

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PISA



Facoltà di Scienze Matematiche, Fisiche e Naturali  
Corso di laurea in Scienze e Tecnologie Biomolecolari

## TESI SPERIMENTALE IN VIROLOGIA

Allestimento di un saggio per la valutazione della risposta immunitaria cellulo-mediata nell'ambito di un protocollo di vaccinazione contro il virus dell'immunodeficienza felina

Relatori:

Chiar.mo Prof. Mauro Pistello

Chiar.mo Prof. Mauro Bendinelli

Candidata:

Francesca Conti

ANNO ACCADEMICO 2005/2006

*Ai miei genitori*

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b>	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>III</b>
<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</b>	
1.1 Meccanismi di risposta immunitaria citotossica	1
1.2 Saggi in vitro per la valutazione della risposta immunitaria cellulo-mediata	3
1.3 Meccanismi di induzione della risposta cellulo-mediata per il controllo delle infezioni virali	7
1.4 Impiego di modelli animali per lo sviluppo di strategie profilattiche contro l'infezione da HIV	12
1.5 Classificazione	13
1.6 Morfologia	14
1.7 Organizzazione del genoma	16
1.7.1 Long terminal repeat	17
1.7.2 Geni strutturali	18
1.7.3 Geni accessori	21
1.8 Ciclo vitale e replicazione	23
1.9 Epidemiologia	27

<b>1.10</b>	<b>Patogenesi</b>	<b>28</b>
<b>1.11</b>	<b>Diagnosi</b>	<b>30</b>
<b>1.12</b>	<b>Risposta immunitaria</b>	<b>30</b>
<b>1.13</b>	<b>Approcci vaccinali contro FIV</b>	<b>34</b>
<b>1.14</b>	<b>Progetto di vaccinazione in corso presso il Centro Retrovirus</b>	<b>36</b>

## **CAPITOLO 2: SCOPO DELLA TESI**

**38**

## **CAPITOLO 3: MATERIALI E METODI**

<b>3.1</b>	<b>Generazione di una linea di fibroblasti felini</b>	<b>39</b>
<b>3.2</b>	<b>Trasformazione dei fibroblasti primari</b>	<b>41</b>
<b>3.3</b>	<b>Produzione del vettore FIV e trasduzione dei fibroblasti</b>	<b>42</b>
<b>3.4</b>	<b>Propagazione dei plasmidi</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Estrazione dei plasmidi</b>	<b>45</b>
<b>3.6</b>	<b>Lettura allo spettrofotometro</b>	<b>46</b>
<b>3.7</b>	<b>Elettroforesi su gel di agarosio</b>	<b>47</b>
<b>3.8</b>	<b>Valutazione dell'efficienza di trasduzione</b>	<b>47</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Valutazione dell'espressione di GFP</b>	<b>47</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Valutazione dell'espressione di Env</b>	<b>48</b>

<b>3.9</b>	<b>Animali utilizzati</b>	<b>49</b>
<b>3.10</b>	<b>Separazione dei PBMC da sangue intero</b>	<b>50</b>
<b>3.11</b>	<b>Saggio CTL</b>	<b>50</b>
<b>3.12</b>	<b>Valutazione della lisi cellulare</b>	<b>52</b>

## **CAPITOLO 4: RISULTATI**

<b>4.1</b>	<b>Animali utilizzati per l'allestimento del saggio</b>	<b>53</b>
<b>4.2</b>	<b>Generazione e trasformazione delle linee di fibroblasti felini</b>	<b>53</b>
<b>4.3</b>	<b>Valutazione dell'efficienza di trasduzione</b>	<b>55</b>
<b>4.4</b>	<b>Valutazione dell'espressione di Env</b>	<b>59</b>
<b>4.5</b>	<b>Saggio CTL</b>	<b>60</b>

## **CAPITOLO 5: DISCUSSIONE**

<b>5.1</b>	<b>Conclusioni</b>	<b>76</b>
------------	--------------------	-----------

## **CAPITOLO 6: RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI**

<b>RINGRAZIAMENTI</b>	<b>88</b>
-----------------------	-----------