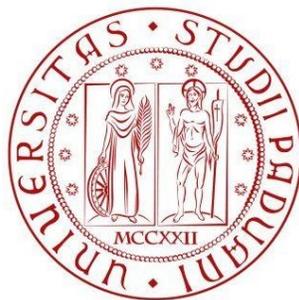


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea magistrale in Biologia Sanitaria



TESI DI LAUREA

**SVILUPPO DI APPROCCI MIRATI ALLA COMBINAZIONE DI TERAPIA  
FOTODINAMICA E ONCOVIROTERAPIA E LORO VALUTAZIONE IN  
MODELLI DI GLIOBLASTOMA IN VITRO**

Relatore: Prof.ssa Arianna Calistri  
Dipartimento di Medicina Molecolare

Correlatore: Dott. Alberto Reale  
Dipartimento di Medicina Molecolare

Laureando: Alessia Facchin

**ANNO ACCADEMICO 2023/2024**

## SOMMARIO

ABSTRACT .....	1
<b>1. INTRODUZIONE .....</b>	<b>3</b>
<i>1.1 Il glioblastoma.....</i>	<i>3</i>
<i>1.2 La viroterapia oncolitica.....</i>	<i>3</i>
<i>1.3 Meccanismo d'azione dei virus oncolitici .....</i>	<i>4</i>
<i>1.4 Limiti dei virus oncolitici .....</i>	<i>6</i>
<i>1.5 HSV-1: epidemiologia e patogenesi .....</i>	<i>7</i>
<i>1.6 HSV-1: struttura e genoma.....</i>	<i>7</i>
<i>1.7 HSV-1: replicazione virale.....</i>	<i>9</i>
<i>1.8 HSV-1 come virus oncolitico.....</i>	<i>10</i>
<i>1.9 Terapia fotodinamica .....</i>	<i>10</i>
<i>1.10 Vie di morte cellulare indotte dalla terapia fotodinamica .....</i>	<i>12</i>
<i>1.11 La proteina Killer Red .....</i>	<i>13</i>
<b>2. SCOPO .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIALI .....</b>	<b>17</b>
<i>3.1 Linee cellulari .....</i>	<i>17</i>
<i>3.2 HSV-1 ricombinanti.....</i>	<i>18</i>
<i>3.3 Plasmidi.....</i>	<i>21</i>
<i>3.4 Ceppi batterici .....</i>	<i>26</i>
<i>3.5 Oligonucleotidi.....</i>	<i>26</i>
<b>4. METODI .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 TECNICHE DI BIOLOGIA CELLULARE E DI VIROLOGIA .....</b>	<b>27</b>
<i>4.1.1 Trasfezione di plasmidi esprimenti isoforme di Killer Red in cellule HeLa-DH.....</i>	<i>27</i>
<i>4.1.2 Trasfezione e irradiazione di cellule 293T esprimenti Mem-KR e Mt-KR .....</i>	<i>27</i>
<i>4.1.3 Valutazione dell'espressione di ICP4 mediante immunofluorescenza in cellule Vero CCL81 .....</i>	<i>28</i>
<i>4.1.4 Saggio di infezione delle cellule GL261 con HSV-1 .....</i>	<i>29</i>
<i>4.1.5 Valutazione della vitalità delle cellule GL261 dopo l'infezione con HSV-1 ricombinanti .....</i>	<i>29</i>
<i>4.1.6 Irradiazione delle cellule GL261 infettate con HSV-KR .....</i>	<i>30</i>
<i>4.1.7 Valutazione dell'espressione di mIL12 mediante saggio ELISA .....</i>	<i>31</i>
<b>4.2 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE .....</b>	<b>32</b>

4.2.1 Preparazione dei batteri chemiocompetenti DH5a.....	32
4.2.2 Minipreparazione del DNA plasmidico.....	32
4.2.3 Sviluppo del plasmide contenente la cassetta di espressione mIL12-aPD1 .....	33
4.2.3.1 Sviluppo del plasmide pUC ZeoH-RFPL4b mediante In-Fusion Cloning.....	33
4.2.3.2 Sviluppo del plasmide pZeo-RFPL4b e mIL12-aPD1 mediante In-Fusion Cloning.....	36
4.2.3.3 Sviluppo del plasmide con la sequenza di poli-adenilazione (poliA) SV40 .....	37
<b>5. RISULTATI E DISCUSSIONE.....</b>	<b>39</b>
5.1 Killer Red indirizzata al mitocondrio risulta l'isoforma ottimale della proteina per l'inserimento in un HSV-1 oncolitico.....	39
5.2 HSV-KR infetta e uccide cellule di glioblastoma murino GL261 .....	42
5.3 Irradiazione delle cellule GL261 infettate con HSV-KR induce morte cellulare.....	48
5.4 L'interleuchina 12 murina è efficientemente espressa da una cassetta contenente le due subunità della chemochina separate da un linker GGGGSGGGGS .....	52
5.5 Generazione di una serie di plasmidi necessari per ingegnerizzare HSV-KR con una cassetta esprimente mIL12-aPD1, sotto il controllo del promotore RFPL4b, inserita nel locus $\gamma$ 34.5 .....	54
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>61</b>
<b>7. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>63</b>



## ABSTRACT

Nonostante i progressi ottenuti, alcuni tumori rimangono ad oggi difficili da trattare e associati ad una prognosi infausta. Tra questi rientra il glioblastoma per il quale, al momento, non esistono regimi terapeutici mirati. Questo progetto di tesi si inserisce in una ricerca più ampia che ha lo scopo di testare in vitro la combinazione di due approcci terapeutici promettenti in ambito oncologico, l'oncoviroterapia e la terapia fotodinamica, per lo sviluppo di un trattamento efficace del glioblastoma. In particolare, è stato testato in cellule di glioblastoma murino (GL261) un virus oncolitico basato su HSV-1 (oHSV-1), caratterizzato da specifiche manipolazioni geniche atte a neuroattenuarlo e ad aumentare la sua immunogenicità. Inoltre, il virus testato esprime la *Killer Red*. Quest'ultima è una proteina fotoattivabile che, in seguito ad irradiazione con una luce di opportuna lunghezza d'onda, induce la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che, accumulandosi nelle cellule, portano alla loro morte. L'effetto della *Killer Red*, nella strategia da noi sviluppata, dovrebbe combinarsi con la lisi delle cellule infettate dovuta all'azione diretta del virus. In questa tesi di Laurea abbiamo dimostrato che l'oHSV-1 esprimente *Killer Red* è in grado di replicarsi e uccidere le cellule GL261 in presenza e in assenza di fotoattivazione. Abbiamo, inoltre, posto le basi per aumentare l'efficacia del virus ricombinante e per testare la strategia sviluppata *in vivo* in un opportuno modello murino, avendo ottenuto dal Ministero della Salute l'autorizzazione a condurre questi esperimenti cruciali.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 Il glioblastoma

Il glioblastoma (GB) è una forma tumorale maligna primaria molto aggressiva che colpisce il sistema nervoso centrale degli adulti, manifestandosi comunemente nel cervello.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) classifica i gliomi, che costituiscono il 30% dei tumori cerebrali primitivi e l'80% di tutti i tumori maligni, in quattro gradi istologici differenti definiti da indifferenziazione, anaplasia e aggressività, permettendo così di delineare il grado di malignità e di selezionare la tipologia di trattamento più adeguata (Omuro A. *et al.*, 2013). Il glioblastoma appartiene al IV grado e rappresenta una delle neoplasie più aggressive e incurabili, con un tasso di incidenza annuale di circa 6 casi ogni 100.000 individui nel mondo, in cui il 70% dei casi è diagnosticato a un'età compresa tra 45 e 70 anni, sebbene il tumore possa insorgere a tutte le età.

Il trattamento standard per il GB prevede la resezione chirurgica seguita da radioterapia e chemioterapia a base di temozolomide, tuttavia, sebbene le metastasi da GB siano molto rare, l'infiltrazione estesa del tumore nel cervello rende spesso impraticabile la completa asportazione tumorale e le recidive sono molto frequenti. Anche le comuni pratiche di radioterapia e di chemioterapia si rivelano spesso inefficaci a causa dell'elevata eterogeneità e della bassa immunogenicità del tumore. Difatti, gli attuali approcci terapeutici disponibili, sebbene siano applicati nella quotidiana pratica clinica, dimostrano diversi limiti come gravi effetti collaterali, mancanza di controllo sulla metastasi e sulla recidiva del tumore, facile sviluppo di resistenza ai farmaci, oltre ad avere un impatto molto limitato sul miglioramento della prognosi dei pazienti affetti da GB, al punto che il tasso medio di sopravvivenza dei pazienti varia da 14,6 a 20,5 mesi e meno del 5% dei pazienti sopravvive a 5 anni dalla diagnosi, rendendo il GB uno dei tumori più mortali (Omuro A. *et al.*, 2013).

Il microambiente immunosoppresso indotto dal tumore, la presenza di cellule staminali del glioma (GSC), la bassa immunità infiltrante e l'esistenza della barriera emato-encefalica costituiscono ad oggi alcuni dei limiti che ostacolano il successo terapeutico delle pratiche cliniche disponibili, motivo per cui diventa sempre più necessario sviluppare nuovi approcci terapeutici che possano ovviare questi ostacoli in modo da ridurre la crescita tumorale entro delle tempistiche compatibili con la sopravvivenza dei pazienti affetti.

In particolare, la terapia oncolitica combinata con la terapia fotodinamica desta molto interesse come nuova e potente strategia terapeutica per il trattamento del cancro, incluso il glioblastoma (Hamad A. *et al.*, 2023).

## 1.2 La viroterapia oncolitica

La viroterapia oncolitica è un tipo di immunoterapia antitumorale che comprende tutte le tecniche e gli approcci terapeutici che utilizzano virus presenti in natura o geneticamente modificati con il potenziale di replicarsi selettivamente nelle cellule tumorali e di diffondere all'interno del tumore senza danneggiare il tessuto sano.

Due sono i diversi approcci che la viroterapia può utilizzare come strategia promettente per il trattamento del tumore: l'uso di virus non replicanti che fungono da vettori per il trasporto di materiale genico d'interesse e l'impiego di virus replicativi oncolitici. Questi ultimi, in base alla natura delle cellule cancerose, alle caratteristiche del virus oncolitico (OV) stesso, alla risposta immunitaria dell'ospite e all'interazione del virus con il microambiente tumorale, sono capaci di

uccidere le cellule tumorali mediante lisi diretta o modulazione dell'immunità antitumorale. L'equilibrio tra la distruzione diretta del tumore, mediata dalla replicazione virale, e la risposta immunitaria antitumorale, definita dal virus, determina l'efficacia dei virus oncolitici (Rius-Rocabert S. *et al.*, 2020).

Una sempre maggiore conoscenza della biologia dei virus, dell'immunologia dei tumori e dell'ingegneria genetica offrono la possibilità di rivoluzionare i trattamenti standard contro il cancro affiancando la viroterapia oncolitica alle quotidiane pratiche cliniche come l'intervento chirurgico, la radioterapia e la chemioterapia.

Tuttavia, diversi sono gli ostacoli da superare per il successo clinico dei virus oncolitici come la modalità di somministrazione da adottare, la presenza della barriera emato-encefalica, il microambiente immunosoppressore del GB e gli anticorpi neutralizzanti sistemici che limitano l'accesso dei virus terapeutici al microambiente tumorale (Fatima M. *et al.*, 2023).

### ***1.3 Meccanismo d'azione dei virus oncolitici***

I virus oncolitici sono agenti antitumorali con un elevato profilo di biosicurezza che si replicano selettivamente nelle cellule tumorali inducendone la lisi e la morte immunogenica. A differenza di quelli esistenti in natura come il virus della malattia di Newcastle (NDV) e il reovirus, che sono utilizzati nella ricerca clinica nella loro forma nativa, i virus geneticamente modificati sono ingegnerizzati in modo da rimuovere i geni virulenti responsabili della patogenicità e/o introdurre geni terapeutici con l'obiettivo rispettivo di aumentare la biosicurezza del virus e di espandere le capacità immuno-infiammatorie dell'infezione virale (Ma R. *et al.*, 2023).

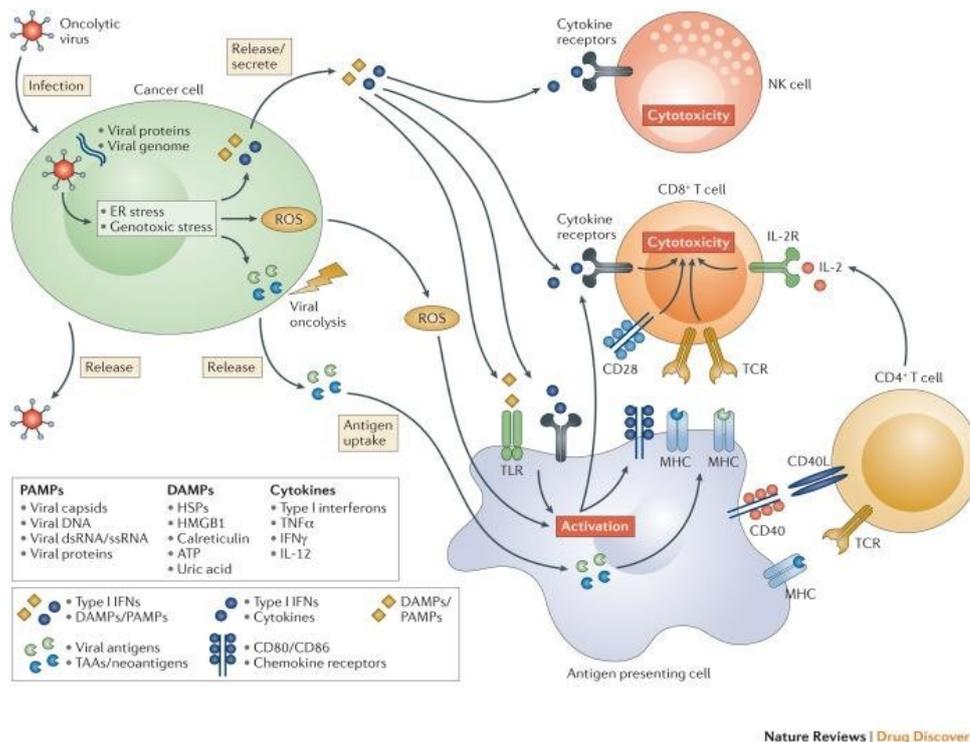
I virus oncolitici agiscono colpendo selettivamente le cellule tumorali mediante l'interazione specifica tra proteine di superficie virali e recettori cellulari espressi sulla superficie delle cellule tumorali, favorendo così il riconoscimento e l'ingresso in cellule target. Riuscendo a penetrare e infettare le cellule tumorali, i virus oncolitici attivano il ciclo replicativo provocando, nella maggior parte dei casi, la lisi cellulare diretta o l'apoptosi delle cellule bersaglio, contribuendo in larga scala alla riduzione dello sviluppo tumorale. Tuttavia, il potenziale litico degli OV dipende anche dalla natura del virus, dalla dose impiegata, dal tropismo virale naturale e indotto e dalla suscettibilità della cellula tumorale alle diverse forme di morte cellulare (apoptosi, necrosi, autofagia). Inoltre, grazie alla produzione e al rilascio di progenie virale, è possibile ottenere un effetto amplificato perché i nuovi virioni sintetizzati possono riconoscere e infettare le cellule bersaglio adiacenti fino a quando la risposta immunitaria non attenua la replicazione virale stessa o le cellule ospiti sensibili non si esauriscono (Scanlan H. *et al.*, 2022).

Infatti, un ulteriore meccanismo d'azione utilizzato dai virus per mediare una risposta antitumorale consiste nella stimolazione della risposta immunitaria antitumorale sistemica, mediata dal rilascio di antigeni nel microambiente tumorale, motivo per cui la maggior parte dei virus oncolitici viene armata con chemochine o inibitori del checkpoint immunitario (Kaufman H. F. *et al.*, 2015).

Dopo l'infezione con un virus oncolitico, come riportato nella rappresentazione schematica in Figura 1, le cellule tumorali attivano una risposta antivirale che si traduce nella sovraregolazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e nella produzione di citochine antivirali, in particolare gli interferoni di tipo I (IFN), i quali sono rilasciati dalle cellule tumorali infettate e promuovono la maturazione delle cellule presentanti l'antigene (APC) come le cellule dendritiche (DC), le cellule T CD8+ e le cellule natural killer (NK).

In seguito alla oncolisi, determinata dal virus oncolitico, le cellule tumorali rilasciano progenie virale, pattern molecolari associati ai patogeni (PAMP), pattern molecolari associati al danno

(DAMP) e antigeni associati al tumore (TAA), inclusi i neo-antigeni. Tra i PAMPs, di natura virale, sono compresi il dna, le proteine e il capsido, mentre tra i DAMPs, costituiti da proteine della cellula ospite, si includono ATP, acido urico, calreticulina, proteina da shock termico (HSP) etc. PAMPs e DAMPs stimolano ulteriormente il sistema immunitario attivando le cellule presentanti l'antigene mediante l'interazione con recettori Toll-like (TLR), promuovendo così l'attivazione dei linfociti T CD4+ e la risposta immunitaria contro cellule tumorali infettate dal virus. Allo stesso tempo i TAA e i neo-antigeni favoriscono la stimolazione di risposte immunitarie de novo contro cellule tumorali non infettate (Kaufman H. F. *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Attivazione della risposta antitumorale locale e sistemica dei virus oncolitici (da Kaufman H. F. *et al.*, 2015).

L'attivazione della risposta immunitaria innata e adattativa contro le cellule tumorali, indotta dall'azione dei virus oncolitici, è un evento utile per favorire la conversione del microambiente tumorale freddo e immunosoppressivo, dotato di poche cellule immunitarie, in un ambiente caldo che possa mediare la regressione tumorale anche in siti distanti che non sono raggiunti o esposti direttamente al virus, tuttavia può costituire un'arma a doppio taglio perché l'eventuale neutralizzazione delle risposte antivirali potrebbe limitare l'infezione e la replicazione virale delle cellule tumorali.

Al contrario, le cellule sane non sono suscettibili all'infezione virale perché, a differenza delle cellule tumorali, possiedono una varietà di vie di segnalazione intrinseche e attive che riconoscono e contrastano la replicazione e la propagazione delle particelle virali. Infatti, nelle cellule sane il riconoscimento virale, mediato da pattern recognition receptor (PRR) localizzati nel citosol o sulla superficie cellulare, favorisce l'attivazione trascrizionale di geni coinvolti nella risposta antivirale di una cellula infetta portando successivamente alla secrezione di citochine antivirali come gli IFN di tipo I e all'espressione di geni antivirali stimolati dall'interferone (Telikani Z. *et al.*, 2022).

Gli IFN di tipo I, riducendo inoltre la proliferazione cellulare e attivando la proteina pro-apoptotica p53, svolgono anche un ruolo antitumorale e, poiché molteplici tipi di cancro bloccano questa via di segnale attraverso una ridotta espressione del recettore per IFN di tipo I o un'alterata segnalazione a valle, i virus oncolitici riescono a colpire con maggior specificità le cellule tumorali perché il virus non viene eliminato dalle risposte indotte dall'IFN (Kaufman H. F. *et al.*, 2015).

#### ***1.4 Limiti dei virus oncolitici***

Nonostante il potenziale antitumorale dei virus oncolitici, esistono diversi limiti che separano gli OV dal loro utilizzo come nuova classe di farmaci, come la modalità di somministrazione, la capacità di penetrazione e di diffusione, l'efficacia e l'immunità antivirale dell'ospite (Ma R. *et al.*, 2023).

Tra le vie di somministrazione più utilizzate negli studi clinici prevale la somministrazione intratumorale (IT) che consiste nell'iniezione locale del OV nel sito tumorale, in modo da colpire direttamente la posizione del tumore, superando così la diluizione sistemica delle particelle virali nel volume sanguigno. Tuttavia, i limiti della modalità includono una bassa applicazione per i tumori metastatici, posizionati distanti dal punto d'iniezione, e problemi di sicurezza in caso di somministrazioni multiple.

La somministrazione sistemica invece, come l'iniezione endovenosa (IV), consente ai virus oncolitici di raggiungere più efficacemente i siti metastatici, indipendentemente dalla loro posizione. Tuttavia, gli OV possono essere rimossi e neutralizzati velocemente da anticorpi antivirali preesistenti e indotti da altre risposte immunitarie che sono presenti nel circolo sanguigno, limitando così il numero di virus oncolitici che raggiunge il sito tumorale. Inoltre, un altro problema risiede nella capacità dei virus oncolitici di oltrepassare la barriera emato-encefalica (BBB) in caso di tumori inaccessibili come quelli cerebrali, poiché la BBB blocca il rilascio di virus e di agenti terapeutici nel sito bersaglio, rendendo, in questo caso, la somministrazione IT la scelta migliore (Fatima M. *et al.*, 2023).

La penetrazione e la diffusione dei OV costituiscono una grande sfida da superare affinché i virus possano attraversare le barriere fisiche che li separano dal contesto tumorale: la matrice extracellulare (ECM), interagendo con le cellule tumorali e con le componenti del microambiente tumorale (TME), limita l'ingresso dei OV e contribuisce al mantenimento del tumore, quindi è necessario modulare e degradare selettivamente la ECM così da consentire l'ingresso e la diffusione dei virus oncolitici nell'ambiente tumorale (Mohiuddin E. *et al.*, 2021).

Affinché i virus oncolitici possano mediare un effetto terapeutico significativo devono persistere nel sito tumorale in modo da indurre un'oncolisi sufficiente a generare un'immunità antitumorale adattativa di lunga durata, motivo per cui spesso si ricorre a somministrazioni multiple. Infatti, le singole somministrazioni di OV offrono il vantaggio di ridurre i costi e la complessità, a favore di una maggiore biosicurezza, tuttavia, sono correlate a una bassa o moderata efficacia poiché il virus può essere neutralizzato ed eliminato dalla circolazione oppure può esprimere il transgene terapeutico per un periodo temporale limitato. Per aumentare quindi la persistenza virale è possibile utilizzare una dose iniziale più elevata, ricorrere a iniezioni multiple o veicolare i OV all'interno di cellule carrier in modo da limitarne l'eliminazione (Ma R. *et al.*, 2023).

Qualunque siano il metodo e la dose di somministrazione scelti, è importante che la sicurezza abbia la precedenza in ambito clinico, in modo da garantire cure appropriate con un rischio minimo per il paziente.

### **1.5 HSV-1: epidemiologia e patogenesi**

Il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) appartiene alla famiglia *Herpesviridae* (comunemente noti come herpesvirus) e alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* (alfaherpesvirus), la quale comprende anche HSV-2 e il virus della varicella zoster (VZV). Si tratta di virus ubiquitari, dotati di un genoma di grandi dimensioni con un pattern di espressione genica complesso e capaci di indurre patologie benigne in soggetti immunocompetenti (Zhu S. *et al.*, 2021).

Gli alfaherpesvirus hanno un tropismo variabile, un ciclo di replicazione veloce che culmina nella lisi della cellula infetta e inducono latenza nei gangli sensoriali del sistema nervoso.

HSV-1 è distribuito in tutta la popolazione mondiale, sia nei paesi industrializzati che in via di sviluppo, e, dal momento che l'infezione raramente risulta fatale e il virus va in latenza nell'ospite, oltre la metà della popolazione mondiale è portatrice di HSV-1 ed è capace di trasmetterlo a individui sensibili, durante gli eventi di infezione produttiva, mediante uno stretto contatto. Infatti, l'infezione primaria, che colpisce prevalentemente la mucosa orale con le caratteristiche lesioni labiali, avviene comunemente in giovane età, entro i 5 anni di vita, ma le percentuali di sierconversione aumentano anche durante l'adolescenza (Knipe D. M. *et al.*, 2013).

Durante l'infezione primaria le particelle virali entrano attraverso le ramificazioni delle fibre nervose sensoriali e sono veicolate, con un trasporto retrogrado mediato da dineina, lungo gli assoni dei neuroni gangliari fino a raggiungere i nuclei, localizzati nel corpo cellulare dei neuroni, dove permangono in uno stato di latenza. Durante la latenza il genoma virale è assemblato in una struttura cromatinica extracromosomica repressa quindi, sebbene i neuroni siano infetti da decine e centinaia di episomi virali, non avviene la replicazione virale e sono bloccati l'espressione dei geni litici con la sintesi di proteine virali, l'apoptosi, l'immunità innata e la risposta immunitaria adattativa. In questo modo il virus sfugge alla sorveglianza immunologica e, non potendo essere riconosciuto ed eliminato, permane tutta la vita nei neuroni (Zhu S. *et al.*, 2021). L'unico marcatore virale prodotto in modo abbondante nei gangli durante l'infezione primaria è il trascritto di latenza LAT che sopprime la replicazione litica del virus. Si tratta di un trascritto non codificante coinvolto nella regolazione della cascata dell'espressione genica con la finalità di proteggere i neuroni dalla morte, infatti, promuove la formazione di eterocromatina sui promotori bloccando la trascrizione genica (Knipe D. M. *et al.*, 2013).

In seguito a stimoli di stress, HSV-1 può riattivarsi, avviare un ciclo di replicazione litica e produrre nuove particelle virioniche che migrano, con un trasporto anterogrado mediato da chinesine, lungo l'assone per reinfettare le cellule epiteliali localizzate nei siti dell'infezione primaria.

L'infezione da HSV-1 colpisce prevalentemente la regione orale (herpes labialis) ed è caratterizzata dalla comparsa di vescicole labiali; tuttavia, può causare lesioni anche in altri distretti come la mucosa genitale (herpes genitalis), i siti di abrasione (herpes gladiatorum) e le palpebre. Occasionalmente, inoltre, HSV-1 può colpire la congiuntiva e i tessuti corneali dell'occhio provocando cheratocongiuntiviti che possono anche compromettere la capacità visiva dell'individuo affetto. Raramente l'infezione erpetica può entrare nel sistema nervoso centrale ed essere responsabile di patologie molto gravi come meningite ed encefalite, caratterizzate da un tasso di mortalità molto elevato (Denes C. E. *et al.*, 2020).

### **1.6 HSV-1: struttura e genoma**

HSV-1 è un virus di forma sferica, con un diametro medio di 180 nm che si estende fino a 225

nm includendo le proteine esposte in superficie, costituito da 4 elementi strutturali: un core che racchiude il genoma virale, un nucleocapside icosaedrico che circonda il nucleo, uno strato proteico chiamato tegumento che circonda il capsid e un involucro esterno definito envelope.

Il nucleo contiene il genoma virale costituito da Dna a doppio filamento ed è circondato dal capsid, ovvero una struttura proteica composta da 162 capsomeri, in particolare 150 esoni e 12 pentoni, disposti con una simmetria icosaedrica. Il guscio esterno del capsid presenta quattro proteine virali: la proteina principale VP5 (*UL19*), la proteina accessoria VP26 (*UL35*) e le proteine VP23 (*UL18*) e VP19C (*UL38*). VP5 è presente in cinque copie in ogni pentamero e in sei copie in ogni esamero, VP26 è localizzata in sei copie sopra le subunità VP5 su ciascun esone, mentre VP23 e VP19C collegano capsomeri adiacenti. Il capsid contiene anche le proteine UL6 e VP24 implicate nell'impacchettamento del genoma virale e nelle modifiche strutturali durante la replicazione del virus (Knipe D. M. *et al.*, 2013).

