i gruppi (Fig. 33B), anche se gli animali immunizzati con il vettore esprimente Tat mostrano segni di infezione più lievi, che tendono a regredire più velocemente. In parallelo la stessa analisi è stata condotta posticipando al giorno 20 la somministrazione del boost alle dosi 10^6 e 10^7 pfu. In questo caso abbiamo osservato una totale protezione negli animali immunizzati con HSVTB5gJTat che hanno ricevuto il boost alla dose 10^6 pfu, rispetto al gruppo di controllo immunizzato con HSVTB5gJHE (Fig. 33C), tale risultato viene mantenuto anche nel momento in cui aumentiamo la dose del boost a 10^7 pfu, anche se la protezione indotta risulta leggermente inferiore, (Fig 33D). Questi dati seppur significativi, si riferiscono ad un singolo esperimento. Ulteriori studi verranno condotti, per dimostrare la significatività del dato.

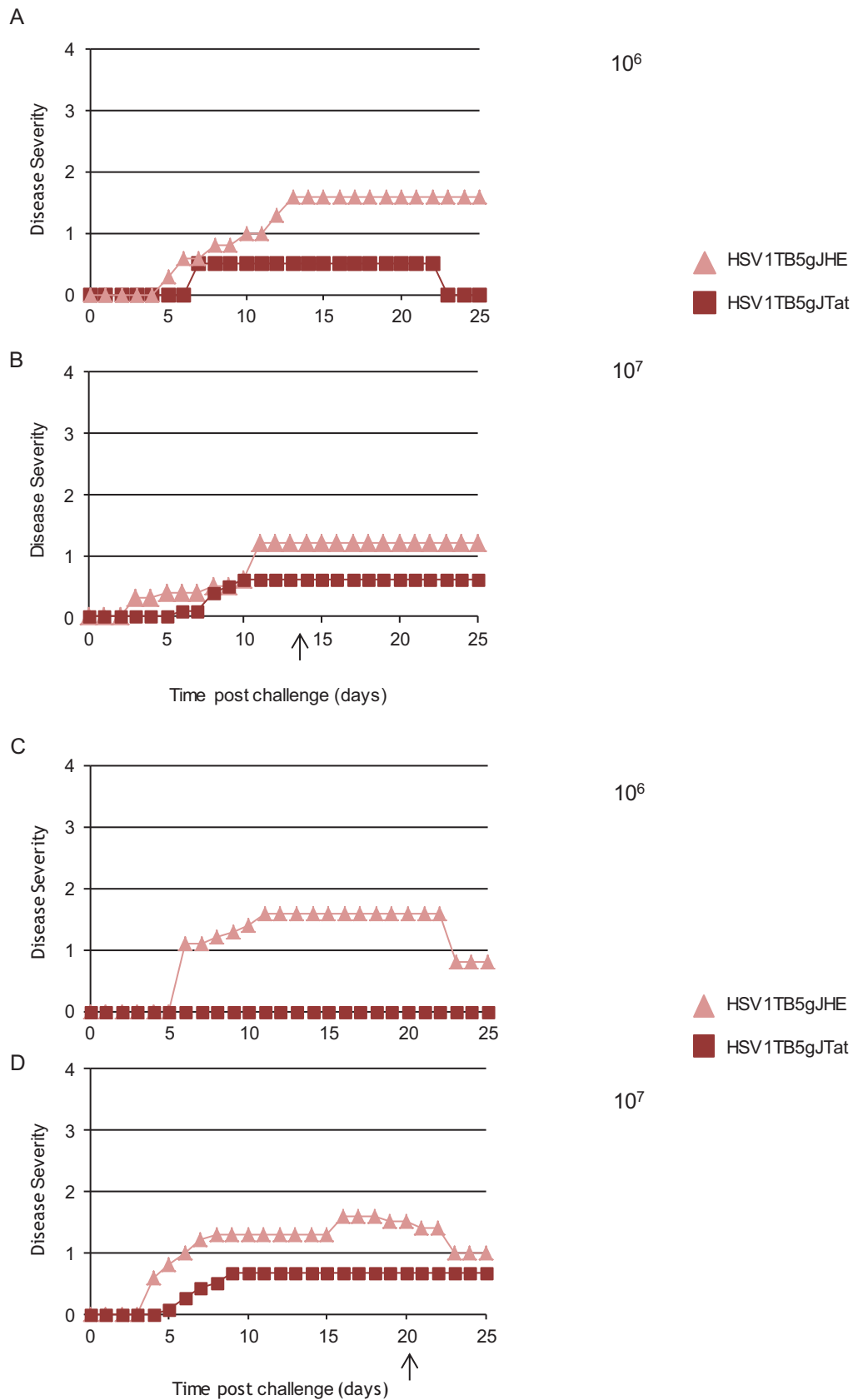


Figura 33: Progressione dell'infezione intravaginale con una dose letale del virus HSV-1 wild-type sul modello murino dei Balb/C immunizzati con il vettore non replicativo al giorno 14 con le dosi 10^6 e 10^7 pfu (33A-33B), e con il vettore non replicativo al giorno 20 con le dosi 10^6 e 10^7 pfu (33C-33D).

