



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
Facoltà di Medicina e Chirurgia

CORSO di DOTTORATO in
BIOTECNOLOGIE APPLICATE ALLE SCIENZE MEDICHE
ciclo XXVI

TESI DI DOTTORATO DI RICERCA

PROGRESSI NELLA TECNOLOGIA DEL VETTORE *POXVIRALE* MVA:
1. PRODUZIONE DI RICOMBINANTI ESPRIMENTI DUE TRANSGENI
2. TRANSATTIVAZIONE DI GENI CELLULARI

Relatore: prof. Diego Maria Michele FORNASARI
Correlatore: prof. Antonio SICCARDI
Coordinatore del Dottorato: prof. Massimo LOCATI

Andrea BARBIERI
Matricola R09302

A.A. 2012-2013

RIASSUNTO	I
ABBREVIAZIONI.....	III
INTRODUZIONE – PARTE I	1
1. BIOLOGIA DEI POXVIRUS.....	1
1.1 <i>Morfologia dei Virioni.....</i>	2
1.2 <i>Genoma.....</i>	3
1.3 <i>Ciclo replicativo ed espressione genica.....</i>	4
Fase precoce - adesione, ingresso ed espressione di geni precoci.....	4
Fase intermedia - duplicazione ed espressione di geni intermedi	6
Fase tardiva - espressione di geni tardivi e morfogenesi	7
1.4 <i>Immunomodulazione dei Poxvirus.....</i>	9
2. RICERCA BIOMEDICA E INGEGNERIA GENETICA DEI POXVIRUS.....	10
2.1 <i>Ingegneria genetica: generazione di Poxvirus ricombinanti.....</i>	10
2.2 <i>I Poxvirus nella ricerca biomedica</i>	12
2.2.1 Vaccini di prima e seconda generazione.....	12
2.2.2 Vettori attenuati e vaccini di terza generazione	13
2.2.3 Modified Vaccinia Ankara.....	14
Efficacia vaccinale di MVA in animali e uomo.....	15
MVA contenenti più transgeni.....	18
INTRODUZIONE – PARTE II	19
3. IL COMPLESSO MAGGIORE DI ISTOCOMPATIBILITÀ DI CLASSE-II.....	19
3.1 <i>Regolazione trascrizionale del locus MHC Classe-II</i>	22
4. CIITA, IL MASTER CONTROL REGULATOR DELLA CLASSE-II	25
4.1 <i>Controllo dell'espressione genica e struttura di CIITA</i>	25
4.2 <i>L'attività transattivatoria di CIITA.....</i>	28
4.3 <i>Implicazione di CIITA nella patologie.....</i>	29
4.3.1 CIITA e i tumori.....	30
4.4 <i>Strategie terapeutiche basate sull'uso di CIITA</i>	31
SCOPO DEL LAVORO.....	33
MATERIALI E METODI.....	35
1. COLTURE CELLULARI.....	35
2. PRODUZIONE DI VIRUS MVA RICOMBINANTI.....	36
2.1 <i>Generazione dei plasmidi di trasferimento.....</i>	37
2.1.1 p94-HLAC e p94-fCIITA	37
2.1.2 p675	39
2.1.3 p604	40
2.1.4 p604-NP.....	40
2.2 <i>Generazione di virus ricombinanti.....</i>	41
2.2.1 Ricombinazione omologa e selezione dei cloni	41
2.2.2 Purificazione dello stock virale e titolazione	43
2.3 <i>Caratterizzazione dei virus ricombinanti</i>	44

2.3.1	PCR	45
2.3.2	Western Blot	45
2.3.3	Citometria	46
2.3.4	Immunofluorescenza.....	47
3.	STUDI IN VIVO.....	48
3.1	<i>Modello animale e protocollo di immunizzazione</i>	48
3.2	<i>ELISA anti-MVA</i>	49
3.3	<i>Analisi citometrica della distribuzione linfocitaria</i>	50
RISULTATI - PARTE I.....		52
1.	PRODUZIONE DEL VIRUS MVA HLAC(ΔIII)ENV(ΔVI).....	54
1.1	<i>FASE 1: generazione del virus accettore MVA HcRED(ΔIII)ENV(ΔVI)</i>	55
1.2	<i>FASE 2: generazione del virus MVA HLAC(ΔIII)ENV(ΔVI)</i>	55
2.1.1	Costruzione del plasmide donatore p94-HLAC	55
2.1.2	Generazione del virus ricombinante doppio MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI)	56
2.	PRODUZIONE DEL VIRUS MVA HA(ΔIII)NP(ΔVI)	57
2.1	<i>FASE 1: generazione del virus accettore MVA HA(ΔIII)HcRED(ΔVI)</i>	59
2.1.1	Costruzione del plasmide p675	59
2.1.1.1	Generazione del virus accettore MVA HcRED(Δ VI)	61
2.1.2	Generazione del virus accettore MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI).....	62
2.2	<i>FASE 2: generazione del virus MVA HA(ΔIII)NP(ΔVI)</i>	65
2.2.1	Costruzione del plasmide p604	65
2.2.2	Costruzione del plasmide di trasferimento p604-NP.....	67
2.2.3	Generazione del virus MVA HA(Δ III)NP(Δ VI).....	70
RISULTATI - PARTE II.....		72
1.	PRODUZIONE E CARATTERIZZAZIONE DEL VIRUS MVA fCIITA(ΔIII)	73
1.1	<i>Costruzione di p94-fCIITA</i>	73
1.2	<i>Produzione del virus e purificazione dello stock</i>	75
1.3	<i>Caratterizzazione di MVA fCIITA(ΔIII): espressione e localizzazione di fCIITA</i>	78
2.	ANALISI DELLA TRANSATTIVAZIONE DI CLASSE-II	81
2.1	<i>Western Blot non riducente</i>	82
2.2	<i>Citometria</i>	83
2.3	<i>Immunofluorescenza</i>	83
3.	TEST IN VIVO	86
DISCUSSIONE		89
BIBLIOGRAFIA		95
RINGRAZIAMENTI		123

Riassunto

Il virus Modified Vaccinia Ankara (MVA) è un ceppo fortemente attenuato di Vaccinia Virus ed è da tempo utilizzato in qualità di vettore vaccinale nell'uomo. La totale incapacità di replicare in cellule di mammifero unita agli alti livelli di espressione dei transgeni (TG) veicolati costituiscono i punti di forza di MVA e ne fanno un vettore estremamente sicuro e potente, in grado di indurre una forte risposta immunitaria nei soggetti vaccinati. Uno dei metodi più impiegati per la costruzione di virus MVA ricombinanti (rMVA) sfrutta la ricombinazione omologa tra specifiche regioni del genoma virale e un plasmide donatore, contenente due sequenze di omologia che indirizzano la ricombinazione. La selezione dei cloni ricombinanti viene generalmente effettuata introducendo *marker* che determinano alterazioni nel fenotipo delle cellule infettate (ad esempio, resistenza ad antibiotici o proteine fluorescenti) e grazie ai quali è possibile aumentare notevolmente l'efficienza.

L'interesse suscitato in ambito scientifico e medico da parte di MVA ha fornito una notevole spinta all'ideazione di nuove strategie volte alla sua manipolazione ed ingegnerizzazione, come dimostrato dai notevoli progressi compiuti nell'ultimo ventennio. Il lavoro svolto in questa tesi, suddivisa in due parti, si inserisce in questo ambito e ha come scopo lo sviluppo di nuovi metodi nel tentativo di rendere MVA un vettore sempre più duttile, potente e versatile nell'ambito della ricerca sia di base sia clinica.

Così come i vaccini più tradizionali possono essere costituiti da diversi antigeni, anche i virus rMVA possono essere ingegnerizzati per esprimere due o più TG (mrMVA). Strategie per la generazione di mrMVA sono già descritte in letteratura, ma non si sono dimostrate completamente soddisfacenti, soprattutto per quanto riguarda l'indipendenza trascrizionale e traduzionale dei TG. Questo è un prerequisito molto importante qualora i TG, ad esempio, dovessero assemblarsi secondo precisi rapporti stechiometrici a formare una proteina multimerica. Nella prima parte di questo lavoro di tesi viene descritta una nuova strategia di costruzione di mrMVA basata sul *Red-to-Green gene swapping* (Di Lullo et al., 2010) che permette l'inserimento dei TG in punti diversi del genoma, in particolare all'interno delle regioni ΔIII e ΔVI , assicurandone pertanto la totale indipendenza. Il primo virus mrMVA presentato, MVA HLAC(ΔIII)ENV(ΔVI), è stato costruito a partire da un rMVA già contenente il gene ENV nella regione ΔVI e inserendo HLAC nella regione ΔIII applicando direttamente il metodo del *Red-to-Green gene swapping*. Il secondo virus, MVA HA(ΔIII)NP(ΔVI), è stato invece costruito in maniera del tutto speculare, partendo da un rMVA contenente HA nella regione ΔIII e inserendo NP nella regione ΔVI . La strategia di ingegnerizzazione impiegata per quest'ultimo ha richiesto la costruzione di due nuovi plasmidi di trasferimento, contenenti le sequenze di omologia per la regione ΔVI , rispettivamente p675 (plasmide donatore della proteina rossa HcRED) e p604 (plasmide di trasferimento contenente un MCS e la proteina verde EGFP). Entrambi i virus sono stati poi saggiati per valutare l'espressione dei TG contenuti e confrontati con i virus rMVA singoli: non essendo state individuate differenze, è stato concluso che la strategia presentata è adatta alla generazione di mrMVA recanti TG in regioni diverse.

Nonostante l'importanza che MVA ricopre nel panorama scientifico e medico, la piena potenzialità di questo virus non è ancora stata raggiunta: il suo impiego, infatti, è stato finora limitato a quello di *carrier* di TG contro i quali indurre una risposta immunitaria, benché esistano altre strategie che non coinvolgano la diretta presentazione dei TG al sistema immunitario. Una di queste è la possibilità di promuovere l'espressione di geni cellulari sfruttando fattori di trascrizione, induttori o transattivatori opportunamente inseriti all'interno del vettore MVA. Per approfondire questo campo d'indagine, è stato selezionato CIITA, gene fisiologicamente espresso nelle cellule presentanti l'antigene (APC) e responsabile dell'espressione di MHC Classe-II. Nella seconda parte di questo lavoro è stato pertanto costruito, attraverso la tecnica del *Red-to-Green gene swapping*, il virus MVA fCIITA(Δ III), contenente il gene CIITA fuso al tag M2 all'interno della regione Δ III. Come confermato a mezzo di western blot, saggi citometrici e immunofluorescenza, MVA fCIITA(Δ III) si è rivelato in grado di indurre un fenotipo Classe-II⁺ in cellule umane e murine, dimostrando che l'infezione virale non interferisce con l'attività transattivatoria di CIITA.

Considerato che l'overespressione della Classe-II sulle cellule tumorali ha prodotto interessanti, benché eterogenei, risultati nel campo dell'immunoterapia e che i metodi di *gene delivery* finora impiegati risultano poco efficienti o dispendiosi in termini di tempo, è stata presa in considerazione la possibilità di veicolare CIITA all'interno di cellule tumorali sfruttando il virus costruito. In via preliminare, è stata saggiata *in vivo* la capacità di MVA fCIITA(Δ III) di stimolare il ramo T-helper mediante due immunizzazioni intramuscolari consecutive. Al termine dell'immunizzazione sono state valutate sia la risposta anti-vettore attraverso un saggio ELISA sia la distribuzione delle popolazioni linfocitarie CD4⁺ mediante citometria su cellule estratte da linfonodi. I risultati, tuttavia, non hanno messo in mostra differenze significative rispetto al controllo: l'assenza dell'effetto biologico, ossia l'aumento di anticorpi anti-vettore, è risultata infatti in linea con la mancata over-stimolazione dei linfociti T-helper. Data la possibilità che la risposta anti-vettore fosse già completamente saturata, impedendo di fatto l'ulteriore stimolazione del ramo umorale, sono in corso ulteriori saggi *in vivo* per la valutazione funzionale del virus costruito inerente ad una possibile stimolazione del ramo cellulare dell'immunità acquisita. Qualora la capacità immunostimolatoria e/o immunomodulante di MVA fCIITA(Δ III), eventualmente in associazione con adiuvanti, venisse confermata, si avrà a disposizione un ottimo strumento per valutare in maniera rapida e sicura in quali tumori l'overespressione della Classe-II svolge un ruolo efficace nell'induzione di una risposta immunitaria antitumorale.

Abbreviazioni

ADCC	Citotossicità cellulare mediata da anticorpi
BAC	Cromosoma artificiale batterico
BLS	Bare lymphocyte syndrome
CEF	Fibroblasti embrionali di pollo
CEV	Virus dotati di envelope associati alla membrana
CPXV	Cowpoxvirus
DC	Cellule dendritiche
EEV	Virus extracellulare dotato di envelope
GAG	Glicosaminoglicani
HAT	Istone acetiltransferasi
IEV	Virus intracellulare dotato di envelope
IMV	Virus maturo intracellulare
IV	virus immaturo
MCS	Multiple Cloning Site
MHC	Complesso maggiore di istocompatibilità
MIIC	Vescicole contenenti la Classe-II
MOI	Molteplicità di infezione
mrMVA	MVA ricombinante multiplo
MVA	Modified Vaccinia Ankara
NK	Cellule natural killer
OPV	Orthopoxvirus
pDC	DC plasmacitoidi
P.I.	Post infezione
rMVA	MVA ricombinante
rVACV	Vaccinia Virus ricombinante
TAA	Antigene associato ai tumori
TCR	Recettore delle cellule T
TG	Transgene
TK	timidina kinasi
TPG	Plasmide di trasferimento verde
VACV	Vaccinia Virus

Introduzione – Parte I

1. Biologia dei *Poxvirus*

I *Poxvirus*, famiglia *Poxviridae* (Tabella 1), sono un numeroso ed eterogeneo gruppo di virus a DNA a doppio filamento rivestiti da *envelope*. *Poxviridae* comprende due sottofamiglie, *Chordopoxvirinae* ed *Entomopoxvirinae*, in grado di infettare rispettivamente vertebrati ed invertebrati. *Chordopoxvirinae* è suddivisa in otto diversi *genera*, il più importante e studiato dei quali è senza dubbio quello degli *Orthopoxvirus* (OPV). Gli OPV, come tutti gli appartenenti ai *Poxvirus*, replicano interamente nel citoplasma delle cellule infettate benché siano virus a DNA. Inoltre, caratteristica unica, il loro genoma risulta conservato inter-specie, in particolar modo in una porzione centrale di circa 100kb contenente i geni necessari per la replicazione ed il ciclo vitale. Ciò si traduce in cross-reattività immunologica e, pertanto, cross-protezione da una successiva infezione da parte di un virus del medesimo genere (Mercer, Schmidt, e Weber 2006). A supporto di ciò, si può citare la grande efficacia della vaccinazione contro *Variola major* tramite *Vaccinia Virus* (VACV), entrambi OPV, che ha portato nel 1977 all'eradicazione del vaiolo in natura.

Fino agli anni '80, la conoscenza dei processi molecolari e cellulari coinvolti nella risposta antivirale era alquanto limitata, considerata la mancanza di strumenti adatti al loro studio. Con l'avvento della tecnologia del DNA ricombinante, nuove strategie d'indagine si resero disponibili e VACV venne selezionato come modello di studio per colmare tali lacune. Per questo motivo, la

maggior parte della nostra conoscenza sui *Poxvirus* e, in generale, nel campo della virologia è dovuta a VACV. Ad oggi sono disponibili molteplici modelli di VACV, dai mutanti termosensibili ai ricombinanti inducibili, il cui impiego non è limitato allo studio *in vitro* ma coinvolge anche test *in vivo* volti allo sviluppo di vaccini ricombinanti.

Famiglia	Sottofamiglia	Genere	Virus
Poxviridae	Chordopoxvirinae	Orthopoxvirus	Variola virus , Monkeypox virus, Cowpox virus, Vaccinia virus , Camelpox virus, Ectromelia virus, Taterapox virus, Uasin Gishu virus
		Avipoxvirus	Canarypox virus, Fowlpox virus , Juncopox virus, Mynahpox virus, Pigeonpox virus, Psittacinepox virus, Quailpox virus, Sparrowpox virus, Starlingpox virus, Turkeypox virus
		Capripoxvirus	Sheeppox virus, Goatpox virus, Lumpy skin disease virus
		Cervidpoxvirus	Deerpox virus W-848-83
		Crocodylipoxvirus	Crocodile poxvirus
		Leporipoxvirus	Hare fibroma virus, Myxoma virus, Rabbit fibroma virus, Squirrel fibroma virus
		Molluscipoxvirus	Molluscum contagiosum virus
		Parapoxvirus	Bovine papular stomatitis virus, Orf virus, Parapoxvirus of red deer in New Zealand, Pseudocowpox virus
		Suipoxvirus	Swinepox virus
		Yatapoxvirus	Tanapox, Yaba monkey tumor virus
	Entomopoxvirinae	Alphaentomopoxvirus	Melolontha melolontha entomopoxvirus
		Betaentomopoxvirus	Amsacta moorei entomopox virus
		Gammaentomopoxvirus	Chironomus luridus entomopoxvirus

Tabella 1. Classificazione dei Poxvirus. *Variola virus* è l'agente eziologico del vaiolo, eradicato nel 1977 grazie a una campagna vaccinale globale nella quale è stato impiegato *Vaccinia Virus* (VACV). I successivi studi compiuti su VACV hanno guidato la scoperta di ceppi attenuati, come ad esempio MVA, impiegati oggi in qualità di vettori virali grazie alla loro sicurezza. Un altro vettore *Poxvirale* estremamente interessante è Fowlpox Virus: al pari dei ceppi attenuati di VACV, è in grado di infettare cellule di mammifero pur non replicando in esse.

1.1 Morfologia dei Virioni

VACV, come tutti i *Poxvirus*, possiede un virione relativamente grande (in media 250nm x 350nm) e complesso (Figura 1), al limite della risoluzione per la microscopia ottica. Analogamente ad altri membri della famiglia, VACV è in grado di produrre diversi tipi di virioni, almeno tre, tutti in

grado di infettare, seppur con modalità diverse, le cellule dell'ospite. Di questi, il virus maturo intracellulare (IMV) e il virus extracellulare dotato di envelope (EEV) sono le forme più significative: se IMV costituisce il primo intermedio della fase replicativa ed è provvisto di due membrane (capside e membrana interna), l'EEV rappresenta il punto di arrivo della maturazione del virus ed è caratterizzato da una membrana aggiuntiva (membrana esterna). Tale membrana è di derivazione golgiana o endosomiale e contiene proteine di transmembrana sia cellulari sia virali. All'interno del *core* trovano posto il genoma, alcune proteine strutturali e gli enzimi di trascrizione propri del virus, necessari durante le primissime fasi dell'infezione.

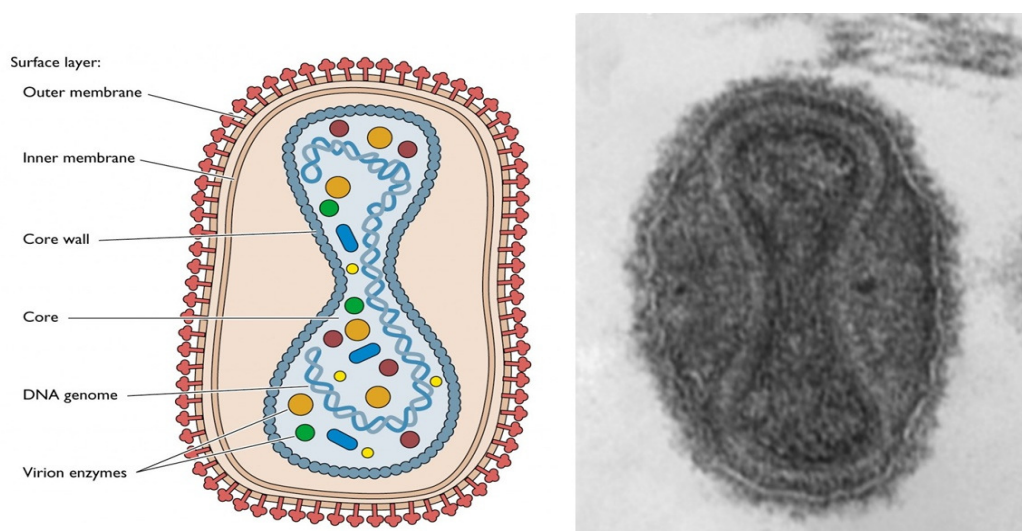


Figura 1. Struttura schematica di un virione EEV di *Poxvirus* (sinistra) e immagine di microscopia elettronica a trasmissione del virione di *Variola Major* (destra). Il virione IMV è sprovvisto di membrana esterna e quindi possiede un diverso assortimento di proteine di superficie.

1.2 Genoma

Il genoma di VACV è costituito da un doppio filamento a DNA lineare di 200-300kb, contenente approssimativamente 200 geni contigui e privi di *splicing* (Figura 2). La porzione centrale, come già sottolineato, contiene geni per la replicazione - conservati inter-specie - mentre le due porzioni terminali recano geni volti a determinare virulenza e specie-specificità. Le estremità del genoma, dette ITR, sono costituite da sequenze ripetute in tandem e non sono libere, bensì chiuse da due *loop* a forcina (*hairpin* o *terminal loop*). La particolare struttura di queste regioni ricopre un ruolo critico durante la fase della replicazione.

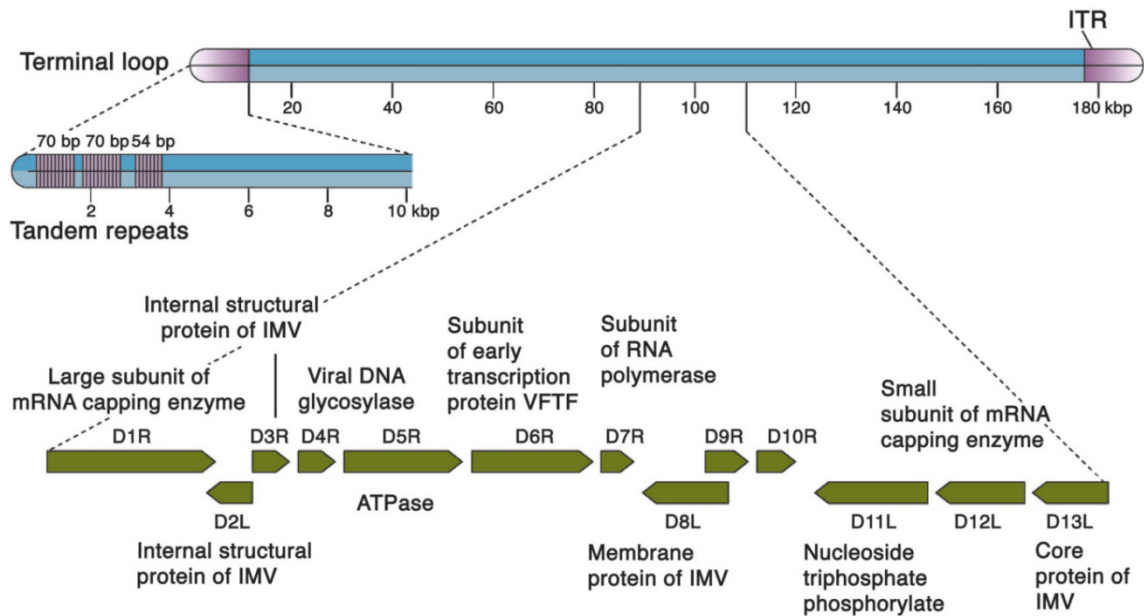


Figura 2. Organizzazione del genoma di VACV. La porzione centrale è costituita da geni codificanti per proteine strutturali, alcuni dei quali sono rappresentati nell'esploso in basso con la nomenclatura derivata dalla digestione con l'enzima HindIII. Nell'esploso a sinistra è riportata la struttura delle ITR (*Inverted Tandem Repeats*) e si può notare il *terminal loop* all'estremità del genoma.

1.3 Ciclo replicativo ed espressione genica

Il ciclo replicativo di VACV (Figura 3) si svolge nel citoplasma, all'interno delle cosiddette *virus factories*, ed è in gran parte indipendente dalla cellula ospite: sia la replicazione del DNA sia la trascrizione sono infatti affidate a polimerasi virali, mentre la traduzione delle proteine è delegata all'apparato cellulare. All'interno del ciclo si possono individuare tre fasi: precoce, intermedia e tardiva.

Fase precoce - adesione, ingresso ed espressione di geni precoci

Il ciclo replicativo ha inizio con l'**adesione** del virione alla membrana della cellula ospite (Figura 3 punto 1): è opinione diffusa (Vanderplassen e Smith 1997) che i recettori impiegati da IMV differiscano da quelli di EEV dato il diverso corredo di proteine superficiali dei due. Vari studi (Chung et al. 1998; Hsiao, Chung, e Chang 1998; Hsiao, Chung, e Chang 1999; Lin et al. 2000) indicano come probabili *target* di IMV i GAG solforati (in particolare, eparansolfato e condroitinsolfato), tuttavia virus deleti dei recettori per tali GAG non subiscono alterazioni nell'infettività, ad indicare che le molecole coinvolte nell'adesione dei virioni IMV sono molteplici e non tutte identificate (Hsiao, Chung, e Chang 1998; Rodriguez e Smith 1990; Ward 2005). Inoltre, è risaputo che il legame di un anticorpo specifico per un antigene di membrana sensibile alla tripsina (B2) è in grado di bloccare il

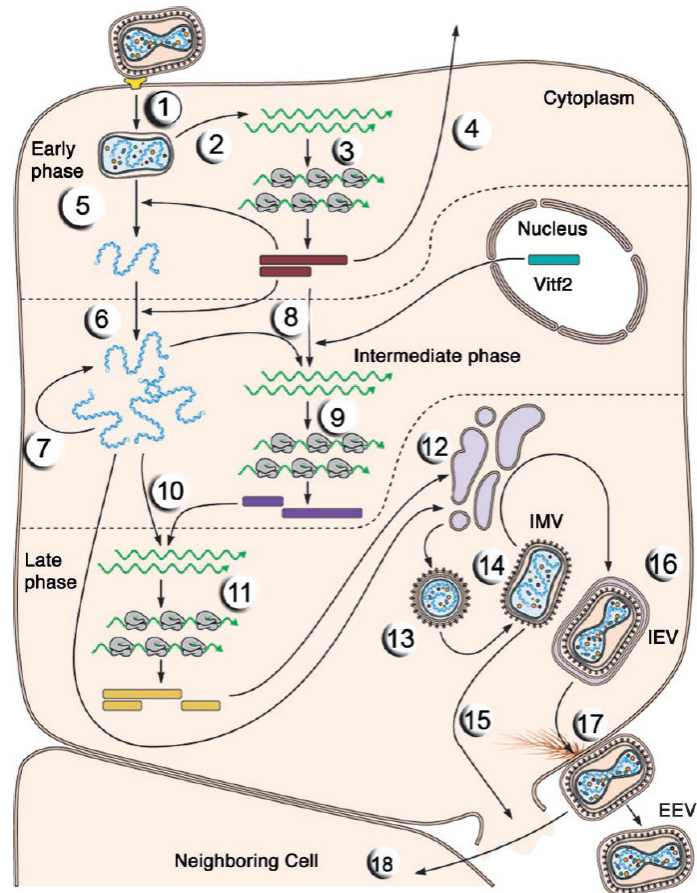


Figura 3. Sintesi del ciclo replicativo di VACV.

legame degli IMV, ma non degli EEV (Vanderplasschen e Smith 1997; W. Chang et al. 1995). I dati sono tuttavia insufficienti e le indagini ancora in corso.

Una volta aderito alla membrana, il virus deve liberarsi dell'*envelope*, completando l'**ingresso** nel citoplasma della cellula infettata (Figura 3 punto 1). Il meccanismo molecolare impiegato è relativamente complesso e dipende dal numero di membrane che compongono il virione (Figura 4). L'ingresso di IMV, essendo il suo capsidone rivestito da un singolo *envelope* lipidico, avviene attraverso la fusione diretta tra la membrana virale *interna* e la membrana cellulare. EEV, invece, essendo dotato di due rivestimenti lipidici, adotta una strategia diversa: la membrana esterna, in seguito al legame con la membrana cellulare, perde di integrità e si fonde parzialmente ad essa. Il virione, che a questo punto risulta analogo ad un IMV, può fondersi con la membrana cellulare e liberare il capsidone nel citoplasma.

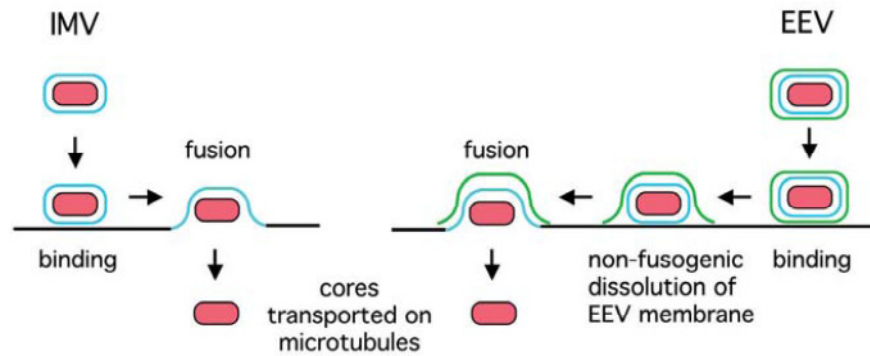


Figura 4. Rappresentazione delle strategie di ingresso dei virioni di VACV. A sinistra, IMV si fonde direttamente alla membrana cellulare. A destra, EEV dapprima perde la membrana esterna tramite un processo non fusogeno e poi libera il capside nel citoplasma attraverso fusione della membrana interna.

Indipendentemente dalla via di ingresso seguita, il capside, *nudo*, viene veicolato per mezzo dei microtubuli in prossimità del nucleo (Figura 3 punto 2). La prima fase del ciclo replicativo si conclude quindi con l'**espressione dei geni precoci** ad opera di una RNA-polimerasi virale DNA-dipendente, che riconosce unicamente i promotori di VACV e la sequenza di terminazione TTTTNT. L'enzima si trova già associato al genoma virale all'interno del *core*, unitamente a fattori di iniziazione della trascrizione ed enzimi che modificano il *cap* e il *poly-A* degli RNA virali per renderli simili alle controparti eucariotiche. In questo modo, i geni precoci, che ricoprono circa il 50% del trascrittoma di VACV, vengono espressi sin dalle primissime fasi dell'infezione (Figura 3 punto 3). Tali geni codificano per proteine coinvolte in vari processi, in particolar modo evasione immunologica e induzione paracrina della proliferazione (Figura 3 punto 4), ulteriore *uncoating* virale e apertura della parete del *core* (Figura 3 punto 5), aumento del pool di nucleotidi disponibili e duplicazione del DNA virale.

Fase intermedia - duplicazione ed espressione di geni intermedi

La fase intermedia ha inizio con la **duplicazione del genoma** di VACV (Figura 3 punti 6-7, illustrata in dettaglio in Figura 5) ad opera di una DNA-polimerasi virale DNA-dipendente, trascritta durante la fase precoce. Il processo di replicazione ha inizio con l'introduzione di un *nick* in uno dei filamenti di DNA in prossimità del *terminal loop*. L'*hairpin* perde quindi il *folding* e viene duplicato dalla DNA-polimerasi virale. Le due catene quindi si dividono e l'*hairpin* della catena nascente si riforma grazie alle ITR, fungendo da nuovo innesco per la DNA-polimerasi che completa la duplicazione del genoma sull'altro filamento. La risoluzione del concatamero generato da tale processo avviene unicamente nella fase tardiva e richiede l'intervento di almeno tre proteine virali che inseriscono due *nick*, separano la giunzione di Holliday e ligano le estremità.

Al contempo, la RNA-polimerasi virale dà inizio all'**espressione dei geni intermedi** (Figura 3 punto 8), i cui promotori si differenziano da quelli precoci poiché richiedono la presenza di fattori di trascrizione sia virali (VITF1-3, prodotti durante la fase precoce) sia cellulari (VITF2, retrotraslocato dal nucleo). Le proteine intermedie (Figura 3 punto 9) fungono da fattori di trascrizione per i geni tardivi, pertanto per la conclusione del ciclo replicativo è necessaria la corretta espressione sia delle proteine precoci sia di quelle intermedie.

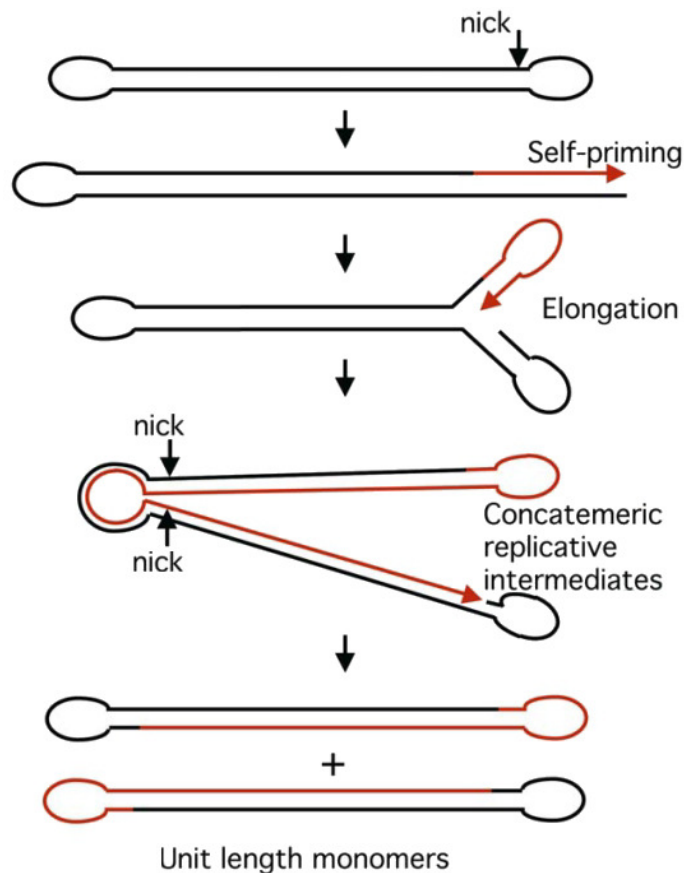


Figura 5. Fasi della duplicazione del genoma di VACV. La presenza del *terminal loop* e delle ITR svolge un ruolo chiave nel processo di duplicazione, che prevede la generazione di intermedi di replicazione concatenati, successivamente risolti da enzimi virali.

Fase tardiva - espressione di geni tardivi e morfogenesi

I geni tardivi codificano principalmente per proteine strutturali del capsido, fattori di virulenza, peptidi ad attività immunosoppressiva ed enzimi che verranno successivamente assemblati all'interno del virione (Figura 3 punto 11). Gli mRNA tardivi posseggono caratteristiche diverse se comparati a quelli precoci: in primo luogo, il segnale di terminazione TTTTNT non viene più riconosciuto dalla RNA-polimerasi, il che porta alla trascrizione di mRNA particolarmente lunghi;

secondariamente, all'estremità 5' degli mRNA, tra il *cap* e il codone AUG, viene aggiunto un *poly-A* la cui funzione è tuttora sconosciuta.

Terminata l'espressione tardiva, ha inizio la **morfogenes**i dei virioni (Figura 3 punto 12-17, illustrata in dettaglio in Figura 6). Dapprima, membrane lipidiche dell'ospite di probabile derivazione endoplasmatica (o tutt'al più pre-golgiiana) e proteine virali si associano a formare delle mezzelune (*crests*). Queste ultime si assemblano intorno ai complessi nucleoproteici di VACV generando particelle sferiche chiamate "virus immaturi" (IV). Gli IV maturano attraverso successivi tagli proteolitici, i quali inducono la condensazione del capsid nella caratteristica forma "a mattoncino" posseduta dagli IMV (due membrane). È da sottolineare che gli IMV vengono liberati unicamente in seguito a lisi della cellula, poiché normalmente il processo di maturazione prosegue con l'ulteriore rivestimento da parte di una doppia membrana lipidica (endosomiale o golgiiana), portando alla formazione di virus intracellulari dotati di *envelope* (IEV, quattro membrane). Tali IEV vengono quindi veicolati dai microtubuli verso la superficie cellulare e, attraverso un processo di esocitosi, danno vita ai virus dotati di *envelope* associati alla membrana (CEV, tre membrane). Da ultimo, i CEV possono o staccarsi dalla membrana sotto forma di EEV o indurre localmente una rapida polimerizzazione di actina che li "spinge" verso le membrane delle cellule adiacenti, propagando l'infezione in un *focus*.

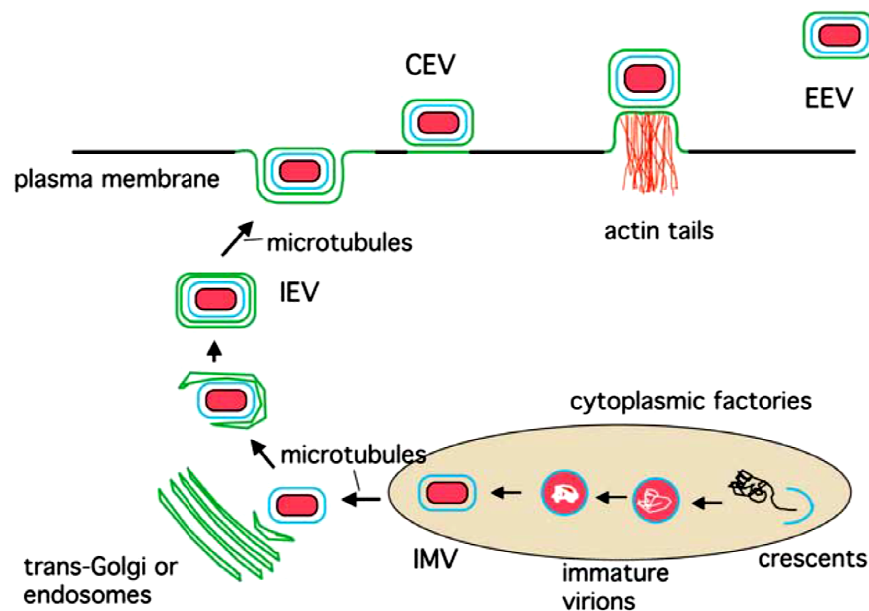


Figura 6. Morfogenesi dei virioni di VACV. IV = virus immaturi; IMV = virus maturi intracitoplasmatici; IEV = virus intracellulari dotati di envelope; CEV = virus dotati di envelope associati alla membrana; EEV = virus extracitoplasmatici dotati di envelope. La formazione e la maturazione dei virioni di VACV segue un processo ben definito che si svolge a cavallo delle *factories* citoplasmatiche e del comparto golgiiano-endosomiale. L'assemblaggio prevede la formazione di diversi intermedi, tutti infettivi a parte gli IV, che differiscono tra loro per quanto riguarda il numero delle membrane dell'*envelope* e il corredo di proteine di superficie.

1.4 Immunomodulazione dei Poxvirus

I grandi virus a DNA rappresentano un buon bersaglio contro il quale montare una risposta immune. Per tal motivo, i *Poxvirus* hanno sviluppato una serie di strategie volte sia a diminuire la risposta immunitaria dell'ospite sia ad aumentare la sopravvivenza delle cellule infettate, così da massimizzare l'efficienza del ciclo replicativo.

Durante le fasi sia precoce sia tardiva dell'infezione, i *Poxvirus* esprimono un'ampia gamma di proteine, alcune delle quali vengono secrete dalle cellule dell'ospite. La maggior parte di queste molecole, agendo in qualità di *mock receptors* e competendo per il legami con i recettori fisiologici, sono in grado di contrastare efficacemente la risposta antivirale stimolata da IFN- α/β (inibizione della replicazione virale), IFN- γ (stimolazione di macrofagi, linfociti B, linfociti T CD4⁺ e potenziamento dell'espressione del complesso MHC), IL-1 β (azione proinfiammatoria), IL-18 (azione proinfiammatoria e potenziante la citotossicità dei linfociti NK) e TNF (azione proinfiammatoria, antivirale e citotossica) (Symons, Alcamí, e Smith 1995; Vancová, La Bonnardiére, e Kontsek 1998; Alcamí, Symons, e Smith 2000; Katze, He, e Gale 2002; Mossman et al. 1995; Alcamí e Smith 1995; Bai et al. 2005; V. P. Smith e Alcamí 2000; Alcamí e Smith 1992; Spriggs et al. 1992; Seet et al. 2001; Cunnion 1999). Altre molecole secretorie bloccano invece la chemiotassi leucocitaria sia fungendo da *mock receptors* sia agendo da omologhi di citochine anti-infiammatorie (Lalani, Barrett, e McFadden 2000; P. M. Murphy 2001). Inoltre, alcuni *Poxvirus* sono in grado di secernere serpine (inibitori di serin proteasi), enzimi che riducono l'attivazione delle cellule infiammatorie e la *clearance* virale (Macen et al. 1993; Nash, Lucas, e McFadden 1997), mentre altri producono peptidi che interferiscono con l'attivazione del complemento, riducendone l'attività chemiotattica e citotossica (Seet et al. 2001; Isaacs, Kotwal, e Moss 1992).

Altri sistemi messi a punto dai *Poxvirus* per ostacolare il sistema immunitario comprendono la down-regolazione del CD4 sui Linfociti T-*helper* (rallentamento della risposta umorale) (Mansouri et al. 2002; Barry et al. 1995) e dell'MHC Classe I sulle cellule infettate (riduzione della presentazione di peptidi ai linfociti CD8⁺) (Boshkov, Macen, e McFadden 1992; Guerin et al. 2002; Früh et al. 2002). Quest'ultima strategia porta con sé un rischio: se da un lato viene infatti bloccata la risposta cellulo-mediata T-*killer*, dall'altro la mancanza di Classe I sulla superficie cellulare induce la risposta NK. Per ovviare a ciò, alcuni *Poxvirus* sono in grado di esprimere omologhi della Classe I, i quali, formando complessi stabili con la β 2-microglobulina, riescono ad ingannare i linfociti NK (Guerin et al. 2002; Mansouri et al. 2002).

Da ultimo, i *Poxvirus* hanno sviluppato la capacità di rallentare l'apoptosi cellulare inibendo direttamente l'attivazione delle caspasi indotta da FasL o TNF (via estrinseca), bloccando il *pathway*

mitocondriale (via intrinseca) e impedendo la funzionalità delle caspasi stesse (Seet et al. 2001; Bertin et al. 1997; Hu et al. 1997; Komiyama et al. 1994; Martinez-Pomares, Stern, e Moyer 1993; Zhou et al. 1997; Everett et al. 2000). In tal modo la sopravvivenza delle cellule infettate viene prolungata, aumentando il tempo utile per la replicazione, il *packaging* e la propagazione dell'infezione.

2. Ricerca biomedica e ingegneria genetica dei Poxvirus

L'avvento della tecnologia del DNA ricombinante segnò una rivoluzione nel mondo della biologia e, grazie ad essa, nel 1980 si aprì un nuovo capitolo nella storia dei *Poxvirus* (Riccardo Wittek et al. 1980; R Wittek et al. 1980; R Wittek e Moss 1980). Le tecniche molecolari vennero infatti sfruttate appieno al fine di fornire i mezzi necessari per ingegnerizzare geneticamente i *Poxvirus*, permettendo lo studio approfondito della loro biologia. Inoltre, dati l'ampio spettro di infezione e gli alti livelli di espressione dei transgeni (TG) veicolati, i *Poxvirus* ricombinanti divennero in breve tempo uno strumento estremamente utile per la ricerca medica e veterinaria, rivelandosi ottimi vettori di espressione e vaccini candidati contro malattie scorrelate (Panicali e Paoletti 1982; Mackett, Smith, e Moss 1982).

2.1 Ingegneria genetica: generazione di Poxvirus ricombinanti

Il sistema di ingegnerizzazione genetica più usato sfrutta la ricombinazione omologa, un evento relativamente frequente (circa 0.1%) che avviene in maniera spontanea all'interno delle cellule infettate. La ricombinazione viene guidata da un plasmide che contiene un MCS sotto promotore virale, fiancheggiato da due regioni di omologia che indirizzano di fatto la ricombinazione in siti specifici del genoma *Poxvirale*. Inserendo un TG nell'MCS, quindi, è possibile generare per ricombinazione una progenie virale in grado di esprimere tale TG (Figura 7).

Rendendosi necessario isolare i virus ricombinanti all'interno di un largo eccesso di virus parentale, diversi approcci di selezione sono stati messi a punto. Uno dei primi metodi consisteva nel ricombinare il TG all'interno del gene virale timidina chinasi (TK), così da inattivarlo, e di selezionare successivamente i cloni con fenotipo TK⁻ all'interno di cellule prive di TK (Mackett, Smith, e Moss 1984). Tale sistema, benché funzionale, richiedeva parecchie settimane di lavoro per riuscire ad identificare ed isolare un numero davvero esiguo di placche. Per aumentare l'efficienza si diffuse pertanto l'impiego di *marker ad hoc* inseriti nella cassetta di ricombinazione accanto al TG, così da

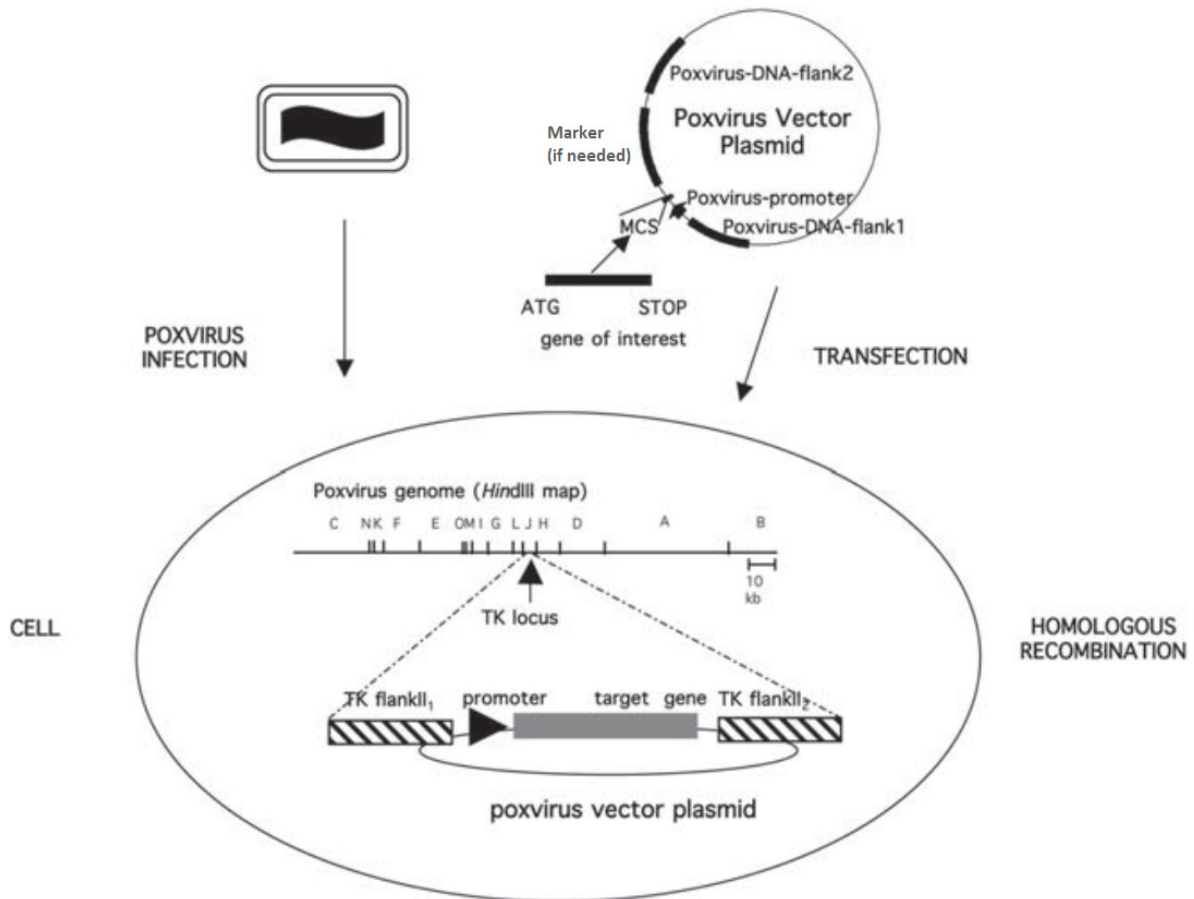


Figura 7. Rappresentazione schematica del processo di ricombinazione omologa per la produzione di *Poxvirus* ricombinanti. In alto a destra, il plasmide di trasferimento, la cui cassetta di ricombinazione, contenente il TG sotto promotore virale e un eventuale *marker* selettivo, è fiancheggiata dalle due regioni di omologia flank1 e flank2. In seguito ad infezione/trasfezione in cellule, l'intera cassetta di ricombinazione viene inserita all'interno del genoma virale in uno specifico locus (nell'esempio, è quello della TK).

porre i ricombinanti sotto pressione selettiva positiva. Un esempio molto semplice consiste nella resistenza a farmaci e composti chimici, ottenuta inserendo ad esempio geni per la resistenza agli antibiotici, il gene *gpt* (Falkner e Moss 1988) o somministrando BrdU o AZT (Holzer et al. 2005) a virus ricombinanti nel gene TK; alternativamente può essere applicato uno screening colorimetrico o di fluorescenza, introducendo geni codificanti ad esempio per β -galattosidasi (Caroline Staib, Drexler, e Sutter 2004) o per proteine analoghe alla GFP (Di Lullo et al. 2009; Di Lullo et al. 2010); o ancora, tecniche più raffinate prevedono l'utilizzo di fenotipi virali non replicanti (ad esempio, VACV- Δ A27L o MVA- Δ 3EL), complementati in seguito a ricombinazione (Hornemann et al. 2003); da ultimo, è possibile espandere in maniera transiente lo spettro d'ospite, facendo avvenire la ricombinazione in cellule non permissive per il virus *wild type* (G Sutter, Wyatt, et al. 1994; C Staib et al. 2000; Caroline Staib et al. 2003). Esaurito il loro scopo, i *marker* possono essere quindi eliminati in maniera

spontanea tramite un'ulteriore ricombinazione intragenomica, così da escludere potenziali effetti non desiderati *in vivo* ed aumentare il livello di sicurezza dei vettori virali (Di Lullo et al. 2010).

La ricombinazione omologa in cellule eucariotiche, benché efficace, non è il solo sistema esistente volto alla generazione di *Poxvirus* ricombinanti. A titolo d'esempio, è stata descritta in letteratura una tecnologia estremamente elegante che impiega i BAC e un virus *helper* (Domi e Moss 2005). L'intero genoma del *Poxvirus* VACV viene dapprima clonato all'interno di BAC, i quali possono essere ingegnerizzati direttamente in *E.Coli* impiegando enzimi derivanti dal batteriofago. Successivamente, i BAC modificati vengono utilizzati per produrre virus *puri* in cellule eucariotiche, aiutati inizialmente da un virus *helper* (il DNA dei *Poxvirus* non è infatti infettivo *per se*).

In definitiva, i sistemi di ingegnerizzazione dei *Poxvirus* hanno permesso di aumentare drasticamente semplicità e velocità di ricombinazione, mettendo a disposizione dei ricercatori vettori di espressione transiente duttili e relativamente facili da usare. Inoltre, considerato il fenotipo attenuato posseduto da alcuni *strain* virali incapaci di replicare in cellule di mammifero, i *Poxvirus* vennero ben presto candidati per l'uso su larga scala in qualità di vaccino totalmente sicuro.

2.2 I *Poxvirus* nella ricerca biomedica

Storicamente, VACV non fu il primo *Poxvirus* ad essere impiegato nella medicina: bisogna infatti tornare agli ultimi decenni del XVIII secolo e agli studi di Edward Jenner, nei quali venne scoperto un metodo profilattico antivaioloso alternativo alla "variolizzazione", la cosiddetta "vaccinazione" con *Cowpoxvirus* (CPXV) (Riedel 2005). Accolta inizialmente con estremo scetticismo, la vaccinazione riscosse invece un enorme successo, dimostrandosi decisamente più sicura della variolizzazione pur mantenendone l'efficacia. Agli inizi del XX secolo, a circa cento anni dalla sua scoperta, la vaccinazione era ormai divenuta una pratica comune e nel 1959 la neonata Organizzazione Mondiale della Sanità diede inizio al piano globale di eradicazione del Vaiolo, nel quale CPXV venne sostituito col più sicuro VACV (Baxby 1977).

2.2.1 Vaccini di prima e seconda generazione

Durante la campagna antivaiolosa, VACV venne impiegato su larga scala e si dimostrò *sufficientemente* sicuro ed estremamente potente: induceva infatti protezione nel 95% dei soggetti vaccinati, causando tuttavia effetti avversi anche seri nello 0,1% dei casi e morte in circa 1 caso per ogni milione (Fulginiti, Papier, Lane, Neff, e Henderson 2003a; Fulginiti, Papier, Lane, Neff, e Henderson 2003b). Questo vaccino era a tutti gli effetti un virus vivo, virulento, prodotto in animali

domestici quali vitelli o pecore (prima generazione), spesso non clonato e scarsamente purificato. Ciononostante, il rapporto rischio/beneficio, se comparato ai drammatici effetti del vaiolo, era certamente a favore del suo uso.