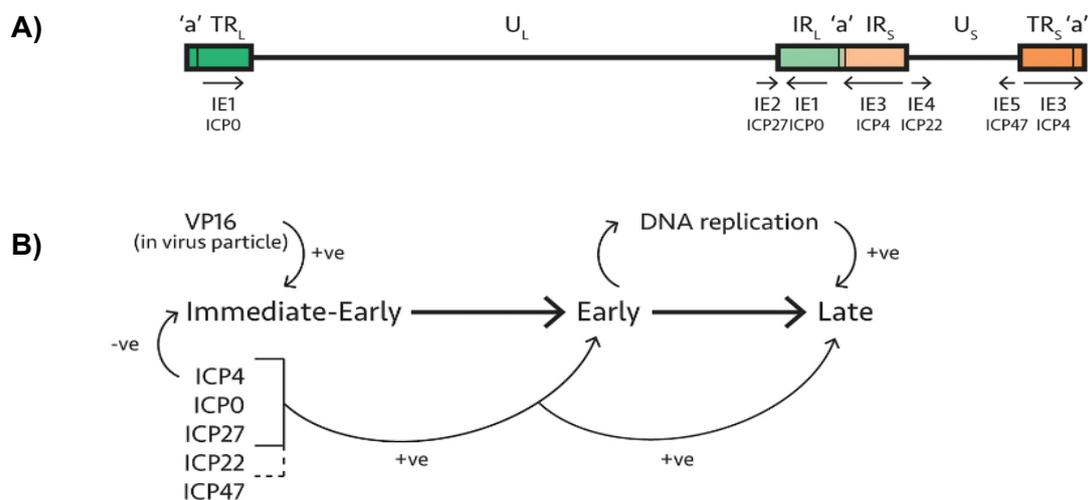
Il tegumento è lo spazio fisico localizzato tra la superficie inferiore dell'envelope e il nucleocapsid ed è composto da circa 26 proteine, coinvolte nel rilascio del genoma virale dal capsid e nel suo ingresso nel nucleo (*UL36*), nella stimolazione della trascrizione dei geni immediate early (VP16 codificata dal gene *UL48*), nella destabilizzazione degli mRNA cellulari con blocco della sintesi proteica dell'ospite (VHS codificata dal gene *UL41*), nel legame e nella traslocazione dell'RNA dalle cellule infettate a quelle adiacenti non infettate (VP22 codificata dal gene *UL49*).

Esternamente è localizzato l'envelope, ovvero un doppio strato lipidico in cui sono incorporate 13 glicoproteine virali differenti (gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL, gM) e alcune proteine di membrana non glicosilate (*UL20*, *US9*) (Denes C. E. *et al.*, 2020).

HSV-1 ha un genoma a Dna a doppio filamento lineare, di circa 152 kbp, suddiviso in sequenza lunga (UL) e sequenza corta (US), come è riportato in Figura 2, e ciascuna componente è fiancheggiata da regioni invertite ripetute (IR) che permettono eventi di ricombinazione: UL è racchiusa tra ab e b'a', mentre US tra a'c' e ca. Le sequenze L e S sono invertite l'una rispetto all'altra quindi HSV può generare quattro isoforme lineari, le quali sono presenti in concentrazioni equimolari in una popolazione di cellule infettate con HSV wild-type (Knipe D. M. *et al.*, 2013).

Il genoma virale comprende almeno 80 ORF che codificano una varietà di proteine, diversi RNA non codificanti e microRNA. Le proteine si distinguono in quelle espresse da geni essenziali, fondamentali per la replicazione virale, e da geni accessori, le quali non sono necessarie alla replicazione in vitro ma diventano importanti in vivo per conferire capacità di adattamento.

Una caratteristica peculiare del virus è l'espressione genica temporale che consiste nella trascrizione ordinata e a cascata dei geni, i quali sono suddivisi in geni alfa o precoci immediati (IE), geni beta o precoci (E) e geni gamma o tardivi (L). La proteina VP16, presente nel tegumento, è un transattivatore essenziale dei geni IE che permette all'RNA polimerasi cellulare di riconoscere i promotori dei geni IE in modo da consentire l'espressione delle proteine precocissime entro 2-4 h dall'infezione. La sintesi di ICP22, ICP4, ICP0, ICP27 e ICP47 induce l'espressione dei geni precoci, che compaiono a circa 5-8 h dall'infezione e che codificano gli elementi necessari alla replicazione virale, consentendo poi la sintesi dei geni tardivi, la cui trascrizione avviene solo una volta iniziata la replicazione stessa (Knipe D. M. *et al.*, 2013). Una rappresentazione schematica dell'espressione genica temporale è riportata in Figura 2.



**Figura 2.** A) Rappresentazione schematica delle sequenze geniche nel Dna di HSV-1; B) rappresentazione schematica dell'espressione genica temporale di HSV-1 (da Denes C. E. et al., 2020).

### 1.7 HSV-1: replicazione virale

Il ciclo replicativo di HSV-1 è suddiviso in ingresso nella cellula ospite, espressione dei geni virali, replicazione virale, assemblaggio del virione e fuoriuscita delle particelle virioniche.

L'ingresso del virus nelle cellule target è mediato da numerose glicoproteine virali, esposte sulla superficie del virus, che intervengono in maniera sequenziale nel processo di internalizzazione del virus. Inizialmente la glicoproteina gC interagisce con proteoglicani, in particolare l'eparan solfato, espressi sulla superficie cellulare, generando un legame primario, che è stabilizzato dall'interazione di recettori cellulari con gD. Si attivano meccanismi di fusione tra l'envelope e la membrana plasmatica, mediati da gB-gH-gL, per garantire il rilascio del nucleocapside nel citoplasma. La proteina del tegumento VP1/2, localizzata nel nucleocapside, interagisce con la dineina motrice della rete microtubulare del citoscheletro per trasportare il capsido al nucleo dove, grazie a eventi di destabilizzazione e di aumento della pressione nel nucleocapside, avviene il rilascio del DNA (Knipe D. M. et al., 2013).

Una volta entrato nel nucleo, il Dna virale in assenza di sintesi proteica circolarizza velocemente e forma una struttura episomale covalentemente chiusa: la prima replicazione è a teta, ma è seguita da una replicazione a circolo rotante così da produrre numerose copie di genoma, le quali esistono sotto forma di concatameri, per essere poi scisse da endonucleasi virali in singole unità genomiche lineari.

Dopo l'espressione dei geni tardivi, le proteine del capsido prodotte nel citoplasma si localizzano nel nucleo della cellula infetta, dove avviene l'assemblaggio del capsido e l'impacchettamento del genoma virale.

Il modello più accreditato per l'uscita delle nuove particelle virioniche dalla cellula ospite prevede che i nucleocapsidi interagiscono con la membrana nucleare interna destabilizzando la laminina. In questo modo si favorisce la gemmazione del virus che acquisisce un envelope primario, il quale poi si fonde con la membrana esterna, liberando il nucleocapside nel citoplasma. Qui il nucleocapside completa l'acquisizione delle proteine del tegumento e acquisisce l'envelope finale da strutture vescicolari come l'apparato di Golgi, per essere poi rilasciato all'esterno mediante meccanismi di esocitosi (Knipe D. M. et al., 2013).

### **1.8 HSV-1 come virus oncolitico**

HSV-1 si presta come il virus oncolitico d'elezione e più promettente nelle applicazioni cliniche grazie al suo potenziale litico, all'ampio spettro di cellule infettate, alle dimensioni elevate del genoma che non si integra nel genoma dell'ospite e che consentono l'inserimento di geni target e alla numerosa presenza di geni non essenziali al ciclo replicativo, i quali possono essere sostituiti con cassette di espressione transgenica d'interesse (Scanlan H. *et al.*, 2022). La profonda conoscenza della struttura genomica di HSV-1 permette infatti di ingegnerizzare geneticamente il virus eliminando o inserendo geni terapeutici, elementi citotossici o geni reporter (Tang G. *et al.*, 2023).

Si tratta inoltre di un virus capace di infettare il topo, che è l'organismo modello d'eccellenza per gli studi scientifici perché condivide una distinta somiglianza genetica con gli esseri umani, oltre ad essere economico e a replicarsi velocemente producendo prole abbondante.

Altri aspetti rilevanti che rendono l'HSV-1 un virus oncolitico interessante sono la capacità di attivare risposte immunitarie cellulari a lungo termine e la disponibilità di farmaci per il controllo della proliferazione virale.

Nel 2015 la Food and Drug Administration (FDA), e successivamente l'Europa e la Svizzera, ha approvato il primo virus oncolitico, chiamato T-VEC (talimogene laherparepvec, IMLYGIC), per il trattamento intralesionale del melanoma avanzato, chirurgicamente non resecabile. Il T-VEC è un oHSV-1 che presenta le delezioni di entrambe le copie del gene  $\gamma 34.5$  e del gene *Us12* ( $\alpha 47$ ) e, nei locus deleti di  $\gamma 34.5$ , è armato con il gene codificante il fattore stimolante le colonie di granulociti-monociti umani (*GM-CSF*), ovvero una citochina che stimola le cellule dendritiche (Vitiello A. *et al.*, 2024). La duplice delezione dei geni  $\gamma 34.5$ , codificanti il fattore di neurovirulenza ICP34.5, è responsabile della replicazione selettiva nelle cellule tumorali e dell'attenuazione della patogenicità, infatti, dal momento che la funzione del gene  $\gamma 34.5$  è impedire l'arresto della sintesi proteica innescato dall'infezione virale, la sua inattivazione rende il virus incapace di replicarsi nelle cellule sane. Così facendo, il virus HSV-1 deleto del gene  $\gamma 34.5$  può replicare solo nelle cellule tumorali poiché presentano difetti nella risposta di arresto della sintesi proteica (Aldrak N. *et al.*, 2021).

Il gene *US12*, codificante la proteina ICP47, ha la funzione di down-regolare l'espressione del complesso MHC-I coinvolto nella presentazione antigenica, quindi, la sua delezione aumenta la risposta antitumorale. Inoltre, facilita l'espressione precoce del gene *US11*, il quale blocca la fosforilazione intracellulare della chinasi RNA-dipendente (PKR), ovvero un enzima che inibisce la sintesi proteica in risposta al signaling dell'IFN, con il conseguente incremento della replicazione virale nelle cellule infettate (Aldrak N. *et al.*, 2021).

L'inserzione di due copie della citochina infiammatoria GM-CSF favorisce il reclutamento dei monociti dal sangue periferico nei siti di infiammazione e promuove l'attivazione di monociti e di cellule dendritiche per la presentazione antigenica, stimolando così il microambiente immunosoppressivo tumorale e generando un effetto anti-tumorale sistemico (Kohlhapp F. J. *et al.*, 2016).

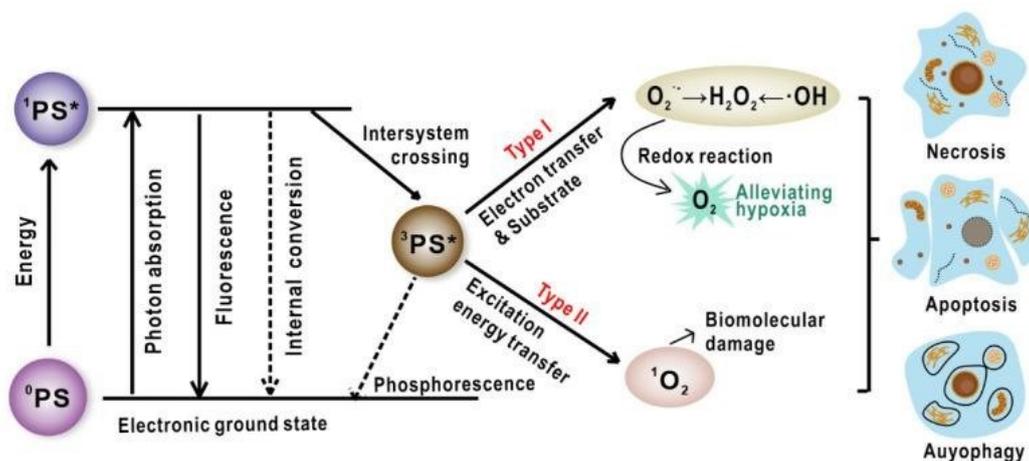
### **1.9 Terapia fotodinamica**

La terapia fotodinamica (PDT) è un intervento minimamente invasivo, approvato per il trattamento clinico di diversi tipi di cancro e di malattie non neoplastiche, in cui molecole foto-attivabili, dette fotosensibilizzatori (PS), vengono accumulate nelle cellule target e, una volta attivate dalla luce, generano specie reattive dell'ossigeno (ROS) responsabili della citotossicità, con conseguente morte delle cellule attraverso apoptosi, necrosi, autofagia, degenerazione e

risposta infiammatoria dell'area trattata (Kwiatkowski S. *et al.*, 2018).

Gli elementi fondamentali della terapia fotodinamica, che determinano la distruzione irreversibile delle componenti cellulari colpite, sono luce, fotosensibilizzatori e ossigeno. Nel processo di fotoattivazione, mediato da luce laser, lo stato di tripletto eccitato dei PS interagisce con le biomolecole presenti nell'ambiente circostante trasferendo elettroni così da provocare la generazione di radicali liberi come lo ione superossido e il radicale idrossile che distruggono le biomolecole (reazione di tipo I), oppure trasferire direttamente l'energia verso l'ossigeno molecolare, con conseguente produzione di ossigeno singoletto (reazione di tipo II), come riportato nella rappresentazione schematica in Figura 3. (Kwiatkowski S. *et al.*, 2018).

I contributi dei meccanismi di tipo I e di tipo II sono influenzati da una varietà di fattori, tra cui il valore del pH, la costante dielettrica tissutale, le proprietà dei PS e la concentrazione di ossigeno. La presenza di ossigeno è un fattore chiave nella terapia fotodinamica quindi, a causa del microambiente ipossico del tumore, i PS chimici, che comunemente necessitano di grandi quantità di ossigeno per generare ROS con una reazione di tipo II, sono geneticamente modificati in modo da agire in scarsa presenza di O<sub>2</sub> e da targhettare compartimenti cellulari mirati.



**Figura 3.** Rappresentazione grafica dei meccanismi di tipo I e di tipo II nella terapia fotodinamica e dei tipi di morte cellulare indotti dalla strategia terapeutica (da J. Liu *et al.*, 2021).

Poiché la PDT può consumare velocemente grandi quantità di ossigeno tissutale e al contempo chiudere i vasi sanguigni che forniscono ossigeno, il trattamento può indurre un'ipossia più grave nell'ambiente tumorale, tuttavia, diversi studi suggeriscono che la PDT di tipo I funziona bene anche in condizioni di scarso ossigeno, come gli ambienti tumorali (Liu J. *et al.*, 2021).

Un aspetto rilevante per una somministrazione non invasiva della PDT è il fatto che la penetrazione della luce nel tessuto dipende fortemente dalla lunghezza d'onda e diversi studi supportano la capacità della luce del vicino infrarosso (808-820 nm) di penetrare attraverso il cranio fino a 3 cm nel tessuto cerebrale.

La terapia fotodinamica agisce mediante tre distinti meccanismi tumoricidi: (i) generazione di stress e calore ossidativo che può uccidere direttamente le cellule tumorali; (ii) distruzione del sistema vascolare associato al cancro, che porta al collasso del tumore poiché viene meno il supporto di sostanze nutritive e di ossigeno alle cellule tumorali; (iii) attivazione della risposta infiammatoria acuta e induzione della risposta immunitaria di difesa dell'ospite contro le cellule tumorali (Donohoe C. *et al.*, 2019).

### ***1.10 Vie di morte cellulare indotte dalla terapia fotodinamica***

Quando la produzione di ROS, generata dalla PDT, supera la capacità delle cellule di contrastare lo stress ossidativo e di riparare i danni indotti, si innescano eventi di morte cellulare a causa dell'alterazione delle strutture e della perdita delle loro funzioni.

Necrosi, apoptosi e autofagia costituiscono, ad oggi, le forme di morte cellulare più conosciute e studiate nel contesto della terapia fotodinamica, sebbene la loro identificazione nell'ambiente tumorale risulti essere piuttosto complessa a causa della sovrapposizione degli eventi.

Infatti, concentrazioni di fotosensibilizzatori e stimoli luminosi differenti inducono danni e morti cellulari diverse: generalmente sulla superficie tumorale e in prossimità dei vasi sanguigni, dove l'esposizione ai fotoni è maggiore, c'è una produzione superiore di ROS che porta a necrosi, mentre nelle regioni più profonde e distanti dai vasi sanguigni, dove lo stress ossidativo è ridotto, le cellule tumorali tendono a morire per apoptosi. Danni moderati e inferiori, determinati da una scarsa produzione di ROS, inducono autofagia, la quale può eventualmente innescare altri meccanismi di morte cellulare (Donohoe C. *et al.*, 2019).

La necrosi è un tipo di morte cellulare non programmata, determinata da un trauma cellulare o da uno stress acuto, in cui si hanno la perdita di permeabilità e di integrità della membrana plasmatica, con riversamento all'esterno di tutto il contenuto intracellulare. È considerata un processo passivo perché non richiede energia e sintesi proteica, infatti, si manifesta in caso di crisi bioenergetica, quando la perdita di funzionalità dei mitocondri interrompe la produzione di ATP (D'Arcy M. S. *et al.*, 2019). Seguono poi degli eventi a cascata, come la perdita dell'omeostasi volumetrica, stabilita dall'incapacità delle pompe ioniche di membrana di mantenere i gradienti elettrochimici di Na/K, il rigonfiamento cellulare e degli organelli e l'aumento del Ca citosolico, che diffonde dalla membrana plasmatica e dal reticolo endoplasmatico danneggiati. L'attivazione delle fosfolipasi Ca-dipendenti contribuisce a distruggere i fosfolipidi e a disorganizzare le membrane, tra cui quelle lisosomiali, innescando un circolo di danni che culmina nella rottura e nella morte cellulare, portando a una forte infiammazione (Donohoe C. *et al.*, 2019).

Nonostante la necrosi da PDT sia associata a elevate concentrazioni di PS e/o ad alte dosi di luce, anche l'impiego di PS che hanno tropismo specifico per la membrana plasmatica media la morte cellulare per perdita dell'integrità cellulare.

L'apoptosi è una morte cellulare programmata utilizzata per l'eliminazione di cellule non più necessarie o danneggiate, attraverso l'attivazione di una sequenza di eventi coordinati e programmati, messi in atto da una serie di proteine altamente conservate. Mantiene intatte l'integrità di membrana e la compartimentalizzazione, senza rilasciare all'esterno il materiale intracellulare, infatti, è un processo silente dal momento che non innesca la risposta infiammatoria. Si tratta inoltre di un evento attivo, che necessita di ATP, il quale si sviluppa attraverso diverse alterazioni cellulari come il raggrinzimento citoplasmatico, il rigonfiamento mitocondriale, a cui seguono il laddering, che consiste nella degradazione della creatina, la picnosi e la carioressi e la formazione di vescicole che si distaccano dal corpo cellulare principale generando i corpi apoptotici (D'Arcy M. S. *et al.*, 2019). L'esposizione superficiale della fosfatidilserina funge da segnale "eat me" per il legame dei macrofagi che fagocitano e degradano i corpi apoptotici.

L'autofagia è un processo di auto-degradazione di materiali di notevoli dimensioni altamente conservato nel quale porzioni di citoplasma e organelli sono sequestrati in una vescicola a doppia membrana, detta autofagosoma, e trasportati a un organello degradativo, detto lisosoma, per la degradazione e l'eventuale riciclaggio delle macromolecole risultanti (D'Arcy M. S. *et al.*, 2019). Dopo l'attivazione dell'autofagia, la morte cellulare può verificarsi come risultato dell'azione dell'autofagia stessa o attivando altri eventi di morte cellulare programmata, come l'apoptosi.

Tuttavia, diversi studi nell'ambito della PDT hanno evidenziato che il blocco genetico dell'autofagia si traduce spesso nell'aumento della fototossicità indotta dai ROS, a suggerire che l'autofagia è prevalentemente utilizzata come meccanismo di sopravvivenza piuttosto che di morte cellulare (Donohoe C. *et al.*, 2019).

### **1.11 La proteina Killer Red**

La proteina *Killer Red* (KR) è stata originariamente ingegnerizzata dalla cromoproteina non fluorescente anm2CP di un antomedusa mediante le sostituzioni di singoli amminoacidi Thr145Asp e Cys161Gly.

*Killer Red* è una proteina di 240 amminoacidi, con una struttura 3D simile ad altre proteine fluorescenti, come GFP, dotata di una struttura a beta-barile a undici filamenti che circonda un'alfa elica contenente il cromoforo, fonte della fluorescenza e della fototossicità della proteina. Il cromoforo è formato dai residui 67Q (glutammina), 68Y (tirosina) e 69G (glicina) dando origine alla sequenza QTG e può assorbire la luce verde con lunghezza d'onda di 540-580 nm ed emettere una luce rossa più lunga di 610 nm, facilitando la produzione di ROS attraverso lo scambio di ossigeno e di ioni con l'ambiente circostante per indurre fototossicità.

Le interessanti proprietà della proteina dipendono strettamente da una differenza strutturale unica tra le proteine fluorescenti, che consiste nella presenza di un canale aperto che collega il cromoforo all'ambiente esterno alla proteina; infatti, la fototossicità di *Killer Red* supera anche di 1000 volte quella delle altre proteine fluorescenti (Liu J. *et al.*, 2021).

Ad oggi, la fotoreazione di tipo I indotta da *Killer Red* è ampiamente approvata, suggerendo che questa proteina fototossica potrebbe essere adattabile al microambiente ipossico nei tessuti tumorali per diversi tipi di terapie combinate, tra cui la viroterapia fotodinamica mirata.

L'efficacia di *Killer Red* applicata alla terapia fotodinamica può aumentare significativamente mediante tecniche di ingegneria genetica mirate a indirizzarne l'espressione in specifici compartimenti cellulari o tipi di cellule. Così facendo, è possibile raggiungere una regolazione spaziale e temporale della produzione di stress ossidativo. Per questo motivo si sintetizzano isoforme diverse di *Killer Red* rivolte a target diversi come la membrana plasmatica, il mitocondrio e il reticolo endoplasmatico.

- ***Killer Red* indirizzata alla membrana (Mem-KR):** la membrana plasmatica svolge un ruolo determinante nel mantenimento dell'omeostasi cellulare, dell'integrità cellulare e del trasporto dei nutrienti. Poiché i ROS possono indurre perossidazione lipidica causando cambiamenti conformazionali alla membrana lipidica e necrosi programmata, la PDT risulta essere una potente strategia per interrompere l'integrità di cellule target. Questa forma di *Killer Red* è già stata testata con successo anche in combinazione con un oHSV-1 diverso da quello generato in questa tesi di Laurea (Shimizu K. *et al.*, 2023).
- ***Killer Red* indirizzata al mitocondrio (Mt-KR):** i mitocondri costituiscono l'organello essenziale nel metabolismo energetico della cellula, nella formazione di ROS e nel controllo della morte cellulare programmata perciò danni ossidativi nella matrice, indotti dai ROS, ne inducono la disfunzione e la rottura. Inserendo nella sequenza codificante la proteina fluorescente KR un motivo di localizzazione mitocondriale (MTS), è possibile indurre la morte cellulare della cellula target mediante apoptosi o autofagia cellulare. L'apoptosi cellulare caspasi-dipendente avviene perché lo stress ossidativo generato dai ROS aumenta la permeabilità della membrana mitocondriale e il rilascio del citocromo C, capace di attivare la via delle caspasi che porta all'apoptosi cellulare. Mt-KR inoltre può indurre anche morte cellulare caspasi-indipendente tramite la depolarizzazione della

membrana mitocondriale, l'aumento dei ROS e la disfunzione mitocondriale che ne deriva a seguito della foto-irradiazione. Infine, la fototossicità indotta da Mt-KR può avviare l'autofagia mitocondriale con conseguente morte cellulare. Questa forma di *Killer Red* è già stata testata con successo in vitro, ma mai in combinazione con virus oncolitici (Xin L. *et al.*, 2019).

- ***Killer Red* indirizzata al reticolo endoplasmatico (ER-KR)**: il reticolo endoplasmatico, localizzato in posizione perinucleare, è il comparto subcellulare deputato alla sintesi proteica e un accumulo di ROS in questo può causare un disturbo nell'omeostasi del Ca<sup>2+</sup> con conseguente blocco della sintesi e del rilascio di proteine. Di conseguenza un gran numero di proteine mal ripiegate si accumula nella cavità del reticolo endoplasmatico, aumentandone lo stress che può portare alla morte cellulare. Questa forma di *Killer Red* è stata immaginata e sviluppata dal gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il tirocinio di Laurea.

## 2. SCOPO

Questo progetto di tesi focalizza l'attenzione sulla combinazione dell'attività oncolitica del virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) con l'attività della proteina *Killer Red*, contro le cellule tumorali di glioblastoma. HSV-1, per le elevate dimensioni del genoma e la profonda conoscenza della sua biologia, si presta bene allo sviluppo di agenti oncolitici armati. A riprova, l'unico virus oncolitico ad oggi utilizzato in clinica è basato su HSV-1 (oHSV-1). Stiamo parlando di T-VEC, un virus oncolitico autorizzato per il trattamento del melanoma non resecabile già nel 2016 (Reale A. *et al.*, 2021). Il gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il mio tirocinio di Laurea ha pensato di far esprimere ad un oHSV-1 con lo stesso backbone genetico di T-VEC, e ulteriormente neuroattenuato, la proteina *Killer Red*.

Innanzitutto, sono state testate tre diverse forme della proteina *Killer Red*, indirizzate rispettivamente alla membrana (Mem-KR), al mitocondrio (Mit-KR) e al reticolo endoplasmatico (ER-KR). Mentre le prime due isoforme sono già state utilizzate in letteratura, e Mem-KR anche in combinazione con un oHSV-1 (K. Shimizu *et al.*, 2023), la forma indirizzata al reticolo endoplasmatico è stata ideata dal gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il tirocinio. Le tre isoforme di *Killer Red* erano già state inserite in un plasmide per l'espressione in cellule eucariotiche quindi, per prima cosa, ho analizzato la localizzazione intracellulare di ER-KR utilizzando cellule della cervice uterina umana HeLa-DH che, oltre a essere di origine tumorale, ben si prestano a questo tipo di analisi. I dati ottenuti, tuttavia, non hanno indicato una chiara localizzazione al reticolo endoplasmatico della proteina over-espressa, quindi, abbiamo deciso di procedere con le due isoforme già note della proteina. In questo caso, cellule embrionali umane 293T sono state trasfettate con i costrutti esprimenti Mem-KR e Mit-KR e, al picco dell'espressione, le cellule sono state irradiate, mediante luce laser, in modo da osservare gli effetti sulla vitalità cellulare. Non essendo state riscontrate differenze significative tra le due isoforme di *Killer Red*, si è deciso di procedere con Mt-KR. Infatti, da un lato questa isoforma non è mai stata testata in combinazione con un oHSV-1, inoltre, considerando che i mitocondri giocano un ruolo essenziale nella produzione di specie reattive dell'ossigeno, è ipotizzabile che questa isoforma in vivo possa risultare più efficace rispetto a Mem-KR, anche se gli esperimenti da noi svolti in vitro non supportano questa ipotesi.

In laboratorio è stato quindi sviluppato un oHSV-1 esprimente Mt-KR con l'obiettivo di combinare l'effetto di *Killer Red* (terapia fotodinamica) alla lisi delle cellule bersaglio, mediata dalla replicazione virale.

Nel dettaglio, per generare un oHSV-1 con le stesse caratteristiche di T-VEC, sono state rimosse le due sequenze codificanti il fattore di neurovirulenza ICP34.5, insieme al gene *Us12*, esprimente una proteina coinvolta nella down-regolazione della presentazione antigenica. Inoltre, per aumentare ulteriormente la neuroattenuazione del virus ricombinante sono state inserite a valle di un trascritto virale, codificante una proteina essenziale per la replicazione di HSV-1 (ICP8), le sequenze target di un miRNA over-espresso nei neuroni maturi (mir124), generando il virus ricombinante denominato HSV-1-mir124. Esperimenti preliminari hanno infatti dimostrato che HSV-1-mir124 è effettivamente più neuroattenuato rispetto ad un virus privo delle sequenze target per il miRNA in questione. Inoltre, era stato dimostrato che un HSV-1-mir124 esprimente la proteina reporter mCherry (HSV-mCherry) era in grado di uccidere le cellule di glioblastoma umano e murino con un'efficienza paragonabile a quella del virus parentale. In questa tesi di Laurea, abbiamo innanzitutto dimostrato che un oHSV-1, in cui Mt-KR sostituisce mCherry (HSV-KR), mantiene la capacità di uccidere le cellule di glioblastoma murino GL261. Inoltre, utilizzando lo stesso virus ricombinante, è stato dimostrato che in seguito a fotoattivazione con

luce laser alla lunghezza d'onda di 561.2 nm, le cellule GL261 infettate ed esprimenti la proteina *Killer Red* vengono rapidamente uccise.