Anche questi risultati dimostrano che la presenza del Tat nel vettore non replicativo conferisce una maggiore protezione degli animali immunizzati, in quanto i segni dell'infezione e la progressione di quest'ultima sono meno evidenti e per alcuni trattamenti risultano completamente assenti rispetto alla controparte immunizzata con il vettore non replicativo di controllo HSVTB5gJHE.

8 DISCUSSIONE

I vaccini basati su vettori virali, come alphavirus, adenovirus, vaccinia virus, hanno mostrato la loro efficacia nell'incrementare l'efficienza dell'immunizzazione contro infezioni virali o batteriche. Recenti studi dimostrano inoltre che vettori basati su HSV-1 possiedono tutte le caratteristiche necessarie per indurre risposte immuni antigene-specifiche, anche in soggetti con una pre-esistente immunità contro l'infezione da HSV. Il vantaggio nell'impiego di questi vettori erpetici consiste principalmente nella loro capacità di ospitare fino a 50 kbp di DNA esogeno e combinare antigeni multipli con geni che codificano per citochine e/o molecole immunostimolatorie. Quest'ultima caratteristica risulta essenziale nella progettazione di vaccini nei quali è richiesta la presenza di multi-componenti e/o molecole adiuvanti, al fine di ottenere un'efficace risposta immunitaria. Per lo sviluppo di un vaccino preventivo o terapeutico efficace contro HSV, risulta necessario prevenire non solo l'infezione acuta, ma anche la latenza e la riattivazione del virus. Inoltre tale vaccino deve essere in grado di indurre buone risposte sia contro epitopi immunodominanti che subdominanti. I vaccini basati su vettori HSV replicativi attenuati si sono dimostrati sicuri ed efficaci nel trasferimento nella cellula ospite di transgeni, antigeni, citochine, indipendentemente dalla via di somministrazione utilizzata. Il potenziale svantaggio nell'uso di vettori replicativi attenuati di HSV riguarda la capacità di riattivarsi o di ricombinarsi con ceppi wild-type. Al fine di evitare questi rischi, sono stati sviluppati vettori HSV deleti dei geni responsabili del ciclo replicativo e della neuro-virulenza. Un'altra problematica riguardo l'uso di HSV ricombinanti come vettori è legata alla presenza della proteina *Vhs* codificata dal gene U_L41 . *Vhs* è una fosfoproteina di 58 kDa rilasciata direttamente all'interno del citoplasma delle cellule infettate, in grado di bloccare la maturazione delle cellule dendritiche (DC) e di inibire così la risposta immunitaria¹⁰³. L'eliminazione del *locus* U_L41 dal genoma virale, con conseguente eliminazione della proteina *Vhs*, permette la fisiologica attivazione delle DC inducendo quindi una migliore risposta cellulare antigene specifica¹⁰⁴⁻¹⁰⁵.

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di costruire dei vettori HSV replicativi attenuati e non replicativi basati su HSV-1, esprimenti o meno il gene *tat* di HIV-1. La scelta di introdurre il gene che codifica per la proteina Tat è legata alle sue già note proprietà immunomodulatorie. In particolare, è stato dimostrato che la co-immunizzazione dei topi con le proteine Ova e Tat induce risposte CTL verso epitopi di Ova subdominanti e criptici che

non sono indotte dalla vaccinazione con la proteina Ova da sola⁹⁵. In modo analogo, topi co-vaccinati con la proteina Tat e le proteine Gag, Env o Env-V2-deleta di HIV-1 sviluppano risposte cellulari Th1 e CTL dirette verso un maggior numero di epitopi T rispetto a quelle indotte dalla vaccinazione con le proteine Gag, Env o Env-V2-deleta da sole⁹⁵⁻⁹⁶.

Per dimostrare la capacità del vettore vivo attenuato esprime la proteina Tat (HSV1-Tat), di indurre una migliore risposta immune *in vivo*, la sua attività è stata confrontata con un vettore HSV esprime un gene di controllo LacZ (HSV1-LacZ). Gli studi condotti hanno innanzitutto dimostrato che entrambi i vettori ricombinanti, essendo replicativi attenuati sono più sicuri rispetto al virus wild-type. Successivamente il loro utilizzo *in vivo* ha dimostrato, in due diversi modelli murini, la capacità del virus esprime Tat di indurre una più ampia e forte risposta immunitaria rispetto al virus di controllo. L'effetto di Tat nel potenziare la risposta immune è stato inoltre confermato utilizzando sia dosi che siti di inoculo diversi. Il vettore HSV1-Tat somministrato per via intradermica o intravaginale si è dimostrato sicuro in quanto non sono stati osservati effetti avversi durante l'intero protocollo sperimentale. Per quanto riguarda i dati ottenuti a seguito della somministrazione intradermica è stata osservata una buona risposta cellulare diretta contro gli epitopi immunodominanti nei soli topi trattati con HSV1-Tat. Analizzando invece le risposte indotte dal trattamento per via intravaginale è emerso che i topi trattati con HSV1-Tat, a differenza dei topi di controllo, sviluppano risposte cellulari sia contro gli epitopi immunodominanti che subdominanti di HSV-1. I dati ottenuti negli stessi animali, per quanto riguarda l'analisi della risposta umorale, hanno confermato l'effetto di Tat nel potenziare la risposta immune in questo caso incrementando la produzione di IgG, in particolare del sottotipo IgG2a.