Nel 1977 si verificò l'ultimo caso di vaiolo in Somalia e, due anni più tardi, l'Organizzazione Mondiale della Sanità dichiarò tale malattia completamente debellata. L'interesse nei confronti di VACV tuttavia non diminuì poiché, grazie alle nuove tecniche di ingegnerizzazione, le sue potenzialità in qualità di vettore di espressione e vaccinale iniziarono ad emergere. La diffusione delle colture cellulari, inoltre, permise l'espansione di VACV *in vitro* (seconda generazione), in un ambiente più controllato e sterile rispetto al modello animale. Tra i vaccini di seconda generazione destinati ad uso veterinario merita sicuramente menzione il rVACV esprime la glicoproteina del *Rhabdovirus*, utilizzato con successo in Belgio tra il 1989 e il 1993 e che ha permesso di controllare la diffusione della rabbia tra le volpi selvatiche (Brochier, Costy, e Pastoret 1995). Data la capacità di indurre forti risposte citotossiche, inoltre, rVACV contenenti antigeni virali (Earl et al. 1986; Lathe et al. 1987) o associati a cancro (Bernards et al. 1987; Estin et al. 1988; Kantor et al. 1992) vennero inseriti in protocolli sperimentali volti allo sviluppo di vaccini antitumorali, con risultati decisamente incoraggianti. Infine, VACV venne saggiato anche in qualità di adiuvante e vari studi dimostrarono l'efficacia di rVACV recanti citochine (Rao et al. 1996) o molecole costimolatorie (Chamberlain et al. 1996) nell'aumentare l'efficacia della risposta immunitaria. Gli unici ostacoli da superare erano quelli legati alla sicurezza in fase di manipolazione (BSL-2, operatori vaccinati) e di successivo utilizzo nell'uomo.

2.2.2 Vettori attenuati e vaccini di terza generazione

Col passare degli anni e il susseguirsi degli studi, VACV cedette il passo ad altri vettori *Poxvirali* che, nel loro insieme, contribuirono ad abbattere, se non annullare del tutto, il rischio di eventi avversi associati all'uso di VACV. Questo aprì le porte della vaccinazione anche a quella parte di popolazione costituita da pazienti immunocompromessi, fino ad allora esclusi, nonché rese disponibili nuove strategie vaccinali, come ad esempio i protocolli *prime/boost* con diversi *backbone* virali. Questi vettori, costituenti la terza generazione, sono ceppi altamente attenuati di VACV, come ad esempio NYVAC e Modified Vaccinia Ankara (MVA), i quali hanno ricevuto l'approvazione del NIH per l'uso in BSL-1 anche da personale non vaccinato. NYVAC è stato costruito rimuovendo in maniera mirata diciotto geni coinvolti nel tropismo e nella patogenicità di VACV. In conseguenza di ciò, la replicazione del virus in cellule umane è bloccata ad uno stadio precoce, risultando tuttavia produttiva nella linea di scimmia VERO e in cellule primarie di pollo (CEF) (Tartaglia et al. 1992).

2.2.3 Modified Vaccinia Ankara

A differenza di NYVAC, il fenotipo estremamente attenuato di MVA è dovuto all'accumulo di una serie di difetti genetici conseguenti a più di 570 passaggi seriali su cellule di pollo CEF. Attraverso analisi di restrizione sul genoma sono state individuate sei delezioni maggiori (Δ I-VI, Figura 8) che, nel loro complesso, hanno causato la perdita del 12%-15% del genoma di VACV (Meyer, Sutter, e Mayr 1991; Antoine et al. 1998; Meisinger-Henschel et al. 2010), riducendolo a circa 177kb. MVA è caratterizzato da uno spettro d'ospite molto ristretto: al pari di NYVAC, le CEF risultano pienamente permissive per la sua replicazione, che in cellule di mammifero viene invece bloccata a livello della morfogenesi, più precisamente nella fase della generazione del virione (G Sutter e Moss 1992). Questa peculiarità sta alla base del successo di MVA, dal momento che risulta in grado di esprimere proteine eterologhe nelle cellule infettate pur non replicando in esse. Sorprendentemente, si dimostrano in grado di supportare la crescita virale anche alcune linee tumorali di mammifero, in particolare BHK-21 (criceto) e, anche se in maniera molto ridotta, A-549 (uomo) (Carroll e Moss 1997; L S Wyatt et al. 1998; Okeke, Nilssen, e Traavik 2006). La totale sicurezza e la capacità di esprimere ad alti livelli i TG veicolati sono solo due dei punti di forza che han fatto di MVA un eccellente candidato in qualità di vettore di espressione transiente e vaccinale (G Sutter e Moss 1992). A questi si aggiungono la stabilità nel tempo, una produzione economica e semplice, la flessibilità per quanto riguarda la dimensione dei TG inseriti (anche multipli), l'abilità nella stimolazione a lungo termine di entrambi i rami del sistema immunitario contro il TG veicolato (Ramírez et al. 2000) e, da ultimo, una vasta gamma di vie di somministrazione *in vivo*, in particolare quella intradermica e intranasale. MVA, infine, non codifica per molti inibitori dell'immunità, né interferisce con il processamento e la normale presentazione antigenica dell'ospite. Pertanto la risposta contro il vettore risulta più sostenuta, in accordo con l'osservazione che l'immunità cellulo-mediata e umorale permangono a lungo nell'ospite (Hammarlund et al. 2003).

In alcuni studi, la capacità di MVA di indurre una risposta immune anti-*Poxvirale* è stata comparata a quella dei tradizionali vaccini VACV: i risultati non hanno messo in evidenza sostanziali differenze, sebbene le dosi richieste con MVA siano sensibilmente maggiori (Ingo Drexler et al. 2003; Belyakov et al. 2003; Linda S Wyatt et al. 2004). Studi più recenti hanno comunque mostrato che la risposta contro il vettore possa essere aumentata sensibilmente attraverso la delezione di geni specifici, in particolare A35 (Rehm et al. 2010; Rehm e Roper 2011) e C12L (Falivene et al. 2012), o l'inserimento del TG CD40L (Lauterbach et al. 2013).

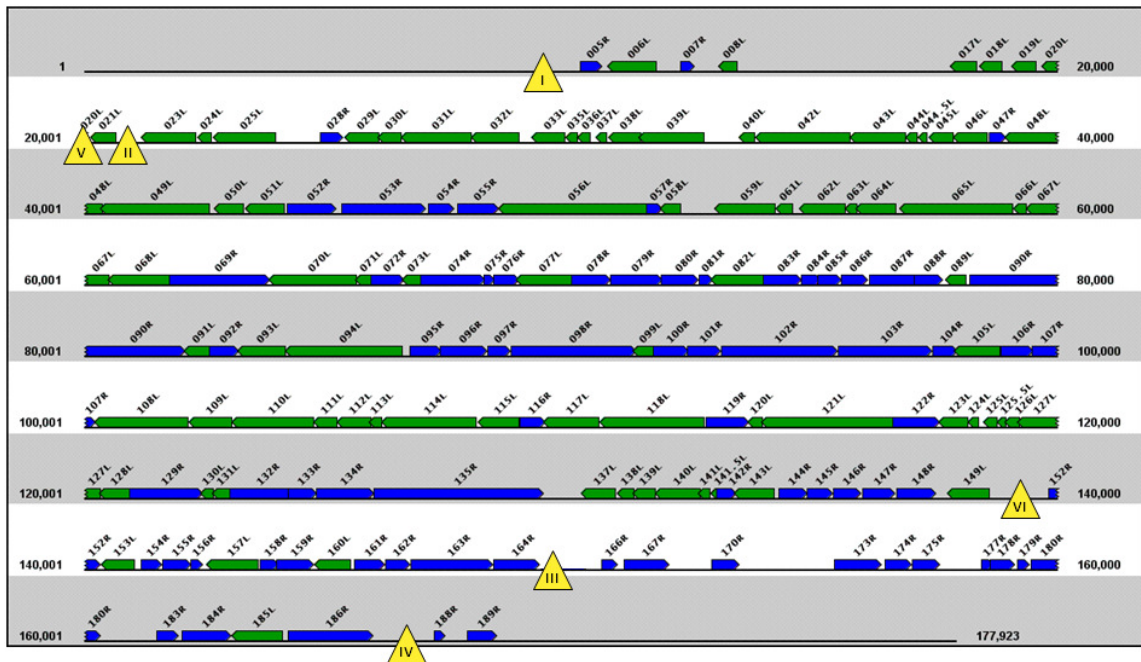


Figura 8. Mappatura delle sei delezioni maggiori di MVA. In blu e in verde sono rappresentati gli ORF presenti rispettivamente sul filamento senso e antisenso, alcune delle quali sono sovrapposte. I triangoli gialli identificano la posizione e il numero della delezione, da I a VI.

Efficacia vaccinale di MVA in animali e uomo

È lecito supporre che il maggiore punto di forza di MVA, la completa avirulenza, potrebbe rappresentare anche il suo maggiore svantaggio nei confronti dei virus replicativi come VACV, i quali, in effetti, potendo infettare produttivamente l'ospite, esprimono i TG a livelli più alti (Blanchard et al. 1998; Antoine et al. 1998; Ingo Drexler, Staib, e Sutter 2004; Caroline Staib et al. 2005). Ciononostante, si può assumere che l'effetto immunostimolante legato alla mancanza di inibitori immunologici possa in qualche modo agire in senso positivo, compensando tale svantaggio. È bene comunque tenere a mente che, trattandosi di un vettore virale, l'uso ripetuto di MVA nello stesso soggetto induce inesorabilmente una risposta immunitaria, determinando in ultima analisi una riduzione sensibile dell'efficacia vaccinale. Per tal motivo sono state messe a punto strategie vaccinali alternative, grazie alle quali è possibile incrementare la risposta contro i TG d'interesse pur limitando quella anti-vettore. Le più usate comprendono il *prime* con DNA seguito da un *boost con* MVA, o ancora un *prime* con MVA seguito da un *boost* con vettori virali correlati, ad esempio *Fowlpox* o *Adenovirus*, o viceversa. Considerati i risultati già citati in precedenza e ottenuti attraverso la delezione delle proteine A35 e C12L o l'introduzione di CD40L, è auspicabile pensare che saranno presto identificati altri geni in grado, questa volta, di diminuire la risposta contro il vettore, consentendo un maggior numero di vaccinazioni con MVA. La risposta contro il vettore, comunque,

non interferisce in alcun modo con l'immunogenicità legata ai TG portati, come dimostrato in uno studio del 2004 (Z. Wang et al. 2004).

Prese insieme, tutte queste qualità rendono conto dell'efficacia *in vivo* di MVA come vettore per uso vaccinale in modelli animali, come ad esempio nei confronti di SIV (Hirsch et al. 1996; Hanke et al. 1999; Barouch et al. 2001), peste equina africana (Alberca et al. 2014; Calvo-Pinilla et al. 2014), malaria (Schneider et al. 1998), influenza (G Sutter, Wyatt, et al. 1994; Hessel et al. 2010; Hessel et al. 2011; Mullarkey et al. 2013; Kamlangdee et al. 2014), parainfluenza (L S Wyatt et al. 1996), morbillo (Weidinger et al. 2001), Chikungunya Virus (van den Doel et al. 2014), HIV (Hallengård et al. 2012) e finanche tumori (I Drexler et al. 1999; Rosales et al. 2000; Mulryan et al. 2002; Hodge et al. 2003; Espenschied et al. 2003; Ishizaki et al. 2010). Di particolare interesse è un recentissimo studio, nel quale MVA è stato impiegato in associazione con altri vettori per scatenare una risposta immunitaria duratura contro il virus dell'ebola (Stanley et al. 2014)

La medesima sicurezza ed efficienza osservata negli animali è stata riscontrata anche nell'uomo, come dimostra il caso della vaccinazione antivaiole promossa in Germania agli inizi degli anni '70 in soggetti a rischio per la vaccinazione tradizionale (Mayr, Hochstein-Mintzel, e Stickl 1975; Gerd Sutter e Staib 2003), o anche il più recente *trial* effettuato in soggetti con dermatite atopica (Sonnenburg et al. 2014).

MVA deve la sua efficacia in qualità di vaccino alla capacità di esprimere ad alti livelli i TG da lui portati, poiché il blocco della replicazione, come già detto, avviene soltanto nella fase del *packaging*. I TG, dopo la traduzione, possono quindi essere processati dalla cellula ospite e presentati nel contesto di MHC Classe-I, attivando linfociti T CD8⁺ specifici, (ad esempio (Zhang et al. 2007; Krishnan et al. 2008)). In aggiunta a ciò, come mostrato da recenti evidenze sperimentali (Gasteiger et al. 2007), processi quali il *cross-priming* (Albert, Sauter, e Bhardwaj 1998) potrebbero essere coinvolti, inducendo un ulteriore *boost* della risposta immunitaria cellulo-mediata. Da ultimo, compatibilmente con l'immunogenicità intrinseca dei TG espressi, anche il ramo umorale può essere attivato, scatenando in ultima analisi una potente risposta anticorpale, come nel caso degli antigeni influenzali HA e NP (G Sutter, Wyatt, et al. 1994; Ramírez et al. 2000; Florek et al. 2014). Premesso questo, è facile dedurre che l'impiego di MVA in qualità di vettore vaccinale nell'uomo possa essere estremamente eterogeneo in quanto a patologie compatibili col suo utilizzo (Gerd Sutter e Staib 2003), come ad esempio SARS (Chen et al. 2005), malaria (Moorthy et al. 2003; Kimani et al. 2014; Bauza et al. 2014), HCV (Swadling et al. 2014; Di Bisceglie et al. 2014) e HIV (Cosma et al. 2003; Mwau et al. 2004; Currier et al. 2010; Keefer et al. 2011; Climent et al. 2014; Goepfert et al. 2014), in protocolli sia profilattici sia terapeutici. Risultati per il momento negativi sono invece stati ottenuti

con la tubercolosi (Tameris et al. 2013; Andersen e Woodworth 2014), benché le premesse fossero state incoraggianti (Xing et al. 2005).

Anche in ambito tumorale MVA potrebbe dimostrarsi un fondamentale alleato come dimostrato dagli incoraggianti risultati *in vitro* ottenuti nei confronti del carcinoma naso-faringeo associato a EBV (Taylor et al. 2004). Studi clinici hanno inoltre dimostrato l'efficacia vaccinale del virus MVA esprimente l'antigene E2 di HPV (Gutierrez et al. 2002; Hui et al. 2013). Altri esempi di rMVA esprimenti antigeni associati ai tumori (TAA) sono presenti in letteratura. Un primo esempio è il virus MVA esprimente l'antigene MUC1 (TG4010), giunto in fase II con eccellenti risultati nei confronti dei tumori esprimenti MUC1 (Rochlitz et al. 2003; Acres 2007; Dreicer et al. 2009; Limacher e Quoi 2012). Un secondo esempio, sempre positivo, è il virus MVA-p53 (overesprimente p53), in grado di aumentare i linfociti CD8⁺ p53-specifici in tumori gastrointestinali refrattari (Song et al. 2007; Song et al. 2011; Hardwick et al. 2014). Sono però anche presenti dati contrastanti: ad esempio, il virus esprimente l'antigene tumorale 5T4 (MVA-5T4, TroVAX), per il quale è presente una nutrita bibliografia (Harrop et al. 2007; Tykodi e Thompson 2008; Kaufman et al. 2009; Amato et al. 2010; D. W. Kim et al. 2010; Amato e Stepankiw 2012; Said e Amato 2013; Amato et al. 2014) è giunto in fase III nonostante i risultati preclinici fossero controversi (D. W. Kim et al. 2010; Hanwell et al. 2013), e richiederà, quindi, ulteriori approfondimenti, soprattutto per quanto riguarda i pazienti in grado di beneficiarne. È bene sottolineare che molti di questi virus sono combinati con molecole adiuvanti che potenziano l'effetto vaccinale, come ad esempio citochine (Rochlitz et al. 2003) o molecole costimolatorie (Hodge et al. 2003).

In conclusione, è possibile affermare che l'importanza di MVA in qualità di vaccino è ben supportata dalla letteratura presente e che numerosi *trial* di fase I, II e III coinvolgenti l'uso di tale vettore sono stati completati o sono al momento in corso. Ad esempio, in Belgio, a partire dal 1996, sei studi clinici hanno visto MVA impiegato come vettore vaccinale (B-GT/11, B-GT/12, B-GT22, B-GT/24 e BGT/26, consultabili alla pagina http://www.biosafety.be/GT/Regulatory/Table_1.html) (Goossens et al. 2013); o ancora, l'Organizzazione Mondiale della Sanità ha dato inizio a 26 *trial* clinici, molti dei quali ancora in corso (reperibili alla pagina <http://apps.who.int/trialsearch/> eseguendo una ricerca con le parole chiave "Modified Vaccinia Ankara"); negli Stati Uniti, infine, ben 59 *trial* sono stati iniziati a partire dal 2003 e alcuni di essi sono stati di recente conclusi con risultati positivi (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?term=modified+vaccinia+ankara>).

MVA contenenti più transgeni

I vaccini disponibili in commercio sono spesso costituiti da un insieme di antigeni, allo scopo di indurre una risposta multipla con un solo ciclo vaccinale: ad esempio, il vaccino trivalente MPR consente la vaccinazione contro morbillo, parotite e rosolia con un'unica formulazione; oppure, il vaccino anti-influenzale, contenendo al suo interno antigeni provenienti da diversi ceppi circolanti, è in grado di stimolare la risposta immunitaria in maniera più efficiente.

Traslando questo concetto sui virus ricombinanti, MVA è sicuramente uno tra i più adatti per quanto riguarda la possibilità di allocare più TG considerando che, avendo perso più di 20kb, possiede una flessibilità genomica davvero notevole. Questo si rivela particolarmente utile in diversi casi. Ad esempio, qualora vi fosse la necessità di adiuvare la risposta immunitaria stimolata da un rMVA impiegando molecole specifiche (come nel caso di citochine o molecole costimolatorie), avere a disposizione un rMVA multiplo permetterebbe di semplificare il *gene delivery* e diminuire la dose virale utilizzata in maniera proporzionale ai TG veicolati, riducendo al contempo la risposta contro il vettore (Rochlitz et al. 2003; Hodge et al. 2003). Parimenti, qualora si volesse studiare l'effetto di una vaccinazione combinata con più antigeni contro lo stesso patogeno, ad esempio influenza, veicolare più TG usando un unico vettore avrebbe il medesimo impatto positivo sull'efficacia finale (Berthoud et al. 2011; Lillie et al. 2012; Powell et al. 2013; Mullarkey et al. 2013; Antrobus et al. 2013; Hessel et al. 2014).

I metodi di ingegnerizzazione descritti in letteratura che permettono la costruzione di MVA contenenti più TG (mrMVA) sfruttano principalmente la possibilità di generare geni di fusione (Poon et al. 2009; Kolibab et al. 2010; Berthoud et al. 2011; Altenburg et al. 2014), eventualmente clivati in un secondo momento, oppure utilizzano promotori multipli all'interno dello stesso sito (Brevetto EP1916306A1). Queste strategie, benché funzionali, sottopongono il prodotto finale a limiti notevoli. In primo luogo, l'espressione di più proteine sottoforma di gene di fusione può ridurre o alterare la funzionalità delle singole unità, ad esempio interferendo col *folding* o causando problemi di ingombro sterico. In secondo luogo, la trascrizione di più geni contenuti nello stesso *locus* in tandem o in orientamento inverso non è indipendente e fenomeni di competizione ancora una volta per ingombro sterico o per ridotta efficienza di uno dei promotori, ad esempio, compromettono l'equimolarità dei trascritti. Nella maggior parte dei casi, questo non è un prerequisito per la funzionalità del vaccino. Risulta tuttavia fondamentale qualora i TG inseriti in MVA dovessero assemblarsi in precisi rapporti stechiometrici. La subunità in eccesso potrebbe infatti aggiungere ulteriore stress ad una cellula già sofferente a causa dell'infezione virale, ad esempio inducendo UPR o legandosi in maniera aspecifica ad altre proteine cellulari, riducendo in definitiva l'efficienza dell'intero sistema di espressione.

Introduzione – Parte II

3. Il complesso maggiore di istocompatibilità di Classe-II

Col termine “complesso maggiore di istocompatibilità” (MHC) si fa riferimento alle glicoproteine coinvolte nel processo di presentazione degli antigeni ai recettori TCR dei linfociti T. Dal momento che i TCR non sono in grado di riconoscere l’antigene libero ma hanno bisogno che venga rielaborato e presentato dalle proteine del MHC, è chiaro che queste ultime rivestono un ruolo centrale nell’induzione della risposta immunitaria acquisita (Pier, Lyczak, e Wetzler 2004; Robinson e Delvig 2002).

I geni appartenenti al MHC sono altamente polimorfici e si trovano organizzati in un unico *locus* che, nell’uomo, è posizionato sul braccio corto del cromosoma 6 e si estende per circa 4Mb (Figura 9A). All’interno di questo *locus* sono presenti tre classi distinte di MHC, delle quali però solo due, Classe-I e Classe-II, sono coinvolte nella presentazione antigenica. Ognuna di queste due classi codifica per proteine funzionalmente correlate, rispettivamente HLA-A/B/C per la Classe-I e HLA-DP/DQ/DR per la Classe-II. I geni appartenenti alla Classe-III codificano invece per proteine correlate con l’immunità innata (alcuni componenti del sistema del complemento, TNF α , TNF β) o completamente scorrelate col sistema immunitario (in particolare, due *Heat Shock Protein*).

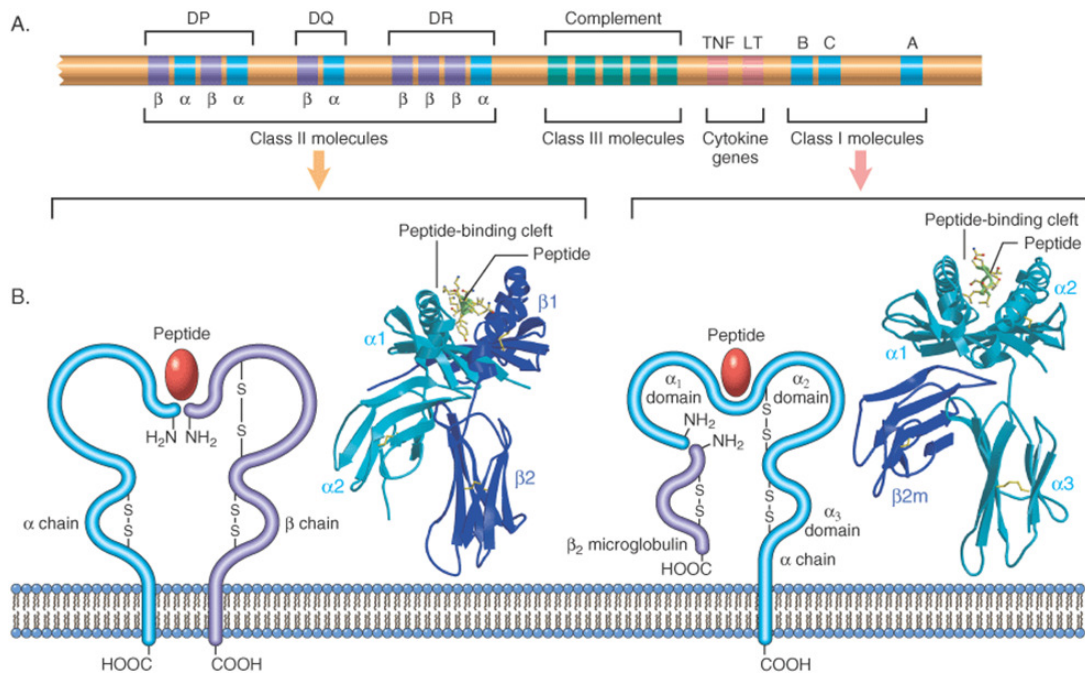


Figura 9. Organizzazione del locus MHC umano (A) e struttura eterodimerica delle proteine appartenenti alla Classe-II (B, sinistra) e Classe-I (B, destra).

La Classe-I è espressa sulla superficie di tutte le cellule nucleate (non quindi i globuli rossi, ad esempio) e ha il compito di presentare gli antigeni citoplasmatici ai linfociti T CD8⁺: il riconoscimento di antigeni *non-self* scatena la risposta citotossica dei CD8⁺ che porta alla lisi delle cellule bersaglio. Le proteine appartenenti alla Classe-I sono costituite da un eterodimero formato da una grande catena di transmembrana (catena α) associata a una piccola proteina globulare (β₂-microglobulina). La catena α è composta da tre domini, uno prossimale alla membrana e appartenente alla famiglia delle immunoglobuline (α₃) e due distali (α₂ e α₁), questi ultimi formanti il solco antigenico in grado di accogliere i peptidi (8-10 a.a.) (Figura 9B). La derivazione di tali peptidi è normalmente intracitoplasmatica, legata all'attività costitutiva del proteasoma e a quella indotta da IFN-γ dell'immunoproteasoma. Il processo attraverso il quale gli antigeni vengono caricati nel solco della Classe-I è stato finemente studiato e coinvolge, oltre ai proteasomi, un complesso trasportatore dei peptidi (TAP) e diverse *chaperonine* reticolari (tapasina, calnexina, calreticulina), la cui funzione è quella di stabilizzare il complesso catena α/β₂-microglobulina durante la traduzione, il *folding* e fino all'effettivo legame col peptide antigenico. Vi è l'evidenza di un ulteriore *pathway*, denominato *cross-priming* (Albert, Sauter, e Bhardwaj 1998), nel quale peptidi esogeni, fagocitati da cellule specializzate come ad esempio le cellule dendritiche (DC), vengono comunque ripresentati in Classe-I.

Le proteine della Classe-II sono invece fisiologicamente espresse da un ristretto gruppo di cellule denominate cellule presentanti l'antigene (APC). Tra le APC, le DC e i linfociti B esprimono la Classe-II in maniera costitutiva, mentre i macrofagi richiedono l'attivazione da parte dell'antigene prima di acquisire il fenotipo Classe-II⁺. Eccezionalmente, anche fibroblasti, astrociti, cellule endoteliali e cellule epiteliali possono assumere un fenotipo Classe-II⁺ in seguito a forte stimolazione da parte di IFN- γ , e l'espressione può essere ulteriormente modulata da TGF- β , IFN- β , TNF, IL-1, IL-10 o l'infezione da parte di vari patogeni (Reith, LeibundGut-Landmann, e Waldburger 2005). Le proteine della Classe-II mediano la presentazione di antigeni extracellulari ai linfociti T-*helper* CD4⁺, contribuendo all'attivazione del ramo umorale della risposta immunitaria e fornendo le basi per l'ADCC. Sono anch'esse costituite da un eterodimero che però, a differenza della Classe-I, è formato da due catene di peso simile (33KDa e 28KDa, rispettivamente catena α e β) (Figura 9B). La tasca di legame dell'antigene, che si forma all'interfaccia tra le due catene, risulta più grande e più aperta rispetto a quella della Classe-I e accoglie peptidi di dimensioni maggiori (almeno 13-18 a.a.). Il processo che porta al caricamento degli antigeni sulla Classe-II è schematizzato in Figura 10. Durante la traduzione delle catene α e β , la tasca di legame si lega a molecole dette catene invarianti (Ii) a formare un trimero che, in un secondo momento, si associa ulteriormente in nonameri, composti da tre catene α , tre catene β e tre catene Ii (punto 1). La funzione di Ii è triplice: guida il *fold*ing della Classe-II, previene l'associazione con altri peptidi presenti nel RE e destinati alla Classe-I e fornisce un segnale di localizzazione verso il percorso lisosoma-endosomale. Le vescicole contenenti i nonameri, superato il Golgi, giungono in prossimità degli endosomi, con i quali si fondono a formare le *vescicole contenenti la classe II* (MIIC). Nelle MIIC, le peptidasi lisosomali clivano le catene Ii, e corti peptidi rimangono nella tasca di legame dell'antigene (CLIP) (punto 2): il complesso $\alpha\beta$ CLIP è ora pronto per accogliere i peptidi antigenici derivanti dal comparto del fagolisosoma. Oltre al MHC di Classe-II, le MIIC contengono altre proteine, chiamate HLA-DM e HLA-DO (punto 3), deputate alla regolazione della rimozione di CLIP e dell'inserimento dei peptidi antigenici nella tasca di legame del dimero $\alpha\beta$ (punti 4 e 5). È presente anche un'ulteriore proteina, HLA-DN, ma il suo ruolo è ancora poco chiaro.

La presentazione in Classe-II è implicata in diversi processi, tra i quali la selezione timica (positiva e negativa) dei recettori TCR appartenenti ai linfociti CD4⁺ in fase di maturazione, l'omeostasi dei linfociti CD4⁺ maturi nella periferia, l'iniziazione e la regolazione della risposta umorale nei confronti di patogeni e tumori e, infine, il mantenimento della tolleranza verso il *self*, di fondamentale importanza per scongiurare l'insorgere di malattie autoimmuni (Reith, LeibundGut-Landmann, e Waldburger 2005). La centralità del suo ruolo correla perfettamente con la complessa regolazione a cui la sua espressione è sottoposta.

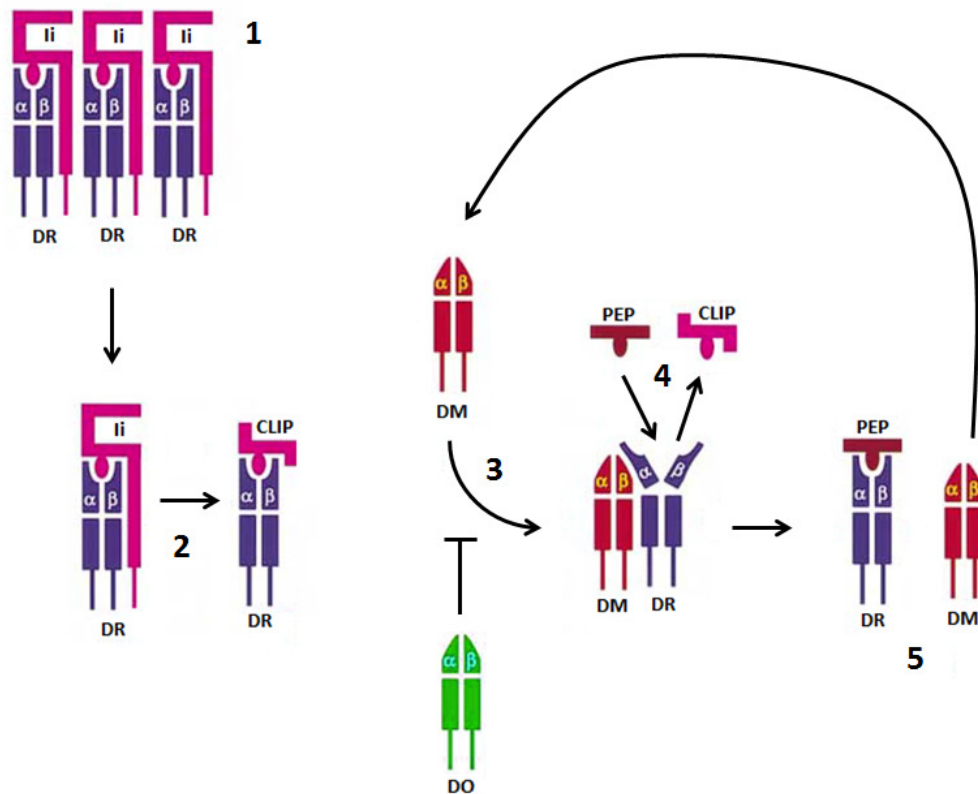


Figura 10. Processo di caricamento degli antigeni nel contesto dell'MHC di Classe-II. Il nonamero formato da tre catene α , tre catene β e tre catene Ii (punto 1) viene veicolato attraverso ER e Golgi per raggiungere gli endosomi. Al loro interno, le peptidasi lisosomiali clivano le catene Ii, lasciando i corti peptidi CLIP nella tasca di legame dell'antigene (punto 2). Le vescicole contenenti la Classe-II (in questo caso, HLA-DR) possono a questo punto fondersi con i fagolisosomi ed entrare in contatto con gli antigeni. HLA-DM e HLA-DO regolano rispettivamente in modo positivo e negativo (punto 3) la rimozione di CLIP e il legame ai peptidi antigenici (PEP) (punto 4). Il complesso HLA-DR, caricato con l'antigene, può quindi essere inviato in membrana e HLA-DM riciclato per continuare a promuovere lo scambio CLIP-antigeni (punto 5).

3.1 Regolazione trascrizionale del locus MHC Classe-II

L'espressione delle proteine appartenenti alla Classe-II è finemente regolata a livello trascrizionale da un elemento piuttosto complesso situato 150-300bp a monte del sito di inizio della trascrizione. Tale elemento è costituito da un modulo SXY ben conservato tra i vertebrati, formato dai *box* S, X, X2 e Y organizzati in maniera ben precisa (Reith e Mach 2003; Jenny Pan-Yun Ting e Trowsdale 2002; Boss e Jensen 2002). Il modulo SXY è presente anche a monte dei geni codificanti per Ii, DM e DO, richiesti, come visto prima, per il corretto funzionamento delle molecole della Classe-II. Altri moduli SXY sono stati inoltre individuati lungo l'intero *locus* della Classe-II e nel primo introne di Ii, con probabile funzione di *enhancer* della trascrizione (Krawczyk et al. 2004). Curiosamente, sono stati identificati *stretch* nucleotidici simili al modulo SXY anche nei promotori per la Classe-I, ad indicare la probabile esistenza di meccanismi di *cross-talk* tra i due *pathway* (Reith e Mach 2003; Reith, LeibundGut-Landmann, e Waldburger 2005; Jenny Pan-Yun Ting e Trowsdale 2002; Boss e Jensen 2002).

Il meccanismo attraverso il quale viene iniziata la trascrizione dei geni della Classe-II è guidato da quattro fattori transattivatori (CIITA, RFX5, RFXAP e RFXANK), scoperti studiando individui affetti da BLS (bare lymphocyte syndrome) di tipo II e linee cellulari con difetti di espressione della Classe-II (Klein et al. 1993; R S Accolla 1983; R S Accolla et al. 1986). RFX5, RFXAP e RFXANK, ubiquitari, formano il complesso eterotrimerico RFX che lega specificamente il *box X* del modulo SXY (Figura 11). In seguito al legame, RFX media l'ancoraggio ai *box X2* e *Y* rispettivamente dei fattori di trascrizione CREB (Moreno et al. 1999) e NFY (Mantovani 1999). Per quanto riguarda il *box S*, saggi *in vitro* hanno dimostrato che potrebbe essere legato da RFX, ma i dati sono ancora scarsi (Annick Muhlethaler-Mottet et al. 2004) e la sua funzione rimane pertanto sconosciuta. Il complesso multiproteico formato da RFX/CREB/NFY, conosciuto come *MHC Class-II enhanceosome*, funge da piattaforma per il quarto transattivatore, CIITA, senza il quale la trascrizione non può essere iniziata (Boss e Jensen 2002; Jenny Pan-Yun Ting e Trowsdale 2002; Masternak et al. 2000; Reith e Mach 2003). A differenza dei fattori costituenti l'"enancesoma", l'espressione di CIITA non è ubiquitaria ma finemente regolata da un complesso apparato trascrizionale, e la sua attività può essere ulteriormente modulata a livello post-traduzionale, seppur in maniera limitata (vedi Capitolo 4). CIITA, nella sua funzione in qualità di transattivatore, non lega direttamente il DNA ma adotta altri meccanismi: è in grado di reclutare i fattori di trascrizione TFIIB e TFIID (J D Fontes, Jiang, e Peterlin 1997; Mahanta et al. 1997) e di interagire con P-TEFb (Kanazawa, Okamoto, e Peterlin 2000), induce la fosforilazione della RNA polimerasi II (Spilianakis et al. 2003) e richiama molteplici fattori di rimodellamento della cromatina (Mudhasani e Fontes 2002; Mudhasani e Fontes 2005; Zika e Ting 2005; Wright e Ting 2006), agendo inoltre esso stesso da HAT (A Raval et al. 2001). È stato infine recentemente proposto che l'attività di CIITA potrebbe anche dipendere dalla capacità di omodimerizzare (Devaiah e Singer 2013). Rivestendo un ruolo centrale nella regolazione dell'espressione della Classe-II, CIITA ne è considerato a tutti gli effetti il *master control regulator* e verrà pertanto ulteriormente approfondito.

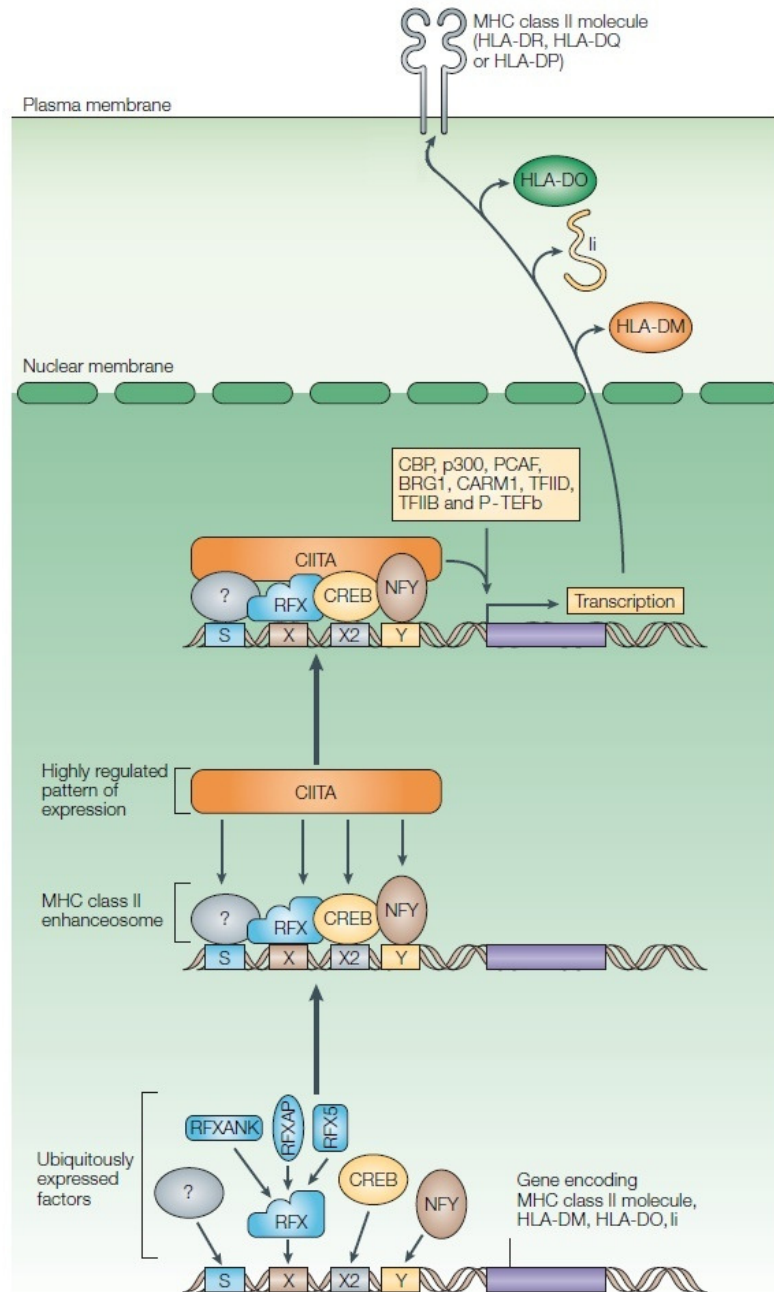


Figura 11. Riassunto della transattivazione del locus MHC di Classe-II. Il complesso RFX recluta CREB e NFY a formare l'enhanceosoma. Quest'ultimo funge a sua volta da piattaforma per CIITA, il quale recluta fattori di iniziazione e fattori rimodellanti della cromatina, dando inizio all'espressione dei geni presenti a valle del promotore.

4. CIITA, il *master control regulator* della Classe-II

Il gene CIITA umano (detto anche C2TA o MHC2TA) è stato scoperto nel 1993 attraverso saggi di complementazione in cellule RJ2.2.5, negative per Classe-II (Steimle et al. 1993). Posizionato in 16p13, codifica, come visto prima, per il transattivatore del complesso maggiore di istocompatibilità di Classe II. L'omologia di sequenza con l'ortologo murino è circa del 70%, pertanto il gene CIITA umano è in grado di transattivare i geni contenuti nel *locus* della Classe-II dei topi, come confermato da dati di letteratura (Mortara et al. 2006).

4.1 Controllo dell'espressione genica e struttura di CIITA

La regolazione dell'espressione di CIITA avviene in gran parte a livello trascrizionale, sebbene esistano ulteriori meccanismi post-trascrizionali e post-traduzionali che regolano la stabilità e funzionalità rispettivamente dell'mRNA e della proteina (De Lerna Barbaro et al. 2005; Wu et al. 2009). La trascrizione di CIITA è affidata a una regione che contiene quattro diversi promotori (Figura 12) (A Muhlethaler-Mottet et al. 1997). Tre di questi, pI, pIII e pIV, sono conservati nel topo e sono stati oggetto di numerosi studi che ne hanno chiarito il funzionamento. pII è invece presente unicamente nella porzione regolatoria umana e, per questo motivo, non sono presenti dati sufficienti. pI, pIII e pIV sono seguiti da un esone 1 alternativo promotore-specifico (in arancione) che viene unito per *splicing* alla restante porzione comune di 18 esoni (verde), originando almeno tre diversi trascritti. In *Ensemble* sono riportate in totale 16 varianti di *splicing* relative unicamente all'isoforma trascritta da pIII (Figura 13), pertanto è lecito supporre che ancora molto resti da scoprire. Negli esoni alternativi a valle di pI e pIII sono presenti due codoni AUG che codificano per porzioni N-terminali specifiche: questo rende conto delle due isoforme di CIITA più lunghe, rispettivamente di 132KDa (pI) e 124KDa (pIII). Inoltre, all'interno dell'esone 2, è presente un ulteriore codone di inizio della traduzione, comune quindi a tutti i trascritti, che dà origine ad una terza isoforma, la più corta, di 121KDa. Ognuna di esse è in grado di legare l'enancosoma e di transattivare i geni contenuti nel *locus* della Classe-II, benché l'isoforma prodotta da pI risulti più efficiente (Nickerson et al. 2001).

La struttura di CIITA è abbastanza complessa e contiene una serie di domini regolatori che, nel loro insieme, permettono di inserire CIITA nella famiglia CATERPILLER (Caspase-recruitment domain (CARD), transcription enhancer, R (purine)-binding, pyrin, lots of LRRs) (Jenny P-Y Ting e Davis 2005), alla quale appartengono molte proteine implicate in immunità e apoptosi e le cui forme mutate sono alla base di alcuni disordini immunitari o infiammatori (ad esempio NOD1/2, CIAS1 – noto come criopirina – e CIITA) (Reith, LeibundGut-Landmann, e Waldburger 2005). All'interno di CIITA è

possibile individuare un dominio di attivazione (AD), in grado di legare fattori di trascrizione e la proteina legante CREB (CBP); un dominio acetiltransferasico (AT); una serie di domini ricchi in prolina, serina e treonina (PST); un dominio legante il GTP (GBD) e una porzione terminale ricca in leucina (LRR), fondamentali per il legame con l'enanceosoma (Harton e Ting 2000), il retrotrasporto nel nucleo (Aparna Raval et al. 2003), la dimerizzazione (Schnappauf et al. 2003) e la regolazione dell'attività transattivatoria (Linhoff et al. 2001; Chin, Li, e Ting 1997; S B Hake et al. 2000); una serie di segnali di localizzazione nucleari (NLS), che lavorando a stretto contatto col GBD controllano la corretta localizzazione di CIITA; infine, un dominio coinvolto nella degradazione della proteina attraverso ubiquitinilazione (Schnappauf et al. 2003). A questi, e unicamente per quanto riguarda la proteina espressa da pI, si aggiunge un ulteriore dominio CARD all'N-terminale, responsabile molto probabilmente della maggiore attività transattivatoria espletata dall'isoforma di 132KDa (Nickerson et al. 2001).

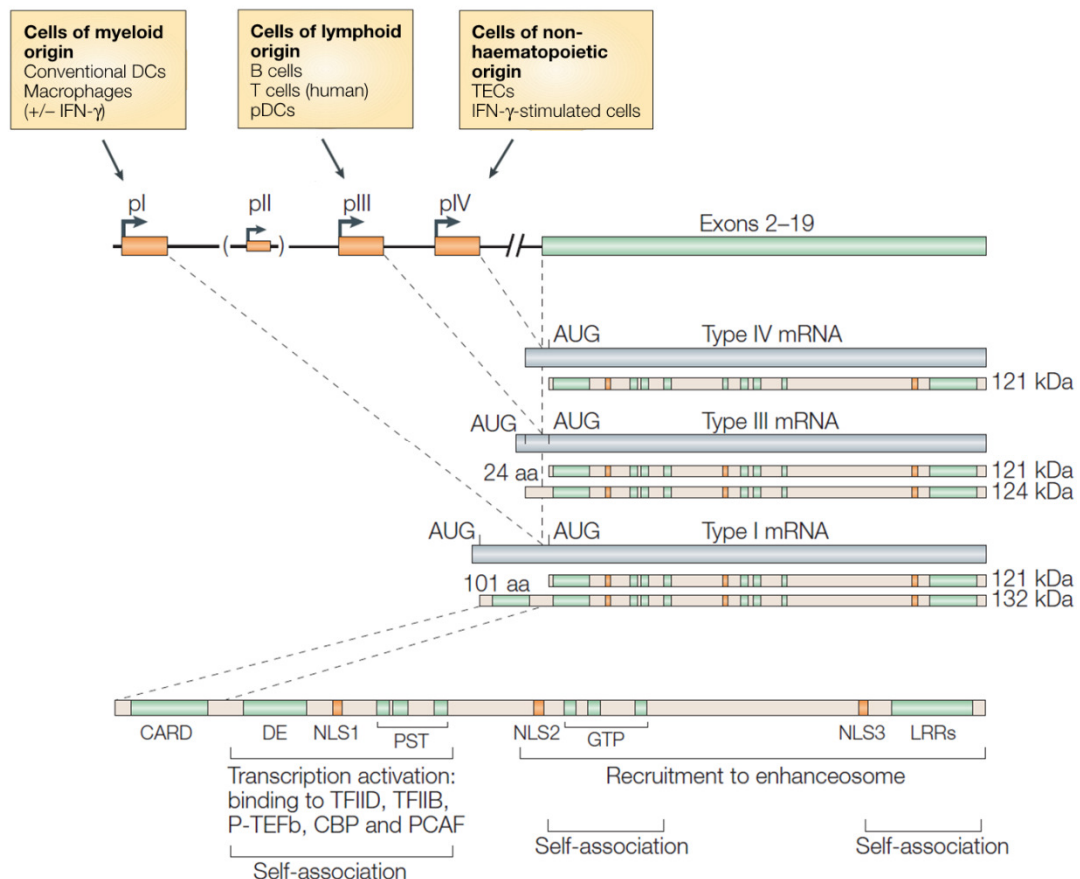


Figura 12. Struttura della regione regolatoria di CIITA contenente i quattro promotori, analisi dei trascritti principali e illustrazione dei domini proteici. I trascritti derivanti da pI, pIII e pIV codificano per tre isoforme da 132KDa, 124KDa e 131 KDa che si differenziano unicamente per la porzione N-terminale. La regione comune contiene uno *stretch* acido (DE), tre segmenti ricchi in prolina, serina e treonina (PST), un dominio centrale di legame al GTP, una serie di ripetizioni ricche in leucina (LRR) e almeno tre segnali di localizzazione nucleare (NLS1-3). L'N-terminale svolge un ruolo chiave nell'attivazione della trascrizione essendo in grado di legare fattori di trascrizione e regolatori (dominio di attivazione). La porzione centrale e il C-terminale sono invece implicati nell'omodimerizzazione e nel riconoscimento dell'enanceosoma. L'isoforma prodotta da pI contiene un dominio addizionale, CARD, probabilmente responsabile della sua maggiore efficacia in qualità di transattivatore.



Figura 13. Rappresentazione schematica delle 16 varianti di splicing del gene CIITA derivanti dall'attività del promotore pIII. Il trascritto principale, CIITA-001, possiede una regione 3'UTR particolarmente estesa e codifica per l'isoforma 2 (1130 a.a. NM_000246, NP_000237).

La presenza di quattro diversi promotori suggerisce che l'attività di ognuno di essi potrebbe essere associata a un diverso *lineage* cellulare. Esperimenti preliminari mostrano in effetti che pI è maggiormente utilizzato nelle DC, pIII è attivo unicamente nelle cellule B e pIV è sensibile all'IFN- γ (A Muhlethaler-Mottet et al. 1997; A Muhlethaler-Mottet et al. 1998). Attraverso una lunga serie di studi *in vitro* e *in vivo* su modelli murini recanti specifiche delezioni nei promotori, questo quadro piuttosto semplice è stato ulteriormente indagato e rifinito (Reith, LeibundGut-Landmann, e Waldburger 2005).

I risultati mostrano che il promotore pIV (Figura 14A) è necessario per l'espressione di CIITA nelle cellule non ematopoietiche, mentre nei macrofagi non riveste un ruolo fondamentale. Per un corretto funzionamento, inoltre, il pIV richiede l'intervento di proteine coinvolte nel rimodellamento della cromatina (come ad esempio BRG1), ed è stato scoperto che il legame di STAT1, mediatore della trasduzione del segnale proveniente dal legame di IFN- γ col suo recettore, è sufficiente per indurre l'acetilazione locale degli istoni (Wright e Ting 2006).

Per quanto riguarda pIII (Figura 14B), l'iniziale osservazione del suo coinvolgimento nell'induzione di CIITA nei linfociti B è stata confermata. Curiosamente, pIII è anche implicato nella trascrizione di CIITA all'interno delle DC plasmacitoidi (pDC), a differenza delle DC convenzionali che utilizzano pI: questo potrebbe essere spiegato dall'evidenza che le pDC sembrano più vicine alle cellule di derivazione linfoide e, pertanto, potrebbero sfruttare meccanismi di attivazione analoghi a quelli linfocitari piuttosto che quelli mieloidi. Ci potrebbero essere tuttavia delle discrepanze specie-specifiche, poiché il promotore pIII umano è dotato di un *enhancer* responsivo all'IFN- γ , assente

invece nel topo. Da ultimo, anche la regolazione epigenetica potrebbe avere un ruolo nell'attivazione del pIII, benché i dati siano ancora non sufficienti (Wright e Ting 2006).

Riguardo al promotore pI, invece, i dati sono ancora carenti: come detto sopra, è risaputo essere responsabile dell'espressione di CIITA all'interno di tutte le DC convenzionali (ma non le pDC) e non sembra dipendere dall'IFN- γ , benché l'effettivo meccanismo molecolare non sia stato ancora chiarito.

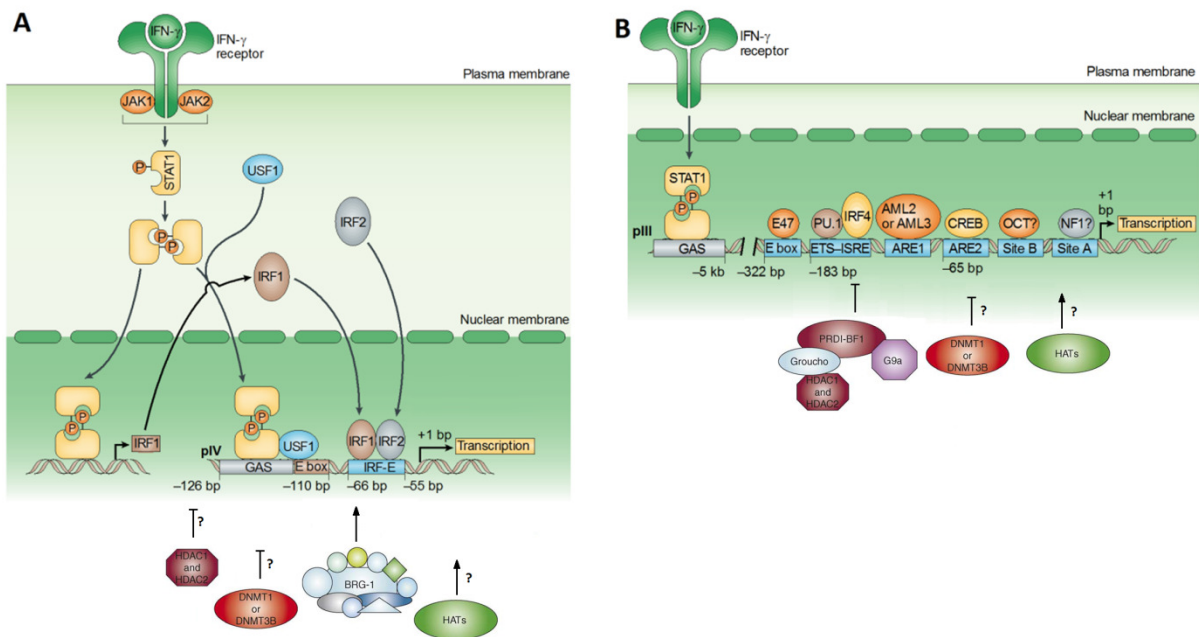


Figura 14. Meccanismo di funzionamento dei promotori pIV (A) e pIII (B). **A)** Il promotore pIV viene attivato in risposta al legame dell'IFN- γ col suo recettore. In seguito ad attivazione delle JAK1/2, STAT1 viene fosforilato, dimerizza e trasloca nel nucleo, dove promuove l'espressione di IRF1. STAT1 viene in seguito reclutato da USF1, con quale si lega al box GAS/E presente nel promotore pIV di CIITA. IRF1, a sua volta, dimerizza con IRF2 e lega il box IRF-E. I quattro fattori possono quindi reclutare i fattori di iniziazione e promuovere la trascrizione di CIITA. Sono inoltre coinvolti vari complessi rimodellatori della cromatina, i quali agiscono in senso sia positivo sia negativo sulla trascrizione di CIITA. **B)** La trascrizione promossa da pIII è regolata da un numero maggiore di fattori: CREB, legante il box ARE2; AML2 (linfociti B/T) e AML3 (linfociti T), leganti ARE1; E47, legante il box E; PU.1/IRF4, il cui dimerico riconosce il box composto ETS-IRSE. Sono stati identificati altri due box, il sito A e il sito B, potenzialmente legati da OCT e NF1 rispettivamente. Il silenziamento epigenetico di pIII nei linfociti B è affidato a BLIMP1 (PRDI-BF1), il quale forma un complesso con il co-repressore Groucho, le HDAC1/2 e la HMT G9a, specifica per la lisina 9 dell'istone H3. Il controllo epigenetico di pIII potrebbe comunque coinvolgere altre HMT o HAT. Nell'uomo, ma non nel topo, è inoltre presente un box GAS sensibile all'IFN- γ a circa 5kb dal promotore.