Sulla base di questi risultati incoraggianti e con lo scopo di migliorare ulteriormente l'efficacia del virus ricombinante in vivo, abbiamo deciso di armare maggiormente HSV-KR inserendo una cassetta di espressione per il gene codificante l'interleuchina 12 murina (mIL12). In natura, l'IL12 è prodotta dalle cellule dendritiche e induce selettivamente i linfociti T citotossici, incrementando così le risposte immunitarie antitumorali. IL12 è un eterodimero composto da due subunità, unite da un ponte disolfuro, motivo per cui la sua espressione, attraverso vettori di espressione, non è semplice. Avendo a disposizione in laboratorio un oHSV-1 caratterizzato dalla presenza di una cassetta per l'espressione delle subunità B e A dell'mIL12, unite tra loro attraverso il linker GGGGSGGGGS, abbiamo utilizzato questo virus per infettare le cellule di rene di scimmia Vero e valutare la presenza nel surnatante della citochina. Una volta dimostrato che mIL12 è ben espressa, abbiamo iniziato il procedimento per inserire questa sequenza codificante in HSV-KR nel locus virale delete del gene  $\gamma$ 34.5. Inoltre, abbiamo deciso di arricchire la cassetta con la sequenza codificante l'anticorpo anti-PD1 (aPD1), ovvero un anticorpo a singola catena che agisce a livello del checkpoint immunitario PD1, bloccando l'interazione tra PD1 e il ligando PDL1, per ripristinare la risposta immunitaria dei linfociti T contro le cellule tumorali. La cassetta di espressione mIL12-aPD1 risulta costituita dal promotore RFPL4b, dalla sequenza codificante la subunità B della mIL12, dal linker GGGGSGGGGS, dalla sequenza codificante la subunità A di mIL12, dal peptide di auto-proteolisi T2A e dalla sequenza codificante l'anticorpo aPD1.

Una volta ottenuto questo virus ricombinante verrà testato in vivo in un modello murino di glioblastoma basato su cellule GL261 in una serie di esperimenti per i quali abbiamo già ottenuto l'autorizzazione dal Ministero della Salute.

### 3. MATERIALI

#### 3.1 Linee cellulari

Le linee cellulari impiegate in questo progetto di tesi sono:

**Vero CCL81** (ATCC® CCL-81TM) è una linea cellulare continua, isolata da cellule epiteliali renali di un esemplare adulto di scimmia verde africana, *Cercopithecus aethiops*. Si tratta di cellule ampiamente utilizzate negli studi di virologia perché sono carenti nell'espressione dell'interferone, quindi si prestano a saggi d'infezione, saggi di immunofluorescenza, titolazioni e amplificazioni. Sono cellule che crescono in adesione, con morfologia simil-fibroblastica e sono mantenute in terreno di coltura DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle Medium*; GIBCO), integrato con siero bovino fetale (FBS) 10% v/v e Penicillina/Streptomycin (P/S) 1% v/v. L'incubazione è eseguita in incubatore umidificato a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> e circa 2 volte a settimana, in base alla confluenza raggiunta, sono passate con rapporto 1:10.

**GL261** (DSMZ: ACC-802) è una linea cellulare di glioblastoma murino, indotta in topi C57BL/6 mediante l'iniezione intracranica di 3-metilcolantrene e mantenuta attraverso trapianti continui. Sono cellule dotate di mutazioni in TP53 e KRAS.

Si tratta di cellule con morfologia simil-fibroblastica e crescono in adesione in terreno di coltura DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle Medium*; GIBCO), integrato con FBS 10% v/v e P/S 1% v/v. L'incubazione è eseguita in incubatore umidificato a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub> e circa 2 volte a settimana, in base alla confluenza raggiunta, sono passate con rapporto 1:10.

**HeLa-DH**, gentilmente fornita dal Prof. Fabio Mammano, Dipartimento di Fisica e Astronomia G. Galilei, Università degli Studi di Padova, è una linea cellulare tumorale immortalizzata e altamente stabilizzata, isolata da un cancro alla cervice uterina, la quale è ampiamente utilizzata per studi basati su trasfezione di costrutti over-espressanti proteine di interesse. Sono cellule che crescono in adesione e sono mantenute in terreno di coltura DMEM F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*; GIBCO), integrato con FBS 10% v/v e P/S 1% v/v in incubatore umidificato a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>.

Il terreno DMEM F12 viene utilizzato per la crescita di alcune linee cellulari al posto del DMEM, infatti, oltre a contenere alte concentrazioni di glucosio, amminoacidi e vitamine, è addizionato di componenti aggiuntive tra cui zinco, putrescina, ipoxantina e timidina.

**HEK-293T** (ATCC® CRL-3216TM), comunemente nota come 293T, è una linea cellulare immortalizzata, derivante da cellule renali embrionali umane, il cui utilizzo si presta ampiamente nella ricerca grazie alla sua versatilità e alla sua naturale propensione alla trasfezione. Le cellule HEK-293T derivano dalle cellule parentali HEK-293 a cui è stato incorporato nel genoma un mutante dell'antigene T di SV40 sensibile alla temperatura. L'espressione di tale antigene permette la replicazione di vettori virali che hanno il sito di replicazione SV40 o di plasmidi dotati dell'origine di replicazione SV40.

Si tratta di cellule che crescono in adesione nel terreno di coltura DMEM, integrato con FBS 10% v/v e P/S 1% v/v, in incubatore umidificato a 37°C con il 5% di CO<sub>2</sub>.

Diverse sono le motivazioni che rendono le 293T le cellule di elezione per la trasfezione: alta

efficienza di trasfezione dovuta alla capacità di esprimere alcuni geni virali che facilitano l'ingresso del DNA nelle cellule bersaglio, favorendo un elevato tasso di assorbimento del DNA esogeno; robusta crescita; adattabilità, attribuibile alla tendenza di queste cellule a crescere sia in adesione che in sospensione, a seconda delle esigenze; versatilità, poiché sono in grado di produrre proteine complesse; natura umana della linea cellulare, poiché fornisce un contesto biologico più predittivo e rilevante di cosa può accadere in vivo (E. Tan et al., 2021).

### 3.2 HSV-1 ricombinanti

Di seguito sono riportati i virus herpes simplex di tipo 1 ricombinanti utilizzati in questa tesi di Laurea.

**oHSV-1- $\Delta\gamma$ 34.5- $\Delta$ Us12-hCMV-EGFP** (abbreviato in HSV-EGFP) è un HSV-1 ricombinante, ceppo 17+, che possiede lo stesso back-bone genetico del T-VEC, caratterizzato dalla delezione di entrambe le copie del gene  $\gamma$ 34.5, codificante il fattore di neurovirulenza ICP34.5, e del gene *Us12*, codificante ICP47, ovvero una proteina virale in grado di down modulare la presentazione degli antigeni da parte della cellula infettata. Nella regione intergenica *UL55-UL56* presenta, inoltre, una cassetta per l'espressione del gene reporter *EGFP*, codificante la Enhanced Green Fluorescent Protein, la quale emette una fluorescenza verde se esposta alla luce nell'intervallo blu-ultravioletto. Questo gene è posto sotto il controllo trascrizionale del promotore precocissimo del citomegalovirus umano (hCMV).

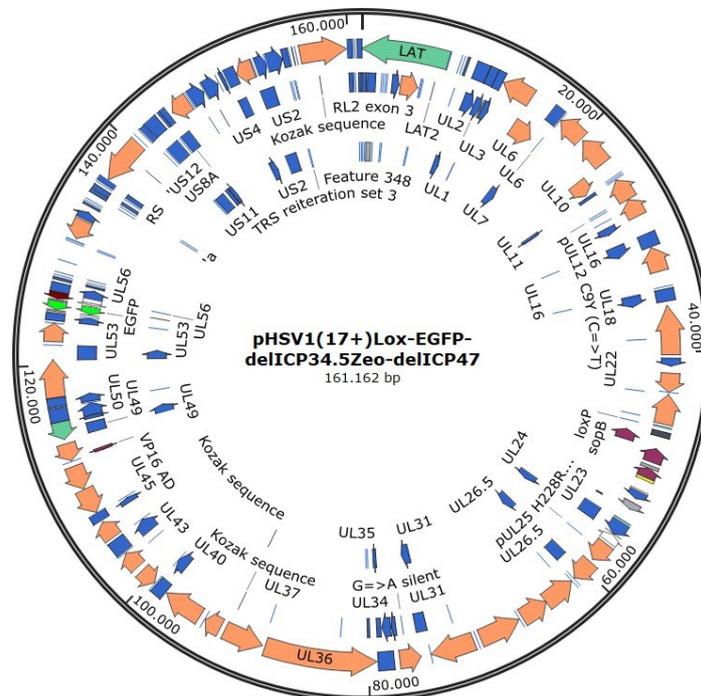


Figura 4. Mappa di oHSV-1- $\Delta\gamma$ 34.5- $\Delta$ Us12-hCMV-EGFP

**oHSV-1- $\Delta\gamma$ 34.5- $\Delta$ Us12-mir124-hCMV-Mt-KR** (abbreviato in HSV-KR) possiede le stesse caratteristiche del virus precedentemente descritto, infatti, è privo della sequenza genica codificante il principale fattore virale associato alla neurovirulenza (ICP34.5), rendendo il virus

incapace di replicarsi nelle cellule sane, compresi i neuroni, e manca del gene *Us12*, responsabile della presentazione antigenica delle cellule infettate. Come ulteriore livello di neuro-attenuazione, questo virus presenta le regioni target di un miRNA, abbondantemente sovra-espresso nei neuroni maturi, fuse al trascritto codificante una proteina essenziale per la replicazione di HSV-1. Si tratta delle sequenze bersaglio di mir124, localizzate a valle del gene *UL29*, il quale codifica ICP8, ovvero una proteina che svolge un ruolo chiave nell'espressione genica virale e nella sintesi del DNA virale. Infatti, è responsabile di svolgere e legare il DNA a singolo filamento per consentire l'ingresso del macchinario che replica il genoma virale. Infine, nella regione intergenica *UL55-UL56* è dotato di una cassetta genica per l'espressione della proteina Mt-KR, posta sotto il controllo trascrizionale di hCMV.

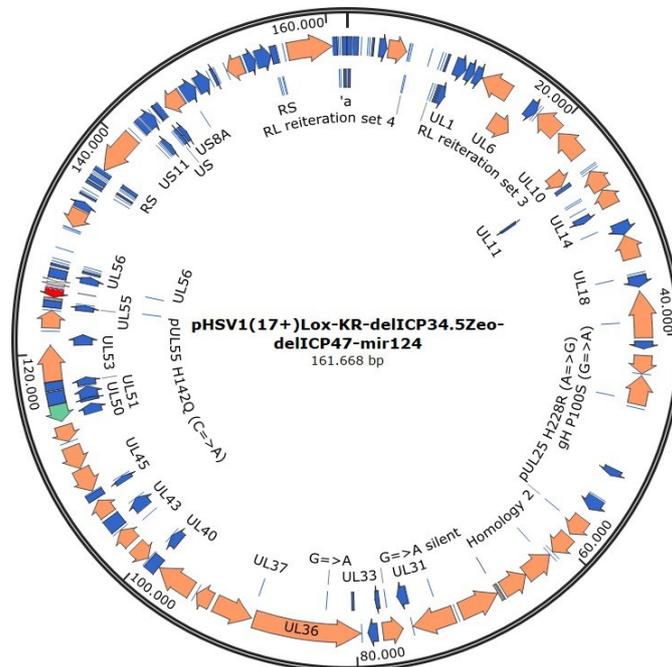


Figura 5. Mappa di oHSV-1- $\Delta\gamma34.5$ - $\Delta Us12$ -mir124-hCMV-KR

**oHSV-1- $\Delta\gamma34.5$ - $\Delta Us12$ -mir124-hCMV-mIL12-sPD1** (abbreviato in HSV-mIL12-sPD1) è un virus HSV-1 ricombinante, caratterizzato dalla doppia delezione del gene  $\gamma34.5$  e del gene *Us12*. A valle del gene codificante la proteina ICP8 presenta le sequenze target del mir124 e nella regione intergenica *UL55-UL56* possiede la cassetta di espressione dell'interleuchina 12 murina (mIL12), la quale è costituita dalle sequenze codificanti la subunità B e la subunità A, separate dal linker GGGGSGGGGS, e della versione solubile della proteina 1 di morte cellulare programmata (sPD1). La cassetta contenente i geni terapeutici, appena descritti, è posta sotto al controllo trascrizionale del promotore hCMV e, a valle, possiede la sequenza di poli-adenilazione dell'ormone di crescita bovino BGH poliA che è funzionale alla terminazione della trascrizione.

Tutti i vettori virali citati e descritti sopra sono stati generati nel laboratorio dove ho svolto il tirocinio di Laurea prima del mio arrivo, utilizzando una tecnica di mutagenesi basata su cromosomi artificiali batterici (BAC). Il BAC è un vettore di clonaggio, basato sul plasmide F isolato da *E. coli*, che permette di clonare frammenti di DNA lunghi fino a 300 kbp. Nella presente

tesi di Laurea è stata utilizzata una serie di BAC nei quali sono stati clonati interi genomi di HSV-1, ceppo 17+, contenenti diverse mutazioni geniche come la delezione di entrambi i geni  $\gamma34.5$  e del gene *Us12*. In uno dei due loci di  $\gamma34.5$  deleto, è stato inserito il gene per la resistenza alla zeocina, il quale è utile per integrare nel vettore, mediante ricombinazione, i transgeni dotati di code di omologia per la zeocina. Il BAC contiene poi una cassetta di espressione per il gene *cat*, responsabile della resistenza al cloramfenicolo, poiché codifica l'enzima cloramfenicolo acetiltrasferasi (CAT) che è deputato a legare covalentemente al gruppo idrossilico del cloramfenicolo uno o due gruppi acetili, derivanti dall'acetil-S-Coenzima A, impedendo così che il cloramfenicolo si leghi al ribosoma. Tale antibiotico, infatti, agisce sui batteri bloccando il meccanismo di traduzione degli mRNA, inibendo di conseguenza la sintesi proteica. Inoltre, il gene della Cre ricombinasi è inserito all'interno della stessa cassetta di espressione genica, la quale è fiancheggiata da due siti LoxP che ne consentono la rimozione spontanea una volta inserita in cellule eucariotiche.

Tra le componenti principali del BAC si riconoscono anche il sito di origine *oriS* e di replicazione *repE*, i quali garantiscono la stabilità del plasmide mantenendo un ridotto numero di copie, e i geni *parA* e *parE*, responsabili della ripartizione di BAC nelle cellule figlie.

Questo vettore di clonaggio viene elettroporato nel ceppo di *E. coli* GS1783 il cui cromosoma codifica i geni coinvolti nella ricombinazione Red, meglio spiegata più sotto, localizzati sotto il controllo del repressore temperatura-sensibile *c1857* che si inattiva a 42°C, e il gene codificante l'endonucleasi I-SceI, posta sotto il controllo di un promotore arabinosio-inducibile. I primi si attivano durante l'incubazione a 42°C e favoriscono la prima ricombinazione Red in cui il costrutto di trasferimento, affiancato da una regione di omologia di circa 50 bp, è introdotto all'interno del BAC in sostituzione della sequenza originaria, mediante la tecnica della Red recombination. L'endonucleasi I-SceI, invece, può esprimersi aggiungendo arabinosio al terreno di coltura e presenta un sito di restrizione di 18 bp che, non essendo frequente nelle sequenze batteriche, rende l'enzima I-SceI meno soggetto a restrizioni aspecifiche (Yoshikawa T. *et al.*, 2023).

Il sistema di ricombinazione Red, derivante dall'espressione "recombination defective", è stato originariamente scoperto in mutanti del batteriofago  $\lambda$  ed è costituito da due proteine differenti che formano un complesso che accoppia i due passaggi protagonisti della reazione (Caldwell B. J. *et al.*, 2019).

La proteina Red $\alpha$ , codificata dal gene *red $\alpha$*  o *exo*, è un'esonucleasi 5'-3' che lega l'estremità del DNA a doppio filamento e che digerisce progressivamente il filamento con l'estremità 5'; la proteina Red $\beta$ , codificata dal gene *red $\beta$* , lega l'estremità 3' del DNA a singolo filamento, risultante dalla digestione di Red $\alpha$ , e prende contatto con un filamento di DNA complementare per promuovere l'annealing e favorire la ricombinazione. Omologhi delle proteine Red sono stati trovati prevalentemente all'interno di genomi fagici e di genomi batterici, ma sono stati individuati anche in alcuni tipi di elementi genetici mobili e in virus oncogeni con Dna a doppio filamento come l'Herpes simplex virus 1 (HSV-1), l'herpesvirus associato al sarcoma di Kaposi (KSHV) e il virus di Epstein-Barr. In particolare, nel caso di *E. coli*, la funzione di esonucleasi è svolta dalla proteina RecE, mentre la proteina di annealing è RecT (Caldwell B. J. *et al.*, 2019).

La Red recombination ha dimostrato di essere un metodo di ricombinazione molto potente perché ha un'elevata efficienza, infatti, può promuovere la ricombinazione anche tra regioni di omologia brevi, con un'estensione di 30-50 bp, e perché non necessita di siti di restrizione unici, consentendo così anche la mutagenesi di grandi costrutti di DNA, come i cromosomi artificiali batterici. Queste caratteristiche, insieme a una spiccata fedeltà del processo di ricombinazione, l'ha resa una strategia molto utile in diverse applicazioni genomiche ad alto rendimento (Caldwell

B. J. *et al.*, 2019). Per ricostituire il virus a partire dal rispettivo BAC, le cellule 293T vengono trasfettate con la tecnica della Lipofectamina e, quando l'effetto citopatico coinvolge circa il 90% delle cellule, il sovranatante viene raccolto per infettare le cellule Vero e per titolare lo stock virale mediante un saggio di formazione di placche, come descritto dal nostro gruppo di ricerca (Vitiello A. *et al.*, 2024).

### 3.3 Plasmidi

In questo progetto di tesi sono stati utilizzati i plasmidi elencati di seguito.

Il plasmide **pcDNA3.1+** è un vettore commerciale di DNA a doppio filamento, di 5.4 kb, che deriva dal pcDNA3 e che è progettato per un'espressione costitutiva di alto livello in una varietà di linee cellulari di mammiferi. Il plasmide contiene i diversi elementi elencati:

- il promotore hCMV il quale, essendo un promotore virale costitutivo, presenta un'elevata attività trascrizionale in un'ampia gamma di cellule, dal momento che si trova sempre in uno stato attivo;
- il sito di clonazione multipla (MCS) che contiene molteplici siti di restrizione, per consentire l'inserimento di frammenti di DNA esogeni nel plasmide e la clonazione genica;
- l'origine di replicazione "ori", necessaria al plasmide per replicarsi autonomamente e in alto numero di copie all'interno delle cellule ospiti;
- i geni di resistenza all'ampicillina e alla neomicina;
- il segnale di poli-adenilazione dell'ormone della crescita bovino (BGH poliA) e la sequenza di terminazione della trascrizione SV40 poliA per garantire una maggiore stabilità dell'mRNA.

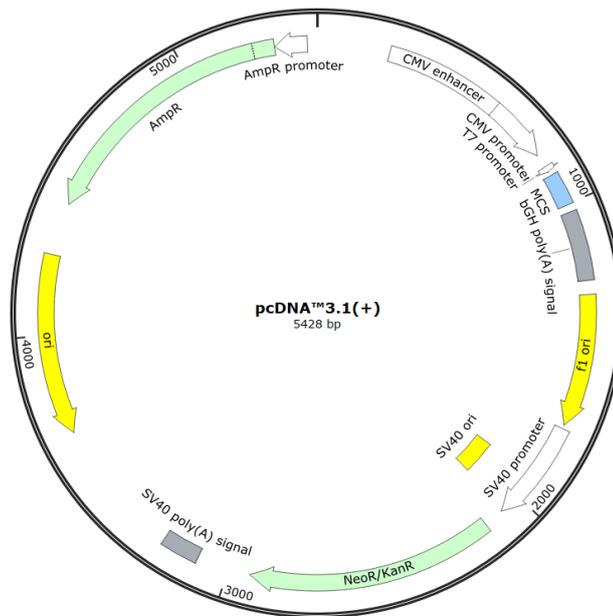


Figura 7. Mappa del plasmide pcDNA3.1+

All'interno del plasmide pcDNA3.1+, descritto sopra, sono state clonate la sequenza della proteina *Killer Red* (Tabella 1), posta sotto al controllo trascrizionale del promotore hCMV, e le relative sequenze di localizzazione subcellulare (Tabella 2) in modo da generare tre plasmidi distinti che si differenziano per la localizzazione del compartimento cellulare in cui è stata posizionata la proteina *Killer Red*. Questa è una molecola fotoattivabile, capace di produrre e rilasciare ROS in seguito alla fotoattivazione con luce alla lunghezza d'onda di 540-580 nm ed è responsabile della citotossicità e dell'uccisione delle cellule bersaglio.

- *Killer Red* con localizzazione alla membrana (**Mem-KR**): il gene *KillerRed* è fuso all'estremità 5' con il segnale di localizzazione di membrana (MLS) della neuromodulina, la quale è una proteina posizionata nella membrana dei neuroni, capace di interagire con la calmodulina. Contiene un segnale per la palmitoilazione post-traduzionale delle cisteine in posizione 3 e 4 che indirizza la proteina *Killer Red* alla membrana cellulare, infatti, con il termine "palmitoilazione" si intende il legame covalente di acidi grassi ai residui di cisteina di proteine esposte in membrana.
- *Killer Red* con localizzazione mitocondriale (**Mt-KR**): la proteina *Killer Red* presenta una doppia sequenza del citocromo c ossidasi 8, ovvero il quarto complesso enzimatico della catena di trasporto degli elettroni all'ossigeno, localizzato nella membrana mitocondriale interna e deputato al trasferimento di elettroni dal citocromo c all'ossigeno.
- *Killer Red* con localizzazione al reticolo endoplasmatico (**ER-KR**): all'estremità 5' del gene esprime la proteina *Killer Red* è presente la sequenza segnale della calreticulina, ovvero una proteina chaperone altamente conservata, posizionata in abbondanza nel reticolo endoplasmatico, che assolve a diverse funzioni importanti nelle cellule eucariotiche, infatti, presentando un dominio di legame per il calcio, è implicata nella regolazione della concentrazione del calcio intracellulare, agendo anche da proteina di legame e di deposito del calcio stesso all'interno del lume del reticolo endoplasmatico. Inoltre, svolge un ruolo chiave anche nel processo di ripiegamento delle glicoproteine cellulari. Tuttavia, poiché a causa del traffico vescicolare la sequenza segnale della calreticulina è insufficiente a garantire il mantenimento di elevati livelli della proteina *Killer Red* all'interno del reticolo endoplasmatico, all'estremità 3' della *Killer Red* è stata posizionata la sequenza segnale di ritenzione al reticolo.

#### Sequenza codificante della proteina *Killer Red*, senza codoni di inizio o di stop

```
gagggcgccccgcctgtccagagcgacatgacctcaaaatcttcacgacggcgaggtgaacggccagaagttcaccatcgtggccga
cggcagcagcaagttccccacggcgacttcaactgacgcccgtgtgcgagaccggcaagctgcccagctggaagcccactctgccac
ctgatccagtacggcgagcccttctgcccgcctaccccgacggcaccagccatttgcggaggagtgcttcccaggggcctgagcatcgac
cgcaccgtgcttcgagaacgacggcaccatgaccagccaccacacctagcgtggcagacacctgctggtgagccgatcaccgtga
actgacggcttccagcccacggccccatcgcgacaccagctggtggacatcctgccaacgagaccacatgttccccacggcccc
aacggcgtgcccagctggccttcacggcctcaccaccgcccacggcggcctgatgatgggcccacttcgacagcaagatgacctcaacgg
cagccgcgatcagatccccggcccacacttctgaccatcatcacaagcagatgagggacaccagcgacaagcgcgaccacgtgtgc
cagcgcgaggtggcctacggcccacagcgtgccccgcaccagcgcctacggtagcgcagagat
```

*Tabella 1. Sequenza codificante della proteina *Killer Red*.*

Localizzazione	Sequenza	Origine della sequenza
Membrana plasmatica	atgctgtgctgtatgagaagaaccaaacagg tgaaaagaatgatgaggaccaaagatc	Neuromodulina
Mitocondrio	atgtccgtcctgacgccgctgctgctgcggg gcttgacaggctcggcccggcggctcccagt gccgcgcgccaagatccattcgtgggggat ctgtccgtcctgacgccgctgctgctgcggg gcttgacaggctcggcccggcggctcccagt gccgcgcgccaag	Doppia sequenza del citocromo c ossidasi 8
Reticolo endoplasmatico (al 5' della sequenza codificante)	atgctgctgagcgtgccgctgctgctgggcct gctgggcctggcggtggcg	Segnale calreticulina
Reticolo endoplasmatico (al 3' della sequenza codificante)	aaagatgaactg	Segnale di ritenzione al reticolo endoplasmatico

Tabella 2. Sequenze segnale di localizzazione intracellulare della proteina Killer Red.

**pUC ZeoH** è un plasmide di 3128 bp, ad alto numero di copie, che si replica autonomamente all'interno delle cellule ospiti mediante l'utilizzo dell'origine di replicazione "ori" e, come buona parte dei plasmidi, possiede una cassetta di espressione per il gene della resistenza all'ampicillina. Questo plasmide è stato generato in laboratorio al fine di contenere delle sequenze di omologia, della lunghezza di circa 200 bp, per uno dei loci  $\gamma 34.5$  in cui nel BAC di HSV-KR è stato inserito un gene di resistenza all'antibiotico zeocina.

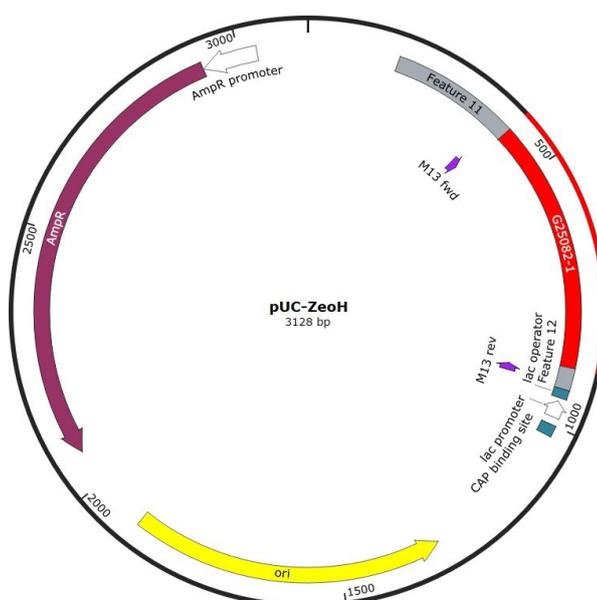
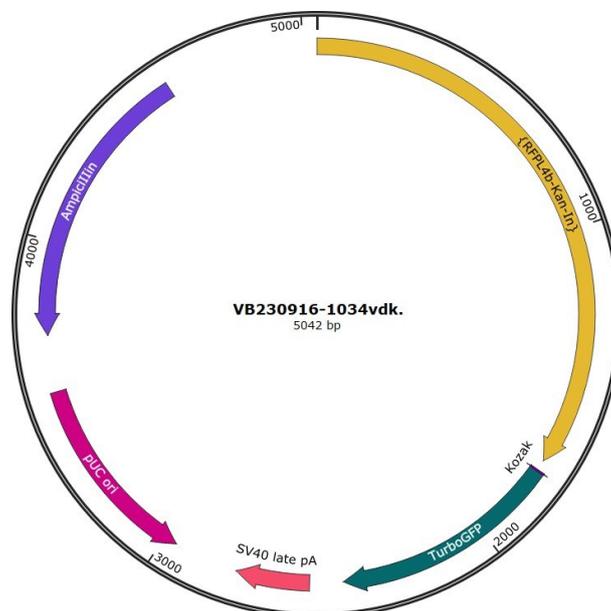


Figura 8. Mappa del plasmide pUC ZeoH

**VB230916-1034vdk** (abbreviato in VB-RFPL4b) è un plasmide di 5042 bp, che si replica nelle cellule ospiti a partire dalla sequenza di replicazione “pUC ori” producendo un alto numero di copie, circa 500-700 in *E. coli*. Il plasmide, generati in laboratorio, presenta il gene della resistenza all’ampicillina e una sequenza che esprime il promotore umano ret finger protein like 4b (RFPL4b), integrato di un gene per la resistenza alla kanamicina. Quest’ultimo, (*KanR*), codifica l’enzima aminoglicoside fosfotransferasi, con il compito di trasferire un gruppo fosfato alla kanamicina, inibendone la funzionalità. La kanamicina è un antibiotico che appartiene alla famiglia degli amminoglicosidi, è utilizzato principalmente contro le infezioni dei batteri gram negativi ed esercita la sua funzione interagendo con la subunità 30S del ribosoma e inibendo la sintesi proteica con diversi meccanismi d’azione: blocco della formazione del complesso ribosoma-mRNA, incorporazione di amminoacidi scorretti introducendo errori nella lettura del mRNA, impedimento della traslocazione corretta dei peptidi. Questi elementi concorrono insieme alla sintesi di proteine anormali e/o non funzionali e alla terminazione prematura della traduzione.