Questo studio ci permette di affermare, in accordo con i dati presenti in letteratura, la capacità adiuvante di Tat nel direzionare la risposta immune verso il pattern Th1.

Questo studio ha inoltre dimostrato che l'immunizzazione *in vivo* di due modelli murini (Balb/C e C57BL/6) con il vettore HSV1-Tat è in grado di proteggere gli animali dalle lesioni e dalla morte causata dall'infezione con una dose letale di HSV-1 o HSV-2 wild-type.

La presenza del gene codificante per la proteina Tat all'interno del vettore HSV sembra quindi essere importante per indurre una risposta protettiva in entrambi i modelli murini considerati.

Questo effetto di Tat, riscontrato sia per la proteina solubile che per quella espressa dal vettore virale, potrebbe essere dovuto essenzialmente ad un miglior processing delle proteine

di HSV; Tat infatti agendo sull'immunoproteasoma potrebbe favorire la generazione e la presentazione di alcuni epitopi che altrimenti non verrebbero espressi⁹⁵.

La seconda fase del nostro studio invece si è focalizzata sulla generazione e successiva sperimentazione *in vivo* di vettori erpetici non replicativi altamente immunogenici associati o meno al gene codificante per la proteina Tat di HIV-1. Poiché i dati preliminari hanno mostrato la sicurezza del trattamento, si è proseguito alla valutazione della protezione degli animali in seguito alla somministrazione di una dose letale di HSV-1 wild-type. Dai risultati ottenuti è emerso che tutti gli animali sviluppano i segni tipici dell'infezione, ma solamente gli animali trattati con il vettore esprimente Tat (HSV-TB5gJTat) mostrano un andamento della progressione dell'infezione più attenuato che correla con una maggiore protezione. L'effetto di Tat nel ridurre il progredire dell'infezione da HSV-1 wild-type è stato inoltre confermato utilizzando dosi di vettore e tempistiche di inoculo diversi.

L'utilizzo di vettori non replicativi per la realizzazione di un vaccino rappresenta un elemento di maggiore sicurezza rispetto ad altri sistemi, in quanto il virus non essendo in grado di replicarsi riduce la possibilità di ricombinarsi con altri ceppi virali e la sua somministrazione risulterebbe sicura anche in pazienti immuno-compromessi.

Questi studi indicano che l'utilizzo di vettori replicativi attenuati e non replicativi di HSV esprimenti la proteina Tat sono sicuri, in quanto non hanno mostrato effetti avversi per l'intera durata del protocollo sperimentale. Inoltre i vettori replicativi attenuati sono in grado di indurre-aumentare-ampliare la risposta immunitaria specifica di tipo Th1 e CTL contro epitopi di HSV.

Concludendo i dati ottenuti supportano l'uso dei vettori HSV replicativi attenuati e dei vettori non replicativi, esprimenti il gene *tat* di HIV-1, per la realizzazione-applicazione di nuove strategie di vaccinazione contro le infezioni da Herpes-Simplex sia di tipo 1 che di tipo 2.

9 Bibliografia

- 1- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA,. “ Microbiologia “EdiSES Napoli. 2002.
- 2- La placa “ Principi di Microbiologia Medica” Nona Edizione; Società Editrice Esculapio, Bologna. 2001.
- 3- Roizman B, Sears AE,. Herpes Simplex Viruses and their replication. In Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Fields Virology. 1996 .
- 4- Spear PG,. Entry of a herpes viruses into cells. Semin Virol. 1993.
- 5- Batterson W, Roizman B,. Characterization of the Herpes Simplex virion-associated factor responsible for the induction of a gene. J. Virol. 1983.
- 6- Kwong AD, Frenkel N,. The HSV virion host shut-off function. J. Virol. 1989.
- 7- Laquerre S, Argnani R, Anderson DB, Zucchini S, Manservigi R, Glorioso JC. Heparan Sulphate proteoglycanbinding by herpes simplex virus type 1 glycoprotein B and C, which differ in their contribution to virus attachment, penetration, and cell-to-cell spread. J. Virol. 1998.
- 8- Shukla D, Liu J, Blaiklock P, Shworak NW, Bai X, Esko JD, Cohen GH, Eisenberg RJ, Rosenberg RD, Spear PG,. A novel role for 3-O-Sulfated heparin sulphate in herpes simplex virus 1 entry. Cell. 1999.
- 9- Campadelli-Fiume G, Amasio M, Avitabile E, Cerretani A, Forghieri C, Gianni T, Menotti L,. The multipartite system the mediates entry of herpes simplex virus into the cell. Rev. Med. Virol. 2007.
- 10-Ogita H, Takai Y,. Nectins and nectin-like molecules: role in cell adhesion, polarization, movement and proliferation. IUBMB life. 2006.
- 11-Menotti L, Cerretani A, Campadelli-Fiume G,. A Herpes Simplex recombinant that exhibits a single-chain antibody to HER2/neu enters cells the mammary tumor receptor, independently of the gD receptor, J.Virol. 2006.
- 12-Campadelli-Fiume G, Gianni T,. HSV glycoproteins and their roles in virus entry and egress. In Alpha Herpesvirus Molecular and Cellular Biology. 2006.
- 13-Christenson B, Esmark A,. Long-term follow studies on herpes simplex antibodies in the cause of cervical cancer: Patterns of neutralizing antibodies. Am. J. Epidemiol. 1971.
- 14-Roizman B,. Fields Virology.