4.2 L'attività transattivatoria di CIITA

Una volta completata la traduzione, CIITA deve poter retrotraslocare nel nucleo per assolvere al suo compito di transattivatore. I meccanismi alla base di tale processo sono stati studiati a fondo e sono stati individuati tre diversi NLS coinvolti nella localizzazione di CIITA unitamente al dominio GBD (Cressman et al. 2001; Bewry et al. 2007). Delezioni o mutazioni in queste regioni interferiscono con

la rilocalizzazione di CIITA all'interno del nucleo, di fatto generando un fenotipo analogo a quello della BLS di tipo II (Cressman et al. 1999).

Una volta nel nucleo, come visto sopra, CIITA è in grado di promuovere l'espressione dei geni presenti nel *locus* della Classe-II, classici e non classici (Sandra B Hake et al. 2003). Sono stati proposti due diversi modelli. Nel primo, più tradizionale, CIITA riconosce e lega l'enceosoma costituito da RFX/CREB/NFY attraverso la porzione C-terminale e recluta i fattori di iniziazione e i complessi rimodellatori della cromatina attraverso il dominio AD all'N-terminale. Più recentemente, in accordo con l'evidenza che CIITA è in grado di dimerizzare, è stata proposta una alternativa nella quale una copia di CIITA, in seguito al riconoscimento dell'enceosoma, ne recluta una seconda già complessata con i fattori di iniziazione. Dopo la dimerizzazione, questa seconda copia va incontro ad autofosforilazione, promuovendo l'inizio della trascrizione (Devaiah e Singer 2013).

Accanto al *locus* della Classe-II, CIITA sembra implicato nella regolazione trascrizionale, positiva o negativa, anche di altri geni (LeibundGut-Landmann et al. 2004), tra i quali la Classe-I (Martin et al. 1997; Sims et al. 2002), IL4 (T. Gourley et al. 1999; Sisk et al. 2000) e FASL (T S Gourley e Chang 2001; Tania S Gourley et al. 2002).

4.3 Implicazione di CIITA nella patologie

Al fine di inibire la risposta immunitaria indotta dalla presentazione degli antigeni nel contesto del MHC di Classe-II, numerosi patogeni hanno messo a punto strategie, più o meno chiarite, che interferiscono con l'espressione o la funzione di CIITA (LeibundGut-Landmann et al. 2004; Reith, LeibundGut-Landmann, e Waldburger 2005). Per citare alcuni esempi, è stato scoperto che la proteina Tat di HIV compete con CIITA nel legame con la ciclina T1, un componente di P-TEFb (Kanazawa, Okamoto, e Peterlin 2000; H. Okamoto et al. 2000). O ancora, una lipoproteina da 19KDa prodotta dal micobatterio della tubercolosi si è rivelata in grado di inibire l'espressione IFN- γ -dipendente di IRF1, bloccando pertanto la trascrizione di CIITA mediata dal pIV (Figura 14A) (Pai et al. 2003). Allo stesso modo, anche il virus della Varicella Zoster inibisce la trascrizione di IRF1, bloccando però l'espressione di STAT-1 α e JAK (Abendroth et al. 2000). Per contro, alcune evidenze mostrano che CIITA è in grado a sua volta di interferire con l'attività di alcune proteine derivanti dai patogeni (R S Accolla et al. 2001), come ad esempio il transattivatore Tat di HIV (Roberto S Accolla et al. 2002) e l'attivatore trascrizionale Tax-2 di HTLV-2 (Casoli et al. 2003).

Considerato il ruolo del promotore pIV nell'induzione del fenotipo Classe-II⁺ in cellule non ematopoietiche, CIITA potrebbe anche essere implicato nell'insorgenza di svariati disordini

immunologici, tra i quali le patologie autoimmuni o il rigetto che si verifica nei trapianti allogenici: sulla superficie degli epitelii e del parenchima degli organi colpiti da tali patologie, infatti, si riscontra spesso la presenza della Classe-II (Guardiola e Maffei 1993). A tal proposito, è anche presente un modello murino di glomerulonefrite, nel quale il decorso della malattia correla e dipende dall'espressione della Classe-II sulle cellule del parenchima renale (S. Li et al. 1998).

4.3.1 CIITA e i tumori

Le molecole appartenenti al MHC ricoprono un ruolo cruciale nella risposta contro gli agenti infettivi e i patogeni, ma la loro utilità non si limita a ciò. Essendo implicate nella presentazione dei TAA, infatti, rappresentano anche una delle strategie di sorveglianza messe a punto dal sistema immunitario per identificare ed eliminare le cellule neoplastiche e pre-neoplastiche (Foss 2002; García-Lora et al. 2003). Detto questo, risulta logico che la downregolazione, anche parziale, dell'MHC sia un tratto comune a molti tumori, poiché permette loro di ridurre la "visibilità" al sistema immunitario. I linfociti T CD8⁺ costituiscono i primi effettori della risposta antitumorale, effettuando la lisi delle cellule presentanti antigeni *non-self* o TAA nel contesto della Classe-I (R. Wang et al. 2002). Per tale motivo, quest'ultima è certamente il bersaglio preferenzialmente downregolato da parte di molti tumori maligni.

L'acquisizione della totale immunità a lungo termine, tuttavia, necessita dell'attività *helper* dei linfociti T CD4⁺ sia durante il *priming* sia nella successiva fase effettrice (Quezada e Peggs 2011): anche la perdita della Classe-II, quindi, è un evento ricorrente, soprattutto per quanto riguarda i tumori ematopoietici (Drénou et al. 2002; Momburg et al. 1987; van den Elsen et al. 2003). A titolo d'esempio, è risaputo che la perdita della Classe-II è un *marker* prognostico negativo per il linfoma diffuso a grandi cellule B (DLBCL) (Rimsza et al. 2005). L'incapacità di esprimere la Classe-II in risposta all'IFN- γ è inoltre spesso associata anche a tumori di origine non ematopoietica, sebbene i dati siano ancora contrastanti (Yazawa et al. 1999; Magner et al. 2000; Naves et al. 2002; van den Elsen et al. 2003; Croce et al. 2003). Il meccanismo attraverso il quale i tumori perdono la capacità, costitutiva o inducibile, di esprimere la Classe-II è legato al silenziamento epigenetico del gene CIITA. In molti tumori, tra i quali leucemie, linfomi, teratocarcinoma, neuroblastoma e tumore polmonare a piccole cellule, le regioni regolatorie corrispondenti ai promotori pIII e pIV risultano infatti ipermetilate (van der Stoep et al. 2002; S. P. Murphy et al. 2002; van den Elsen et al. 2003; Croce et al. 2003; Holling et al. 2003) e pertanto irresponsive all'IFN- γ . In alcune linee di carcinoma a cellule squamose, invece, il silenziamento di CIITA è stato associato a deacetilazione degli istoni (Kanaseki et al. 2003).

In controtendenza rispetto a quanto detto sopra, esistono anche tumori che overesprimono la Classe-II. Alcuni gliomi e melanomi, ad esempio, acquisiscono un fenotipo fortemente Classe-II⁺ attraverso l'attivazione costitutiva di pIV (Goodwin et al. 2001) o di pIII (Deffrennes et al. 2001; Takamura et al. 2004). Anche i mielomi tendono ad attivare in maniera costitutiva il promotore pIV di CIITA (Morimoto et al. 2004), evadendo l'immunosorveglianza attraverso l'induzione dell'anergia nei linfociti T causata dalla mancata co-stimolazione (Cook e Campbell 1999; Crespo et al. 2013).

4.4 Strategie terapeutiche basate sull'uso di CIITA

La comprensione dei meccanismi di regolazione della Classe-II, del suo transattivatore CIITA e degli eventi che stanno alla base della risposta *helper* rappresenta un campo d'indagine molto promettente per l'individuazione di nuove strategie immunoterapeutiche (Reith, LeibundGut-Landmann, e Waldburger 2005; Thibodeau, Bourgeois-Daigneault, e Lapointe 2012). Nei casi in cui l'upregolazione della Classe-II risulti dannosa, ad esempio nelle malattie autoimmuni, l'inibizione dell'espressione di CIITA potrebbe infatti rivelarsi una strategia vincente. Al contrario, l'overespressione di CIITA potrebbe essere indotta per migliorare l'immunogenicità di quei tumori o, in generale, di quei patogeni che sfruttano la downregolazione della Classe-II per impedire lo sviluppo di una corretta risposta immunitaria.

Nella letteratura sono riportati una serie di studi nei quali cellule tumorali, rese positive per la Classe-II attraverso l'overespressione di CIITA, sono state impiegate in protocolli vaccinali per saggiare l'induzione della risposta antitumorale. Studi condotti su un modello di carcinoma mammario murino (TSA) hanno dimostrato che l'overespressione della Classe-II è estremamente efficace nell'aumentare l'immunogenicità e favorire il completo rigetto del tumore, inducendo peraltro una risposta tumore-specifica (Meazza et al. 2003; Mortara et al. 2006; Frangione et al. 2010). L'ulteriore combinazione di tale strategia con il silenziamento della catena invariante li si è mostrata altrettanto efficiente nell'indurre una risposta tumore-specifica in protocolli di vaccinazione/*challenge* con cellule Sal o RM9 (Qiu et al. 1999; Y. Wang et al. 2005). Inoltre, è stato osservato che l'iniezione intratumorale di plasmidi o *Adenovirus* esprimenti CIITA e l'RNA antisense per li è in grado di rallentare la crescita di tumori originati da cellule Renca o ML38, riducendone la massa finale (Lu et al. 2003; G G Hillman et al. 2003), sebbene il meccanismo molecolare non sia stato sufficientemente chiarito (Gilda G Hillman et al. 2004; Dissanayake et al. 2005).

Sebbene i dati finora presentati siano promettenti, è bene ricordare che esistono anche evidenze sperimentali negative. Ad esempio, in un lavoro condotto su carcinoma polmonare (Line1), nel quale linee stabili esprimenti CIITA, CD86 o entrambi i TG sono state generate impiegando vettori

retrovirali, l'overespressione di CIITA ha favorito la crescita tumorale *in vivo*, per di più sinergizzando in maniera negativa con CD86 quando coespresso (Martin, Frelinger, e Ting 1999). La presenza di tumori che non rispondono all'immunoterapia basata su CIITA non è tuttavia un fenomeno inatteso, bensì correla con l'osservazione che alcune neoplasie traggono beneficio dall'espressione della Classe-II, come i mielomi (Cook e Campbell 1999), sfruttando altri meccanismi di difesa dalla risposta immunitaria. Oltre alla già citata induzione dell'anergia, la mancata co-stimolazione induce anche lo sviluppo di cellule T-regolatorie (Corthay 2009; Broere et al. 2011), responsabili del mantenimento della tolleranza periferica, della modulazione della risposta immunitaria e della prevenzione nei confronti di patologie autoimmuni. A conferma di ciò, evidenze cliniche mostrano che la presenza di un infiltrato T-regolatorio nel microambiente tumorale correla con una prognosi negativa (Wolf et al. 2005; Dranoff 2005).

In conclusione, l'identificazione dei tumori nei quali l'overespressione della Classe-II CIITA-indotta correla con un miglioramento del quadro patologico potrebbe rivelarsi un'enorme progresso e fornire uno strumento estremamente efficace nella stimolazione di una risposta tumore-specifica. Tali risposte immunologiche, inoltre, potrebbero essere ulteriormente adjuvate dall'espressione di molecole costimolatorie (ad esempio, CD80/86) o dalla co-somministrazione di citochine (Armstrong et al. 1998; Y. Wang et al. 2005). Tuttavia, dal momento che la variabilità è ampia, l'efficacia di questi approcci profilattici o terapeutici va saggiata caso per caso: l'utilizzo di una adeguata strategia di *gene delivery* permetterebbe quindi di ridurre drasticamente i tempi sperimentali. La trasfezione con agenti chimici (PEI e lipofectamine, ad esempio) o metodi fisici (elettroporazione) è sicuramente il metodo più semplice, sebbene la modesta efficienza rappresenti un limite non indifferente (T. K. Kim e Eberwine 2010). Per ovviare a ciò, è possibile utilizzare sistemi che permettano la generazione di linee stabili, ad esempio introducendo geni per la resistenza agli antibiotici o impiegando vettori retrovirali. Alternativamente, considerando che l'infezione con vettori *Poxvirali* attenuati è un metodo estremamente efficiente, riproducibile e sicuro per indurre l'overespressione transiente del TG di interesse, si potrebbe introdurre l'uso di vettori MVA ingegnerizzati *ad hoc*.

Scopo del lavoro

Le principali caratteristiche di MVA, ossia l'incapacità di replicare in cellule di mammifero e l'espressione ad alti livelli dei TG veicolati, lo hanno reso un eccellente candidato in qualità di vettore sia d'espressione sia vaccinale. L'interesse che questo virus ha suscitato in ambito scientifico e medico ha certamente fornito una notevole spinta all'ideazione di nuove strategie volte alla sua manipolazione ed ingegnerizzazione: il filo conduttore di questo lavoro di tesi, suddivisa in due parti, si inserisce all'interno di quest'ultimo ambito di ricerca, nel tentativo di rendere MVA un vettore sempre più duttile, potente e versatile nell'ambito della ricerca sia di base sia clinica.

Un metodo estremamente intuitivo per migliorare l'efficienza di un vettore di espressione consiste nella possibilità di introdurre diversi TG al suo interno. Sebbene per altri vettori questo possa rappresentare un limite, MVA si rivela più che adatto poiché, avendo perso più di 20kb, possiede una flessibilità genomica notevole. Metodi per la generazione di virus MVA esprimenti diversi TG (mrMVA) sono già descritti in letteratura, ma non si sono dimostrati completamente soddisfacenti, soprattutto per quanto concerne l'indipendenza trascrizionale e traduzionale dei TG. Il primo scopo di questo lavoro di tesi è quindi quello di fornire ulteriori strumenti per l'ingegnerizzazione dei vettori *Poxvirali* MVA esprimenti più TG, contribuendo ad aumentarne la versatilità.

Nel campo dell'immunoterapia, l'overespressione della Classe-II sulle cellule tumorali ha prodotto interessanti, seppur eterogenei, risultati per quanto riguarda l'induzione di una risposta antitumorale specifica. Il *pathway* di espressione della Classe-II è stato finemente studiato ed è stato chiarito il ruolo centrale di CIITA in qualità di *master control regulator* della sua trascrizione: grazie

al'overespressione del solo CIITA, infatti, è possibile indurre un fenotipo Classe-II⁺ in cellule normalmente negative. La possibilità di veicolare CIITA all'interno di cellule tumorali in maniera semplice, efficiente e sicura potrebbe pertanto dimostrarsi una strategia vaccinale o terapeutica estremamente promettente, benché richieda l'identificazione preventiva dei tumori in grado di rispondere positivamente a tale trattamento. Considerando che i metodi di *gene delivery* finora impiegati risultano poco efficienti o dispendiosi in termini di tempo, l'utilizzo di MVA in qualità di vettore potrebbe apportare un significativo contributo verso lo sviluppo di immunoterapie antitumorali basate sull'overespressione di Classe-II. La seconda linea d'indagine di questa tesi consiste pertanto nel saggiare la capacità di un rMVA esprimente CIITA di transattivare i geni contenuti nel *locus* della Classe-II di cellule tumorali umane e murine, aprendo le porte ad un utilizzo alternativo di questo vettore *Poxvirale*.

Materiali e metodi

1. Colture cellulari

Per la produzione dei virus ricombinanti sono state impiegate cellule primarie di pollo (CEF, Chicken Embryo Fibroblasts). Le cellule CEF vengono isolate da embrioni di pollo di 10/11 giorni (Charles River, certificazione SPF), coltivate per 1 passaggio in terreno sintetico VP-SFM (*Life Technologies*) addizionato con glutammina 4mM (GIBCO, *Invitrogen*) e 1% di Pen/Strep (GIBCO, *Invitrogen*) e infine conservate a -80°C utilizzando 10% DMSO in qualità di criopreservante. All'occorrenza, le CEF vengono scongelate e tenute in coltura nel medesimo terreno descritto in precedenza (*serum free*, SF-CEF) per un numero limitato di passaggi.

La titolazione degli stock di MVA è stata effettuata utilizzando la linea cellulare di criceto BHK-21, coltivata in terreno RPMI-1640 (GIBCO, *Invitrogen*) addizionato con 10% FBS e 1% Pen/Strep. Durante la titolazione, la percentuale di siero viene dimezzata per rallentare la crescita delle cellule e rendere più evidente l'effetto citopatico derivato dall'infezione con MVA.

La caratterizzazione degli stock è stata eseguita su diverse tipologie cellulari: (i) cellule SF-CEF o, in alternativa, CEF coltivate in terreno DMEM con aggiunta di 5% FBS, 1% Chicken Serum e 1% Pen/Strep (*serum*, S-CEF); (ii) cellule umane di derivazione renale HEK-293T, coltivate in DMEM completo (10% FBS + 1% Pen/Strep); (iii) cellule murine di tumore mammario TSA, coltivate in DMEM completo (ottenute dal prof. Roberto Accolla, UnInsubria, Varese). In qualità di controlli, sono state impiegate le linee cellulari umane linfoblastoidi RAJI (coltivate in terreno RPMI-1640 completo) e 771.221 CW4⁺ (coltivate in terreno RPMI-1640 completo addizionato con G418 300ug/mL e

Igromicina 150ug/mL), nonché cellule murine di tumore mammario trasdotte con fCIITA (TSA pLXIN-fCIITA, ottenute dal prof. Roberto Accolla, UnInsubria, Varese), coltivate in DMEM completo.

Le infezioni con virus MVA alla moi desiderata sono effettuate nei relativi terreni in assenza di siero per 2h. Successivamente, dopo 2 lavaggi con terreno vuoto, si aggiunge terreno completo.

La trasfezione di cellule SF-CEF e S-CEF viene effettuata con 10ug di plasmide in OptiMem usando Lipofectamine® 2000 (Invitrogen), come riportato sul manuale d'uso. Dopo 2 lavaggi con terreno vuoto per rimuovere il siero, se presente, e le cellule morte, le CEF vengono trasfettate per 6h a 37°C. Dopo 2 lavaggi con terreno vuoto per rimuovere la lipofectamina, si aggiunge terreno completo (VP-SFM addizionato di glutammina e antibiotici o DMEM addizionato con 5% FBS, 1% CS e 1% Pen/Strep) e si ripone nell'incubatore

La trasfezione di cellule HEK293T o TSA viene effettuata in DMEM completo utilizzando PEI (2.58ug/mL in NaCl 150mM), 1ul PEI/ug plasmide. Dopo 2 lavaggi con terreno completo, le cellule vengono trasfettate 6h-O.N. a 37°C con una quantità adatta di plasmide (piastre da 6 pozzetti: 2-3ug/pozzetto; piastre da 12 pozzetti: 1-2ug/pozzetto). Dopo la trasfezione, si effettuano 2 lavaggi per rimuovere il PEI e si aggiunge terreno completo, riponendo le piastre nell'incubatore.

Tutte le cellule sono state coltivate in incubatori a 37°C, 5% CO₂.

2. Produzione di virus MVA ricombinanti

La tecnica di produzione dei virus MVA ricombinanti impiegata in questo lavoro di tesi si basa sul *Red-to-Green gene swapping* (Di Lullo et al. 2010) e sfrutta la ricombinazione omologa tra il DNA virale e una cassetta contenuta all'interno di plasmidi di trasferimento specifici. Le regioni di omologia (*flanking region*) contenute all'interno di tali plasmidi guidano la ricombinazione e permettono lo scambio di DNA tra le due molecole. Il processo di produzione dei virus, schematizzato in Figura 15, prevede: 1. Inserimento del gene codificante per HcRED all'interno della regione designata per la ricombinazione, mediato dai plasmidi di trasferimento p75 o p675; sorting delle cellule rosse; caratterizzazione dei virus esprimenti HcRED; clonaggio per diluizione terminale e produzione dello *stock*; 2. Scambio della proteina HcRED con la cassetta esprimente EGFP e il TG scelto, mediato dai plasmidi di trasferimento p94-TG o p604-TG; sorting delle cellule verdi; caratterizzazione dei cloni esprimenti EGFP; 3. Sorting delle cellule prive di fluorescenza, potenzialmente infettate dai virus che, in seguito a ricombinazione intragenomica tra le regioni Z,

han perso la fluorescenza ma sono positivi per il TG; clonaggio dei virus privi di *marker* fluorescente;
4. Espansione, purificazione, titolazione e ulteriore caratterizzazione dello *stock* virale.

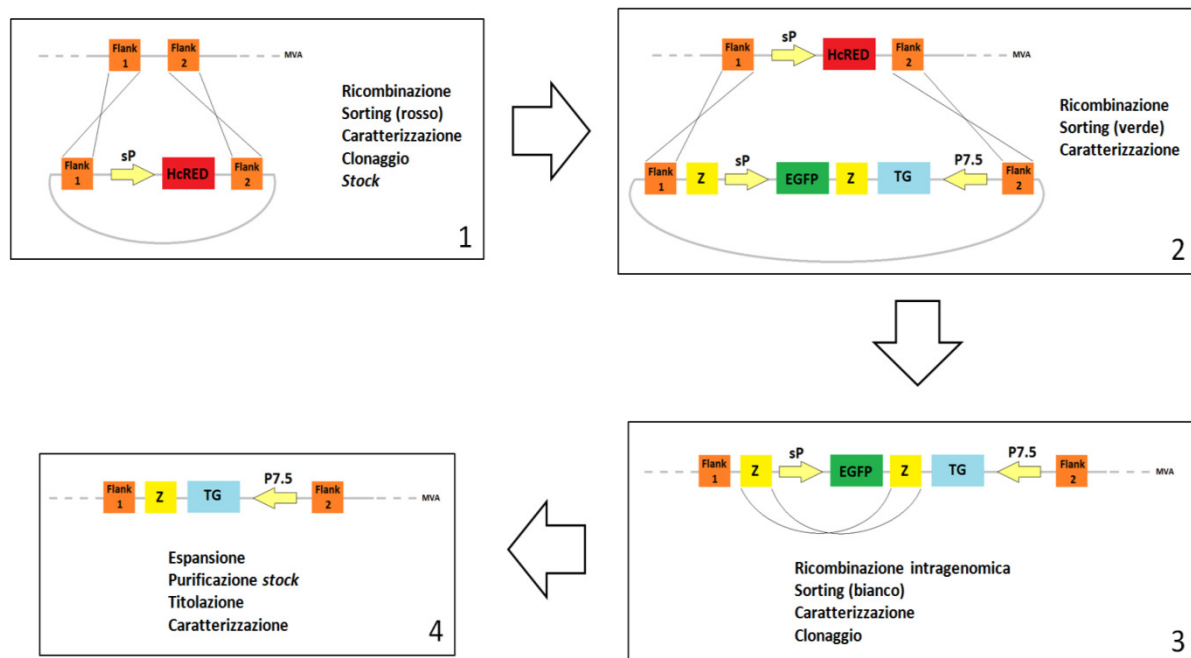


Figura 15. Riassunto del processo di produzione di virus ricombinanti MVA utilizzando la strategia del *Red-to-Green gene swapping*.

2.1 Generazione dei plasmidi di trasferimento

I plasmidi utilizzati e costruiti in questo lavoro di tesi sono riportati in Tabella 2.

2.1.1 p94-HLAC e p94-fCIITA

I plasmidi di trasferimento p94-HLAC e p94-fCIITA, contenenti i geni HLAC e fCIITA sotto promotore virale P7.5 tra le regioni di omologia fiancheggianti Δ III, sono stati costruiti usando il plasmide p94 come *backbone* e clonando al suo interno i frammenti prelevati da pHLAC e pcDNA3.1-fCIITA.

Per quanto riguarda la costruzione di p94-HLAC, 10ug di p94 (vettore) e pHLAC (inserto) sono stati digeriti con gli enzimi BamHI e AscI (NEB) per 3h a 37°C e il vettore è stato ulteriormente defosforilato per 1h (CIP, NEB). Dopo corsa elettroforetica, i frammenti di interesse sono stati purificati da gel usando il kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) e ligati tra loro

Plasmide	Nome alternativo	Regioni di omologia	Inserito	Origine
p75	pIII-sP-Red	Δ III	sP-HcRED	(Di Lullo et al. 2009)
p94	TPG	Δ III	Z, sP-EGFP, Z, P7.5-MCS	(Di Lullo et al. 2010)
p104	TPG	Δ III	Z, sP-EGFP, Z, P7.5-MCS	Presente in laboratorio
p60	pVidHR-sP/P7.5	Δ VI	MCS/sP (AS), P7.5(S)/MCS, Z, P7.5-K1L, Z	Gerd Sutter, TU, Monaco
pHLAC	-	-	HLAC	Presente in laboratorio
pcDNA3.1-fCIITA	-	-	fCIITA	Roberto Accolla, UnInsubria, Varese
p94-NP	-	Δ III	Z, sP-EGFP, Z, P7.5-NP	Presente in laboratorio
p94-HLAC	-	Δ III	Z, sP-EGFP, Z, P7.5-HLAC	Costruito
p94-fCIITA	-	Δ III	Z, sP-EGFP, Z, P7.5-fCIITA	Costruito
p675	-	Δ VI	sP-HcRED	Costruito
p604	TPG- Δ VI	Δ VI	Z, sP-EGFP, Z, P7.5-MCS	Costruito
p604-NP	-	Δ VI	Z, sP-EGFP, Z, P7.5-NP	Costruito

Tabella 2. Elenco dei plasmidi usati e costruiti in questo lavoro di tesi. sP = promotore sintetico precoce/tardivo di VACV (Chakrabarti, Sisler e Moss, 1998); p7.5 = promotore naturale precoce/tardivo di VACV (Mackett, Smith e Moss, 1984); AS = antisenso; S = senso.

O.N. a 16°C (T4 Ligase, NEB). Il prodotto di ligazione è stato quindi trasformato in batteri *E.Coli* TOP10 chimicamente competenti e le colonie ottenute dopo semina su piastre selettive per Ampicillina sono state sottoposte a due digestioni enzimatiche di controllo. Una colonia positiva è stata infine espansa e il plasmide p94-HLAC recuperato dai batteri usando il kit “EndoFree Plasmid Maxi Kit” (Qiagen). La concentrazione è stata determinata usando il NanoDrop (ThermoScientific).

Per quanto riguarda la costruzione di p94-fCIITA, 10ug di p94 (vettore) e pcDNA3.1-fCIITA (inserto) sono stati digeriti con l’enzima PmeI (NEB) per 3h a 37°C e il vettore è stato ulteriormente defosforilato per 1h (CIP, NEB). Dopo corsa elettroforetica, i frammenti di interesse sono stati purificati da gel e ligati tra loro come in precedenza. Il prodotto di ligazione è stato quindi trasformato in batteri *E.Coli* TOP10 chimicamente competenti e le colonie ottenute dopo semina su piastre selettive per Ampicillina sono state sottoposte a due digestioni enzimatiche per controllare il corretto orientamento dell’inserto. Una colonia positiva è stata infine espansa e il plasmide p94-fCIITA purificato dai batteri come in precedenza. La concentrazione è stata infine calcolata usando il NanoDrop.

2.1.2 p675

Il plasmide donatore p675, contenente il gene HcRED sotto promotore virale sP tra le due *flanking region* ΔVI, è stato costruito usando il *backbone* del plasmide p60 e clonando al suo interno il gene HcRED derivante dal plasmide p75.

Mancando siti di restrizione adeguati per il clonaggio, i frammenti di p60 e p75 sono stati derivati tramite PCR con polimerasi *proofreading* AccuPrime™ pfx (Invitrogen), usando i primer recanti siti di restrizione Bsu36I alle estremità (inserzione direzionale) riportati in Tabella 3. La temperatura di annealing appropriata (63°C) è stata preventivamente identificata mediante gradiente .

Primer	Sequenza 5' → 3'
HcRED-Bsu36I for	AGAG <u>CCTCAGGG</u> TTCAGCTTAAAAATTGAAAT
HcRED-Bsu36I rev	AGAG <u>CCTGAGG</u> GGCCGCTTCAGTTGGCCTTCT
p60-Bsu36I for	AGAG <u>CCTCAGG</u> ATAAGACGCATGAAGGCTGA
p60-Bsu36I rev	AGAG <u>CCTGAGG</u> GTTTAGGCTTCTGTACCT

Tabella 3. Elenco e sequenza dei primer impiegati nella costruzione di p675. Il sito Bsu36I è sottolineato.

I frammenti di PCR sono stati purificati dopo corsa tramite kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) e la concentrazione calcolata mediante NanoDrop. Successivamente, 5ug di ogni prodotto di PCR sono stati digeriti per 2h con Bsu36I (NEB) e, dopo defosforilazione del frammento-vettore (p60) e nuova purificazione tramite kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), i due frammenti sono stati ligati O.N. a 16°C (T4 ligase, NEB). Il prodotto di ligazione è stato trasformato in batteri *E.Coli* TOP10 chimicamente competenti e le colonie ottenute dopo semina su piastre selettive per Ampicillina sono state sottoposte a digestione enzimatica per identificare quali contenessero l’inserto. Per escludere la presenza di mutazioni indotte dalla PCR, alcuni cloni positivi per l’analisi di restrizione sono stati sequenziati (Primm S.r.l.). Inoltre, per verificare la corretta espressione della proteina HcRED in presenza di polimerasi virale, cellule HEK293T sono state infettate in piastra da 6 pozzetti col virus vuoto MVA V4 (moi 1) e, dopo 2h, lavate 2 volte con PBS e trasfettate con 2ug di plasmide p675 utilizzando come agente trasfettante il PEI (concentrazione: 2,54ug/mL, 1uL/ug di DNA). L’osservazione della fluorescenza e l’acquisizione delle immagini sono state effettuate 24h p.i. utilizzando il microscopio DM IL LED (Leica). Confermata l’espressione di HcRED, una colonia è stata espansa e il plasmide purificato come in precedenza.

2.1.3 p604

Il plasmide di trasferimento specifico per la regione Δ VI è stato assemblato inserendo la porzione costituita da “Z, sP-EGFP, Z e P7.5-MCS” contenuta in p104 (analogo di p94 ma con un MCS migliorato) tra le due *flanking region* Δ VI contenute nel plasmide p60. Il nuovo plasmide, analogo a p94 e p104 ma specifico per la regione Δ VI di MVA, è stato denominato p604 (o TPG- Δ VI).

Il frammento relativo al *backbone* è stato preparato digerendo 10ug di p60 con PmeI e SnaBI per 3h a 37°C. Dopo 1h di defosforilazione a 37°C (CIP, NEB), il frammento è stato sottoposto a corsa elettroforetica, purificato da gel e quantificato al NanoDrop. La digestione con SnaBI ha rimosso circa 220bp dalla *flanking region left* (1061bp \rightarrow 840bp), ma questo non influisce sull'esito della ricombinazione omologa.

Il frammento relativo all'inserto è stato exciso dal plasmide p104 sfruttando una digestione totale dell'enzima SnaBI (NEB) e una parziale dell'enzima BstBI (NEB). La condizione di digestione è stata messa a punto preventivamente: dopo aver digerito 2ug di p104 con SnaBI per 2h a 37°C, il prodotto di digestione è stato incubato per tempi crescenti con l'enzima BstBI a 65°C (1'-2,5'-5'-10'-15'-30'-1h). Individuata la tempistica migliore, 20ug di p104 sono stati digeriti sequenzialmente con SnaBI (3h a 37°C) e BstBI (10' a 65°C). Dopo corsa elettroforetica, il frammento di interesse è stato exciso da gel, purificato e reso *blunt* usando il frammento Klenow della DNA polimerasi (NEB). Dopo un'ultima purificazione attraverso il kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega), la concentrazione del frammento è stata valutata al NanoDrop.

Successivamente, frammento-vettore e frammento-inserto sono stati ligati O.N. a 16°C (T4 ligase, NEB) e il prodotto di ligazione trasformato in batteri *E.Coli* TOP10 chimicamente competenti. Le colonie ottenute dopo semina su piastre selettive per Ampicillina sono state sottoposte a digestione enzimatica per saggiare tanto la presenza quanto l'orientamento dell'inserto. Infine, una colonia positiva è stata espansa e il plasmide purificato come in precedenza.

2.1.4 p604-NP

Il plasmide di trasferimento di p604 contenente NP (p604-NP) è stato clonato excidendo il gene NP (Influenza, ceppo H1N1) dal plasmide p94-NP e ligandolo nel MCS di p604. Il gene NP possiede il tag V5 al C-terminale, utile per la rilevazione con anticorpi anti-tag.

10ug di p604 (vettore) e di p94-NP (inserto) sono stati digeriti con gli enzimi BamHI e AscI (NEB) per 3h a 37°C. Il frammento-vettore è stato ulteriormente defosforilato per 1h a 37°C (CIP, NEB). In seguito, entrambi i frammenti sono stati separati per elettroforesi, excisi, purificati da gel e

quantificati tramite NanoDrop. Dopo ligazione O.N. a 16°C (T4 ligase, NEB), il prodotto è stato trasformato in batteri *E.Coli* TOP10 chimicamente competenti. Le colonie ottenute dopo semina su piastre selettive per Ampicillina sono state saggiate per restrizione enzimatica per individuare quelle contenenti l'inserto, il cui verso è obbligato dalla presenza di estremità coesive differenti. Due colonie positive sono state infine saggiate per l'espressione delle proteine contenute nella cassetta di ricombinazione. Cellule S-CEF coltivate in piastre a 6 pozzetti sono state infettate con virus MVA HcRED(Δ III) (esprime la proteina rossa, moi 1). Dopo 2h, le cellule sono state lavate 2 volte con DMEM, trasfettate con 10ug di plasmide p604-NP per 6h in OptiMem e Lipofectamine® 2000 (*Life Technologies*), lavate 2 volte con DMEM e infine poste nel terreno di coltura indicato. L'espressione di EGFP è stata valutata in microscopia 24h p.i. come descritto in precedenza, mentre quella di NP è stata saggiata 48h p.i. attraverso Western Blot, impiegando il protocollo descritto più avanti. Confermata l'espressione dei geni contenuti nella cassetta di ricombinazione, una colonia è stata espansa e il plasmide purificato come descritto in precedenza.

2.2 Generazione di virus ricombinanti

I virus utilizzati e costruiti in questo lavoro di tesi sono riportati in Tabella 4.

Virus	Δ III	Δ VI	Origine	Note
MVA vuoto (V4)	-	-	Presente in laboratorio	Accettore del gene HcRED in Δ VI
MVA HcRED(Δ III)	HcRED	-	Presente in laboratorio	Accettore del gene fCIITA
MVA HcRED(Δ VI)	-	HcRED	Costruito	
MVA HcRED(Δ III)ENV(Δ VI)	HcRED	ENV	Presente in laboratorio	Accettore del gene HLAC in Δ III
MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI)	HLAC	ENV	Costruito	
MVA-HA(Δ III)	HA	-	Presente in laboratorio	Accettore del gene HcRED in Δ VI
MVA-NP(Δ III)	NP	-	Presente in laboratorio	
MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI)	HA	HcRED	Costruito	Accettore del gene NP in Δ VI
MVA HA(Δ III)NP(Δ VI)	HA	NP	Costruito	
MVA fCIITA(Δ III)	fCIITA	-	Costruito	

Tabella 4. Elenco dei virus usati e costruiti in questo lavoro di tesi. Per ogni virus è riportato il contenuto delle regioni Δ III e Δ VI.

2.2.1 Ricombinazione omologa e selezione dei cloni

SF-CEF coltivate in piastre da 6 pozzetti vengono infettate col virus accettore a bassa moi (0.1-1). Dopo 2h, i pozzetti vengono lavati 2 volte con terreno VP-SFM vuoto per rimuovere il virus in

eccesso e le SF-CEF trasfettate con 10ug di plasmide di trasferimento (contenente HcRED o EGFP+TG) come indicato in precedenza. Il giorno successivo, dopo aver controllato la fluorescenza al microscopio, le cellule vengono raccolte tramite *scraping* dei pozzetti. Si procede quindi ad effettuare un lisato totale attraverso metodi fisici: 3 cicli di congelamento a -80°C /scongelo/vortex seguiti da 3 cicli di sonicazione in ghiaccio (QSonica Q700, 100% Amplitude, 5' per ciclo).

Il giorno precedente al *sorting*, il lisato viene impiegato per infettare SF-CEF coltivate in piastre da 6 pozzetti. Dopo 2h, i pozzetti vengono lavati con VP-SFM vuoto e si aggiunge terreno VP-SFM addizionato con glutammina, antibiotici e citocalasina D 1uM (degrada i microfilamenti di actina e ne inibisce la polimerizzazione, bloccando di fatto la fuoriuscita di MVA dalle cellule e, quindi, la superinfezione). Il giorno del *sorting*, i pozzetti vengono lavati 2 volte con VP-SFM vuoto per eliminare la citocalasina D. Successivamente, le SF-CEF vengono raccolte tramite tripsinizzazione (Gibco, *Invitrogen*) e, dopo 2 lavaggi in VP-SFM per eliminare la tripsina, si pongono i campioni in ghiaccio fino al momento del *sorting*. Lo strumento utilizzato per analizzare e selezionare le cellule in base alla loro fluorescenza è il citofluorimetro MoFlo™ XDP (*Beckman-Coulter*), messo a disposizione dalla *facility* FRACTAL presente all'interno dell'Ospedale San Raffaele. Per la fluorescenza rossa è stata usata l'impostazione del fluorocromo APC, il cui spettro è compatibile con quello di HcRED. Il *sorting* viene effettuato in piastra da 96 pozzetti su *layer* di SF-CEF in crescita (*sorting* a singola cellula o 2-50 cellule per pozzetto) o in tubo da 15mL (*sorting* in *bulk*, poi piastrato in proporzioni variabili in piastre da 6 pozzetti su SF-CEF in crescita).

A partire da 48h post *sorting*, i pozzetti vengono osservati al microscopio per individuare foci esprimenti la fluorescenza desiderata. Eventualmente, immagini in fluorescenza dell'intera piastra possono essere acquisite usando un *fluoroimager* (Typhoon FLA9000, GE Healthcare). I pozzetti positivi vengono quindi raccolti tramite *scraping* e si effettua un lisato totale come descritto in precedenza. Parte di questo lisato viene usato per effettuare i saggi necessari per l'individuazione dei cloni positivi a mezzo di PCR, western blot o citometria, come descritto più avanti. L'intero processo di *sorting* fin qui descritto (infezione in presenza di citocalasina D, *sorting*, analisi dei pozzetti) può essere ripetuto più volte per purificare ulteriormente il campione ed eliminare il *carry-over* di virus parentale (privo di fluorescenza o esprimente HcRED).

Successivamente, il virus viene clonato attraverso uno o più cicli di diluizione terminale: diluizioni seriali del lisato selezionato (generalmente in potenze di 10, da 10^{-2} a 10^{-7}) vengono seminate su cellule SF-CEF in piastre da 96 pozzetti. Dopo qualche giorno, mediamente 3-4, le piastre vengono osservate al microscopio per individuare la presenza del virus attraverso fluorescenza o effetti citopatici. I pozzetti della diluizione limite, contenenti virus potenzialmente derivanti da un

singolo clone, vengono prelevati per scraping, lisati come in precedenza e saggiati a mezzo di PCR, western blot o citometria, come descritto più avanti.

Da ultimo, uno o più cloni positivi vengono inoculati in 6-8 *flask* T162 contenenti SF-CEF confluenti al 70-80%, così da permettere l'espansione del virus per la produzione dello *stock*. Qualora si dovesse preparare un nuovo *stock* a partire da virus già purificato e titolato, si inoculano circa $1e7$ pfu/*flask*. L'infezione viene costantemente monitorata: dopo 24h è già visibile la fluorescenza dei virus esprimenti HcRED, mentre dopo 48-72h iniziano ad essere visibili i primi effetti citopatici. A 4-5 giorni dall'inoculo, le cellule mostrano generalmente forti effetti citopatici, culminanti nella lisi e liberazione del virus intracellulare (principalmente IMV) che si somma a quello liberato per esocitosi (EEV). Il *debris* cellulare e il surnatante di ogni *flask* vengono infine raccolti dopo circa 7 giorni p.i., dispensati in tubi da 50mL e conservati a -80°C fino al momento della purificazione.

2.2.2 Purificazione dello *stock* virale e titolazione

I buffer e le soluzioni impiegate per la purificazione e la titolazione degli *stock* virali sono riportati in Tabella 5.

Reagenti	Composizione
Tris buffer	Tris 10mM pH=9
Saccarosio 36%	Saccarosio 36% w/v in Tris 10mM pH=9
Formulation buffer	10mM NaCl + 280mM Tris pH=7.7 (1:1 v/v)
Fix solution	Acetone + MetOH (1:1 v/v), 4°C
CV solution	0.5% Crystal Violet in MetOH 20%

Tabella 5. Elenco e composizione dei reagenti e *buffer* impiegati durante la purificazione e la titolazione degli *stock* virali.

I lisati cellulari raccolti sono centrifugati in tubi Nalgene per 1h a 24k RCF, 4°C . Il surnatante viene scartato e il pellet, composto da virus e *debris* cellulari, è risospeso in Tris buffer (1mL per ogni *flask* usata per la produzione) e dispensato in provette. A questo punto, si sottopone il campione a 3 cicli di congelamento a -80°C /scongelo/vortex, seguiti da 3 cicli di sonicazione in ghiaccio e almeno 15 passaggi in siringa da insulina (27.5G). In tal modo, il *debris* viene completamente disgregato, liberando il virus. Successivamente, si centrifuga per 5' a 1.8k RCF, 4°C : il surnatante, contenente principalmente virus e piccoli *debris* cellulari, viene conservato e il pellet, composto da grandi *debris* cellulari e, potenzialmente, altro virus, viene risospeso in Tris buffer. Si ripete quindi l'intero processo: 3 cicli di congelamento/scongelo/vortex, 3 sonicate, almeno 15 passaggi in

siringa e centrifugazione a 1.8k RCF. Il surnatante viene nuovamente prelevato e unito a quello ottenuto in precedenza, mentre il pellet, per sicurezza, viene conservato a -80°C fino al termine della titolazione.

Si procede quindi con la purificazione mediante “cuscino” di saccarosio. Sul fondo di un tubo Nalgene vengono depositati 15mL di Saccarosio 36%, sul quale si aggiungono con cautela i due surnatanti prelevati in precedenza, portati a 15mL con Tris buffer. Dopo centrifugazione per 1h a 30k RCF, 4°C, il surnatante viene rimosso e il pellet risospeso in un volume adeguato di Formulation buffer (generalmente 600-1000uL). Da ultimo, il protocollo si conclude effettuando nuovamente 3 cicli di congelamento/scongelamento/vortex e 3 sonicate, al termine delle quali lo *stock* viene conservato a -80°C. Prima di ogni utilizzo, si effettuano sempre 3 cicli di sonicazione sullo *stock* per omogeneizzare la sospensione virale.

La determinazione del titolo virale viene effettuata sulle cellule BHK-21 attraverso il metodo della diluizione terminale e applicando la distribuzione di Poisson. Le cellule vengono seminate in piastre da 96 pozzetti, 2000 cellule/pozzetto, e sono fatte aderire per almeno 4h. Per ogni *stock* da titolare si preparano diluizioni seriali in potenze di 10 (da 10^{-2} a 10^{-12}), che vengono seminate a volume noto (50uL) in 16 pozzetti/diluizione. Nel caso di virus esperimenti HcRED, l'individuazione dei pozzetti positivi per l'infezione è effettuata 3-5 giorni post semina mediante osservazione al microscopio a fluorescenza. Nel caso di virus privi di fluorescenza, invece, si effettua uno screening preliminare per individuare gli effetti citopatici 3-5 giorni post semina, durante i quali il virus ha il tempo di espandersi; successivamente, le piastre di titolazione vengono replicate su altrettante piastre contenenti BHK-21 fresche: il virus, questa volta più concentrato all'interno dei singoli pozzetti, darà luogo a evidenti foci di lisi nella piastra di replica, permettendo l'individuazione certa dei pozzetti positivi. Le piastre della replica sono poi fissate per 10' con la Fix solution, lavate 2 volte con acqua, incubate 5' con la CV solution e quindi lavate più volte con acqua per rimuovere il crystal violet in eccesso. La presenza di foci di lisi verrà individuata tramite l'assenza di colorazione viola, poiché le cellule infettate e sofferenti si staccano durante il fissaggio in acetone/metanolo. Infine, il calcolo della titolazione virale, espressa in pfu/mL, viene effettuato sfruttando la distribuzione di Poisson.

2.3 Caratterizzazione dei virus ricombinanti

La caratterizzazione dei cloni virali e degli *stock* viene effettuata combinando metodi molecolari (PCR), biochimici (western blot) e immunologici (citometria e immunofluorescenza).

2.3.1 PCR

La PCR è il metodo più immediato per caratterizzare i virus ricombinanti. Il DNA virale viene estratto usando il kit “QIAamp DNA Blood Mini Kit” (Qiagen) a partire da 200uL di lisato cellulare (derivante ad esempio dai pozzetti delle piastre di sorting o di diluizione terminale) o da almeno 2e5 pfu di virus titolato. La polimerasi usata è GoTaq G2 Flexi (Promega) con concentrazione costante di MgCl₂ (2mM). I primer impiegati in ogni PCR, le temperature di annealing e i tempi di elongazione sono riportati in

Tabella 6. Per ogni PCR sono stati eseguiti 30 cicli. Le bande di PCR sono separate mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio/etidio e visualizzate al transilluminatore UV.

PCR	Ta (°C)	Elongazione	Primer	Sequenza 5' → 3'
ΔIII	60	2'	ΔIII for	CCAAAGGAAATGCATCATTGATTATTCTCCTG
			ΔIII rev	GAATGCACATACATAAGTACCGGCATCTCTAGCAGT
ΔVI	60	2'	ΔVI for	CCTGGACATTTAGTTTGAGTGTTCTGAAT
			ΔVI rev	CTCAGCATCTAGTTGATATTCCAACCTCTT
HA	56	30''	HA for	CGCATTGAGAACCTGAACAA
			V5 rev	TTAGTCCAGGCCAGCAG
NP	60	1'	NP for	GTGCACCGAGCTGAAGCT
			NP rev	TCGGCGTTGTCGCCGAAG
fCIITA	55	2'	fCIITA for	ATGGACTACAAAGACGATGAC
			fCIITA rev	GAATCCATCCACCCAAC

Tabella 6. Tabella riassuntiva delle PCR usate per la caratterizzazione dei virus. Ta = temperatura di *annealing* usata.

2.3.2 Western Blot

In Tabella 7 e Tabella 8 sono riportati rispettivamente i reagenti e gli anticorpi impiegati per i saggi di western blot.

I campioni provenienti da linee in adesione sono lavati 2 volte nel pozzetto con PBS, raccolti tramite *scraping* (CEF e TSA) o *pipettamento* (HEK293T), centrifugati brevemente e risospesi in un volume adeguato di Sample buffer (riducente o non riducente). Nel caso della linea Raji (sospensione), i campioni vengono lavati 2 volte con PBS tramite centrifugazione in provetta e risospesi in un volume adeguato di Sample buffer (riducente o non riducente).

Dopo frammentazione del DNA tramite siringa da insulina ed eventuale denaturazione al calore (5' 95°C), le proteine vengono separate in SDS-PAGE. Il blot è eseguito su membrana di

Reagenti	Composizione
Sample buffer non riducente 2X	Tris-HCl 100mM, SDS 4%, Glicerolo 20%, Blu di bromofenolo 0.2%
Sample buffer riducente 2X	Tris-HCl 100mM, SDS 4%, Glicerolo 20%, Blu di bromofenolo 0.2%, DTT 200mM
Separating buffer 4x	Tris 1.5M, 4% SDS, pH=8.8 (HCl)
Stacking buffer 4x	Tris 0.5M, 4% SDS, pH 6.8 (HCl)
Running buffer 10x	Tris 0.25M, Glicina 1.92M, SDS 1%
Transfer buffer 10x	Tris 0.25M, Glicina 1.92M (per 1X: aggiungere 20% MeOH)
Blocking solution	Latte 5% in PBS + Tween 0.1%
Wash solution	PBS + Tween 0.1%

Tabella 7. Elenco e composizione dei reagenti impiegati durante i saggi di western blot.

Proteina	Anticorpo I	Anticorpo II
HLAC	L31-biotinilato 1:3000 *	Str-HRP 1:10000 (Sigma)
ENV	2F5 1:3000	Goat- α -human-HRP 1:10000 (Dako)
HA	Siero di pollo (α H1N1) 1:1000**	Rabbit- α -chicken-HRP 1:15000 (Sigma)
NP	Siero di pollo (α H1N1) 1:1000**	Rabbit- α -chicken-HRP 1:15000 (Sigma)
NP	Rabbit- α -V5 1:3000 (Sigma)	Goat- α -rabbit-HRP 1:10000 (Dako)
fCIITA	Mouse- α -Flag M2 1:8000 (Sigma)	Goat- α -mouse-HRP 1:10000 (Dako)
HLA-DR α / β	L243 1:1000 (BioLegend)	Goat- α -mouse-HRP 1:10000 (Dako)

Tabella 8. Elenco degli anticorpi primari e secondari impiegati per lo sviluppo dei western blot. Gli anticorpi I sono diluiti in PBS + Tween 0.1% + Gelatina 0.1% e riutilizzati. Gli anticorpi II sono diluiti in PBS + Tween 0.1% + latte 1% e vengono preparati all'occorrenza. *= biotinilato in laboratorio; **= ottenuto dalla prof.ssa Ilaria Capua, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova.

nitrocellulosa (Whatman) applicando $\Delta V=100V$ per 1h a 4°C. Dopo aver verificato l'avvenuto trasferimento incubando con Ponceau, si procede alla saturazione con Blocking solution, seguita da 3 lavaggi con Wash solution, incubazione O.N. a 4°C con l'anticorpo I, 3 lavaggi con Wash solution, incubazione RT 1h con anticorpo II, 3 lavaggi e incubazione con ECL (Amersham, GE Healthcare). L'acquisizione è fatta con lastre fotografiche.

2.3.3 Citometria

Gli anticorpi usati durante i saggi citometrici sono riportati in Tabella 9.

I campioni derivanti da linee in adesione vengono lavati 2 volte nel pozzetto con PBS, raccolti tramite breve tripsinizzazione, lavati 2 volte in PBS per rimuovere la tripsina (7', 1200 RPM/244 RCF, 4°C) e suddivisi in tubi da citometria. Per quanto riguarda le linee in sospensione, invece, Nel caso

Proteina	Anticorpo I	Anticorpo II
HLAC	L31-biotinilato 10ug/mL*	Str-PE 1:200 (BD)
ENV	2G12 10ug/mL	Goat- α -human-FITC 1:100 (KPL) Goat- α -human-PE 1:200 (SantaCruz)
HLA-DR α / β	D1.12 (ibridoma) 1:2 **	Goat- α -mouse-PE 1:200 (SantaCruz)
I-Ad	MKD-6 (ibridoma) 1:2 **	Goat- α -mouse-FITC 1:100 (eBioscience)

Tabella 9. Elenco degli anticorpi primari e secondari impiegati per i saggi citometrici. Gli anticorpi sono diluiti in PBS + BSA 5%. *= biotinilato in laboratorio; ** = ottenuti dal prof. Roberto Accolla, UnInsubria, Varese.

della linea Raji (sospensione), i campioni vengono lavati 2 volte con PBS tramite centrifugazione in tubi da 15mL e poi dispensati in tubi da citometria. Le incubazioni con gli anticorpi sono effettuate per 45', 4°C al buio alle concentrazioni riportate in Tabella 9, lavando 3 volte come in precedenza dopo ogni incubazione. Da ultimo, i campioni vengono fissati con 0.4% PFA in PBS e conservati a 4°C al buio fino al momento dell'acquisizione. I citometri impiegati sono il BD Accuri C6 (software in *Bundle*) e il BD FACSCanto II (software BD FACSDiva). L'analisi è stata effettuata attraverso il software FCS Express 4 Flow Cytometry (<http://www.denovosoftware.com>).

2.3.4 Immunofluorescenza

In Tabella 10 e Tabella 11 sono riportati i reagenti e gli anticorpi impiegati per i saggi di immunofluorescenza.

Reagenti	Composizione
PLL solution	Poly-L-Lysine (Sigma) 10% in H ₂ O
Fixing solution	PFA 4% in PBS
Quenching solution 40x	NH ₄ Cl 2M in PBS
Triton buffer	Triton X-100 0.2% in PBS
Wash/Blocking solution	Gelatina 0.2% in PBS
DAPI 10000x	1mg/mL
Mounting solution	Mowiol 4-88 2.4g (Sigma), 6g glicerolo, 6ml H ₂ O, 12mL Tris 0.2M pH=8.5 (HCl).

Tabella 10. Elenco e composizione dei reagenti impiegati per i saggi di immunofluorescenza.

Proteina	Anticorpo I	Anticorpo II
fCIITA	Mouse- α -Flag M2 1:1000 (Sigma)	Donkey- α -mouse-Alexa 488 1:1000 (Invitrogen)
HLA-DRα/β	L243 1:500 (BioLegend)	Donkey- α -mouse-Alexa 488 1:1000 (Invitrogen)

Tabella 11. Elenco degli anticorpi primari e secondari impiegati per i saggi di immunofluorescenza. Gli anticorpi sono diluiti in Blocking solution (gelatina 0.2% in PBS).

