

# 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> |
| <br>  |            |
| <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> |
|-----------------------|-----------|