

**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**



FACOLTA' DI SCIENZE BIOLOGICHE

**TESI DI DOTTORATO IN BIOLOGIA
APPLICATA**

Indirizzo in:

“Fisiologia Animale Vegetale e Microbica”

XVIII Ciclo, 2005

**RISPOSTA T CITOTOSSICA A BREVE E A
LUNGO TERMINE DOPO VACCINAZIONE CON IL
BATTERIOFEGO FILAMENTOSO *fd***

DOTTORANDA:

DINA MASCOLO

I.G.B.

“A. Buzzati Traverso”, CNR

RELATORE:

Prof. EZIO RICCA

CORRELATORE:

Dtt.ssa. GIOVANNA DEL POZZO

COORDINATORE:

Prof. MAURILIO DE FELICE

INDICE

1. Introduzione

(pag. 1-13)

- 1.1 Il Sistema Immunitario
- 1.2 Immunità mediata dai linfociti T CD8+
- 1.3 I linfociti T CD8+ della memoria
- 1.4 I vaccini
- 1.5 Il batteriofago filamentoso *fd*
- 1.6 Obiettivo del lavoro

2. Materiali e Metodi

(pag. 14-22)

- 1.1 Preparazione e purificazione di batteriofagi ibridi
- 1.2 Peptidi e procedure di immunizzazione
- 1.3 Test di citotossicità sui linfociti T CD8
- 1.4 Determinazione della frequenza dei linfociti T CD8 secernenti IFN- γ mediante test ELISPOT
- 1.5 Determinazione della frequenza dei linfociti T CD8 antigene specifici mediante i Pentameri
- 1.6 Analisi Statistiche

3. Risultati

(pag. 23-37)

- 3.1 Immunogenicità di fagi veicolanti epitopi T CTL e helper
- 3.2 Uso del fago singolo ibrido *fdOVA* per indurre risposte CTL
- 3.4 Risposte a lungo termine dei linfociti T CD8+ antigene-specifici

4. Discussione

(pag. 38-44)

5. Bibliografia

(pag. 45-50)

1. INTRODUZIONE

1.1 Il Sistema Immunitario

Il sistema immunitario svolge una continua sorveglianza nel nostro organismo contro agenti patogeni riconosciuti come estranei o meglio dannosi, al fine di attuare reazioni difensive.

I primi meccanismi deputati a svolgere questo ruolo sono le barriere chimico-fisiche, come gli epiteli, le mucose e alcune proteine ematiche, quali i componenti del sistema del complemento, ed ancora cellule dendritiche, macrofagi e neutrofili con attività fagocitica, leucociti come le cellule natural killer con attività citolitica. Tutti questi tipi cellulari fanno parte del sistema dell'*immunità innata* e i meccanismi di protezione che essi attuano si basano essenzialmente su una famiglia di recettori definiti Toll-like receptors (TLRs) che legano strutture molecolari complesse altamente conservate e derivate dai microrganismi come ad esempio CpG, LPS, ssRNA e mannosidi. L'*immunità innata* è quindi di natura non specifica perché pre-esistente all'esposizione dell'antigene, ma priva di memoria immunologica. Inoltre gli effettori di tale sistema sono in grado di attuare tempestivamente una risposta all'antigene dal momento che non necessitano di meccanismi di differenziamento e proliferazione come accade nella *immunità adattativa* che può essere quindi definita come ritardata. Gli effettori dell'*immunità innata* non vanno incontro a riarrangiamento genico, poiché posseggono geni prefissati nella linea germinale, inoltre non hanno un'organizzazione clonale poiché non posseggono una specificità antigenica come invece accade per il sistema adattativo, (1).

Se nelle fasi precoci dell'infezione, il patogeno riesce ad evadere la prima linea difensiva attuata dal sistema immunitario innato, si innesca una risposta acquisita o adattativa specifica, perché diretta contro antigeni del patogeno. In questa fase si assiste al reclutamento, all'espansione e al differenziamento di cloni linfocitari ad alta specificità e capaci di discriminare selettivamente tra componenti self e non-self. Tale meccanismo difensivo risulta potenziato in intensità ed efficacia in seguito a reiterate esposizioni allo stesso antigene e ciò costituisce la cosiddetta "memoria immunologica".

Il sistema immunitario, come è storicamente noto, opera secondo due categorie funzionali, rispettivamente basate sulla risposta umorale e su quella

cellulo-mediata. Questa classificazione è da ricondursi al tipo di antigene che ha innescato la risposta e alle differenze dei meccanismi effettori che stabiliscono ed orientano, nei precursori multipotenti il tipo di competenza immunitaria, precedentemente avviata dal riconoscimento specifico dell'antigene stesso.

La fase effettrice dell'immunità umorale, distinguibile in una risposta primaria ed una secondaria, si realizza attraverso l'attivazione di cloni di cellule B, che normalmente si trovano in uno stato di "quiescenza immunitaria". Queste ultime, riconoscono epitopi conformazionali o sequenziali sulla superficie di proteine native, e in questo modo vengono sensibilizzate e differenziano in plasmacellule producenti anticorpi neutralizzanti che vengono rilasciati nel sangue e nei liquidi interstiziali.

Invece nell'immunità cellulo-mediata, i linfociti T non sono in grado di riconoscere le molecole antigeniche solubili, ma solo peptidi derivati dalla processazione di antigeni proteici effettuata dalle cellule presentanti l'antigene (APC), quali i macrofagi, i linfociti B, le cellule dendritiche, le cellule di Langherans, e le cellule endoteliali delle venule. In seguito, tali peptidi esposti sulla superficie delle APC in associazione con il Complesso Maggiore di Istocompatibilità (MHC), vengono riconosciuti in modo specifico dai linfociti T attraverso il Recettore per l'Antigene (TCR). Questa interazione provoca l'attivazione di linfociti T citotossici (CTL) e dei linfociti T helper (Th).

Le molecole MHC sono proteine integrali di membrana altamente polimorfiche, la cui regione extra-cellulare ammino-terminale forma una tasca dove viene alloggiato il peptide antigenico. Queste molecole sono suddivise in due classi: le molecole MHC di classe I ed MHC di classe II, che differiscono per struttura e funzione, poichè diverse sono le sottopopolazioni di linfociti T da cui vengono riconosciute.

Infatti i linfociti citotossici (CD8+) riconoscono peptidi espressi in associazione con molecole MHC di classe I, derivati dalla processazione di antigeni endogeni, come proteine virali o tumorali sintetizzate all'interno della stessa cellula o derivate da batteri e protozoi penetrati nel citoplasma cellulare.

Invece, i linfociti T helper (CD4+) riconoscono, in associazione con le molecole MHC di classe II antigeni esogeni, che vengono captati, internalizzati

per pinocitosi o endocitosi, processati ed in fine riesposti come peptidi sulla superficie delle APC.

I linfociti T helper, in seguito ad attivazione, possono esplicare le loro funzioni effettrici, che risultano differenti in relazione al diverso spettro di citochine prodotte e all'antigene coinvolto. La differenziazione delle cellule vergini può portare a due sottopopolazioni: le Th1 e le Th2. La prima raggiunge i tessuti infetti dove attiva i macrofagi secernendo IL-2 e IFN- γ , la seconda produce principalmente IL-4, che stimola la sintesi di IgE nel corso di reazioni allergiche e altre citochine come IL-5, IL-10 e IL-13 che stimolano risposte umorali. Dunque la differenziazione dei linfociti helper CD4⁺ dipende sia dal tipo di antigene che dal tipo di cellula che lo presenta.

1.2 Immunità mediata dai linfociti T CD8

I linfociti T CD8⁺ vergini, che non hanno mai avuto contatto con l'antigene, vengono selezionati nel timo ed immessi nella circolazione sanguigna e linfatica dove permangono finchè muoiono o incontrano l'antigene; tale incontro induce proliferazione e successivo differenziamento dei linfociti T in cellule effettrici e della memoria.

A questo punto si parla di linfociti T citotossici maturi, una sottopopolazione di linfociti T in grado di lisare ed uccidere cellule bersaglio che esprimono antigeni specifici (2).

Essi entrano in gioco principalmente contro le infezioni intracellulari, nel rigetto dei trapianti d'organo e nell'immunosorveglianza verso antigeni tumorali (3).

Infatti i linfociti citotossici inducono l'apoptosi delle cellule bersaglio attivando la cascata delle caspasi, sia attraverso il rilascio nella cellula infetta di granuli contenenti perforina e granzimi, sia attraverso un'interazione di membrana tra il FAS-ligando (CD95L) dei CD8 e la molecola FAS delle cellule bersaglio. Un secondo meccanismo di difesa realizzato dai linfociti T è rappresentato dalla secrezione di citochine proinfiammatorie, come IFN- γ e TNF-

α. Si tratta di molecole solubili che non solo vanno ad interferire con la replicazione intracellulare degli eventuali patogeni, ma sono anche in grado di reclutare altre cellule effettrici come macrofagi e neutrofili che potenziano la risposta immune, di indurre lo switch di classe anticorpale nei linfociti B e il differenziamento degli stessi linfociti T in sottopopolazioni dotate di diversa specificità.

Una efficiente stimolazione dei CTL, richiede come descritto in letteratura, non solo il legame del linfocita con il complesso MHC I-peptide esposto sulla superficie dell'APC, ma anche una cooperazione da parte delle cellule T-helper. Antigeni esogeni fagocitati dalle cellule dendritiche vengono presentati ai CD4+, i quali attivano le presentanti stesse attraverso l'interazione CD40-CD40 ligando (CD40L) (4). In seguito il legame a tale recettore si traduce nell'alterazione del fenotipo delle APC, nelle quali si ha induzione dell'espressione di molecole costimolatorie di superficie e nell'attivazione delle cellule T-helper CD4⁺. In tal modo queste ultime produrranno citochine (IL-12, IL-6 e TNF- γ) che agiscono come fattori di crescita autocrini e paracrini necessari per l'attivazione dei linfociti T citotossici effettori e della memoria. Studi effettuati su modelli animali hanno dimostrato che in assenza di cellule T helper l'attivazione dei linfociti citotossici può essere ottenuta con l'ausilio di un anticorpo monoclonale anti CD40 ed inoltre che in topi normali, è possibile bloccare l'induzione di una risposta T citolitica usando anticorpi diretti contro CD40L (5).

D'altra parte alcuni agenti infettivi, come virus e batteri, potrebbero non richiedere il coinvolgimento dei CD4+ perché capaci di attivare direttamente le APC attraverso la stimolazione dei recettori Toll-like (TLR) che si trovano sulla superficie delle cellule presentanti (6), questo fenomeno si traduce successivamente in una attivazione dell'immunità innata e dei linfociti T CD8+.

1.3 I linfociti T CD8 della memoria

In seguito ad un'infezione o ad una vaccinazione, si verifica la fase acuta della risposta immune, in cui i linfociti T CD8 vergini, reclutati dalla periferia, proliferano e differenziano in cellule effettrici antigene-specifiche ed in cellule della memoria.

Dopo l'eliminazione dell'antigene, gran parte degli effettori muore per apoptosi perché si tratta di cellule a breve vita, ma alcuni di essi sopravvivono ed entrano a far parte del pool della memoria.

Tali cellule sono in grado di persistere anche per tutta la vita di un individuo e garantire protezione in caso di una re-infezione con il patogeno precedentemente incontrato, attraverso risposte più rapide ed efficaci.

I meccanismi che governano lo sviluppo e il mantenimento delle cellule T CD8 della memoria non sono ancora ben definiti, infatti vi sono teorie contrastanti circa le modalità di innesco di una efficace risposta dei linfociti T CD8 della memoria; in questo contesto è fondamentale il supporto dei linfociti helper, dai quali tuttavia è stato proposto che i CD8 potrebbero essere dispensati nel caso in cui le frequenze dei precursori citotossici siano elevate (7).

Ulteriori studi affermano che le cellule della memoria non hanno una intrinseca longevità, per cui necessitano di continui stimoli come le citochine in particolare IL-15, a sostegno della loro proliferazione basale che si realizza preferenzialmente nel midollo osseo (8). Tra gli stimoli proliferativi assume un ruolo cruciale l'antigene stesso, tuttavia non è ancora chiaro se sia indispensabile per il mantenimento della memoria una stimolazione continua, pure a basse dosi da parte dell'antigene oppure se le cellule CD8 "parentali" attivate, siano in grado di istruire le cellule "figlie" trasmettendo loro un programma di sviluppo che le orienti in cellule effettrici o della memoria, indipendentemente dall'antigene (9).