- 15-Sacks SL, Griffiths PD, Corey L, Cohen C, Cunningham A, Dusheiko GM, Self S, Spruance S, Stanberry LR, Wald A, Whitley RJ,. (Herpes Simplex Virus) HSV shedding. *Antiviral Res.* 2004.
- 16-Spruance SL, Overall JC Jr, Kern ER, Krueger GG, Pliam V, Miller W,. The natural history of recurrent herpes simplex labialis: implications for antiviral therapy. *N Engl J Med.* 1977.
- 17-Ramsey PG, Fife KH, Hackman RC, Meyers JD, Corey L,. Herpes simplex virus pneumonia: clinical, virologic, and pathologic features in 20 patients. *Ann Intern Med.* 1982.
- 18-Suligo B, Torri A, Grilli G, Tanzi E, Palú G,. Seroprevalence and seroincidence of herpes simplex virus type 1 and herpes simplex virus type 2 infections in a cohort of adolescents in Italy. *Italian Herpes Management Forum. Sex Transm Dis.* 2004.
- 19-Dunn JR, Walker JD, Graham J, Weiss CB,. Gender differences in the relationship between housing, socioeconomic status, and self-reported health status. *Rev Environ Health.* 2000.
- 20-Hayward GS., Jacob RJ., Wadsworth SC., and Roizman B,. *Proc. Natd.Acad. Sc. USA.* 1975.
- 21-Vyse AJ, Gay NJ, Slomka MJ, Gopal R, Gibbs T, Morgan-Capner P, Brown DW,. The burden of infection with HSV-1 and HSV-2 in England and Wales: implications for the changing epidemiology of genital herpes. *Sex Transm Infect.* 2000.
- 22-Benedetti JK, Zeh J, Corey L,. Clinical reactivation of genital herpes simplex virus infection decreases in frequency over time. *Ann Intern Med.* 1999.
- 23-Madkan VK, Giancola AA, Sra KK, Tyring SK. Sex differences in the transmission, prevention, and disease manifestations of sexually transmitted diseases. *Arch Dermatol.* 2006.
- 24-Roest RW, Carman WF, Maertzdorf J, Scoular A, Harvey J, Kant M, Van Der Meijden WI, Verjans GM, Osterhaus AD,. Genotypic analysis of sequential genital herpes simplex virus type 1 (HSV-1) isolates of patients with recurrent HSV-1 associated genital herpes. *J Med Virol.* 2004.
- 25-Thapa M, Welner RS, Pelayo R, Carr DJ. CXCL9 and CXCL10 expression are critical for control of genital herpes simplex virus type 2 infection through mobilization of HSV-specific CTL and NK cells to the nervous system *J Immunol.* 2008.

- 26-Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000.
- 27-Liu MT, Chen BP, Oertel P, Buchmeier MJ, Armstrong D, Hamilton TA, Lane TE,. The T cell chemoattractant IFN-inducible protein 10 is essential in host defense against viral-induced neurologic disease. *J Immunol*. 2000.
- 28-Kolb SA, Sporer B, Lahrtz F, Koedel U, Pfister HW, Fontana A. Identification of a T cell chemotactic factor in the cerebrospinal fluid of HIV-1 infected individuals as interferon- inducible protein 10. *J Neuroimmunol*. 1999.
- 29-Liu MT, Armstrong D, Hamilton TA, Lane TE,. Expression of Mig (monokine induced by interferon- γ) is important in T lymphocyte recruitment and host defense following viral infection of central nervous system. *J Immunol*. 2001.
- 30-Thapa M, Welner RS, Pelayo R, Carr DJ,. CXCL9 and CXCL10 expression are critical for control of genital herpes simplex virus type 2 infection through mobilization of HSV-specific CTL and NK cells to the nervous system. *J. Immunol*. 2008.
- 31-Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000.
- 32-Liu MT, Chen BP, Oertel P, Buchmeier MJ, Armstrong D, Hamilton TA, Lane TE,. The T cell chemoattractant IFN-inducible protein 10 is essential in host defense against viral-induced neurologic disease. *J. Immunol*. 2000.
- 33-Kolb SA, Sporer B, Lahrtz F, Koedel U, Pfister HW, Fontana A,. Identification of a T cell chemotactic factor in the cerebrospinal fluid of HIV-1 infected individuals as interferon- inducible protein 10. *J. Neuroimmunol*. 1999.
- 34-Liu MT, Armstrong D, Hamilton TA, Lane TE,. Expression of Mig (monokine induced by interferon- γ) is important in T lymphocyte recruitment and host defense following viral infection of central nervous system. *J. Immunol*. 2001.
- 35-Christensen JE, Lemos CD, Moos T, Christensen JP, Thomsen AR,. CXCL10 is the key ligand for CXCR3 on CD8⁺ effector T cells involved in immune surveillance of