Cellule HEK293T vengono seminate in piastre da 12 pozzetti (300-500k cellule/pozzetto) contenenti vetrini coprioggetto (diametro 13mm) pretrattati con PLL solution come riportato sul manuale d'uso (Sigma). Dopo 24h, le cellule vengono infettate a moi bassa (0.5/1) o trasfettate come indicato in precedenza. Il giorno successivo, i vetrini vengono fissati con Fixing solution per 15' RT, lavati 3 volte con PBS, incubati con Quenching solution 1X per 10' RT e lavati 3 volte con PBS. Si procede quindi all'incubazione con Triton buffer per 3' RT (permeabilizzazione), seguita da 2 lavaggi con Wash solution e ulteriore incubazione con Blocking solution per 15' RT (saturazione). Le incubazioni con gli anticorpi vengono effettuate per 30' RT al buio alle concentrazioni riportate in Tabella 11, lavando 2 volte con Wash solution dopo ogni incubazione. Dopo aver colorato i nuclei con DAPI 1X in H₂O per 10' RT al buio, si lava una volta con PBS e due volte con H₂O per rimuovere i sali. Si conclude montando i vetrini con 15-20uL di Mounting solution su vetrini portaoggetto e facendo asciugare per 48h RT al buio. I vetrini asciutti possono essere conservati a 4°C al buio. L'acquisizione è stata effettuata al microscopio confocale UltraVIEW ERS Spinning Disk Confocal (PerkinElmer) attraverso il software in *bundle* Volocity, messi a disposizione dalla *facility* ALEMBIC presente all'interno dell'Ospedale San Raffaele. L'analisi è stata effettuata con il software ImageJ v1.46R (<http://imagej.net>).

3. Studi in vivo

Il protocollo sperimentale *in vivo* è stato approvato dallo I.A.C.U.C. dell'Istituto Scientifico S. Raffaele il 31.1.2013 ed è registrato col numero 580.

3.1 Modello animale e protocollo di immunizzazione

Per gli esperimenti di immunizzazione in vivo sono stati impiegati topi femmina di 8 settimane appartenenti alla linea C57BL/6, maneggiati all'interno di uno stabulario barrierato.

Il protocollo è riassunto in Figura 16. Le immunizzazioni con i virus MVA fCIITA(Δ III) e MVA HcRED(Δ III) sono state effettuate in due gruppi sperimentali composti da 3 topi l'uno attraverso inoculo intramuscolare di $1e7$ pfu/topo in PBS sterile al giorno 0 (*prime*) e 21 (*boost*). Per valutare la risposta anti-vettore (vedi in seguito), campioni ematici sono stati prelevati a diversi *time-point* attraverso incisione caudale. Dopo coagulazione (15', 37°C + 15', 4°C), i campioni vengono centrifugati 2 volte a 4°C (10', 244 RCF + 10' 5.5k RCF) per separare la parte corpuscolata dal siero, che viene conservato a -20°C.

Per l'analisi della distribuzione linfocitaria, gli animali sono stati sacrificati al giorno 42 per prelevare i linfonodi inguinali, poplitei e ascellari. Dopo *smash* e disgregazione con *cell strainer* 40um (Falcon, Corning), i linfociti sono stati congelati in RPMI + 10%DMSO fino al momento della citometria.

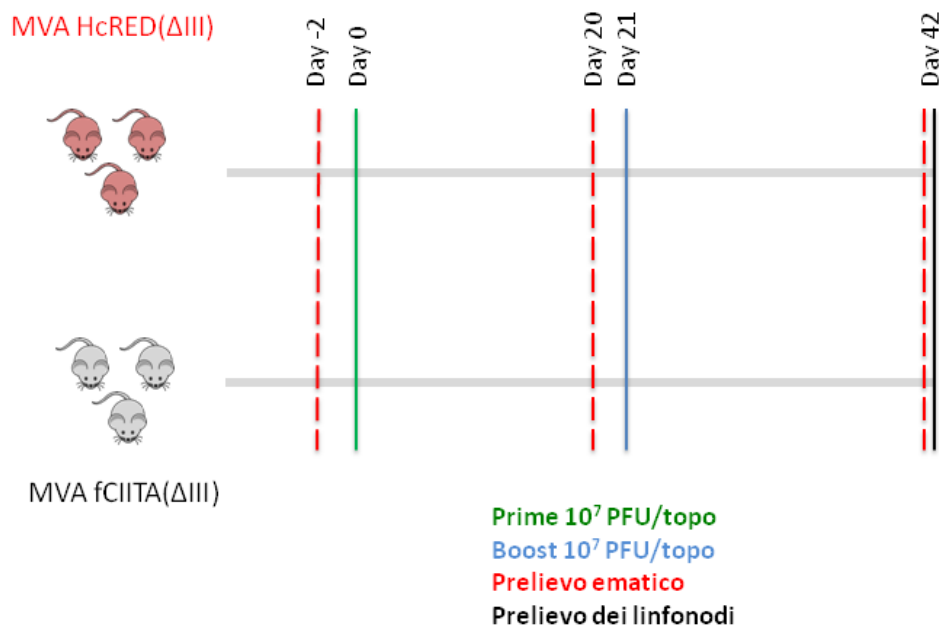


Figura 16. Protocollo di immunizzazione impiegato in questa tesi. Due gruppi sperimentali di 3 topi l'uno sono stati immunizzati al giorno 0 e 21 con i virus MVA fCIITA(Δ III) e MVA HcRED(Δ III), $1e7$ pfu/topo. Ai giorni -2, 20 e 42 è stato prelevato il sangue per monitorare l'immunizzazione. Al giorno 42 sono anche stati prelevati i linfonodi.

3.2 ELISA anti-MVA

La determinazione del titolo anticorpale anti-vettore è stato effettuato attraverso saggi ELISA in piastre *flat-bottom* F96 MaxiSorp (Nunc) usando un protocollo messo a punto in precedenza nel laboratorio.

Il *coating* delle piastre viene effettuato incubando O.N. RT 5e4 pfu/pozzetto di virus MVA HcRED(Δ III) in PBS, 50uL/pozzetto. Il giorno successivo, dopo 3 lavaggi con PBS utilizzando pipetta *multistep*, i pozzetti vengono saturati con 100uL di latte 3% in PBS per almeno 4h. Nel frattempo si preparano diluizioni seriali dei sieri con latte 1% in PBS (potenze di 2, da 1:16'000 a 1:2'048'000). Dopo la saturazione, si lavano i pozzetti come in precedenza per rimuovere il latte in eccesso e si dispensano le diluizioni in duplicato, 50uL/pozzetto, incubando O.N. RT. Il giorno successivo, le piastre vengono nuovamente lavate come in precedenza e si procede con l'incubazione dell'anticorpo secondario Goat- α -mouse-HRP 1:2000 (Dako) diluito in latte 1% in PBS, 2h RT. Da ultimo, dopo 3 lavaggi con PBS come in precedenza, si procede allo sviluppo con OPD (Sigma), 50uL/pozzetto, bloccando la reazione dopo 15-30' con 50uL H₂SO₄ 2N. L'acquisizione viene effettuata con Microplate Reader model 680 (BioRad) e i dati analizzati usando il software Prism v6 (<http://www.graphpad.com/scientific-software/prism>).

3.3 Analisi citometrica della distribuzione linfocitaria

Anti-	Clone	Diluizione	Fluorocromo
Fcy-R	HB-197	1:100	-
CD3-biotina	145.2C11 (BioLegend)	1:200	Str-APC/Cy7 (1:200)
CD4	GK1.5 (BioLegend)	1:400	PerCP
CD8	53-6.7 (BioLegend)	1:400	PB
CD25	PC61 (BioLegend)	1:200	PE/Cy7
CD44	IM7 (BioLegend)	1:200	PE
CD62L	MEL-14 (eBioscience)	1:400	APC
Foxp3	FJK-16S (eBioscience)	1:100	FITC

Tabella 12. Riassunto degli anticorpi usati per la marcatura dei linfociti estratti dai linfonodi murini. L'anticorpo antiCD3 è biotinilato ed è stata effettuata una seconda incubazione con Str-APC/Cy7.

Marcatura e acquisizione sono state effettuate presso il laboratorio del prof. Fabio Grassi (IRB, Bellinzona), impiegando gli anticorpi elencati in Tabella 12. I campioni sono stati trasportati in ghiaccio secco. Una volta scongelati, i linfociti provenienti dello stesso gruppo sperimentale sono stati riuniti, lavati in PBS e contati. Prima di effettuare la marcatura, gli Fcy-R sono stati saturati con HB-197 (10' in ghiaccio) per prevenire il *binding* aspecifico. In seguito, dopo aver aggiunto un eccesso di terreno completo RPMI per inibire l'anticorpo, sono stati effettuati 2 lavaggi in centrifuga con FBS 2% in PBS, 1500 RPM, 5', 4°C. I campioni sono stati incubati per 20' in ghiaccio al buio con una *mix*

contenente gli anticorpi anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD44 e anti-CD62L (riportati in Tabella 12 e diluiti con FBS 2% in PBS). Dopo un lavaggio come in precedenza, le cellule sono state fissate e permeabilizzate col kit Fixation/Permeabilization (eBioscience) e incubate per 20' in ghiaccio al buio con l'anticorpo anti-Foxp3 e la Str-APC/Cy7, diluiti con FBS 2% in PBS. Infine, dopo un lavaggio con buffer di permeabilizzazione, i campioni sono stati risospesi in PBS, acquisiti con lo strumento BD LSRFortessa (software BD FACSDiva) e analizzati col software FCS Express 4 Flow Cytometry (<http://www.denovosoftware.com>).

Risultati - Parte I

La tecnologia del *Red-to-Green gene swapping* (Di Lullo et al. 2010) rappresenta un'alternativa estremamente efficace all'utilizzo di altre strategie selettive, per esempio quelle basate su geni che forniscono la resistenza ad un composto chimico (Falkner e Moss 1988) o permettono l'espansione dello spettro d'ospite (G Sutter, Ramsey-Ewing, et al. 1994; C Staib et al. 2000; Caroline Staib et al. 2003; Hornemann et al. 2003). I virus ricombinanti esprimenti proteine fluorescenti, infatti, possono essere individuati analizzando la fluorescenza delle cellule infettate: l'identificazione e l'isolamento dei cloni positivi risulta così più veloce e semplice. Un ulteriore vantaggio dell'uso di *marker* fluorescenti è costituito dalla possibilità di automatizzare il processo di selezione avvalendosi del *sorting* al citofluorimetro (FACS): il valore aggiunto è notevole, poiché il tempo di produzione di un virus rMVA *ex novo* può essere ridotto a poche settimane, di solito 4-6, al termine delle quali si ha a disposizione uno stock clonale e purificato del virus ricombinante per il TG scelto.

Designato come un ottimo candidato in qualità di vettore vaccinale, MVA dispone di molteplici punti di forza. Agli alti livelli di espressione dei TG veicolati e alla totale sicurezza legata al suo uso nell'uomo, entrambi requisiti fondamentali, si aggiungono semplicità di *handling* (BSL-1, ma in realtà BSL-2 come regolamentato per gli organismi geneticamente modificati) e velocità di produzione in *stock*. Partendo da un *seed* a basso titolo virale ed infettando circa 40 milioni di cellule permissive, infatti, è possibile purificare, concentrare e concludere la titolazione dello *stock* in meno di venti giorni, recuperando più di $1e9$ pfu totali. Questo, se comparato a sistemi più tradizionali, come ad esempio la produzione del vaccino anti-influenzale, risulta sia più efficiente sia meno dispendioso.

Le formulazioni vaccinali correntemente utilizzate sono spesso costituite da un *cocktail* di antigeni provenienti da diversi patogeni, allo scopo di indurre una risposta multipla con un unico ciclo vaccinale. Si potrebbe citare, a titolo d'esempio, il vaccino trivalente MPR, che consente di vaccinare al contempo contro morbillo, parotite e rosolia. È altresì possibile inserire all'interno dello stesso vaccino diversi antigeni di un unico patogeno, così da aumentare l'efficacia della protezione: ad esempio, il vaccino anti-influenzale contiene gli antigeni HA (emoagglutinina) e NA (neuraminidasi) di diversi ceppi circolanti, generalmente due A e uno B. Allo stesso modo, un ulteriore passo avanti nella tecnologia di MVA è costituito dalla possibilità di generare virus ricombinanti multipli (mrMVA), recanti cioè due o più TG al loro interno. Metodi di ingegnerizzazione che permettono la costruzione di mrMVA sono descritti in letteratura e prevedono principalmente l'uso di geni di fusione (Altenburg et al. 2014) (Poon et al. 2009) (Kolibab et al. 2010) (Berthoud et al. 2011), eventualmente contenenti peptidi autoclivanti (J. H. Kim et al. 2011), oppure di promotori in *tandem* o in direzioni opposte all'interno dello stesso sito (Brevetto EP1916306A1). Il limite di questi sistemi è tuttavia evidente: la trascrizione dei due geni non è infatti indipendente e fenomeni di competizione nella trascrizione per ingombro sterico o di scarsa efficienza di uno dei promotori, ad esempio, compromettono l'equimolarità dei trascritti. Tale requisito è di fondamentale importanza qualora i TG inseriti in MVA dovessero assemblarsi in precisi rapporti stechiometrici, come ad esempio nel caso di proteine multimeriche. La subunità in eccesso, in molteplici casi, può precipitare nel citoplasma, accumularsi in corpi di inclusione, indurre UPR, esaurire la capacità dei proteasomi o legarsi in maniera aspecifica ad altre proteine cellulari, sottoponendo la cellula ad uno stress non indifferente che, in ultima analisi, riduce l'efficienza dell'intero sistema di espressione.

La prima parte di questo lavoro di tesi ha lo scopo di introdurre un'alternativa, nella quale due TG vengono inseriti all'interno di regioni diverse del genoma di MVA, affinché gli eventi di trascrizione e traduzione risultino totalmente indipendenti. Sono state saggiate due strategie complementari, allo scopo di valutarne l'equivalenza. Nella prima, un virus MVA contenente il gene dell'envelope di HIV-1 (ENV) nella regione ΔVI è stato ulteriormente ingegnerizzato nella regione ΔIII , inserendo il gene umano codificante per HLAC. Nella seconda, è stato provato l'inverso: un virus MVA contenente nella regione ΔIII il gene influenzale dell'emoagglutinina (HA) è stato usato come accettore di un secondo gene influenzale, codificante per la nucleoproteina (NP), inserito all'interno della regione ΔVI .

1. Produzione del virus MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI)

Il primo virus ricombinante, MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI), contenente cioè i geni HLAC e ENV rispettivamente nella regione Δ III e Δ VI, è stato costruito a partire dal virus MVA ENV(Δ VI), già presente in laboratorio.

Il processo di produzione (Figura 17) è stato suddiviso in due fasi. Nella prima, impiegando il plasmide p75 (Di Lullo et al. 2009) (nell'articolo chiamato pIII-sP-Red), è stato generato il virus accettore MVA HcRED(Δ III)ENV(Δ VI), contenente cioè la proteina HcRED nella regione (Δ III). Nella seconda, tale virus accettore è stato ulteriormente ingegnerizzato mediante *Red-to-Green gene swapping* e sostituendo il transgene HLAC all'interno della stessa regione grazie al plasmide di trasferimento p94-HLAC.

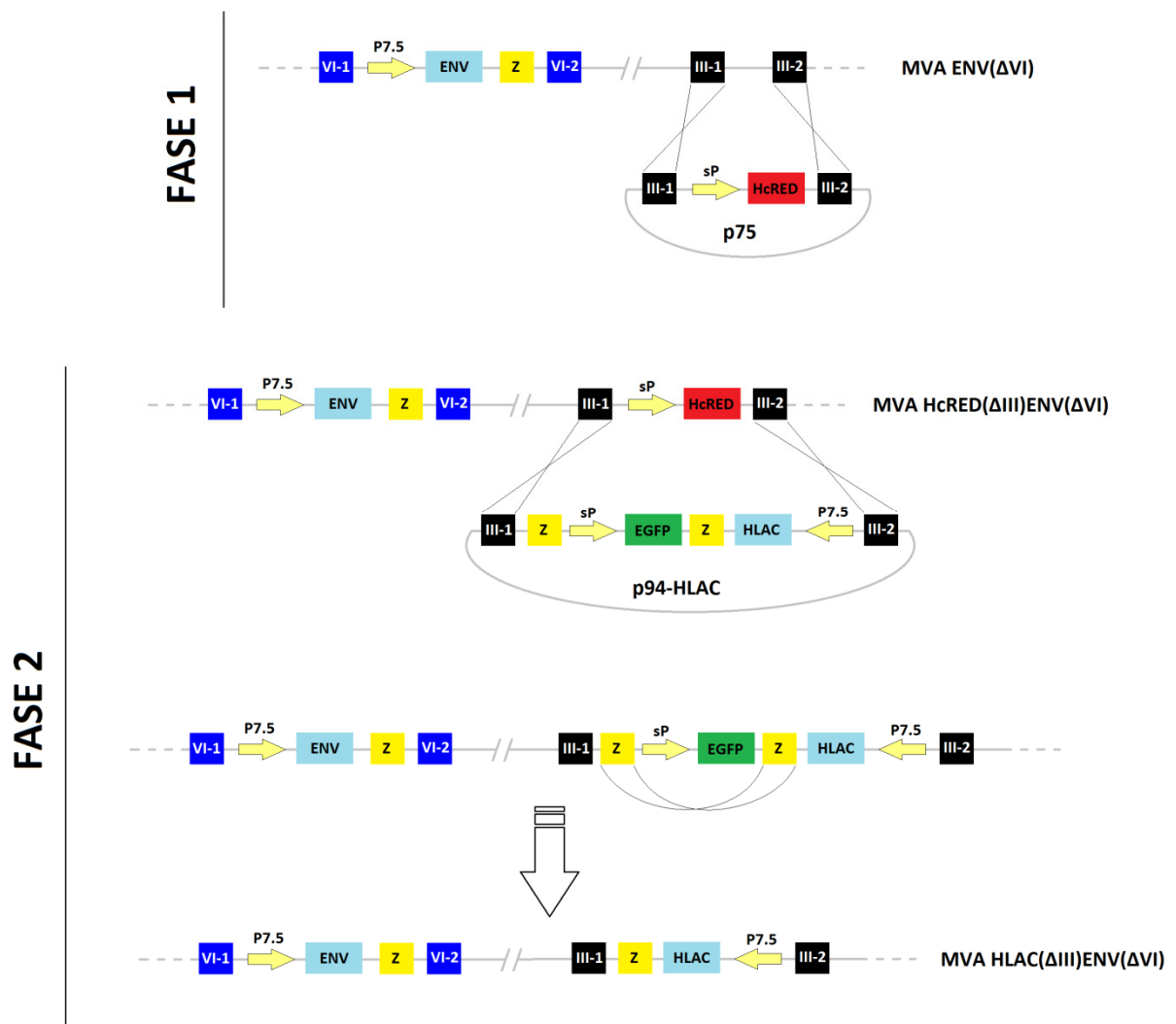


Figura 17. Razionale di generazione del virus MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI). In blu, le *flanking region* della regione Δ VI, in nero quelle della regione Δ III. Nella fase 1 è stato generato il virus accettore nella regione Δ III, impiegato nella successiva fase 2 insieme al plasmide p94-HLAC per la generazione del ricombinante doppio.

1.1 FASE 1: generazione del virus accettore MVA HcRED(Δ III)ENV(Δ VI)

Il virus MVA HcRED(Δ III)ENV(Δ VI) è stato generato in precedenza nel laboratorio su cellule BHK-21 sfruttando il metodo del *Red-to-Green gene swapping* (Di Lullo et al. 2010).

In breve, cellule BHK-21 (permissive) sono state infettate con virus MVA ENV(Δ VI) e trasfettate col plasmide p75 per indurre ricombinazione omologa nella regione Δ III e generare virus esprimenti la proteina rossa. Sulle cellule è stato poi colato dell'agarosio così da ridurre l'espansione del virus e generare foci discreti di infezione. I foci rossi, la cui fluorescenza è sinonimo di avvenuta ricombinazione, sono stati quindi prelevati dai pozzetti e espansi su BHK-21 fresche. Tale procedimento è stato ripetuto più volte al fine di rimuovere il *carry-over* parentale (non fluorescente). Da ultimo, l'isolamento di un singolo clone è stato effettuato attraverso diluizione terminale, al termine della quale il virus è stato prodotto in *stock* e caratterizzato per PCR.

1.2 FASE 2: generazione del virus MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI)

1.2.1 Costruzione del plasmide donatore p94-HLAC

Il plasmide di trasferimento col gene HLAC nella regione Δ III (p94-HLAC) è stato costruito a partire dai plasmidi p94 (Di Lullo et al. 2010) e pHLAC. L'inserto HLAC è stato exciso da pHLAC con gli enzimi BamHI e Ascl e successivamente ligato in p94 tagliato con i medesimi enzimi. Le colonie sono state saggiate per restrizione (Figura 18A) e una di esse è stata ulteriormente digerita con altri enzimi per confermarne la struttura (Figura 18B) prima del suo uso nel protocollo di ricombinazione.

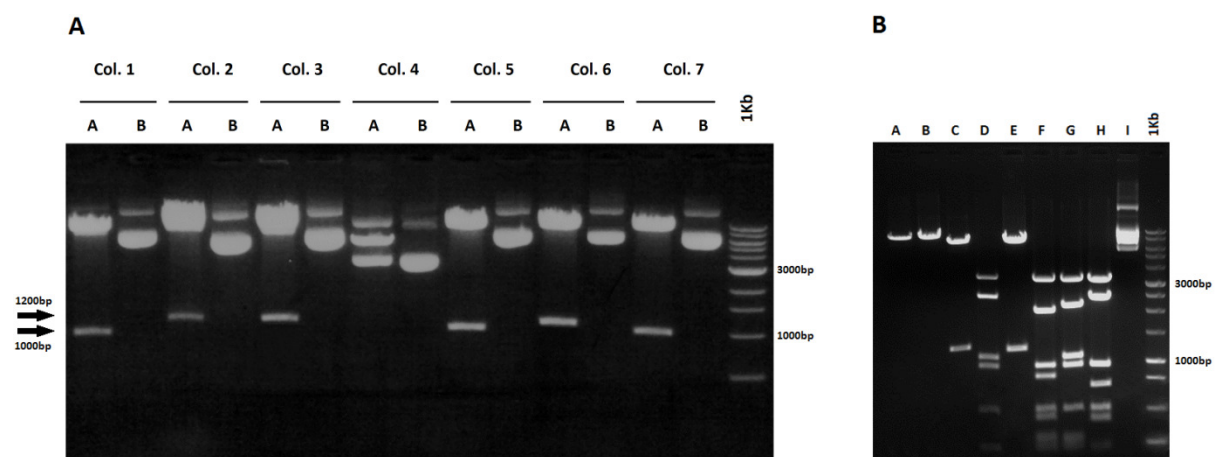


Figura 18. Screening delle colonie ottenute trasformando il prodotto di ligazione tra p94 e HLAC (A) e ulteriore controllo della colonia 2 mediante altri enzimi (B). **A)** A=BamHI+Ascl B=Non digerito. Le colonie 2, 3 e 6 risultano positive per l'inserto di circa 1200bp. **B)** A= BamHI, B= Ascl, C= SacI, D= Avall, E= BamHI+Ascl, F= Avall+SacI, G= Avall+BamHI, H= Avall+Ascl, I= non digerito. L'enzima SacI taglia nel MCS e nell'inserto, generando due bande analoghe alla digestione BamHI+Ascl. L'enzima Avall digerisce molteplici volte nel vettore e nell'inserto, dando origine ad un pattern di restrizione compatibile con l'atteso.

1.2.2 Generazione del virus ricombinante doppio MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI)

A questo punto, il plasmide p94-HLAC è stato impiegato in qualità di donatore nel protocollo di infezione/trasfezione su SF-CEF unitamente al virus accettore MVA HcRED(Δ III)ENV(Δ VI). I virus ricombinanti, esprimenti EGFP, sono stati selezionati per *sorting* a singola cellula e poi clonati tramite due cicli di diluizione terminale. Durante questi passaggi, il *marker* EGFP è stato perso in seguito all'evento di ricombinazione tra le regioni Z, dando origine a virus MVA privi di *marker* fluorescente e, pertanto, individuabili unicamente grazie all'effetto citopatico provocato nelle cellule infettate. Alcuni cloni privi di fluorescenza sono stati saggiati tramite citometria per verificare l'espressione di HLAC sulla superficie delle cellule (Figura 19) e due di essi sono stati espansi su cellule SF-CEF per la produzione dello *stock*. Dopo purificazione su cuscino di saccarosio, i due *stock* sono stati saggiati per l'espressione dei TG HLAC e ENV e per la corretta localizzazione sulla superficie cellulare rispettivamente attraverso western blot e citometria (Figura 20). Il risultato del western blot non ha messo in evidenza differenze qualitative di espressione tra il virus doppio MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI) e i rispettivi controlli MVA monogenici, suggerendo che l'inserimento di geni in punti diversi di MVA non influisce sulla loro espressione. La citometria, infine, mostra chiaramente che l'infezione di cellule S-CEF con MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI) è in grado di indurre un fenotipo positivo per entrambi i TG, garantendo al contempo la corretta localizzazione sulla superficie cellulare.

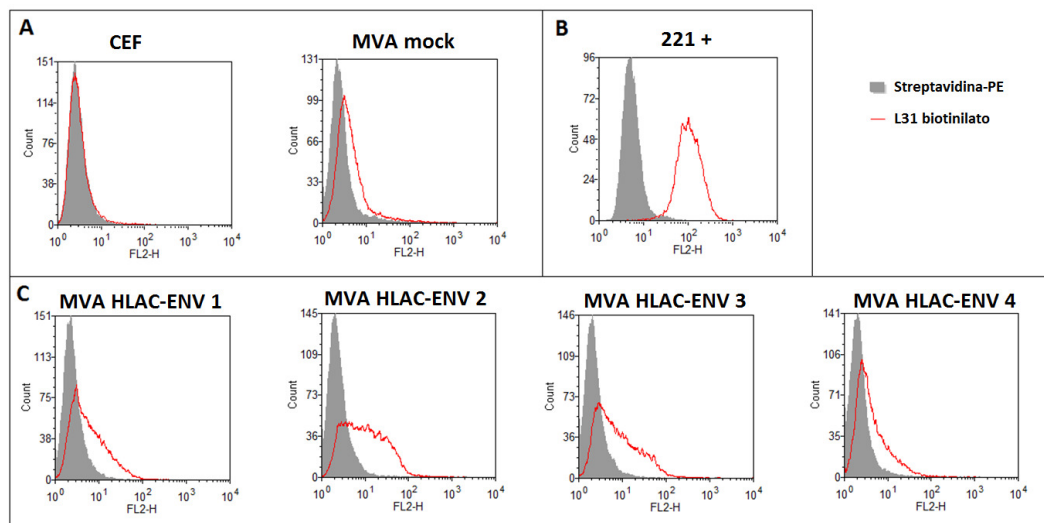


Figura 19. Citometria di controllo su quattro cloni del virus MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI), eseguita su S-CEF. I campioni sono stati raccolti 48h p.i. con i virus indicati. Per la marcatura è stato impiegato l'anticorpo L31-biotinitato, accoppiato successivamente a streptavidina-PE. A = controlli negativi; B = controllo positivo di HLAC sulla linea 221+ (771.221 CW4⁺); C = quattro cloni del virus MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI). Due di essi (MVA HLAC-ENV 1 e MVA HLAC-ENV 2) sono stati selezionati ed espansi per la produzione dello *stock*.

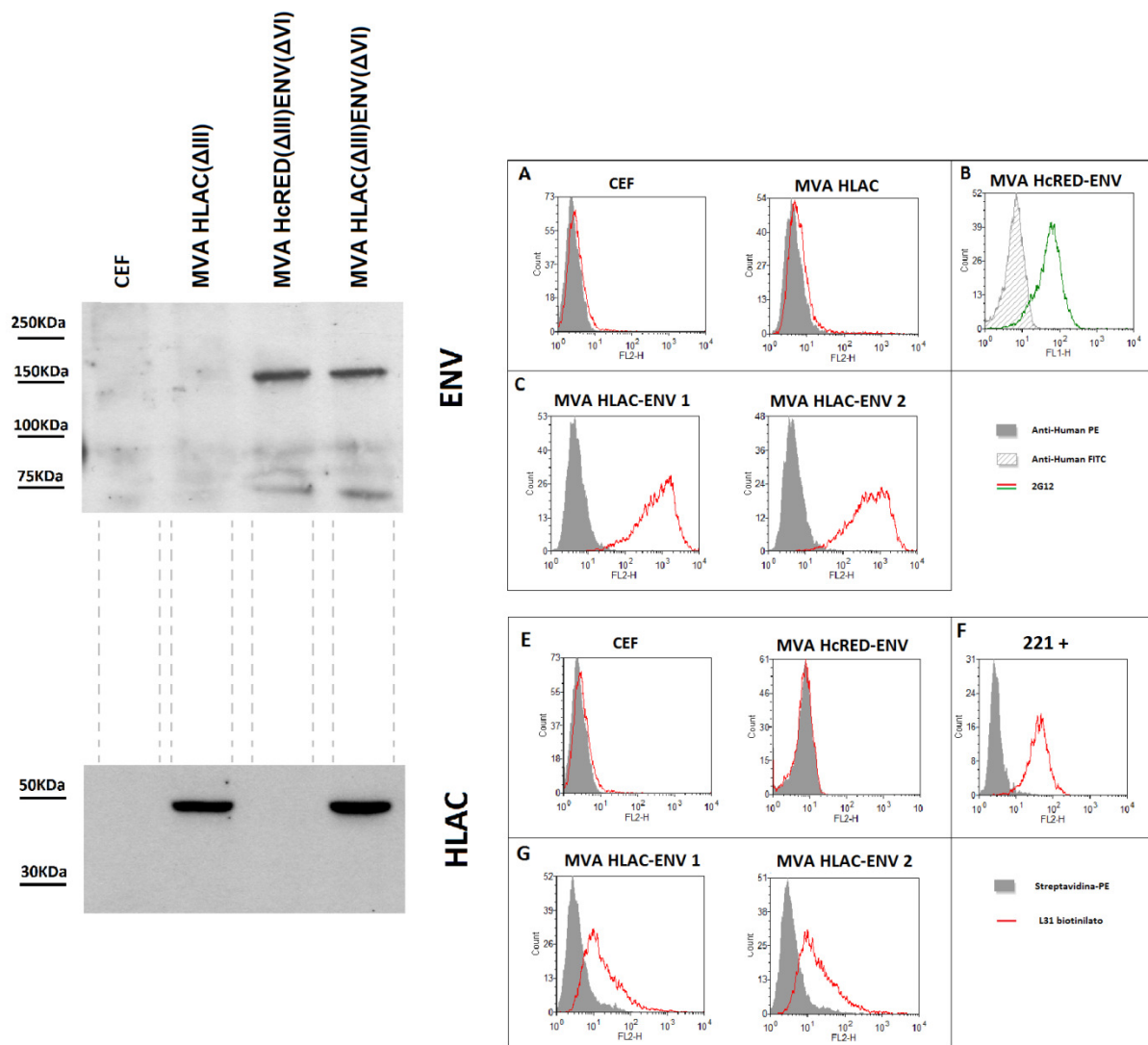


Figura 20. Western blot (a sinistra) e citometria (a destra) di controllo sugli stock di MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI) su S-CEF. I campioni sono stati raccolti 48h p.i. con i virus indicati. Il western blot per ENV (in alto a sinistra, banda a 160KDa) è stato sviluppato usando l'anticorpo 2F5, mentre per la citometria (in alto a destra) è stato impiegato l'anticorpo 2G12. Per quanto riguarda HLAC, è stato impiegato l'anticorpo L31-biotinilato sia nel western Blot (in basso a sinistra, banda a 40KDa) sia nella citometria (in basso a destra). A,E = controlli negativi; B = controllo positivo di ENV sul virus accettore MVA HcRED(Δ III)ENV(Δ VI); C,G = stock virali MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI) F = controllo positivo di HLAC sulla linea 771.221 CW4⁺.

2. Produzione del virus MVA HA(Δ III)NP(Δ VI)

Analogamente a quanto fatto nel capitolo precedente, è stato generato un secondo virus ricombinante, MVA HA(Δ III)NP(Δ VI), contenente cioè i TG influenzali emoagglutinina (HA) nella regione Δ III e nucleoproteina (NP) nella regione Δ VI. Essendo partiti dal virus MVA HA(Δ III), la strategia di ricombinazione (Figura 21) è speculare rispetto alla precedente ed ha reso necessaria la costruzione di due nuovi plasmidi contenenti le regioni di omologia fiancheggianti Δ VI: p675, il

plasmide donatore della proteina rossa per la generazione del virus accettore MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI), e p604, il plasmide di trasferimento codificante per la proteina verde, nel quale è stato successivamente inserito il TG NP.

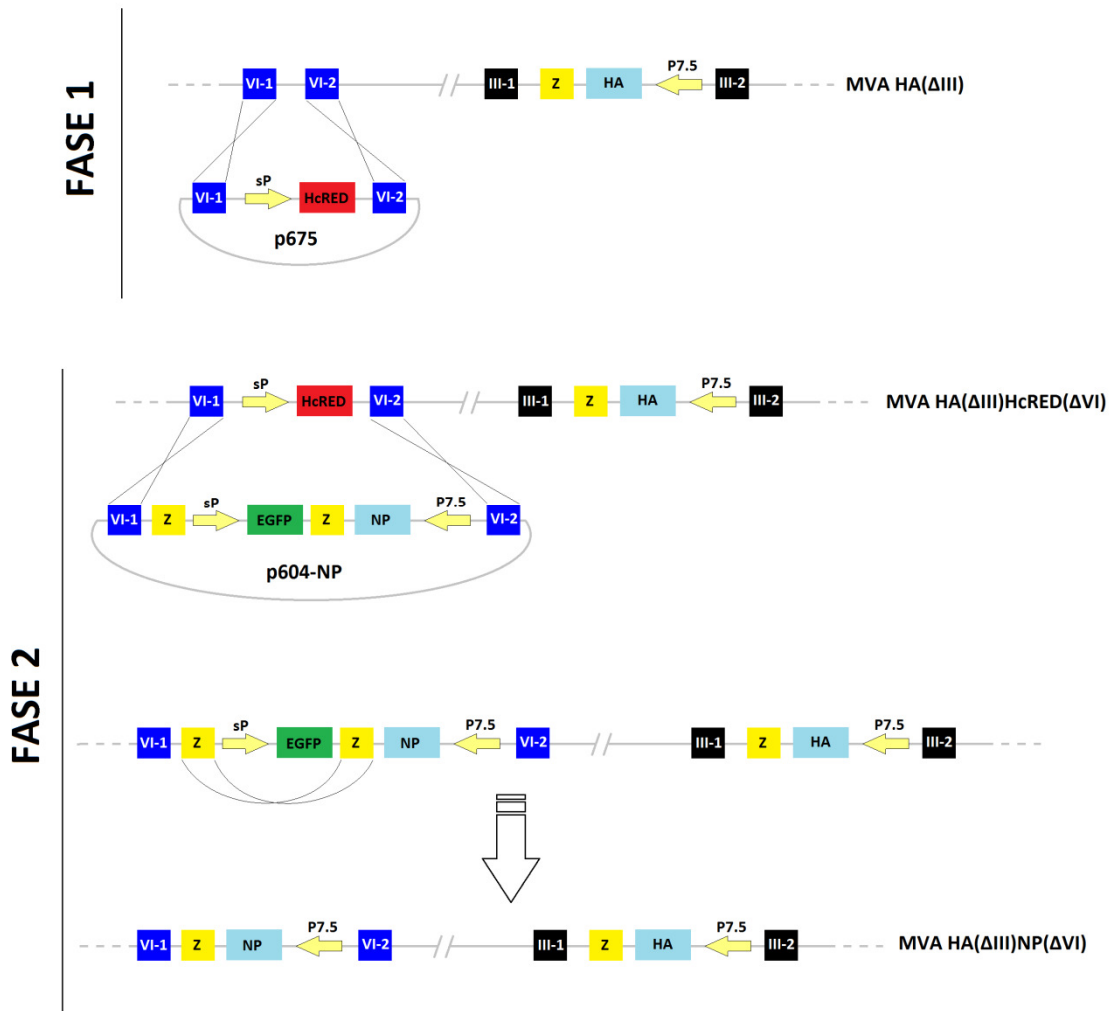


Figura 21. Razionale della generazione del virus MVA HA(Δ III)NP(Δ VI). In blu, le *flanking region* della regione Δ VI, in nero quelle della regione Δ III. Analogamente, ma in maniera speculare a quanto fatto per il virus MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI), nella fase 1 è stato generato il virus accettore contenente HcRED nella regione Δ VI, il quale è stato impiegato nella successiva fase 2 insieme al plasmide p604-NP per la generazione del ricombinante doppio.

2.1 FASE 1: generazione del virus accettore MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI)

2.1.1 Costruzione del plasmide p675

Il plasmide donatore della proteina rossa è stato assemblato a partire dal plasmide p60 (ottenuto da Gerd Sutter, TU, Monaco e originalmente chiamato pVIdHR-sP/P7.5), contenente le regioni di omologia per la regione Δ VI (Figura 22A), e dal plasmide p75 (Di Lullo et al. 2010), contenente il gene HcRED sotto promotore virale sP (Figura 22B), entrambi già presenti in laboratorio.

Non avendo a disposizione siti di restrizione adeguati per trasferire il gene HcRED da p75 a p60, i frammenti sono stati derivati tramite PCR utilizzando *primer* recanti agli estremi il sito di restrizione Bsu36I (che consente una inserzione monodirezionale, Figura 22A e B). Le colonie ottenute trasformando il prodotto della ligazione in batteri E.Coli sono state sottoposte a restrizione enzimatica per identificare quali contenessero l'inserito (Figura 23). Per escludere la presenza di mutazioni indotte dalla PCR, quattro colonie positive sono state sequenziate. Una di esse, la cui sequenza è risultata pari all'atteso, è stata sottoposta al test *in vitro* volto a saggiare l'espressione della proteina rossa tramite infezione/trasfezione su cellule HEK-293T, confermata tramite osservazione in microscopia a fluorescenza (Figura 24).

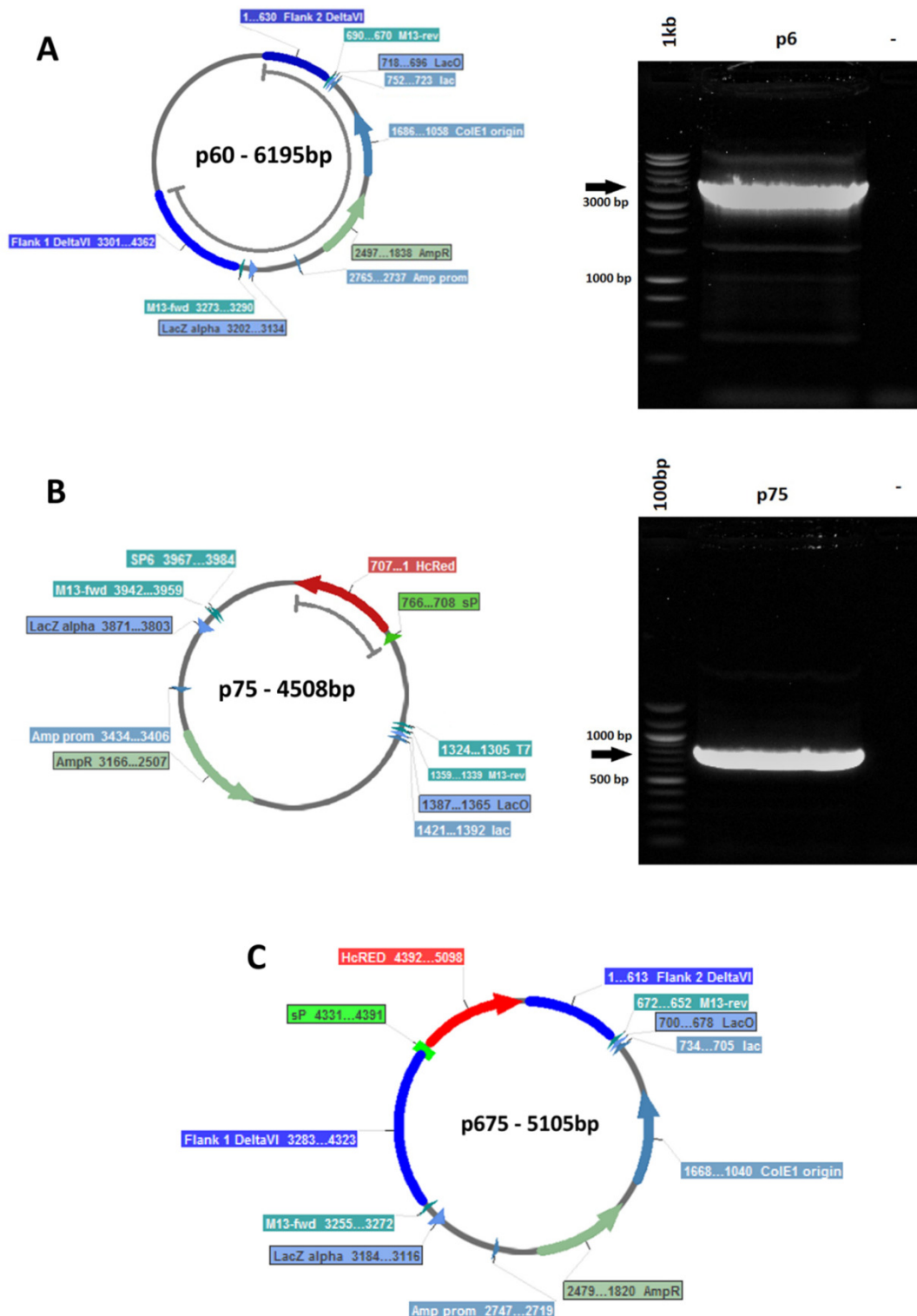


Figura 22. PCR preparativa dei frammenti per la generazione di p675. **A)** Mappa di p60, contenente la *flanking region* Δ VI (in blu). **B)** Mappa di p75, contenente il gene HcRED (in rosso) sotto promotore virale sP (in verde). Sulle mappe sono evidenziati i frammenti estratti per PCR, indicati da una freccia sui relativi gel di agarosio. **C)** Mappa di p675.

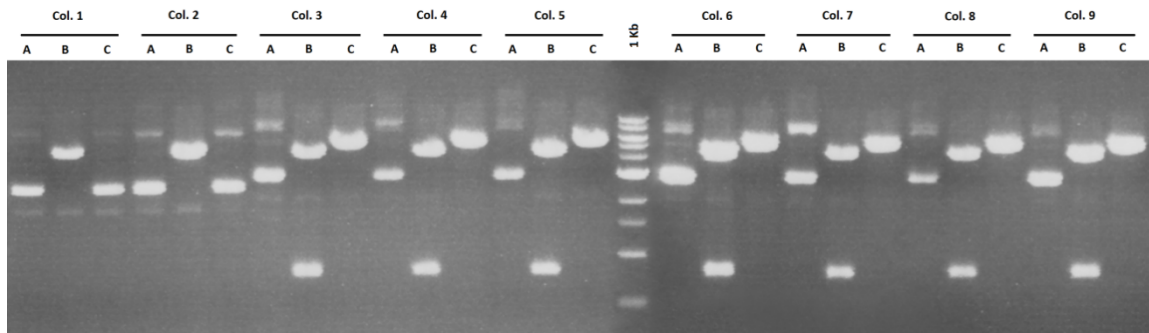


Figura 23. Screening delle colonie ottenute trasformando il prodotto di ligazione tra i frammenti di p60 e p75 ottenuti per PCR. A=non digerito, B=Bsu36I, C=EcoNI. La digestione con Bsu36I restituisce i due frammenti di partenza di circa 4.3kb e 760bp. EcoNI digerisce un'unica volta all'interno di HcRED, linearizzando il plasmide. Le colonie 1 e 2 non contengono l'inserto, mentre tutte le altre mostrano un pattern di restrizione compatibile con p675.

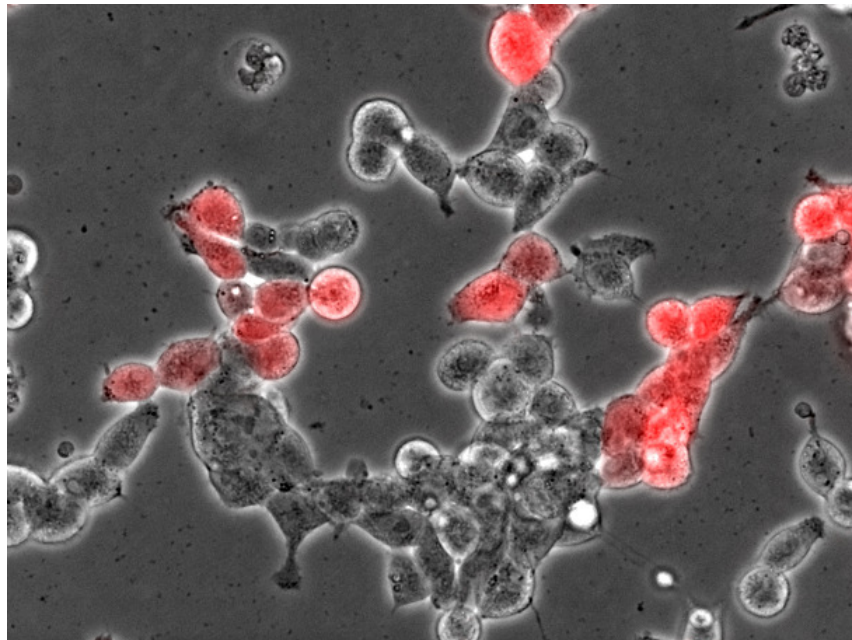


Figura 24. Immagine microscopica (40X) di cellule HEK-293T infettate con MVA V4 e trasfettate con p675. Le cellule infettate appaiono tondeggianti già 24h p.i., indicando che la linea HEK293T è particolarmente sensibile all'infezione con MVA. Le cellule al contempo infettate e trasfettate risultano rosse poiché in esse viene espresso il gene HcRED sotto promotore virale sP.

2.1.1.1 Generazione del virus accettore MVA HcRED(Δ VI)

Prima di impiegare il plasmide p675 nella generazione del virus contenente due TG, la sua capacità di ricombinazione è stata saggiata su un virus MVA vuoto: utilizzando il protocollo di infezione/trasfezione sulle cellule primarie di pollo (SF-CEF), la proteina HcRED è stata inserita all'interno della regione Δ VI del genoma virale, portando alla generazione del virus accettore MVA

HcRED(Δ VI). Le cellule infettate dai virus ricombinanti, esprimenti quindi HcRED, sono state selezionate tramite FACS e seminate in piastre da 96 pozzetti (Figura 25A). Dopo pochi giorni, alcuni pozzetti presentanti foci rossi sono stati saggiati per PCR, il cui risultato mostra chiaramente l'avvenuta ricombinazione del gene HcRED all'interno della regione Δ VI (Figura 25B). Il virus accettore MVA HcRED(Δ VI) è stato infine clonato attraverso diluizione terminale.

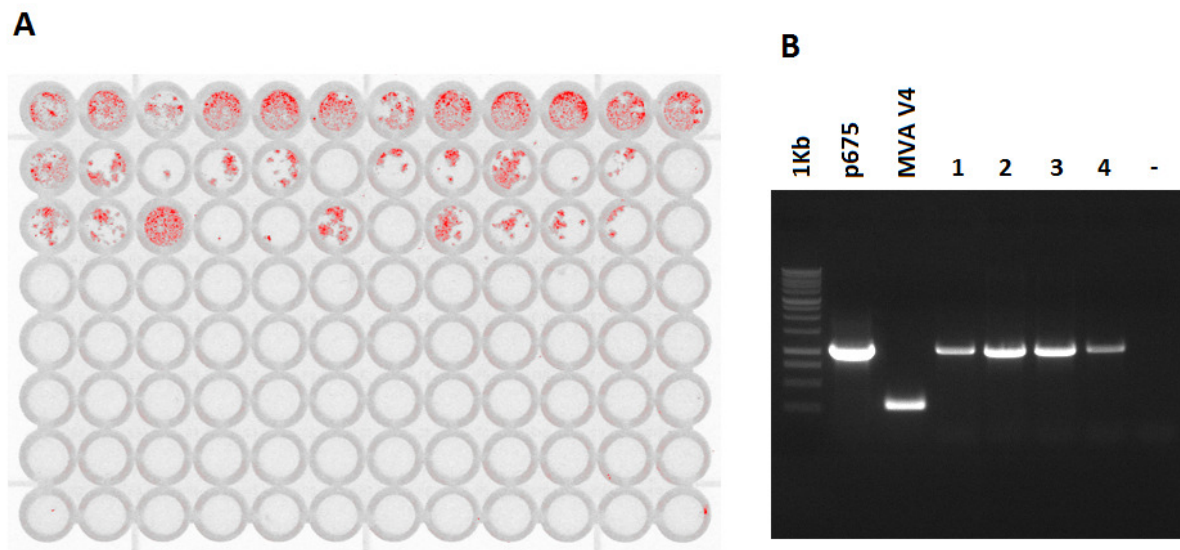


Figura 25. Piastra di sorting (A) e PCR di controllo con primer specifici per la regione Δ VI. **A)** La presenza di foci rossi indica che il virus presente è in grado di esprimere HcRED nelle cellule infettate. **B)** La conferma dell'avvenuta ricombinazione all'interno della regione Δ VI è stata ottenuta attraverso PCR, effettuata su quattro pozzetti positivi per HcRED e impiegando il plasmide p675 e MVA V4 rispettivamente in qualità di controllo positivo e negativo. La banda attesa è di poco superiore a 1kb.

2.1.2 Generazione del virus accettore MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI)

Il plasmide p675 è stato successivamente utilizzato nel protocollo di infezione/trasfezione col virus MVA HA(Δ III) in cellule SF-CEF, così da indurre ricombinazione omologa nella regione Δ VI e generare il virus accettore MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI).

Virus ricombinanti, esprimenti quindi la proteina rossa, sono stati selezionati e clonati tramite due cicli di *sorting* a singola cellula (Figura 26A) seguiti da una diluizione terminale su SF-CEF (Figura 26B) in piastre da 96 pozzetti. Ad ogni passaggio, i pozzetti positivi per la fluorescenza sono stati ulteriormente analizzati a mezzo di PCR, utilizzando primer specifici per la regione Δ III (Figura 27A), per il gene HA (Figura 27B) e per la regione Δ VIa (Figura 27C). In tal modo, è stato possibile

individuare a livello molecolare l'eventuale presenza di *carry-over* parentale o di altri eventuali virus contaminanti. Uno dei cloni positivi (RED- e HA-positivo) è stato infine espanso su SF-CEF e il lisato così ottenuto impiegato per produrre uno stock del virus accettore MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI), da utilizzare per la generazione del doppio ricombinante.

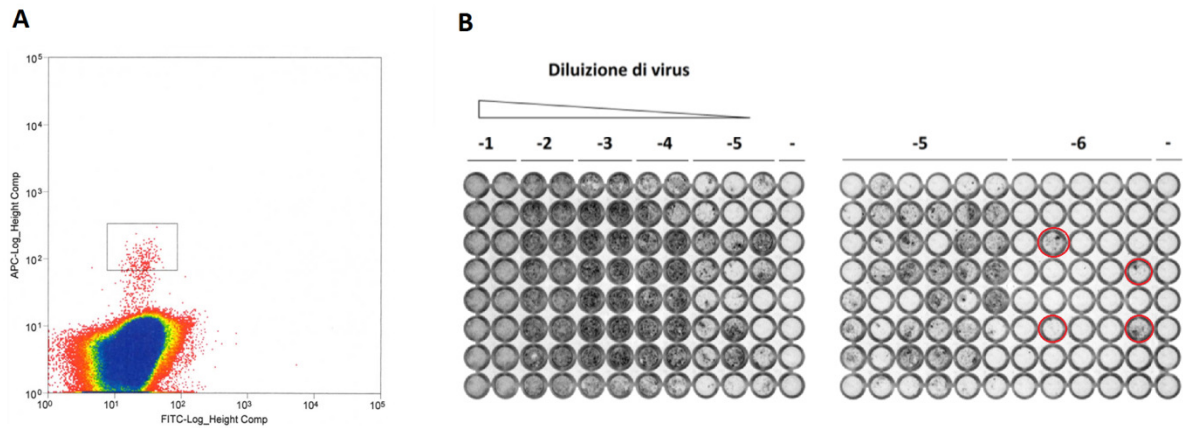


Figura 26. Scatter plot di FACS su SF-CEF infettate col lisato ottenuto da infezione/trasfezione con MVA HA(Δ III) e p675 (A) e diluizione terminale su SF-CEF di un clone MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI) (B). **A)** Sull'ascissa è riportato il logaritmo dell'intensità della fluorescenza verde, sull'ordinata il logaritmo dell'intensità della fluorescenza rossa. La nuvola principale è costituita da cellule non infettate o infettate da virus privi di proteina fluorescente. In seguito a infezione/trasfezione, una piccola popolazione ricombinante esprime proteina rossa può essere individuata e isolata tramite FACS, il cui *gate* di acquisizione è rappresentato dal rettangolo. **B)** La diluizione di virus utilizzata è espressa come Log_{10} . Nella piastra a sinistra, le due file di pozzetti con diluizione minore sono totalmente lisate, pertanto non è visibile fluorescenza rossa. Nella piastra a destra, nei pozzetti con diluizione 10^{-6} , solo 4 pozzetti su 40 risultano positivi (cerchiati di rosso), garantendo una buona probabilità di avvenuto clonaggio (pari al 99.5% secondo la distribuzione di Poisson).