1.4 I Vaccini

Lo studio e la comprensione dei meccanismi di difesa immunitaria ha, tra le molteplici applicazioni, quella di prevenire e contrastare le infezioni di tipo virale o batterico, sensibilizzando le difese immunitarie dell'individuo nei confronti di potenziali agenti patogeni e conferendo protezione nel caso di una successiva esposizione a tale agente.

In questo contesto si colloca la progettazione di vaccini che siano dotati di un efficace valore protettivo. Inoltre la condizione essenziale affinché un vaccino induca un'immunizzazione durevole, specifica ed efficace nell'individuo è la capacità di generare un'immunità umorale attraverso le cellule B produttrici anticorpi neutralizzanti, ma soprattutto un'immunità cellulare attraverso l'attivazione dei linfociti T citotossici CD8+.

Entrambe le risposte dipendono dai linfociti T helper CD4+ antigene-specifici. Un elemento cruciale, nella formulazione di un vaccino è il tipo di antigene contro cui si vuole avere la risposta; infatti antigeni relativamente stabili o efficaci nella sola specie umana sono più facilmente controllabili di antigeni soggetti a mutazioni o in grado di essere veicolati anche da specie animali.

Tra le varie strategie oggi in uso o in fase di sperimentazione si ricordano i vaccini a DNA o RNA, i vaccini sintetici, virali e batterici, attenuati ed inattivati o basati sull'uso di vettori ricombinanti.

Tuttavia sono ancora in corso studi per ridurre la patogenicità dei virus usati come vettori e parallelamente per potenziare l'immunogenicità degli antigeni rispetto al veicolo. Infatti è fondamentale che un vaccino non sia tossico, a basso costo di produzione e stabile ovvero resistente a condizioni variabili di temperatura e tamponamento, consentendo così di ridurre le problematiche relative alla conservazione del prodotto. In generale si cerca di sfruttare dei carrier per veicolare peptidi sintetici, che di per sé sono poco immunogenici ed hanno una scarsa stabilità a causa della repentina degradazione cui vanno incontro nell'organismo. In questo caso si parla di vaccini ricombinanti, che possono essere costituiti da costrutti a DNA, capaci di esprimere l'antigene nelle cellule dell'ospite o da carrier proteici ingegnerizzati e veicolanti epitopi

immunodominanti o intere proteine antigeniche espressi come proteine di fusione, derivati da tumori o microorganismi patogeni. Inoltre si cerca di realizzare formulazioni vacciniche che inducano risposte ad alta frequenza cellulare da parte dei linfociti specifici per l'epitopo immunodominante ed invece risposte limitate contro epiotipi subdominanti (10).

Per questo motivo nella progettazione di vaccini è fondamentale l'identificazione e la caratterizzazione dei determinanti antigenici del patogeno in grado di stimolare una risposta umorale e cellulare. Naturalmente in questo tipo di approcci gli epitopi vengono a trovarsi in un contesto molecolare diverso strutturalmente e topologicamente da quello naturale, che potrebbe interferire con il riconoscimento da parte del sistema immunitario e dunque è necessaria la comprensione dei meccanismi di processazione proteolitica di un antigene.

1.5 Il batteriofago filamentoso fd

Il fago filamentoso *fd*, è un virus che infetta batteri gram negativi come *Escherichia coli* ed il suo genoma è costituito da una molecola di DNA circolare a singolo filamento di circa 6500 nucleotidi codificante per 11 proteine, suddivisi in gruppi in base alla funzione che hanno nel ciclo vitale del fago.

Il primo gruppo contiene proteine (pIII, pVI, pVII pVIII e pIX) strutturali del capsido e proteine coinvolte nell'interazione del fago con il pilo di coniugazione batterico durante il processo di infezione. Nel secondo gruppo sono annoverate le proteine (pII, pV e pX) richieste per la replicazione del DNA del fago, mentre l'ultimo gruppo comprende le tre proteine (pI, pIV e pXI) necessarie per l'assemblaggio della particella fagica. Il ciclo infettivo del fago ha inizio con il legame della proteina pIII al pilo coniugativo F' di *E. coli* e la successiva traslocazione del DNA nel citoplasma batterico, che viene convertito da enzimi della cellula ospite dalla forma circolare a singolo filamento alla forma replicativa a doppio filamento, utilizzata in seguito come stampo per la sintesi delle proteine virali e per la produzione di un'altra molecola di DNA a singolo filamento che verrà incorporata nella progenie virale.

L'assemblaggio del batteriofago avviene nella membrana citoplasmatica dell'ospite, in questa fase le proteine del capsido si dispongono attorno alle eliche di DNA a singolo filamento neo-sintetizzate e sequestrate dalla proteina pV, finchè le nuove particelle fagiche nascenti vengono estruse attraverso la membrana della cellula ospite. L'assemblaggio continua fino all'esaurirsi del DNA sintetizzato, che è ben tollerato dall'ospite batterico che continua a crescere e a dividersi normalmente. Infatti, i batteriofagi filamentosi al termine del loro ciclo vitale vengono secreti nel mezzo di coltura senza uccidere il loro ospite o rompere l'integrità della sua membrana cellulare, e possono essere rapidamente purificati dal brodo di coltura attraverso centrifugazione frazionata.

Una delle applicazioni di questa tecnologia consiste nella costruzione di librerie di fagi esprimenti sequenze casuali di peptidi utili a identificare ligandi specifici, coinvolti ad esempio nell'interazione tra DNA e proteine, ormone e recettore, enzima e substrato, o tra antigene ed anticorpo. Un'ulteriore

potenzialità di questa tecnica sta nel fatto che i fagi possono veicolare sul capsido domini funzionali, nella loro conformazione nativa (11), ciò ha reso possibile lo studio di interazioni proteina-proteina, in cui è di particolare importanza che venga conservato il *folding* del dominio di legame. Infine si è visto che anche frammenti di anticorpi possono essere presentati sulla superficie del batteriofago in una forma biologicamente attiva, e sono stati realizzati fagi esprimenti molecole anticorpali costituite dalle regioni variabili delle catene leggere e pesanti connesse ad una stessa catena polipeptidica ed espresse come proteine di fusione con la pIII (12).

1.6 Obiettivo del lavoro

La ricerca alla base di questa tesi di Dottorato è consistita nell'utilizzo del batteriofago filamentoso come carrier di peptidi immunologicamente rilevanti per realizzare vaccini ricombinanti. L'interesse principale è stato quello di mettere a punto le condizioni migliori e i protocolli di utilizzo di questo carrier per ottenere risposte citotossiche. In particolare sono stati costruiti fagi esprimenti peptidi immunodominanti sia helper che citotossici in topi wild-type C57Bl6/J, ovvero presentati dalle molecole MHC di classe I e II di questo ceppo murino.

Sono stati preparati fagi singoli ibridi e doppi ibridi ed è stata valutata l'efficacia delle diverse formulazioni antigeniche nell'indurre risposte citotossiche specifiche a breve e a lungo termine. Sono state messe a punto una serie di metodiche che hanno consentito la valutazione delle risposte funzionali, ed è stata testata l'efficacia di adiuvanti diversi, di differenti siti di somministrazione ed in fine sono state valutate le dosi ottimali di antigene da utilizzare.

2. MATERIALI E METODI

2.1 Preparazione e purificazione di batteriofagi ibridi

Il batteriofago filamentoso wild-type può essere ingegnerizzato realizzando così fagi ibridi (rappresentazione schematica nella figura 1), che vengono preparati clonando gli oligonucleotidi codificanti per la sequenza esogena tra i codoni che codificano per i residui amminoacidici 3 e 4 della proteina pVIII matura, come mostrato nel Pannello A della figura 2.

In particolare i clonaggi per realizzare costrutti singoli ibridi fdOVA e fdHBVc, esprimenti un unico peptide esogeno, quali: OVA (5'-CCGCGGAGGGTTCCATCATCAACTTCGAAAACTGGACGATCCCGCC AAGG-3') o HBVc (5'CCGCGGAGGGTACCCCGCCGGCTTACCGTCCGCCGAACGCTCCGAT CCTGGACGACCCGCCAAGG-3') vengono realizzati inserendo le sequenze esogene nel genoma fagico fdAMPLAY88, mostrato nel Pannello B della figura 2. Questo vettore contiene due copie del gene codificante per la proteina pVIII, di cui una nella forma nativa e l'altra modificata, in modo da contenere, sotto il controllo di un promotore *tac* inducibile mediante IPTG, i siti di restrizione SacII-StyI utili all'inserzione delle sequenze oligonucleotidiche sopra descritte. Il costrutto così ottenuto viene usato per trasformare cellule batteriche di *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan che produrranno, rilasciandoli nel mezzo di coltura, fagi singoli ibridi il cui capsido è costituito sia da copie wild-type che copie ricombinanti della proteina pVIII.

Invece per sintetizzare fagi doppio ibridi fdOVA/HBVc, esprimenti cioè simultaneamente i due diversi peptidi, è stato utilizzato il vettore plasmidico pTfd8SHU, mostrato nel Pannello C della figura 2, che contiene una sola copia del gene VIII, con a monte i siti di restrizione SacII-StuI per clonare l'oligonucleotide codificante il peptide OVA. Con tale costrutto sono state trasformate cellule di *E. coli* XL1-Blue MRF' Kan, che successivamente, durante la fase esponenziale della crescita sono state infettate con il fago fdHBVc. In questo modo i batteri, opportunamente selezionati con antibiotici, producono particelle virali che assemblandosi espongono sulla superficie del capsido

proteine pVIII wild-type frammiste a copie recanti le due diverse sequenze esogene.

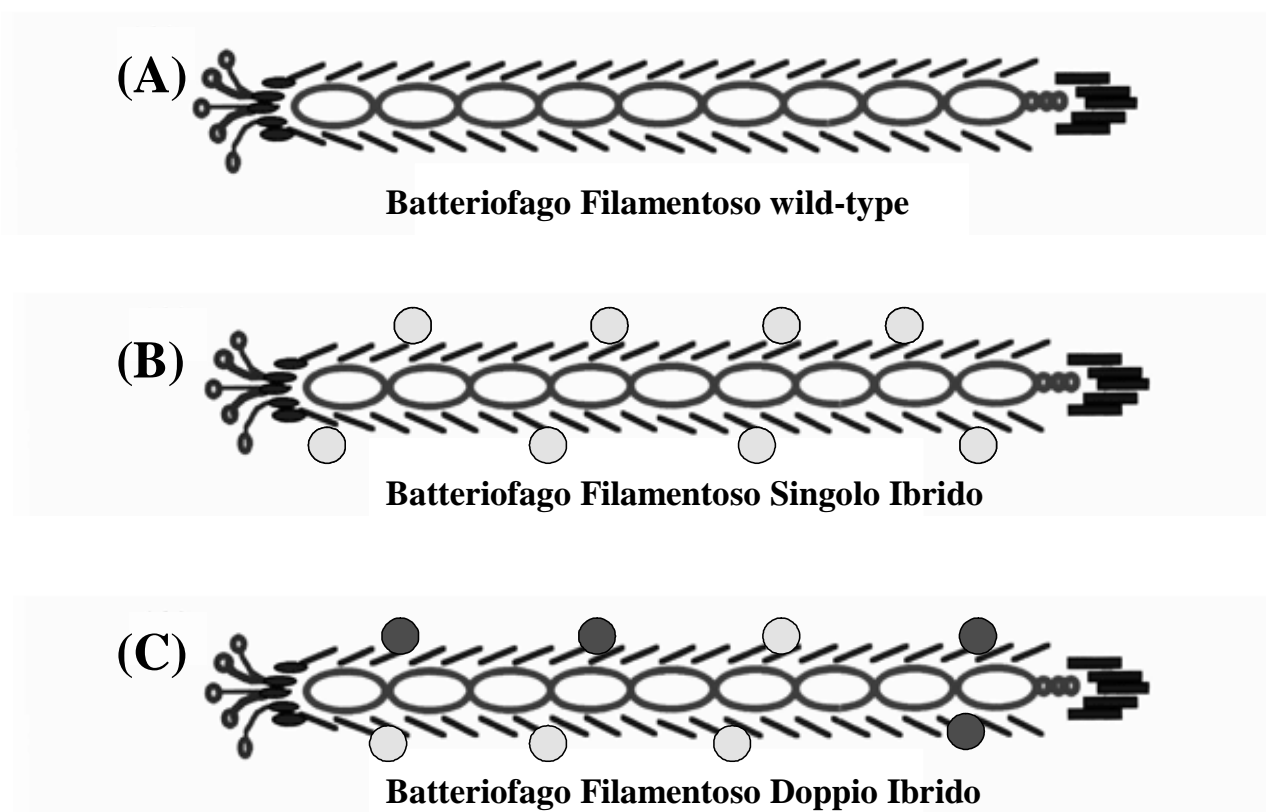


Figura 1: Batteriofago filamentoso wild-type e ingegnerizzato.