- the lymphocytic choriomeningitis virus-infected central nervous system. *J. Immunol.* 2006.
- 36-Ghersa P, Gelati M, Colinge J, Feger G, Power C, Papoin R, Salmaggi A,. MIG-differential gene expression in mouse brain endothelial cells. *Neuroreport.* 2002.
- 37-Whitley RJ, Roizman B,. Herpes simplex viruses: is a vaccine tenable? *J Clin Invest.* 2002.
- 38-Christensen JE, Lemos CD, Moos T, Christensen JP, Thomsen AR,. CXCL10 is the key ligand for CXCR3 on CD8⁺ effector T cells involved in immune surveillance of the lymphocytic choriomeningitis virus-infected central nervous system. *J. Immunol.* 2006.
- 39-Ghersa P, Gelati M, Colinge J, Feger G, Power C, Papoin R, Salmaggi A,. MIG-differential gene expression in mouse brain endothelial cells. *Neuroreport.* 2002
- 40-Koelle DM, Corey L,. Recent progress in herpes simplex virus immunobiology and vaccine research. *Clin Microbiol Rev.* 2003.
- 41-Mertz G. J. G, Peterman R, Ashley, J. L, Jourden D. Salter, L. Morrison A. McLean, L Corey,. Herpes simplex virus type-2 glycoprotein-subunit vaccine: tolerance and humoral and cellular responses in humans. *J. Infect. Dis.*1984.
- 42-Skinner G. R. B, M. E. Turyk, C. A. Benson, G. D. Wilbanks, P. Heseltine, J. Galpin, R. Kaufman, L. Goldberg, C. E. Hartley, A. Buchan. The efficacy and safety of Skinner herpes simplex vaccine towards modulation of herpes genitalis; report of a prospective double-blind placebo-controlled trail. *Med. Microbiol. Immunol.* 1997.
- 43-Lachmann Robin H,. Herpes simplex virus-based vectors *Int. J. Exp. Path.* 2004.
- 44-Shah AC, Benos D, Gillespie GY, Markert JM,. Oncolytic viruses: clinical applications as vectors for the treatment of malignant gliomas. *J. Neurooncol.*2003.
- 45-Marconi P, Krisky D, Oligino T, Poliani PL, Ramakrishnan R, Goins WF, Fink DJ, Glorioso JC,. Replication-defective herpes simplex virus vectors for gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996.

- 46-Goins WF, Marconi P, Krisky D, Wolfe D, Glorioso JC, Ramakrishnan R, Fink DJ,. Construction of replication-defective herpes simplex virus vectors. *Curr Protoc Hum Genet.* 2002.
- 47-Bozac A, Berto E, Vasquez F, Grandi P, Caputo A, Manservigi R, Ensoli B, Marconi P,. Expression of human immunodeficiency virus type 1 tat from a replication-deficient herpes simplex type 1 vector induces antigen-specific T cell responses. *Vaccine.* 2006.
- 48-Belshe RB, Leone PA, Bernstein DI, Wald A, Levin MJ, Stapleton JT, Gorfinkel I, Morrow RL, Ewell MG, Stokes-Riner A, Dubin G, Heineman TC, Schulte JM,. Efficacy results of a trial of a herpes simplex vaccine. *N Engl J Med.* 2012.
- 49-Wang X, Xie G, Liao J, Yin D, Guan W, Pan M, Li J, Li Y,. Design and evaluation of a multi-epitope assembly peptide (MEAP) against herpes simplex virus type 2 infection in BALB/c mice. *Virology.* 2011.
- 50-Bernstein DI, Harrison CJ, Jenki LJ, Myers MG, Stanberry LR,. Cell-mediated immunologic responses and recurrent genital herpes in the guinea pig. Effects of glycoprotein immunotherapy. *J Immunol.* 1991.
- 51-Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, Radhakrishnan R, Van Hoogevest P, Van Nest G,. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant MF59 for human vaccines. *Pharm Biotechnol.* 1995.
- 52-Pass RF, Duliege AM, Boppana S, Sekulovich R, Percell S, Britt W, Burke RL,. A subunit cytomegalovirus vaccine based on recombinant envelope glycoprotein B and a new adjuvant. *J Infect Dis.* 1999.
- 53-Heineman TC, Clements-Mann ML, Poland GA, Jacobson RM, Izu AE, Sakamoto D, Eiden J, Van Nest GA, Hsu HH,. A randomized, controlled study in adults of the immunogenicity of a novel hepatitis B vaccine containing MF59 adjuvant. *Vaccine.* 1999.
- 54-Ott G, Barchfeld GL, Van Nest G. Enhancement of humoral response against human influenza vaccine with the simple submicron oil/water emulsion adjuvant MF59. *Vaccine.* 1995.
- 55-Bernstein DI, Aoki FY, Tyring SK, Stanberry LR, St-Pierre C, Shafran SD, Leroux-Roels G, Van Herck K, Bollaerts A, Dubin G, GlaxoSmithKline,. Herpes Vaccine