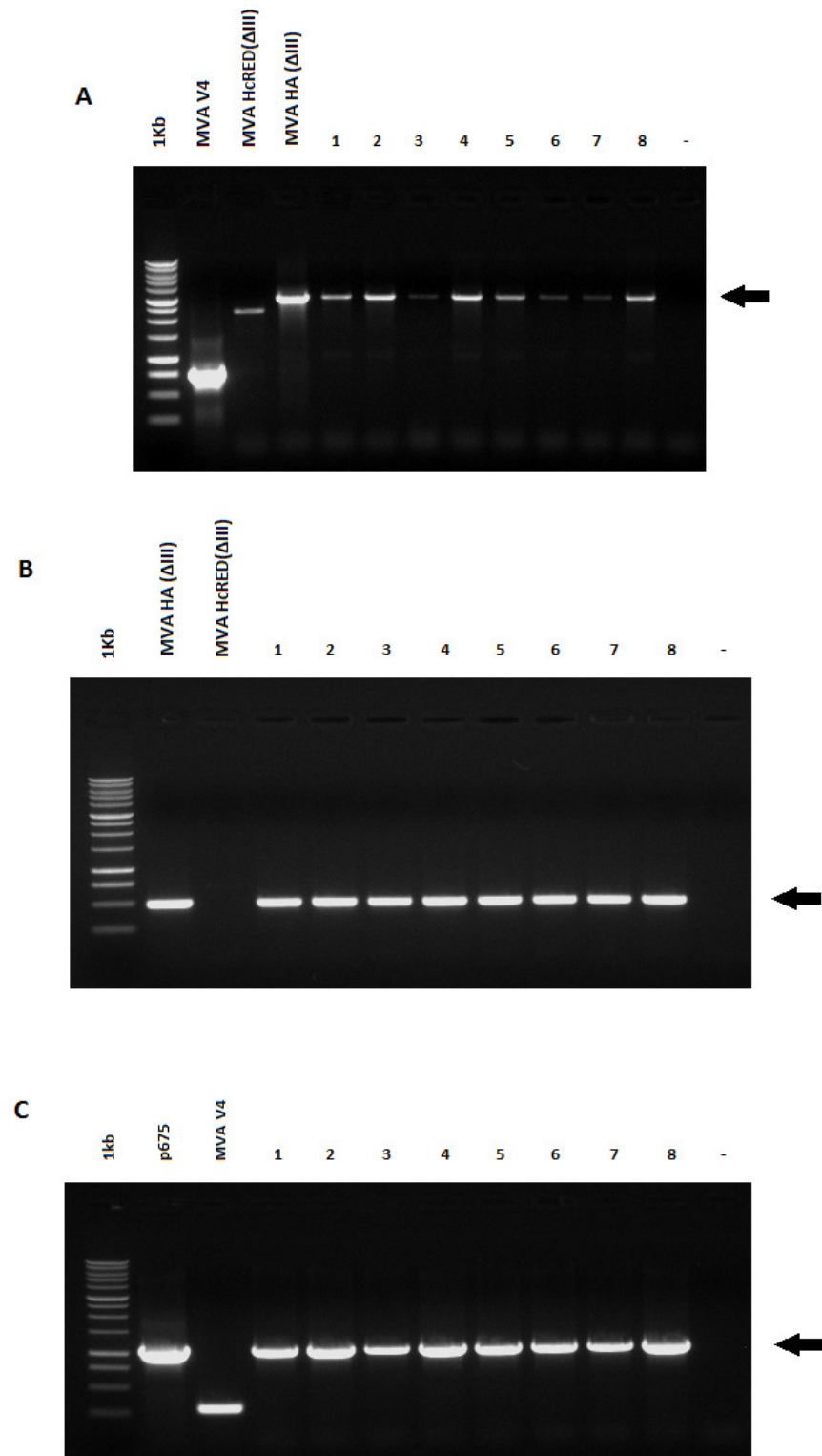


Figura 27. Esempio di PCR con primer specifici per la regione Δ III (A), per il gene HA (B) e per la regione Δ VIa (C). MVA V4 non contiene alcun gene né nella regione Δ III né nella regione Δ VI, pertanto le due bande evidenziate in A e C rappresentano le distanze tra le sequenze riconosciute dai *primer*, rispettivamente di circa 700bp e circa 270bp. MVA HcRed(Δ III) contiene il gene HcRED nella regione Δ III. Gli otto cloni di MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI) saggiati sono positivi sia per il gene HA nella regione Δ III (A e B) sia per il gene HcRED nella regione Δ VI (C).

2.2 FASE 2: generazione del virus MVA HA(Δ III)NP(Δ VI)

2.2.1 Costruzione del plasmide p604

Il plasmide di trasferimento p604 (Figura 28F), contenente il *marker* EGFP e un MCS tra le regioni di omologia per la regione Δ VI, è stato assemblato a partire dai plasmidi p104 (analogo del p94 e contenente un MCS migliorato) e p60 (Figura 28A e D), già presenti nel laboratorio.

Il frammento contenente il MCS e il *marker* EGFP è stato exciso dal plasmide p104 attraverso due digestioni consecutive (una totale con l'enzima SnaBI e l'altra parziale con l'enzima BstBI, Figura 28B e C) e successivamente reso *blunt* impiegando il frammento Klenow della DNA polimerasi. Il *backbone*, contenente le regioni di omologia per la regione Δ VI, è stato invece ottenuto digerendo il plasmide p60 con PmeI e SnaBI (Figura 28E). Dopo ligazione *in vitro* e trasformazione in batteri *E.Coli*, le colonie ottenute sono state saggiate per restrizione al fine di individuare quelle contenenti l'inserto orientato nel verso desiderato (Figura 29).

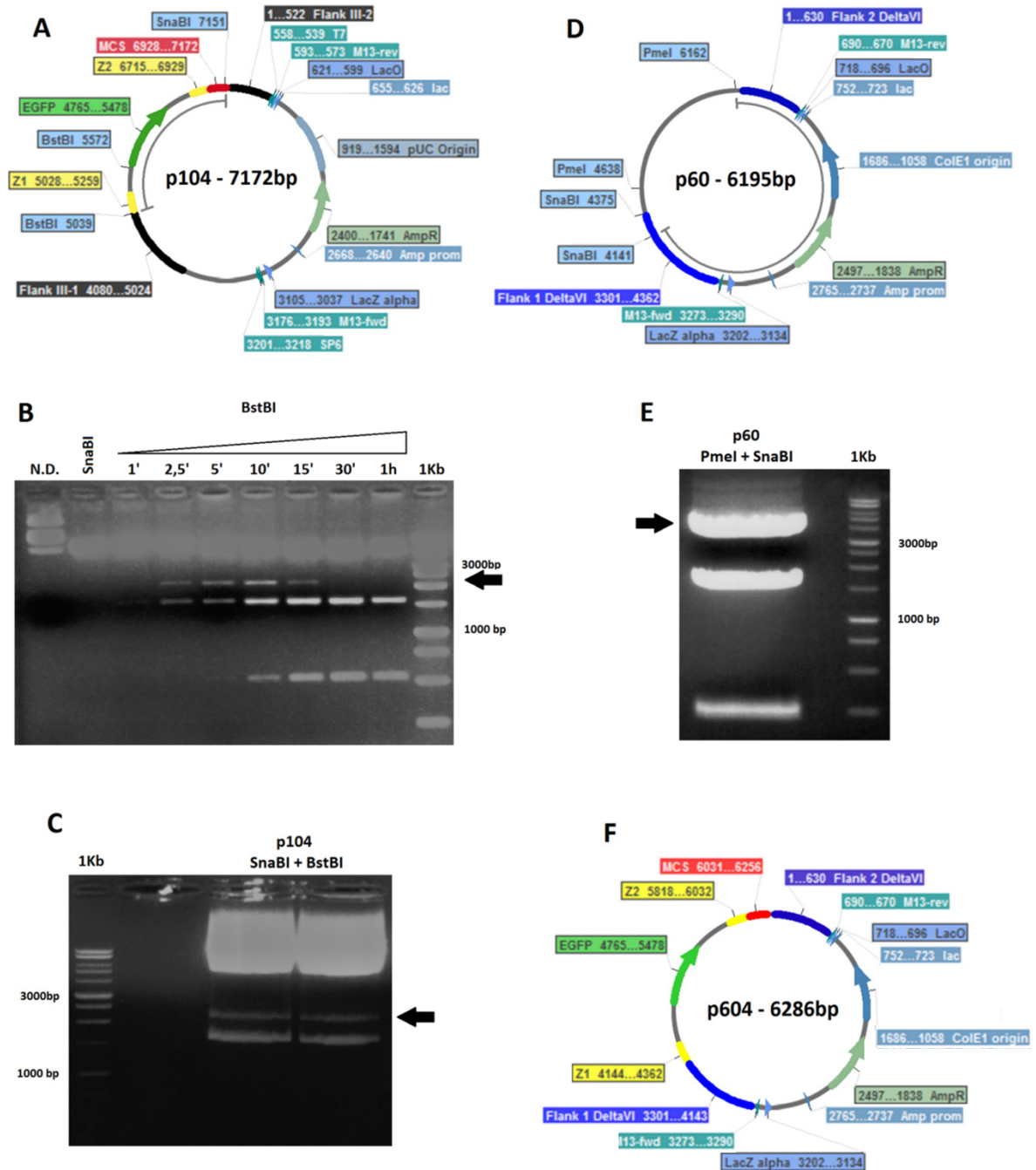


Figura 28. Costruzione del plasmide p604. **A)** Mappa del plasmide p104, nella quale è indicato il frammento exciso tramite digestione enzimatica. In nero sono riportate le *flanking region* per la regione Δ III, in rosso l'MCS, in giallo le due regioni Z, in verde il gene per EGFP. **B)** Messa a punto della digestione parziale di p104. Dopo digestione totale con SnaBI, il plasmide p104 è stato ulteriormente ristretto per il tempo indicato con BstBI. La banda di interesse, indicata dalla freccia e contenente le due regioni Z, EGFP e MCS, inizia ad essere evidente dopo 2'30'' di digestione con BstBI e raggiunge il picco dopo 10' di digestione. **C)** Digestione preparativa di p104, effettuata con le condizioni individuate nel punto B. La banda excisa è indicata dalla freccia. **D)** Mappa del plasmide p60, nella quale è indicato il frammento exciso per digestione enzimatica. In blu sono riportate le *flanking region* per la regione Δ VI. Si noti che il taglio dell'enzima SnaBI sottrae circa 220bp. **E)** Digestione preparativa di p60 con PmeI e SnaBI. La banda del *backbone* contenente le *flanking region* è indicata dalla freccia. **F)** Mappa di p604. In blu sono riportate le *flanking region* per la regione Δ VI, in rosso l'MCS, in giallo le due regioni Z, in verde il gene per EGFP.

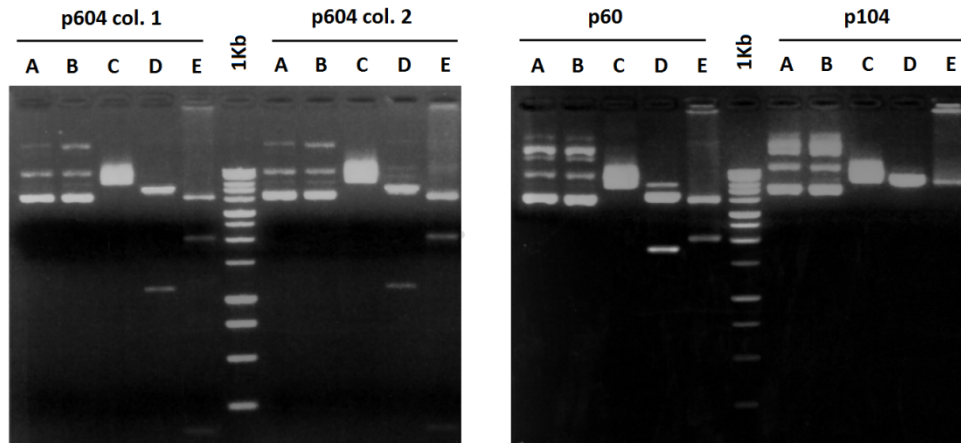


Figura 29. Digestione enzimatica di due colonie del plasmide p604 (a sinistra) e dei plasmidi impiegati per la sua costruzione (a destra). A = non digerito; B = NruI, taglia nell'inserto; C = AscI, taglia nell'inserto; D = HpaI, taglia nel vettore e nell'inserto in maniera asimmetrica, determinando il verso di inserimento, senso (5130bp+1156bp) o antisenso (4324bp+1962bp); E = BstBI, taglia 2 volte nel vettore e una volta nell'inserto, generando 3 frammenti che identificano il verso di inserimento (senso: 4058bp+2080bp+172bp, antisenso: 5128bp+1010bp+172bp). Dalle bande di restrizione ottenute, si conclude che le due colonie saggiate contengono l'inserto orientato nel verso desiderato.

2.2.2 Costruzione del plasmide di trasferimento p604-NP

A partire dal p604 è stato poi costruito il plasmide di trasferimento p604-NP (Figura 30D), contenente la proteina NP (fusa al C-terminale col tag V5) e il *marker* EGFP tra le regioni di omologia per la regione ΔVI . Il gene NP è stato exciso dal plasmide p94-NP, già presente nel laboratorio (Figura 30B), e ligato al vettore p604 utilizzando i siti BamHI e AscI. Le colonie ottenute dopo trasformazione sono state saggiate tramite restrizione enzimatica (Figura 31A e B) e due di esse sono state impiegate nel protocollo di infezione/trasfezione in cellule S-CEF per verificare l'espressione delle proteine contenute nella cassetta di ricombinazione. La fluorescenza verde di EGFP è stata osservata al microscopio a fluorescenza a partire da 12-18h p.i. (Figura 32A), mentre la presenza di NP è stata dimostrata tramite western blot eseguito 48h p.i. (Figura 32B).

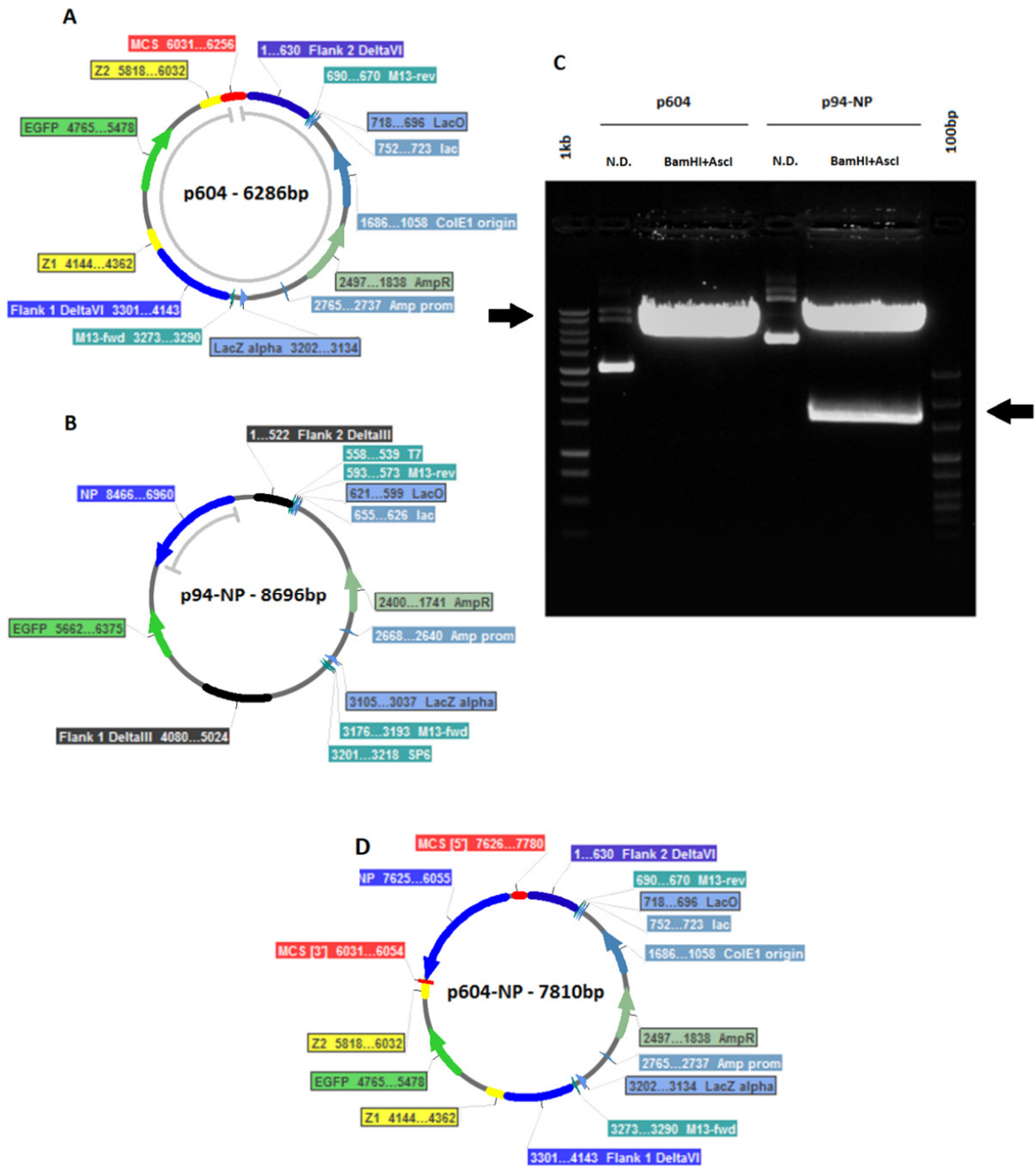


Figura 30. Digestione preparativa dei frammenti per la ligazione di p604-NP. **A)** Mappa di p604, contenente MCS (in rosso) e EGFP (verde) tra le regioni di omologia per Δ VI (blu). **B)** Mappa di p94-NP, contenente NP (in blu). **C)** Gel di digestione preparativa. N.D.= non digerito. P604, digerito nel MCS (in rosso) con BamHI e Ascl, genera un frammento di circa 6245bp (lato sinistro). P94-NP, digerito con BamHI e Ascl, genera un frammento di circa 1565bp contenente NP (lato destro). Le frecce indicano le bande excise. **D)** Mappa di p604-NP.

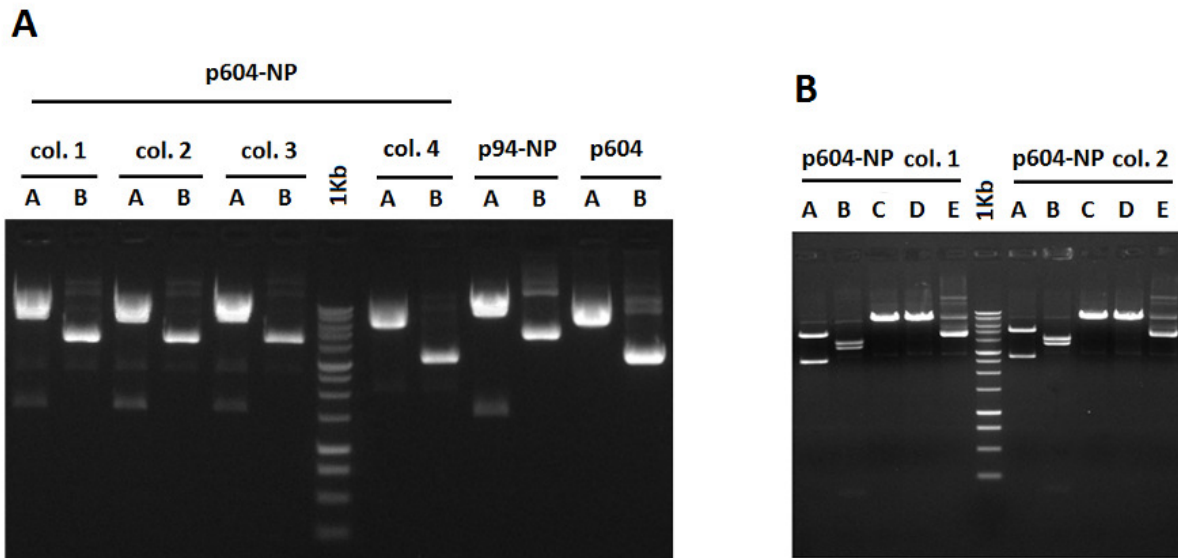


Figura 31. Digestione di controllo di due colonie ottenute dopo la trasformazione del prodotto di ligazione tra p604 e NP (A) e ulteriore restrizione di due di esse (B). **A)** A = BamHI+Ascl; B = non digerito. La digestione con BamHI+Ascl genera in p604-NP due frammenti di 1565bp (NP) e 6245bp (vettore). Le colonie 1, 2 e 3 risultano positive, mentre la 4 non possiede l'inserto (probabile contaminante derivato da p604). **B)** A = HpaI, digerisce due volte nel vettore originando due frammenti di 5130bp e 2680bp; B = BstBI, digerisce tre volte nel vettore generando altrettanti frammenti di 4059bp, 3579bp e 172bp; C = NotI, taglia una volta nel vettore; D = NheI, taglia una volta nel vettore; E = non digerito. Entrambe le colonie mostrano un profilo di digestione compatibile con l'atteso.

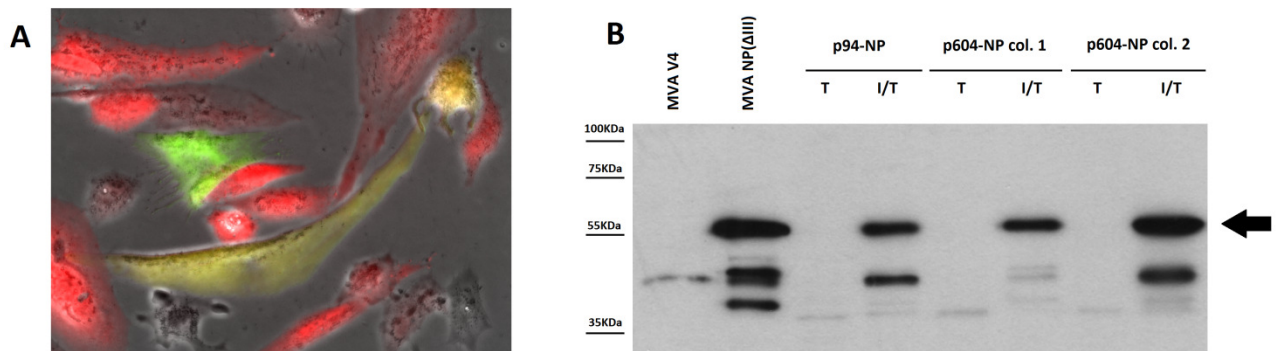


Figura 32. Infezione/Trasfezione visualizzata in microscopia a fluorescenza (40X, A) e western blot con anticorpo anti-V5 su estratti totali di S-CEF. **A)** Cellule S-CEF sono state infettate con MVA HcRED(Δ III) e trasfettate col plasmide p604-NP. Il *merge* delle acquisizioni per le due fluorescenze (HcRED e EGFP) mostra chiaramente colocalizzazione: EGFP è pertanto espressa unicamente nelle cellule al contempo infettate e trasfettate, come atteso. **B)** T = cellule trasfettate col plasmide indicato. I/T = cellule infettate con MVA HcRED(Δ III) e trasfettate col plasmide indicato. Il virus MVA NP(Δ III), recante cioè la proteina NP nella regione Δ III, era già stato prodotto nel laboratorio ed è il controllo positivo. NP viene trascritto unicamente in presenza del virus (campioni I/T, banda a 56KDa indicata dalla freccia).

2.2.3 Generazione del virus MVA HA(Δ III)NP(Δ VI)

Il plasmide donatore p604-NP e il virus accettore MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI) sono stati infine impiegati nel protocollo di infezione/trasfezione su SF-CEF per indurre ricombinazione omologa nella regione Δ VI e generare il virus MVA HA(Δ III)NP(Δ VI). I virus ricombinanti, esprimenti EGFP, sono stati sottoposti a due cicli *sorting* a singola cellula (Figura 33 A e B). Due cloni positivi sono stati ulteriormente sottoposti a *sorting*, questa volta allo scopo di isolare i virus che, effettuata ricombinazione omologa tra le regioni Z, hanno perso il gene codificante per l'EGFP e, quindi, risultano privi di *marker* fluorescente. La successiva visualizzazione al microscopio di effetti citopatici culminanti con la lisi delle cellule ha permesso di individuare la presenza di virus non fluorescenti all'interno dei pozzetti. Un clone positivo è stato infine espanso su cellule SF-CEF per la produzione dello *stock*, successivamente purificato, titolato e saggiato mediante un western blot (Figura 34): come per il virus descritto nel capitolo precedente, anche MVA HA(Δ III)NP(Δ VI) si dimostra in grado di esprimere entrambi i TG contenuti.

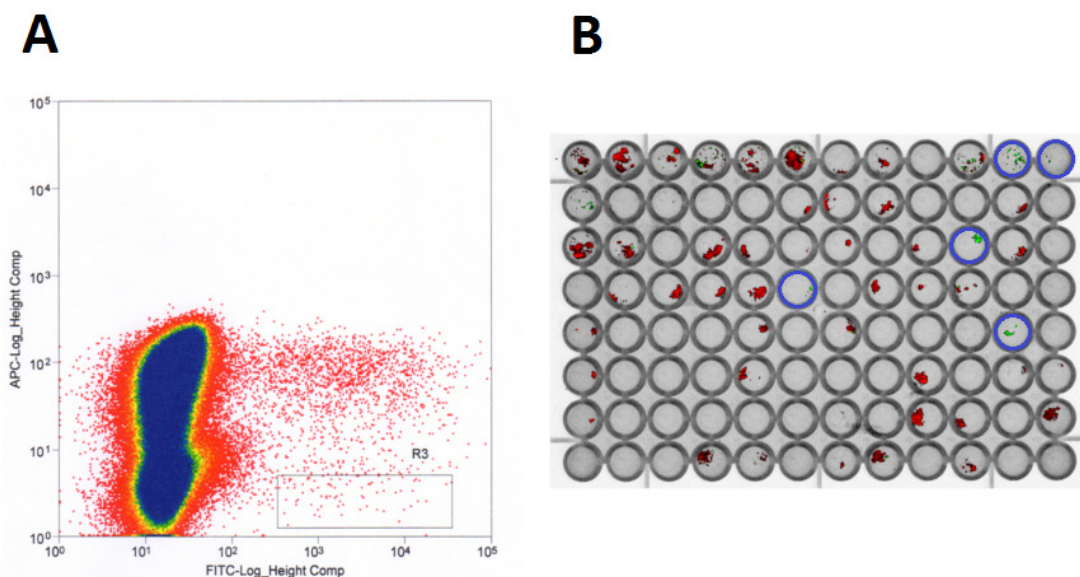


Figura 33. Scatter plot di FACS su SF-CEF infettate col lisato ottenuto da infezione/trasfezione con MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI) e p604-NP (A) e relativa piastra di *sorting* (B). **A)** Sull'ascissa è riportato il logaritmo dell'intensità della fluorescenza verde, sull'ordinata il logaritmo dell'intensità della fluorescenza rossa. La nuvola all'origine degli assi è costituita da cellule non infettate o infettate da virus privi di proteina fluorescente. La nuvola rossa (in alto a sinistra) è infettata dal virus accettore MVA HA(Δ III)HcRED(Δ VI). In seguito a infezione/trasfezione, una piccola popolazione ricombinante esprime proteina verde può essere individuata e isolata tramite FACS, il cui *gate* di acquisizione è rappresentato dal rettangolo R3 (in basso a destra). Sono anche presenti cellule sia rosse sia verdi (in alto a destra), nelle quali è avvenuto un singolo evento di ricombinazione e pertanto è avvenuta l'integrazione dell'intero plasmide p94-fCIITA. **B)** Le cellule selezionate dal *sorting* sono state raccolte in piastre da 96 pozzetti su cellule SF-CEF in adesione. Dopo qualche giorno, è possibile individuare foci di infezione esprimenti proteina verde o rossa (*carry-over* del virus accettore). I pozzetti indicati dai cerchi blu mostrano unicamente fluorescenza verde e sono raccolti tramite *scraping* per la successiva analisi di ricombinazione.

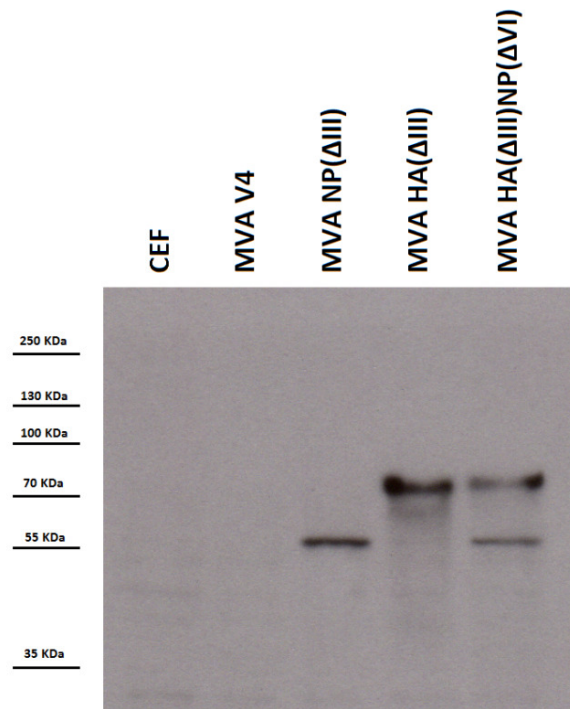


Figura 34. Western blot eseguito sullo stock del virus MVA HA(ΔIII)NP(ΔVI). MVA HA(ΔIII) e MVA NP(ΔIII), già presenti nel laboratorio, sono stati impiegati in qualità di controlli positivi per le singole proteine (rispettivamente circa 75KDa e circa 55KDa). MVA V4 è il virus vuoto. Il western blot è stato sviluppato impiegando un siero di pollo immunizzato contro H1N1 (ottenuto dalla prof.ssa Ilaria Capua, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Padova) e che riconosce, quindi, entrambe le proteine. È stato confermato che il virus MVA HA(ΔIII)NP(ΔVI) è in grado di esprimere sia HA sia NP.

In conclusione, sono stati costruiti due virus mrMVA (Figura 35) adottando due strategie speculari. Entrambi i virus prodotti sono in grado di esprimere i TG veicolati al pari dei rMVA singoli, consentendo di concludere che il metodo impiegato è adatto alla generazione di virus ricombinanti contenenti diversi TG.

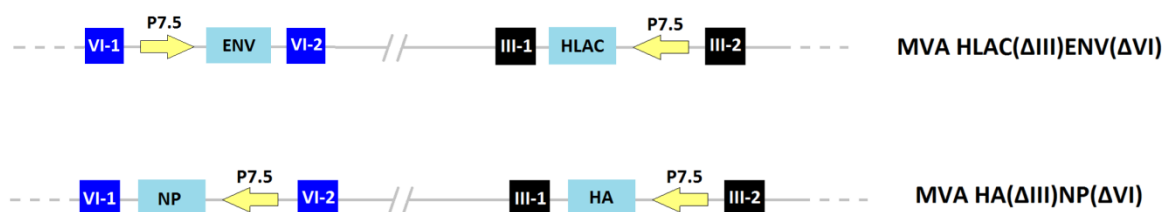


Figura 35. Riassunto e rappresentazione schematica dei virus mrMVA prodotti in questo lavoro di tesi. Sopra, MVA HLAC(ΔIII)ENV(ΔVI). Sotto, MVA HA(ΔIII)NP(ΔVI)

Risultati - Parte II

Numerosi trial clinici che coinvolgono l'uso di MVA sono stati compiuti o sono tuttora in corso e coprono una svariata gamma di patologie (<http://apps.who.int/trialsearch/Default.aspx>, <http://clinicaltrials.gov/>). Gli alti livelli di espressione dei TG veicolati e la totale sicurezza legata al suo uso nell'uomo, infatti, fanno di MVA un virus estremamente adatto in qualità di vettore vaccinale. I peptidi derivanti dai TG, in quanto citoplasmatici, possono essere direttamente presentati nel contesto di MHC Classe-I o implicati in processi quali il *cross-priming* (Albert, Sauter, e Bhardwaj 1998): la risposta immunitaria contro di essi è generalmente molto forte e comprende l'attivazione di entrambi i rami del sistema immunitario, in particolar modo quello cellulo-mediato (Krishnan et al. 2008).

Nonostante l'importanza che MVA ricopre nel panorama scientifico e medico, la piena potenzialità di questo virus è ancora ben lontana dall'essere raggiunta, poiché il suo impiego è stato finora limitato a quello di *carrier* di TG contro i quali indurre una risposta immunitaria. Esistono tuttavia altre strategie di utilizzo che non coinvolgono la diretta presentazione degli antigeni al sistema immunitario. Una di queste è la possibilità di promuovere l'espressione di geni cellulari sfruttando fattori di trascrizione, induttori o transattivatori opportunamente inseriti all'interno del vettore MVA.

Per approfondire questo campo d'indagine è stato selezionato CIITA, gene fisiologicamente espresso nelle cellule presentanti l'antigene (APC) e implicato nel *pathway* di MHC Classe-II. Tale gene svolge un ruolo critico nell'immunità adattativa poiché induce l'espressione dei geni contenuti

nei loci della Classe-II, agendo in qualità di transattivatore (Reith, LeibundGut-Landmann, e Waldburger 2005; Devaiah e Singer 2013). Dopo aver generato un virus rMVA contenente CIITA, l'efficienza di transattivazione della Classe-II è stata saggiata utilizzando diversi approcci sperimentali.

1. Produzione e caratterizzazione del virus MVA fCIITA(Δ III)

Il virus MVA fCIITA(Δ III) è stato generato sfruttando il “*Red-to-Green gene swapping*” a partire dal virus MVA HcRed(Δ III), già presente nel laboratorio, e impiegando p94-fCIITA in qualità di plasmide di trasferimento per la regione Δ III. fCIITA è un gene di fusione costituito da CIITA recante al 5' il *tag* Flag M2, utile per la sua rilevazione tramite l'anticorpo anti-Flag M2.

1.1 Costruzione di p94-fCIITA

Il plasmide di trasferimento p94-fCIITA (Figura 36C), contenente la proteina fCIITA e il *marker* EGFP tra le regioni di omologia per la regione Δ III, è stato costruito excidendo il gene fCIITA dal plasmide pcDNA3.1-fCIITA (ottenuto dal prof. Roberto Accolla, UnInsubria, Varese) con l'enzima PmeI e inserendolo nel plasmide p94 tagliato col medesimo enzima.

Dopo la successiva trasformazione in batteri competenti, le colonie ottenute sono state saggiate per restrizione enzimatica per individuare quelle contenenti l'inserito orientato nel verso corretto (Figura 36A). Due di esse sono state digerite con altri enzimi: confermata ulteriormente la struttura (Figura 36B), una di esse è stata impiegata nel protocollo di infezione/trasfezione per la generazione del virus ricombinante MVA fCIITA(Δ III).

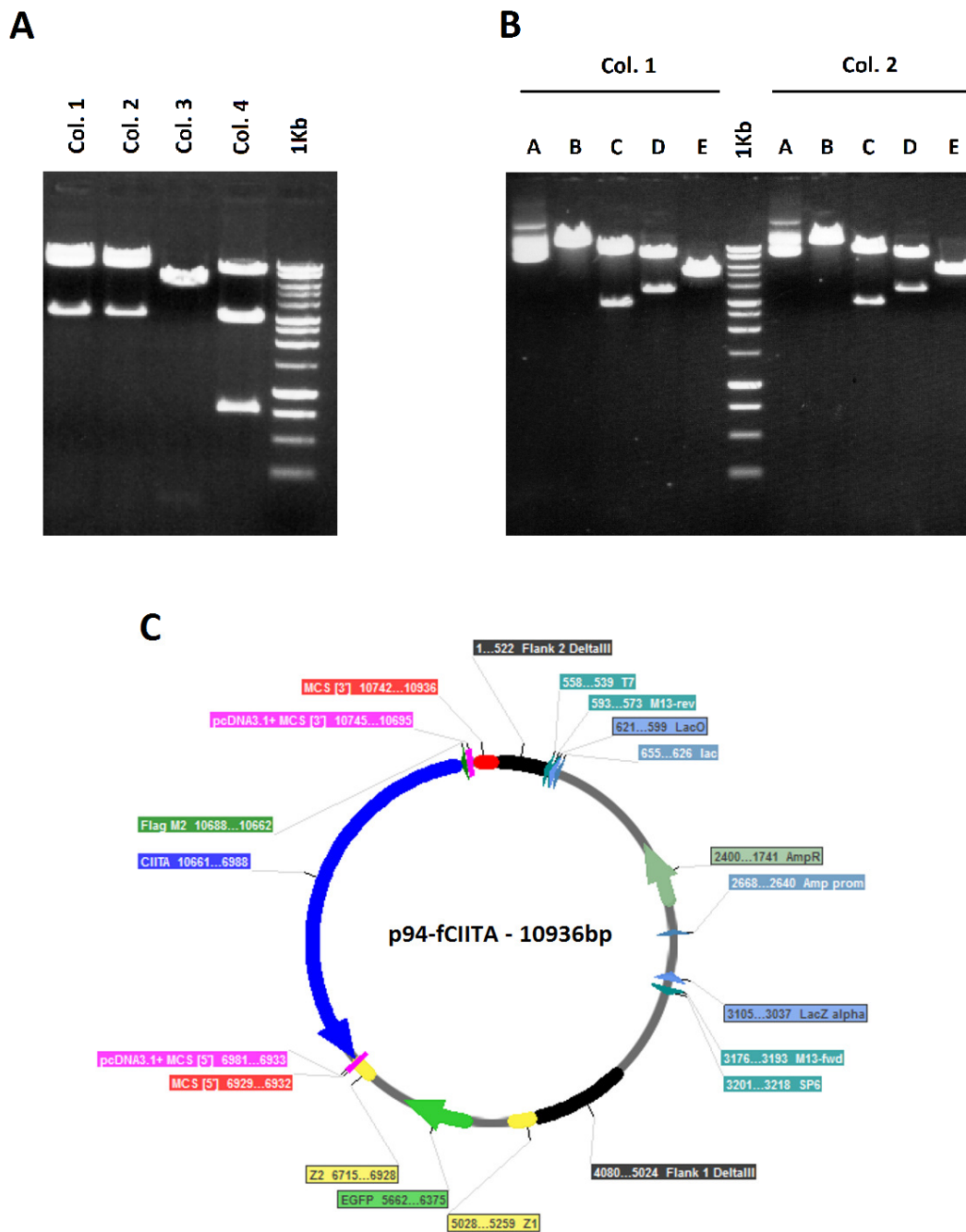


Figura 36. Digestione enzimatica di controllo (A), ulteriore conferma della mappa di restrizione (B) e rappresentazione della mappa del plasmide p94-fCIITA (C). **A)** Digestione enzimatica con BamHI di quattro colonie ottenute dall'inserimento di fCIITA in p94. Se l'inserto è stato inserito nel senso desiderato, la restrizione con tale enzima restituisce 3 bande di circa 7861bp, 3030bp, 45bp. Al contrario, nel caso di inserimento antisenso, le 3 bande di restrizione peseranno 7136bp, 3030bp e 770bp. Le colonie 1 e 2 mostrano un pattern di restrizione compatibile con l'inserimento desiderato (la banda di 45bp non risulta visibile nell'immagine), la colonia 3 non contiene l'inserto mentre la colonia 4 contiene l'inserto in orientamento opposto. **B)** Digestione delle colonie 1 e 2 con altri enzimi per confermare la mappa di restrizione. A = non digerito, B = Bsu36I (taglia nell'inserto, linearizzando p94-fCIITA), C = BamHI (vedi punto A), D = PmeI (digerisce due volte alle estremità dell'MCS, excidendo l'inserto e dando luogo a due frammenti di 7127bp e 3809bp) E = AflIII (digerisce nell'MCS e nel *backbone* del p94, generando due frammenti da 6115bp e 4821bp che in questo gel migrano sovrapposti). **C)** Mappa di p94-fCIITA. In nero, le *flanking region* per la regione Δ III, in blu il gene CIITA, contenente al 5' il piccolo *tag* Flag M2 (in verde).

1.2 Produzione del virus e purificazione dello stock

Il virus accettore MVA HcRED (Δ III) è stato impiegato nel protocollo di infezione/trasfezione su cellule SF-CEF unitamente al plasmide p94-fCIITA. I virus ricombinanti esprimenti la proteina EGFP sono stati clonati con due cicli di *sorting* in piastra da 96 pozzetti (Figura 37). Successivamente, tre cloni positivi per fCIITA in PCR e western blot (Figura 38) sono stati sottoposti ad un ulteriore *sorting* per l'isolamento di quei virus che, avendo subito il secondo evento di ricombinazione, hanno perso il *marker* EGFP (Figura 39A). L'identificazione dei pozzetti positivi, a questo punto più laboriosa data l'assenza di fluorescenza, è stata effettuata osservando la lisi al microscopio e confermando la presenza di virus ricombinanti a mezzo di PCR (Figura 39B e C). Da ultimo, dopo una diluizione terminale e il relativo *screening* (Figura 40), un clone è stato espanso su cellule SF-CEF per la produzione dello *stock*.

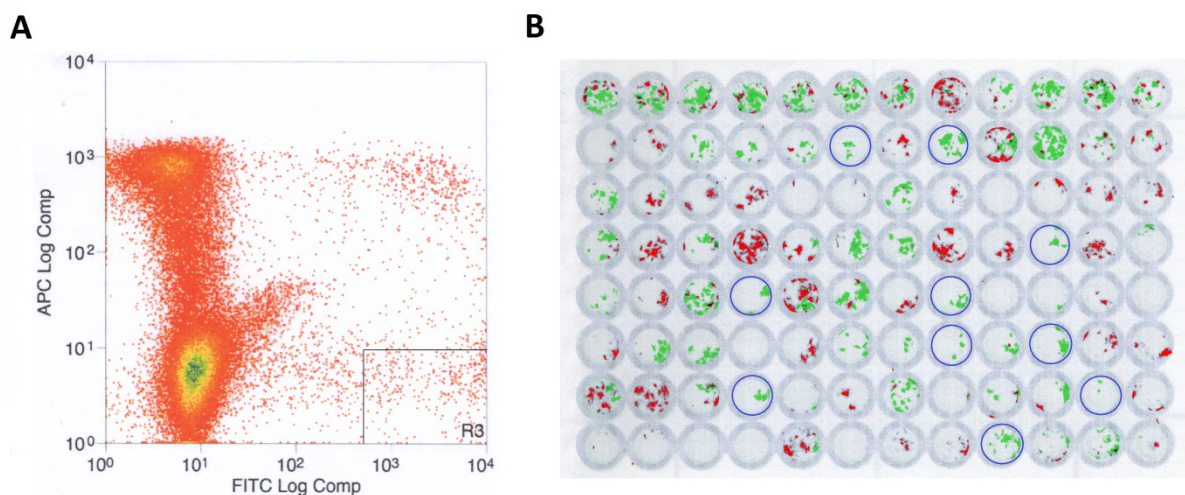


Figura 37. Scatter plot di FACS su SF-CEF infettate col lisato ottenuto da infezione/trasfezione con MVA HcRED(Δ III) e p94-fCIITA (A), raccolto a singola cellula per ogni pozzetto in piastra da 96 (acquisizione in fluorescenza, B). A) Sull'ascissa è riportato il logaritmo dell'intensità della fluorescenza verde, sull'ordinata il logaritmo dell'intensità della fluorescenza rossa. La nuvola all'origine degli assi è costituita da cellule non infettate o infettate da virus privi di proteina fluorescente. La nuvola rossa (in alto a sinistra) è infettata dal virus accettore MVA HcRED(Δ III). In seguito a infezione/trasfezione, una piccola popolazione ricombinante esprime proteina verde può essere individuata e isolata tramite FACS, il cui *gate* di acquisizione è rappresentato dal rettangolo R3 (in basso a destra). Sono anche presenti cellule sia rosse sia verdi (in alto a destra), nelle quale è avvenuto un singolo evento di ricombinazione e pertanto è avvenuta l'integrazione dell'intero plasmide p94-fCIITA. B) Le cellule selezionate dal *sorting* vengono raccolte in piastre da 96 pozzetti su cellule SF-CEF in adesione. Dopo qualche giorno, è possibile individuare foci di infezione esprimenti proteina verde o rossa (*carry-over* del virus accettore). I pozzetti indicati dai cerchi blu mostrano unicamente fluorescenza verde e sono raccolti tramite *scraping* per la successiva analisi di ricombinazione.

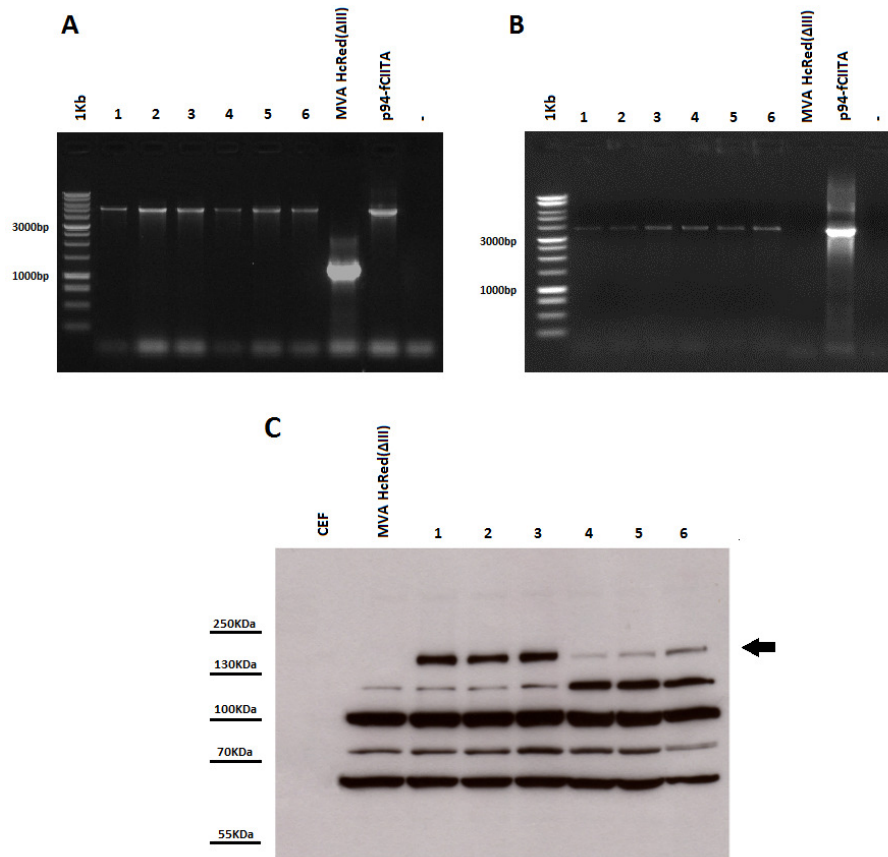


Figura 38. PCR (A e B) e western blot (C) per identificare i cloni esperimenti EGFP positivi per fCIITA. In figura A è riportata la PCR con i primer specifici per le *flanking region* della regione ΔIII (banda attesa di circa 6000bp) mentre in figura B è riportata la PCR con i primer specifici per fCIITA (banda attesa di circa 3600bp). MVA HcRED(ΔIII) è il virus accettore, impiegato come controllo negativo, mentre il plasmide donatore p94-fCIITA è stato usato come controllo positivo. Le bande dei cloni analizzati per PCR sono compatibili con quelle del controllo positivo. In figura C è mostrato il western blot eseguito su S-CEF 48h p.i. con i medesimi cloni. Ancora una volta, MVA HcRED(ΔIII) è impiegato come controllo negativo. Lo sviluppo è stato effettuato usando l'anticorpo anti-Flag M2 e la freccia indica la banda attesa. Le bande più basse, non specifiche, sono presenti in tutte le cellule infettate con MVA e assenti nelle non infettate. Tutti i cloni analizzati sono in grado di esprimere fCIITA.

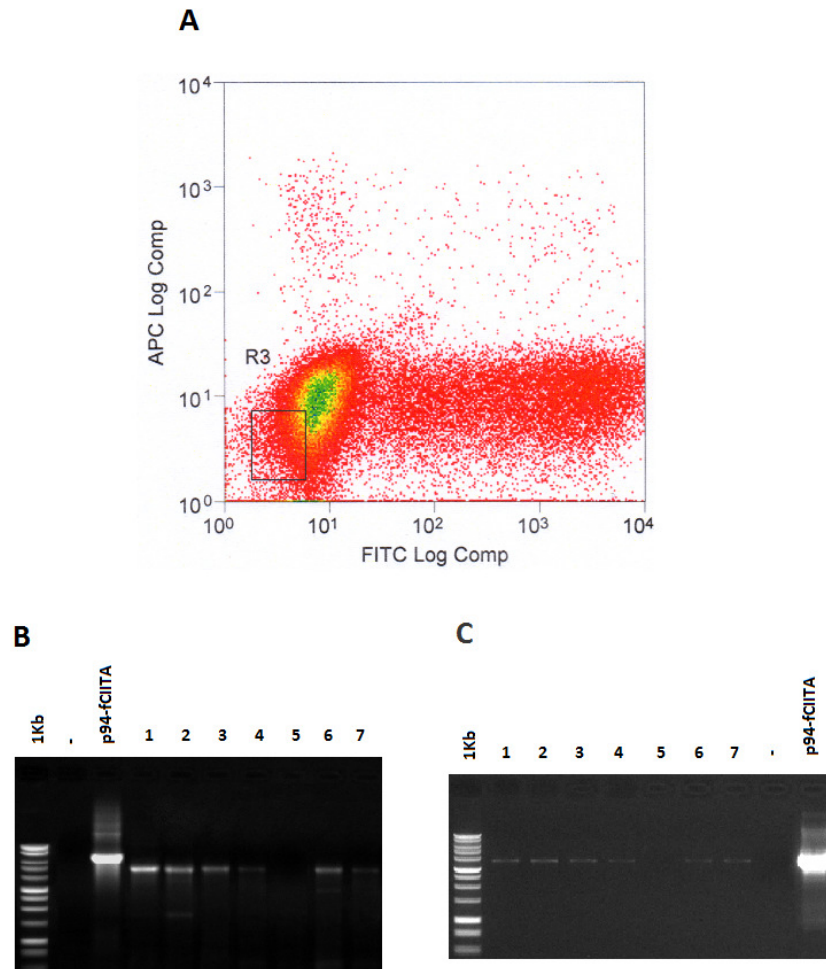


Figura 39. Scatter plot di FACS per isolare virus ricombinanti privi di EGFP (A) e PCR di controllo sui cloni ottenuti dopo semina su cellule SF-CEF in piastra da 96 pozzetti, per identificare quelli contenenti fCIITA (B e C). **A)** Sull'ascissa è riportato il logaritmo della fluorescenza verde, sull'ordinata il logaritmo della fluorescenza rossa. La nuvola all'origine degli assi è costituita da cellule non infettate o infettate da virus privi di proteina fluorescente e su di essa è stato posizionato il *gate* di *sorting* (rettangolo). Nonostante i ripetuti passaggi di *sorting* a singola cellula, è ancora presente del *carry-over* di virus accettore rosso MVA HcRED(Δ III) (nuvola in alto a sinistra). Dopo la semina su SF-CEF, i pozzetti lisati e privi di fluorescenza sono stati raccolti. Su di essi sono state eseguite PCR di controllo usando primer specifici per le *flanking region* della regione Δ III (banda attesa di circa 4400bp, Figura 4B) o per fCIITA (banda attesa di circa 3600bpm Figura 4C). Tutti i campioni tranne il 5 risultano positivi per questo *screening*. In Figura 4B, infatti, la loro banda risulta più bassa rispetto al controllo p94-fCIITA, poiché il gene EGFP è stato perso in seguito al secondo evento di ricombinazione.

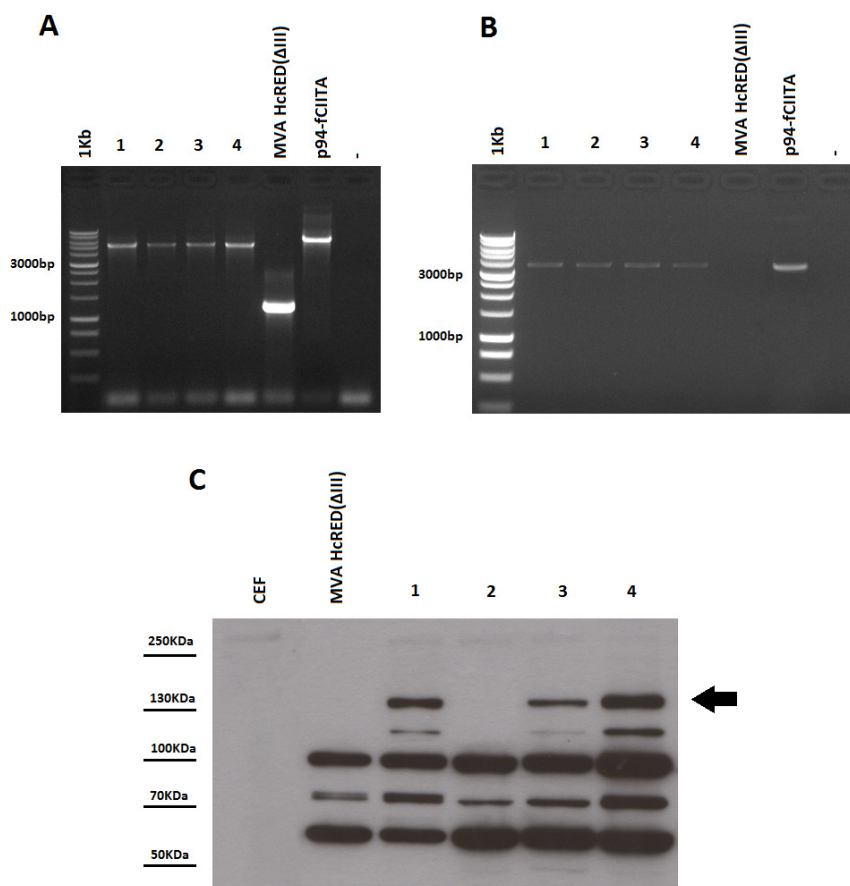


Figura 40. PCR di controllo dei cloni privi di EGFP isolati dopo diluizione terminale in SF-CEF (A e B) e western blot sui medesimi cloni per saggiare l'espressione di fCIITA in cellule S-CEF. Dopo diluizione terminale su cellule SF-CEF, i pozzetti lisati e privi di fluorescenza sono stati saggiati attraverso PCR con primer specifici per le *flanking region* della regione Δ III (banda attesa di circa 4400bp, **A**) o per fCIITA (banda attesa di circa 3600bp, **B**). In **C** è mostrato il western blot eseguito su S-CEF 48h p.i. con i medesimi cloni. Nonostante la positività in PCR di tutti e quattro, il clone 2 non è in grado di esprimere fCIITA (banda attesa indicata dalla freccia). Il clone 4 è stato ulteriormente espanso per la produzione e la purificazione dello stock virale.