Sono mostrate alcune delle proteine minori: pIII, pVI, pVII e pIX che formano il rivestimento del batteriofago, ma soprattutto la pVIII (↘) che è la maggiore, del capside virale. Peptidi (●) (●) esogeni clonati nella proteina pVIII del capside.

Pannello A: fago wild-type.

Pannello B: fago singolo ibrido esprime il solo peptide OVA (●).

Pannello C: fago doppio ibrido esprime sia il peptide OVA (●) che HBVc (●).

Le particelle virali sono state purificate dal mezzo di coltura batterico, secondo la metodica descritta (34), attraverso centrifugazioni successive e gradiente di densità di cloruro di cesio. Le preparazioni sono state poi analizzate mediante elettroforesi su SDS-PAGE e successiva rivelazione attraverso colorazione con nitrato di argento, che consente di discriminare tra la proteina

pVIII wild-type e quella ricombinante in virtù del maggiore peso molecolare di quest'ultima.

Inoltre è stata verificata la sequenza amminoacidica all' estremità N-terminale necessario anche per stabilire il numero di copie di proteina pVIII modificata rispetto al numero di quelle non ricombinanti.

Sfruttando il batteriofago filamentoso è possibile realizzare costrutti fagici singoli e doppio ibridi, veicolanti peptidi esogeni espressi come proteine di fusione all' N-terminale della pVIII, che è la proteina maggiore del capsido virale. Infatti essa rappresenta il 99% dell'intero corredo proteico del fago, essendo presente in 2700 copie.

A

Sequence in "wild type" fd

C GCT GCT GAG GGT GAC GAT CCC GCA AAA GCG GCC.
 A A E G D D P A K A A
 -1 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +10

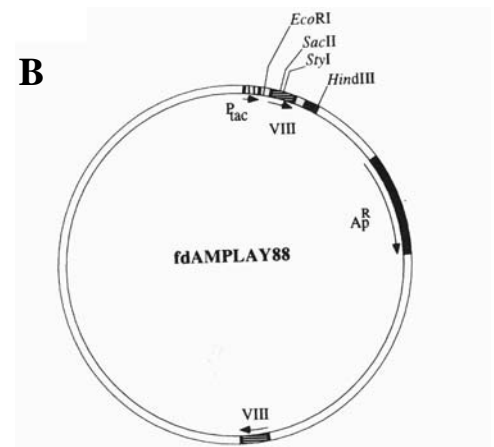
Sequence in pTfd8SHU

SacII HpaI StuI
 C GCC GCG GAG GTT AAC AGG CCT GCA AAA GCG GCC.
 A A E V N R P A K A A
 -1 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +10

Sequence in fdAMPLAY88

SacII StyI
 C GCC GCG GAG GGT GAC GAT CCC GCC AAG GCG GCC
 A A E G D D P A K A A
 -1 +1 +2 +3 +4 +5 +6 +7 +8 +9 +10

B



C

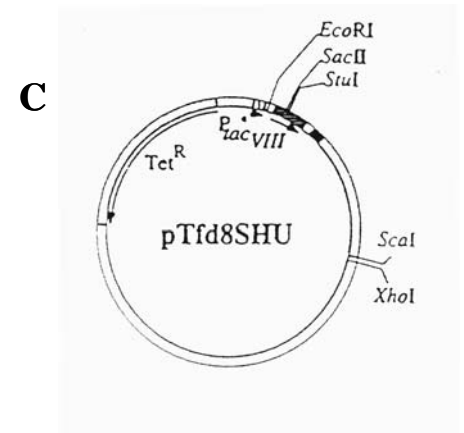


Figura 2: Diagramma schematico del genoma fagico

Pannello A. Sono indicate le sequenze del fago wild-type, inoltre sono riportati i siti di restrizione SacII-StyI per il genoma del fago e SacII-StuI per il vettore plasmidico PTfd8SHU, a livello dei quali viene effettuato il clonaggio delle sequenze esogene di interesse.

Pannello B. Diagramma schematico del genoma fagico fdAMLY88.

Pannello C. Diagramma schematico del vettore plasmidico PTfd8SHU.

2.2 Peptidi e procedure di immunizzazione

I peptidi usati nel lavoro per realizzare i costrutti fagici sono stati acquistati dalla Primm (Milano, Italia), e sono il peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) dell'ovalbumina di siero bovino ed il peptide HBV_{C128-140} (TPPAYRPPNAPIL) del Core Antigenico del Virus dell'Epatite B hanno una purezza del 95% e sono stati analizzati per HPLC e spettrometria di massa.

Gli esperimenti sono stati effettuati "in vivo", utilizzando topi appartenenti ai ceppi C57BL6/J (H-2^d) e Balb/c (H-2^b) acquistati dalla Harlan Nossan (Corezzana, Italia) e in seguito mantenuti nello stabulario dell'IGB, in accordo con le indicazioni istituzionali.

Topi B6 di sesso femminile, di età compresa tra due e quattro mesi sono stati inoculati due volte a distanza di quindici giorni con le varie preparazioni fagiche in presenza di due diversi adiuvanti. L'antigene è stato inoculato a livello sottocutaneo nella prima immunizzazione mescolato con l'adiuvante Completo di Freund (CFA) e nella seconda somministrazione con l'adiuvante Incompleto di Freund (IFA). Alternativamente l'antigene è stato somministrato intraperitonealmente con 150 µg di PolyI:C (poliinosinico e policitidilico), che è un analogo sintetico del ssRNA virale. I topi sono stati sacrificati dopo due settimane dall'ultima iniezione, per valutare la risposta immunitaria cellulomediata a breve termine, o dopo 50-60 giorni per la risposta tardiva

2.3 Test di citotossicità sui linfociti T CD8

Per valutare la risposta da parte dei linfociti citotossici, le cellule effettrici definite “*responder*”, derivate dalla milza dei topi immunizzati e di un topo di controllo, vengono sottoposte al JAM test (28), in cui si misura l’attività citotossica peptide-specifica nei confronti di cellule bersaglio definite “*target*” opportunamente marcate con timidina triziata che si intercala nel DNA delle cellule. Il test sfrutta come indice dell’attività citolitica la frammentazione del DNA, uno dei primi eventi che si verifica nel corso della lisi di una cellula e quindi la riduzione del numero di cellule marcate.

Le cellule *responder* vengono in primo luogo attivate mediante ristimolazione in vitro; a tale scopo gli splenociti sono piastrati (4×10^6 cellule/pozzetto), in presenza di IL-2 ad una concentrazione finale di 20 U/ml, con cellule presentanti l’antigene appartenenti ad un topo singenico, irradiate per 4 min con 4000 RAD, opportunamente preincubate con il peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 µg/ml). Parallelemente, come controllo positivo le cellule di ciascun topo vengono stimulate anche con gli splenociti di Balb/c (2×10^6 per pozzetto) irradiati, generando così una risposta allo-reattiva, dal momento che i due ceppi hanno differenti MHC-I. Dopo 6-7 giorni di co-coltura a 37°C e 5% CO₂ le cellule *responder* vengono raccolte e testate per valutare l’attività citotossica nei confronti di cellule *target* precedentemente marcate con ³H-TdR (10 µci per 16 h). Le cellule *responder*, ristimate in vitro con il peptide OVA, vengono incubate per 4 ore con cellule *target* EL4T (H-2^b singeniche ai topi B6) pulsate e non pulsate con il peptide OVA; diversamente le cellule *responder* stimulate con Balb/c vengono testate in alloreattività contro le P815 (H-2^d) e le EL4T.

La percentuale di lisi delle cellule bersaglio, che rappresenta l’indice dell’attività citolitica delle *responder*, viene calcolata utilizzando la seguente formula:

$$\%Lisi = [(T-S)/T] \times 100$$

T = timidina triziata delle *target* in assenza di *responder*

S = timidina triziata delle *target* in presenza di *responder*

In fine, per ottenere la percentuale di lisi antigene-specifica, si sottrae alla lisi delle *target* pre-incubate con il peptide OVA, la lisi degli stessi non pre-pulsati.

2.4 Determinazione della frequenza dei linfociti T CD8 secernenti IFN- γ mediante ELISPOT

L'ELISPOT è un saggio immuno-enzimatico che consente di stabilire la frequenza dei linfociti T CD8 secernenti una citochina, quale il IFN- γ .

Piastre MAIP con fondo in nitrocellulosa, opportunamente pretrattate con anticorpo anti IFN- γ (5 μ g/ml), vengono usate per piastrare le cellule *responder* (500000 cellule/pozzetto), ovvero gli splenociti di topi immunizzati e di un topo non trattato, in presenza di IL-2 (20 U/ml) e delle APC (500000 cellule/pozzetto). Le cellule presentanti usate appartengono a un topo singenico irradiato, e sono pre-pulsate e non con il peptide OVA (10 μ g/ml) al fine di restimolare le *responder* nel corso di un'incubazione di 40 ore. Inoltre le cellule della milza di ciascun topo, vengono incubate anche ad una concentrazione finale di 100000 cellule/pozzetto, con il solo terreno di coltura per ottenere un controllo negativo o con un mitogeno policlonale, la ConA (10 μ g/ml), come controllo positivo. Inoltre le TSA, una linea cellulare di adenocarcinoma mammario murino, e le I3500 costituite dalla stessa linea parentale però trasfettata con il gene per il IFN- γ in modo da produrre costitutivamente la citochina in esame, rappresentano rispettivamente i controlli negativi positivi e del test.

Al termine della stimolazione i pozzetti contenenti i diversi campioni vengono lavati e di seguito incubati per 5 ore con un anticorpo secondario, l'anti-IFN- γ -biotinilato (1 μ g/ml). Successivamente, dopo aver allontanato accuratamente l'anticorpo in eccesso, si aggiunge la poli-HRP-streptavidina (Endogen, Woburn, MA) e il substrato AEC (Sigma, Milano, Italia), che consentono di visualizzare mediante microscopia gli spots, che sono indice del legame anticorpo-IFN- γ prodotto dalle responders. Gli spots sono stati contati utilizzando il lettore per ELISPOT (AELVIS).

2.5 Determinazione della frequenza dei linfociti T CD8 antigene specifici mediante i Pentameri

L'identificazione di linfociti T CD8 antigene specifici è possibile usando la metodica dei pentameri, che sono costituiti da complessi solubili di MHC-I-peptide coniugati con un fluorocromo, quale la ficoeritrina (PE).

- ❖ Gli splenociti dei topi immunizzati e non, vengono incubati in piastre da 96 pozzetti a fondo a U (2×10^6 /pozzetto) per 15 minuti a 4°C con un anticorpo bloccante, il 24G2. Esso è diretto contro il recettore per la porzione costante delle immunoglobuline, ed è utile al fine di impedire eventuali legami aspecifici dei reagenti che si useranno nei passaggi successivi. In questo test vengono usati come controllo positivo gli splenociti di topi transgenici, gli OT-1-B6, ovvero topi i cui linfociti T CD8 esprimono tutti il TCR specifico per il peptide OVA.
- ❖ Il test prosegue incubando le cellule per 45 minuti a 4°C con i pentameri (Proimmune, Oxford, UK), costituiti da complessi monomerici di K^b-SIINFEKL (MHC-I-peptide OVA) o di K^b-SSYSYSSL (MHC-I-peptide irrilevante di controllo negativo) assemblati e marcati con ficoeritrina.
- ❖ I campioni sono incubati per 15 minuti a 4°C con un anticorpo anti CD8+ α -PECyrome5, specifico per l'antigene CD8 di membrana. Successivamente i campioni vengono lavati con una soluzione contenente PBS BSA 0,5%, Sodio Azide 0,02%, EDTA 2 mM.
- ❖ Dopo fissazione (metanolo al 30% e paraformaldeide 0,4% in PBS), i campioni vengono analizzati al citofluorimetro, considerando la popolazione dei linfociti T CD8+ ed acquisendo 50000 eventi per campione.

2.6 Analisi Statistiche

Tutti i dati presentati nel lavoro sono stati analizzati per la loro significatività statistica, usando il t-Test di Student. Le differenze tra i vari gruppi considerati vengono considerate significative se il $p < 0.05$.