*Figura 9. Mappa del plasmide VB230916-1034vdk*

**VB230628-1251tev** (abbreviato in VB-mIL12-aPD1) è un plasmide di 6540 bp, ad alto numero di copie, che si replica nelle cellule ospiti mediante l’origine di replicazione “pUC ori” e possiede il gene per la resistenza all’ampicillina. Questo plasmide, generato in laboratorio, presenta la cassetta di espressione dei geni terapeutici mIL12-aPD1 che dovranno essere inseriti all’interno del virus HSV-KR in uno dei due loci con la delezione di  $\gamma$ 34.5, sotto al controllo trascrizionale del promotore RFPL4b, per migliorare la capacità del vettore virale di stimolare il sistema immunitario. L’interleuchina 12 murina è una citochina complessa, espressa dalle sequenze delle subunità B e A, le quali sono separate da un linker costituito da 4 residui di glicina e da un residuo di serina, ripetuto due volte (GGGGSGGGGS). IL12 murina è poi connessa alla sequenza codificante l’anticorpo a singola catena aPD1 mediante la sequenza auto-proteolitica T2A.

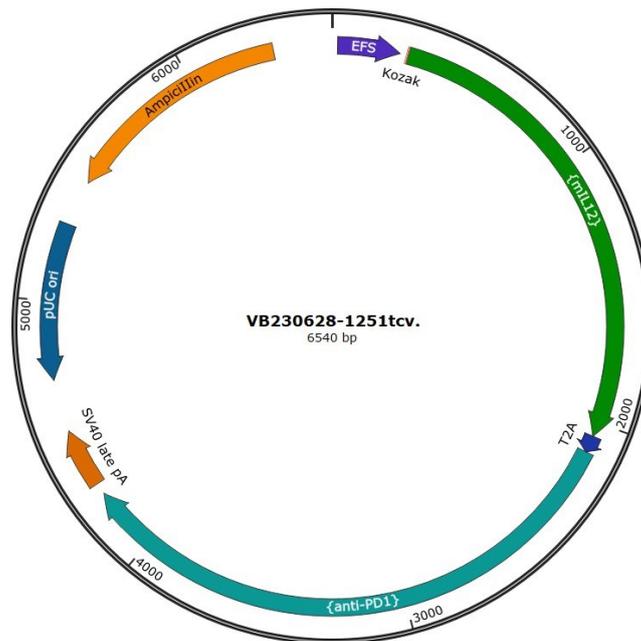


Figura 10. Mappa del plasmide VB230628-1251tcv

**pEF1-mSOCS3** è un plasmide di 6112 bp, generato in laboratorio, che possiede la sequenza SV40 (da Simian Virus 40) di poli-adenilazione la quale, al termine del processo di trascrizione da parte dell'RNA polimerasi, aggiunge una sequenza poliadenilica di circa 200 nucleotidi (poliA) all'estremità 3'OH del mRNA, permettendo la corretta traduzione del trascritto primario.

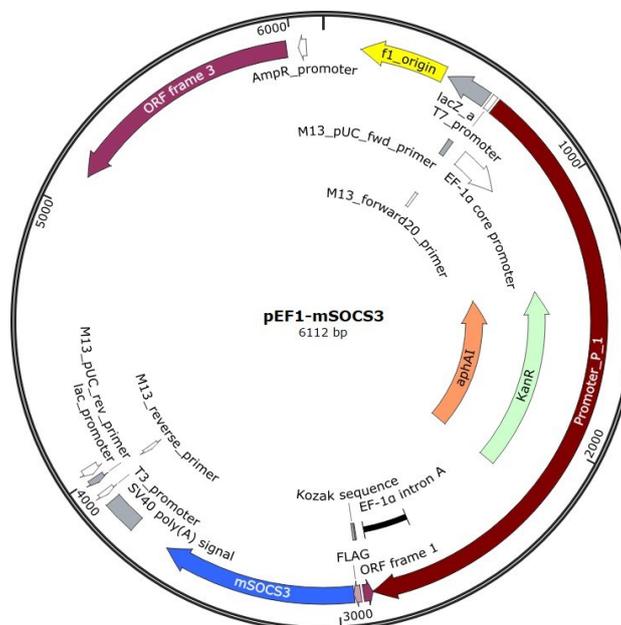


Figura 11. Mappa del plasmide pEF1-mSOCS3

### 3.4 Ceppi batterici

In questo progetto di tesi è stato utilizzato il seguente ceppo batterico.

**DH5 $\alpha$**  è uno dei ceppi di *E. coli* da laboratorio più comuni, utilizzato per la propagazione di piccoli plasmidi e selezionato per la sua capacità di raggiungere un'elevata efficienza di trasformazione. Infatti, questi batteri sono resi chimicamente competenti mediante un trattamento con il cloruro di calcio (CaCl<sub>2</sub>). Nel loro genoma possiedono la mutazione puntiforme recA1, che sostituisce la glicina 160 del polipeptide recA con un residuo di acido aspartico, al fine di disabilitare l'attività delle ricombinasi e inattivare la ricombinazione omologa, fornendo un'elevata stabilità dell'inserimento. Inoltre, possiedono la mutazione endA1 che inattiva un'endonucleasi intracellulare per impedire la degradazione del plasmide inserito e conservare un'elevata resa e qualità del DNA esogeno. Infine, sono addizionati con il marcatore lacZ $\Delta$ M15, il quale permette l' $\alpha$ -complementazione del gene della  $\beta$ -galattosidasi, da vettori pUC o simili, per consentire lo screening delle colonie blu/bianche su piastre di agar batterico contenenti Blu-Gal o X-Gal.

### 3.5 Oligonucleotidi

Nella seguente tabella sono inseriti i primer utilizzati in questo progetto di tesi, riportando il nome, la sequenza e l'applicazione molecolare.

Nome	Sequenza	Applicazione
IF_mIL12_RFLPF	tgctggaagtccaaggatgccacc atgtgtcctca	Amplificazione in PCR
IF_mIL12_RFLPR	gtaggcctgctagcggccttagca ttcccctcgattaaaggactttgtcac	Amplificazione in PCR
IF_RFLP_ZeoF	tggccggcccggaggccatggggat cctctgttgacttttactgct	Amplificazione in PCR
IF_RFLP_ZeoR	cgccggccgcgatcggatccgat ccttgagactccagcagaatt	Amplificazione in PCR
IF_SV40_pZeoF	gcctacgcgtagatcaactgtttattg cagcttataatggttataaaa	Amplificazione in PCR
IF_SV40_pZeoR	accctgttaagatctaagatacattg atgagttggacaaaccac	Amplificazione in PCR

**Tabella 3.** Elenco dei primer utilizzati nelle diverse applicazioni di biologia molecolare coinvolte in questo progetto di Tesi.

## 4. METODI

### 4.1 TECNICHE DI BIOLOGIA CELLULARE E DI VIROLOGIA

#### 4.1.1 Trasfezione di plasmidi esprimenti isoforme di Killer Red in cellule HeLa-DH

In una camera di coltura con vetrino LabTek II CC2, sono state seminate 80.000 cellule HeLa-DH per pozzetto, per un totale di 8 pozzetti, in un volume finale di 500  $\mu$ l di terreno DMEM (GIBCO) con 10% v/v di FBS.

Il giorno successivo è stata allestita la trasfezione delle cellule con i plasmidi che esprimono le isoforme della proteina *Killer Red* indirizzate al mitocondrio e al reticolo endoplasmatico, in modo da valutare l'espressione e la localizzazione intracellulare della proteina. La trasfezione, che consiste nell'introduzione di materiale genetico in cellule eucariotiche riceventi, è stata condotta attraverso l'utilizzo di liposomi. In particolare, è stato utilizzato il reagente commerciale "Lipofectamine 2000 Transfection Reagent" (Invitrogen) che si avvale della lipofectamina, la quale è caratterizzata da subunità lipidiche cationiche che, a contatto con l'ambiente acquoso, formano dei liposomi capaci di intrappolare il DNA plasmidico, mascherandone la carica negativa, e veicolandolo all'interno delle cellule target. Infatti, i liposomi contenenti il DNA, essendo dotati di cariche positive sulla loro superficie, si fondono con la membrana plasmatica delle cellule riceventi, vincendo la repulsione elettrostatica.

In particolare, sono state preparate una eppendorf contenente il DNA plasmidico, a una concentrazione finale di 2500 ng, in terreno DMEM senza siero e una eppendorf contenente la lipofectamina in terreno DMEM senza siero.

Il DNA con DMEM senza siero è stato poi aggiunto nella eppendorf contenente la lipofectamina in un rapporto 1:1, a cui è seguito un periodo di incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente, per favorire la formazione dei liposomi. Trascorso il tempo di incubazione, il complesso DNA-lipidi che si è formato è stato trasferito alle cellule HeLa-DH.

Le cellule sono state poi messe in incubatore a 37°C e analizzate al microscopio nei giorni seguenti, dopo aver eseguito, dove necessario, un trattamento delle cellule trasfettate con ER-Tracker<sup>TM</sup> Green (Invitrogen). Si tratta di un colorante permeabile alle cellule vive, altamente selettivo per il reticolo endoplasmatico, la cui colorazione è costituita dal colorante BODIPT FL verde fluorescente e dalla glibenclamide, la quale lega i recettori della sulfanilurea dei canali K<sup>+</sup> sensibili all'ATP che sono molto abbondanti sul reticolo endoplasmatico.

Dopo aver rimosso il terreno e aver fatto un lavaggio con HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (GIBCO), ER-Tracker Green è stato diluito in HBSS e aggiunto alle cellule utilizzando una concentrazione finale di 1  $\mu$ M. Trascorsi circa 15-30 minuti in incubatore a 37°C, la soluzione è stata sostituita con terreno DMEM fresco e le cellule sono state osservate al microscopio confocale (Nikon).

#### 4.1.2 Trasfezione e irradiazione di cellule 293T esprimenti Mem-KR e Mt-KR

In piastre da 96 pozzetti sono state seminate 40.000 cellule 293T in terreno DMEM con 10% v/v di FBS senza P/S per pozzetto, per un totale di 6 pozzetti. Il giorno seguente le cellule sono state trasfettate con l'isoforma della *Killer Red* indirizzata alla membrana (Mem-KR) e quella a localizzazione mitocondriale (Mt-KR) per procedere alla fotoattivazione e valutare, a distanza di 24 e 48 ore, gli eventi di morte cellulare derivanti.

La trasfezione è stata condotta utilizzando, come precedentemente, "Lipofectamine 2000

Transfection Reagent” (Invitrogen) considerando una concentrazione finale di 200 ng di DNA per pozzetto.

A distanza di 24 e 48 ore dalla trasfezione, è stata eseguita la fotoattivazione di metà pozzetti irradiando la proteina *Killer Red* alla lunghezza d’onda di 561.2 nm e mantenendo il laser TRITC impostato al 95% della potenza per 45 minuti. Per valutare la citotossicità indotta dalla fotoattivazione e stimare la quantità di cellule vive e morti presenti, è stata addizionata la Calceina AM (ThermoFisher), ovvero un colorante di marcatura per cellule vive che, permeando attraverso la membrana, interagisce con le esterasi intracellulari, che scindono il gruppo estere acetossimetile (AM), favorendo la produzione di una fluorescenza verde, la quale permane all’interno della cellula. Mentre le cellule vive manifestano la fluorescenza, che è rilevata facilmente al microscopio confocale utilizzando il filtro FITC, le cellule apoptotiche e morte non riescono a trattenere la Calceina AM a causa della compromissione della membrana.

#### ***4.1.3 Valutazione dell’espressione di ICP4 mediante immunofluorescenza in cellule Vero CCL81***

Nei saggi in cui si confronta la capacità replicativa di due virus è molto importante partire con uno stesso input di particelle virali infettive. A tale scopo, considerando gli errori sperimentali insiti nella tecnica che si utilizza per titolare gli stock di HSV-1 mediante il metodo di formazione delle placche, prima di procedere all’infezione, i virus ricombinanti vengono anche testati attraverso un saggio di espressione della proteina precocissima virale ICP4 a 6 ore dall’infezione di cellule Vero CCL81. In particolare, in una camera di coltura con vetrino LabTek II CC2, vengono seminate 100.000 cellule Vero CCL81 per pozzetto, per un totale di 15 pozzetti, in terreno DMEM con 10% v/v FBS. Il vetro delle camere è chimicamente rivestito con una carica positiva che imita la Poly-D-Lysine in modo da favorire la crescita in adesione delle cellule ed è un dispositivo utilizzato per poter guardare le cellule ad alto ingrandimento al microscopio a immersione.

Il giorno seguente le cellule sono state infettate con il virus HSV-KR alla molteplicità di infezione (MOI) di 0.01 unità formanti placca (PFU) su cellula in 100 µl di volume di infezione. Ovvero, a partire dal titolo, si calcola il volume di stock virale necessario per avere 100 particelle virali infettive da depositare su 100.000 cellule in un volume di infezione pari a 100 µl. Si prepara un volume sufficiente di questa diluizione dello stock virale in DMEM senza siero e si esegue un’infezione delle cellule in triplicato, utilizzandone 50 µl, 75 µl, 100 µl e 125 µl, in un volume finale di 250 µl. Dopo 1 ora di incubazione a 37°C e dopo un lavaggio con il buffer salino 1X (PBS 1X), vengono aggiunti 500 µl per pozzetto di terreno DMEM 2% v/v FBS e si esegue un’incubazione di 6 ore a 37°C. Successivamente, dopo la rimozione del terreno e il lavaggio con PBS 1X, le cellule vengono fissate con metanolo 100% per 5 minuti a -20°C. Rimosso il metanolo ed effettuato un lavaggio in PBS 1X, si esegue un’incubazione di 30 minuti a temperatura ambiente con una soluzione di PBS 1X 5% BSA (albumina di siero bovino) per impedire che siti recettoriali aspecifici possano essere legati dall’anticorpo.

Rimossa la soluzione con BSA, viene eseguito un lavaggio in PBS 1X e viene aggiunto l’anticorpo primario anti-ICP4 (10F1, ab6514, Abcam) diluito 1:200 in PBS, lasciato incubare over night (O/N) a 4°C.

Vengono quindi effettuati tre lavaggi in PBS 1X lasciando agire il PBS qualche minuto, in modo da rimuovere l’anticorpo primario in eccesso che non ha legato l’antigene, e viene aggiunto l’anticorpo secondario goat-anti-mouse (Alexa Fluor® 488, ab150113) diluito 1:500 in PBS 1X

e lasciato incubare 1 ora a temperatura ambiente al buio, per preservare il fluoroforo. Per evidenziare i nuclei cellulari viene allestita una colorazione con 300µl per pozzetto di DRAQ5 diluito 1:500 in PBS 1X, incubato 20 minuti a temperatura ambiente al buio e poi rimosso e lavato con PBS 1X.

Infine, si procede con il montaggio mediante l'uso di una soluzione montante a base di glicerolo e con la visualizzazione dei risultati al microscopio confocale.

#### ***4.1.4 Saggio di infezione delle cellule GL261 con HSV-1***

In una piastra da 24 pozzetti, sono state seminate 75.000 cellule GL261 per pozzetto, per un totale di 9 pozzetti, in 500 µl di terreno DMEM con 10% v/v FBS.

Il giorno successivo, dopo aver rimosso il terreno ed effettuato un lavaggio con PBS 1X, è stata effettuata un'infezione delle GL261 con i virus HSV-KR e HSV-EGFP alla MOI di 1 PFU/cellula. L'infezione è stata condotta in triplicato, quindi 3 pozzetti sono stati infettati con una diluizione del virus HSV-KR, che ha un titolo virale di  $7.34 \times 10^8$ , 3 pozzetti con una diluizione del virus HSV-EGFP, che ha un titolo virale di  $9.6 \times 10^8$ , mentre 3 pozzetti hanno svolto la funzione di controllo negativo. Le diluizioni sono state eseguite in terreno DMEM privo di siero, per un volume finale di 250 µl per pozzetto, e il virus è stato lasciato incubare per 1 ora a 37°C. Trascorso il tempo d'incubazione, è stato rimosso il virus, è stato effettuato un lavaggio con PBS 1X per eliminare eventuali residui rimasti e sono stati aggiunti a tutti i pozzetti, compresi i controlli negativi, 500 µl di terreno DMEM con 2% v/v FBS.

Ogni 24 ore, per 10 giorni, le cellule sono state analizzate e fotografate al microscopio confocale per valutare l'andamento dell'espressione dei transgeni e gli effetti citopatici indotti dai virus e, contemporaneamente, sono state raccolte delle aliquote, prelevando 250 µl di surnatante da ogni pozzetto, e conservate a -80°C per eseguire in un secondo momento le titolazioni mediante saggio a placche. A ogni pozzetto sono stati infine aggiunti quotidianamente 250 µl di terreno DMEM con 2% v/v FBS in modo da mantenere il volume finale di ogni pozzetto pari a 500 µl.

Al termine dell'esperimento, dopo aver rimosso il terreno ed effettuato un lavaggio in PBS 1X, sono stati aggiunti 250 µl di tripsina per staccare e raccogliere le cellule. Si è poi valutata la vitalità cellulare dei diversi campioni mediante la conta delle cellule diluite in Trypan Blue e l'impiego della camera di Bürker, come spiegato al paragrafo successivo.

#### ***4.1.5 Valutazione della vitalità delle cellule GL261 dopo l'infezione con HSV-1 ricombinanti***

Per definire la vitalità delle cellule di glioblastoma murino GL261 in seguito all'infezione con i virus HSV-1 ricombinanti, è stata eseguita la conta cellulare servendosi della camera di Bürker e del colorante Trypan Blue. La camera di Bürker è uno strumento di conta cellulare costituita da un vetrino rettangolare che presenta due celle di 3x3 mm in cui vengono caricati i campioni da analizzare, ciascuna suddivisa in 9 quadrati di 1 mm, i quali, a loro volta, comprendono 16 quadrati più piccoli aventi una superficie di  $1/25 \text{ mm}^2$ . Il Trypan Blue è un colorante blu utilizzato per il conteggio delle cellule vitali mediante un principio di esclusione poiché, essendo permeabile solo alle membrane che hanno perso la loro integrità, colora selettivamente solo le cellule morte, rendendole facilmente distinguibili da quelle vive con una rapida analisi al microscopio.

Dopo aver staccato e raccolto le cellule, i campioni sono stati diluiti 1:5 prelevando 10 µl di sospensione cellulare e aggiungendo 40 µl di Trypan Blue in modo da raggiungere un volume

finale di 50 µl. Dopo aver collocato un vetrino coprioggetti sugli appositi piani di appoggio della camera di Bürker, servendosi di un puntale, si è proceduti al riempimento della cella facendo defluire per capillarità 10 µl del campione da analizzare. Le cellule sono state poi osservate al microscopio, inserendo un obiettivo 10x, e contate scegliendo 4 dei 9 quadrati da 1 mm. Per definire la quantità di cellule/ml presenti nel campione in esame, si è proceduti calcolando il numero medio di cellule per quadrato, e moltiplicando il risultato per il fattore di diluizione (x 5) e per il fattore di conversione (x 10.000), il quale rappresenta il volume della camera di Bürker. Infine, per risalire alla totalità delle cellule presenti nel campione, si è moltiplicato il valore ottenuto per il volume della sospensione cellulare.

$$\text{Cellule/ml} = \frac{\text{numero medio di cellule per quadrato}}{(\text{fattore di diluizione}) \times (\text{fattore di conversione})}$$

#### **4.1.6 Irradiazione delle cellule GL261 infettate con HSV-KR**

Per poter irradiare le cellule GL261 infettate con il virus HSV-KR, 75.000 cellule GL261 sono state seminate in 4 pozzetti di una piastra da 24 pozzetti, in 500 µl di terreno DMEM con 10% v/v FBS.

Il giorno seguente, rimosso il terreno e svolto un lavaggio con PBS 1X, è stata allestita l'infezione delle cellule GL261 con il virus oHSV-1-Δγ34.5-ΔUs12-mir124-hCMV alla MOI di 1 PFU/cellula. Nello specifico, la piastra è stata infettata in quadruplicato con HSV-KR (titolo virale di  $7.34 \times 10^8$  PFU/ml). L'infezione condotta in quattro pozzetti è stata necessaria per consentire di monitorare in duplicato, nel corso dei giorni, le due diverse condizioni di studio, ovvero quella di "cellule infettate e irradiate" e di "cellule infettate e non irradiate". Come nell'esperimento precedente, l'infezione è stata svolta diluendo lo stock virale in 250 µl di terreno DMEM senza siero e ponendo le cellule in incubatore a 37°C per 1 ora, terminata la quale, il virus è stato rimosso sostituendo il terreno privo di siero con 500 µl di terreno DMEM al 2% v/v FBS. A ogni pozzetto sono stati quotidianamente rimossi e aggiunti 250 µl di terreno DMEM 2% v/v FBS per rinfrescare le cellule fino al momento in cui, raggiunto il 90% di cellule positive all'infezione, sono state irradiate con la luce laser.

L'irradiazione delle cellule infettate è stata condotta una volta ottenuto il 90% delle cellule positive all'infezione attraverso l'impiego del laser alla lunghezza d'onda di 561.2 nm (TRITC), impostato al 95% della potenza per 45 minuti, e gli effetti derivanti dalla fotoattivazione sono stati valutati anche nei giorni successivi all'irradiazione acquisendo le immagini al microscopio confocale. L'aggiunta della Calceina AM (ThermoFischer), ovvero un indice di vitalità cellulare permeabile alle membrane cellulari integre, ha permesso di valutare la quantità di cellule vive presenti dopo l'irradiazione per definire il potenziale citotossico della proteina *Killer Red* fotoattivata.

Inoltre, per osservare gli eventi di mortalità cellulare ci si è avvalsi del Kit Alexa Fluor 488 Annexin V (Invitrogen) che utilizza l'anticoagulante umano Annessina V per evidenziare le cellule in apoptosi poiché, essendo una proteina calcio-dipendente legante i fosfolipidi, ha un'elevata affinità per la fosfatidilserina. Inoltre, la coniugazione al fluoroforo Alexa Fluor 488, che ha una corrispondenza spettrale con il canale led FITC, fornisce un segnale esatto di fluorescenza verde quando la proteina rileva e lega la fosfatidilserina, esposta sul foglietto esterno delle cellule in apoptosi. Il fluoroforo, infatti, viene eccitato dal laser alla lunghezza d'onda di 488 nm ed emette una fluorescenza verde, alla lunghezza d'onda di 500-550 nm. L'utilizzo del

reagente Annexin V coniugato al fluoroforo necessita tuttavia di un periodo di incubazione di circa 15 minuti, seguito da un lavaggio, dopo il quale è possibile iniziare le analisi di morte cellulare.

#### ***4.1.7 Valutazione dell'espressione di mIL12 mediante saggio ELISA***

Dopo aver seminato e infettato 10.000 cellule Vero per pozzetto, in una piastra da 96 pozzetti, con il virus HSV-1 esprimente il gene dell'interleuchina 12 murina e il gene di sPD1 (HSV-mIL12-sPD1), e aver raccolto il surnatante da ogni pozzetto a distanza di 24, 48 e 72 ore dall'infezione, è stato utilizzato il protocollo "Quantikine ELISA Mouse IL-12 p70 Immunoassay" (BioTechne) per misurare la quantità di IL12 p70 presente nel surnatante delle cellule infettate. Il test ELISA, acronimo di Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, è una tecnica immunoenzimatica ampiamente utilizzata in biochimica per rilevare e quantificare la presenza di sostanze d'interesse in un campione, basandosi sul riconoscimento selettivo e specifico tra anticorpo e antigene. Per la misurazione della concentrazione dell'antigene mIL12 presente nei campioni, è stato preparato un saggio ELISA a sandwich, il quale si avvale di una piastra pre-rivestita con un anticorpo monoclonale, specifico per riconoscere un epitopo antigenico di mIL12. Dopo aver aggiunto 50 µl del diluente RD1-14 in ciascun pozzetto, sono stati addizionati 50 µl del campione, dello standard e del controllo in pozzetti separati e siglati, lasciando incubare la piastra al buio per 2 ore a temperatura ambiente, in modo da favorire il riconoscimento e il legame selettivo dell'anticorpo all'antigene. Scaduto il tempo di incubazione, sono stati effettuati 5 cicli di lavaggi in ciascun pozzetto aspirando il contenuto, addizionando 400 µl di Wash Buffer e rimuovendo ogni residuo, in modo da eliminare eventuali eccessi di antigene che non sono stati legati dall'anticorpo.

Successivamente sono stati addizionati a ciascun pozzetto 100 µl di anticorpo policlonale, il quale prende contatto con un epitopo antigenico di mIL12 ed è coniugato a un enzima specifico per l'interleuchina 12 murina. Dopo aver incubato la piastra al buio per 2 ore a temperatura ambiente, sono stati ripetuti i 5 cicli di lavaggio precedenti, aggiungendo e rimuovendo il Wash Buffer. In seguito, sono stati addizionati ad ogni pozzetto 100 µl della soluzione substrato dell'enzima, con cui è stato marcato l'anticorpo policlonale, e la piastra è stata incubata al buio a temperatura ambiente per 30 minuti, durante i quali l'enzima ha convertito il substrato fornito in un prodotto colorimetrico di colore blu. Al termine del tempo, sono stati aggiunti 100 µl della soluzione bloccante, la quale stoppa la reazione denaturando l'enzima e convertendo il prodotto di reazione al colore giallo. Sapendo che l'intensità del prodotto colorimetrico è proporzionale alla quantità di mIL12 legata dall'anticorpo, utilizzando uno spettrofotometro impostato alla lunghezza d'onda di 450 nm, è stato possibile determinare l'assorbanza e risalire alla concentrazione di mIL12 presente in ogni campione. Tuttavia, poiché il lettore non fornisce la correzione della lunghezza d'onda, alle letture svolte a 450 nm è stato necessario sottrarre le letture effettuate a 540 nm. Ovviamente, per poter interpretare al meglio i risultati forniti dal saggio, è stato necessario condurre l'esperimento anche con dei campioni standard, forniti dal kit, in modo da costruire una retta di taratura che esprime dei valori di assorbanza in relazione alla concentrazione di mIL12 rilevata.

## 4.2 TECNICHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE

### 4.2.1 Preparazione dei batteri chemiocompetenti DH5 $\alpha$

Dopo aver aliquotato 50  $\mu$ l di batteri DH5 $\alpha$  in un tubo contenente 2,5 ml di terreno LB senza antibiotici e aver lasciato crescere il mini inoculo in incubatore a 37°C O/N e in agitazione, tutto il campione è stato inoculato in una beuta con 200 ml di terreno LB privo di antibiotici e addizionato di 15 mM di MgCl<sub>2</sub>. I batteri chemiocompetenti sono stati fatti crescere over day (O/D) in incubatore a 37°C, in agitazione, fino al raggiungimento di una OD<sub>600</sub> di 0.4, facendo attenzione a non superare la fase di crescita esponenziale. Raggiunto il valore di crescita desiderato, mantenendo il campione in ghiaccio, i batteri sono stati trasferiti in Falcon da 50 ml e centrifugati per 15 minuti a 3500g a 4°C. Scartato il surnatante, il pellet batterico è stato risospeso aggiungendo 10 ml di soluzione A pre-raffreddata (MnCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MES) in ciascuna falcon, per poi trasferire tutti i campioni in una singola Falcon in modo da ottenere un volume finale pari a 50 ml, dove i batteri sono stati risospesi il meno possibile. Dopo aver mantenuto la Falcon in ghiaccio per 30 minuti, i batteri sono stati nuovamente centrifugati per 15 minuti a 4000g a 4°C e, rimosso il surnatante, sono stati risospesi in 5 ml di soluzione B, la quale è costituita dalla soluzione A e dal glicerolo al 15%. Infine, 50  $\mu$ l di batteri DH5 $\alpha$  sono stati aliquotati in eppendorf da 1,5 ml, trasferiti in ghiaccio secco e conservati a -80°C, pronti all'uso.