1.3 Caratterizzazione di MVA fCIITA(Δ III): espressione e localizzazione di fCIITA

Dopo la produzione e la purificazione dello stock virale utilizzando il metodo indicato in precedenza, il virus MVA fCIITA(Δ III) è stato ulteriormente sottoposto a PCR al fine di escludere la presenza di contaminanti (Figura 41A). L'espressione di fCIITA è stata poi saggiata e confermata mediante western blot su lisati totali ottenuti dalle linee cellulari HEK293T (umane) e TSA (murine) infettate con MVA fCIITA(Δ III) (Figura 41B).

La corretta espressione del gene fCIITA, così come quella di ogni fattore di trascrizione o transattivazione, è un requisito necessario ma non sufficiente per la sua attività. Dopo la traduzione, infatti, fCIITA deve poter accedere al nucleo sfruttando il complesso multiproteico di *import/export* nucleare. Durante l'infezione, MVA sottrae nucleotidi e amminoacidi dal *pool* cellulare, prende il

controllo dell'apparato di traduzione e sfrutta il Golgi per la generazione dei vari *envelope* da cui è avvolto. Tutto questo sottopone la cellula ad uno stress non indifferente e causa evidenti effetti citopatici che, nel lungo termine, inducono l'apoptosi e la lisi delle cellule infettate. Poiché molti *pathway* cellulari vengono bloccati o quantomeno alterati, è ragionevole supporre altrettanto di quelli che regolano il traffico nucleo/citoplasma, ripercuotendosi in ultima analisi sulla localizzazione intracellulare di fCIITA prodotto da MVA. Dati di letteratura relativi a fenomeni di interazione, positiva o negativa, tra l'infezione di MVA e la transattivazione di geni nucleari non sono ad ora disponibili. Pertanto, per aggiungere questo tassello, sono stati effettuati saggi di immunofluorescenza per valutare la localizzazione di fCIITA espresso dal virus MVA fCIITA(Δ III), comparandola a quella di fCIITA espresso dal plasmide pcDNA3.1-fCIITA (Figura 42). Il risultato mostra chiaramente che fCIITA espresso da MVA è in grado di rilocalizzare nel nucleo delle cellule infettate, distribuendosi tra nucleo e citoplasma in maniera simile al gene di origine plasmidica.

In conclusione, i risultati del western blot e dell'immunofluorescenza dimostrano che il virus MVA fCIITA(Δ III) è in grado di indurre l'overespressione di fCIITA anche in cellule particolarmente resistenti alla trasfezione (Figura 41B) e che fCIITA può essere correttamente retrotrasportato nel nucleo delle cellule infettate.

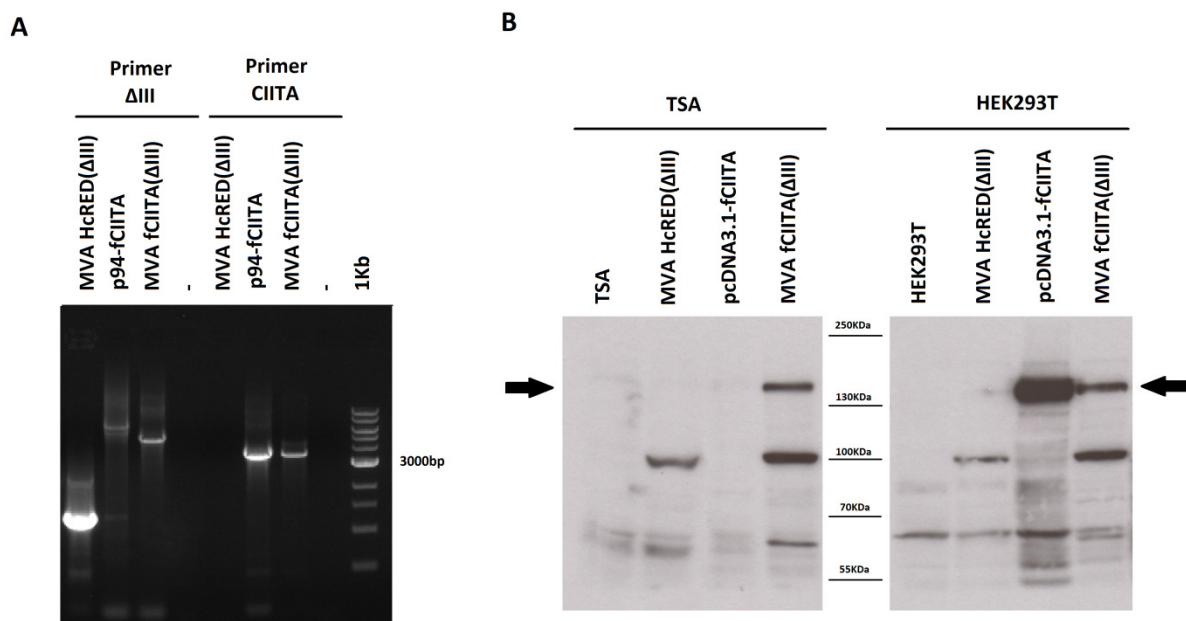


Figura 41. PCR di controllo sugli stock virale purificati (A) e western blot per individuare l'espressione di fCIITA (B). A) Le PCR sono state effettuate con i primer indicati in alto. In seguito al secondo evento di ricombinazione omologa, la regione di circa 1700bp compresa tra le regioni Z (contenente EGFP) viene excisa dal genoma virale. Per tale motivo, la PCR con i primer per le flanking region Δ III risulta più bassa nello stock virale MVA fCIITA(Δ III) rispetto al controllo positivo p94-fCIITA. B) Il western blot è stato effettuato su lisati di linee cellulari TSA o HEK293T infettate con gli stock indicati e impiegando come controllo positivo le medesime cellule trasfettate col plasmide pcDNA3.1-fCIITA. La *detection* è stata effettuata impiegando l'anticorpo monoclonale anti-Flag M2. L'efficienza di trasfezione sulle due linee è profondamente diversa (la linea cellulare TSA non risulta praticamente trasfettata), mentre l'espressione di fCIITA indotta dal virus MVA fCIITA(Δ III) è qualitativamente comparabile.

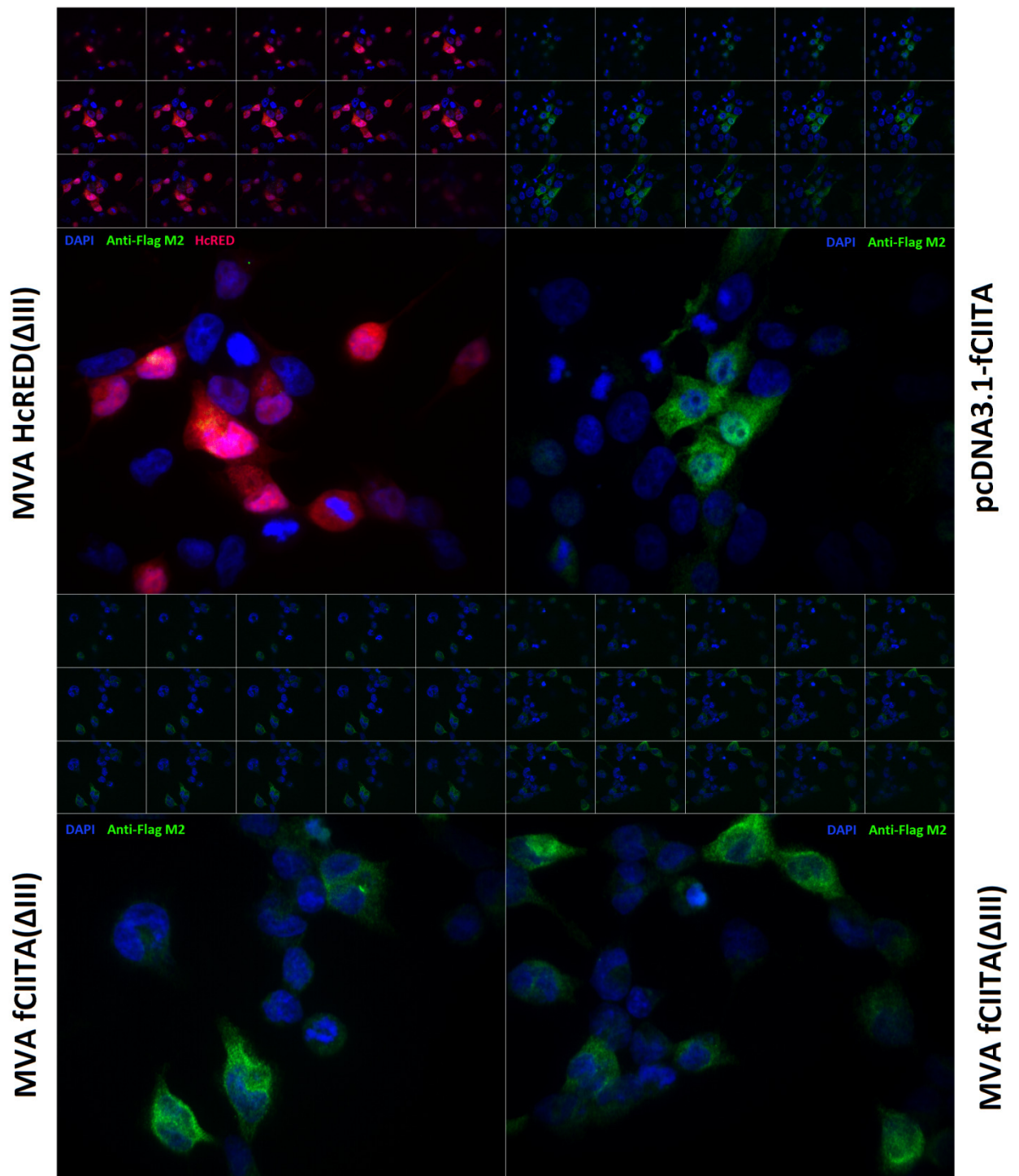


Figura 42. Immunofluorescenza su cellule HEK293T acquisita in microscopia confocale (63X) per visualizzare la distribuzione di fCIITA in cellule infettate con MVA fCIITA(Δ III) o trasfettate con pcDNA3.1-fCIITA. Le cellule sono state fissate con PFA 4% e permeabilizzate con TritonX100. L'anticorpo anti-Flag M2 è accoppiato a un anticorpo secondario Alexa 488 (verde). Per ogni campione è riportato lo Z-stack di 15 slices e il loro *merge*. Il virus MVA HcRED(Δ III) è stato impiegato come controllo negativo e genera poco aspecifico nelle HEK293T (in alto a sinistra). La localizzazione di fCIITA di origine plasmidica (pcDNA3.1-fCIITA, controllo positivo, in alto a destra) è chiaramente nucleo-citoplasmatica, benché vi sia grande variabilità tra le cellule. Nel caso di MVA fCIITA(Δ III) (in basso), fCIITA mostra una localizzazione simile al controllo positivo pcDNA3.1-fCIITA, sebbene la fluorescenza nucleare risulti lievemente più debole.

2. Analisi della transattivazione di Classe-II

È risaputo (Boshkov, Macen, e McFadden 1992; Guerin et al. 2002; Früh et al. 2002) che i *Poxvirus* sono in grado di downregolare la Classe-I presente sulla superficie delle cellule infettate: ciò correla con una minore efficacia della risposta immunitaria, poiché la presentazione di peptidi potenzialmente immunogenici ai linfociti CD8⁺ viene ridotta. Gli *Orthopoxvirus* come MVA non sono tuttavia in grado di indurre una forte downregolazione della Classe I, a differenza di altri *Poxvirus* come il Myxoma Virus o *Rabbit fibroma virus* (Boshkov, Macen, e McFadden 1992). Pochi dati sono invece presenti sul rapporto tra MVA e la Classe-II. In particolare, è stato recentemente pubblicato uno studio *in vitro* su cellule dendritiche (DC) bovine (Guzman et al. 2012) nel quale si dimostra che un rMVA è in grado di indurre rapidamente l'apoptosi delle DC infettate, riducendone la presentazione dell'antigene derivato dal TG. Inoltre, aggiungendo DC fresche, è stato osservato che queste sono in grado di fagocitare i corpi apoptotici derivanti dalle DC infettate e presentare a loro volta l'antigene derivante dal TG di rMVA, subendo però una forte downregolazione di CD40, CD80, CD86, and MHC-II. Ampliando la ricerca bibliografica ai parenti prossimi di MVA, è risultato che VACV, progenitore di MVA, è in grado di inibire l'espressione *in vitro* e *in vivo* della Classe-II e di CD86, come dimostrato da un buon numero di lavori (Engelmayer et al. 1999; Jenne et al. 2000; P. Li et al. 2005; Kastenmuller et al. 2006; Yao et al. 2007; Rehm et al. 2010). Si deduce che MVA potrebbe interferire con l'espressione dei geni contenuti nel locus della Classe-II (ad esempio bloccando la transattivazione mediata da fCIITA) o con la loro localizzazione a livello citoplasmatico e di membrana (ad esempio, sequestrando i complessi MHC nel citoplasma).

La mancanza di ulteriori informazioni su MVA e l'indicazione tratta da VACV hanno guidato i successivi saggi. Dimostrata la capacità di espressione a livello citoplasmatico e il retrotrasporto all'interno del nucleo della proteina fCIITA prodotta dal virus MVA fCIITA(Δ III), quindi, l'attenzione è stata rivolta sul suo corretto funzionamento in qualità di transattivatore. La funzionalità di fCIITA è stata valutata utilizzando tre diversi metodi. Dapprima è stata saggiata la transattivazione dei geni HLA-DR α / β individuandone l'espressione e la dimerizzazione attraverso western blot in ambiente non riducente. Secondariamente, sono stati allestiti saggi citofluorimetrici per verificare la presenza del dimero HLA-DR α / β sulla superficie delle cellule infettate. Da ultimo, sono state confrontate le localizzazioni subcellulari di HLA-DR α / β in cellule infettate con MVA fCIITA(Δ III) o trasfettate con pcDNA3.1-fCIITA attraverso immunofluorescenza.

2.1 Western Blot non riducente

La transattivazione del locus della Classe-II ad opera di fCIITA è stata saggiata attraverso western blot su cellule HEK293T, scegliendo HLA-DR come proteina target dell'analisi. L'anticorpo impiegato in tale saggio, L243, riconosce un epitopo conformazionale a cavallo del dimero HLA-DR α / β , legandosi ad esso unicamente in caso di corretta struttura quaternaria. Per tale motivo, sono state preventivamente testate diverse strategie di lisi con buffer Laemmli su una linea cellulare umana fortemente positiva per Classe-II (RAJI). Come atteso, l'unica condizione che restituisce la banda attesa di circa 50-55KDa (corrispondente al dimero HLA-DR α / β) è quella corrispondente ad un buffer non riducente (-DTT) e senza la successiva denaturazione al calore del lisato (Figura 43A).

La condizione individuata nell'esperimento precedente è stata poi impiegata per allestire il saggio sulla linea HEK293T, normalmente Classe-II⁻. Lisati non ridotti e non bolliti ottenuti da cellule infettate con diversi virus MVA sono stati separati in SDS-PAGE e, dopo blotting, la presenza del dimero proteico HLA-DR α / β è stata saggiata con l'anticorpo L243. Come si può vedere in Figura 43B, l'espressione di HLA-DR α / β è apprezzabile unicamente nelle cellule infettate col virus MVA fCIITA(Δ III), ad indicare che il TG fCIITA espresso da tale virus è in grado di indurre la transattivazione dei geni nucleari contenuti nel locus della Classe-II.

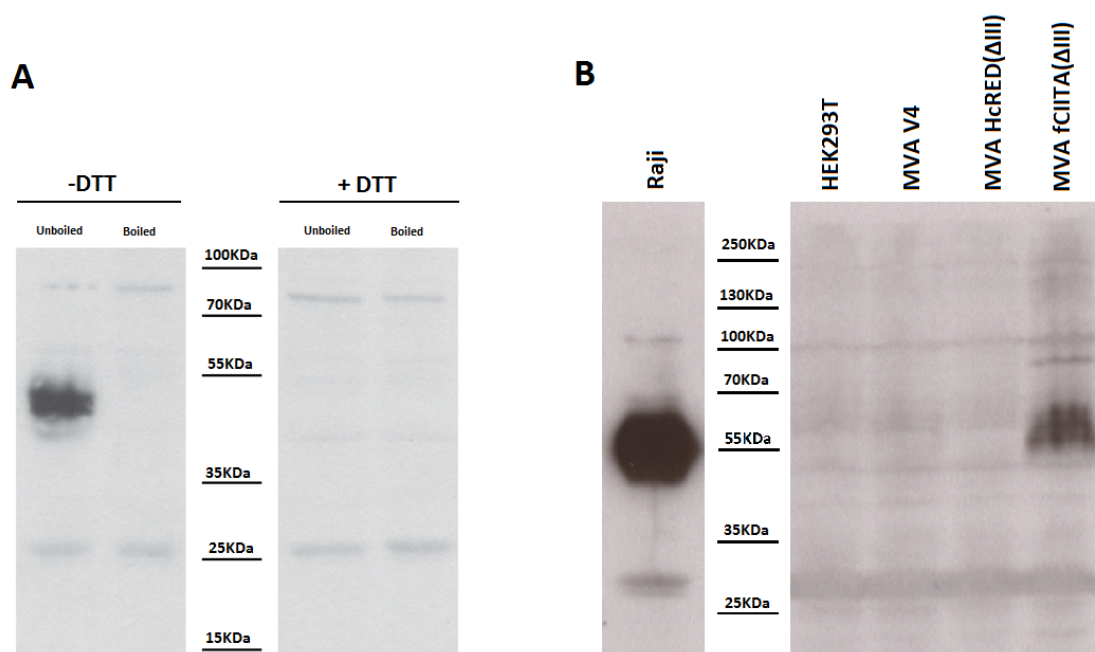


Figura 43. Western blot con anticorpo L243 (anti-dimero HLA-DR α / β): messa a punto dei parametri sperimentali sulla linea RAJI (A) e saggio sulla linea HEK293T (B). A) Le condizioni sperimentali sono state messe a punto su lisati totali di linea linfocitaria RAJI con buffer Laemmli, testando 4 diverse condizioni di estrazione (riducente o non riducente, denaturato per bollitura a 95°C o non denaturato). La condizione sperimentale individuata, con la quale è visualizzabile la banda del dimero HLA-DR α / β di circa 50-55KDa, è quella di lisi in ambiente non riducente (-DTT) senza bollitura del campione. B) La condizione individuata nel punto A è stata impiegata per allestire un western blot su HEK293T infettate come riportato (il virus MVA V4 è vuoto), utilizzando la linea Raji come controllo positivo. La banda specifica per HLA-DR α / β è presente unicamente nel campione infettato con MVA fCIITA(Δ III).

2.2 Citometria

Dimostrata la transattivazione dei geni codificanti per HLA-DR α/β tramite western blot, l'espressione in membrana di tale dimero è stata saggiata attraverso citometria su cellule HEK293T (umane, Figura 44A) e TSA (murine, Figura 44B), impiegando rispettivamente gli anticorpi derivati dagli ibridomi D1.12 e MKD6 (ottenuti dal prof. Roberto Accolla, UnInsubria, Varese). In seguito ad infezione col virus MVA fCIITA(Δ III), entrambe le linee mostrano un incremento della fluorescenza, ad indicare la presenza delle rispettive Classi-II sulla versante esterno della membrana cellulare, mentre questo non accade col virus *mock* impiegato. Per quanto riguarda la linea TSA, inoltre, è stato eseguito un *time-course* di infezione, nel quale è emerso che il plateau di fluorescenza è raggiunto 48h p.i..

È stato in questo modo dimostrato che l'infezione col virus MVA fCIITA(Δ III) è sufficiente per convertire al fenotipo Classe-II⁺ cellule umane e murine normalmente negative per tale antigene.

2.3 Immunofluorescenza

Per confermare il dato emerso nei saggi citometrici, la localizzazione cellulare della Classe-II è stata ulteriormente indagata a mezzo di immunofluorescenza sulle cellule HEK293T infettate col virus MVA fCIITA(Δ III) o trasfettate col plasmide pcDNA3.1-fCIITA e marcando la Classe-II con l'anticorpo L243 (Figura 45). Il segnale presente nel controllo positivo (pcDNA3.1-fCIITA) risulta localizzato principalmente sulla membrana cellulare, a conferma del dato emerso nei saggi citometrici (Figura 44A). Sono inoltre presenti, come atteso, granuli citoplasmatici fortemente positivi che costituiscono il *pool* intracellulare della Classe-II. Confrontando i dati relativi al plasmide pcDNA3.1-fCIITA con quelli relativi all'infezione col virus MVA fCIITA(Δ III), non sono emerse differenze né di localizzazione né di fluorescenza. Il segnale è ancora una volta localizzato sulla membrana delle cellule infettate con la presenza di granuli citoplasmatici fortemente positivi.

In definitiva, questi dati portano a concludere che il virus MVA fCIITA(Δ III) è in grado di indurre la transattivazione della Classe-II, le cui molecole si localizzano correttamente dopo l'espressione, confermando quanto emerso dai saggi citometrici. Non sono inoltre emerse evidenze sperimentali di interferenza tra l'infezione con MVA e la localizzazione cellulare della Classe-II nelle cellule HEK293T.

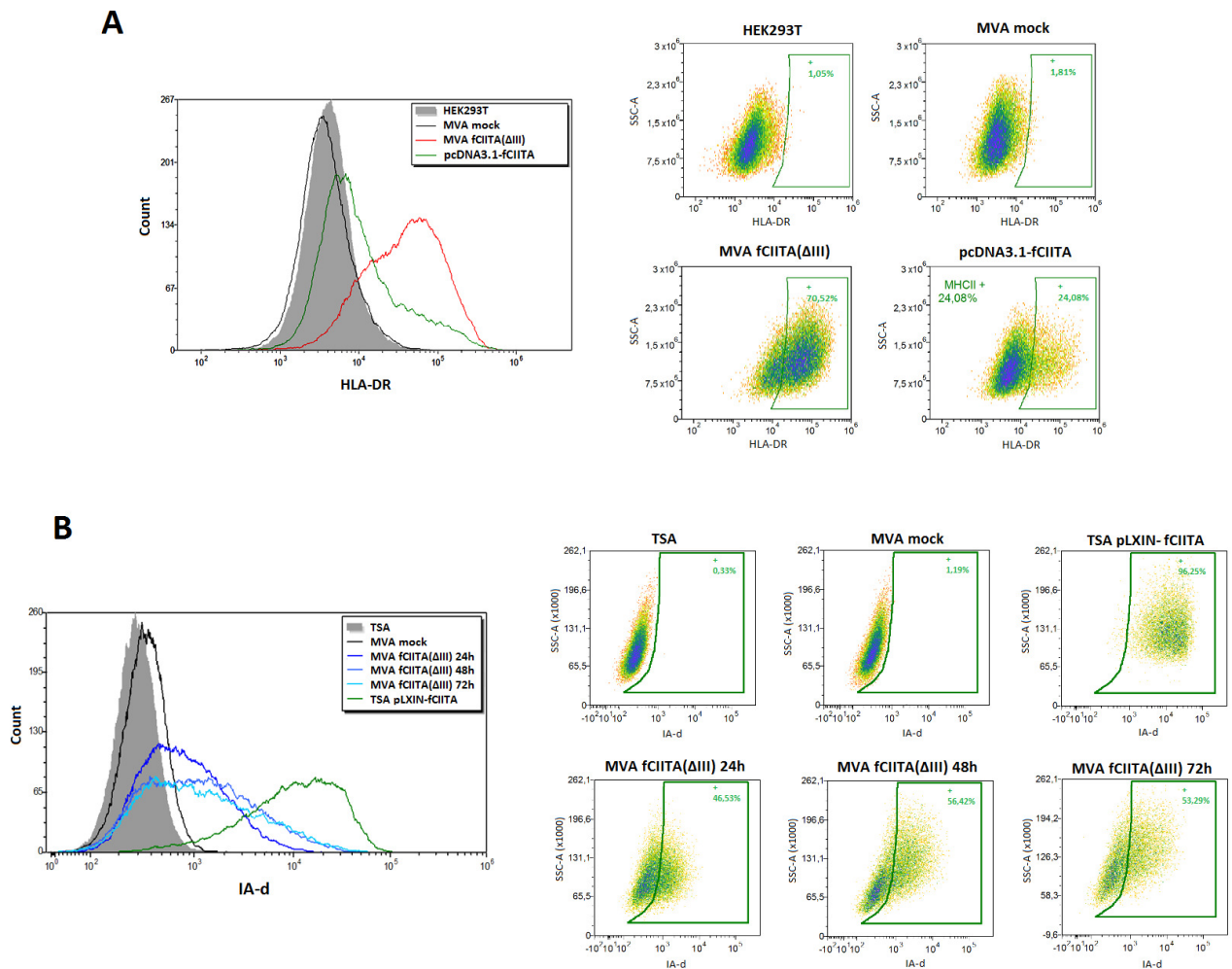


Figura 44. Analisi citometrica per la Classe-II sulle linee HEK293T (umana, A) e TSA (murina, B). **A)** Le cellule HEK293T sono state infettate alla moi 1 con virus MVA fCIITA(Δ III), MVA HA(Δ III) (mock) o trasfettate con 2 μ g del plasmide pcDNA3.1-fCIITA usando il PEI come agente trasfettante. Dal momento che le cellule HEK293T si sono mostrate particolarmente sensibili all'infezione con MVA, l'analisi è stata condotta unicamente 24h p.i.. L'anticorpo anti HLA-DR D1.12 è stato rilevato con un secondario PE-coniugato utilizzando lo strumento Accuri C6 (BD). L'aumento di fluorescenza è visibile unicamente nei campioni MVA fCIITA(Δ III) e pcDNA3.1-fCIITA, indicando che le molecole di HLA-DR sono presenti sulla superficie delle cellule. L'aumento medio della MFI indotta dal virus MVA fCIITA(Δ III) rispetto al virus mock è di circa 10 volte (rispettivamente 37.842 e 3.744). **B)** Le cellule TSA, più resistenti all'infezione con MVA, sono state saggiate a 24h, 48h e 72h p.i. con moi 1. Il controllo positivo impiegato è la linea cellulare TSA pLXIN-fCIITA (ottenuta dal prof. Roberto Accolla, UnInsubria, Varese), che esprime stabilmente CIITA. L'anticorpo MKD6 è stato rilevato con un secondario FITC-coniugato, utilizzando lo strumento FacsCantoII (BD). Nelle TSA infettate col virus MVA fCIITA(Δ III) vi è un aumento di fluorescenza che raggiunge il plateau a 48h p.i.. La media delle MFI è di 345 (mock), 794 (24h), 1131 (48h) e 1170 (72h).

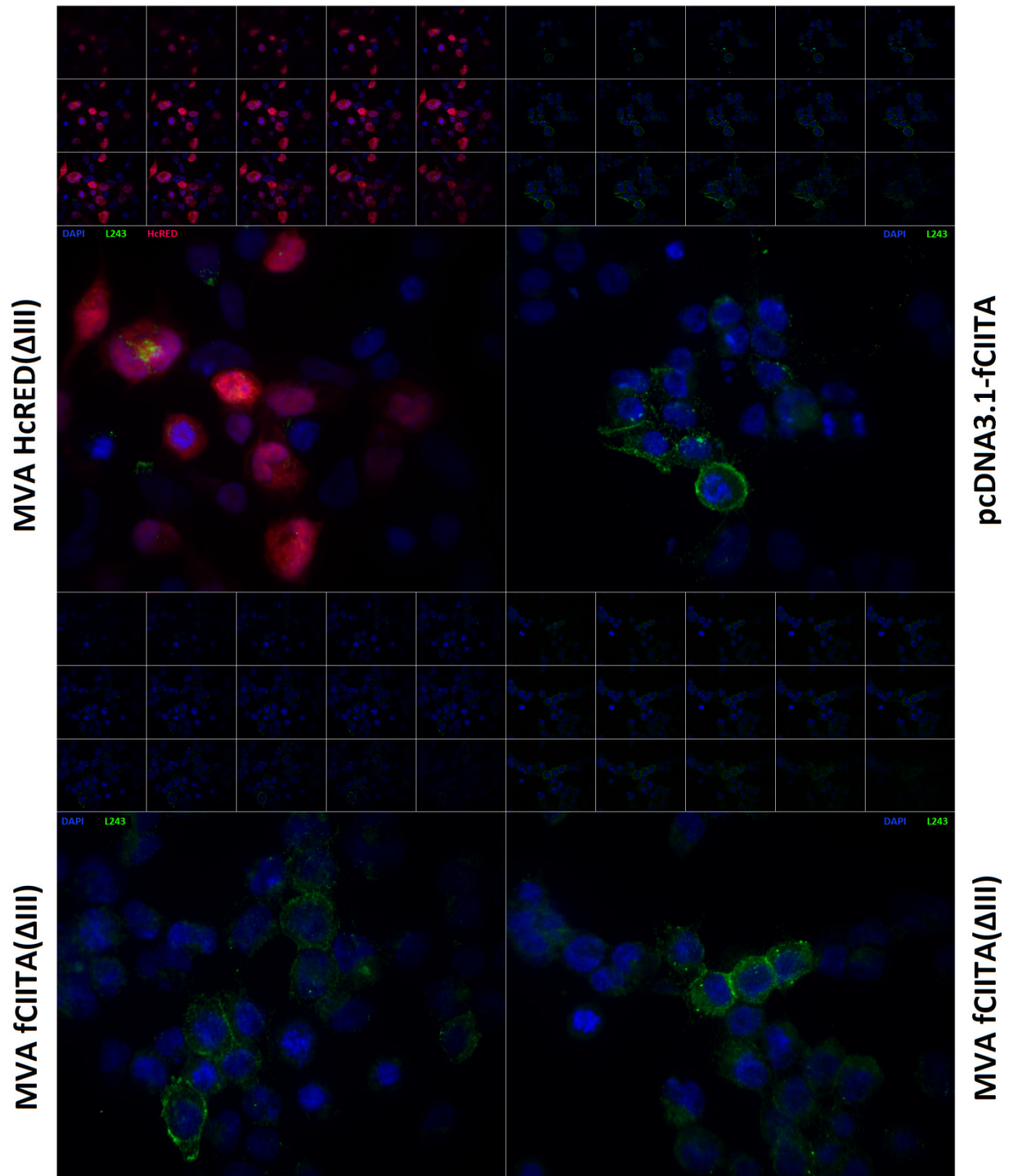


Figura 45. Immunofluorescenza su cellule HEK293T acquisita in microscopia confocale (63X) per visualizzare la distribuzione del dimero HLA- DR α / β in cellule infettate con MVA fCIITA(Δ III) o trasfettate con pcDNA3.1-fCIITA. Le cellule sono state fissate con PFA 4% e permeabilizzate con TritonX100. L'anticorpo L243 è accoppiato a un anticorpo secondario Alexa 488 (verde) e riconosce un epitopo conformazionale a cavallo del dimero HLA-DR α / β . Per ogni campione è riportato lo Z-stack di 15 *slices* e il loro *merge*. Il virus MVA HcRED(Δ III) è stato nuovamente impiegato come controllo negativo e genera poco aspecifico nelle HEK293T (in alto a sinistra). Il plasmide pcDNA3.1-fCIITA (controllo positivo, in alto a destra) transattiva HLA-DR α / β il quale è chiaramente localizzato sulla membrana cellulare e genera granuli fortemente positivi anche nel citoplasma. Tale distribuzione è comparabile con quella presente nei campioni infettati col virus MVA fCIITA(Δ III) (in basso).

3. Test in vivo

I risultati fin qui ottenuti dimostrano che il virus ricombinante MVA fCIITA(Δ III) induce l'overespressione del TG fCIITA nelle cellule infettate, come evidenziato dai western blot (Figura 38C, Figura 40C Figura 41B) e dall'immunofluorescenza (Figura 42). fCIITA, a sua volta, in seguito a retrotraslocazione all'interno del nucleo, transattiva i geni presenti nel locus della Classe-II, promuovendone l'espressione (Figura 43) e convertendo le cellule ad un fenotipo Classe-II⁺ (Figura 44 e Figura 45).

In condizioni fisiologiche, la Classe-II è espressa unicamente sulle APC ed è coinvolta nella presentazione di peptidi di origine extracellulare ai linfociti T CD4⁺, inducendo in ultima analisi l'attivazione del ramo umorale del sistema immunitario. Al contrario, la Classe-I, espressa su (quasi) tutte le cellule, ha il compito di presentare peptidi intracellulari ai linfociti T CD8⁺, segnalando la presenza di proteine *non-self* e inducendo una risposta citotossica cellulo-mediata (ad esempio nel caso di infezione da parte di agenti virali). Svariate evidenze sperimentali hanno tuttavia dimostrato che questi due *pathway* non sono totalmente distinti: in particolare, è stato osservato che antigeni citoplasmatici e nucleari possono essere caricati sulla Classe-II sfruttando sistemi sia analoghi a quelli della Classe-I (TAP- o Sec61-dipendente), sia totalmente differenti (ad esempio, autofagia-mediati) (Malnati et al. 1992; Aichinger et al. 1997; Dongre et al. 2001; Dengjel et al. 2005; Paludan et al. 2005; D Schmid e Münz 2005; Dorothee Schmid, Pypaert, e Münz 2007; Christian Münz 2012). In entrambi i casi, i peptidi intracellulari vengono inviati sulla superficie cellulare nel contesto della Classe-II, stimolando una risposta anticorpale facilmente misurabile attraverso saggi ELISA.

Alla luce di questo e considerata la capacità di MVA fCIITA(Δ III) di transattivare il locus della Classe-II anche in topo, è stato messo a punto un ulteriore metodo di indagine volto a verificare la funzionalità del vettore MVA fCIITA(Δ III): topi C57BL/6 sono stati immunizzati coi virus MVA fCIITA(Δ III) o MVA HcRED(Δ III) e le rispettive risposte anticorpali indotte contro il vettore sono state comparate. Il protocollo di vaccinazione seguito, come descritto in precedenza, ha previsto due inoculi di virus a distanza di 21 giorni. Il sangue è stato prelevato dalla coda a -2 giorni e +42 giorni dal primo inoculo e gli anticorpi anti-vettore sono stati titolati dai sieri attraverso ELISA. Al 42° giorno, inoltre, i linfonodi inguinali, poplitei e ascellari sono stati prelevati e, dopo purificazione dei linfociti, è stata eseguita una citometria per analizzarne il fenotipo, concentrando l'attenzione sui linfociti T CD4⁺ (esperimento compiuto in collaborazione col laboratorio del prof. Fabio Grassi, IRB - Bellinzona). Per quanto riguarda la titolazione degli anticorpi anti-MVA, il saggio ELISA (Figura 46) non ha mostrato differenze statisticamente significative tra il gruppo vaccinato con MVA fCIITA(Δ III) e quello vaccinato con MVA HcRED(Δ III) ($p < 0.001$ $n=3$). In accordo con tale dato, anche il saggio citometrico (Figura 47) non ha messo in evidenza particolari differenze tra i due gruppi, se non una

modesta riduzione dei linfociti T-regolatori (19.56% contro 25.59%) e un leggero aumento dei linfociti T CD8⁺ (31.81 contro 25.63%) nel gruppo immunizzato con MVA fCIITA(Δ III) rispetto al controllo MVA HcRED(Δ III).

In conclusione, nonostante i test *in vitro* mostrino chiaramente la capacità del virus MVA fCIITA(Δ III) di indurre transattivazione di Classe-II nelle cellule infettate, questo non ha generato *in vivo* un miglioramento della risposta anti-vettore, né ha stimolato in maniera evidente il ramo T-*helper* del sistema immunitario murino.

Titolazione Ab anti-MVA

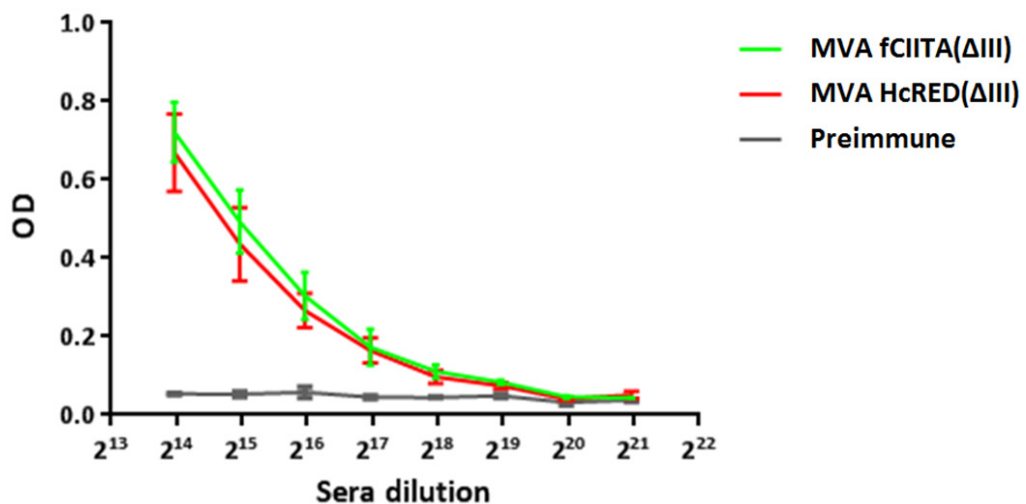
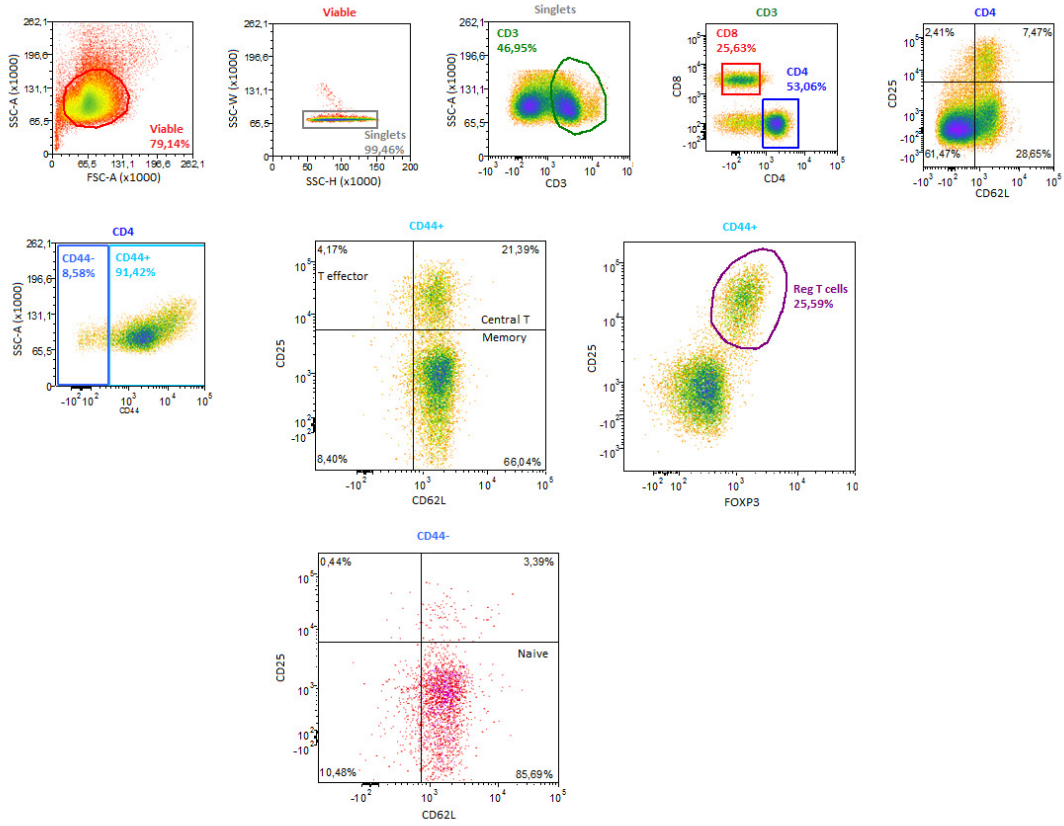


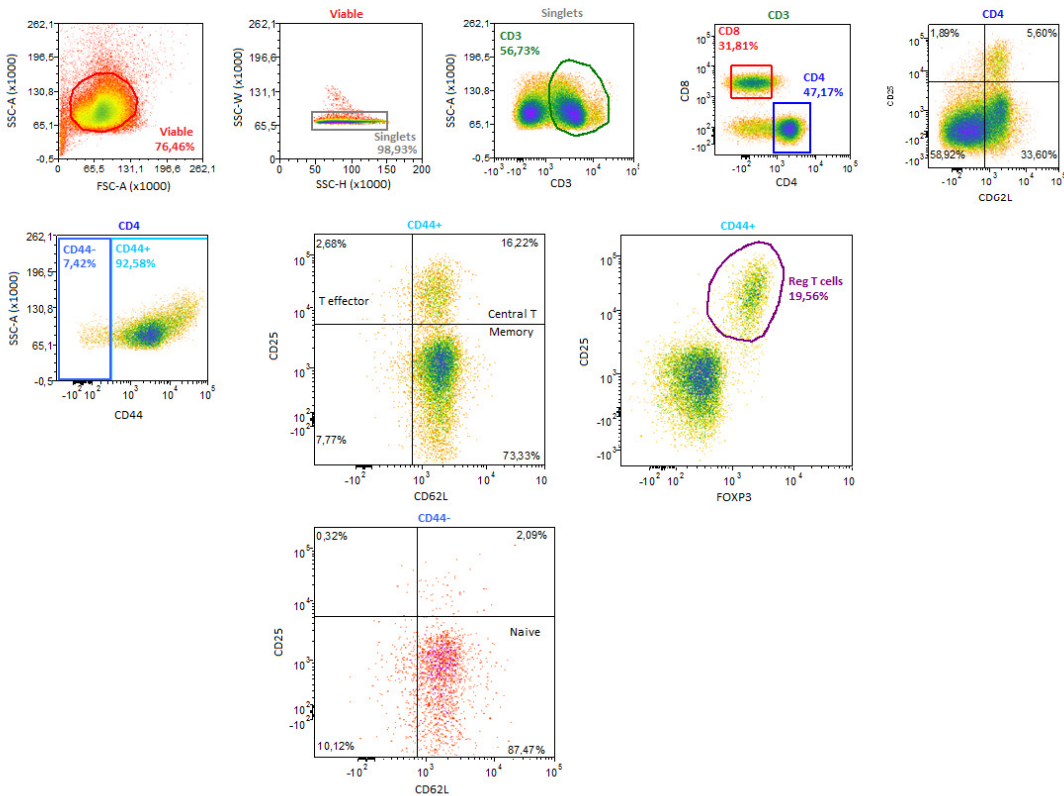
Figura 46. Titolazione degli anticorpi anti-MVA presenti nei sieri dei topi immunizzati con MVA HcRED(Δ III) (rosso) e MVA fCIITA(Δ III) (verde) confrontati con il siero preimmune (grigio). I sieri in figura sono stati purificati dal sangue al giorno -2 (preimmune) e al giorno 42, al termine del protocollo di vaccinazione. La risposta contro il vettore è sostenuta, la diluizione limite è 1.024.000 (2²⁰). Non si evidenziano differenze statisticamente significative tra i due gruppi sperimentali ($p < 0.001$, $n=3$).

Figura 47 (pagina successiva). Citometria sui linfociti derivati da linfonodi di topi immunizzati con il virus MVA HcRED(Δ III) (sopra) e MVA fCIITA(Δ III) (sotto). I linfonodi prelevati dai 3 topi appartenenti allo stesso gruppo sperimentale sono stati riuniti prima della marcatura. Sopra ogni *scatter plot* è indicato il *gate* sul quale è eseguita l'analisi. I due gruppi sperimentali non mostrano particolari differenze nella distribuzione dei *subset* linfocitari principali.

MVA HcRED(Δ III)



MVA fCIITA(Δ III)



Discussione

L'importanza che MVA ricopre a livello vaccinale è stata ampiamente illustrata e discussa nell'introduzione. I progressi derivanti dagli sforzi profusi nell'ingegnerizzazione di vettori ricombinanti basati su questo *Poxvirus* rappresentano certamente un'ulteriore conferma del suo ruolo centrale. Come detto in precedenza, MVA possiede uno spettro d'ospite estremamente ridotto: l'acquisizione di questo fenotipo fortemente attenuato è il risultato della delezione combinata e sequenziale di diverse regioni genomiche che, in ultima analisi, ha causato una riduzione di oltre 20kb. Grazie a tale contrazione, inoltre, MVA ha la capacità di allocare ed esprimere un numero maggiore di TG rispetto ad altri vettori, senza tuttavia subire alterazione nella stabilità genomica. Quest'ultimo è un valore aggiunto non indifferente, poiché permetterebbe sia di semplificare il *gene delivery* sia di ridurre la dose totale di virus impiegata.

I vantaggi derivanti dalla produzione di vettori MVA contenenti due o più TG (mrMVA) non sono passati inosservati. Nella letteratura recente sono infatti presenti un buon numero di lavori che, sfruttando l'uso di geni di fusione o di promotori multipli inseriti all'interno dello stesso sito di ricombinazione, hanno portato alla costruzione di MVA esprimenti TG multipli. Nel complesso, questi metodi si sono rivelati non totalmente soddisfacenti nell'indurre una risposta immunitaria all'interno dell'ospite, come confermato dai dati sperimentali (ad esempio (Hodge et al. 2003; Poon et al. 2009; Kolibab et al. 2010; Berthoud et al. 2011; Lillie et al. 2012; Powell et al. 2013; Mullarkey et al. 2013; Antrobus et al. 2013; Altenburg et al. 2014)). Uno dei maggiori limiti legati all'espressione di proteine di fusione è tuttavia rappresentato dalla possibilità che le diverse subunità interferiscano l'una con l'altra sia durante il *fold*ing a livello citoplasmatico o reticolare sia nella successiva localizzazione.

Inoltre, è bene puntualizzare che la manipolazione di lunghe sequenze nucleotidiche risulta più laboriosa e che, da evidenze di laboratorio, la generazione di virus contenenti TG di dimensioni piuttosto consistenti ha un'efficienza limitata o comunque inferiore rispetto a quelli contenenti TG più corti. Anche l'uso di promotori multipli, *in tandem* o in direzioni opposte, non è scevro da rischi: tra i due promotori potrebbero infatti instaurarsi fenomeni di competizione legati, ad esempio, all'ingombro sterico, che si ripercuotono in definitiva sul rapporto finale dei trascritti. Dal momento che i TG inseriti in MVA non rivestono un ruolo nell'omeostasi cellulare e non interagiscono a livello molecolare, questo normalmente non influisce sulla buona riuscita della vaccinazione. Tuttavia, l'introduzione di strategie alternative che assicurino la totale indipendenza trascrizionale consentirebbe ad esempio l'espressione di proteine più complesse, dimeriche o multimeriche, la cui maturazione deve sottostare a precisi rapporti stechiometrici. L'eccesso di una delle subunità, infatti, potrebbe causare gravi danni all'efficienza dell'intero sistema di espressione, mettendo a repentaglio la funzionalità del vaccino stesso.

Il lavoro svolto nella prima parte di questa tesi descrive un metodo alternativo, semplice ed efficace per la costruzione di mrMVA: i TG sono infatti stati inseriti in punti diversi del genoma virale, risultando di fatto indipendenti dal punto di vista sia trascrizionale sia traduzionale. La strategia proposta si basa sulla ricombinazione omologa tra un virus accettore e un plasmide donatore e sfrutta, in fase di selezione dei ricombinanti, lo scambio di due *marker* fluorescenti ("*Red-to-Green gene swapping*" (Di Lullo et al. 2010)). Tale tecnologia, messa a punto nel laboratorio del prof. Siccardi, si è dimostrata solida ed accessibile e ha permesso la generazione di decine di virus rMVA introducendo i TG all'interno della regione Δ III.

L'applicazione diretta di questa tecnologia ad un virus già contenente il TG ENV nella regione Δ VI ha portato alla costruzione del primo virus presentato in questo lavoro di tesi, MVA HLAC(Δ III)ENV(Δ VI). Attraverso western blot e saggi citometrici, è stata osservata l'espressione di entrambe le proteine sulla superficie delle cellule infettate, confermando la funzionalità del virus costruito. L'utilizzo di questo virus consentirà di approfondire gli studi sul ruolo dell'espressione di HLAC in qualità di modulatore dell'infettività di HIV-1. Da alcuni studi è infatti emerso che ENV è molto probabilmente in grado di associarsi all'HLAC presente sulla superficie dei virioni di HIV-1, aumentando l'infettività sia del ceppo X4 (tropismo linfocitario) sia del ceppo R5 (tropismo macrofagico) (Matucci et al. 2008; Baroni et al. 2009). La comprensione dei meccanismi molecolari che sottostanno al legame tra HLAC e ENV potrebbe pertanto rivelarsi di estremo interesse per lo sviluppo strategie volte alla riduzione dell'infettività virale di HIV-1.

Successivamente, il *Red-to-Green gene swapping* è stato utilizzato unitamente ai plasmidi p675 e p604 per indurre la ricombinazione omologa all'interno della regione Δ VI di un virus già contenente

HA nella regione ΔIII . Questo ha permesso di costruire il secondo virus presentato in questo lavoro di tesi, MVA HA(ΔIII)NP(ΔVI). Tale virus si inserisce all'interno del panorama dei vaccini influenzali alternativi, un campo estremamente vivace che negli ultimi anni ha assistito a notevoli progressi per quanto riguarda sia l'incremento dell'efficacia vaccinale sia la potenziale identificazione di un cosiddetto "vaccino universale", ossia in grado di indurre una risposta cross-protettiva nei confronti di virus influenzali appartenenti a diversi gruppi sierologici. A tal proposito, è stato recentemente pubblicato un lavoro (Hessel et al. 2014) nel quale varianti ingegnerizzate di HA e NP sono state introdotte nelle regioni ΔIII e D4R di MVA, sfruttando una tecnologia selettiva basata sul gene *gpt*. Confrontato a tale strategia, il valore aggiunto del metodo usato in questo lavoro di tesi è rappresentato dall'utilizzo di *marker* fluorescenti che permettono l'isolamento dei virus ricombinanti attraverso il *sorting* (FACS). Questo garantisce un sostanziale snellimento dei tempi di selezione, semplificando pertanto la costruzione di mrMVA. Allo stesso modo ma applicato ad un filone di studio differente, è stato ancor più recentemente pubblicato un secondo lavoro (Wussow et al. 2014), nel quale un MVA è stato finemente ingegnerizzato per esprimere le cinque subunità del complesso pentamerico gH/gL, inserite all'interno di quattro diverse regioni genomiche. Tale complesso è responsabile dell'ingresso di CMV nelle cellule endoteliali e si ritiene che anticorpi diretti contro di esso potrebbero risultare estremamente utili per controllarne l'infezione. Un enorme vantaggio del metodo impiegato, ossia l'ingegnerizzazione *in vitro* (*recombineering*) di un BAC contenente l'intero genoma di MVA, consiste nella possibilità di costruire e caratterizzare a priori il genoma virale, limitando l'uso delle colture cellulari e impiegando un virus *helper* durante le prime fasi dell'infezione. Va comunque detto che l'ingegnerizzazione di un BAC è ben più complessa di quella di un plasmide, e il fatto che sia presente in singola o, al più, duplice copia all'interno dei batteri riduce notevolmente la resa finale.

L'impiego di virus ricombinanti esprimenti più TG potrebbe rivelarsi importante anche in altri sistemi. Soffermandoci nel campo della vaccinazione nei confronti di malattie infettive o tumori, ad esempio, la co-espressione di adiuvanti immunologici potrebbe rappresentare un buon metodo per potenziare la risposta immunitaria nei confronti di antigeni debolmente immunogenici o polarizzarla in maniera specifica, risultando pertanto in una maggiore efficacia del vaccino. In quest'ottica, la possibilità di introdurre TG in punti diversi del genoma di MVA consentirebbe uno sviluppo piramidale del vettore, apportando continui miglioramenti al virus già disponibile senza la necessità di produrre un vettore *ex novo*.