3. RISULTATI

3.1 Immunogenicità di fagi veicolanti epitopi T CTL e helper

Al fine di valutare *in vivo* l'immunogenicità dei batteriofagi ibridi, e quindi la loro capacità di indurre da parte dei linfociti T CD8+ risposte antigene-specifiche, sono stati preparati batteriofagi singoli e doppio ibridi :

- **fdOVA** esprime il peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) derivato dall'ovalbumina di siero bovino, che è un epitopo CTL ristretto H2-K^b.
- **fdHBVc** esprime il peptide HBVc₁₂₈₋₁₄₀ (TPPAYRPPNAPIL) derivato dal Core Antigenico del Virus dell'Epatite B, che è un epitopo helper I-A^b ristretto

In seguito a sequenza amminoacidica all'N-terminale è stato determinato il numero di copie di pVIII modificate rispetto alle wild-type.

Per i costrutti singoli ibridi la sequenza ha mostrato che circa il 20-30% delle pVIII sono ricombinanti corrispondenti a 540-810 copie di proteina, corrispondenti a 1.3 µg di peptide OVA e 5.8 µg di peptide HBVc, mentre per i costrutti doppio ibridi si hanno valori dell' 8-10%, corrispondenti a 220-270 copie OVA.

Sono stati effettuati quattro gruppi di esperimenti utilizzando le diverse formulazioni fagiche in combinazione con i vari adiuvanti. Sono stati immunizzati sei topi C57BL6/J, per ciascun gruppo, secondo un protocollo che prevede due somministrazioni antigeniche, a distanza di due settimane.

In particolare i topi sono stati inoculati con:

- 140 µg di fago doppio ibrido fdOVA/HBVc (esprime 1.3 µg di peptide OVA e 3.5 µg di peptide HBVc) in presenza di adiuvante di Freund Completo e Incompleto a livello sottocutaneo.
- Miscela di fagi singoli ibridi, contenente 50 µg di fdOVA e 140 µg di fdHBVc (esprime 1.3 µg di peptide OVA e 5.8 µg di peptide HBVc) in presenza di adiuvante di Freund Completo e Incompleto a livello sottocutaneo

- 140 µg di fago doppio ibrido fdOVA/HBVc (esprimente 1.3 µg di peptide OVA e 3.5 µg di peptide HBVc) in presenza di adiuvante PolyI:C somministrato a livello intraperitoneale.
- Miscela di fagi singoli ibridi, contenente 50 µg di fdOVA e 140 µg di fdHBVc (esprimente 1.3 µg di peptide OVA e 5.8 µg di peptide HBVc) in presenza di adiuvante PolyI:C somministrato a livello intraperitoneale.

Ulteriori gruppi sono costituiti dai controlli negativi, ovvero topi non trattati o inoculati con 140 µg del solo carrier fdwt in presenza dei due adiuvanti, secondo lo stesso protocollo di immunizzazione. Dopo due settimane dal secondo inoculo i topi sono stati sacrificati, e si è proceduto all'espanto della milza, seguita da ristimolazione in vitro degli splenociti e analisi delle risposte specifiche per il peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ sia in citotossicità che in ELISPOT.

Nella figura 3 è stato considerato un topo rappresentativo di ciascun gruppo e viene mostrata la risposta citotossica dei linfociti T CD8+, valutata in termini di percentuali di cellule target lisate ai diversi rapporti di *responder/target* piastrati. In particolare nei pannelli A e B sono presentati i dati relativi ai topi inoculati con adiuvante di Freund mentre in C e D quelli con PolyI:C.

Nei pannelli A e C sono mostrate le curve relative alle risposte citotossiche specifiche per i *target* EL4T prepulsati con il peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄; i dati sono stati opportunamente sottratti dei valori delle eventuali lisi aspecifiche registrate nei confronti delle EL4T non pulsate con il peptide.

Nei pannelli B e D si possono osservare i dati delle reazioni allogeniche, effettuate per testare, dopo ristimolazione in vitro con cellule di topi Balb/c, la capacità degli stessi splenociti di reagire nei confronti delle P815, che sono cellule *target* con un diverso MHC-I.

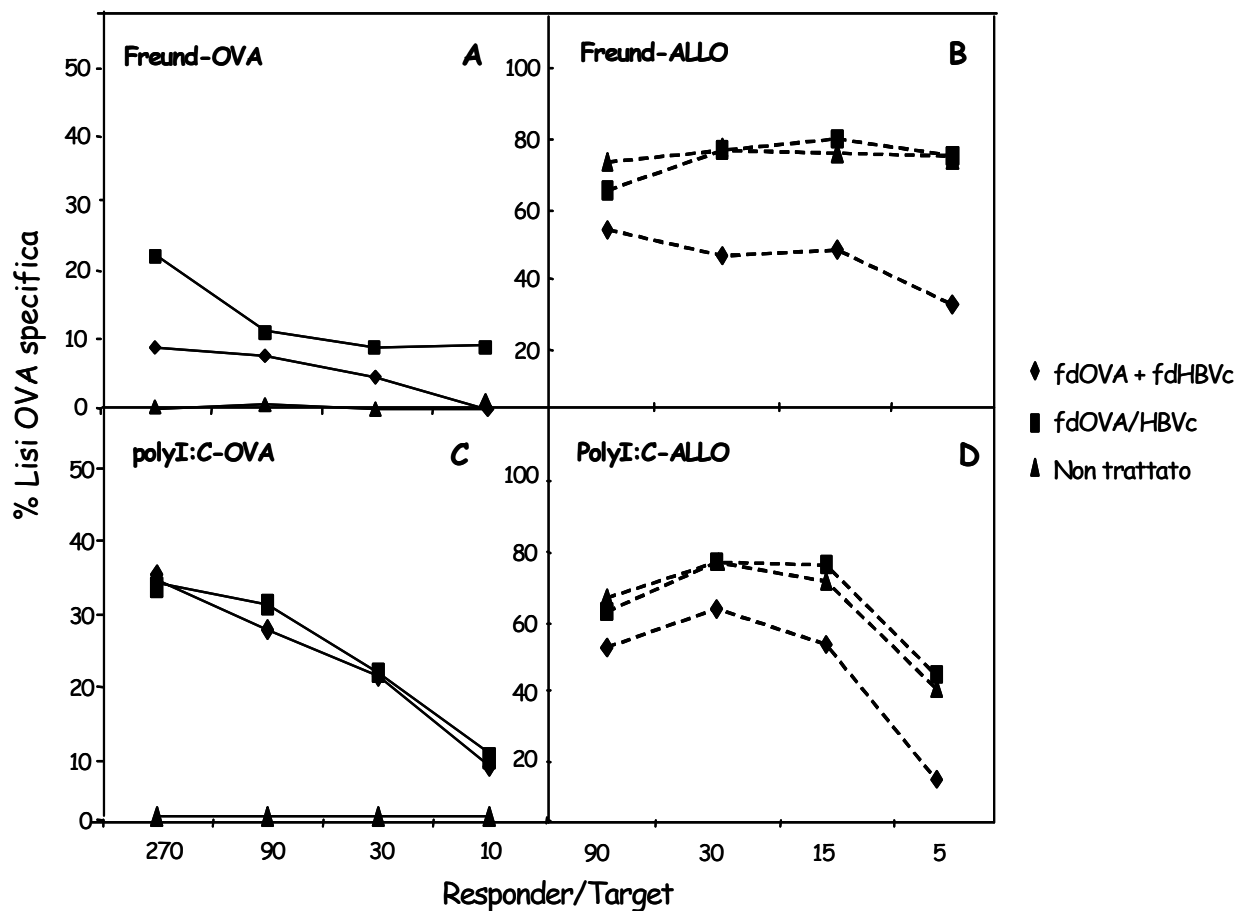


Figura 3: Risposta citotossica antigene-specifica e allogena dei linfociti T CD8+.

Nella figura è mostrato un esperimento rappresentativo per ciascun gruppo di sei topi, immunizzati rispettivamente con fdOVA + fdHBVc (♦) e fdOVA/HBVc (■) e confrontati con topi non trattati (▲). I fagi sono stati inoculati con adiuvante di Freund (pannelli A e B) o con PolyI:C (pannelli C e D). Per ciascun topo la risposta citotossica specifica per il peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (linea continua nei pannelli A e C) e quella allogena (linea tratteggiata nei pannelli B e D) è espressa sull'asse delle ordinate come percentuale di lisi dei target, dopo sottrazione dei valori di lisi aspecifica dei target non pulsati. Sull'asse delle ascisse sono riportati i rapporti *responder/target* piastrati.

Nella figura 4A sono raggruppati i dati di citotossicità ottenuti da ciascun gruppo di sei topi C57BL6/j trattati con i fagi doppi ibridi fdOVA/HBVc o con la miscela di fagi fdOVA + fdHBVc, non immunizzati o trattati con il solo carrier fdwt, con adiuvante CFA/IFA.

Gli splenociti di questi topi, sono stati piastrati al rapporto *responder/target* di 270:1, ed i valori di lisi specifica per il peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄, sottratti dell'eventuale lisi del *target* non pretrattato con il peptide sono mostrati sull'asse delle ordinate. Ogni simbolo riportato rappresenta un topo e sono indicati i valori medi ottenuti per ciascun gruppo. Inoltre i valori ottenuti dall'analisi statistica sono stati calcolati per ciascun gruppo rispetto ai topi non trattati.

I dati indicano che i due gruppi di topi mostrano una risposta CTL antigene specifica paragonabile, confrontati con i topi di controllo che sono negativi.

La figura 4B mostra i risultati del test ELISPOT, in cui gli splenociti degli stessi topi sono stati analizzati per la loro capacità di produrre IFN- γ . Le cellule derivate dai topi immunizzati sono state mantenute in coltura per 40 ore in presenza di APC pretrattate e non con OVA₂₅₇₋₂₆₄, in modo da poter valutare in seguito alla ristimolazione la produzione della citochina. Il numero delle cellule che produce spots per milione di linfociti (IFN- γ SCF/milione di cellule) è riportato sull'asse delle ordinate, ed ogni simbolo rappresenta gli spots ottenuti da ciascun topo. Nel pannello 4C sono inoltre riportati, relativamente a tutti i topi testati in ELISPOT i controlli negativi e positivi, costituiti rispettivamente dagli splenociti incubati con il solo mezzo di coltura o con un mitogeno quale la concanavalina A. Nel grafico è possibile visualizzare valori medi relativi a ciascun gruppo di topi, che indicano una buona risposta in termini produzione di interferone e con valori p significativi rispetto ai topi non immunizzati (vedi figura). Inoltre confrontando i valori di ELISPOT ottenuti per il gruppo trattato con la miscela di fagi singoli ibridi rispetto al doppio ibrido, si ottiene un valore di $p=0.052$ indicando che la prima formulazione antigenica immunizza i topi in maniera più efficace.