### 4.2.2 Minipreparazione del DNA plasmidico

Per estrarre il DNA plasmidico da cellule batteriche si segue il protocollo QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (QIAGEN) che si avvale di una colonna dotata di una membrana di silice capace di legare il DNA in presenza di un'elevata concentrazione di sale caotropico e di consentirne l'eluizione in un volume ridotto, a basso contenuto di sale. La purificazione segue una semplice procedura di legame-lavaggio-eluizione quindi, inizialmente, 1.5 ml del mini inoculo sono stati trasferiti in una eppendorf nuova da 1.5 ml e sono stati pellettati mediante una centrifuga impostata a 13.000 rpm per 3 minuti. Rimosso con attenzione il surnatante, il pellet batterico è stato prima risospeso aggiungendo 250  $\mu$ l di Buffer P1 e poi lisato addizionando 250  $\mu$ l di Buffer P2, il quale viene mescolato invertendo 4-6 volte il campione fino a quando la soluzione non diventa chiara. Infine, sono stati aggiunti 350  $\mu$ l del Buffer N3 di neutralizzazione per bloccare la lisi, mescolando per inversione l'eppendorf 4-6 volte. Il campione è stato poi centrifugato per 10 minuti a 13.000 rpm e il surnatante, contenente il DNA plasmidico, è stato caricato in colonna e centrifugato per 60 secondi a massima velocità, in modo da favorire il legame dell'acido nucleico alla membrana. La colonna è stata in seguito sottoposta a due lavaggi sequenziali per rimuovere i sali, il primo effettuato con 500  $\mu$ l di Buffer PB e il secondo con 750  $\mu$ l di Buffer PE, seguiti entrambi da una centrifuga di 60 secondi a 13.000 rpm. Dopo aver rimosso i buffer di lavaggio eluiti e aver centrifugato per ulteriori 60 secondi a massima velocità la colonna per eliminare le tracce residue dei buffer, la colonna è stata trasferita su un'eppendorf da 1.5 ml nuova e siglata. Al centro della membrana sono stati caricati 50  $\mu$ l del Buffer EB di eluizione e la colonna è stata sottoposta all'ultima centrifuga di 60 secondi a 13.000 rpm per eluire il DNA purificato, il quale è stato quantificato al NanoDrop e conservato a -20°C.

#### **4.2.3 Sviluppo del plasmide contenente la cassetta di espressione *mIL12-aPD1***

Per migliorare la risposta immunitaria attivata dall'infezione con il virus HSV-KR, si vuole armare il vettore virale con una cassetta di espressione contenente i geni terapeutici *mIL12-single chain antibody aPD1 (aPD1)*. Di seguito vengono riportate le tecniche e i passaggi che hanno contribuito allo sviluppo del plasmide contenente la cassetta *mIL12-aPD1*, il quale dovrà essere successivamente utilizzato per la ricombinazione, mediante BAC mutagenesi, nel virus HSV-KR. Affinché i geni terapeutici siano correttamente espressi nelle cellule bersaglio infettate da HSV-1 ricombinante è necessario dotare la cassetta costituita dai geni d'interesse di un promotore, di una sequenza di poli-adenilazione e delle regioni di omologia per consentire la ricombinazione nel genoma virale.

##### **4.2.3.1 Sviluppo del plasmide *pUC ZeoH-RFPL4b* mediante *In-Fusion Cloning***

Per inserire la sequenza del promotore *RFPL4b* nel plasmide *pUC ZeoH*, è stato allestito un clonaggio mediante metodologia *In-Fusion* seguendo il manuale “*In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit*” (TakaraBio). Si tratta di un metodo di clonazione molecolare direzionale, rapido ed efficiente, utilizzato per clonare uno o più frammenti di DNA in qualsiasi vettore linearizzato mediante il riconoscimento di brevi sequenze di omologia, di circa 15-20 bp, localizzate alle estremità dei frammenti. Diversi sono i vantaggi che offre questa tecnica come la capacità di clonare in modo efficiente qualsiasi inserto, di qualsiasi dimensione, in qualsiasi posizione all'interno del vettore selezionato; la possibilità di clonare contemporaneamente con un'unica reazione più frammenti di DNA in un singolo vettore e l'abilità di svolgere la clonazione senza l'utilizzo di digestioni di restrizione, eccetto la linearizzazione del vettore, e di trattamenti con fosfatasi per prevenire l'auto-ligazione.

Gli step della tecnica prevedono la linearizzazione del vettore mediante una digestione di restrizione e la sua purificazione, seguiti dal disegno di primer capaci di amplificare in maniera specifica la sequenza dell'inserto, affiancata da estensioni di 15 bp complementari alle estremità del vettore linearizzato.

Nello specifico, il plasmide *pUC ZeoH* (Figura 8) è stato linearizzato utilizzando gli enzimi di restrizione *BamHI* e *NcoI*. La digestione enzimatica è stata condotta in bagnetto termico a 37°C per 1 ora aggiungendo al campione di DNA gli enzimi e il *CutSmart<sup>®</sup> Buffer 10X* (New England Biolabs), ovvero un tampone che garantisce il 100% di attività enzimatica durante le reazioni di doppia digestione. Trascorsa l'ora di digestione, per verificare che gli enzimi avessero tagliato correttamente il plasmide, portando alla formazione di una singola banda di 3115 bp (gli enzimi sono separati da sole 13 bp), è stata allestita una corsa elettroforetica, caricando il campione sul gel d'agarosio al 1%, ottenuto sciogliendo 0.5 g di polvere di agarosio in 50 ml di buffer *Tris-borato-EDTA (TBE) 1X* e aggiungendo 2.5 µl di *GelRed*. Si tratta di una tecnica che sfrutta le cariche negative delle molecole di DNA per analizzare e separare gli acidi nucleici poiché, applicando un campo elettrico, consente la migrazione del DNA verso il polo positivo. In questo modo le diverse molecole si separano lungo il gel con una velocità che dipende dalla forma e dal peso molecolare, permettendo di valutare la presenza di un gene o di una regione d'interesse.

In seguito alla corsa elettroforetica, si è proceduti all'estrazione del DNA digerito con *BamHI* e *NcoI*, mediante l'impiego del protocollo “*GeneJET PCR Purification Kit*” (ThermoFisher Scientific) il quale utilizza una tecnologia a membrana a base di silice, inserita su un supporto a colonna, per purificare rapidamente i frammenti di DNA con un'efficienza di recupero fino al

100%. Inizialmente, alla miscela di reazione contenente il DNA digerito è stato aggiunto un volume uguale (1:1) di Binding Buffer e il campione è stato trasferito in colonna dove un agente caotropico presente nel buffer ha denaturato le proteine promuovendo il legame del DNA alla membrana. Il campione è stato quindi centrifugato per 60 secondi a 13.000 rpm e il surnatante è stato scartato, facendo attenzione a non toccare il fondo della colonna. Le impurità presenti sono state poi rimosse mediante un lavaggio, effettuato aggiungendo 700 µl di Wash Buffer all'interno della colonna e centrifugando il campione per 60 secondi a 13.000 rpm. Eventuali tracce residue del tampone di lavaggio sono state eliminate sottoponendo la colonna a un'ulteriore centrifuga a massima velocità per 60 secondi. Dopo aver trasferito la colonna in un'eppendorf da 1.5 ml nuova e siglata, sono stati aggiunti al centro della membrana 50 µl dell'Elution Buffer e il campione è stato centrifugato a 13.000 rpm per 60 secondi in modo da eluire il DNA dalla colonna. Successivamente, il DNA recuperato è stato quantificato allo spettrofotometro NanoDrop. Per ottenere la sequenza del promotore RFPL4b, il plasmide VB230916-1034vdk (abbreviato in VB-RFPL4b) (Figura 9), è stato utilizzato come stampo per allestire una reazione a catena della polimerasi (PCR).

Innanzitutto, VB-RFPL4b è stato linearizzato mediante una digestione enzimatica condotta in bagnetto termico a 37°C per 1 ora in presenza dell'enzima AhdI e del tampone di reazione CutSmart® Buffer 10X (New England Biolabs). Poiché l'enzima AhdI ha un unico sito di restrizione all'interno del genoma e ha tagliato una sola volta, il prodotto di digestione possiede le dimensioni del plasmide linearizzato, pari a 5042 bp. Il campione linearizzato è stato poi purificato in colonna mediante il protocollo di estrazione "GeneJET PCR Purification Kit" (ThermoFisher Scientific), precedentemente descritto, ed è stato poi amplificato in duplicato. Nel dettaglio, la PCR è stata condotta utilizzando i primer IF\_RFLP\_ZeoF e IF\_RFLP\_ZeoR (riportati in Tabella 3), i quali sono specifici per amplificare la sequenza del promotore RFPL4b, lunga 1740 bp, e hanno una temperatura di annealing di 68°C. Il DNA è stato amplificato utilizzando la DNA polimerasi ad alta fedeltà Q5® Hot Start (Biolabs) poiché è termostabile, ha elevata fedeltà e specificità, alta produttività e tassi di errore estremamente bassi. Per ottenere delle condizioni ottimali per l'amplificazione, la polimerasi è stata accoppiata con il Q5® High GC Enhancer (Biolabs), specifico per ampliconi ad alto contenuto di GC, e con il Q5® Reaction Buffer (Biolabs), che permette un'amplificazione robusta indipendentemente dal contenuto di GC.

Lo schema di amplificazione utilizzato è il seguente, riportato in Tabella 4:

<b>Denaturazione iniziale</b>	<b>Denaturazione</b>	<b>Annealing</b>	<b>Elongazione</b>	<b>Elongazione finale</b>
30'' 98°C	10'' 98°C	30'' 68°C	50'' 72°C	2' 72°C

*Tabella 4. Schema di amplificazione mediante PCR di VB-RFPL4b.*

Una volta appurato con una corsa elettroforetica diagnostica che il promotore RFPL4b è stato correttamente amplificato, il prodotto di PCR è stato sottoposto alla digestione enzimatica con l'enzima di restrizione DpnI in modo da degradare il DNA parentale e mantenere solo il DNA amplificato e neosintetizzato. Infatti, essendo un enzima specifico per il DNA metilato e non essendoci una DNA metilasi in vitro, degrada solo il DNA parentale lasciando intatto il prodotto di PCR, che non è metilato.

Il prodotto di PCR del promotore RFPL4b, digerito con DpnI, è stato caricato su un nuovo gel di agarosio all'1% per essere estratto dal gel stesso al termine della corsa elettroforetica seguendo il protocollo "GeneJET Gel Extraction Kit" (ThermoFisher Scientific), che è utilizzato per

purificare frammenti di DNA con un'efficienza di recupero del 95%. Nello specifico, identificata alla luce UV la banda d'interesse e servendosi di un bisturi, si è proceduti all'isolamento della banda e al suo trasferimento in una nuova eppendorf da 2 ml. Dopo aver pesato sulla bilancia l'eppendorf contenente la porzione di gel tagliata, è stato aggiunto un volume di Binding Buffer pari al peso della banda, in rapporto 1:1, e il campione è stato posizionato sul termociclature impostato a 50-60°C, per circa 10 minuti, fino al completo scioglimento del gel. Dopo aver vortexato la miscela, il contenuto dell'eppendorf è stato caricato all'interno della colonna di purificazione, contenente una membrana di silice ad elevata affinità per il DNA, ed è stato centrifugato per 60 secondi a 13.000 rpm. Scartato il surnatante, sono stati aggiunti 700 µl di Wash Buffer diluito in etanolo ed è stata effettuata una centrifuga alle stesse condizioni della precedente. Prima di procedere con l'eluizione del DNA, è stata ripetuta un'ulteriore centrifuga alla massima velocità per rimuovere qualsiasi traccia di etanolo dalla soluzione contenente il DNA. Infine, in seguito al trasferimento della colonna su una nuova eppendorf da 1.5 ml e all'aggiunta di 50 µl di Elution Buffer al centro della membrana, il campione è stato eluito dalla colonna mediante una centrifuga di 60 secondi a 13.000 rpm. Il DNA purificato è stato quindi quantificato al NanoDrop e conservato a -20°C.

Si è quindi proceduto con l'allestimento della reazione di clonaggio, che consiste in una soluzione contenente l'inserto, il vettore, 2 µl di 5X In-Fusion HD Enzyme Premix e H<sub>2</sub>O per arrivare al volume finale di 10 µl. Per effettuare il clonaggio mediante metodologia In-Fusion e favorire l'inserimento dell'inserto nel vettore, è stato aggiunto un eccesso di inserto rispetto al vettore con un rapporto 2:1 e il campione è stato incubato per 15 minuti a 50°C. Durante la reazione, l'attività esonucleasica 3'-5' della DNA polimerasi del virus vaccिनico rimuove i nucleotidi alle estremità 3' dei frammenti di DNA, generando delle sporgenze 5' a singolo filamento, le quali si ricombinano insieme portando alla formazione di un nuovo costrutto ricombinato.

Infine, 2.5 µl del prodotto di clonaggio In-Fusion pZeo-RFPL4b sono stati aggiunti a un'aliquota di 50 µl di batteri chemiocompetenti DH5α per essere sottoposti alla trasformazione batterica mediante shock termico. I batteri DH5α, essendo stati trattati con soluzioni di calcio cloruro, utilizzano gli ioni calcio per mascherare le cariche negative dei gruppi lipopolisaccaridici esposti sulle loro membrane esterne, contrastando le repulsioni elettrostatiche con il DNA del prodotto di clonaggio. Infatti, il campione è stato inizialmente mantenuto in ghiaccio per 30 minuti, per favorire l'adesione del DNA alla membrana esterna dei batteri DH5α, e poi è stato trasferito in bagnetto termico a 37°C per 90 secondi in modo da consentire la permeazione del DNA all'interno delle cellule batteriche mediante shock termico. Successivamente, aggiungendo 200 µl di terreno SOC, è stato fornito un brodo ricco di nutrienti per rivitalizzare i batteri dallo shock termico e ripristinarne le funzioni metaboliche. I batteri trasformati sono stati quindi trasferiti nuovamente in bagnetto termico a 37°C per circa 1 ora e poi seminati su una piastra con terreno LB agarizzato e addizionato con l'antibiotico ampicillina. Dopo aver incubato la piastra O/N a 37°C, sono stati allestiti dei mini inoculi prelevando e trasferendo 10 colonie in tubi contenenti 3 ml di LB addizionato con l'antibiotico kanamicina, i quali sono stati lasciati crescere a 37°C O/N e in agitazione. Il giorno successivo, seguendo il protocollo QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN), descritto nei paragrafi precedenti, sono stati estratti i campioni cresciuti e sono stati sottoposti a una digestione diagnostica con l'enzima BamHI e a una corsa elettroforetica per verificare che i batteri siano stati correttamente trasformati con il prodotto di clonaggio. I campioni sono stati in seguito oggetto di una seconda digestione enzimatica, condotta dagli enzimi EcoRV e NotI, in presenza del tampone CutSmart<sup>®</sup> Buffer 10X (New England Biolabs), in modo da linearizzare il plasmide a valle della sequenza contenente il promotore RFPL4b e a monte della sequenza di omologia, così da consentire in seguito l'ingresso della cassetta di espressione dei geni terapeutici

*mIL12-aPD1*, come descritto sotto (vedi Paragrafo 4.2.3.2). Confermata la grandezza delle bande ottenute dalla corsa elettroforetica dei prodotti di digestione, i campioni sono stati purificati secondo il protocollo di estrazione in colonna “GeneJET PCR Purification Kit” (ThermoFisher Scientific) e sono stati quantificati e riposti a -20°C, in attesa del loro utilizzo.

#### 4.2.3.2 Sviluppo del plasmide *pZeo-RFPL4b* e *mIL12-aPD1* mediante *In-Fusion Cloning*

Il plasmide VB230628-1251tev (abbreviato in VB-*mIL12-aPD1*) (Figura 10) contiene all’interno del genoma la cassetta dei geni terapeutici *mIL12-aPD1* che devono essere posti sotto il controllo trascrizionale del promotore *RFPL4b*.

Poiché il plasmide ha delle dimensioni elevate, è stata effettuata una digestione enzimatica per linearizzare il plasmide e facilitare l’amplificazione della sequenza target. L’enzima selezionato è *NotI* poiché taglia all’interno del plasmide VB-*mIL12-aPD1* una singola volta e il sito di restrizione è localizzato all’esterno della cassetta *mIL12-aPD1*. Dopo aver lasciato il campione in bagnetto termico 1 ora a 37°C in presenza dell’enzima di restrizione *NotI* e del tampone di reazione *CutSmart*® Buffer 10X (New England Biolabs), il prodotto di digestione è stato caricato ed estratto da gel mediante il protocollo “GeneJET Gel Extraction Kit” (ThermoFisher Scientific). Estratto da gel il DNA plasmidico, è stata allestita una reazione di PCR con i primer *IF\_mIL12\_RFLP* forward e reverse (riportati in Tabella 3) che contengono regioni di omologia con il promotore *RFPL4b*. La reazione di PCR è volta ad amplificare la sequenza *mIL12-aPD1* da clonare nel plasmide sviluppato, come spiegato al punto 4.2.3.1. A tale scopo è stata utilizzata la DNA polimerasi *Q5*® Hot Start (Biolabs), in presenza del *Q5*® High GC Enhancer (Biolabs) e del *Q5*® Reaction Buffer (Biolabs). La reazione di amplificazione è stata condotta per circa 35 cicli, alternando le fasi di denaturazione, di appaiamento dei primer e di elongazione, come riportato in Tabella 5.

Denaturazione iniziale	Denaturazione	Annealing	Elongazione	Elongazione finale
30” 98°C	10” 98°C	30” 66°C	1’50” 72°C	2’ 72°C

*Tabella 5. Schema di amplificazione mediante PCR di VB-mIL12-aPD1.*

Al termine della reazione, il prodotto di PCR è stato digerito con l’enzima di restrizione *DpnI* in modo da degradare il DNA plasmidico metilato e preservare solo il DNA neo amplificato. La corsa elettroforetica di verifica, in cui sono state valutate la specificità dei primer selezionati e la fedeltà di amplificazione della sequenza target, oltre alla dimensione della banda ottenuta sul gel, è stata seguita dall’estrazione da gel della banda di 4006 bp contenente la cassetta d’espressione dei geni terapeutici *mIL12-aPD1*. Successivamente il campione, estratto seguendo le disposizioni del protocollo “GeneJET Gel Extraction Kit” (ThermoFisher Scientific), è stato quantificato al *NanoDrop* e conservato a -20°C.

Nel frattempo, il plasmide *pZeo-RFPL4b* è stato linearizzato con *EcoRV* e *NotI* ed è stato allestito un clonaggio, mediante la tecnica *In-Fusion* precedentemente descritta, con il prodotto di PCR *mIL12-aPD1*. Poiché il vettore e l’inserito hanno delle dimensioni simili, la soluzione di reazione è stata preparata inserendo un rapporto 1:1 tra il vettore e l’inserito, in presenza di *5X In-Fusion HD Enzyme Premix* e di *H2O* fino a raggiungere un volume finale di 10 µl. Come per il clonaggio precedente, il prodotto *In-Fusion* è stato incubato per 15 minuti a 50°C e trasformato in batteri

DH5 $\alpha$  chemiocompetenti mediante shock termico. I batteri trasformati con il plasmide pZeo-RFPL-mIL12-aPD1 sono stati poi piastrati su terreno LB agar con ampicillina e lasciati crescere a 37°C O/N e le colonie derivanti sono state prelevate e inoculate in mini inoculi di 3 ml contenenti terreno LB addizionato con ampicillina. I campioni sono stati successivamente estratti con QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit (QIAGEN), mediante centrifughe sequenziali allestite su un supporto a colonna, e sono stati sottoposti a una digestione diagnostica con l'enzima SphI, seguita dalla corsa elettroforetica relativa, per verificare che abbiano integrato le sequenze d'interesse.

#### 4.2.3.3 Sviluppo del plasmide con la sequenza di poli-adenilazione (poliA) SV40

Affinché i geni codificanti l'interleuchina 12 murina e l'anticorpo a singola catena anti-PD1 possano essere correttamente trascritti dall'RNA polimerasi e tradotti in proteine, è necessario aggiungere una sequenza di poli-adenilazione (poliA) di SV40 a valle della cassetta di espressione dei geni terapeutici. Per tale ragione, utilizzando i primer IF\_SV40\_pZeo forward e reverse (si veda Tabella 3), è stata amplificata mediante PCR la sequenza SV40 poliA presente nel plasmide pEF1-mSOCS3 (come riportato in Tabella 6). La reazione di PCR (riportata in Tabella 6) è stata condotta in duplicato utilizzando la DNA polimerasi Q5<sup>®</sup> Hot Start (Biolabs) sul plasmide precedentemente linearizzato mediante una digestione enzimatica con AhdI in modo da facilitare, considerando la dimensione elevata del costrutto, l'accesso della polimerasi e l'amplificazione del DNA.

Lo schema di amplificazione utilizzato è il seguente:

Denaturazione iniziale	Denaturazione	Annealing	Elongazione	Elongazione finale
30'' 98°C	10'' 98°C	30'' 65°C	30'' 72°C	2' 72°C

*Tabella 6. Schema di amplificazione mediante PCR della sequenza di poli-adenilazione SV40.*

Il prodotto di PCR è stato, infine, caricato su un gel di agarosio all'1% per valutare se l'amplificazione è avvenuta correttamente generando il frammento SV40 poliA di 152 bp. Sfruttando la breve sequenza di omologia introdotta dai primer della reazione di PCR all'estremità dell'amplicone del frammento SV40 poliA, si procederà al clonaggio mediante metodologia In-Fusion (TakaraBio) del prodotto di PCR del frammento SV40 poliA con il vettore pZeo-RFPL-mIL12-aPD1.



## 5. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 5.1 *Killer Red* indirizzata al mitocondrio risulta l'isoforma ottimale della proteina per l'inserimento in un HSV-1 oncolitico

Allo scopo di sviluppare un virus oncolitico basato su HSV-1 esprimente la proteina fotoattivabile *Killer Red*, la prima fase di questo lavoro sperimentale ha previsto la valutazione di isoforme della proteina, caratterizzate da diversa localizzazione intracellulare, al fine di selezionare la versione più idonea da inserire nel genoma virale.

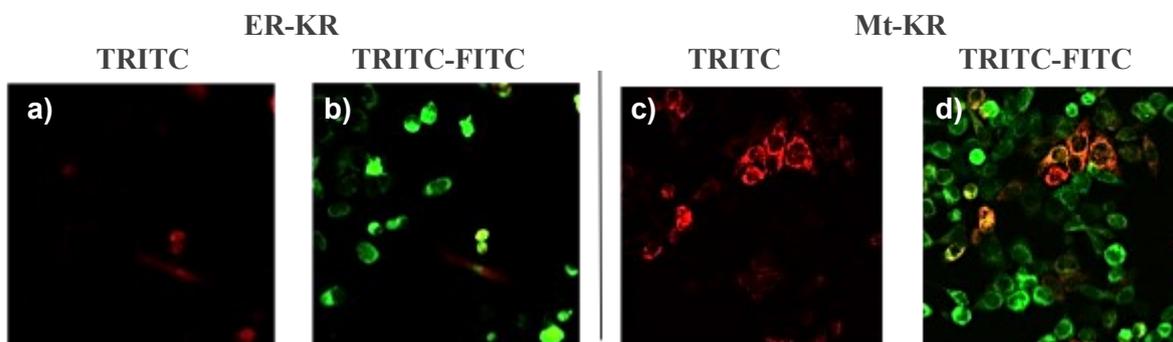
In particolare, abbiamo deciso di testare:

1. ***Killer Red* indirizzata alla membrana (Mem-KR):** si tratta di una forma di *Killer Red* che, grazie alla presenza del segnale di localizzazione di membrana (MLS) della neuromodulina, viene indirizzata e si localizza a livello del plasmalemma. Questa versione di *Killer Red* è già stata testata in approcci per la terapia di tumori, anche in combinazione con un virus oncolitico HSV-1 (Shimizu K. et al., 2023).
2. ***Killer Red* indirizzata al mitocondrio (Mt-KR):** in questo caso la sequenza codificante *Killer Red* contiene il segnale per l'indirizzamento al mitocondrio del citocromo c ossidasi 8, che è localizzato nella membrana mitocondriale interna. Questa forma di *Killer Red* è già stata testata con successo in vitro, ma mai in combinazione con virus oncolitici (Xin L. et al., 2019).
3. ***Killer Red* indirizzata al reticolo endoplasmatico (ER-KR):** per indirizzare e trattenere *Killer Red* nel reticolo endoplasmatico, è stata inserita all'estremità N-terminale la sequenza segnale della calreticulina e, in posizione carbossiterminale, la sequenza segnale di ritenzione al reticolo, KDEL. Questa forma di *Killer Red* è stata immaginata e sviluppata dal gruppo di ricerca presso il quale ho svolto il tirocinio di Laurea. Il rationale risiede nel fatto che danneggiare il reticolo endoplasmatico può indurre morte cellulare immunogena, pertanto, localizzare in questo organello la produzione di ROS da parte di *Killer Red* può potenzialmente aumentare l'efficacia immunoterapeutica del virus oncolitico (Li W. et al., 2019).

Sono stati, quindi, generati tre plasmidi, basati su pcDNA3.1+ (Figura 7), esprimenti la proteina fotoattivabile in cellule eucariotiche, indirizzata ai diversi compartimenti di interesse. A tale scopo, la sequenza codificante la proteina *Killer Red* (riportata in Tabella 1) è stata fusa ai motivi di localizzazione riportati in Tabella 2.

Poiché delle tre isoforme, ER-KR non era mai stata testata prima, abbiamo deciso inizialmente di validare la sua localizzazione intracellulare. Come confronto, abbiamo utilizzato Mt-KR, essendo anche questa proteina localizzata in organelli intracitoplasmatici e ampiamente validata. A tale scopo, sono state inizialmente selezionate le cellule di cervice uterina umana HeLa-DH, data la loro natura tumorale e il fatto che si prestano bene ad analisi di localizzazione di proteine over-esprese. Le cellule sono state trasfettate con i costrutti esprimenti Mt-KR e ER-KR, utilizzando la stessa quantità di DNA (2500 ng) in una camera di coltura dotata di vetrino (LabTek II CC2). Nei giorni successivi, è stata monitorata la fluorescenza rossa emessa dalla proteina *Killer Red*. Nel caso dell'isoforma a localizzazione mitocondriale risulta chiara la localizzazione intracellulare della proteina, che mette in evidenza il nucleo in posizione centrale (Figura 12, pannello c). Nel caso della *Killer Red* con segnali di localizzazione/ritenzione al reticolo endoplasmatico, risulta invece difficile riconoscere il preciso compartimento citoplasmatico nel quale la proteina viene indirizzata (Figura 12, pannello a). È stata quindi effettuata una colorazione con il tracciante del reticolo endoplasmatico, il ER-Tracker™ Green (Invitrogen),

in modo da evidenziare l'organello subcellulare e facilitare l'interpretazione della localizzazione della *Killer Red*. Il tracciante, infatti, è un colorante permeabile alle cellule vive, altamente selettivo per il reticolo endoplasmatico, che emette una fluorescenza verde alla lunghezza d'onda di 488 nm (laser FITC). Perciò, nel caso della *Killer Red* a localizzazione mitocondriale ci si aspetta che la fluorescenza rossa, determinata dalla KR, e la fluorescenza verde, derivante dal tracciante, evidenzino regioni diverse, mentre nel caso della *Killer Red* indirizzata al reticolo endoplasmatico le due fluorescenze dovrebbero sovrapporsi e portare alla formazione di un'unica fluorescenza gialla. A causa della bassa espressione del ER-KR però, è complicato riconoscere questo motivo di espressione caratteristico perché le cellule positive alla trasfezione sono poche e sono distribuite in maniera non uniforme (Figura 12, pannello b). Da notare che, a causa probabilmente della vicinanza dei mitocondri al reticolo endoplasmatico, si osserva la formazione di fluorescenza gialla anche nelle cellule HeLa-DH trasfettate con la proteina *Killer Red* localizzata nel mitocondrio (Figura 12, pannello d).