- Study Group. Safety and immunogenicity of glycoprotein D-adjuvant genital herpes vaccine. *Clin Infect Dis*. 2005.
- 56-Singh M, Carlson JR, Briones M, Ugozzoli M, Kazzaz J, Barackman J, Ott G, O'Hagan D,. A comparison of biodegradable microparticles and MF59 as systemic adjuvants for recombinant gD from HSV-2. *Vaccine*. 1998.
- 57- Valensi J, Carlson M. J. R., Van Nest G,. Systemic cytokine profiles in Balb/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants. *J. Immunol*. 1994.
- 58-Ott G, Van Nest G, Burke R. L.,. The use of muramyl peptides as vaccine adjuvants, p. 89-114. *In* E. Koff (ed.), *Vaccine research: a series of advances*, vol. 1. Marcel Dekker, New York, N.Y. 1991.
- 59- Burke RL,. Contemporary approaches to vaccination against herpes simplex virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1992.
- 60- Stanberry LR,. Evaluation of herpes simplex virus vaccines in animals: the guinea pig vaginal model. *Rev Infect Dis*. 1991.
- 61- Stanberry LR, Burke R, Myers MG,. Herpes simplex virus glycoprotein treatment of recurrent genital herpes. *J Infect Dis*. 1988.
- 62- Straus, S. E, Corey L, Burke R. L., Savarese B, Barnum G., Krause P. R., Kost R. G., Meier J. L., Sekulovich R., Adair S. F., Dekker C. L,. Placebo-controlled trial of vaccination with recombinant glycoprotein D of herpes simplex virus type 2 for immunotherapy of genital herpes. *Lancet*.1994.
- 63- Straus S. E, Wald A, Kost R. G, McKenzie R, Langenberg A. G. M, Hohman P, Lekstrom J, Cox E, Nakamura M, Sekulovich R, Izu A, Dekker C, Corey L,. Immunotherapy of recurrent genital herpes with recombinant herpes simplex virua type 2 glycoproteins B and D: results of a placebo-controlled vaccine trial. *J. Infect. Dis*. 1997.
- 64- Burke CJ, Hsu TA, Volkin DB,. Formulation, stability, and delivery of live attenuated vaccines for human use. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*. 1999.
- 65- Da Costa XJ, Bourne N, Stanberry LR, Knipe DM,. Construction and characterization of a replication-defective herpes simplex virus 2 ICP8 mutant strain and its use in immunization studies in a guinea pig model of genital disease. *Virology*. 1997.
- 66- Epstein AL, Marconi P, Argnani R, Manservigi R,. HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for gene transfer and gene therapy. *Curr Gene Ther*. 2005.