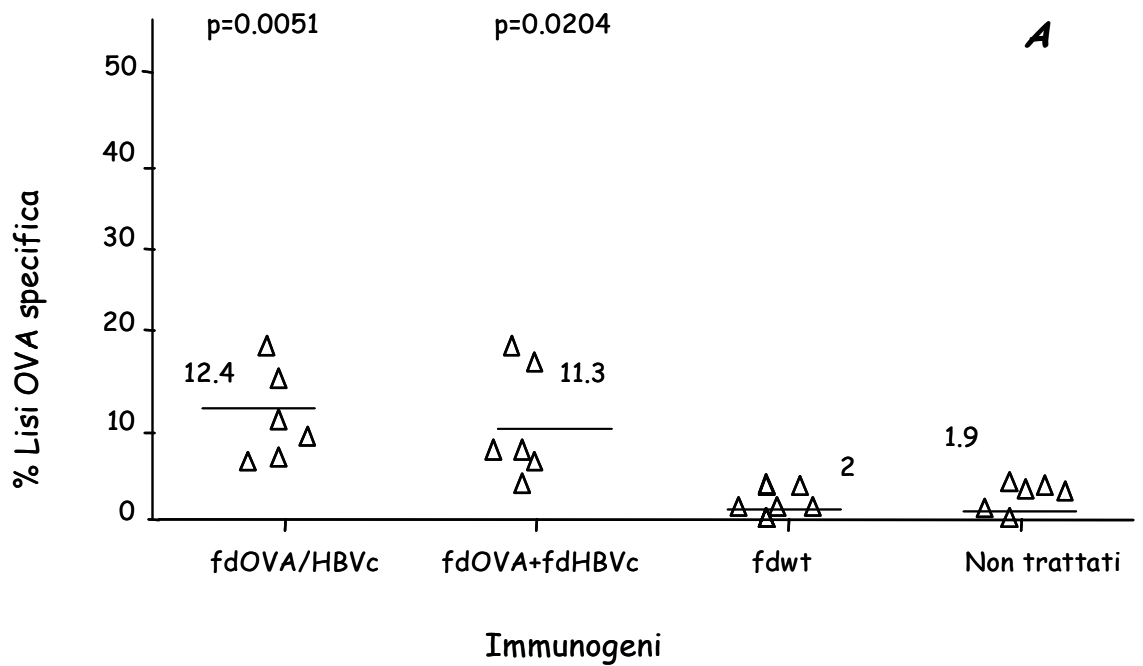
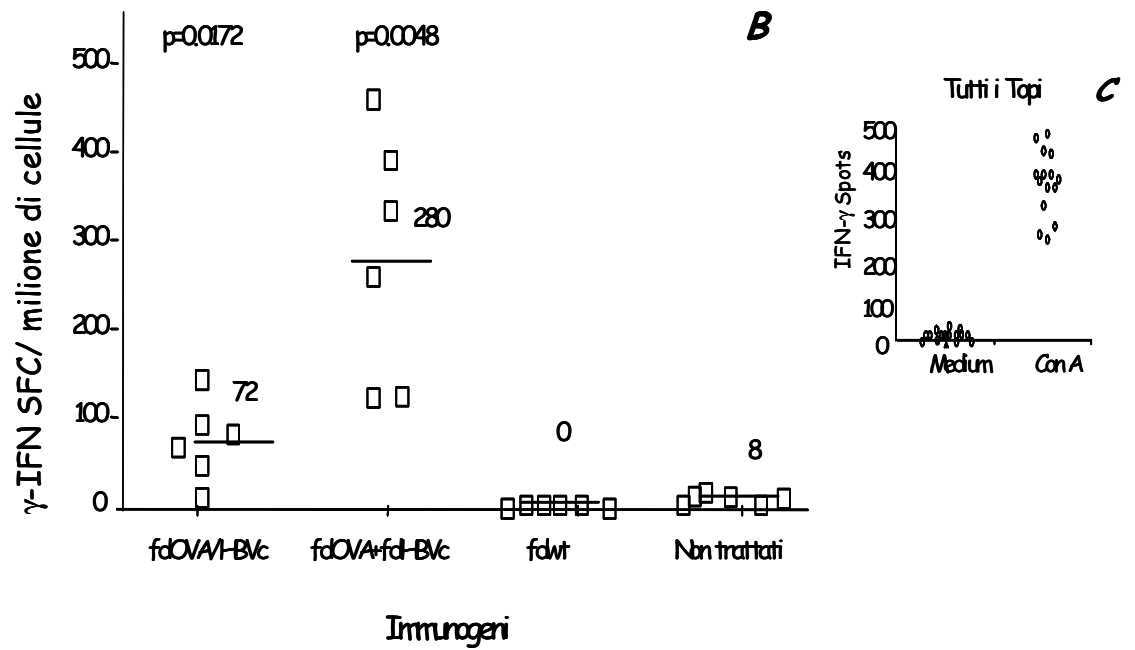


Figura 4: Risposta di CD8+ antigene-specifica, derivati da topi immunizzati con fagi ricombinanti in presenza dell'adiuvante di Freund.

I topi sono stati trattati con due iniezioni di fdOVA/HBVc o con fdOVA + fdHBVc in presenza di adiuvante di Freund. A destra, nei pannelli A e B, sono mostrati due gruppi di topi di controllo, rispettivamente non immunizzati o inoculati con il solo fdwt.

Pannello 4A. Test di citotossicità. Sull'asse delle y sono mostrate le percentuali di lisi specifiche per OVA₂₅₇₋₂₆₄, dopo sottrazione del background relativo ai target non pre-pulsati con il peptide, questi dati si riferiscono al rapporto Responder/Target 270:1. Ogni simbolo rappresenta la lisi ottenuta da ogni singolo topo. In grafico sono riportati i valori medi di ogni gruppo e i valori di p relativi all'analisi statistica fatta confrontando ogni gruppo di topi con quelli di controllo negativo.



Pannello 4B. Test ELISPOT. Sull'asse delle y è riportato il numero delle cellule formanti spots (SFC) di IFN- γ specifici per OVA₂₅₇₋₂₆₄ per milione di linfociti.

Ogni simbolo rappresenta gli spots ottenuti dai singoli topi, dopo sottrazione del background relativo alle APC non pre-pulsate con il peptide.

Nei grafico sono riportati i valori medi di ogni gruppo e i valori di p relativi all'analisi statistica fatta confrontando ogni gruppo di topi con quelli di controllo negativo.

Pannello 4C. Sono riportati i controlli negativi e positivi relativi a tutti i topi mostrati

Parallelamente all'esperimento mostrato, altri gruppi di sei topi sono stati immunizzati con gli stessi antigeni ma in presenza di PolyI:C come adiuvante, ed i risultati ottenuti in CTL ed ELISPOT sono raggruppati rispettivamente nei pannelli A e B della fig. 5. Sono state registrate percentuali di citotossicità peptide-specifiche, con valori medi del 18% e 42% (fig 5A) rispettivamente per i topi immunizzati con i fagi doppi ibridi e con la miscela di fagi singoli ibridi. Questi risultati sono confermati anche dai dati ottenuti in ELISPOT, mostrati in fig 5B. Anche per questi gruppi di topi i valori medi sono significativamente diversi da quelli dei topi non immunizzati come si evince dai valori di p riportati nelle figure). Attraverso l'analisi statistica ($p=0.002$ per la CTL e $p=0.012$ per l'ELISPOT) basata sul confronto tra il gruppo di topi immunizzati con la miscela e quelli trattati con il doppio ibrido, si evince che la prima è più efficace. Inoltre anche in questo esperimento, non sono detectabili risposte CTL antigene-specifiche quando gli splenociti analizzati derivino da animali non immunizzati o trattati con il solo carrier.

Utilizzando la metodica dei pentameri, è stato possibile caratterizzare la popolazione cellulare effettrice, attivata attraverso le immunizzazioni condotte con la miscela di fagi singoli ibridi (fdOVA + fdHBVc) in presenza di PolyI:C. Nella figura 7 è mostrato un topo rappresentativo degli esperimenti effettuati, in cui gli splenociti ex vivo sono stati opportunamente colorati con un anticorpo di topo anti-CD8+ α PE-Cyrome5 e con i pentameri OVA-pent-PE o con un pentamero coniugato con ficoeritrina ma specifico per un peptide irrilevante. Le percentuali di effettori specifici per OVA sono dello 0.1%, dopo aver sottratto opportunamente il background. Questi dati vanno confrontati con quelli relativi ai topi di controllo negativo e positivo, rappresentati rispettivamente da un animale non immunizzato e dalle cellule di un topo C57BL6/j non trattato e miscelato con lo 0.5% delle cellule di un topo OT-1, che essendo transgenico per il TCR ha tutti i linfociti T CD8+ specifici per OVA.

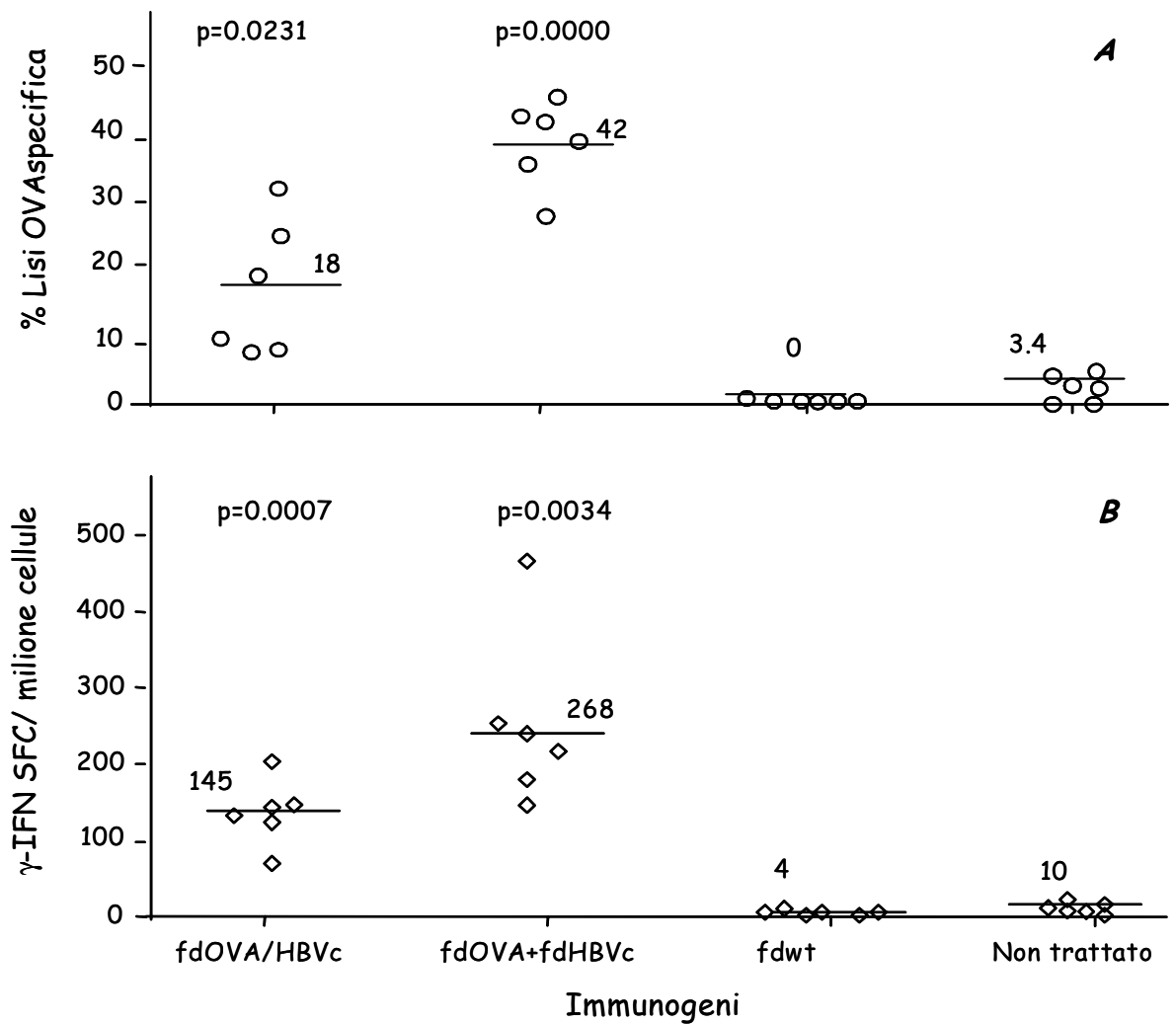


Figura 5: Risposta dei CD8+ antigene-specifica dei topi immunizzati con i fagi ricombinanti in presenza del PolyI:C adiuvante.

I topi sono stati immunizzati con due iniezioni di fdOVA/HBVc o con fdOVA + fdHBVc con il PolyI:C.

A destra in ciascun pannello sono mostrati i topi non trattati o inoculati con il solo fdwt.

Pannello 5A. Test di Citotossicità. Sull'asse delle y sono mostrate le lisi specifiche per OVA₂₅₇₋₂₆₄, dopo sottrazione del background relativo ai target non pre-pulsati con il peptide, i dati si riferiscono al rapporto Responder/Target 270:1. Ogni simbolo rappresenta la lisi ottenuta da ogni singolo topo.

Pannello 5B. Test ELISPOT. Sull'asse delle y è riportato il numero delle cellule formanti spots (SFC) di IFN-γ specifici per OVA₂₅₇₋₂₆₄ per milione di linfociti. Ogni simbolo rappresenta gli spots ottenuti dai singoli topi, dopo sottrazione del background relativo alle APC non pre-pulsate con il peptide.

Nei grafici sono riportati i valori medi di ogni gruppo ed i valori di p relativi all'analisi statistica fatta confrontando ogni gruppo di topi con quelli di controllo negativo.