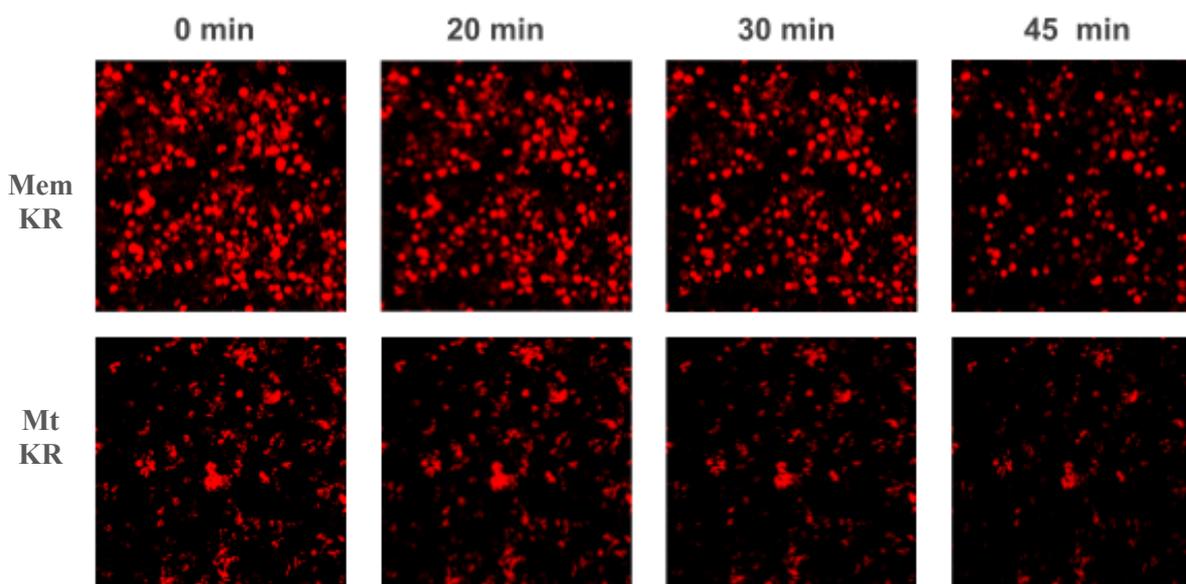


**Figura 12. *Killer Red* indirizzata al reticolo endoplasmatico è poco espressa e non presenta una chiara localizzazione all'organello.** a) Foto delle cellule HeLa-DH trasfettate con la *Killer Red* localizzata al reticolo endoplasmatico; b) foto delle cellule HeLa-DH trasfettate con la *Killer Red* localizzata al reticolo endoplasmatico e colorate con ER-Tracker; c) foto delle cellule HeLa-DH trasfettate con la *Killer Red* a localizzazione mitocondriale; d) foto delle cellule HeLa-DH trasfettate con la *Killer Red* a localizzazione mitocondriale e colorate con ER-Tracker. Le colonne "TRITC" riportano l'immagine relativa alle cellule osservate a luce emessa alla lunghezza d'onda di 561.2 nm che mettono in evidenza la proteina *Killer Red*, mentre le colonne "TRITC-FITC" forniscono la stessa immagine sovrapponendo i filtri TRITC (lunghezza d'onda di 561.2 nm) e FITC, per apprezzare contemporaneamente la localizzazione della KR e del tracciante per il reticolo endoplasmatico. Tutte le immagini sono state acquisite al microscopio confocale, con ingrandimento 20x, e sono rappresentative di 10 campi analizzati per ciascun campione.

In conclusione, i risultati ottenuti indicano che ER-KR è poco espressa e non ha una chiara localizzazione intracellulare. Si è quindi deciso di abbandonare questa isoforma e di proseguire paragonando gli effetti sulla vitalità cellulare delle due isoforme già validate in letteratura. Nello specifico, si è scelto di condurre le prove di fotoattivazione nelle cellule embrionali umane 293T. La scelta di questa linea cellulare è stata motivata dal fatto che, dovendo confrontare le due proteine, si voleva ottimizzare l'efficienza di trasfezione e di espressione delle stesse, aspetti che le cellule 293T dovrebbero garantire.

La fotoattivazione è stata condotta a 24 e a 48 ore di distanza dalla trasfezione delle cellule esponendo le piastre da irradiare all'azione del laser TRITC, che ha lunghezza d'onda di 561.2 nm, per 45 minuti con potenza al 95%. Al microscopio confocale sono state quindi acquisite immagini dei pozzetti al tempo 0 e a intervalli di 10 minuti, durante i 45 minuti di irradiazione,

per valutare gli eventi sulla vitalità cellulare derivanti dall'attivazione della proteina *Killer Red*. Nella piastra irradiata 24 ore dopo la trasfezione con i plasmidi si osserva che, al tempo 0, l'espressione della proteina *Killer Red* indirizzata alla membrana e al mitocondrio è distribuita nel pozzetto in modo uniforme conservando un pattern di localizzazione caratteristico (Figura 13, pannelli Mem-KR, Mt-KR). Durante l'esposizione al laser TRITC, con lunghezza d'onda di 561.2 nm, si nota che alcune cellule inizialmente si espandono, aumentando le loro dimensioni, per poi raggrinzirsi e collassare, perdendo la fluorescenza rossa dovuta alla *Killer Red*. Questo comportamento coinvolge le singole cellule, a tempistiche differenti, con un andamento "tutto o niente" in cui sembra esserci una soglia, al di sopra della quale le cellule irradiate non riescono a contrastare la produzione di ROS e vanno incontro a morte cellulare. Tale evento coincide con il fenomeno del "photobleaching", ovvero la diminuzione d'intensità della fluorescenza rossa della proteina *Killer Red*.

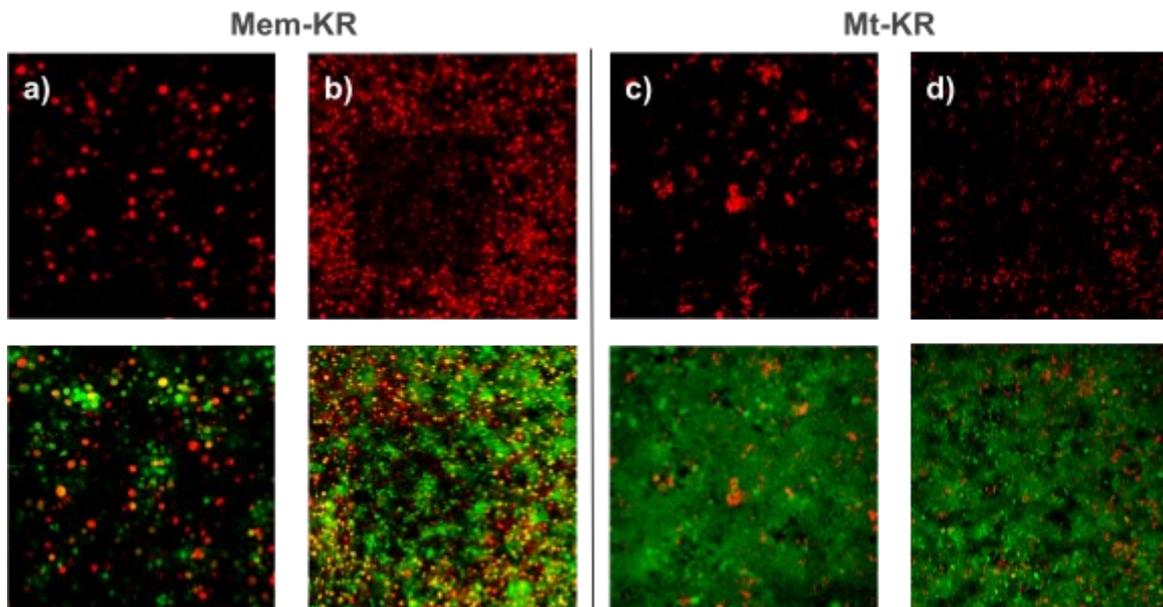


**Figura 13.** La proteina *Killer Red* localizzata nella membrana plasmatica e nel mitocondrio subisce il fenomeno di "photobleaching" quando viene irradiata dalla luce laser a lunghezza d'onda di 561.2 nm in cellule 293T. Pannelli Mem-KR) photobleaching in cellule 293T irradiate dopo 24 ore dalla trasfezione con Mem-KR; Pannelli Mt-KR) photobleaching in cellule 293T irradiate dopo 24 ore dalla trasfezione con Mt-KR. Le immagini sono state acquisite al tempo 0 e trascorsi 20, 30, 45 minuti dalla fotoattivazione. Tutte le immagini sono state acquisite al microscopio confocale con ingrandimento 20x, mediante il laser con lunghezza d'onda di 561.2 nm (TRITC) e sono rappresentative di almeno 10 campi per campione e condizione.

La transizione allo stato non fluorescente della proteina, indotta dalla luce laser, dipende da un attacco diretto dei ROS alle molecole del fotosensibilizzatore con la conseguente degradazione del cromoforo e accompagna gli effetti fototossici della *Killer Red* riflettendo l'efficienza della reazione fotochimica (Kuznetsova D. S. *et al.*, 2015). Si nota che, soprattutto nel caso della Mem-KR che risulta particolarmente espressa, dopo i 45 minuti di irradiazione, il photobleaching non è totale (Figura 13).

In contemporanea al photobleaching delle cellule, per osservare la perdita di vitalità cellulare causata dalla produzione e dall'accumulo di ROS, indotti dall'attivazione della KR, è stata aggiunta la Calceina AM, ovvero un colorante permeabile alla membrana, capace di penetrare

all'interno delle cellule integre. L'indicatore di vitalità viene lasciato agire per circa 10 minuti, durante i quali vengono acquisite immagini al microscopio confocale che consentono di valutare gli effetti sulle cellule generati dall'irradiazione.



**Figura 14.** Le cellule 293T irradiate dopo 24 ore dalla trasfezione con Mem-KR e Mt-KR mostrano perdita di vitalità. **a, b)** cellule 293T trasfettate con Mem-KR, irradiate dopo 24 ore dalla trasfezione e addizionate di Calceina AM. Le immagini sono state acquisite con laser a 561.2 nm (TRITC, sopra) e con laser a 488 nm (FITC, sotto) con ingrandimento 20x (a) e 10x (b); **c, d)** cellule 293T trasfettate con Mt-KR, irradiate dopo 24 ore dalla trasfezione e addizionate di Calceina AM. Le immagini sono state acquisite con laser a 561.2 nm (TRITC, sopra) e con laser a 488 nm (FITC, sotto) con ingrandimento 20x (c) e 10x (d). Le immagini riportate sono rappresentative di 10 campi osservati per ciascun campione

Dalle immagini di Figura 14 (pannelli a, c), si nota una riduzione dell'espressione della Calceina AM in corrispondenza della regione irradiata dalla luce laser e questo evento, come atteso, è giustificato dalla perdita d'integrità di membrana, indotta dall'irradiazione, che non consente alle cellule bersagliate di trattenere il colorante al loro interno. La visione della stessa area ad un ingrandimento minore (10x) fornisce un'immagine chiara del photobleaching che la proteina *Killer Red* subisce quando è fotoattivata e mostra come l'area circostante, non essendo stata irradiata, presenti una vitalità cellulare maggiore, messa in evidenza dall'intensa espressione della Calceina AM (Figura 14, pannelli b, d). Inoltre, ampliando il campo a ingrandimento 10x, si riscontra che il photobleaching e la morte cellulare tendono a non rimanere circoscritti all'area irradiata, ma ad espandersi bersagliando le cellule adiacenti, che vanno incontro a morte cellulare a causa, probabilmente, del contatto con ROS (Figura 14, pannelli b, d).

### **5.2 HSV-KR infetta e uccide cellule di glioblastoma murino GL261**

In laboratorio è stato, quindi generato il virus oncolitico HSV-KR che esprime la forma mitocondriale della proteina *Killer Red* nella regione intergenica *UL55-UL56*, posta sotto il

controllo trascrizionale del promotore hCMV. Questo virus ricombinante, oltre ad avere le stesse delezioni che caratterizzano l'unico virus oncolitico ad oggi autorizzato in clinica, il T-VEC, è caratterizzato dalla presenza delle sequenze target del mir124 fuse al gene *UL29*, che codifica una proteina (ICP8) essenziale per la replicazione del virus. Poiché mir124 è sovra-espresso nei neuroni, questa modifica genomica dovrebbe ulteriormente neuro-attenuare il virus. A supporto di questa ipotesi, esperimenti eseguiti in laboratorio prima del mio tirocinio di Laurea, utilizzando organoidi di cervello umano, avevano evidenziato che il virus HSV-mir-124 presenta una riduzione significativa del titolo virale rispetto al virus oncolitico HSV-Fluc, che esprime la luciferasi di lucciola e che è privo della neuro-attenuazione per il mir124, a indicare che la presenza delle sequenze bersaglio mir124 svolge un ruolo chiave di neuro-attenuazione. D'altro canto, il virus neuro-attenuato con mir124 ha un potere replicativo e oncolitico paragonabile al virus parentale, privo della neuro-attenuazione. Infatti, un saggio d'infezione condotto in parallelo con i virus oncolitici HSV-mCherry e HSV-EGFP ha suggerito che il virus neuro-attenuato HSV-mCherry, esprime la proteina fluorescente mCherry nella regione intergenica *UL55-UL56*, è capace di diffondere e di uccidere le cellule di glioblastoma umane e murine come il virus oncolitico HSV-EGFP, che esprime la proteina fluorescente EGFP nella regione intergenica *UL55-UL56* e che è privo della sequenza bersaglio del mir124.

Il primo obiettivo della mia tesi di Laurea è stato quindi quello di valutare se il virus oncolitico HSV-KR mantiene la stessa capacità di HSV-mCherry di infettare e di uccidere le cellule di glioblastoma murino GL261. HSV-KR possiede lo stesso back-bone genetico e le medesime sequenze target del mir124 di HSV-mCherry, ma presenta la cassetta di espressione della proteina *Killer Red* al posto di *mCherry*. Le cellule selezionate rappresentano un modello ampiamente utilizzato per gli studi relativi ad approcci terapeutici nei confronti del glioblastoma. Infatti, uno dei modelli murini singenici più utilizzato di questa forma di tumore è basato sull'inoculo di cellule GL261 nel cervello di topi C57BL/6.

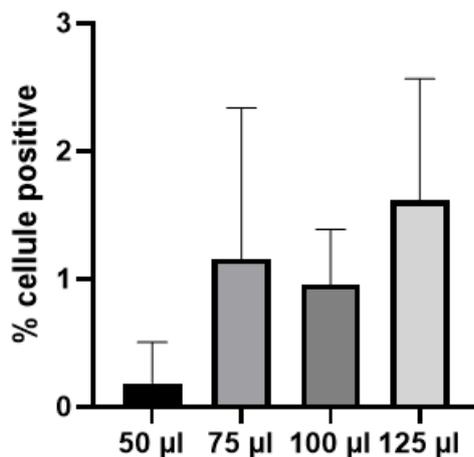
Per poter paragonare correttamente la capacità replicativa di due HSV-1 ricombinanti, è essenziale utilizzare lo stesso input di particelle infettive quando si allestisce il saggio di infezione. A tale scopo, gli stock virali vengono sempre titolati attraverso un classico saggio basato sulla formazione e sulla conta delle placche virali, ma vengono poi anche sottoposti alla valutazione più fina del numero di particelle virali infettive presenti nel campione, attraverso un test basato sulla valutazione dell'espressione della proteina precocissima virale ICP4, a 6 ore dall'infezione di cellule di rene di scimmia Vero. Mentre per il virus HSV-EGFP questo test era già stato svolto, per il virus HSV-KR, che era stato precedentemente titolato mediante titolazione su cellule Vero CCL81 ottenendo un valore di  $7.34 \times 10^8$  unità formanti placche (PFU)/ml, ho eseguito il saggio di valutazione dell'espressione di ICP4 mediante immunofluorescenza. A tale scopo, dopo aver allestito una diluizione dello stock virale basata sul titolo virale, tale da garantire una molteplicità di infezione di 0.01 PFU/cellula, cellule Vero sono state infettate con volumi crescenti di questa diluizione, ovvero 50  $\mu$ l, 75  $\mu$ l, 100  $\mu$ l e 125  $\mu$ l. Sei ore dopo l'infezione, le cellule sono state fissate ed è stata esaminata l'espressione di ICP4 attraverso l'incubazione con un anticorpo primario e secondario appropriati

ICP4 è un fattore di trascrizione espresso da un gene IE nelle prime fasi dell'infezione e svolge un ruolo fondamentale nell'avvio della cascata di espressione genica a valle, permettendo la trascrizione dei geni virali E ed L. Infatti, interagisce con diversi fattori coinvolti nella trascrizione come la proteina legante TATA (TBP), ovvero una sequenza localizzata in tutti i promotori di HSV, e il complesso proteico TFIID, il quale è costituito da TBP e da fattori associati (TAF) ed è deputato al riconoscimento e al legame del promotore. Inoltre, ICP4 svolge anche un ruolo da repressore poiché blocca l'espressione di alcuni geni, tra cui *ICP4* stesso (J. T. Lester et al., 2011).

La sua espressione è, quindi, indice del fatto che le cellule sono state infettate.

Per facilitare la conta cellulare, è stato allestito uno staining con DRAQ5, ovvero un colorante permeabile alla membrana che, grazie all'elevata affinità per il dsDNA, è in grado di discriminare i nuclei cellulari emettendo alla lunghezza d'onda di 665 nm.

Valutando il rapporto tra le cellule positive all'infezione, che emettono alla lunghezza d'onda del verde, e le cellule presenti, che emettono alla lunghezza d'onda dell'infrarosso, è stato possibile definire quale volume della diluizione dello stock utilizzata produce la percentuale di cellule positive attesa quando si utilizza la MOI corretta di 0.01 PFU/cellula.



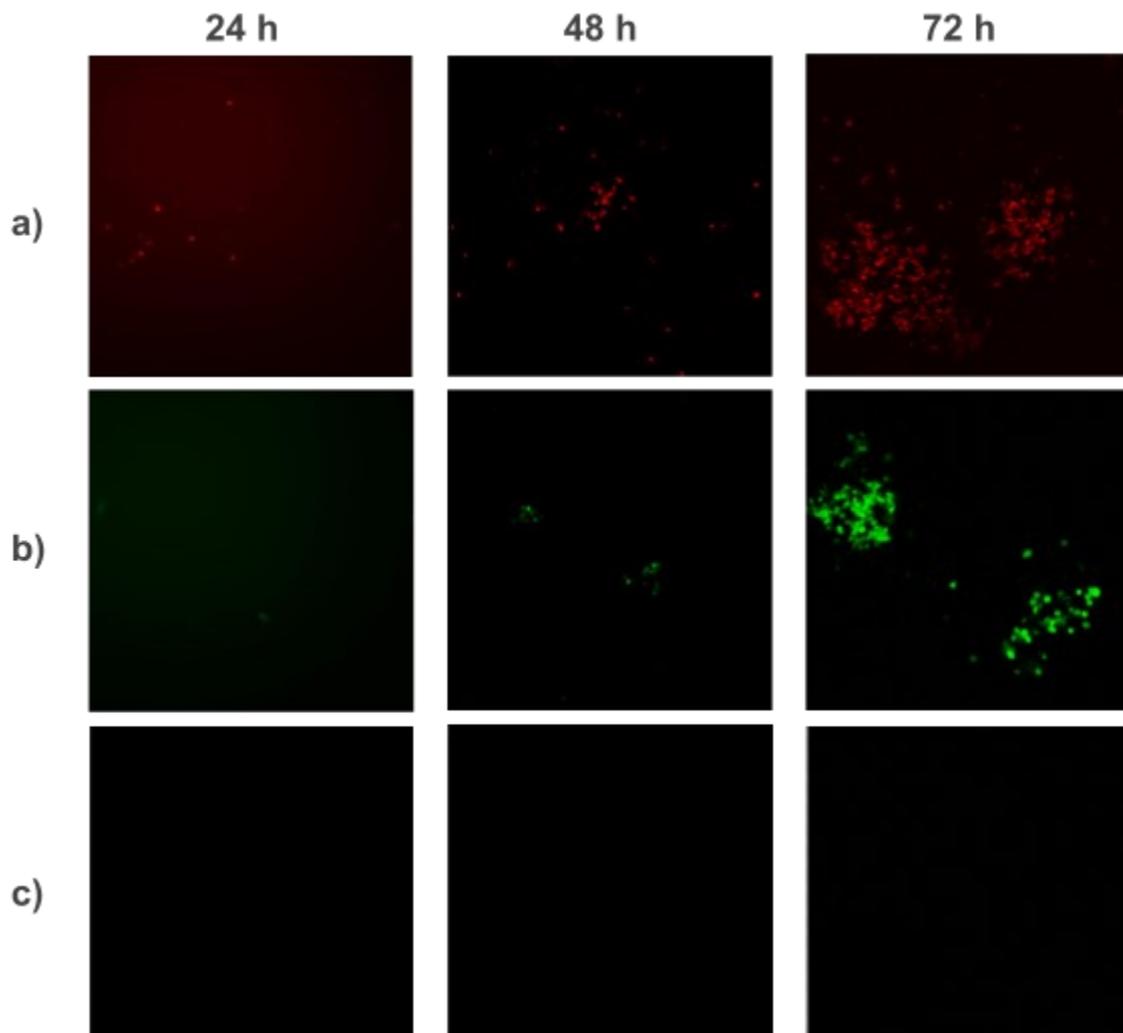
*Figura 15. Valutazione del volume di diluizione dello stock di HSV-KR da utilizzare per ottenere una MOI pari a 0.01 PFU/cellula. Le barre rappresentano la media della percentuale di cellule Vero positive alla proteina virale precocissima ICP4 dopo 6 ore dall'infezione con i volumi riportati di una diluizione dello stock di HSV-KR preparata come riportato nel testo. Sono riportate anche le relative deviazioni standard.*

Dall'analisi dei risultati riportati in Figura 15, si osserva che la quantità di cellule infettate aumenta all'aumentare del volume della diluizione di stock virale utilizzato e che il volume al quale si ottiene una percentuale di cellule che più si avvicina all'1% (0.01 PFU/cellula) è pari proprio a 100 µl, a significare che la titolazione virale precedentemente condotta è accurata. Infatti, a 100 µl non solo la media delle percentuali ottenute è molto vicina a 1%, ma anche la deviazione standard è minore rispetto a quella registrata con 125 µl.

A questo punto, essendo noto il volume di stock virale da utilizzare per ottenere la MOI desiderata, dopo aver infettato le cellule GL261 con i virus oncolitici HSV-KR e HSV-EGFP alla stessa MOI (1 PFU/cellula), ogni 24 ore, per 10 giorni, le cellule sono state osservate al microscopio confocale e sono state acquisite immagini dei pozzetti. Mentre le cellule GL261 infettate con il virus HSV-KR esprimono la caratteristica fluorescenza rossa, mostrando un pattern di localizzazione intracellulare, che è messo in evidenza dall'impiego del laser alla lunghezza d'onda di 561.2 nm (TRITC) (Figura 16, a), le cellule GL261 infettate con il virus HSV-EGFP manifestano la tipica fluorescenza verde, determinata dalla presenza del gene reporter codificante la "Enhanced Green Fluorescent Protein", attraverso l'utilizzo del laser con lunghezza d'onda di 488 nm (FITC) (Figura 16, b). Insieme ai campioni infettati dai virus, sono state acquisite anche le immagini dei pozzetti di controllo, costituiti dalle cellule GL261 non infettate dal virus, sovrapponendo l'uso dei laser a 561.2 nm e 488 nm (rispettivamente TRITC e FITC) e, come atteso, per tutta la durata dell'esperimento non si osserva il minimo segnale di espressione

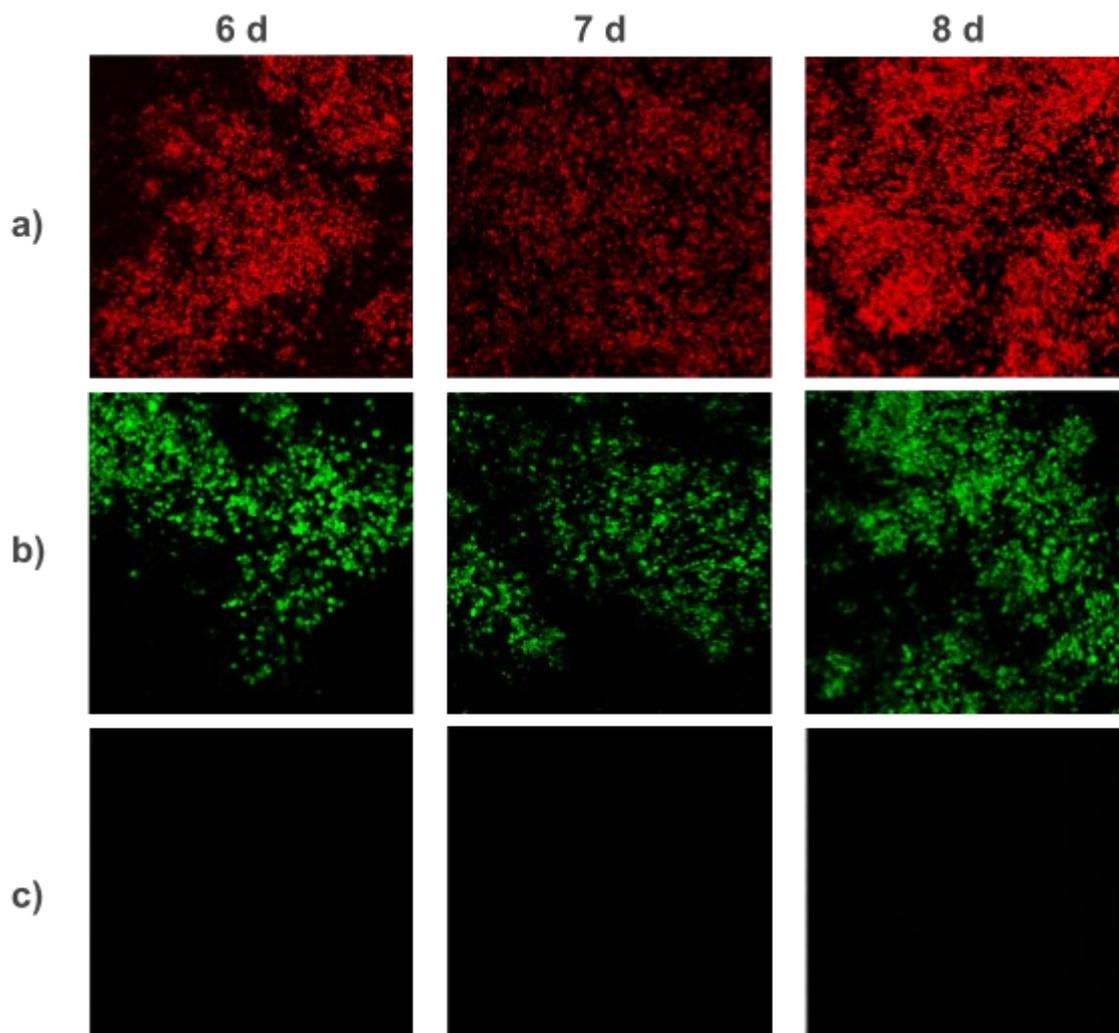
d'infezione virale (Figura 16, c).

A 24 ore dall'infezione, si riesce ad apprezzare la presenza di alcuni spot fluorescenti, radi e isolati, in entrambi i pozzetti infettati dai due virus oncolitici e, nel corso dei giorni, si nota come le cellule fluorescenti tendono ad aumentare di numero diffondendo l'infezione alle cellule circostanti e formando dei cluster di cellule infettate che aumentano di dimensione con lo scorrere delle ore (Figura 16, pannelli a, b).



**Figura 16.** Le cellule GL261 sono sensibili e permissive all'infezione con HSV-KR e HSV-EGFP. **a)** foto rappresentative di triplicati di cellule GL261 infettate con il virus HSV-KR a distanza di 24, 48, 72 ore dall'infezione e osservate con una luce di lunghezza d'onda pari a 561.2 nm (TRITC); **b)** foto rappresentative di triplicati di cellule GL261 infettate con il virus HSV-EGFP a distanza di 24, 48, 72 ore dall'infezione e osservate con una luce di lunghezza d'onda pari a 488 nm (FITC); **c)** foto rappresentative di triplicati di cellule GL261 di controllo, non infettate, prese a 24, 48 e 72 ore dall'inizio dell'esperimento e acquisite sovrapponendo le lunghezze d'onda di 561.2 nm e 488 nm (TRITC e FITC). Tutte le foto sono state catturate al microscopio confocale con ingrandimento 10x.