- 67- Manservigi R, Argnani R, Marconi P,. HSV Recombinant Vectors for Gene Therapy Open Virol J. 2010.
- 68- Hill S, Zhang X, Bournnell ME, Shields JG, Ricciardi-Castagnoli P, Hickling JK,. Generation of a primary immune response to a genetically inactivated (DISC) herpes simplex virus and wild type virus. Biochem Soc Trans. 1997.
- 69- Meignier B, Longnecker R, Roizman B,. In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020: construction and evaluation in rodents. J Infect Dis. 1988.
- 70- Meignier B, Martin B, Whitley RJ, Roizman B,. In vivo behavior of genetically engineered herpes simplex viruses R7017 and R7020. Studies in immunocompetent and immunosuppressed owl monkeys. J Infect Dis. 1990.
- 71- Whitley RJ, Kern ER, Chatterjee S, Chou J, Roizman B,. Replication, establishment of latency, and induced reactivation of herpes simplex virus gamma 1 34.5 deletion mutants in rodent models. J Clin Invest. 1993.
- 72- Spivack JG, Fareed MU, Valyi-Nagy T, Nash TC, O'Keefe JS, Gesser RM, McKie EA, MacLean AR, Fraser NW, Brown SM,. Replication, establishment of latent infection, expression of the latency-associated transcripts and explant reactivation of herpes simplex virus type 1 gamma 34.5 mutants in a mouse eye model. J Gen Virol. 1995.
- 73- Spector FC, Kern ER, Palmer J, Kaiwar R, Cha TA, Brown P, Spaete RR,. Evaluation of a live attenuated recombinant virus RAV 9395 as a herpes simplex virus type 2 vaccine in guinea pigs. J Infect Dis. 1998.
- 74- Perng GC, Thompson RL, Sawtell NM, Taylor WE, Slanina SM, Ghiasi H, Kaiwar R, Nesburn AB, Wechsler SL,. An avirulent ICP34.5 deletion mutant of herpes simplex virus type 1 is capable of in vivo spontaneous reactivation. J Virol. 1995.
- 75- Da Costa XJ, Jones CA, Knipe DM,. Immunization against genital herpes with a vaccine virus that has defects in productive and latent infection. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999.
- 76- De Bruyn Kops A, Uprichard SL, Chen M, Knipe DM,. Comparison of the intranuclear distributions of herpes simplex virus proteins involved in various viral functions. Virology. 1998.
- 77- Bournnell ME, Entwisle C, Blakeley D, Roberts C, Duncan IA, Chisholm SE, Martin GM, Jennings R, Ni Challanaín D, Sobek I, Inglis SC, McLean CS,. A genetically inactivated herpes simplex virus type 2 (HSV-2) vaccine provides effective protection against primary and recurrent HSV-2 disease. J Infect Dis. 1997.

- 78- McLean CS, Erturk M, Jennings R, Challanain DN, Minson AC, Duncan I, Bournnell ME, Inglis SC,. Protective vaccination against primary and recurrent disease caused by herpes simplex virus (HSV) type 2 using a genetically disabled HSV-1. *J Infect Dis.* 1994.
- 79- McLean CS, Ni Challanáin D, Duncan I, Bournnell ME, Jennings R, Inglis SC,. Induction of a protective immune response by mucosal vaccination with a DISC HSV-1 vaccine. *Vaccine.* 1996.
- 80- Bravo FJ, Bourne N, Harrison CJ, Mani C, Stanberry LR, Myers MG, Bernstein DI,. Effect of antibody alone and combined with acyclovir on neonatal herpes simplex virus infection in guinea pigs. *J Infect Dis.* 1996.
- 81- McClements WL, Armstrong ME, Keys RD, Liu MA,. Immunization with DNA vaccines encoding glycoprotein D or glycoprotein B, alone or in combination, induces protective immunity in animal models of herpes simplex virus-2 disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996.
- 82- Hu K, He X, Yu F, Yuan X, Hu W, Liu C, Zhao F, Dou J,. Immunization with DNA vaccine expressing herpes simplex virus type 1 gD and IL-21 protects against mouse herpes keratitis. *Immunol Invest.* 2011
- 83- Hu K, Dou J, Yu F, He X, Yuan X, Wang Y, Liu C, Gu N,. An ocular mucosal administration of nanoparticles containing DNA vaccine pRSC-gD-IL-21 confers protection against mucosal challenge with herpes simplex virus type 1 in mice. *Vaccine.* 2011.
- 84- Fiorentini S, Marconi P, Avolio M, Marini E, Garrafa E, Caracciolo S, Rossi D, Bozac A, Becker PD, Gentili F, Facchetti F, Guzman CA, Manservigi R, Caruso A,. Replication-deficient mutant Herpes Simplex Virus-1 targets professional antigen presenting cells and induces efficient CD4+ T helper responses. *Microbes Infect.* 2007.
- 85- Berto E, Bozac A, Marconi P,. Development and application of replication-incompetent HSV-1-based vectors. *Gene Ther.* 2005.
- 86- Advani SJ, Weichselbaum RR, Whitley RJ, Roizman B,. Friendly fire: redirecting herpes simplex virus-1 for therapeutic applications. *Clin Microbiol Infect.* 2002.
- 87- Epstein AL,. HSV-1-derived recombinant and amplicon vectors for preventive or therapeutic gene transfer: an overview. *Gene Ther.* 2005.
- 88- Kasai K, Saeki Y,. DNA-based methods to prepare helper virus-free herpes amplicon vectors and versatile design of amplicon vector plasmids. *Curr Gene Ther.* 2006.