L'introduzione della tecnologia del DNA ricombinante ha sicuramente costituito una svolta nella biologia. L'utilizzo di geni reporter e la costruzione di vettori in grado di indurre overespressione, downregolazione o silenziamento di specifici geni hanno infatti permesso di

definire le interazioni metaboliche e di dissezionare enormi cascate di attivazione in *working package* di minori dimensioni, delineando precisi *pathway* cellulari ed identificando quei geni che, se mutati, sono in grado di indurre un fenotipo patologico. Parimenti, questo ha anche fornito uno strumento profilattico e terapeutico estremamente potente: ad esempio, attraverso l'inserimento di un gene *wild type*, è possibile complementare *in vivo* o *ex vivo* un difetto genetico ("*gene therapy*"); oppure, è anche possibile alterare il fenotipo cellulare per guidare la risposta immunitaria, come nel caso delle terapie basate sull'uso di DC modificate (Palucka e Banchereau 2013; Ahmed e Bae 2014). In maniera analoga, sono anche in fase di studio strategie vaccinali o terapeutiche attraverso le quali una risposta immunitaria specifica viene indotta utilizzando cellule tumorali mascherate da APC: questo, come descritto nell'introduzione, è reso possibile attraverso la sola overespressione del gene CIITA, necessaria e sufficiente per l'instaurarsi di un fenotipo Classe-II⁺. Considerata, tuttavia, la risposta estremamente eterogenea ottenuta con questi approcci, l'efficacia vaccinale va saggiata caso per caso, richiedendo la produzione di diverse linee esperimenti CIITA. A tal proposito, vari sistemi di *gene delivery* sono stati impiegati (Qiu et al. 1999; Lu et al. 2003; G G Hillman et al. 2003; Meazza et al. 2003; Y. Wang et al. 2005; Mortara et al. 2006; Frangione et al. 2010). La trasfezione con agenti chimici o metodi fisici rappresenta sicuramente il metodo di più semplice, sebbene la modesta efficienza risulti spesso un limite (T. K. Kim e Eberwine 2010). Per ovviare a ciò e non volendo utilizzare sistemi che permettano la generazione di linee stabili (introducendo, ad esempio, geni per la resistenza agli antibiotici), sono state messe a punto altre strategie, tra le quali l'utilizzo di vettori virali ingegnerizzati *ad hoc*. L'infezione è infatti un metodo estremamente efficiente e riproducibile per indurre l'overespressione del TG di interesse, risultando sufficientemente sicura nei limiti consentiti dai livelli di sicurezza previsti. Tra i vettori virali disponibili (Warnock, Daigre, e Al-Rubeai 2011), i *Lentivirus* sono generalmente impiegati per la generazione di linee stabili e nella terapia genica *ex vivo*, poiché sono in grado di integrare nel genoma delle cellule bersaglio. MVA (e alcuni *Avipox virus*), invece, non integrandosi e non replicando nell'uomo, sono da tempo stati impiegati in qualità di vettori vaccinali per indurre forti risposte contro i TG veicolati, come esposto nel paragrafo "Efficacia vaccinale di MVA in animali e uomo" e confermato dall'ampia letteratura presentata a sostegno. L'impiego di vettori di espressione transienti (come MVA) per effettuare il *gene delivery* di CIITA potrebbe quindi apportare un significativo contributo nello sviluppo di immunoterapie basate sull'overespressione della Classe-II.

Nella seconda parte di questo lavoro di tesi è mostrata la costruzione del virus MVA fCIITA(Δ III), contenente cioè il gene fCIITA all'interno della regione Δ III. Dal momento che in letteratura non sono ancora presenti dati sufficienti riguardanti il rapporto tra MVA e l'espressione della Classe-II, è stata preventivamente saggiata la capacità di questo virus nell'indurre un fenotipo Classe-II⁺ nelle cellule infettate, comparandolo a un sistema più tradizionale come può essere la

trasfezione. I dati di western blot (HEK-293T e TSA) e immunofluorescenza (HEK-293T) mostrano che il virus MVA fCIITA(Δ III) è in grado di esprimere correttamente il TG, la cui localizzazione non differisce in maniera sostanziale rispetto all'analogo plasmidico. Inoltre, è stato possibile confermare che MVA fCIITA(Δ III) è in grado di mediare l'espressione e l'invio in superficie delle molecole di Classe-II umane (HLA-DR) e murine (I-Ad), come dimostrato dalle analisi citometriche (HEK-293T e TSA) e i saggi di immunofluorescenza (HEK-293T). Presi insieme, questi risultati permettono di concludere che MVA non interferisce col *pathway* della Classe-II per lo meno per quanto concerne la localizzazione subcellulare di CIITA, la transattivazione della Classe-II e il successivo invio in membrana delle molecole HLA-DR e I-Ad correttamente conformate. Da questi dati è inoltre possibile dedurre che l'eventuale interferenza di MVA con l'espressione di Classe-II potrebbe esplicarsi unicamente a monte, più precisamente a livello pre-traduzionale di CIITA: ad esempio, MVA potrebbe produrre proteine che sequestrano i fattori trascrizionali necessari per l'espressione di CIITA o che competono con essi per il legame con i suoi promotori, inibendo la trascrizione; oppure, altri fattori potrebbero agire a livello citoplasmatico, alterando la stabilità del trascritto e, di fatto, bloccandone o riducendone la traduzione.

La capacità immunostimolante di CIITA è stata successivamente testata *in vivo* utilizzando come *readout* l'induzione di anticorpi anti-vettore in topi immunizzati con MVA fCIITA(Δ III) o MVA *mock* (MVA HcRED(Δ III)). Considerato inoltre il ruolo ricoperto dalla Classe-II nell'induzione dell'anergia e nello sviluppo di cellule T-regolatorie in assenza di sufficiente co-stimolazione (Cook e Campbell 1999; Corthay 2009; Broere et al. 2011; Crespo et al. 2013), è stata anche compiuta un'analisi citometrica per analizzare il fenotipo dei linfociti CD4⁺ purificati dai linfonodi inguinali, poplitei e ascellari. Entrambi i metodi analitici non hanno tuttavia messo in evidenza differenze significative tra i due gruppi: i sieri analizzati tramite saggio ELISA hanno restituito una titolazione anticorpale pressoché identica e la distribuzione delle sotto-popolazioni linfocitarie si è mostrata simile, fatta eccezione per una leggera riduzione dei linfociti T-regolatori e un leggero aumento dei linfociti T CD8⁺ nel gruppo immunizzato con MVA fCIITA(Δ III). L'assenza dell'effetto biologico, ossia l'aumento di anticorpi anti-vettore, è quindi in linea con la mancata over-stimolazione dei linfociti T-helper, ma non dipende dalla risposta T-regolatoria. Una possibile interpretazione di questo dato potrebbe essere che la risposta anti-vettore sia già completamente satura: ciò impedirebbe di fatto l'ulteriore stimolazione del ramo umorale e, quindi, l'incremento del titolo anticorpale anti-vettore.

Per saggiare l'efficacia del virus MVA fCIITA(Δ III), pertanto, è in corso un protocollo di vaccinazione/*challenge in vivo* su topi BALB/c. Dopo vaccinazione con cellule tumorali TSA infettate con diversi virus e utilizzando come controllo positivo cellule stabilmente esprimenti fCIITA (TSA pLXIN-fCIITA), verrà effettuato un inoculo di cellule TSA *wild type* per comparare la crescita tumorale

tra i gruppi sperimentali, così da stabilire l'effettiva efficacia del virus MVA fCIITA(Δ III) nell'indurre una risposta tumore-specifica. In maniera analoga a quanto svolto in precedenza (Lu et al. 2003; G G Hillman et al. 2003), inoltre, la capacità immunomodulante del virus MVA fCIITA(Δ III) verrà anche saggiata attraverso iniezione intratumorale, utilizzando come controllo un virus MVA *mock*. Comparando le relative crescite tumorali, sarà possibile stabilire l'utilità dell'utilizzo di MVA fCIITA(Δ III) in protocolli terapeutici. Da ultimo, non si esclude la possibilità di generare virus ricombinanti contenenti altre molecole immunostimolanti affianco a fCIITA, sfruttando il sistema messo a punto e descritto nella prima parte di questo lavoro di tesi. Possibili candidati sono geni esprimenti molecole costimolatorie (CD80/86 in primis), agonisti dei TLR, citochine pro-infiammatorie o immunomodulanti (IL-1, IL-2, IL-12 e IL-15 a esempio) e chemochine (Sato et al. 2011). Discorso a parte va fatto per IL-10: sebbene sia normalmente riconosciuta come citochina anti-infiammatoria, infatti, la letteratura si trova piuttosto dibattuta sul suo ruolo nell'ambiente tumorale, essendoci evidenze parecchio contrastanti che la vedono implicata in processi sia anti-infiammatori (e quindi pro-neoplastici) sia pro-infiammatori (Mumm et al. 2011; Sato et al. 2011; Mocellin, Marincola, e Young 2005; Stewart et al. 2013). La co-espressione di fCIITA e IL-10 potrebbe quindi aggiungere un ulteriore tassello, contribuendo a fare maggiore chiarezza sul ruolo di questa interleuchina nel microambiente tumorale.

In conclusione, il lavoro presentato in questa tesi ha introdotto due sensibili progressi nella generazione dei virus ricombinanti MVA e nel loro utilizzo. La tecnologia sviluppata consentirà la costruzione di virus ricombinanti contenenti più TG inseriti in punti diversi del genoma di MVA, assicurando l'indipendenza trascrizionale e traduzionale delle singole proteine e consentendo, quindi, l'espressione sicura di complessi multimerici. Inoltre, avendo verificato la possibilità di transattivare proteine cellulari senza particolari interferenze da parte del virus, il campo d'azione di MVA è stato positivamente ridimensionato. Da ultimo, qualora la capacità immunostimolatoria e/o immunomodulante del virus MVA fCIITA(Δ III) venisse confermata, si avrà a disposizione un ottimo strumento per valutare in maniera rapida e sicura in quali tumori l'overespressione della Classe-II svolge un ruolo efficace nell'induzione di una risposta immunitaria antitumorale.

Bibliografia

Abendroth, A, B Slobedman, E Lee, E Mellins, M Wallace, e A M Arvin. 2000. «Modulation Of Major Histocompatibility Class II Protein Expression By Varicella-Zoster Virus.». *Journal Of Virology* 74 (4). American Society for Microbiology: 1900-7-1907. doi:10.1128/JVI.74.4.1900-1907.2000.

Accolla, R S. 1983. «Human B Cell Variants Immunoselected Against A Single Ia Antigen Subset Have Lost Expression Of Several Ia Antigen Subsets.». *The Journal Of Experimental Medicine* 157 (3). Rockefeller University Press: 1053-8-1058. doi:10.1084/jem.157.3.1053.

Accolla, R S, A De Lerma Barbaro, S Mazza, C Casoli, A De Maria, e G Tosi. 2001. «The MHC Class II Transactivator: Prey And Hunter In Infectious Diseases.». *Trends In Immunology* 22 (10). Elsevier: 560-3-563. doi:10.1016/S1471-4906(01)02003-8.

Accolla, R S, M Jotterand-Bellomo, L Scarpellino, A Maffei, G Carra, e J Guardiola. 1986. «Air-1, A Newly Found Locus On Mouse Chromosome 16 Encoding A Trans-Acting Activator Factor For MHC Class II Gene Expression.». *The Journal Of Experimental Medicine* 164 (1). Rockefeller University Press: 369-74-374. doi:10.1084/jem.164.1.369.

Accolla, Roberto S, Stefania Mazza, Andrea De Lerma Barbaro, Andrea De Maria, e Giovanna Tosi. 2002. «The HLA Class II Transcriptional Activator Blocks The Function Of HIV-1 Tat And Inhibits Viral Replication.». *European Journal Of Immunology* 32 (10): 2783-91. doi:10.1002/1521-4141(2002010)32:103.0.CO;2-E.

Acres, Bruce. 2007. «Cancer Immunotherapy: Phase II Clinical Studies With TG4010 (MVA-MUC1-IL2).». *Journal Of B.U.ON. : Official Journal Of The Balkan Union Of Oncology* 12 Suppl 1 (settembre): S71-5.

Ahmed, Md Selim, e Yong-Soo Bae. 2014. «Dendritic Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines: Past, Present And Future.». *Clinical And Experimental Vaccine Research* 3 (2): 113-6-116. doi:10.7774/cevr.2014.3.2.113.

Aichinger, G, L Karlsson, M R Jackson, M Vestberg, J H Vaughan, L Teyton, R I Lechler, e P A Peterson. 1997. «Major Histocompatibility Complex Class II-Dependent Unfolding, Transport, And Degradation Of Endogenous Proteins.». *The Journal Of Biological Chemistry* 272 (46): 29127-36.

Alberca, Berta, Katarzyna Bachanek-Bankowska, Marta Cabana, Eva Calvo-Pinilla, Elisenda Viaplana, Lorraine Frost, Simon Gubbins, Alicia Urniza, Peter Mertens, e Javier Castillo-Olivares. 2014. «Vaccination Of Horses With A Recombinant Modified Vaccinia Ankara Virus (MVA) Expressing African Horse Sickness (AHS) Virus Major Capsid Protein VP2 Provides Complete Clinical Protection Against Challenge.». *Vaccine* 32 (29): 3670-4. doi:10.1016/j.vaccine.2014.04.036.

Albert, M L, B Sauter, e N Bhardwaj. 1998. «Dendritic Cells Acquire Antigen From Apoptotic Cells And Induce Class I-Restricted Ctls.». *Nature* 392 (6671): 86-9. doi:10.1038/32183.

Alcamí, A, J A Symons, e G L Smith. 2000. «The Vaccinia Virus Soluble Alpha/Beta Interferon (IFN) Receptor Binds To The Cell Surface And Protects Cells From The Antiviral Effects Of IFN.». *Journal Of Virology* 74 (23). American Society for Microbiology: 11230-9-11239. doi:10.1128/JVI.74.23.11230-11239.2000.

Alcamí, A, e G L Smith. 1992. «A Soluble Receptor For Interleukin-1 Beta Encoded By Vaccinia Virus: A Novel Mechanism Of Virus Modulation Of The Host Response To Infection.». *Cell* 71 (1). Elsevier: 153-67-167. doi:10.1016/0092-8674(92)90274-G.

Alcamí, A, e G L Smith. 1995. «Vaccinia, Cowpox, And Camelpox Viruses Encode Soluble Gamma Interferon Receptors With Novel Broad Species Specificity.». *Journal Of Virology* 69 (8). American Society for Microbiology: 4633-9-4639.

Altenburg, Arwen F, Joost H C M Kreijtz, Rory D de Vries, Fei Song, Robert Fux, Guus F Rimmelzwaan, Gerd Sutter, e Asisa Volz. 2014. «Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) As Production Platform For Vaccines Against Influenza And Other Viral Respiratory Diseases.». *Viruses* 6 (7): 2735-61. doi:10.3390/v6072735.

Amato, Robert J, Robert E Hawkins, Howard L Kaufman, John A Thompson, Piotr Tomczak, Cezary Szczylik, Mike McDonald, et al 2010. «Vaccination Of Metastatic Renal Cancer Patients With MVA-5T4: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase III Study.». *Clinical Cancer Research : An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 16 (22): 5539-47. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-2082.

Amato, Robert J, Youxin Xiong, Hui Peng, e Virginia Mohlere. 2014. «Clinical Outcomes Model In Renal Cell Cancer Patients Treated With Modified Vaccinia Ankara Plus Tumor-Associated Antigen 5T4.». *The International Journal Of Biological Markers*, settembre, 0. doi:10.5301/jbm.5000112.

Amato, Robert J, e Mika Stepankiw. 2012. «Evaluation Of MVA-5T4 As A Novel Immunotherapeutic Vaccine In Colorectal, Renal And Prostate Cancer.». *Future Oncology (London, England)* 8 (3): 231-7. doi:10.2217/fon.12.7.

Andersen, Peter, e Joshua S Woodworth. 2014. «Tuberculosis Vaccines--Rethinking The Current Paradigm.». *Trends In Immunology* 35 (8): 387-95. doi:10.1016/j.it.2014.04.006.

Antoine, G, F Scheiflinger, F Dorner, e F G Falkner. 1998. «The Complete Genomic Sequence Of The Modified Vaccinia Ankara Strain: Comparison With Other Orthopoxviruses.». *Virology* 244 (2): 365-96. doi:10.1006/viro.1998.9123.

Antrobus, Richard D, Tamara K Berthoud, Caitlin E Mullarkey, Katja Hoschler, Lynda Coughlan, Maria Zambon, Adrian V S Hill, e Sarah C Gilbert. 2013. «Coadministration Of Seasonal Influenza Vaccine And MVA-NP+M1 Simultaneously Achieves Potent Humoral And Cell-Mediated Responses.». *Molecular Therapy* 22 (1). Nature Publishing Group: 233-8. doi:10.1038/mt.2013.162.

Armstrong, T D, B A Pulaski, S Ostr, S Ostrand-Rosenberg, e -Rosenberg. 1998. «Tumor Antigen Presentation: Changing The Rules.». *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII* 46 (2): 70-4.

Bai, Hongdong, R Mark L Buller, Nanhai Chen, Michael Green, e Anthony A Nuara. 2005. «Biosynthesis Of The IFN-Gamma Binding Protein Of Ectromelia Virus, The Causative Agent Of Mousepox.». *Virology* 334 (1): 41-50. doi:10.1016/j.virol.2005.01.015.

Baroni, Miriam, Andrea Matucci, Gabriella Scarlatti, Elisa Soprana, Paola Rossolillo, Lucia Lopalco, Donato Zipeto, Antonio G Siccardi, e Claudio De Santis. 2009. «HLA-C Is Necessary For Optimal Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection Of Human Peripheral Blood CD4 Lymphocytes.». *Journal Of General Virology* 91 (Pt 1). Society for General Microbiology: 235-41-241. doi:10.1099/vir.0.015230-0.

Barouch, D H, S Santra, M J Kuroda, J E Schmitz, R Plishka, A Buckler-White, A E Gaitan, et al 2001. «Reduction Of Simian-Human Immunodeficiency Virus 89.6P Viremia In Rhesus Monkeys By Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Vaccination.». *Journal Of Virology* 75 (11): 5151-8. doi:10.1128/JVI.75.11.5151-5158.2001.

Barry, M, S F Lee, L Boshkov, e G McFadden. 1995. «Myxoma Virus Induces Extensive CD4 Downregulation And Dissociation Of P56lck In Infected Rabbit CD4+ T Lymphocytes.». *Journal Of Virology* 69 (9). American Society for Microbiology: 5243-51-5251.

Bauza, Karolis, Tomas Malinauskas, Claudia Pf, Claudia Pfander, er, Burcu Anar, E Yvonne Jones, et al 2014. «Efficacy Of A Plasmodium Vivax Malaria Vaccine Using Chad63 And Modified Vaccinia Ankara Expressing Thrombospondin-Related Anonymous Protein As Assessed With Transgenic Plasmodium Berghei Parasites.». *Infection And Immunity* 82 (3): 1277-86. doi:10.1128/IAI.01187-13.

Baxby, D. 1977. «The Origins Of Vaccinia Virus.». *The Journal Of Infectious Diseases* 136 (3): 453-5.

Belyakov, Igor M, Patricia Earl, Amiran Dzutsev, Vladimir A Kuznetsov, Michael Lemon, Linda S Wyatt, James T Snyder, et al 2003. «Shared Modes Of Protection Against Poxvirus Infection By Attenuated And Conventional Smallpox Vaccine Viruses.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 100 (16): 9458-63. doi:10.1073/pnas.1233578100.

Bernards, R, A Destree, S McKenzie, E Gordon, R A Weinberg, e D Panicali. 1987. «Effective Tumor Immunotherapy Directed Against An Oncogene-Encoded Product Using A Vaccinia Virus Vector.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 84 (19): 6854-8.

Berthoud, Tamara K, Matthew Hamill, Patrick J Lillie, Lenias Hwenda, Katharine A Collins, Katie J Ewer, Anita Milicic, et al 2011. «Potent CD8+ T-Cell Immunogenicity In Humans Of A Novel Heterosubtypic Influenza A Vaccine, MVA-NP+M1.». *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication Of The Infectious Diseases Society Of America* 52 (1): 1-7. doi:10.1093/cid/ciq015.

Bertin, J, R C Armstrong, S Otilie, D A Martin, Y Wang, S Banks, G H Wang, et al 1997. «Death Effector Domain-Containing Herpesvirus And Poxvirus Proteins Inhibit Both Fas- And TNFR1-Induced Apoptosis.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 94 (4). National Academy of Sciences: 1172-6-1176.

- Bewry, Nadine N, Sophia C E Bolick, Kenneth L Wright, e Jonathan A Harton. 2007. «GTP-Dependent Recruitment Of CIITA To The Class II Major Histocompatibility Complex Promoter.». *Journal Of Biological Chemistry* 282 (36). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 26178-84-26184. doi:10.1074/jbc.M611747200.
- Blanchard, T J, A Alcamì, P Andrea, e G L Smith. 1998. «Modified Vaccinia Virus Ankara Undergoes Limited Replication In Human Cells And Lacks Several Immunomodulatory Proteins: Implications For Use As A Human Vaccine.». *The Journal Of General Virology* 79 (Pt 5) (maggio): 1159-67.
- Boshkov, L K, J L Macen, e G McFadden. 1992. «Virus-Induced Loss Of Class I MHC Antigens From The Surface Of Cells Infected With Myxoma Virus And Malignant Rabbit Fibroma Virus.». *Journal Of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148 (3): 881-7.
- Boss, Jeremy M, e Peter E Jensen. 2002. «Transcriptional Regulation Of The MHC Class II Antigen Presentation Pathway.». *Current Opinion In Immunology* 15 (1): 105-11.
- Brochier, B, F Costy, e P P Pastoret. 1995. «Elimination Of Fox Rabies From Belgium Using A Recombinant Vaccinia-Rabies Vaccine: An Update.». *Veterinary Microbiology* 46 (1-3): 269-79.
- Broere, Femke, Sergei G Apasov, Michail V Sitkovsky, e Willem van Eden. 2011. *Principles Of Immunopharmacology: 3Rd Revised And Extended Edition, Pp. 15-27 «T Cell Subsets And T Cell-Mediated Immunity»*. doi:10.1007/978-3-0346-0136-8_2.
- Calvo-Pinilla, Eva, Francisco de La Poza, Simon Gubbins, Peter Paul Clement Mertens, Javier Ortego, e Javier Castillo-Olivares. 2014. «Vaccination Of Mice With A Modified Vaccinia Ankara (MVA) Virus Expressing The African Horse Sickness Virus (AHSV) Capsid Protein VP2 Induces Virus Neutralising Antibodies That Confer Protection Against AHSV Upon Passive Immunisation.». *Virus Research* 180 (febbraio): 23-30. doi:10.1016/j.virusres.2013.12.002.
- Carroll, M W, e B Moss. 1997. «Host Range And Cytopathogenicity Of The Highly Attenuated MVA Strain Of Vaccinia Virus: Propagation And Generation Of Recombinant Viruses In A Nonhuman Mammalian Cell Line.». *Virology* 238 (2): 198-211. doi:10.1006/viro.1997.8845.
- Casoli, Claudio, Andrea De Lerma Barbaro, Elisabetta Pilotti, Umberto Bertazzoni, Giovanna Tosi, e Roberto S Accolla. 2003. «The MHC Class II Transcriptional Activator (CIITA) Inhibits HTLV-2 Viral Replication By Blocking The Function Of The Viral Transactivator Tax-2.». *Blood* 103 (3): 995-1001. doi:10.1182/blood-2003-07-2503.
- Chakrabarti S, Sisler JR, Moss B. 1997. «Compact, synthetic, vaccinia virus early/late promoter for protein expression.». *Biotechniques* 23(6):1094-1997. PMID: 9421642.

Chamberlain, R S, M W Carroll, V Bronte, P Hwu, S Warren, J C Yang, M Nishimura, B Moss, S A Rosenberg, e N P Restifo. 1996. «Costimulation Enhances The Active Immunotherapy Effect Of Recombinant Anticancer Vaccines.». *Cancer Research* 56 (12): 2832-6.

Chang, W, J C Hsiao, C S Chung, e C H Bair. 1995. «Isolation Of A Monoclonal Antibody Which Blocks Vaccinia Virus Infection.». *Journal Of Virology* 69 (1). American Society for Microbiology: 517-22-522.

Chen, Zhiwei, Linqi Zhang, Chuan Qin, Lei Ba, Christopher E Yi, Fengwen Zhang, Qiang Wei, et al 2005. «Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing The Spike Glycoprotein Of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Induces Protective Neutralizing Antibodies Primarily Targeting The Receptor Binding Region.». *Journal Of Virology* 79 (5): 2678-88. doi:10.1128/JVI.79.5.2678-2688.2005.

Chin, K C, G G Li, e J P Ting. 1997. «Importance Of Acidic, Proline/Serine/Threonine-Rich, And GTP-Binding Regions In The Major Histocompatibility Complex Class II Transactivator: Generation Of Transdominant-Negative Mutants.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 94 (6). National Academy of Sciences: 2501-6-2506.

Chung, C S, J C Hsiao, Y S Chang, e W Chang. 1998. «A27L Protein Mediates Vaccinia Virus Interaction With Cell Surface Heparan Sulfate.». *Journal Of Virology* 72 (2). American Society for Microbiology: 1577-85-1585.

Climent, Núria, Séverine Munier, Núria Piqué, Felipe García, Vincent Pavot, Charlotte Primard, Victor Casanova, José María Gatell, Bernard Verrier, e Teresa Gallart. 2014. «Loading Dendritic Cells With PLA-P24 Nanoparticles Or MVA Expressing HIV Genes Induces HIV-1-Specific T Cell Responses.». *Vaccine*, settembre. doi:10.1016/j.vaccine.2014.09.010.

Cook, G, e J D Campbell. 1999. «Immune Regulation In Multiple Myeloma: The Host-Tumour Conflict.». *Blood Reviews* 13 (3). Elsevier: 151-62-162. doi:10.1054/blre.1999.0111.

Corthay, A. 2009. «How Do Regulatory T Cells Work?». *Scandinavian Journal Of Immunology* 70 (4). Blackwell Publishing Ltd: 326-36-336. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x.

Cosma, Antonio, Rashmi Nagaraj, Silja Bühler, Jorma Hinkula, Dirk H Busch, Gerd Sutter, Frank D Goebel, e Volker Erfle. 2003. «Therapeutic Vaccination With MVA-HIV-1 Nef Elicits Nef-Specific T-Helper Cell Responses In Chronically HIV-1 Infected Individuals.». *Vaccine* 22 (1): 21-9.

Crespo, Joel, Haoyu Sun, Theodore H Welling, Zhigang Tian, e Weiping Zou. 2013. «T Cell Anergy, Exhaustion, Senescence, And Stemness In The Tumor Microenvironment.». *Current Opinion In Immunology* 25 (2): 214-21. doi:10.1016/j.coi.2012.12.003.

Cressman, D E, K C Chin, D J Taxman, e J P Ting. 1999. «A Defect In The Nuclear Translocation Of CIITA Causes A Form Of Type II Bare Lymphocyte Syndrome.». *Immunity* 10 (2): 163-71.

Cressman, D E, W J O'Connor, S F Greer, X S Zhu, e J P Ting. 2001. «Mechanisms Of Nuclear Import And Export That Control The Subcellular Localization Of Class II Transactivator.». *The Journal Of Immunology* 167 (7). American Association of Immunologists: 3626-34-3634. doi:10.4049/jimmunol.167.7.3626.

Croce, Michela, Alessandro De Ambrosis, Maria V Corrias, Vito Pistoia, Marzia Occhino, Raffaella Meazza, Julien Giron-Michel, Bruno Azzarone, Roberto S Accolla, e Silvano Ferrini. 2003. «Different Levels Of Control Prevent Interferon-Gamma-Inducible HLA-Class II Expression In Human Neuroblastoma Cells.». *Oncogene* 22 (49). Nature Publishing Group: 7848-57. doi:10.1038/sj.onc.1207054.

Cunnion, K M. 1999. «Tumor Necrosis Factor Receptors Encoded By Poxviruses.». *Molecular Genetics And Metabolism* 67 (4): 278-82. doi:10.1006/mgme.1999.2878.

Currier, Jeffrey R, Viseth Ngauy, Mark S de Souza, Silvia Ratto-Kim, Josephine H Cox, Victoria R Polonis, Patricia Earl, et al 2010. «Phase I Safety And Immunogenicity Evaluation Of MVA-CMDR, A Multigenic, Recombinant Modified Vaccinia Ankara-HIV-1 Vaccine Candidate.». *Plos One* 5 (11): e13983. doi:10.1371/journal.pone.0013983.

De Lerma Barbaro, Andrea, Francesco A Procopio, Lorenzo Mortara, Giovanna Tosi, e Roberto S Accolla. 2005. «The MHC Class II Transactivator (CIITA) Mrna Stability Is Critical For The HLA Class II Gene Expression In Myelomonocytic Cells.». *European Journal Of Immunology* 35 (2). WILEY-VCH Verlag: 603-11-611. doi:10.1002/eji.200425378.

Deffrennes, V, J Vedrenne, M C Stolzenberg, J Piskurich, G Barbieri, J P Ting, D Charron, e C Alcaïde-Loridan. 2001. «Constitutive Expression Of MHC Class II Genes In Melanoma Cell Lines Results From The Transcription Of Class II Transactivator Abnormally Initiated From Its B Cell-Specific Promoter.». *The Journal Of Immunology* 167 (1). American Association of Immunologists: 98-106-106. doi:10.4049/jimmunol.167.1.98.

Dengjel, Jörn, Oliver Schoor, Rainer Fischer, Michael Reich, Marianne Kraus, Margret Müller, Katharina Kreymborg, et al 2005. «Autophagy Promotes MHC Class II Presentation Of Peptides From Intracellular Source Proteins.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 102 (22): 7922-7. doi:10.1073/pnas.0501190102.

Devaiah, Ballachanda N, e Dinah S Singer. 2013. «CIITA And Its Dual Roles In MHC Gene Transcription.». *Frontiers In Immunology* 4: 476. doi:10.3389/fimmu.2013.00476.

Di Bisceglie, Adrian M, Ewa Janczweska-Kazek, François Habersetzer, Wlodzimierz Mazur, Carol Stanciu, Vicente Carreno, Coman Tanasescu, et al 2014. «Efficacy Of Immunotherapy With TG4040, Peg-Interferon, And Ribavirin In A Phase 2 Study Of Patients With Chronic HCV Infection.». *Gastroenterology* 147 (1): 119-131.e3. doi:10.1053/j.gastro.2014.03.007.

Di Lullo, Giulia, Elisa Soprana, Maddalena Panigada, Alessio Palini, Alessandra Agresti, Claudio Comunian, Adelaide Milani, Ilaria Capua, Volker Erfle, e Antonio G. Siccardi. 2010. «The Combination Of Marker Gene Swapping And Fluorescence-Activated Cell Sorting Improves The Efficiency Of Recombinant Modified

Vaccinia Virus Ankara Vaccine Production For Human Use». *Journal Of Virological Methods* 163 (2): 195-204. doi:10.1016/j.jviromet.2009.09.016.

Di Lullo, Giulia, Elisa Soprana, Maddalena Panigada, Alessio Palini, Volker Erfle, Caroline Staib, Gerd Sutter, e Antonio G. Siccardi. 2009. «Marker Gene Swapping Facilitates Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Production By Host-Range Selection». *Journal Of Virological Methods* 156 (1-2): 37-43. doi:10.1016/j.jviromet.2008.10.026.

Dissanayake, Samudra K, Natalia Tuera, Suzanne Ostr, Suzanne Ostrand-Rosenberg, e -Rosenberg. 2005. «Presentation Of Endogenously Synthesized MHC Class II-Restricted Epitopes By MHC Class II Cancer Vaccines Is Independent Of Transporter Associated With Ag Processing And The Proteasome.». *Journal Of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 174 (4): 1811-9.

Domi, Arban, e Bernard Moss. 2005. «Engineering Of A Vaccinia Virus Bacterial Artificial Chromosome In Escherichia Coli By Bacteriophage Lambda-Based Recombination.». *Nature Methods* 2 (2): 95-7. doi:10.1038/nmeth734.

Dongre, A R, S Kovats, P deRoos, A L McCormack, T Nakagawa, V Paharkova-Vatchkova, J Eng, H Caldwell, J R Yates 3rd, e A Y Rudensky. 2001. «In Vivo MHC Class II Presentation Of Cytosolic Proteins Revealed By Rapid Automated Tandem Mass Spectrometry And Functional Analyses.». *European Journal Of Immunology* 31 (5): 1485-94. doi:10.1002/1521-4141(200105)31:53.0.CO;2-A.

Dranoff, Glenn. 2005. «The Therapeutic Implications Of Intratumoral Regulatory T Cells.». *Clinical Cancer Research* 11 (23). American Association for Cancer Research: 8226-9-8229. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2035.

Dreicer, R, W M Stadler, F R Ahmann, T Whiteside, N Bizouarne, B Acres, J-M Limacher, P Squiban, e A Pantuck. 2009. «MVA-MUC1-IL2 Vaccine Immunotherapy (TG4010) Improves PSA Doubling Time In Patients With Prostate Cancer With Biochemical Failure.». *Investigational New Drugs* 27 (4): 379-86. doi:10.1007/s10637-008-9187-3.

Drexler, I, E Antunes, M Schmitz, T Wölfel, C Huber, V Erfle, P Rieber, M Theobald, e G Sutter. 1999. «Modified Vaccinia Virus Ankara For Delivery Of Human Tyrosinase As Melanoma-Associated Antigen: Induction Of Tyrosinase- And Melanoma-Specific Human Leukocyte Antigen A*0201-Restricted Cytotoxic T Cells In Vitro And In Vivo.». *Cancer Research* 59 (19): 4955-63.

Drexler, Ingo, Caroline Staib, Wolfgang Kastenmuller, Stefan Stevanović, Burkhard Schmidt, François A Lemonnier, Hans-Georg Rammensee, et al 2003. «Identification Of Vaccinia Virus Epitope-Specific HLA-A*0201-Restricted T Cells And Comparative Analysis Of Smallpox Vaccines.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 100 (1): 217-22. doi:10.1073/pnas.262668999.

Drexler, Ingo, Caroline Staib, e Gerd Sutter. 2004. «Modified Vaccinia Virus Ankara As Antigen Delivery System: How Can We Best Use Its Potential?». *Current Opinion In Biotechnology* 15 (6): 506-12. doi:10.1016/j.copbio.2004.09.001.

Drénou, Bernard, Gaëlle Le Friec, Marc Bernard, Céline Pangault, Jean-Marc Grosset, Thierry Lamy, Renée Fauchet, e Laurence Amiot. 2002. «Major Histocompatibility Complex Abnormalities In Non-Hodgkin Lymphomas.». *British Journal Of Haematology* 119 (2): 417-24.

Earl, P L, B Moss, R P Morrison, K Wehrly, J Nishio, e B Chesebro. 1986. «T-Lymphocyte Priming And Protection Against Friend Leukemia By Vaccinia-Retrovirus Env Gene Recombinant.». *Science (New York, N.Y.)* 234 (4777): 728-31.

Engelmayer, J, M Larsson, M Subklewe, A Chahroudi, W I Cox, R M Steinman, e N Bhardwaj. 1999. «Vaccinia Virus Inhibits The Maturation Of Human Dendritic Cells: A Novel Mechanism Of Immune Evasion.». *Journal Of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (12): 6762-8.

Espenschied, Jonathan, Jeffrey Lamont, Jeff Longmate, Solange Pendas, Zhongde Wang, Don J Diamond, e Joshua D I Ellenhorn. 2003. «CTLA-4 Blockade Enhances The Therapeutic Effect Of An Attenuated Poxvirus Vaccine Targeting P53 In An Established Murine Tumor Model.». *Journal Of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 170 (6): 3401-7.

Estin, C D, U S Stevenson, G D Plowman, S L Hu, P Sridhar, I Hellström, J P Brown, e K E Hellström. 1988. «Recombinant Vaccinia Virus Vaccine Against The Human Melanoma Antigen P97 For Use In Immunotherapy.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 85 (4): 1052-6.

Everett, H, M Barry, S F Lee, X Sun, K Graham, J Stone, R C Bleackley, e G McFadden. 2000. «M11L: A Novel Mitochondria-Localized Protein Of Myxoma Virus That Blocks Apoptosis Of Infected Leukocytes.». *The Journal Of Experimental Medicine* 191 (9). Rockefeller University Press: 1487-98-1498. doi:10.1084/jem.191.9.1487.

Falivene, Juliana, María Paula Médico del Zajac, María Fern, María Fernanda Pascutti, a Pascutti, Ana María Rodríguez, Cynthia Maeto, et al 2012. «Improving The MVA Vaccine Potential By Deleting The Viral Gene Coding For The IL-18 Binding Protein.». *Plos One* 7 (2): e32220. doi:10.1371/journal.pone.0032220.

Falkner, F G, e B Moss. 1988. «Escherichia Coli Gpt Gene Provides Dominant Selection For Vaccinia Virus Open Reading Frame Expression Vectors.». *Journal Of Virology* 62 (6). American Society for Microbiology: 1849-54-1854.

Florek, Nicholas W, Jason T Weinfurter, Sinthujan Jegask, Sinthujan Jegaskanda, a, Joseph N Brewoo, Tim D Powell, et al 2014. «Modified Vaccinia Virus Ankara Encoding Influenza Virus Hemagglutinin Induces Heterosubtypic Immunity In Macaques.». *Journal Of Virology* 88 (22): 13418-28. doi:10.1128/JVI.01219-14.

Fontes, J D, B Jiang, e B M Peterlin. 1997. «The Class II Trans-Activator CIITA Interacts With The TBP-Associated Factor TAFII32.». *Nucleic Acids Research* 25 (12). Oxford University Press: 2522-8-2528. doi:10.1093/nar/25.12.2522.

Foss, Francine M. 2002. «Immunologic Mechanisms Of Antitumor Activity.». *Seminars In Oncology* 29 (3 Suppl 7): 5-11.

Frangione, Valeria, Lorenzo Mortara, Patrizia Castellani, Andrea Lerma de Barbaro, e Roberto S. Accolla. 2010. «CIITA-Driven MHC-II Positive Tumor Cells: Preventive Vaccines And Superior Generators Of Antitumor CD4+ T Lymphocytes For Immunotherapy». *International Journal Of Cancer* 127 (7): 1614-1624. doi:10.1002/ijc.25183.

Früh, Klaus, Eric Bartee, Kristine Gouveia, e Mandana Mansouri. 2002. «Immune Evasion By A Novel Family Of Viral PHD/LAP-Finger Proteins Of Gamma-2 Herpesviruses And Poxviruses.». *Virus Research* 88 (1-2): 55-69.

Fulginiti, Vincent A, Arthur Papier, J Michael Lane, John M Neff, e D A Henderson. 2003a. «Smallpox Vaccination: A Review, Part I. Background, Vaccination Technique, Normal Vaccination And Revaccination, And Expected Normal Reactions.». *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication Of The Infectious Diseases Society Of America* 37 (2): 241-50. doi:10.1086/375824.

Fulginiti, Vincent A, Arthur Papier, J Michael Lane, John M Neff, e D A Henderson. 2003b. «Smallpox Vaccination: A Review, Part II. Adverse Events.». *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication Of The Infectious Diseases Society Of America* 37 (2): 251-71. doi:10.1086/375825.

García-Lora, A, I Algarra, A Collado, e F Garrido. 2003. «Tumour Immunology, Vaccination And Escape Strategies.». *European Journal Of Immunogenetics* 30 (3). Blackwell Publishing Ltd.: 177-83-183. doi:10.1046/j.1365-2370.2003.00384.x.

Gasteiger, Georg, Wolfgang Kastenmuller, Ronny Ljapoci, Gerd Sutter, e Ingo Drexler. 2007. «Cross-Priming Of Cytotoxic T Cells Dictates Antigen Requisites For Modified Vaccinia Virus Ankara Vector Vaccines.». *Journal Of Virology* 81 (21): 11925-36. doi:10.1128/JVI.00903-07.

Goepfert, Paul A, Marnie L Elizaga, Kelly Seaton, Georgia D Tomaras, David C Montefiori, Alicia Sato, John Hural, et al 2014. «Specificity And 6-Month Durability Of Immune Responses Induced By DNA And Recombinant Modified Vaccinia Ankara Vaccines Expressing HIV-1 Virus-Like Particles.». *The Journal Of Infectious Diseases* 210 (1): 99-110. doi:10.1093/infdis/jiu003.

Goodwin, B L, H Xi, R Tejiram, D D Eason, N Ghosh, K L Wright, U Nagarajan, J M Boss, e G Blanck. 2001. «Varying Functions Of Specific Major Histocompatibility Class II Transactivator Promoter III And IV Elements In Melanoma Cell Lines.». *Cell Growth & Differentiation* 12 (6). AACR: 327-35.

Goossens, Martine, Katia Pauwels, Nicolas Willemarck, e Didier Breyer. 2013. «Environmental Risk Assessment Of Clinical Trials Involving Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA)-Based Vectors.». *Current Gene Therapy* 13 (6): 413-20.

Gourley, T S, e C H Chang. 2001. «Cutting Edge: The Class II Transactivator Prevents Activation-Induced Cell Death By Inhibiting Fas Ligand Gene Expression.». *The Journal Of Immunology* 166 (5). American Association of Immunologists: 2917-21-2921. doi:10.4049/jimmunol.166.5.2917.

Gourley, T, S Roys, N W Lukacs, S L Kunkel, R A Flavell, e C H Chang. 1999. «A Novel Role For The Major Histocompatibility Complex Class II Transactivator CIITA In The Repression Of IL-4 Production.». *Immunity* 10 (3): 377-86.

Gourley, Tania S, Dipak R Patel, Kevin Nickerson, Soon-Cheol Hong, e Cheong-Hee Chang. 2002. «Aberrant Expression Of Fas Ligand In Mice Deficient For The MHC Class II Transactivator.». *The Journal Of Immunology* 168 (9). American Association of Immunologists: 4414-9-4419. doi:10.4049/jimmunol.168.9.4414.

Guardiola, J, e A Maffei. 1993. «Control Of MHC Class II Gene Expression In Autoimmune, Infectious, And Neoplastic Diseases.». *Critical Reviews In Immunology* 13 (3-4): 247-68.

Guerin, Jean-Luc, Jacqueline Gelfi, Severine Boullier, Maxence Delverdier, Frederique-Anne Bellanger, Stephane Bertagnoli, Ingo Drexler, Gerd Sutter, e Frederique Messud-Petit. 2002. «Myxoma Virus Leukemia-Associated Protein Is Responsible For Major Histocompatibility Complex Class I And Fas-CD95 Down-Regulation And Defines Scrapins, A New Group Of Surface Cellular Receptor Abductor Proteins.». *Journal Of Virology* 76 (6). American Society for Microbiology: 2912-23-2923. doi:10.1128/JVI.76.6.2912-2923.2002.

Gutierrez, Carlos Manual Corona, Alberto Tinoco, Mario López Contreras, Tania Navarro, Patricia Calzado, Laura Vargas, Lise Reyes, Roberto Posternak, e Ricardo Rosales. 2002. «Clinical Protocol. A Phase II Study: Efficacy Of The Gene Therapy Of The MVA E2 Recombinant Virus In The Treatment Of Precancerous Lesions (NIC I And NIC II) Associated With Infection Of Oncogenic Human Papillomavirus.». *Human Gene Therapy* 13 (9): 1127-40. doi:10.1089/104303402753812520.

Guzman, E, C Cubillos-Zapata, M G Cottingham, S C Gilbert, H Prentice, B Charleston, e J C Hope. 2012. «Modified Vaccinia Virus Ankara-Based Vaccine Vectors Induce Apoptosis In Dendritic Cells Draining From The Skin Via Both The Extrinsic And Intrinsic Caspase Pathways, Preventing Efficient Antigen Presentation.». *Journal Of Virology* 86 (10): 5452-66. doi:10.1128/JVI.00264-12.

Hake, S B, K Masternak, C Kammerbauer, C Janzen, W Reith, e V Steimle. 2000. «CIITA Leucine-Rich Repeats Control Nuclear Localization, In Vivo Recruitment To The Major Histocompatibility Complex (MHC) Class II Enhanceosome, And MHC Class II Gene Transactivation.». *Molecular And Cellular Biology* 20 (20). American Society for Microbiology: 7716-25-7725. doi:10.1128/MCB.20.20.7716-7725.2000.

Hake, Sandra B, Helen M Tobin, Viktor Steimle, e Lisa K Denzin. 2003. «Comparison Of The Transcriptional Regulation Of Classical And Non-Classical MHC Class II Genes.». *European Journal Of Immunology* 33 (9). WILEY-VCH Verlag: 2361-71-2371. doi:10.1002/eji.200323795.

Hallengård, David, Steven E Applequist, Sanna Nyström, Anna-Karin Maltais, Mary Marovich, Bernard Moss, Patricia Earl, Kopek Nihlmark, Britta Wahren, e Andreas Bråve. 2012. «Immunization With Multiple Vaccine Modalities Induce Strong HIV-Specific Cellular And Humoral Immune Responses.». *Viral Immunology* 25 (5): 423-32. doi:10.1089/vim.2012.0046.

Hammarlund, Erika, Matthew W Lewis, Scott G Hansen, Lisa I Strelow, Jay A Nelson, Gary J Sexton, Jon M Hanifin, e Mark K Slifka. 2003. «Duration Of Antiviral Immunity After Smallpox Vaccination.». *Nature Medicine* 9 (9): 1131-7. doi:10.1038/nm917.

Hanke, T, R V Samuel, T J Blanchard, V C Neumann, T M Allen, J E Boyson, S A Sharpe, et al 1999. «Effective Induction Of Simian Immunodeficiency Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes In Macaques By Using A Multiepitope Gene And DNA Prime-Modified Vaccinia Virus Ankara Boost Vaccination Regimen.». *Journal Of Virology* 73 (9): 7524-32.

Hanwell, David G, Bryan McNeil, Lucian Visan, Lauren Rodrigues, Pamela Dunn, Patricia E Shewen, Grace E Macallum, Patricia V Turner, e Thorsten U Vogel. 2013. «Murine Responses To Recombinant MVA Versus ALVAC Vaccines Against Tumor-Associated Antigens, Gp100 And 5T4.». *Journal Of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 36 (4): 238-47. doi:10.1097/CJI.0b013e3182941813.

Hardwick, Nicola R, Mary Carroll, Teodora Kaltcheva, Dajun Qian, Dean Lim, Lucille Leong, Peiguo Chu, et al 2014. «P53mva Therapy In Patients With Refractory Gastrointestinal Malignancies Elevates P53-Specific CD8+ T-Cell Responses.». *Clinical Cancer Research : An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 20 (17): 4459-70. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-3361.

Harrop, Richard, Noel Drury, William Shingler, Priscilla Chikoti, Irina Redchenko, Miles W Carroll, Susan M Kingsman, et al 2007. «Vaccination Of Colorectal Cancer Patients With Modified Vaccinia Ankara Encoding The Tumor Antigen 5T4 (Trovax) Given Alongside Chemotherapy Induces Potent Immune Responses.». *Clinical Cancer Research* 13 (15 Pt 1). American Association for Cancer Research: 4487-94-4494. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-0704.

Harton, J A, e J P Ting. 2000. «Class II Transactivator: Mastering The Art Of Major Histocompatibility Complex Expression.». *Molecular And Cellular Biology* 20 (17). American Society for Microbiology: 6185-94-6194. doi:10.1128/MCB.20.17.6185-6194.2000.

Hessel, Annett, Savidis-Dacho, Helga, Coulibaly, Sogue, Portsmouth, Daniel, Kreil, Thomas R, Crowe, Brian A, Schwendinger, Michael G, et al 2014. «MVA Vectors Expressing Conserved Influenza Proteins Protect Mice Against Lethal Challenge With H5N1, H9N2 And H7N1 Viruses». *PLOS ONE* 9 (2). Public Library of Science: e88340. doi:10.1371/journal.pone.0088340.

Hessel, Annett, Michael Schwendinger, Daniela Fritz, Sogue Coulibaly, Georg W Holzer, Nicolas Sabarth, Otfried Kistner, et al 2010. «A Pandemic Influenza H1N1 Live Vaccine Based On Modified Vaccinia Ankara Is Highly Immunogenic And Protects Mice In Active And Passive Immunizations.». *Plos One* 5 (8): e12217. doi:10.1371/journal.pone.0012217.

Hessel, Annett, Michael Schwendinger, Georg W Holzer, Klaus K Orlinger, Sogue Coulibaly, Helga Savidis-Dacho, Marie-Luise Zips, et al 2011. «Vectors Based On Modified Vaccinia Ankara Expressing Influenza H5N1 Hemagglutinin Induce Substantial Cross-Clade Protective Immunity.». *Plos One* 6 (1): e16247. doi:10.1371/journal.pone.0016247.

Hillman, G G, N L Kallinteris, J Li, Y Wang, X Lu, Y Li, S Wu, et al 2003. «Generating MHC Class II+/li- Phenotype After Adenoviral Delivery Of Both An Expressible Gene For MHC Class II Inducer And An Antisense li-RNA Construct In Tumor Cells.». *Gene Therapy* 10 (17): 1512-8. doi:10.1038/sj.gt.3302027.

Hillman, Gilda G, Nikoletta L Kallinteris, Xueqing Lu, Yu Wang, Jennifer L Wright, Yu Li, Shuzhen Wu, et al 2004. «Turning Tumor Cells In Situ Into T-Helper Cell-Stimulating, MHC Class II Tumor Epitope-Presenters: Immuno-Curing And Immuno-Consolidation.». *CANCER TREATMENT REVIEWS* 30 (3): 281-90. doi:10.1016/j.ctrv.2003.08.002.

Hirsch, V M, T R Fuerst, G Sutter, M W Carroll, L C Yang, S Goldstein, M Piatak Jr, et al 1996. «Patterns Of Viral Replication Correlate With Outcome In Simian Immunodeficiency Virus (SIV)-Infected Macaques: Effect Of Prior Immunization With A Trivalent SIV Vaccine In Modified Vaccinia Virus Ankara.». *Journal Of Virology* 70 (6): 3741-52.

Hodge, James W, Diane J Poole, Wilhelmina M Aarts, Alicia Gómez Yafal, Linda Gritz, e Jeffrey Schlom. 2003. «Modified Vaccinia Virus Ankara Recombinants Are As Potent As Vaccinia Recombinants In Diversified Prime And Boost Vaccine Regimens To Elicit Therapeutic Antitumor Responses.». *Cancer Research* 63 (22): 7942-9.

Holling, Tjadine M, Erik Schooten, Anton W Langerak, e Peter J van den Elsen. 2003. «Regulation Of MHC Class II Expression In Human T-Cell Malignancies.». *Blood* 103 (4): 1438-44. doi:10.1182/blood-2003-05-1491.

Holzer, Georg W, Josef Mayrhofer, Werner Gritschenberger, e Falko G Falkner. 2005. «Dominant Negative Selection Of Vaccinia Virus Using A Thymidine Kinase/Thymidylate Kinase Fusion Gene And The Prodrug Azidothymidine.». *Virology* 337 (2): 235-41. doi:10.1016/j.virol.2005.04.009.

Hornemann, Simone, Olof Harlin, Caroline Staib, Sigrid Kisling, Volker Erfle, Bernd Kaspers, Georg Häcker, e Gerd Sutter. 2003. «Replication Of Modified Vaccinia Virus Ankara In Primary Chicken Embryo Fibroblasts Requires Expression Of The Interferon Resistance Gene E3L.». *Journal Of Virology* 77 (15). American Society for Microbiology: 8394-407-8407. doi:10.1128/JVI.77.15.8394-8407.2003.

Hsiao, J C, C S Chung, e W Chang. 1998. «Cell Surface Proteoglycans Are Necessary For A27L Protein-Mediated Cell Fusion: Identification Of The N-Terminal Region Of A27L Protein As The Glycosaminoglycan-Binding Domain.». *Journal Of Virology* 72 (10). American Society for Microbiology: 8374-9-8379.

Hsiao, J C, C S Chung, e W Chang. 1999. «Vaccinia Virus Envelope D8L Protein Binds To Cell Surface Chondroitin Sulfate And Mediates The Adsorption Of Intracellular Mature Virions To Cells.». *Journal Of Virology* 73 (10). American Society for Microbiology: 8750-61-8761.

Hu, S, C Vincenz, M Buller, e V M Dixit. 1997. «A Novel Family Of Viral Death Effector Domain-Containing Molecules That Inhibit Both CD-95- And Tumor Necrosis Factor Receptor-1-Induced Apoptosis.». *Journal Of Biological Chemistry* 272 (15). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 9621-4-9624. doi:10.1074/jbc.272.15.9621.

Hui, Edwin P, Graham S Taylor, Hui Jia, Brigitte B Y Ma, Stephen L Chan, Rosalie Ho, Wai-Lap Wong, et al 2013. «Phase I Trial Of Recombinant Modified Vaccinia Ankara Encoding Epstein-Barr Viral Tumor Antigens In Nasopharyngeal Carcinoma Patients.». *Cancer Research* 73 (6): 1676-88. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-2448.

Isaacs, S N, G J Kotwal, e B Moss. 1992. «Vaccinia Virus Complement-Control Protein Prevents Antibody-Dependent Complement-Enhanced Neutralization Of Infectivity And Contributes To Virulence.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 89 (2). National Academy of Sciences: 628-32-632.

Ishizaki, Hidenobu, Guang-Yun Song, Tumul Srivastava, Kyla Driscoll Carroll, Vafa Shahabi, Edwin R Manuel, Don J Diamond, e Joshua D I Ellenhorn. 2010. «Heterologous Prime/Boost Immunization With P53-Based Vaccines Combined With Toll-Like Receptor Stimulation Enhances Tumor Regression.». *Journal Of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)* 33 (6): 609-17. doi:10.1097/CJI.0b013e3181e032c6.

Jenne, L, C Hauser, J F Arrighi, J H Saurat, e A W Hügin. 2000. «Poxvirus As A Vector To Transduce Human Dendritic Cells For Immunotherapy: Abortive Infection But Reduced APC Function.». *Gene Therapy* 7 (18): 1575-83. doi:10.1038/sj.gt.3301287.

Kamlangdee, Attapon, Brock Kingstad-Bakke, Tavis K Anderson, Tony L Goldberg, e Jorge E Osorio. 2014. «Broad Protection Against Avian Influenza Virus By Using A Modified Vaccinia Ankara Virus Expressing A Mosaic Hemagglutinin Gene.». *Journal Of Virology* 88 (22): 13300-9. doi:10.1128/JVI.01532-14.

Kanaseki, Takayuki, Hideyuki Ikeda, Yukio Takamura, Minoru Toyota, Yoshihiko Hirohashi, Takashi Tokino, Tetsuo Himi, e Noriyuki Sato. 2003. «Histone Deacetylation, But Not Hypermethylation, Modifies Class II Transactivator And MHC Class II Gene Expression In Squamous Cell Carcinomas.». *The Journal Of Immunology* 170 (10). American Association of Immunologists: 4980-5-4985. doi:10.4049/jimmunol.170.10.4980.

Kanazawa, S, T Okamoto, e B M Peterlin. 2000. «Tat Competes With CIITA For The Binding To P-Tefb And Blocks The Expression Of MHC Class II Genes In HIV Infection.». *Immunity* 12 (1): 61-70.