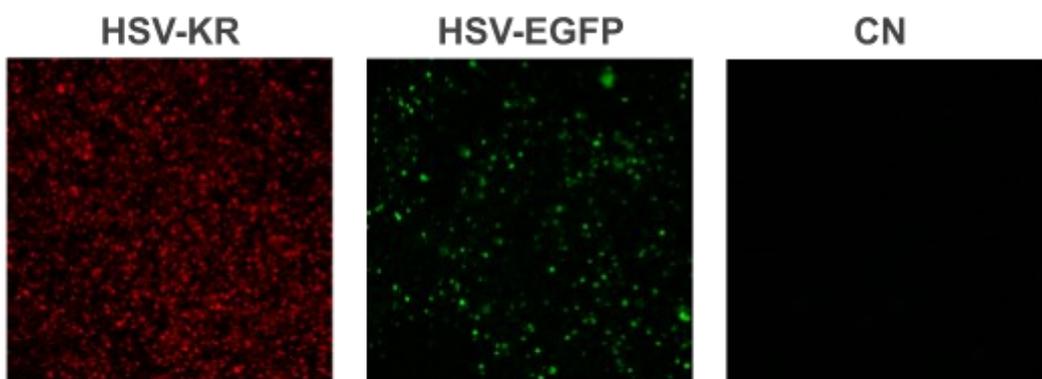
A circa una settimana dall'infezione si osserva che la maggior parte delle cellule infettate con i virus oncolitici HSV-KR e HSV-EGFP appare fluorescente perché l'infezione si sta propagando (Figura 17, pannelli a, b).



**Figura 17.** *L'infezione con HSV-KR e HSV-EGFP si diffonde nelle cellule di glioblastoma murino GL261. a)* foto rappresentative di triplicati di cellule GL261 infettate con il virus HSV-KR a distanza di 6, 7 e 8 giorni, acquisite a 561.2 nm (TRITC); **b)** foto rappresentative di triplicati di cellule GL261 infettate con il virus HSV-EGFP a distanza di 6, 7 e 8 giorni, acquisite a 488 nm (FITC); **c)** foto rappresentative di triplicati di cellule GL261 di controllo, non infettate, a distanza di 6, 7 e 8 giorni, acquisite sovrapponendo le lunghezze d'onda di 561.2 nm e 488 nm (TRITC e FITC). Tutte le foto sono state catturate al microscopio confocale con ingrandimento 10x.

Dalle immagini mostrate in Figura 17, si osserva che il virus HSV-KR (pannello a) riesce a infettare le cellule GL261 e a diffondere efficientemente. Nello specifico, a parità di ore e di giorni trascorsi dall'infezione, le cellule GL261 infettate con il virus HSV-KR sembrano essere in numero maggiore rispetto a quelle infettate con il virus privo delle sequenze bersaglio per il

mir124. Ciò potrebbe dipendere da una maggiore capacità replicativa di HSV-KR che andrà ulteriormente approfondita. In ogni caso, i risultati ottenuti con questo esperimento sono determinanti poiché consentono di dimostrare che il virus HSV-1, armato con la proteina fotoattivabile *Killer Red* e caratterizzato dall'inserimento delle sequenze bersaglio per il mir124, riesce a infettare e a diffondere nelle cellule target di glioblastoma murino come il virus parentale, privo dell'ulteriore neuro-attenuazione. Inoltre, consente di valutare quanto tempo impiegano le cellule di glioblastoma murino GL261 per raggiungere il momento in cui più del 90% delle cellule risultano positive per l'espressione di *Killer Red*. Osservando le immagini acquisite al microscopio e riportate in Figura 17, si evince che il sesto giorno dopo l'infezione con HSV-KR la maggior parte delle cellule sono rosse. Questa tempistica sarà quindi quella che verrà adottata per fotoattivare la proteina *Killer Red* nelle cellule infettate e osservarne gli effetti indotti. L'infezione delle cellule GL261 è stata monitorata durante la sua progressione fino al 13° giorno (Figura 18), durante il quale le cellule sono state staccate, raccolte e contate per valutare la vitalità cellulare nei diversi campioni. Si osserva infatti che, dopo aver raggiunto il picco di infezione, la fluorescenza emessa dalle cellule dei campioni infettati dai virus comincia ad attenuarsi e ridursi, a dimostrazione che le cellule stanno morendo.

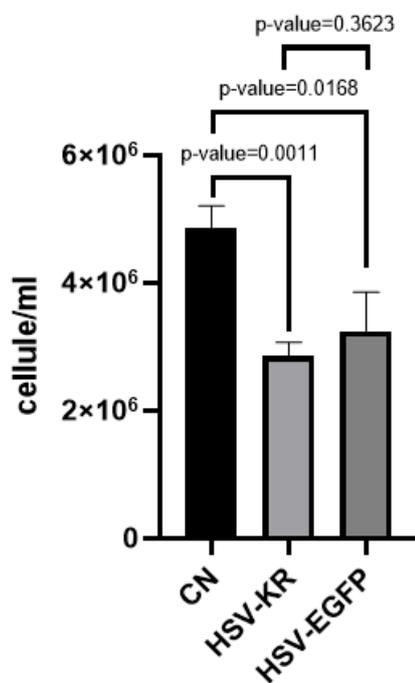


**Figura 18.** A 13 giorni dall'infezione, le cellule GL261 infettate con HSV-KR presentano la più bassa vitalità cellulare. In ordine, foto rappresentative di triplicati di cellule GL261 infettate con i virus HSV-KR, HSV-EGFP e non infettate (CN) a 13 giorni dall'infezione, acquisite come descritto nelle Figure precedenti. Tutte le foto sono state catturate al microscopio confocale con ingrandimento 10x.

Dai risultati della vitalità cellulare, valutata mediante utilizzo del colorante Trypan Blue e conta attraverso camera di Bürker, si evince che, come atteso, i campioni con la vitalità maggiore sono quelli di controllo che, essendo costituiti da cellule non infettate dal virus, non sono state sottoposte all'attività litica virale. Al contrario, tutti i pozzetti infettati con i virus HSV-KR e HSV-EGFP hanno mostrato una vitalità cellulare ridotta rispetto ai controlli, a indicare che la presenza del virus determina la lisi delle cellule infettate. In modo particolare, a 13 giorni dall'infezione, sono state contate in media  $4.8 \times 10^6$  cellule/ml nei pozzetti di controllo,  $2.8 \times 10^6$  cellule/ml nei campioni infettati con HSV-KR e  $3.2 \times 10^6$  cellule/ml nelle cellule GL261 infettate con HSV-EGFP (si veda Figura 19).

È stato inoltre svolto il test statistico di tipo parametrico "t di Student" (riportato in Figura 19) con lo scopo di verificare se il valore medio della distribuzione della vitalità cellulare in GL261 si discosta significativamente dal valore di riferimento considerato. Dando per assunto che tutti i dati abbiano una distribuzione normale e che la varianza delle popolazioni non sia nota, è stato eseguito il t-test confrontando la vitalità cellulare tra il controllo negativo e le cellule GL261

infettate con HSV-KR, tra il controllo negativo e le cellule GL261 infettate con HSV-EGFP e tra le cellule GL261 infettate da entrambi i virus oncolitici. Come atteso, il test statistico t-Student, eseguito confrontando il campione di controllo con le cellule GL261 infettate da HSV-KR, ha evidenziato una differenza significativa nella vitalità cellulare, riportando un valore di p-value pari a 0.0011. Similmente, anche il confronto tra le cellule GL261 di controllo con quelle infettate da HSV-EGFP ha definito che esiste una differenza significativa nella vitalità cellulare tra le due condizioni osservate, fornendo un valore di p-value di 0.0168. Quindi, mentre si è osservata una differenza significativa nella vitalità cellulare tra le cellule di glioblastoma murino GL261 non infettate e le cellule GL261 infettate dai virus oncolitici, non si è osservata alcuna differenza significativa tra la capacità del virus HSV-KR di uccidere le cellule GL261 rispetto al virus HSV-EGFP. Infatti, i risultati del test t-Student che confrontano HSV-KR con HSV-EGFP forniscono un valore di p-value non significativo, pari a 0.3623.



**Figura 19.** HSV-KR uccide efficientemente le cellule GL261. Grafico rappresentativo dei valori in triplicato di vitalità cellulare ottenuti dalla conta delle cellule GL261 di controllo (CN) e infettate dai virus oncolitici HSV-KR e HSV-EGFP.

In conclusione, il virus HSV-KR infetta, si diffonde e uccide le cellule GL261 efficientemente come un virus privo delle sequenze target per il mir124.

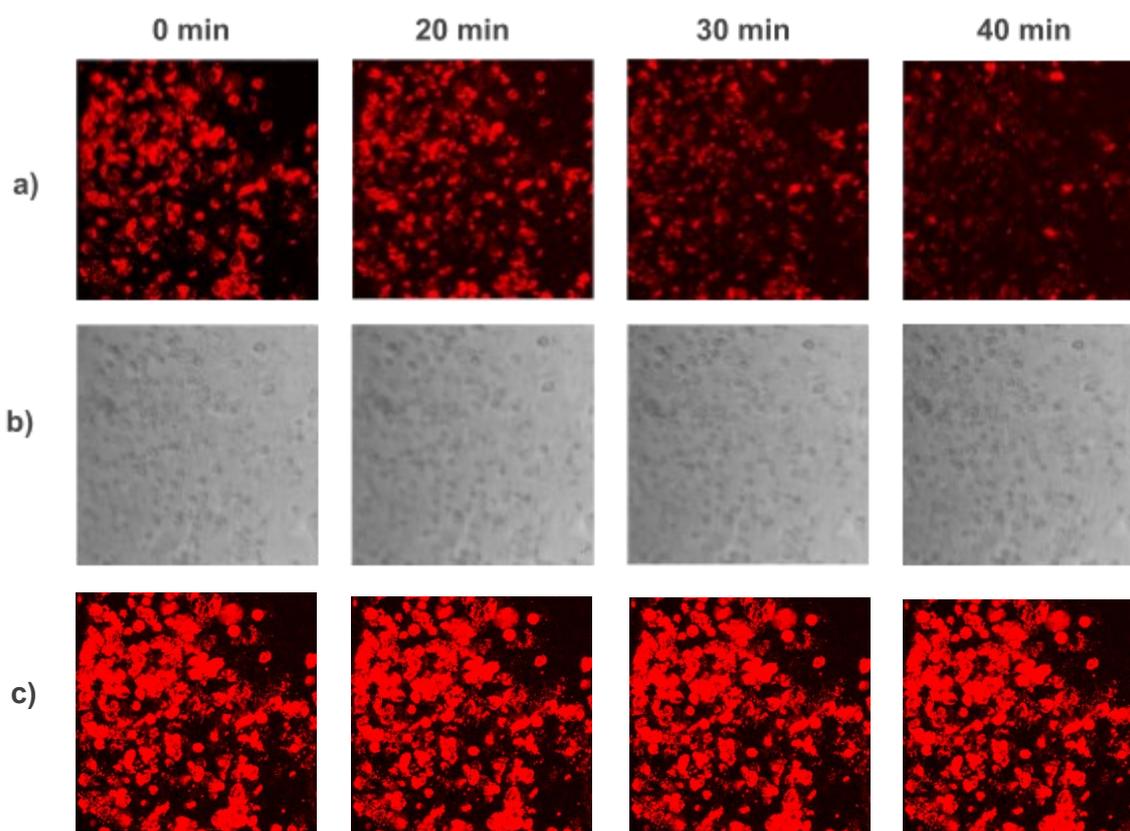
### 5.3 Irradiazione delle cellule GL261 infettate con HSV-KR induce morte cellulare

Alla luce dei risultati precedentemente ottenuti, abbiamo proceduto a valutare l'effetto dell'irradiazione sulla vitalità delle cellule di glioblastoma murino GL261 infettate con il virus HSV-KR, in modo da stabilire come la combinazione dell'attivazione di *Killer Red* con l'attività oncolitica virale vada a influenzare la vitalità delle cellule bersaglio.

Utilizzando i dati ottenuti nell'esperimento di infezione delle GL261 precedentemente descritto,

si è deciso di irradiare le cellule in corrispondenza del giorno in cui si ha un picco di infezione che coinvolge il 90% delle cellule presenti nel pozzetto e che corrisponde al sesto giorno dall'infezione.

Trascorsi 6 giorni dall'infezione delle cellule GL261, sono stati irradiati i pozzetti infettati con il virus HSV-KR utilizzando una luce laser impostata al 95% della potenza, per 45 minuti. Come atteso, utilizzando il laser alla lunghezza d'onda di 561.2 nm (TRITC), nelle cellule GL261 infettate con HSV-KR e irradiate si osserva il photobleaching con il caratteristico calo d'intensità della fluorescenza rossa, determinato dalla degradazione della proteina *Killer Red* (si veda Figura 20, a). Tuttavia, non sono visibili cambiamenti significativi nella morfologia cellulare, la quale è stata catturata al microscopio confocale dall'impiego della luce del visibile (TD) (Figura 20, b). Nel campione di controllo (Figura 20, c), invece, le stesse cellule GL261 infettate con HSV-KR e non irradiate al laser mantengono la fluorescenza rossa della proteina *Killer Red* per tutto il periodo di osservazione.

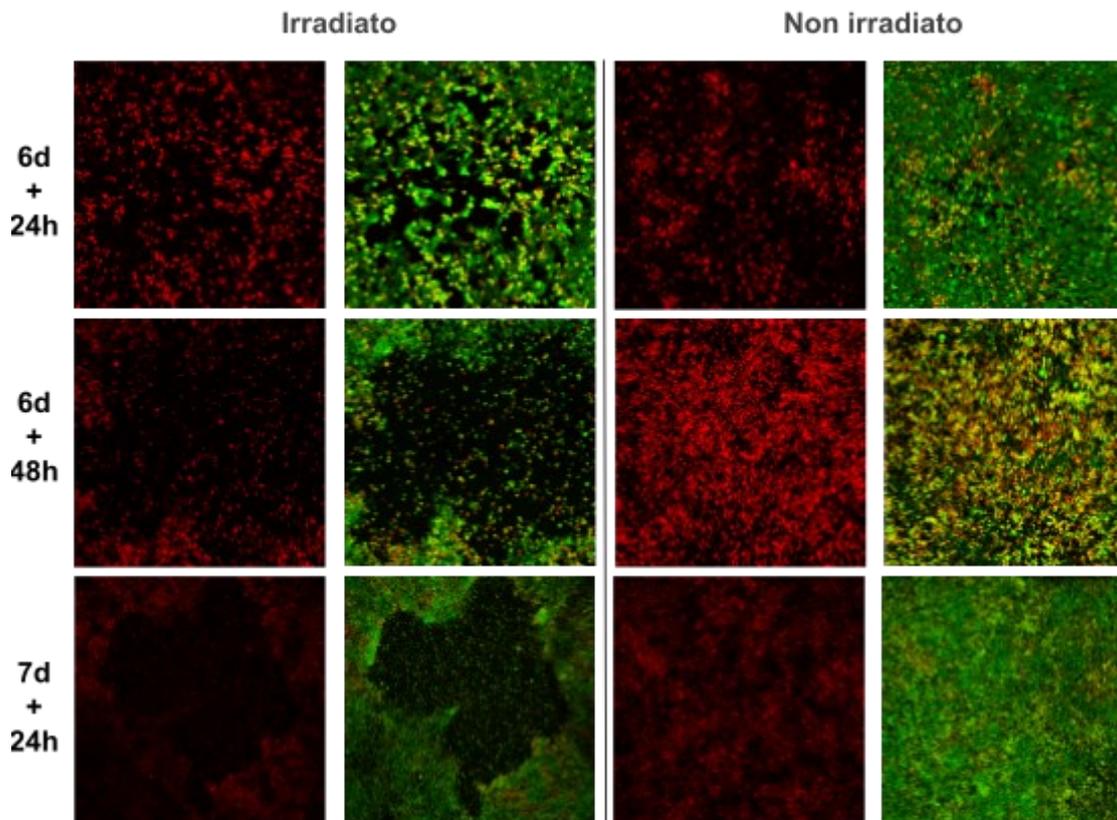


**Figura 20.** Le cellule GL261 infettate con HSV-KR e irradiate mostrano eventi di photobleaching ma nessun cambiamento morfologico significativo. **a)** sequenza temporale di cellule GL261 irradiate 6 giorni dopo l'infezione con HSV-KR e acquisite al microscopio confocale a 561.2 nm (TRITC); **b)** sequenza temporale di cellule GL261 irradiate 6 giorni dopo l'infezione con HSV-KR e acquisite al microscopio confocale alla luce visibile (TD); **c)** sequenza temporale di GL261 infettate con HSV-KR e non irradiate. Tutte le foto sono state catturate con ingrandimento 20x.

Trascorse quindi 24 ore dalla fotoattivazione, si è valutata la vitalità cellulare nel campione infettato e irradiato rispetto al controllo infettato e non irradiato, mediante l'aggiunta della Calceina AM che penetra attraverso le membrane cellulari delle cellule vive e integre emettendo una fluorescenza verde, che è apprezzabile alla lunghezza d'onda di 488 nm (FITC). Nelle

immagini del campione irradiato, riportate in Figura 21 (pannelli 6d+24h), si nota che, in corrispondenza dell'area fotoattivata, dove la fluorescenza rossa è assente o meno intensa, la quantità di cellule vive è ridotta, a differenza del campione non irradiato dove la fluorescenza verde della Calceina AM è preponderante. La stessa analisi, svolta a distanza di 48 ore dall'irradiazione, mostra che la vitalità cellulare nel campione irradiato è nettamente minore rispetto al campione non fotoattivato (si veda Figura 21, pannelli 6d+48h). Infatti, mentre nel pozzetto irradiato le cellule vive sono rare nella regione centrale e sono più concentrate in periferia, dove non sono state fotoattivate, ponendo in evidenza i confini del campo colpito dalla luce laser, nel campione di controllo le cellule e le fluorescenze espresse sono distribuite in maniera omogenea nel pozzetto. In questo ultimo si apprezza infatti un'intensa fluorescenza gialla, che è il risultato della sovrapposizione della fluorescenza rossa e verde, a prova che le cellule che esprimono la proteina *Killer Red*, non essendo ancora state irradiate, sono ancora vive, nonostante l'infezione.

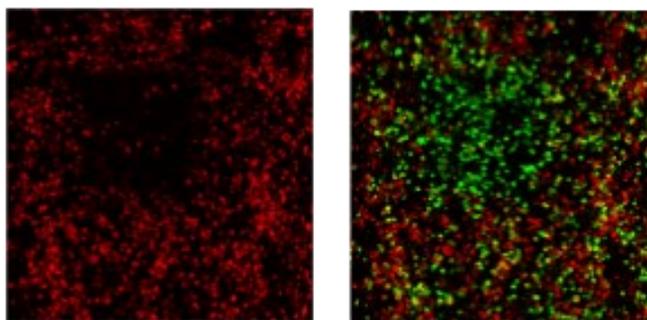
Lo stesso esperimento di fotoattivazione è stato replicato nelle cellule GL261 infettate con HSV-KR a 7 giorni dall'infezione allo scopo di vedere se, in un contesto in cui un numero ancora maggiore di cellule sono infettate e l'effetto del virus sulla vitalità cellulare dovrebbe essere aumentato, si osservano ancora differenze tra le cellule irradiate e non. Dopo 24 ore dall'irradiazione, è stata addizionata la Calceina AM e si è valutata la vitalità cellulare nel pozzetto irradiato rispetto a quello non irradiato osservando i segnali emessi dalle cellule al microscopio confocale con ingrandimento 4x (Figura 21, pannelli 7d+24h). I dati ottenuti hanno confermato i pattern di espressione osservati il giorno precedente, ponendo in risalto le differenze che si riscontrano nell'area irradiata rispetto a quella non fotoattivata, sia nel campione irradiato che in quello di controllo.



**Figura 21.** *L'irradiamento delle cellule GL261 infettate con HSV-KR diminuisce la vitalità cellulare. Cellule GL261 sono state irradiate a 6 o 7 giorni (d) dopo l'infezione con HSV-KR, come indicato, e la loro vitalità è stata valutata dopo 24 o 48 ore (h), come riportato, dopo aggiunta di Calceina AM. Il controllo è costituito da cellule infettate, ma non irradiate, trattate come le precedenti. Le immagini sono state acquisite al microscopio confocale alla lunghezza d'onda di 561.2 nm e 488 nm (rispettivamente TRITC e FITC) a ingrandimento 10x (prime 2 righe) o 4x (ultima riga).*

Sulla base dei risultati ottenuti, le cellule GL261 infettate con HSV-KR sono state nuovamente irradiate, a distanza di 9 giorni dall'infezione, per analizzare gli eventi di mortalità cellulare dovuti alla fotoattivazione in una condizione ancora più avanzata per quanto riguarda l'effetto del virus. In questo caso, poiché Mt-KR agisce accumulando ROS prevalentemente a livello mitocondriale, causando il mal-funzionamento dell'organello e una conseguente apoptosi, si è deciso di valutare se le GL261 infettate e irradiate andassero incontro a questo tipo di morte cellulare, mediante lo staining della fosfatidilserina extracellulare.

A tale scopo, al termine della fotoattivazione, si è ricorsi allo staining con il reagente Annexin V coniugato al fluoroforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) che è capace di legare, con elevata affinità, la fosfatidilserina la quale, con un fenomeno di flipping, subisce un riarrangiamento di simmetria nella membrana plasmatica, esponendosi sul foglietto esterno, durante le prime fasi dell'apoptosi. L'aggiunta di Annessina V sulle cellule GL261 al termine dell'irradiazione ha fornito un segnale convincente di morte cellulare per apoptosi nella regione irradiata dalla luce laser. Infatti, in corrispondenza dell'area bersagliata, oltre al classico evento di photobleaching, si apprezza l'espressione della fluorescenza verde emessa dal fluoroforo coniugato all'Annessina V e indicatore di apoptosi (si veda Figura 22).



**Figura 22.** *L'irradiamento delle cellule GL261 infettate con HSV-KR induce morte cellulare. Foto di cellule GL261 9 giorni dopo l'infezione con HSV-KR in seguito all'aggiunta del reagente Annexin V, acquisite alla lunghezza d'onda di 561.2 nm e 488 nm (rispettivamente TRITC e FITC) a ingrandimento 10x. Tutte le immagini sono state acquisite al microscopio confocale.*

Anche se si tratta di un esperimento preliminare che manca del controllo costituito dalle cellule non fotoattivate, i risultati ottenuti sono molto promettenti e indicano fortemente, insieme a quelli precedentemente descritti, che l'espressione di Mt-KR, da parte dell'oHSV-1 da noi sviluppato, aumenta l'efficienza del virus ricombinante in termini di effetti sulla vitalità delle cellule tumorali. Inoltre, sembrano suggerire che la morte cellulare indotta sia l'apoptosi, che è una modalità di morte cellulare immunogenica (in inglese "immunogenic cell death") associata al successo dell'oncoviroterapia (Reale A. *et al.*, 2021)

#### **5.4 L'interleuchina 12 murina è efficientemente espressa da una cassetta contenente le due subunità della chemochina separate da un linker GGGGSGGGGS**

Molto del successo terapeutico dell'oncoviroterapia risiede nella capacità dei virus oncolitici di stimolare delle risposte immunitarie verso le cellule tumorali infettate, convertendo il microambiente tumorale “freddo”, con poche cellule immunitarie effettrici, in un ambiente “caldo”, con una maggiore infiltrazione di cellule immunitarie e di citochine. Questo aspetto, infatti, può essere implementato armando i virus oncolitici con dei fattori che inducono lo stesso effetto, quali citochine, chemochine e inibitori del check-point. Dunque, per migliorare l'efficacia terapeutica del virus oncolitico esprime la proteina *Killer Red* indirizzata al mitocondrio, si è pensato di inserire, mediante ricombinazione con BAC mutagenesi, un costrutto contenente la cassetta di espressione dei geni terapeutici IL12 murina e un anticorpo single-chain aPD1 (analogo ai check-point inhibitors approvati per l'uso clinico), in modo da combinare l'attività oncolitica e fotodinamica del virus alla capacità di stimolare il sistema immunitario in vivo.

L'anticorpo a singola catena aPD1 agisce a livello del check-point immunitario della proteina 1 della morte cellulare programmata (PD1) bloccando l'asse PD1/PDL1, in modo da rivitalizzare le cellule T e migliorare significativamente gli effetti antitumorali (Lei Q. *et al.*, 2020). Infatti, PD1 è una proteina transmembrana, espressa sulla superficie delle cellule T, che regola la risposta immunitaria dell'organismo promuovendo l'apoptosi dei linfociti T regolatori in modo da evitare l'eccessiva attivazione delle cellule T (Rezayi M. *et al.*, 2023). Si tratta, infatti, di un importante check-point immunitario che, sebbene serva per prevenire le malattie autoimmuni, interagendo con il ligando PDL1 esposto sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC), può bloccare l'uccisione delle cellule tumorali da parte del sistema immunitario, agevolando la proliferazione tumorale. Infatti, quando le cellule T interagiscono per un lungo periodo con lo stesso antigene tumorale, cominciano a rilasciare IFN- $\gamma$ , il quale regola positivamente l'espressione di PDL1 sulla superficie delle cellule tumorali e l'interazione di PD1 con il ligando PDL1 smorza l'attività antitumorale delle cellule.

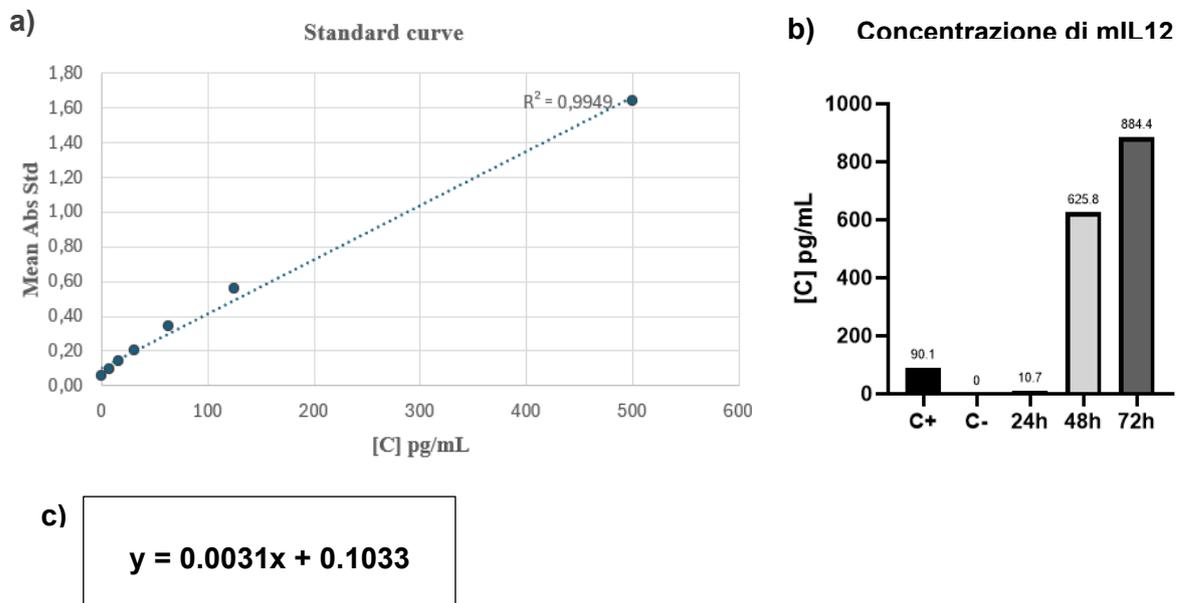
L'interleuchina 12 (IL12), invece, è una citochina glicosilata che funge da ponte tra la risposta immunitaria innata e adattativa, rappresentando un promettente agente terapeutico. Si tratta di un eterodimero costituito dalle subunità IL12A e IL12B, codificate rispettivamente dai geni *IL-12a* e *IL-12b*, e legate covalentemente da un ponte disolfuro (Tait Wojno E. D. *et al.*, 2019). L'IL12 è prodotta dalle cellule presentanti l'antigene e agisce principalmente stimolando le cellule Natural Killer e le cellule T ad aumentare la loro produzione di INF- $\gamma$ , guidando la risposta immunitaria verso l'attivazione delle cellule Th1 e potenziando la citotossicità cellulare dipendente dagli anticorpi contro le cellule tumorali (Ongaro T. *et al.*, 2021). Possiede inoltre anche un'attività anti-angiogenica, mediata dalla produzione e dal rilascio di INF- $\gamma$ , che blocca la formazione di nuovi vasi sanguigni.