3.2 Uso del fago singolo ibrido fdOVA per indurre risposte CTL

E' stata analizzata la capacità di indurre efficaci risposte CTL, da parte dei costrutti fagici veicolanti il solo peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ in assenza dell'epitopo T helper esogeno. A tale scopo sono stati immunizzati gruppi di cinque topi con due iniezioni intraperitoneali di fdOVA in presenza di PolyI:C, con diverse concentrazioni di antigene: quali 30, 50 e 140 µg, alle quali corrispondono rispettivamente 0.84, 1.35, 3.8 µg di peptide OVA veicolato sul fago.

Dopo due settimane dall'ultimo stimolo i topi sono stati sacrificati e gli splenociti testati per la loro capacità di dare risposte OVA₂₅₇₋₂₆₄ specifiche. Nella figura 6 sono riportati i risultati del test di citotossicità, visualizzabili nel pannello 6A, mentre in basso nel pannello B sono riportati i dati dell' ELISPOT. Per quanto concerne la citotossicità, è possibile osservare forti risposte dei CD8+, anche in assenza di HBVc; inoltre tali risposte sono dose-dipendenti. Infatti la percentuale di lisi aumenta con la quantità di fago e quindi di peptide OVA somministrato, fino a raggiungere un picco del 36.84% quando si usano 140 µg di fago. Osservando il pannello 6B in basso dove sono riportati i dati dell'ELISPOT si deduce che le frequenze medie delle cellule che producono IFN-γ correlano con le quantità di peptide OVA somministrato, come dimostrato in citotossicità. Tutti i risultati ottenuti sono significativi rispetto ai topi di controllo.

Gli splenociti ex vivo dei topi trattati con il solo fdOVA sono stati analizzati anche con la tecnica dei pentameri, e nella figura 7 è riportato un topo rappresentativo. Naturalmente anche in questo caso le cellule sono state colorate con un anticorpo anti-CD8+α-PECyrome5 e con OVA-pent-PE o ctrl-pent-PE. La percentuale dei CD8 specifici per OVA è dello 0.12% dopo aver sottratto il background. In conclusione è possibile affermare che i batteriofagi pur veicolando il solo peptide citolitico OVA, in assenza dell'helper esogeno (HBVc) sono in grado di indurre elevate produzioni di IFN-γ e forti risposte CTL, che sono dose dipendenti.

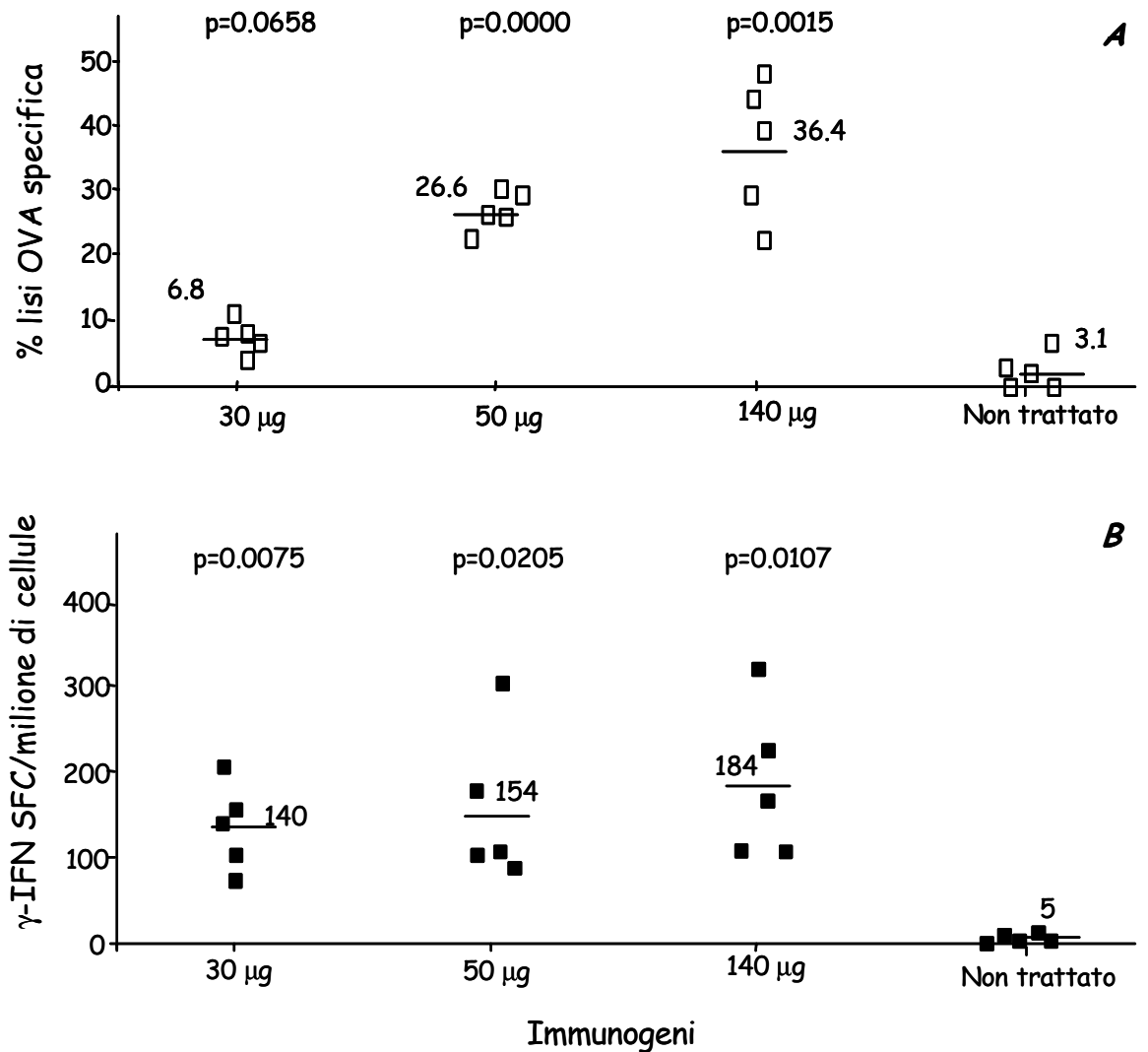


Figura 6: Risposta delle cellule T CD8+ antigene specifica dopo immunizzazione con fdOVA.

I topi sono stati inoculati due volte con fdOVA più PolyI:C come adiuvante.

Pannello A. Test di citotossicità.

Pannello B. Test ELISPOT.

Ciascun gruppo di topi ha ricevuto diverse quantità di fago fdOVA, come mostrato sull'asse delle x.

Inoltre nelle figure sono mostrate le medie relative ad ogni gruppo e i valori di p ottenuti confrontando ciascun gruppo di topi immunizzati con il gruppo dei topi non trattati.

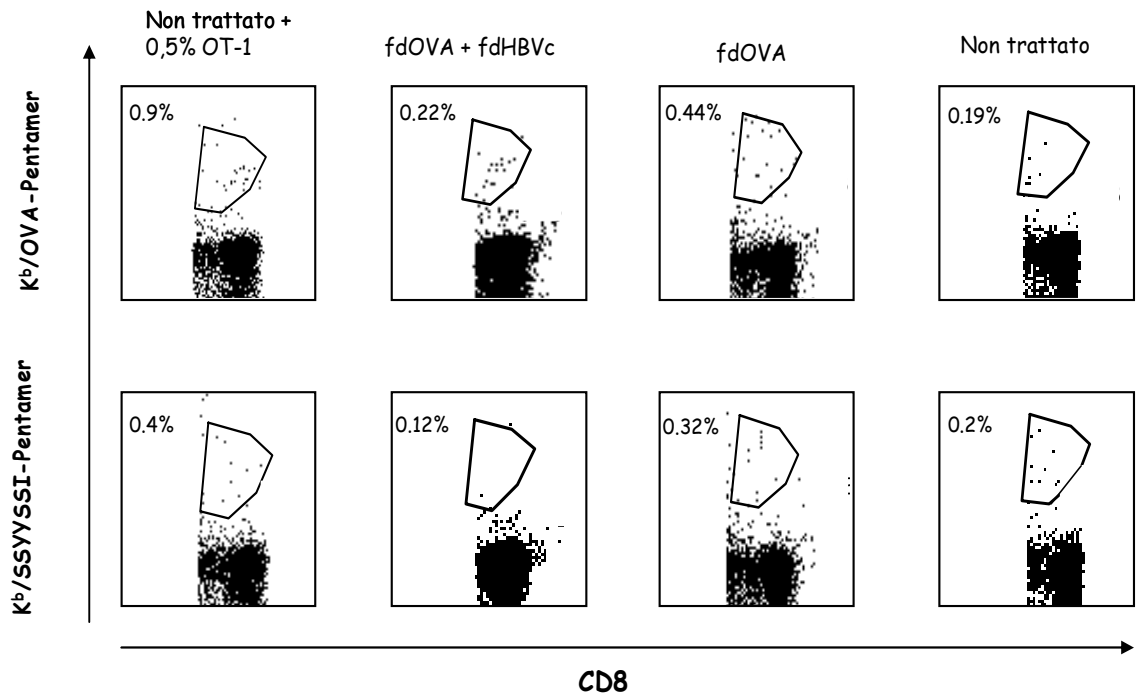


Figura 7: Colorazione con i pentameri degli splenociti derivati dai topi immunizzati.

I dot plots rappresentano le analisi citofluorimetriche degli splenociti colorati con un anticorpo anti CD8+ α -PE-Cy5, mostrato sull'asse delle x, e con i pentameri OVA-pent-PE o ctrl-pent-PE, visualizzabile sull'asse delle y. I valori mostrati indicano le percentuali dei linfociti CD8+ positivi per il peptide OVA individuati nella regione mostrata. I topi immunizzati con la miscela o con il fago fdOVA, somministrati con PolyI:C, vanno confrontati con il controllo negativo mostrato a destra e quello positivo rappresentato a sinistra dalle cellule di un topo B6 non trattato e miscelato con lo 0.5% delle cellule di un topo OT-1

3.4 Risposte a lungo termine dei linfociti T CD8+ antigene-specifici

Al fine di valutare se il batteriofago filamentoso sia in grado di indurre linfociti T CD8+ a lungo termine, capaci di rispondere rapidamente ed efficientemente ad una riesposizione tardiva allo stesso antigene, sono stati immunizzati gruppi di quattro topi, con due iniezioni intraperitoneali a intervalli di quindici giorni, con una miscela di fagi singoli ibridi (50 µg fdOVA + 50 µg fdHBVc) o con il solo fago fdOVA (50 µg) con PolyI:C.

In questo esperimento i topi sono stati sacrificati dopo due mesi dall'ultimo stimolo per stabilire se una risposta citotossica antigene specifica fosse visualizzabile anche a lungo termine. I dati di citotossicità mostrati nella figura 8, validano l'ipotesi formulata, poiché si osserva che gli splenociti specifici per OVA₂₅₇₋₂₆₄ ristimolati in vitro, persistono nella milza dei topi trattati con le due formulazioni vacciniche anche dopo due mesi dall'immunizzazione. Questi risultati sono confermati dai dati ottenuti dalla colorazione degli splenociti, ristimolati in vitro con il peptide OVA, con un anticorpo anti-CD8+PE-Cycrome5 e con OVA-pent-PE o ctrl-pent-PE. Infatti nella figura 9 è mostrato il dot plot rappresentativo di uno dei quattro topi per gruppo analizzati. Le percentuali di cellule specifiche per OVA ottenute, dopo sottrazione del background, sono dello 0.71% nel caso in cui si consideri il topo trattato con il solo fdOVA, mentre è dello 0.17% per il topo inoculato con la miscela di fagi.