Kantor, J, K Irvine, S Abrams, H Kaufman, J DiPietro, e J Schlom. 1992. «Antitumor Activity And Immune Responses Induced By A Recombinant Carcinoembryonic Antigen-Vaccinia Virus Vaccine.». *Journal Of The National Cancer Institute* 84 (14): 1084-91.

Kastenmuller, Wolfgang, Ingo Drexler, Holger Ludwig, Volker Erfle, Christian Peschel, Helga Bernhard, e Gerd Sutter. 2006. «Infection Of Human Dendritic Cells With Recombinant Vaccinia Virus MVA Reveals General Persistence Of Viral Early Transcription But Distinct Maturation-Dependent Cytopathogenicity.». *Virology* 350 (2): 276-88. doi:10.1016/j.virol.2006.02.039.

Katze, Michael G, Yupeng He, e Michael Gale. 2002. «Viruses And Interferon: A Fight For Supremacy.». *Nature Reviews. Immunology* 2 (9): 675-87. doi:10.1038/nri888.

Kaufman, Howard L, Bret Taback, William Sherman, Dae Won Kim, William H Shingler, Dorota Moroziewicz, Gail DeRaffele, et al 2009. «Phase II Trial Of Modified Vaccinia Ankara (MVA) Virus Expressing 5T4 And High Dose Interleukin-2 (IL-2) In Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma.». *Journal Of Translational Medicine* 7 (1). BioMed Central Ltd: 2. doi:10.1186/1479-5876-7-2.

Keefer, Michael C, Sharon E Frey, Marnie Elizaga, Barbara Metch, Stephen C de Rosa, Paulo F Barroso, Georgia Tomaras, et al 2011. «A Phase I Trial Of Preventive HIV Vaccination With Heterologous Poxviral-Vectors Containing Matching HIV-1 Inserts In Healthy HIV-Uninfected Subjects.». *Vaccine* 29 (10): 1948-58. doi:10.1016/j.vaccine.2010.12.104.

Kim, Dae Won, Vikram Krishnamurthy, Steven D Bines, e Howard L Kaufman. 2010. «Trovax, A Recombinant Modified Vaccinia Ankara Virus Encoding 5T4: Lessons Learned And Future Development.». *Human Vaccines* 6 (10): 784-91.

Kim, Jin Hee, Sang-Rok Lee, Li-Hua Li, Hye-Jeong Park, Jeong-Hoh Park, Kwang Youl Lee, Myeong-Kyu Kim, Boo Ahn Shin, e Seok-Yong Choi. 2011. «High Cleavage Efficiency Of A 2A Peptide Derived From Porcine Teschovirus-1 In Human Cell Lines, Zebrafish And Mice.». *Plos One* 6 (4): e18556. doi:10.1371/journal.pone.0018556.

Kim, Tae Kyung, e James H Eberwine. 2010. «Mammalian Cell Transfection: The Present And The Future.». *Analytical And Bioanalytical Chemistry* 397 (8). Springer-Verlag: 3173-8-3178. doi:10.1007/s00216-010-3821-6.

Kimani, Domtila, Ya Jankey Jagne, Momodou Cox, Eva Kimani, Carly M Bliss, Evelyn Gitau, Caroline Ogwang, et al 2014. «Translating The Immunogenicity Of Prime-Boost Immunization With Chad63 And MVA ME-TRAP From Malaria Naive To Malaria-Endemic Populations.». *Molecular Therapy : The Journal Of The American Society Of Gene Therapy* 22 (11): 1992-2003. doi:10.1038/mt.2014.109.

Klein, C, B Lisowska-Grospierre, F LeDeist, A Fischer, e C Griscelli. 1993. «Major Histocompatibility Complex Class II Deficiency: Clinical Manifestations, Immunologic Features, And Outcome.». *The Journal Of Pediatrics* 123 (6): 921-8.

Kolibab, Kristopher, Amy Yang, Steven C Derrick, Thomas A Waldmann, Liyanage P Perera, e Sheldon L Morris. 2010. «Highly Persistent And Effective Prime/Boost Regimens Against Tuberculosis That Use A Multivalent Modified Vaccine Virus Ankara-Based Tuberculosis Vaccine With Interleukin-15 As A Molecular Adjuvant.». *Clinical And Vaccine Immunology : CVI* 17 (5): 793-801. doi:10.1128/CVI.00006-10.

Komiyama, T, C A Ray, D J Pickup, A D Howard, N A Thornberry, E P Peterson, e G Salvesen. 1994. «Inhibition Of Interleukin-1 Beta Converting Enzyme By The Cowpox Virus Serpin Crma. An Example Of Cross-Class Inhibition.». *Journal Of Biological Chemistry* 269 (30). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 19331-7-19337.

Krawczyk, Michal, Nicolas Peyraud, Natalia Rybtsova, Krzysztof Masternak, Philipp Bucher, Emmanuèle Barras, e Walter Reith. 2004. «Long Distance Control Of MHC Class II Expression By Multiple Distal Enhancers Regulated By Regulatory Factor X Complex And CIITA.». *The Journal Of Immunology* 173 (10). American Association of Immunologists: 6200-10-6210. doi:10.4049/jimmunol.173.10.6200.

Krishnan, Aparna, Zhongde Wang, Tumul Srivastava, Ravindra Rawal, Pooja Manch, Pooja Manchanda, a, Don J Diamond, e Corinna La Rosa. 2008. «A Novel Approach To Evaluate The Immunogenicity Of Viral Antigens Of Clinical Importance In HLA Transgenic Murine Models.». *Immunology Letters* 120 (1-2): 108-16. doi:10.1016/j.imlet.2008.07.010.

Lalani, A S, J W Barrett, e G McFadden. 2000. «Modulating Chemokines: More Lessons From Viruses.». *Immunology Today* 21 (2). Elsevier: 100-6-106. doi:10.1016/S0167-5699(99)01556-X.

Lathe, R, M P Kieny, P Gerlinger, P Clertant, I Guizani, F Cuzin, e P Chambon. 1987. «Tumour Prevention And Rejection With Recombinant Vaccinia.». *Nature* 326 (6116): 878-80. doi:10.1038/326878a0.

Lauterbach, Henning, Juliane Pätzold, Ronny Kassub, Barbara Bathke, Kay Brinkmann, Paul Chaplin, Mark Suter, e Hubertus Hochrein. 2013. «Genetic Adjuvantation Of Recombinant MVA With CD40L Potentiates CD8 T Cell Mediated Immunity.». *Frontiers In Immunology* 4 (gennaio): 251. doi:10.3389/fimmu.2013.00251.

LeibundGut-Landmann, Salomé, mann, Jean-Marc Waldburger, Michal Krawczyk, Luc A Otten, Tobias Suter, Adriano Fontana, Hans Acha-Orbea, e Walter Reith. 2004. «Mini-Review: Specificity And Expression Of CIITA, The Master Regulator Of MHC Class II Genes.». *European Journal Of Immunology* 34 (6): 1513-25. doi:10.1002/eji.200424964.

Li, Ping, Nan Wang, Delu Zhou, Christina S K Yee, Cheong-Hee Chang, R, Randy R Brutkiewicz, y R Brutkiewicz, e Janice S Blum. 2005. «Disruption Of MHC Class II-Restricted Antigen Presentation By Vaccinia Virus.». *Journal Of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 175 (10): 6481-8.

Li, S, C Kurts, F Köntgen, S R Holdsworth, e P G Tipping. 1998. «Major Histocompatibility Complex Class II Expression By Intrinsic Renal Cells Is Required For Crescentic Glomerulonephritis.». *The Journal Of Experimental Medicine* 188 (3). Rockefeller University Press: 597-602-602. doi:10.1084/jem.188.3.597.

Lillie, Patrick J, Tamara K Berthoud, Timothy J Powell, Teresa Lambe, Caitlin Mullarkey, Alexandra J Spencer, Matthew Hamill, et al 2012. «Preliminary Assessment Of The Efficacy Of A T-Cell-Based Influenza Vaccine, MVA-NP+M1, In Humans.». *Clinical Infectious Diseases* 55 (1). Oxford University Press: 19-25-25. doi:10.1093/cid/cis327.

Limacher, Jean-Marc, e Elisabeth Quoix. 2012. «TG4010: A Therapeutic Vaccine Against MUC1 Expressing Tumors.». *Oncoimmunology* 1 (5): 791-792. doi:10.4161/onci.19863.

Lin, C L, C S Chung, H G Heine, e W Chang. 2000. «Vaccinia Virus Envelope H3L Protein Binds To Cell Surface Heparan Sulfate And Is Important For Intracellular Mature Virion Morphogenesis And Virus Infection In Vitro And In Vivo.». *Journal Of Virology* 74 (7). American Society for Microbiology: 3353-65-3365. doi:10.1128/JVI.74.7.3353-3365.2000.

Linhoff, M W, J A Harton, D E Cressman, B K Martin, e J P Ting. 2001. «Two Distinct Domains Within CIITA Mediate Self-Association: Involvement Of The GTP-Binding And Leucine-Rich Repeat Domains.». *Molecular And Cellular Biology* 21 (9). American Society for Microbiology: 3001-11-3011. doi:10.1128/MCB.21.9.3001-3011.2001.

Lu, Xueqing, Nikoletta L Kallinteris, Jizhi Li, Shuzhen Wu, Yu Li, Zhong Jiang, Gilda G Hillman, Joseph V Gulfo, Robert E Humphreys, e Minzhen Xu. 2003. «Tumor Immunotherapy By Converting Tumor Cells To MHC Class II-Positive, Ii Protein-Negative Phenotype.». *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII* 52 (10): 592-8. doi:10.1007/s00262-003-0404-9.

Macen, J L, C Upton, N Nation, e G McFadden. 1993. «SERP1, A Serine Proteinase Inhibitor Encoded By Myxoma Virus, Is A Secreted Glycoprotein That Interferes With Inflammation.». *Virology* 195 (2): 348-63. doi:10.1006/viro.1993.1385.

Mackett, M, G L Smith, e B Moss. 1982. «Vaccinia Virus: A Selectable Eukaryotic Cloning And Expression Vector.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 79 (23): 7415-9.

Mackett, M, G L Smith, e B Moss. 1984. «General Method For Production And Selection Of Infectious Vaccinia Virus Recombinants Expressing Foreign Genes.». *Journal Of Virology* 49 (3). American Society for Microbiology: 857-64-864.

Magner, W J, A L Kazim, C Stewart, M A Romano, G Catalano, C Grande, N Keiser, F Santaniello, e T B Tomasi. 2000. «Activation Of MHC Class I, II, And CD40 Gene Expression By Histone Deacetylase Inhibitors.». *The Journal Of Immunology* 165 (12). American Association of Immunologists: 7017-24-7024. doi:10.4049/jimmunol.165.12.7017.

Mahanta, S K, T Scholl, F C Yang, e J L Strominger. 1997. «Transactivation By CIITA, The Type II Bare Lymphocyte Syndrome-Associated Factor, Requires Participation Of Multiple Regions Of The TATA Box Binding Protein.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 94 (12). National Academy of Sciences: 6324-9-6329.

Malnati, M S, M Marti, T LaVaute, D Jaraquemada, W Biddison, R DeMars, e E O Long. 1992. «Processing Pathways For Presentation Of Cytosolic Antigen To MHC Class II-Restricted T Cells.». *Nature* 357 (6380): 702-4. doi:10.1038/357702a0.

Mansouri, Mandana, Eric Bartee, Kristine Gouveia, Bianca T Hovey Nerenberg, John Barrett, Laurel Thomas, Gary Thomas, Grant McFadden, e Klaus Früh. 2002. «The PHD/LAP-Domain Protein M153R Of Myxomavirus Is A Ubiquitin Ligase That Induces The Rapid Internalization And Lysosomal Destruction Of CD4.». *Journal Of Virology* 77 (2). American Society for Microbiology: 1427-40-1440. doi:10.1128/JVI.77.2.1427-1440.2003.

Mantovani, R. 1999. «The Molecular Biology Of The CCAAT-Binding Factor NF-Y.». *Gene* 239 (1): 15-27.

Martin, B K, K C Chin, J C Olsen, C A Skinner, A Dey, K Ozato, e J P Ting. 1997. «Induction Of MHC Class I Expression By The MHC Class II Transactivator CIITA.». *Immunity* 6 (5): 591-600.

Martin, B K, J G Frelinger, e J P Ting. 1999. «Combination Gene Therapy With CD86 And The MHC Class II Transactivator In The Control Of Lung Tumor Growth.». *The Journal Of Immunology* 162 (11). American Association of Immunologists: 6663-70-6670.

Martinez-Pomares, L, R J Stern, e R W Moyer. 1993. «The Ps/Hr Gene (B5R Open Reading Frame Homolog) Of Rabbitpox Virus Controls Pock Color, Is A Component Of Extracellular Enveloped Virus, And Is Secreted Into The Medium.». *Journal Of Virology* 67 (9). American Society for Microbiology: 5450-62-5462.

Masternak, K, A Muhlethaler-Mottet, J Villard, M Zufferey, V Steimle, e W Reith. 2000. «CIITA Is A Transcriptional Coactivator That Is Recruited To MHC Class II Promoters By Multiple Synergistic Interactions With An Enhanceosome Complex.». *Genes & Development* 14 (9). Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1156-66-1166. doi:10.1101/gad.14.9.1156.

Matucci, Andrea, Paola Rossolillo, Miriam Baroni, Antonio G Siccardi, Alberto Beretta, e Donato Zipeto. 2008. «HLA-C Increases HIV-1 Infectivity And Is Associated With Gp120.». *Retrovirology* 5 (1). BioMed Central Ltd: 68. doi:10.1186/1742-4690-5-68.

Mayr, A, V Hochstein-Mintzel, e H Stickl. 1975. «Abstammung, Eigenschaften Und Verwendung Des Attenuierten Vaccinia-Stammes MVA». *Infection*, gennaio.

Meazza, Raffaella, Alberto Comes, Anna M Orengo, Silvano Ferrini, e Roberto S Accolla. 2003. «Tumor Rejection By Gene Transfer Of The MHC Class II Transactivator In Murine Mammary Adenocarcinoma Cells.». *European Journal Of Immunology* 33 (5). WILEY-VCH Verlag: 1183-92-1192. doi:10.1002/eji.200323712.

Meisinger-Henschel, C., M. Spath, S. Lukassen, M. Wolferstatter, H. Kachelriess, K. Baur, U. Dirmeier, et al 2010. «Introduction Of The Six Major Genomic Deletions Of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) Into The Parental Vaccinia Virus Is Not Sufficient To Reproduce An MVA-Like Phenotype In Cell Culture And In Mice». *Journal Of Virology* 84 (19): 9907-9919. doi:10.1128/JVI.00756-10.

- Mercer, A. A., A. Schmidt, e O. Weber. 2006. *Poxviruses (Birkhäuser Advances In Infectious Diseases)*.
- Meyer, H, G Sutter, e A Mayr. 1991. «Mapping Of Deletions In The Genome Of The Highly Attenuated Vaccinia Virus MVA And Their Influence On Virulence.». *The Journal Of General Virology* 72 (Pt 5) (maggio): 1031-8.
- Mocellin, Simone, Francesco M Marincola, e Howard A Young. 2005. «Interleukin-10 And The Immune Response Against Cancer: A Counterpoint.». *Journal Of Leukocyte Biology* 78 (5). Society for Leukocyte Biology: 1043-51-1051. doi:10.1189/jlb.0705358.
- Momburg, F, B Herrmann, G Moldenhauer, e P Möller. 1987. «B-Cell Lymphomas Of High-Grade Malignancy Frequently Lack HLA-DR, -DP And -DQ Antigens And Associated Invariant Chain.». *International Journal Of Cancer. Journal International Du Cancer* 40 (5): 598-603.
- Moorthy, Vasee S, Margaret Pinder, William H H Reece, Kate Watkins, Sowsan Atabani, Carolyn Hannan, Kalifa Bojang, et al 2003. «Safety And Immunogenicity Of DNA/Modified Vaccinia Virus Ankara Malaria Vaccination In African Adults.». *The Journal Of Infectious Diseases* 188 (8): 1239-44. doi:10.1086/378515.
- Moreno, C S, G W Beresford, P Louis-Pence, A C Morris, e J M Boss. 1999. «CREB Regulates MHC Class II Expression In A CIITA-Dependent Manner.». *Immunity* 10 (2): 143-51.
- Morimoto, Y, M Toyota, A Satoh, M Murai, H Mita, H Suzuki, Y Takamura, et al 2004. «Inactivation Of Class II Transactivator By DNA Methylation And Histone Deacetylation Associated With Absence Of HLA-DR Induction By Interferon-Gamma In Haematopoietic Tumour Cells.». *British Journal Of Cancer* 90 (4). Nature Publishing Group: 844-52. doi:10.1038/sj.bjc.6601602.
- Mortara, Lorenzo, Patrizia Castellani, Raffaella Meazza, Giovanna Tosi, Andrea Lerma de Barbaro, Francesco A Procopio, Alberto Comes, Luciano Zardi, Silvano Ferrini, e Roberto S Accolla. 2006. «CIITA-Induced MHC Class II Expression In Mammary Adenocarcinoma Leads To A Th1 Polarization Of The Tumor Microenvironment, Tumor Rejection, And Specific Antitumor Memory.». *Clinical Cancer Research : An Official Journal Of The American Association For Cancer Research* 12 (11 Pt 1): 3435-43. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0165.
- Mossman, K, C Upton, R M Buller, e G McFadden. 1995. «Species Specificity Of Ectromelia Virus And Vaccinia Virus Interferon-Gamma Binding Proteins.». *Virology* 208 (2): 762-9. doi:10.1006/viro.1995.1208.
- Mudhasani, Rajini, e Joseph D Fontes. 2002. «The Class II Transactivator Requires Brahma-Related Gene 1 To Activate Transcription Of Major Histocompatibility Complex Class II Genes.». *Molecular And Cellular Biology* 22 (14). American Society for Microbiology: 5019-26-5026. doi:10.1128/MCB.22.14.5019-5026.2002.
- Mudhasani, Rajini, e Joseph D Fontes. 2005. «Multiple Interactions Between BRG1 And MHC Class II Promoter Binding Proteins.». *Molecular Immunology* 42 (6): 673-82. doi:10.1016/j.molimm.2004.09.021.

Muhlethaler-Mottet, A, W Di Berardino, L A Otten, e B Mach. 1998. «Activation Of The MHC Class II Transactivator CIITA By Interferon-Gamma Requires Cooperative Interaction Between Stat1 And USF-1.». *Immunity* 8 (2): 157-66.

Muhlethaler-Mottet, A, L A Otten, V Steimle, e B Mach. 1997. «Expression Of MHC Class II Molecules In Different Cellular And Functional Compartments Is Controlled By Differential Usage Of Multiple Promoters Of The Transactivator CIITA.». *The EMBO Journal* 16 (10): 2851-60. doi:10.1093/emboj/16.10.2851.

Muhlethaler-Mottet, Annick, Michal Krawczyk, Krzysztof Masternak, Charalambos Spilianakis, Androniki Kretsovali, Joseph Papamatheakis, e Walter Reith. 2004. «The S Box Of Major Histocompatibility Complex Class II Promoters Is A Key Determinant For Recruitment Of The Transcriptional Co-Activator CIITA.». *Journal Of Biological Chemistry* 279 (39). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 40529-35-40535. doi:10.1074/jbc.M406585200.

Mullarkey, Caitlin E, Amy Boyd, Arjan van Laarhoven, Eric A Lefevre, B Veronica Carr, Massimiliano Baratelli, Eleonora Molesti, et al 2013. «Improved Adjuvanting Of Seasonal Influenza Vaccines: Preclinical Studies Of MVA-NP+M1 Coadministration With Inactivated Influenza Vaccine.». *European Journal Of Immunology* 43 (7): 1940-52. doi:10.1002/eji.201242922.

Mulryan, Kate, Matthew G Ryan, Kevin A Myers, David Shaw, Who Wang, Susan M Kingsman, Peter L Stern, e Miles W Carroll. 2002. «Attenuated Recombinant Vaccinia Virus Expressing Oncofetal Antigen (Tumor-Associated Antigen) 5T4 Induces Active Therapy Of Established Tumors.». *Molecular Cancer Therapeutics* 1 (12): 1129-37.

Mumm, John B, Jan Emmerich, Xueqing Zhang, Ivan Chan, Lingling Wu, Smita Mauze, Steven Blaisdell, et al 2011. «IL-10 Elicits Ifn γ -Dependent Tumor Immune Surveillance.». *Cancer Cell* 20 (6): 781-96. doi:10.1016/j.ccr.2011.11.003.

Murphy, P M. 2001. «Viral Exploitation And Subversion Of The Immune System Through Chemokine Mimicry.». *Nature Immunology* 2 (2): 116-22. doi:10.1038/84214.

Murphy, Shawn P, Renae Holtz, Nicole Lewandowski, Thomas B Tomasi, e Hiroshi Fuji. 2002. «DNA Alkylating Agents Alleviate Silencing Of Class II Transactivator Gene Expression In L1210 Lymphoma Cells.». *The Journal Of Immunology* 169 (6). American Association of Immunologists: 3085-93-3093. doi:10.4049/jimmunol.169.6.3085.

Mwau, Matilu, Inese Cebere, Julian Sutton, Priscilla Chikoti, Nicola Winstone, Edmund G-T Wee, Tara Beattie, et al 2004. «A Human Immunodeficiency Virus 1 (HIV-1) Clade A Vaccine In Clinical Trials: Stimulation Of HIV-Specific T-Cell Responses By DNA And Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) Vaccines In Humans.». *The Journal Of General Virology* 85 (Pt 4): 911-9.

Münz, Christian. 2012. «Antigen Processing For MHC Class II Presentation Via Autophagy». *Frontiers In Immunology* 3 (gennaio). doi:10.3389/fimmu.2012.00009.

Nash, P, A Lucas, e G McFadden. 1997. «SERP-1, A Poxvirus-Encoded Serpin, Is Expressed As A Secreted Glycoprotein That Inhibits The Inflammatory Response To Myxoma Virus Infection.». *Advances In Experimental Medicine And Biology* 425 (gennaio): 195-205.

Naves, Rodrigo, Ana Maria Lennon, Giovanna Barbieri, Lilian Reyes, Gisella Puga, Laura Salas, Virginie Deffrennes, et al 2002. «MHC Class II-Deficient Tumor Cell Lines With A Defective Expression Of The Class II Transactivator.». *International Immunology* 14 (5). Oxford University Press: 481-91-491. doi:10.1093/intimm/14.5.481.

Nickerson, K, T J Sisk, N Inohara, C S Yee, J Kennell, M C Cho, P J Yannie, G Nunez, e C H Chang. 2001. «Dendritic Cell-Specific MHC Class II Transactivator Contains A Caspase Recruitment Domain That Confers Potent Transactivation Activity.». *Journal Of Biological Chemistry* 276 (22). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 19089-93-19093. doi:10.1074/jbc.M101295200.

Okamoto, H, K Asamitsu, H Nishimura, N Kamatani, e T Okamoto. 2000. «Reciprocal Modulation Of Transcriptional Activities Between HIV-1 Tat And MHC Class II Transactivator CIITA.». *Biochemical And Biophysical Research Communications* 279 (2): 494-9. doi:10.1006/bbrc.2000.3972.

Okeke, Malachy Ifeanyi, Oivind Nilssen, e Terje Traavik. 2006. «Modified Vaccinia Virus Ankara Multiplies In Rat IEC-6 Cells And Limited Production Of Mature Virions Occurs In Other Mammalian Cell Lines.». *The Journal Of General Virology* 87 (Pt 1): 21-7. doi:10.1099/vir.0.81479-0.

Pai, Rish K, Marilyn Convery, Thomas A Hamilton, W Henry Boom, e Clifford V Harding. 2003. «Inhibition Of IFN-Gamma-Induced Class II Transactivator Expression By A 19-Kda Lipoprotein From Mycobacterium Tuberculosis: A Potential Mechanism For Immune Evasion.». *The Journal Of Immunology* 171 (1). American Association of Immunologists: 175-84-184. doi:10.4049/jimmunol.171.1.175.

Palucka, Karolina, e Jacques Banchereau. 2013. «Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines.». *Immunity* 39 (1): 38-48. doi:10.1016/j.immuni.2013.07.004.

Paludan, Casper, Dorothee Schmid, Markus L, Markus Landthaler, thaler, Martina Vockerodt, Dieter Kube, Thomas Tuschl, e Christian Münz. 2005. «Endogenous MHC Class II Processing Of A Viral Nuclear Antigen After Autophagy.». *Science (New York, N.Y.)* 307 (5709): 593-6. doi:10.1126/science.1104904.

Panicali, D, e E Paoletti. 1982. «Construction Of Poxviruses As Cloning Vectors: Insertion Of The Thymidine Kinase Gene From Herpes Simplex Virus Into The DNA Of Infectious Vaccinia Virus.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 79 (16): 4927-31.

Pier, Gerald Bryan, Jeffrey B Lyczak, e Lee M Wetzler. 2004. *Immunology, Infection, And Immunity*. Amer Society for Microbiology.

Poon, Leo L M, Y H Connie Leung, John M Nicholls, Pin-Yu Perera, Jack H Lichy, Masafumi Yamamoto, Thomas A Waldmann, J S Malik Peiris, e Liyanage P Perera. 2009. «Vaccinia Virus-Based Multivalent H5N1 Avian

Influenza Vaccines Adjuvanted With IL-15 Confer Sterile Cross-Clade Protection In Mice.». *Journal Of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (5): 3063-71. doi:10.4049/jimmunol.0803467.

Powell, Timothy J, Yanchun Peng, Tamara K Berthoud, Marie-Eve Blais, Patrick J Lillie, Adrian V S Hill, Sarah L Rowland-Jones, Andrew J McMichael, Sarah C Gilbert, e Tao Dong. 2013. «Examination Of Influenza Specific T Cell Responses After Influenza Virus Challenge In Individuals Vaccinated With MVA-NP+M1 Vaccine.». *PLOS ONE* 8 (5). Public Library of Science: e62778. doi:10.1371/journal.pone.0062778.

Qiu, G, J Goodchild, R E Humphreys, e M Xu. 1999. «Cancer Immunotherapy By Antisense Suppression Of Ii Protein In MHC-Class-II-Positive Tumor Cells.». *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII* 48 (9): 499-506.

Quezada, Sergio A, e Peggs, Karl S. 2011. «Tumor-Reactive CD4+ T Cells: Plasticity Beyond Helper And Regulatory Activities». *Immunotherapy*, agosto. Future Medicine Ltd London, UK. doi:10.2217/imt.11.83.

Ramírez, J C, M M Gherardi, D Rodríguez, e M Esteban. 2000. «Attenuated Modified Vaccinia Virus Ankara Can Be Used As An Immunizing Agent Under Conditions Of Preexisting Immunity To The Vector.». *Journal Of Virology* 74 (16): 7651-5.

Rao, J B, R S Chamberlain, V Bronte, M W Carroll, K R Irvine, B Moss, S A Rosenberg, e N P Restifo. 1996. «IL-12 Is An Effective Adjuvant To Recombinant Vaccinia Virus-Based Tumor Vaccines: Enhancement By Simultaneous B7-1 Expression.». *Journal Of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 156 (9): 3357-65.

Raval, A, T K Howcroft, J D Weissman, S Kirshner, X S Zhu, K Yokoyama, J Ting, e D S Singer. 2001. «Transcriptional Coactivator, CIITA, Is An Acetyltransferase That Bypasses A Promoter Requirement For TAF(II)250.». *Molecular Cell* 7 (1): 105-15.

Raval, Aparna, Jocelyn D Weissman, T Kevin Howcroft, e Dinah S Singer. 2003. «The GTP-Binding Domain Of Class II Transactivator Regulates Its Nuclear Export.». *The Journal Of Immunology* 170 (2). American Association of Immunologists: 922-30-930. doi:10.4049/jimmunol.170.2.922.

Rehm, Kristina E, Ramsey F Connor, Gwendolyn J B Jones, Kenneth Yimbu, e Rachel L Roper. 2010. «Vaccinia Virus A35R Inhibits MHC Class II Antigen Presentation.». *Virology* 397 (1): 176-86. doi:10.1016/j.virol.2009.11.008.

Rehm, Kristina E, e Rachel L Roper. 2011. «Deletion Of The A35 Gene From Modified Vaccinia Virus Ankara Increases Immunogenicity And Isotype Switching.». *Vaccine* 29 (17): 3276-83. doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.023.

Reith, Walter, Salomé LeibundGut-Landmann, e Jean-Marc Waldburger. 2005. «Regulation Of MHC Class II Gene Expression By The Class II Transactivator». *Nature Reviews Immunology* 5 (10): 793-806. doi:10.1038/nri1708.

Reith, Walter, e Bernard Mach. 2003. «THE BARE LYMPHOCYTE SYNDROME AND THE REGULATION OF MHC EXPRESSION». *Annual Review Of Immunology*, novembre. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA. doi:10.1146/annurev.immunol.19.1.331.

Riedel, Stefan. 2005. «Edward Jenner And The History Of Smallpox And Vaccination.». *Proceedings (Baylor University. Medical Center)* 18 (1): 21-5.

Rimsza, Lisa M, Robin A Roberts, Elias Campo, Thomas M Grogan, Silvia Bea, Itziar Salaverria, Andreas Zettl, et al 2005. «Loss Of Major Histocompatibility Class II Expression In Non-Immune-Privileged Site Diffuse Large B-Cell Lymphoma Is Highly Coordinated And Not Due To Chromosomal Deletions.». *Blood* 107 (3): 1101-7. doi:10.1182/blood-2005-04-1510.

Robinson, John H, e Alexei A Delvig. 2002. «Diversity In MHC Class II Antigen Presentation.». *Immunology* 105 (3): 252-62.

Rochlitz, Christoph, Robert Figlin, Patrick Squiban, Marc Salzberg, Miklos Pless, Richard Herrmann, Eric Tartour, et al 2003. «Phase I Immunotherapy With A Modified Vaccinia Virus (MVA) Expressing Human MUC1 As Antigen-Specific Immunotherapy In Patients With MUC1-Positive Advanced Cancer.». *The Journal Of Gene Medicine* 5 (8): 690-9. doi:10.1002/jgm.397.

Rodriguez, J F, e G L Smith. 1990. «IPTG-Dependent Vaccinia Virus: Identification Of A Virus Protein Enabling Virion Envelopment By Golgi Membrane And Egress.». *Nucleic Acids Research* 18 (18): 5347-51.

Rosales, C, V V Graham, G A Rosas, H Merchant, e R Rosales. 2000. «A Recombinant Vaccinia Virus Containing The Papilloma E2 Protein Promotes Tumor Regression By Stimulating Macrophage Antibody-Dependent Cytotoxicity.». *Cancer Immunology, Immunotherapy : CII* 49 (7): 347-60.

Said, Rabih, e Robert J Amato. 2013. «Identification Of Pre- And Post-Treatment Markers, Clinical, And Laboratory Parameters Associated With Outcome In Renal Cancer Patients Treated With MVA-5T4.». *Frontiers In Oncology* 3 (gennaio): 185. doi:10.3389/fonc.2013.00185.

Sato, Takami, Mizue Terai, Yutaka Tamura, Vitali Alexeev, Michael J Mastrangelo, e Senthamil R Selvan. 2011. «Interleukin 10 In The Tumor Microenvironment: A Target For Anticancer Immunotherapy.». *Immunologic Research* 51 (2-3). Humana Press Inc: 170-82-182. doi:10.1007/s12026-011-8262-6.

Schmid, D, e C Münz. 2005. «Immune Surveillance Of Intracellular Pathogens Via Autophagy.». *Cell Death And Differentiation* 12 Suppl 2 (novembre): 1519-27. doi:10.1038/sj.cdd.4401727.

Schmid, Dorothee, Marc Pypaert, e Christian Münz. 2007. «Antigen-Loading Compartments For Major Histocompatibility Complex Class II Molecules Continuously Receive Input From Autophagosomes.». *Immunity* 26 (1): 79-92. doi:10.1016/j.immuni.2006.10.018.

Schnappauf, Felix, Sandra B Hake, Margarita M Camacho Carvajal, Séverine Bontron, Barbara Lisowska-Groszperre, e Viktor Steimle. 2003. «N-Terminal Destruction Signals Lead To Rapid Degradation Of The Major

Histocompatibility Complex Class II Transactivator CIITA.». *European Journal Of Immunology* 33 (8). WILEY-VCH Verlag: 2337-47-2347. doi:10.1002/eji.200323490.

Schneider, J, S C Gilbert, T J Blanchard, T Hanke, K J Robson, C M Hannan, M Becker, R Sinden, G L Smith, e A V Hill. 1998. «Enhanced Immunogenicity For CD8+ T Cell Induction And Complete Protective Efficacy Of Malaria DNA Vaccination By Boosting With Modified Vaccinia Virus Ankara.». *Nature Medicine* 4 (4): 397-402.

Seet, Bruce T, J B Johnston, Craig R Brunetti, John W Barrett, Helen Everett, Cheryl Cameron, Joanna Sypula, Steven H Nazarian, Alexandra Lucas, e Grant McFadden. 2001. «Poxviruses And Immune Evasion.». *Annual Review Of Immunology* 21 (dicembre). Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA: 377-423. doi:10.1146/annurev.immunol.21.120601.141049.

Sims, T N, M Afrouzian, J Urmson, L F Zhu, e P F Halloran. 2002. «The Role Of The Class II Transactivator (CIITA) In MHC Class I And II Regulation And Graft Rejection In Kidney.». *American Journal Of Transplantation* 1 (3). Munksgaard International Publishers: 211-21-221. doi:10.1034/j.1600-6143.2001.001003211.x.

Sisk, T J, T Gourley, S Roys, e C H Chang. 2000. «MHC Class II Transactivator Inhibits IL-4 Gene Transcription By Competing With NF-AT To Bind The Coactivator CREB Binding Protein (CBP)/P300.». *The Journal Of Immunology* 165 (5). American Association of Immunologists: 2511-7-2517. doi:10.4049/jimmunol.165.5.2511.

Smith, V P, e A Alcamí. 2000. «Expression Of Secreted Cytokine And Chemokine Inhibitors By Ectromelia Virus.». *Journal Of Virology* 74 (18). American Society for Microbiology: 8460-71-8471. doi:10.1128/JVI.74.18.8460-8471.2000.

Song, Guang-Yun, Gibson, Glen, Haq, Wahajul, Huang, Eric C C, Srivasta, Tumul, Hollstein, Monica, Daftarian, Pirouz, Wang, Zhongde, Diamond, Don, e Ellenhorn, Joshua D I. 2007. «An MVA Vaccine Overcomes Tolerance To Human P53 In Mice And Humans». *Cancer Immunology, Immunotherapy* 56 (8). Springer-Verlag: 1193-1205. doi:10.1007/s00262-006-0270-3.

Song, Guang-Yun, Srivastava, Tumul, Ishizaki, Hidenobu, Lacey, Simon F, Diamond, Don J, e Ellenhorn, Joshua D I. 2011. «Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) Expressing Wild-Type Human P53 Induces Specific Antitumor CTL Expansion». *Cancer Investigation*, settembre. Informa Healthcare New York. doi:10.3109/07357907.2011.606248.

Sonnenburg, von, Frank, Pamela Perona, Ulf Darsow, Johannes Ring, Alfred von Krempelhuber, Jens Vollmar, Siegfried Roesch, Nicole Baedeker, Herwig Kollaritsch, e Paul Chaplin. 2014. «Safety And Immunogenicity Of Modified Vaccinia Ankara As A Smallpox Vaccine In People With Atopic Dermatitis.». *Vaccine* 32 (43): 5696-702. doi:10.1016/j.vaccine.2014.08.022.

Spilianakis, Charalambos, Androniki Kretsovali, Theodora Agalioti, Takis Makatounakis, Dimitris Thanos, e Joseph Papamatheakis. 2003. «CIITA Regulates Transcription Onset Viase5-Phosphorylation Of RNA Pol II.». *The EMBO Journal* 22 (19): 5125-36. doi:10.1093/emboj/cdg496.

Spriggs, M K, D E Hruby, C R Maliszewski, D J Pickup, J E Sims, R M Buller, e J VanSlyke. 1992. «Vaccinia And Cowpox Viruses Encode A Novel Secreted Interleukin-1-Binding Protein.». *Cell* 71 (1). Elsevier: 145-52-152. doi:10.1016/0092-8674(92)90273-F.

Staib, C, I Drexler, M Ohlmann, S Wintersperger, V Erfle, e G Sutter. 2000. «Transient Host Range Selection For Genetic Engineering Of Modified Vaccinia Virus Ankara.». *Biotechniques* 28 (6): 1137-42, 1144-6, 1148.

Staib, Caroline, Ingo Drexler, e Gerd Sutter. 2004. «Construction And Isolation Of Recombinant MVA.». *Methods In Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 269 (aprile). Humana Press: 77-100-99. doi:10.1385/1-59259-789-0:077.

Staib, Caroline, Sigrid Kisling, Volker Erfle, e Gerd Sutter. 2005. «Inactivation Of The Viral Interleukin 1Beta Receptor Improves CD8+ T-Cell Memory Responses Elicited Upon Immunization With Modified Vaccinia Virus Ankara.». *The Journal Of General Virology* 86 (Pt 7): 1997-2006. doi:10.1099/vir.0.80646-0.

Staib, Caroline, Marianne Löwel, Volker Erfle, e Gerd Sutter. 2003. «Improved Host Range Selection For Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara.». *Biotechniques* 34 (4): 694-6, 698, 700.

Stanley, Daphne A, Anna N Honko, Clement Asiedu, John C Trefry, Annie W Lau-Kilby, Joshua C Johnson, Lisa Hensley, et al 2014. «Chimpanzee Adenovirus Vaccine Generates Acute And Durable Protective Immunity Against Ebolavirus Challenge.». *Nature Medicine* 20 (10): 1126-9. doi:10.1038/nm.3702.

Steimle, V, L A Otten, M Zufferey, e B Mach. 1993. «Complementation Cloning Of An MHC Class II Transactivator Mutated In Hereditary MHC Class II Deficiency (Or Bare Lymphocyte Syndrome).». *Cell* 75 (1): 135-46.

Stewart, C Andrew, Hannah Metheny, Noriho Iida, Loretta Smith, Miranda Hanson, Folkert Steinhagen, Robert M Leighty, et al 2013. «Interferon-Dependent IL-10 Production By Tregs Limits Tumor Th17 Inflammation.». *The Journal Of Clinical Investigation* 123 (11). American Society for Clinical Investigation: 4859-74-4874. doi:10.1172/JCI65180.

Sutter, G, A Ramsey-Ewing, R Rosales, e B Moss. 1994. «Stable Expression Of The Vaccinia Virus K1L Gene In Rabbit Cells Complements The Host Range Defect Of A Vaccinia Virus Mutant.». *Journal Of Virology* 68 (7): 4109-16.

Sutter, G, L S Wyatt, P L Foley, J R Bennink, e B Moss. 1994. «A Recombinant Vector Derived From The Host Range-Restricted And Highly Attenuated MVA Strain Of Vaccinia Virus Stimulates Protective Immunity In Mice To Influenza Virus.». *Vaccine* 12 (11): 1032-40.

Sutter, G, e B Moss. 1992. «Nonreplicating Vaccinia Vector Efficiently Expresses Recombinant Genes.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 89 (22): 10847-51.

Sutter, Gerd, e Caroline Staib. 2003. «Vaccinia Vectors As Candidate Vaccines: The Development Of Modified Vaccinia Virus Ankara For Antigen Delivery.». *Current Drug Targets. Infectious Disorders* 3 (3): 263-71.

Swadling, Leo, Stefania Capone, Richard D Antrobus, Anthony Brown, Rachel Richardson, Evan W Newell, John Halliday, et al 2014. «A Human Vaccine Strategy Based On Chimpanzee Adenoviral And MVA Vectors That Primes, Boosts, And Sustains Functional HCV-Specific T Cell Memory.». *Science Translational Medicine* 6 (261): 261ra153. doi:10.1126/scitranslmed.3009185.

Symons, J A, A Alcamí, e G L Smith. 1995. «Vaccinia Virus Encodes A Soluble Type I Interferon Receptor Of Novel Structure And Broad Species Specificity.». *Cell* 81 (4): 551-60.

Takamura, Yukio, Hideyuki Ikeda, Takayuki Kanaseki, Minoru Toyota, Takashi Tokino, Kohzoh Imai, Kiyohiro Houkin, e Noriyuki Sato. 2004. «Regulation Of MHC Class II Expression In Glioma Cells By Class II Transactivator (CIITA).». *Glia* 45 (4). Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company: 392-405-405. doi:10.1002/glia.10343.

Tameris, Michele D, Mark Hatherill, Bernard S L, Bernard S Landry, ry, Thomas J Scriba, Margaret Ann Snowden, et al 2013. «Safety And Efficacy Of MVA85A, A New Tuberculosis Vaccine, In Infants Previously Vaccinated With BCG: A Randomised, Placebo-Controlled Phase 2B Trial.». *Lancet* 381 (9871): 1021-8. doi:10.1016/S0140-6736(13)60177-4.

Tartaglia, J, M E Perkus, J Taylor, E K Norton, J C Audonnet, W I Cox, S W Davis, J van der Hoeven, B Meignier, e M Riviere. 1992. «NYVAC: A Highly Attenuated Strain Of Vaccinia Virus.». *Virology* 188 (1): 217-32.

Taylor, G S, T A Haigh, N H Gudgeon, R J Phelps, S P Lee, N M Steven, e A B Rickinson. 2004. «Dual Stimulation Of Epstein-Barr Virus (EBV)-Specific CD4+ And CD8+-T-Cell Responses By A Chimeric Antigen Construct: Potential Therapeutic Vaccine For EBV-Positive Nasopharyngeal Carcinoma.». *Journal Of Virology* 78 (2): 768-78.

Thibodeau, Jacques, Marie-Claude Bourgeois-Daigneault, e Réjean Lapointe. 2012. «Targeting The MHC Class II Antigen Presentation Pathway In Cancer Immunotherapy». *Oncoimmunology* 1 (6): 908-916. doi:10.4161/onci.21205.

Ting, Jenny P-Y, e Beckley K Davis. 2005. «CATERPILLER: A Novel Gene Family Important In Immunity, Cell Death, And Diseases.». *Annual Review Of Immunology* 23 (marzo). Annual Reviews: 387-414. doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115616.

Ting, Jenny Pan-Yun, e John Trowsdale. 2002. «Genetic Control Of MHC Class II Expression.». *Cell* 109 Suppl (aprile): S21-33.

Tykodi, Scott S, e John A Thompson. 2008. «Development Of Modified Vaccinia Ankara-5T4 As Specific Immunotherapy For Advanced Human Cancer.». *Www.Expertopin.Com/Ebt* 8 (12). Informa UK Ltd London, UK: 1947-53. doi:10.1517/14712590802567298.

Vancová, I, C La Bonnardiere, e P Kontsek. 1998. «Vaccinia Virus Protein B18R Inhibits The Activity And Cellular Binding Of The Novel Type Interferon-Delta.». *Journal Of General Virology* 79 (Pt 7) (7). Society for General Microbiology: 1647-9-1649.

Vanderplasschen, A, e G L Smith. 1997. «A Novel Virus Binding Assay Using Confocal Microscopy: Demonstration That The Intracellular And Extracellular Vaccinia Virions Bind To Different Cellular Receptors.». *Journal Of Virology* 71 (5). American Society for Microbiology: 4032-41-4041.

Wang, Rong-Fu, Gang Zeng, Samuel F Johnston, Kuishin Voo, e Han Ying. 2002. «T Cell-Mediated Immune Responses In Melanoma: Implications For Immunotherapy.». *Critical Reviews In Oncology / Hematology* 43 (1). Elsevier: 1-11-11. doi:10.1016/S1040-8428(01)00186-X.

Wang, Yu, Minzhen Xu, Mingxin Che, Eric Von Hofe, Asad Abbas, Nikoletta L Kallinteris, Xueqing Lu, Zachary J Liss, Jeffrey D Forman, e Gilda G Hillman. 2005. «Curative Antitumor Immune Response Is Optimal With Tumor Irradiation Followed By Genetic Induction Of Major Histocompatibility Complex Class I And Class II Molecules And Suppression Of Ii Protein.». *Human Gene Therapy* 16 (2). Mary Ann Liebert, Inc. 2 Madison Avenue Larchmont, NY 10538 USA: 187-99. doi:10.1089/hum.2005.16.187.

Wang, Zhongde, Corinna La Rosa, Rebecca Maas, Heang Ly, John Brewer, Shahram Mekhoubad, Pirouz Daftarian, Jeff Longmate, William J Britt, e Don J Diamond. 2004. «Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing A Soluble Form Of Glycoprotein B Causes Durable Immunity And Neutralizing Antibodies Against Multiple Strains Of Human Cytomegalovirus.». *Journal Of Virology* 78 (8): 3965-76.

Ward, Brian M. 2005. «Visualization And Characterization Of The Intracellular Movement Of Vaccinia Virus Intracellular Mature Virions.». *Journal Of Virology* 79 (8). American Society for Microbiology: 4755-63-4763. doi:10.1128/JVI.79.8.4755-4763.2005.

Warnock, James N, Claire Daigre, e Mohamed Al-Rubeai. 2011. «Introduction To Viral Vectors.». *Methods In Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 737 (maggio). Humana Press: 1-25-25. doi:10.1007/978-1-61779-095-9_1.

Weidinger, G, M Ohlmann, B Schlereth, G Sutter, e S Niewiesk. 2001. «Vaccination With Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Protects Against Measles Virus Infection In The Mouse And Cotton Rat Model.». *Vaccine* 19 (20-22): 2764-8.

Wittek, R, E Barbosa, J A Cooper, C F Garon, H Chan, e B Moss. 1980. «Inverted Terminal Repetition In Vaccinia Virus DNA Encodes Early Mrnas.». *Nature* 285 (5759): 21-5.

Wittek, R, e B Moss. 1980. «Tandem Repeats Within The Inverted Terminal Repetition Of Vaccinia Virus DNA.». *Cell* 21 (1). Elsevier: 277-84-284. doi:10.1016/0092-8674(80)90135-X.

Wittek, Riccardo, Cooper, Jonathan A, Barbosa, Ernest, e Moss, Bernard. 1980. «Expression Of The Vaccinia Virus Genome: Analysis And Mapping Of Mrnas Encoded Within The Inverted Terminal Repetition». *Cell* 21 (2). Elsevier: 487-493. doi:10.1016/0092-8674(80)90485-7.

Wolf, Dominik, Anna M Wolf, Holger Rumpold, Heidi Fiegl, Alain G Zeimet, Elisabeth Muller-Holzner, Martina Deibl, Guenther Gastl, Eberhard Gunsilius, e Christian Marth. 2005. «The Expression Of The Regulatory T Cell-Specific Forkhead Box Transcription Factor Foxp3 Is Associated With Poor Prognosis In Ovarian Cancer.». *Clinical Cancer Research* 11 (23). American Association for Cancer Research: 8326-31-8331. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1244.

Wright, Kenneth L., e Jenny P-Y. Ting. 2006. «Epigenetic Regulation Of MHC-II And CIITA Genes». *Trends In Immunology* 27 (9): 405-412. doi:10.1016/j.it.2006.07.007.

Wu, Xiaoyan, Xiaocen Kong, Larry Luchsinger, Barbara D Smith, e Yong Xu. 2009. «Regulating The Activity Of Class II Transactivator By Posttranslational Modifications: Exploring The Possibilities.». *Molecular And Cellular Biology* 29 (21). American Society for Microbiology: 5639-44-5644. doi:10.1128/MCB.00661-09.

Wussow, Felix, Flavia Chiuppesi, Joy Martinez, John Campo, Erica Johnson, Christin Flechsig, Maegan Newell, et al 2014. «Human Cytomegalovirus Vaccine Based On The Envelope Gh/GI Pentamer Complex.». *PLOS Pathogens* 10 (11). Public Library of Science: e1004524. doi:10.1371/journal.ppat.1004524.

Wyatt, L S, M W Carroll, C P Czerny, M Merchlinsky, J R Sisler, e B Moss. 1998. «Marker Rescue Of The Host Range Restriction Defects Of Modified Vaccinia Virus Ankara.». *Virology* 251 (2): 334-42. doi:10.1006/viro.1998.9397.

Wyatt, L S, S T Shors, B R Murphy, e B Moss. 1996. «Development Of A Replication-Deficient Recombinant Vaccinia Virus Vaccine Effective Against Parainfluenza Virus 3 Infection In An Animal Model.». *Vaccine* 14 (15): 1451-8.

Wyatt, Linda S, Patricia L Earl, Leigh Anne Eller, e Bernard Moss. 2004. «Highly Attenuated Smallpox Vaccine Protects Mice With And Without Immune Deficiencies Against Pathogenic Vaccinia Virus Challenge.». *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 101 (13): 4590-5. doi:10.1073/pnas.0401165101.

Xing, Zhou, Michael Santosuosso, Sarah McCormick, Teng-Chih Yang, James Millar, Mary Hitt, Yonghong Wan, Jonathan Bramson, e H Martin Vordermeier. 2005. «Recent Advances In The Development Of Adenovirus- And Poxvirus-Vectored Tuberculosis Vaccines.». *Current Gene Therapy* 5 (5): 485-92.

Yao, Yongxue, Ping Li, Pratibha Singh, Allison T Thiele, David S Wilkes, Gourapura J Renukaradhya, Randy R Brutkiewicz, et al 2007. «Vaccinia Virus Infection Induces Dendritic Cell Maturation But Inhibits Antigen Presentation By MHC Class II.». *Cellular Immunology* 246 (2): 92-102. doi:10.1016/j.cellimm.2007.06.005.

Yazawa, T, H Kamma, M Fujiwara, M Matsui, H Horiguchi, H Satoh, M Fujimoto, K Yokoyama, e T Ogata. 1999. «Lack Of Class II Transactivator Causes Severe Deficiency Of HLA-DR Expression In Small Cell Lung Cancer.». *The Journal Of Pathology* 187 (2). John Wiley & Sons, Ltd.: 191-9-199. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199901)187:23.0.CO;2-3.

Zhang, Yuxia, Shu Li, Ming Shan, Xuwen Pan, Ke Zhuang, Lihua He, Keith Gould, e Po Tien. 2007. «Hepatitis B Virus Core Antigen Epitopes Presented By HLA-A2 Single-Chain Trimers Induce Functional Epitope-Specific CD8+ T-Cell Responses In HLA-A2.1/Kb Transgenic Mice.». *Immunology* 121 (1): 105-12. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02543.x.

Zhou, Q, S Snipas, K Orth, M Muzio, V M Dixit, e G S Salvesen. 1997. «Target Protease Specificity Of The Viral Serpin Crma. Analysis Of Five Caspases.». *Journal Of Biological Chemistry* 272 (12). American Society for Biochemistry and Molecular Biology: 7797-800-7800. doi:10.1074/jbc.272.12.7797.

Zika, Eleni, e Jenny P-Y Ting. 2005. «Epigenetic Control Of MHC-II: Interplay Between CIITA And Histone-Modifying Enzymes.». *Current Opinion In Immunology* 17 (1): 58-64. doi:10.1016/j.coi.2004.11.008.

van den Doel, Petra, Asisa Volz, Jouke M Roose, Varsha D Sewbalaksing, Gorben P Pijlman, Ingeborg van Middelkoop, Vincent Duiverman, et al 2014. «Recombinant Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing Glycoprotein E2 Of Chikungunya Virus Protects AG129 Mice Against Lethal Challenge.». *Plos Neglected Tropical Diseases* 8 (9): e3101. doi:10.1371/journal.pntd.0003101.

van den Elsen, Peter J, Tjadine M Holling, Nienke van der Stoep, e Jeremy M Boss. 2003. «DNA Methylation And Expression Of Major Histocompatibility Complex Class I And Class II Transactivator Genes In Human Developmental Tumor Cells And In T Cell Malignancies.». *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)* 109 (1): 46-52.

van der Stoep, Nienke, Paula Biesta, Edwin Quinten, e Peter J van den Elsen. 2002. «Lack Of IFN-Gamma-Mediated Induction Of The Class II Transactivator (CIITA) Through Promoter Methylation Is Predominantly Found In Developmental Tumor Cell Lines.». *International Journal Of Cancer* 97 (4). John Wiley & Sons, Inc.: 501-7-507. doi:10.1002/ijc.1623.

Ringraziamenti

Desidero ringraziare prima di tutto il prof. **Antonio Siccardi**, che mi ha accolto nel laboratorio e mi permesso di scoprire il mondo dei Poxvirus ricombinanti. Sotto la sua guida ho avuto modo di crescere, tanto in età quanto in obiettività, imparando che nulla è impossibile finché si ha la volontà di continuare.

Inoltre, ringrazio sentitamente anche **Elisa Soprana**, senza la quale buona parte di questa tesi non si sarebbe potuta scrivere. Grazie alla sua competenza ed esperienza, ho avuto modo di apprendere molto a livello sia sperimentale sia umano, affrontando al meglio ogni difficoltà.

Intendo poi ringraziare il prof. **Roberto Accolla**, la dott.ssa **Giovanna Tosi** e la dott.ssa **Greta Forlani** per la avermi pazientemente guidato nell'enorme campo della Classe-II; il prof. **Fabio Grassi** e la dott.ssa **Tanja Rezzonico Jost** per avermi assistito nell'analisi dei linfociti; il dott. **Francesco Gubinelli** e la dott.ssa **Valentina Bernasconi** per il loro contributo nella generazione di alcuni plasmidi usati in questa tesi; la dott.ssa **Elisa Nigro** per la competenza e l'assistenza nei modelli murini; il dott. **Stefano Bestetti** per l'assistenza nell'acquisizione delle immagini di microscopia confocale.

Ringrazio inoltre tutti i membri del laboratorio, passati e presenti, per il loro supporto e aiuto in caso di necessità: Maddalena Panigada, Francesca Bosè, Valentina Bianchi, Lorena Maria Ferreira, Andrea Mannucci, Marta Recagni e Vijay Yenagi.

Desidero infine ringraziare la mia famiglia per la pazienza e il sostegno, Paola per l'affetto e la vicinanza e i miei amici per il supporto morale.