- 89- Santos K, Duke CM, Dewhurst S,. Amplicons as vaccine vectors. *Curr Gene Ther.* 2006.
- 90- Chentoufi AA, Binder NR, Berka N, Durand G, Nguyen A, Bettahi I, Maillère B, BenMohamed L,. Asymptomatic human CD4+ cytotoxic T-cell epitopes identified from herpes simplex virus glycoprotein B. *J Virol.* 2008.
- 91- Dasgupta G, Chentoufi AA, Nesburn AB, Wechsler SL, BenMohamed L,. New concepts in herpes simplex virus vaccine development: notes from the battlefield. *Expert Rev Vaccines.* 2009.
- 92- Huilan Y, Cui Z, Jianyong F, Lei G, Wei Q,. Construction of, and T-helper (Th)1/Th2 immune responses to, a herpes simplex virus type 2 glycoprotein D-cytotoxic T-lymphocyte epitope DNA vaccine. *Clin Exp Dermatol.* 2010.
- 93- Dupuis M, Denis-Mize K, LaBarbara A, Peters W, Charo IF, McDonald DM, Ott G,. Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis. *Eur J Immunol.* 2001.
- 94- Singh M, Carlson JR, Briones M, Ugozzoli M, Kazzaz J, Barackman J, Ott G, O'Hagan D,. A comparison of biodegradable microparticles and MF59 as systemic adjuvants for recombinant gD from HSV-2. *Vaccine.* 1998.
- 95- Gavioli R, Guerrini R, Masucci MG, Tomatis R, Traniello S, Marastoni M,. High structural side chain specificity required at the second position of immunogenic peptides to obtain stable MHC/peptide complexes. *FEBS Lett.* 1998.
- 96- Kittiworakarn J, Lecoq A, Moine G, Thai R, Lajeunesse E, Drevet P, Vidaud C, Ménez A, Léonetti M,. HIV-1 Tat raises an adjuvant-free humoral immune response controlled by its core region and its ability to form cysteine-mediated oligomers. *J Biol Chem.* 2006.
- 97- Ensoli B, Bellino S, Tripiciano A, Longo O, Francavilla V, Marcotullio S, Cafaro A, Picconi O, Paniccchia G, Scoglio A, Arancio A, Ariola C, Ruiz Alvarez MJ, Campagna M, Scaramuzzi D, Iori C, Esposito R, Mussini C, Ghinelli F, Sighinolfi L, Palamara G, Latini A, Angarano G, Ladisa N, Soscia F, Mercurio VS, Lazzarin A, Tambussi G, Visintini R, Mazzotta F, Di Pietro M, Galli M, Rusconi S, Carosi G, Torti C, Di Perri G, Bonora S, Ensoli F, Garaci E,. Therapeutic Immunization with HIV-1 Tat Reduces Immune Activation and Loss of Regulatory T-Cells and Improves Immune Function in Subjects on HAART. *PLoS One.* 2010.
- 98- Gavioli R, Cellini S, Castaldello A, Voltan R, Gallerani E, Gagliardoni F, Fortini C, Cofano EB, Triulzi C, Cafaro A, Srivastava I, Barnett S, Caputo A, Ensoli B,. The Tat

- protein broadens T cell responses directed to the HIV-1 antigens Gag and Env: implications for the design of new vaccination strategies against AIDS. *Vaccine*. 2008.
- 99- Kronenberg K, Brosch S, Butsch F, Tada Y, Shibagaki N, Udey MC, von Stebut E,. Vaccination with TAT-antigen fusion protein induces protective, CD8(+) T cell-mediated immunity against *Leishmania major*. *J Invest Dermatol*. 2010.
- 100- Caputo A, Brocca-Cofano E, Castaldello A, Voltan R, Gavioli R, Srivastava IK, Barnett SW, Cafaro A, Ensoli B,. Characterization of immune responses elicited in mice by intranasal co-immunization with HIV-1 Tat, gp140 DeltaV2Env and/or SIV Gag proteins and the nontoxicogenic heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin. *Vaccine*. 2008.
- Kirman JR, Turon T, Su H, Li A, Kraus C, Polo JM., Belisle J, Morris S, Seader RA,. Enhanced immunogenicity to *M.tuberculosis* by vaccination with an alphavirus plasmid replicon expressing antigen 85A. *Infect. Immun*. 2003. 101-
- 101- Glorioso JC, Goins WF, Schmidt MC, Oligino T, Krisky DM, Marconi PC, Cavalcoli JD, Ramakrishnan R, Poliani PL, Fink DJ,. Engineering herpes simplex virus vectors for human gene therapy. *Adv Pharmacol*. 1997.
- 102- Arya SK, Guo C, Josephs SF, Wong-Staal F. Trans-activator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III). *Science*. 1985.
- 103- Samady L, Costigliola E, MacCormac L, McGrath Y, Cleverley S, Lilley CE, Smith J, Latchman DS, Chain B, Coffin RS. Deletion of the virion host shutoff protein (vhs) from herpes simplex virus (HSV) relieves the viral block to dendritic cell activation: potential of vhs- HSV vectors for dendritic cell-mediated immunotherapy. *J Virol*. 2003
- 104- Doepker RC, Hsu WL, Saffran HA, Smiley JR. Herpes simplex virus virion host shutoff protein is stimulated by translation initiation factors eIF4B and eIF4H. *J Virol*. 2004
- 105- Cotter CR, Nguyen ML, Yount JS, López CB, Blaho JA, Moran TM. The virion host shut-off (vhs) protein blocks a TLR-independent pathway of herpes simplex virus type 1 recognition in human and mouse dendritic cells. *PLoS One*. 2010