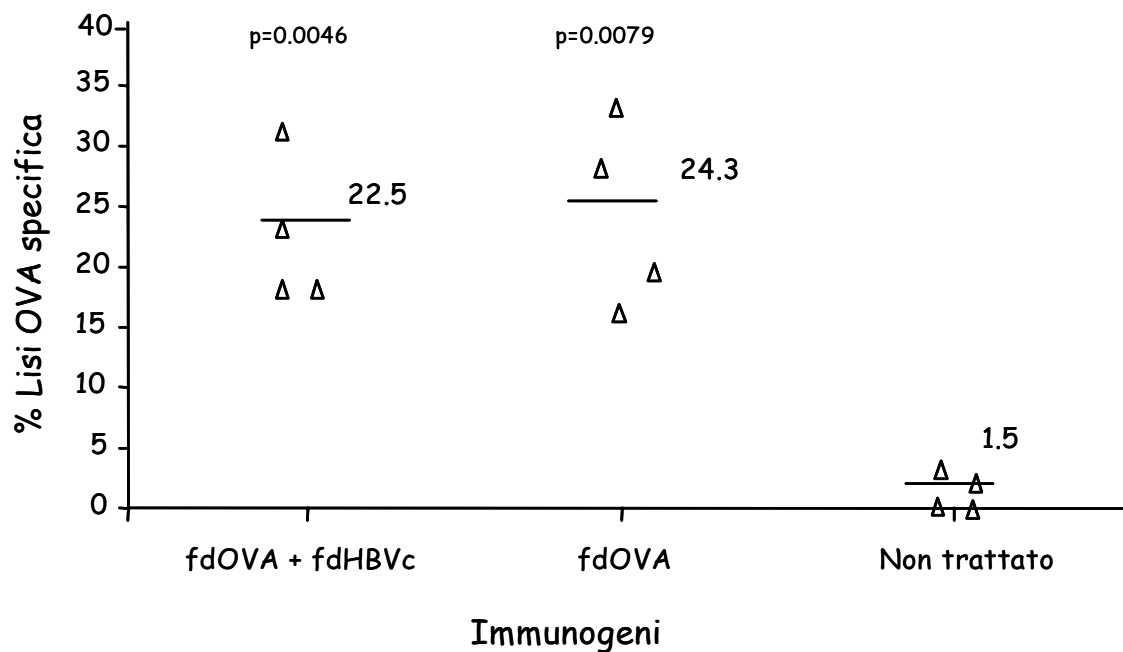


Figura 8: Citotossicità antigene specifiche a lungo termine dopo immunizzazione con fagi ricombinanti in presenza di PolyI:C come adiuvante.

I topi sono stati trattati con due iniezioni di miscela di fagi o con il solo fdOVA con il PolyI:C; dopo due mesi dall'ultimo inoculo i topi sono stati sacrificati e sono gli splenociti sono stati testati per stabilire la loro risposta citotossica antigen-specifica.

Sull'asse delle y sono riportate le percentuali di lisi $OVA_{257-264}$ specifiche. I dati sono stati sottratti del background relativo alla lisi aspecifica dei target non pulsati con il peptide e sono relativi al rapporto Responder/Target 270:1.

Ciascun simbolo corrisponde alla lisi ottenuta per ogni topo. In grafico sono riportati i valori medi di ogni gruppo e i dati del p, ottenuti confrontando ogni gruppo con quello non trattato.

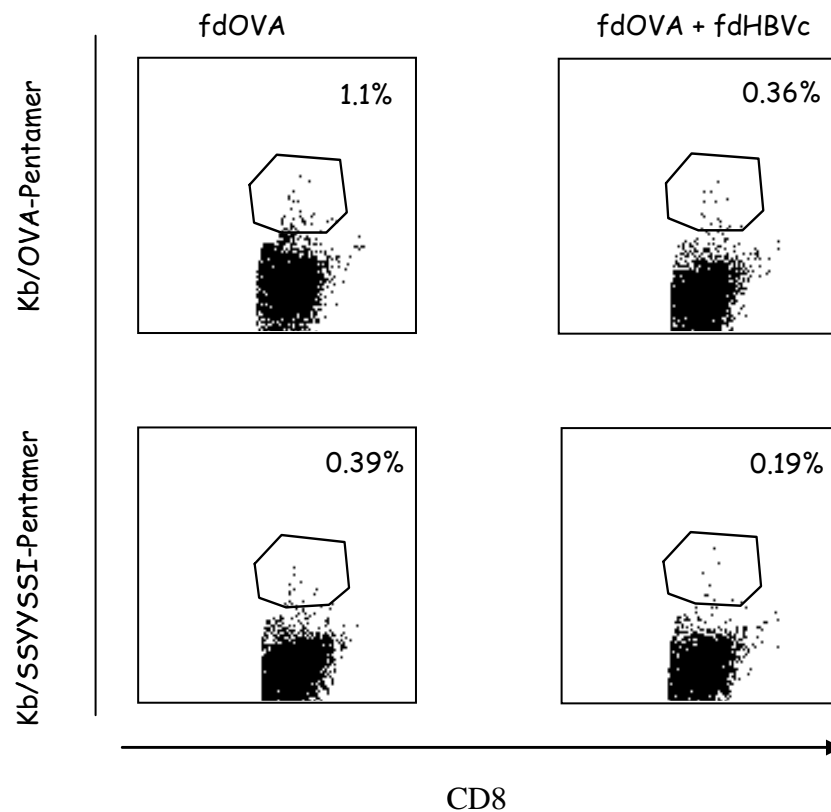


Figura 9: Colorazione con i pentameri degli splenociti derivati dai topi analizzati a lungo termine.

Nella figura sono rappresentati i dot plots delle analisi citofluorimetriche effettuate sugli splenociti ristimolati in vitro.

Le colorazioni sono state fatte con un anticorpo anti-CD8+ α -PE-Cy5 (asse delle x) e con i pentameri OVA-pent-PE o con ctrl-pent-PE (asse delle y). Le scale sugli assi x e y sono logaritmiche, ed è stata scelta una unità arbitraria. I numeri rappresentano le percentuali di cellule nella regione di CD8+ che sono positive per i pentameri.

4. DISCUSSIONE

Una problematica ancora oggi aperta riguarda l'elaborazione di vaccini efficaci nel prevenire infezioni virali o tumori, ed in tal senso numerosi sono gli studi in corso che mirano a superare le limitazioni dei vaccini classici che risultano essere poco efficaci e tossici. Una particolare attenzione è posta alla ricerca sui "T cell vaccine" vaccini che stimolano una risposta immune cellulare mediata dai linfociti CD8+ e CD4+. Esistono diversi tipi di vaccini in grado di stimolare una risposta citotossica. Vaccini vivi attenuati (batteri o virus), vaccini basati su vettori ricombinanti capaci o meno di replicarsi (batteri o virus), vaccini a DNA sono generalmente in grado di produrre antigeni estranei nelle cellule dell'ospite che poi sono processati e presentati in associazione con l'MHC di classe I.

Infatti esiste una forte limitazione all'uso di vaccini basati su peptidi sintetici antigenici esprimenti epitopi T, a causa del fatto che queste preparazioni non sono molto stabili e sono poco immunogeniche. Inoltre anche l'uso di vaccini basati su proteine risulta limitato dal fatto che si tratta di preparazioni solubili che sono preferenzialmente processate secondo il pathway che porta alla presentazione da parte dell'MHC-II.

Esistono tuttavia alcuni tipi di carrier molecolari, sia solubili che corpuscolati, che possono esprimere o veicolare epitopi immunodominanti o proteine antigeniche appartenenti ad un patogeno o prodotte nel corso di una trasformazione neoplastica che sono in grado di essere *crosspresentati* e quindi di produrre in seguito al processamento sia peptidi presentati in associazione con le molecole MHC di classe I che di classe II. (28).

In linea con l'attuale ricerca sui vaccini è il lavoro oggetto di questa tesi, in cui viene proposto l'uso del "*phage display*", una biotecnologia innovativa considerata all'avanguardia sia ai fini diagnostici che ai fini terapeutici, che consente di ingegnerizzare il DNA del batteriofago filamentoso per produrre particelle carrier esprimente peptidi esogeni (13). Dati di letteratura dimostrano che il fago pur essendo un antigene esogeno può essere captato e cross-processato dalle APC, quali macrofagi e cellule dendritiche, (20, 16, 17), sia secondo il pathway degli antigeni esogeni che quello degli antigeni endogeni (15, 18).

E' stato dimostrato che il meccanismo di cross-presentazione delle particelle fagiche ha inizio nell'endosoma, dove subiscono una degradazione iniziale, e successivamente i peptidi che ne derivano vengono traslocati nel citoplasma. A questo punto essi sono ricondotti indietro nel lume del fagosoma, dove vengono caricati sull'MHC di classe I attraverso un meccanismo TAP-dipendente. (19,29) come è rappresentato nella figura 10. E' dimostrato quindi che, durante la cross-presentazione del fago, complessi MHC-II-peptide sono generati negli organelli citoplasmatici tipici del pathway degli antigeni endogeni. Questa caratteristica gli consente di veicolare peptidi helper e citotossici e di indurre attivazione sia dei linfociti CD4 che CD8.

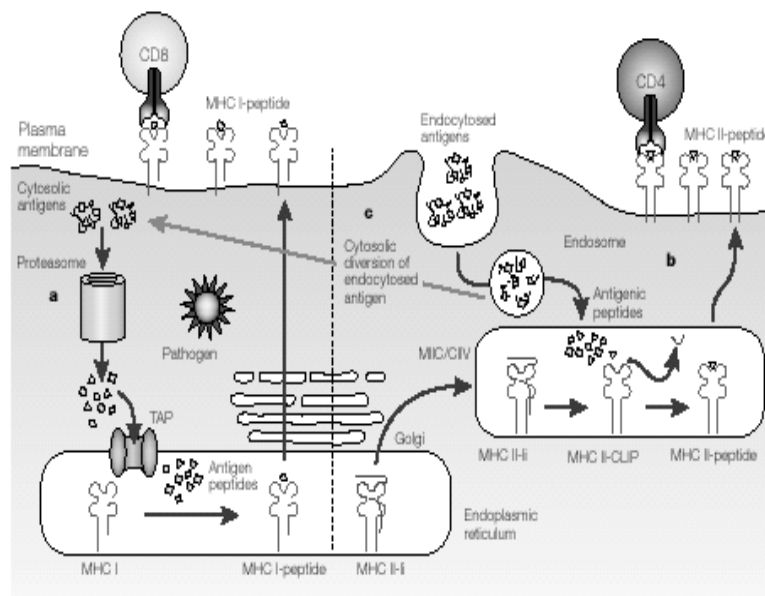


Figura 10: Rappresentazione schematica dei pathway associati all'MHC-I e II seguiti da antigeni endogeni ed esogeni, e della cross-processazione di antigeni di natura extracellulare come il batterifago filamentoso.

Molti lavori hanno preso in considerazione l'uso del fago come carrier, infatti è descritto in letteratura che, sfruttando virioni doppi ibridi, veicolanti contemporaneamente epitopi T helper e B, si possono attivare delle risposte cellulari mediate dai linfociti T CD4+ ed evocare risposte umorali con produzione di anticorpi ad alto titolo e neutralizzanti e (23, 15, 30)

Parallelamente e' stato dimostrato che fagi veicolanti sia epitopi T helper che citotossici, derivati dalla Trascrittasi Inversa (RTAse) del virus HIV-1, sono in grado di evocare risposte citotossiche (21) efficaci in esperimenti *in vivo* su topi transgenici HLA-A2 e di attivare linfociti umani di sangue periferico (PBL), di donatori HLA-A2, effettuando sia un priming che un'espansione delle linee CD8. (22) L'efficacia nell'indurre risposte citotossiche e' stata anche dimostrata da altri autori (33) nei confronti di epitopi tumorali e di epitopi del virus dell'epatite B (32)

L'uso del fago permette di realizzare reagenti a basso costo, non patogeni perchè incapaci di replicarsi in organismi superiori e privi di tossicità se iniettati in modelli animali. I costrutti fagici possono esporre in superficie peptidi esogeni come proteine di fusione all'N-terminale pVIII, una proteina di 50 residui a.a., che rappresenta con le sue 2700 copie il costituente maggiore dell'involucro proteico del virione (14, 15). Esiste però un limite alla lunghezza dei peptidi esprimibili sui fagi, infatti peptidi di 10-16 amminoacidi provocherebbero una destabilizzazione della struttura capsidica se tutte le copie della pVIII fossero modificate. Il problema é stato superato costruendo fagi ibridi che contengono, mescolate sul rivestimento, copie "wild-type" e copie chimeriche della proteina pVIII, che possono essere generati dall'espressione simultanea dei geni codificanti la proteina "wild type" e quella modificata nella stessa cellula di *E. coli*. Questa metodica consente di realizzare formulazioni vacciniche multiepitopiche, poiché è possibile esprimere su una stessa particella virale due diversi peptidi, realizzando costrutti doppio ibridi o miscelare preparazioni di fagi singoli ibridi, in cui siano espresse in combinazione tra loro due sequenze esogene differenti. Di conseguenza ciascuna particella fagica esprimerà sulla sua superficie un elevato numero di copie di peptide esogeno che trovandosi

all'estremità N-terminale della proteina pVIII e quindi non inserito in una struttura terziaria, potrà assumere una molteplicità di conformazioni tra cui quella che esso assume nell'ambito della proteina nativa cui appartiene. Inoltre le sequenze dei peptidi che si vogliono esprimere devono essere compatibili con le esigenze di assemblaggio della struttura proteica e quindi non devono contenere cisteine, che possono formare ponti disolfuro e non devono essere particolarmente polari.

In questo lavoro sono stati usati costrutti fagici per indurre risposte citotossiche in un ceppo di topi wild-type C57BL/6j (30) in combinazione con diversi adiuvanti, al fine di investigare su quale sia la formulazione antigenica più efficace e in secondo luogo per valutare sia risposte citotossiche a breve termine che a lungo termine

I fagi sono stati somministrati in associazione con due adiuvanti diversi per comprendere quale sia il loro ruolo nell'ambito di questo sistema per l'innescamento delle risposte immuni. In generale gli adiuvanti vengono sfruttati per ottimizzare le condizioni di immunizzazione, poichè possono modulare il network delle citochine, sostenere per un periodo di tempo prolungato il mantenimento dell'antigene nella conformazione nativa e il suo rilascio graduale in circolo, possono inoltre favorirne l'immissione nei compartimenti intracellulari al fine di contribuire alla stimolazione dei linfociti T citotossici e al loro orientamento verso le cellule presentanti (25).

Gli adiuvanti usati sono quello di Freund's e il PolyI:C; quest'ultima è una molecola che mima l'RNA virale ed è capace di legare le molecole TLR3 di superficie determinandone una up-regolazione, stimolando in questo modo risposte immunitarie innate (26). Studi precedenti inoltre hanno dimostrato che esso è un adiuvante efficace nell'indurre priming dei linfociti T CD8 (27) e produzione di citochine e chemochine proinfiammatorie.

Le formulazioni fagiche utilizzate sono costituite dalla miscela fdOVA + fdHBVc o dal fago doppio ibrido fdOVA/HBVc, che veicolano il peptide citolitico e quello helper rispettivamente su due diverse particelle fagiche o su uno stesso virione. In particolare in entrambi i costrutti sono presenti 1.3 µg di peptide OVA, quindi piccole quantità che comunque sono sufficienti per indurre

buone frequenze di linfociti T CD8+ OVA-specifici, come dimostrato dalla colorazione con i pentameri. La bassa quantità di peptide veicolato avvalorava il concetto dell'elevato potenziale immunogenico del fago come carrier, dal momento che per ottenere dati paragonabili di risposte citotossiche, come produzione di IFN- γ e come lisi di un *target* specifici, in test effettuati con i soli peptidi, sarebbero necessarie dosi di peptidi 40 volte maggiori rispetto a quelle veicolate dal fago.

Inoltre, confrontando le due formulazioni vacciniche proposte, è stata ottenuta una risposta maggiore inoculando i topi con la miscela piuttosto che con il fago doppio ibrido, ciò probabilmente è da attribuirsi alla maggiore quantità di carrier che essa contiene che potrebbe svolgere un ruolo di adiuvante, ed indurre infiammazione e stimolazione dei recettori Toll-like. La dimostrazione che anche il fago doppio ibrido sia efficace, anche se in misura minore, nell'indurre risposte citotossiche peptide specifiche ci consentirà di realizzare formulazioni vacciniche multiepitopiche, esprimendo su una stessa particella virale due diversi peptidi CTL e mescolando diverse preparazioni di fagi doppi ibridi.

Nel lavoro illustrato è stata anche dimostrata la capacità dei fagi singoli ibridi fdOVA di indurre risposte CD8+ indipendentemente dalla presenza dell'epitopo helper esogeno.

La quantità di peptide CTL presente (0.84, 1.4, e 3.8 μ g) sul fago influisce sull'entità della risposta dei CD8+, ma probabilmente anche la struttura del capsido contiene epitopi T helper che coadiuvano la risposta citolitica, come già è stato descritto in letteratura relativamente alla produzione degli anticorpi (24).

Dunque confrontando i vari gruppi di topi immunizzati con la miscela o con il doppio ibrido ed osservando i dati relativi alla titolazione di fdOVA, potremmo affermare che si riscontra un aumento della risposta quando viene utilizzato una maggiore quantità di fago dovuto ai suoi epitopi helper o al suo effetto adiuvante generale.

Il dato più importante e nuovo è tuttavia quello relativo all'induzione di una risposta CD8 a lungo termine. Infatti due inoculi della dose intermedia di fdOVA, ovvero 50 μ g, somministrato con il PolyI:C sono sufficienti ad indurre memoria immunitaria in assenza di un helper esogeno. Rimane da comprendere

quale sia effettivamente il ruolo del PolyI:C nel determinare la memoria dei CD8 e la sua cinetica e per questo sono attualmente in corso ulteriori studi, in linea con quanto è stato fatto per altri adiuvanti (31).

Concludendo è possibile affermare che in questa tesi, come in precedenza altri lavori di letteratura (32) è stata dimostrata l'estrema versatilità del batteriofago filamentoso come carrier, ovvero sfruttando le caratteristiche sopra elencate del virione, tra cui il meccanismo di cross-priming si potrebbero realizzare formulazioni vacciniche non-living utili contro infezioni virali o tumori. Inoltre si possono realizzare vaccini multiepitoci, veicolanti dai quattro ai sei epitopi CTL differenti, grazie alla miscela di fagi singoli e doppio ibridi. Infine è stata dimostrata anche la sua elevata immunogenicità *in vivo*, dal momento che esso è in grado di indurre priming dei linfociti T CD8+ antigene-specifici e successivamente di sostenere forti risposte sia a breve che a lungo termine, condizione questa essenziale per l'elaborazione di un efficace carrier.

5. BIBLIOGRAFIA

- 1) Janewy C.A. Jr. and Ruslan Medzhitov.: Innate Immune recognition. *Annual review of immunology* (2002); 20:197-216.
- 2) Berke G.: The CTL's Kiss of Death. *Cell* (1995); 81: 9-12.
- 3) Zweerink H.J., Gammon M.C., Utz U., Sauma, S.J., Harrer T., Hawkins J.C., Johnson R.P., Sirotina A., Hermes J.D., Walker B.D., Biddson W.E.: Presentation of endogenous peptides to MHC Class I-restricted cytotoxic T lymphocytes in transport deletion mutant T2 cells. *J. of Immunol.* (1993); 150: 1763-71.
- 4) Ridge J.P, Di Rosa F., Matzinger P.: A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature* (1998); 393, 474-478.
- 5) Shoenberger S.P., Toes R., van der Voort E.I.H., Offringa R., Melief C.J.M.: T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* (1998); 393, 480-483.
- 6) Michael J. Bevan.: Helping the CD8+ T-cell response. *Nat. Rev. Immunology* (2004); 4:595-602.
- 7) Mintern J.D., Davey G.M., Belz G.T., Carbone F.R., Heath W.R.: The crossCutting edge: precursor frequency affects the helper dependence of cytotoxic T cells. *J.Immunol.* (2002); 168(3): 977-80.
- 8) Parretta E., Cassese G., Barba P., Santoni A., Guardiola J., Di Rosa F.: CD8 cell division maintaining cytotoxic memory occurs predominantly in the bone marrow. *J. Immunol.* (2005); 174(12): 7654-64.

- 9) Susan M. Kaech and Rafi Ahmed : Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nature Immunology* (2001); 2: 415-22.
- 10) Robinson Harriet L. & Rama Rao Amara.: T cell vaccines for microbial infections. *Nature medicine* (2005); 11(4 Suppl): S25-S32 Review.
- 11) Willis A.E., Perham R.N., Wright D.: Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous bacteriophage. *Gene* (1993); 128: 79-83.
- 12) O' Neil K.T., Hoess R.H.: Phage display protein engineering by direct evolution. *Curr. Opinion in Immunol.* (1996);8: 546-53.
- 13) Malik P., Terry T.D. and Perham R.N.: Multiple display of foreign peptide epitopes on filamentous bacteriophage virions, phage display of peptides and proteins. A laboratory manual edited by Kay B.K., Winter J. and McCafferty J.(1996);127-139.
- 14) Greenwood J., Willis A.E., Perham R.N.: Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from *Plasmodium falciparum* sporozoite protein as antigen. *J. Mol. Biol.* (1991), 220: 821-27.
- 15) Di Marzo Veronese F., Willis A.E., Boyer-Thompson C., Appella E., and Perham R. : Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage *J. Mol. Biol.* (1994);243: 167-172.
- 16) Ramirez M.C., Sigal L.J. The multiple routes of MHC-I cross-presentation. *Trends Microbiol.* (2004); 12(5): 204-7

- 17) Ramirez M.C., Sigal LJ. Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J. Immunol.* (2002); 169 (12): 6733-42.
- 18) Gaubin M., Fanutti C., Mishal Z., Durrbach A., De Berardinis P., Sartorius R., Del pozzo., Guardiola J., Perham RN., Piatier Tonneau D.: Processing of filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and II peptide loading compartments. *DNA Cell Biol*(2003); 22(1):11-8
- 19) Ying Wan, Yuzhang Wu, Jingran Zhou, Liyun Zou, Yunfei Liang, Jianping Zhao, Zhengcai Jia, Jan Engberg, Jiang Bian and Wei Zhou. : Cross-presentation of hage particle antigen in MHC class II and endoplasmic reticulum marker-positive compartments. *Eur. J. Immunol.* (2005); 35:2041-50.
- 20) M. Kovacsovics-Bankowski and K.L. Rock.: A phagosome-to-cytosol-pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* (1995): 267;243-45.
- 21) De Bernardinis P., Sartorius R., Fanutti C., Perham R.N., Del Pozzo G., Guardiola J.: Phage display of peptides from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nature Biotechnology* (2000); 18: 873-76.
- 22) Guardiola J., De Berardinis P., Sartorius R., Fanutti C., Perham R.N., Del Pozzo G.: Phage display of epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses in vitro and in vivo. *Adv. Exp. Med Biol.* (2001); 495: 291-8.
- 23) De Berardinis P., D'Apice L., Prisco A., Ombra M.N., Barba P., Del Pozzo G., Petukhov S., Malik P., Perham R.N., Guardiola J.: Recognition of HIV-derived B and T cell epitopes displayed on filamentous phages. *Vaccine*.(1999);17: 1434-41.

- 24) Perham RN., Terry TD., Willis AE., Greenwood J., Di Marzo Veronese F., Appella E.: Engineering a peptide epitope display system on filamentous bacteriophage *FEMS Microbiol Rev.*(1995); 17(1-2): 25-31.
- 25) Karla M. Lima, Sandra Aparecida dos Santos, José M. Rodrigues, Jr., Celio L. Silva. *Vaccine* (2004);22: 2374-79.
- 26) Nilsen N., Nonstad U., Khan N., Knetter C.F., Akira S., Sundan A., Espevik T., Lien E.: Lipopolysaccharide and double-stranded RNA up-regulate toll-like receptor 2 independently of myeloid differentiation factor 88. *J. Biol. Chem.* (2004); 279(38): 39727-35.
- 27) Patrick R. Burkett, Rima Koka, Marcia Chien, Sophia Chai, Faye Chan, Averil Ma and David L. Boone.: Il-5Ra expression on Cd8+ T cells is dispensable for T cell memory. *PNAS* (2003); 100:4724-29.
- 28) Polly Matzinger: The JAM test, a simple assay for DNA fragmentation and cell death. *Journal of Immunological Methods* (1991); 145: 185-192.
- 29) Shen L., Sigal L.J., Boes M., Rock K.L.: Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I cross-presentation in vivo. *Immunity* (2004); 21(2): 155-65.
- 30) Yang Q., Wang L., Lu D.N., Gao R.J., Son J.N., Hua P.Y., Yuan D.W.: Prophylactic vaccination with phage-displayed epitope of *C. albicans* elicits protective immune responses against systemic candidiasis in C57BL6/J mice. *Vaccine* (2005) 23(31); 4088-96.
- 31) Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A., Haring JS., Harty JT.: Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat. Med.* (2005); 11(7):748-56.

32) Wan Y., Wu Y., Bian J., Wang X.Z., Zhou W., Jia Z.C., Tan Y., Zhou L.: Induction of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes response in vivo by filamentous phage display vaccine. *Vaccine* (2001); 19(20-22): 2918-23.

33) Jimbo Fang, guiyun Wang, Qiong Yang, Jinna Song, Ye Wang, Li wang.: The potential of phage display virions expressing malignant tumor specific antigen MAGE-A1 epitope in murine model. *Vaccine* (2005); 23: 4860-66.

34) Brian K. Kay, Jill Winter, John Mc Cafferty.: Phage Display of Peptides and Proteins. *A Laboratory Manua.* (1996).l