Essendo, quindi, IL12 costituita da due subunità che devono essere entrambe efficientemente espresse affinché la proteina sia funzionale, abbiamo innanzitutto valutato se una sequenza per l'espressione di mIL12, già presente in laboratorio e clonata in un HSV-1 ricombinante, fosse in grado di portare alla produzione e alla secrezione della citochina. In questo virus, HSV-mIL12-sPD1, descritto al paragrafo 3.2, è presente la cassetta di espressione genica dell'interleuchina 12 murina, la quale è costituita dalle sequenze codificanti la subunità B e la subunità A, separate dal linker GGGGSGGGGS, e della versione solubile della proteina 1 di morte cellulare programmata (sPD1). La cassetta contenente i geni terapeutici sopra citati è localizzata nella regione intergenica UL55-UL56, posta sotto al controllo trascrizionale del promotore hCMV.

Abbiamo quindi utilizzato un saggio ELISA commerciale (si veda Paragrafo 4.1.7) per valutare

se le cellule Vero, infettate con HSV-mIL12-sPD1, esprimono la proteina immuno-stimolatoria. I dati ottenuti allo spettrofotometro sono stati riassunti in un grafico (Figura 23, b) che riporta l'assorbanza media misurata nei controlli positivi, nei controlli negativi e nei campioni, a distanza di 24, 48 e 72 ore dall'infezione. Per poter effettuare una valutazione quantitativa, è stata generata una curva standard seguendo le indicazioni fornite dal produttore del kit, in modo da mettere in relazione il valore medio di assorbanza con la concentrazione di mIL12, espressa in pg/mL, presente nel surnatante (Figura 23, a).

Utilizzando infine l'equazione della retta di taratura (Figura 23, c) è stato possibile risalire alla concentrazione di interleuchina 12 murina presente in ogni campione, sostituendo il valore medio dell'assorbanza all'incognita della retta. I risultati hanno evidenziato una significativa capacità da parte delle cellule infettate con HSV-mIL12-sPD1 di esprimere l'interleuchina 12 murina infatti, si nota che, all'aumentare del tempo, aumenta notevolmente la concentrazione di mIL12 che è rilasciata nel surnatante, superiore al punto massimo della curva standard.



**Figura 23.** mIL12 è efficientemente espressa in cellule Vero infettate con HSV-mIL12-sPD1. a) grafico che rappresenta i valori di assorbanza e di concentrazione della curva standard; b) grafico che rappresenta i valori di concentrazione di mIL12 ottenuti per i campioni analizzati attraverso i valori di assorbanza ottenuti e l'equazione della retta di taratura, riportata in (c); c) equazione della retta di taratura.

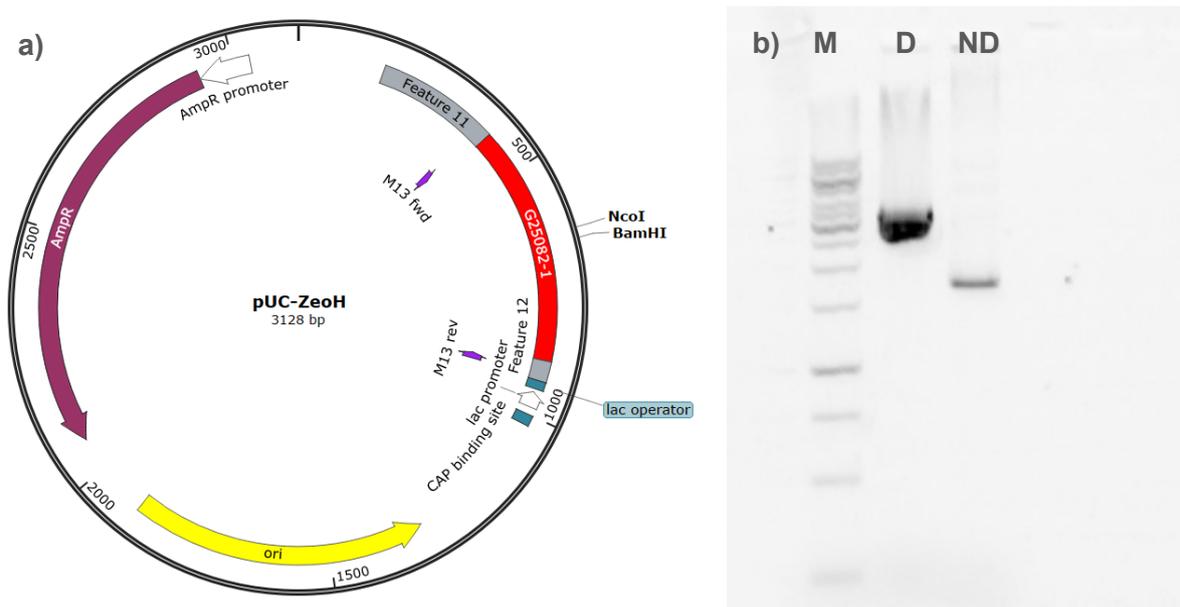
Poiché i risultati raggiunti hanno messo in luce che mIL12 è efficientemente prodotta e secreta a partire dalla sequenza codificante testata, tra l'altro inserita nel genoma virale insieme a un secondo transgene, proprio come nella cassetta che intendiamo generare, abbiamo selezionato questa sequenza codificante per procedere alla generazione di un HSV-KR armato.

### 5.5 Generazione di una serie di plasmidi necessari per ingegnerizzare HSV-KR con una cassetta esprime mIL12-aPD1, sotto il controllo del promotore RFPL4b, inserita nel locus $\gamma34.5$

Per sviluppare un HSV-KR in grado di esprimere mIL12 e aPD1, è stato necessario generare diversi plasmidi al fine di ottenere un costrutto dotato di un promotore e di una sequenza di poliadenilazione, localizzati rispettivamente a monte e a valle della cassetta codificante i geni d'interesse così da garantire la loro corretta espressione.

Inoltre, è stato importante servirsi di un plasmide esprime delle regioni di omologia presenti nel BAC HSV-KR in modo da introdurle nel costrutto finale e consentire gli eventi di ricombinazione omologa durante l'elettroporazione del plasmide nel BAC.

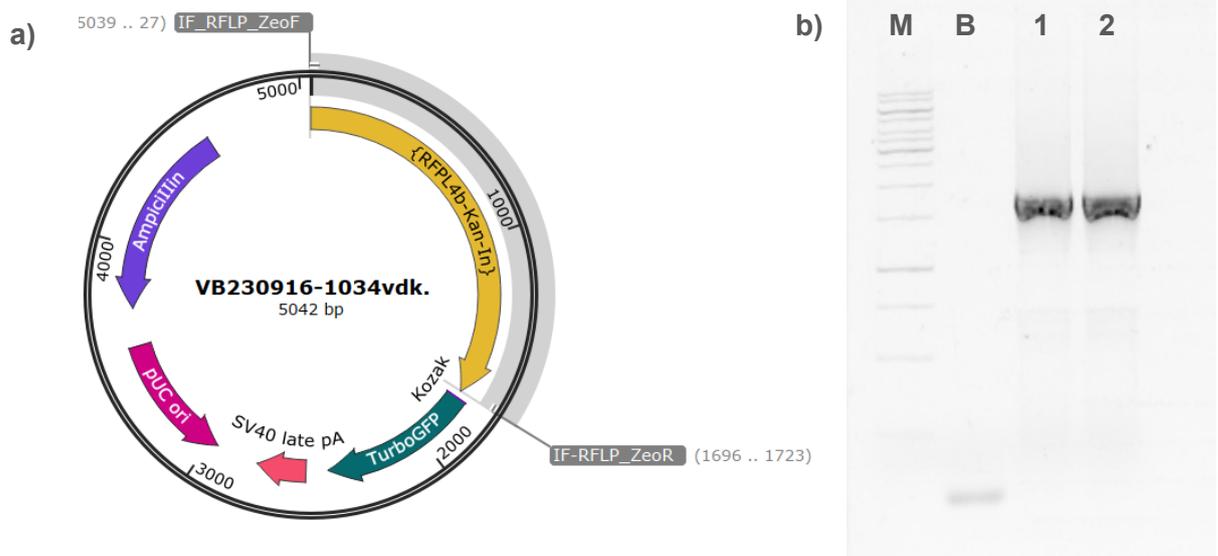
A tal fine, il plasmide pUC ZeoH è stato linearizzato mediante una digestione enzimatica con BamHI e NcoI (Figura 24, pannello a) in modo da esporre le sequenze di omologia per la zeocina, identiche a quelle localizzate nel locus  $\gamma34.5$  delecto del BAC HSV-KR, in cui è stato inserito il gene per la resistenza alla zeocina, ed è stata svolta una corsa elettroforetica su gel d'agarosio per verificare che il vettore sia stato correttamente digerito (Figura 24, pannello b). Poiché gli enzimi tagliano il plasmide in due punti distanziati di sole 13 bp l'uno dall'altro, nel campione digerito si ottiene una singola banda ad alto peso molecolare, con una lunghezza di circa 3000 bp rispetto al marker GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Scientific™) e che corrisponde, come atteso, alla banda di 3115 bp. Nel campione non digerito compare invece una banda compresa tra 1500-2000 bp perché corrisponde alla forma superavvolta del plasmide non tagliato che, essendo più compatto, ha maggior mobilità elettroforetica.



**Figura 24. Digestione di pUC-ZeoH.** a) mappa del plasmide pUC-ZeoH riportante i siti di taglio degli enzimi NcoI e BamHI; b) immagine rappresentativa della corsa elettroforetica del marker GeneRuler 1 kb (M), pUC-ZeoH digerito (D) e non digerito (ND).

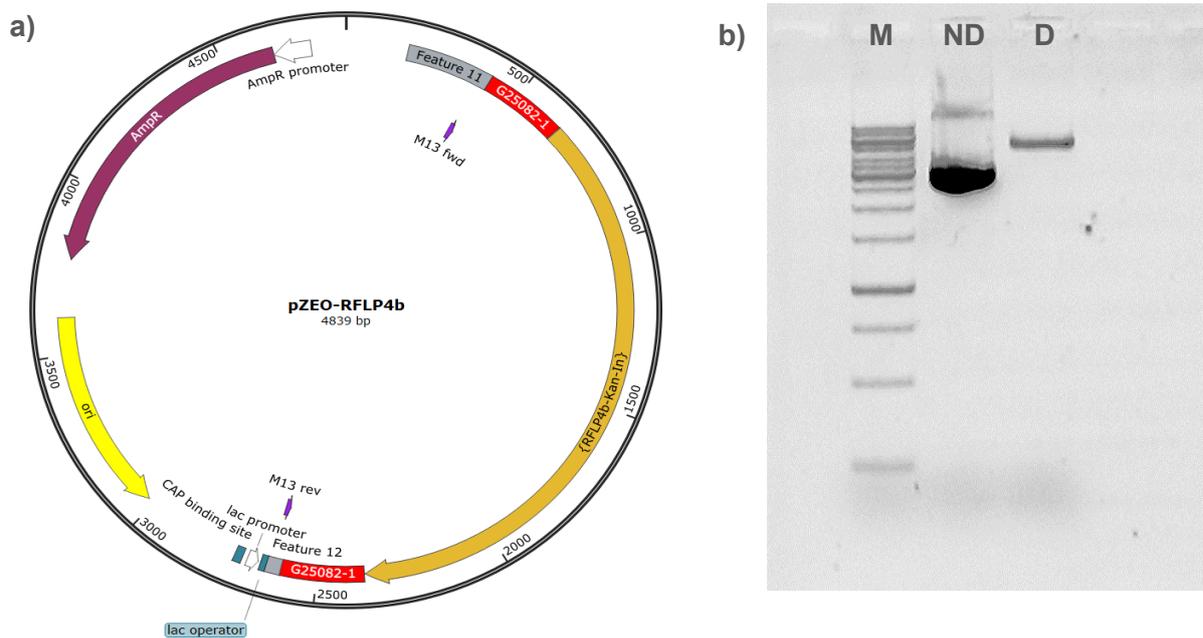
Il plasmide VB230916-1034vdk, abbreviato in VB-RFPL4b, contiene la sequenza del promotore umano RFPL4b. VB-RFPL4b è stato linearizzato con l'enzima AhdI per facilitare l'amplificazione in PCR della sequenza del promotore RFPL4b mediante i primer IF\_RFPL\_ZeoH forward e reverse (riportati in Tabella 3), i quali generano un frammento di PCR

dotato anche di una regione di circa 15 bp che si sovrappone alle estremità presenti nel vettore pUC ZeoH linearizzato. Il prodotto di PCR, ottenuto e digerito con l'enzima DpnI per eliminare il DNA plasmidico (metilato) residuo, è stato oggetto di una corsa elettroforetica di estrazione da gel, condotta in duplicato da cui è stato purificato il frammento RFPL4b, il quale possiede all'interno un gene di resistenza batterico all'antibiotico kanamicina e ha dimensioni di 1765 bp. Come riportato nella foto del gel della corsa elettroforetica (Figura 25, pannello b), si osserva che entrambi i campioni caricati hanno generato una banda di peso molecolare compreso tra 1500-2000 bp, come atteso.



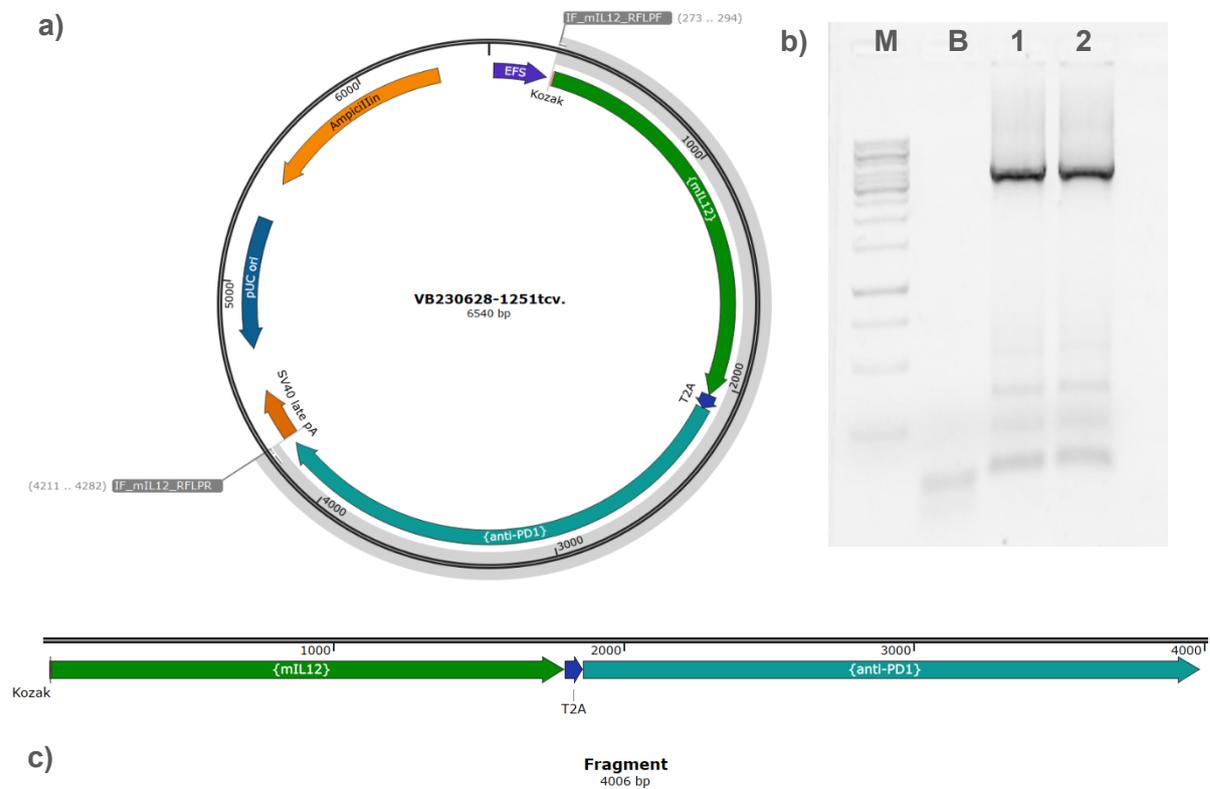
**Figura 25. Amplificazione mediante PCR della sequenza RFPL4b del plasmide VB230916-1034vdk. a)** mappa del plasmide VB230916-1034vdk con evidenziata la regione contenente la sequenza del promotore RFPL4b che verrà amplificata attraverso PCR; **b)** corsa elettroforetica del marker Gene Ruler 1 kb (M), del bianco di PCR (B) e del prodotto di PCR in duplicato (1, 2).

Ottenuti l'inserto e il vettore, rappresentati rispettivamente dal prodotto di PCR contenente il promotore RFPL4b e dal plasmide pUC ZeoH linearizzato, è stato svolto un clonaggio attraverso la metodologia In-Fusion (TakaraBio) per sintetizzare il plasmide pZeo-RFPL4b (Figura 26, pannello a), il quale è stato successivamente sottoposto alla digestione enzimatica con EcoRV e NotI per essere linearizzato. Infatti, sarà necessario disporre del costrutto pZeo-RFPL4b linearizzato per poter allestire il secondo clonaggio In-Fusion con la sequenza mL12-aPD1. Per valutare se la digestione enzimatica fosse stata eseguita correttamente, il prodotto di clonaggio digerito e non digerito è stato caricato su un gel di agarosio. Poiché gli enzimi selezionati tagliano il costrutto in due punti separati da sole 17 bp, nel campione digerito è attesa una singola banda di 4822 bp e se ne ottiene infatti una posizionata tra le 4000-5000 bp, mentre nel campione non digerito si osserva la presenza di una banda più bassa, localizzata tra le 3000-4000 bp, a causa della forma superavvolta del plasmide (Figura 26, pannello b).



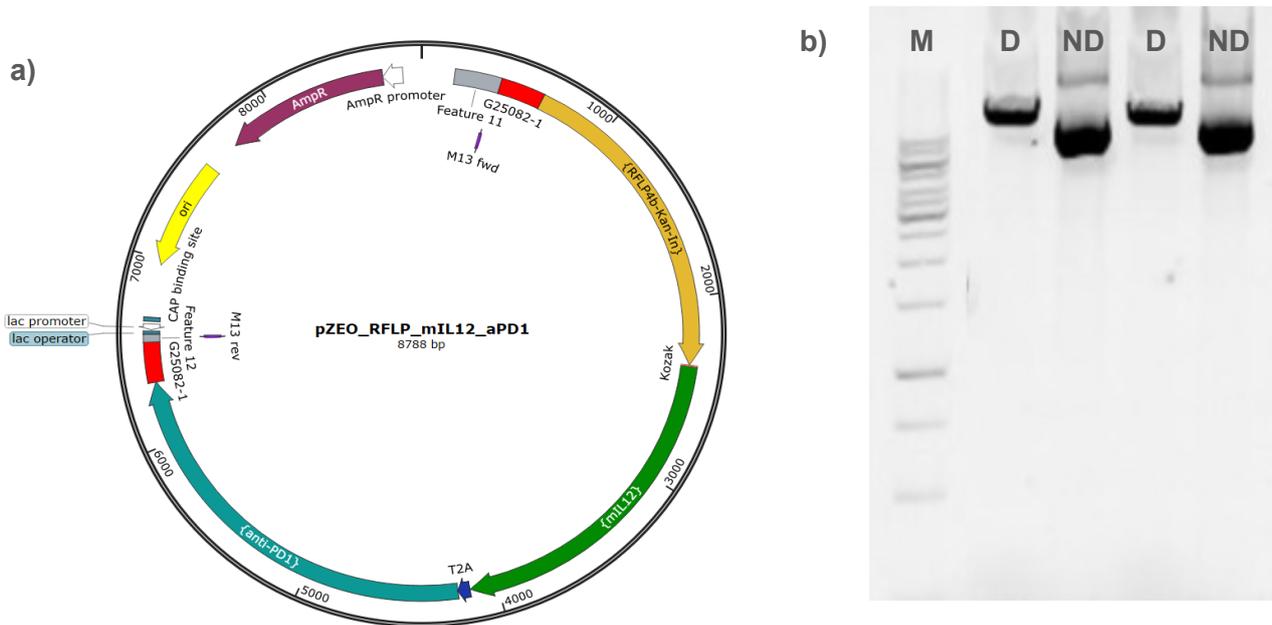
**Figura 26.** Clonaggio attraverso metodologia *In-Fusion* che porta allo sviluppo del plasmide *pZeo-RFPL4b*. **a)** mappa del plasmide *pZeo-RFPL4b*; **b)** immagine rappresentativa della corsa elettroforetica del marker *Gene Ruler 1 kb* (M), di *pZeo-RFPL4b* digerito (D) e del non digerito (ND).

Inoltre, per ottenere i geni terapeutici d'interesse, la cassetta di espressione *mIL12-aPD1*, localizzata all'interno del plasmide *VB230628-1251tcv*, è stata amplificata in PCR mediante i primer *IF\_mIL12RFLP* forward e reverse (riportati in Tabella 3), i quali hanno permesso di generare un prodotto di PCR che presenta alle estremità una breve sequenza di sovrapposizione con il promotore *RFPL4b* (Figura 27, pannello a). Eseguita la digestione con l'enzima *DpnI*, il frammento *mIL12-aPD1* è stato caricato in duplicato su un gel d'agarosio per esaminare la dimensione dell'amplicone ottenuto e, come atteso, è stata osservata la formazione di una banda con peso molecolare di 4000 bp (Figura 27, pannello b).



**Figura 27. Amplificazione mediante PCR della sequenza mIL12-aPD1 del plasmide VB230628-1251tcv.** a) mappa del plasmide VB230628-1251tcv con evidenziata la regione contenente i geni terapeutici mIL12-aPD1 amplificato in PCR; b) corsa elettroforetica del marker Gene Ruler 1 kb (M), del bianco (B) e del prodotto di PCR in duplicato (1, 2); c) rappresentazione schematica del prodotto di PCR.

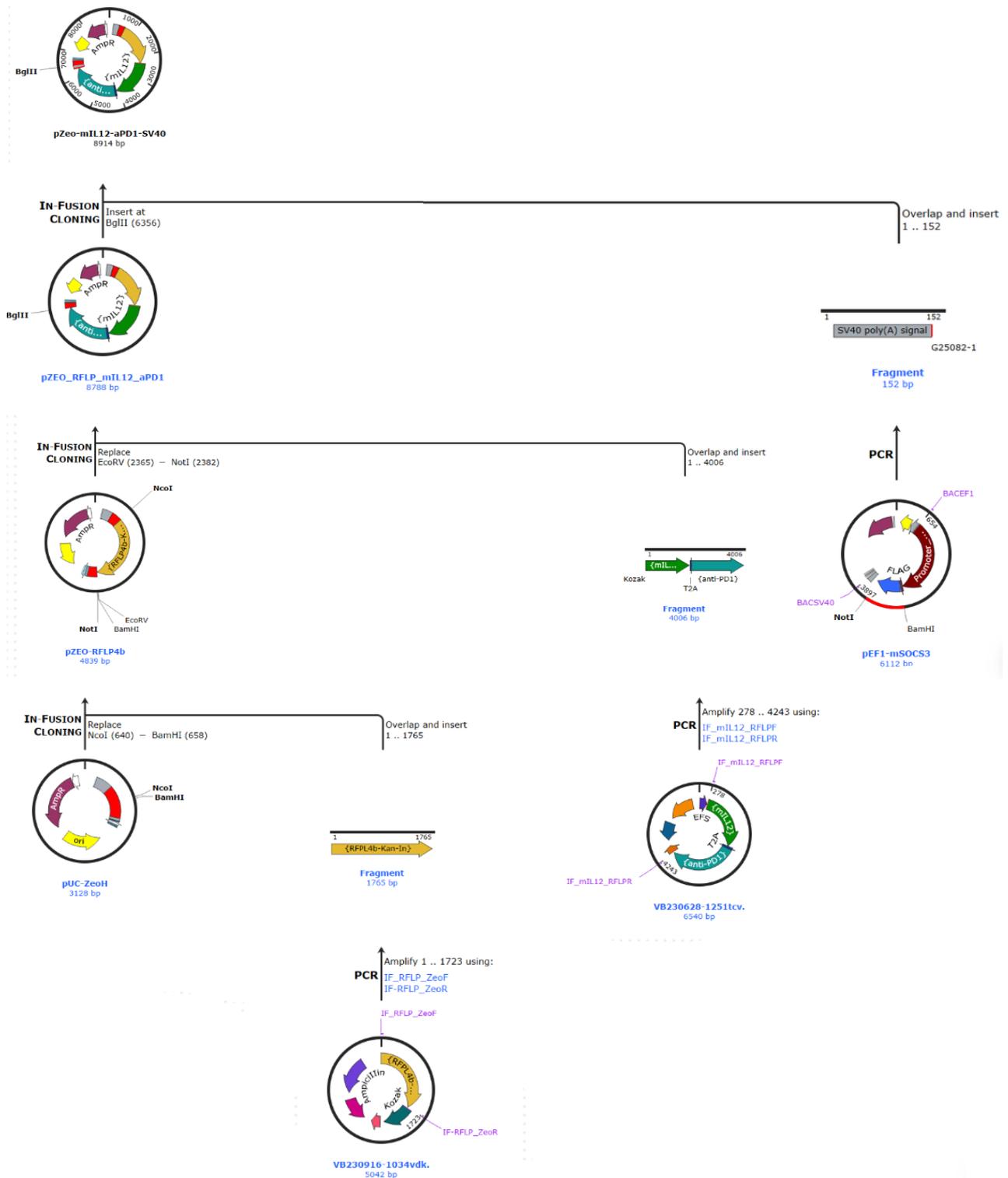
Il prodotto di PCR della cassetta di espressione mIL12-aPD1 e il costrutto pZeo-RFPL4b linearizzato, sono stati quindi utilizzati rispettivamente con la funzione di inserto e di vettore nell'allestimento di un secondo clonaggio mediante metodologia In-Fusion (TakaraBio) che ha portato alla sintesi del costrutto pZeo-RFPL-mIL12-aPD1 (Figura 28, pannello a). Questo possiede il promotore RFPL4b, posizionato a monte della sequenza codificante i geni terapeutici *mIL12* e *aPD1*, e le sequenze di omologia uguali a quelle presenti nel BAC HSV-KR. Per accertare che sia avvenuto il corretto inserimento dell'inserto nel vettore, il prodotto di clonaggio è stato sottoposto a una digestione enzimatica, seguita dalla corsa elettroforetica, ad opera dell'enzima SphI. Poiché l'enzima taglia l'inserto in due punti differenti e distanti, nel campione tagliato ci si aspetta di osservare la formazione di due bande, una con peso molecolare di 6482 bp e l'altra di 2306 bp. Tuttavia, il DNA digerito mostra un pattern non atteso (Figura 28, pannello b). Infatti, mentre la banda di 6482 bp è posizionata giustamente nella parte alta del gel, compresa tra le 6000-8000 bp, la banda a basso peso molecolare non è visibile (Figura 28, pannello b).



**Figura 28. Clonaggio attraverso tecnica In-Fusion con sviluppo del plasmide pZeo-RFPL-mIL12-aPD1.**  
**a)** mappa del costruito pZeo-RFPL-mIL12-aPD1; **b)** corsa elettroforetica in duplicato di pZeo-RFPL-mIL12-aPD1 digerito (D) con *SphI* e non digerito (ND). M rappresenta il marker GeneRuler 1 kb.

Infine, la sequenza di poli-adenilazione “SV40 poliA” è stata amplificata in PCR, utilizzando i primer IF\_SV40\_pZeo forward e reverse, dal plasmide pEF1-mSOCS3 per essere posizionata a valle della cassetta mIL12-aPD1 e permettere la corretta sintesi del mRNA e, attualmente, stiamo completando il clonaggio di questo plasmide. Questo sarà, infatti, linearizzato a valle dei geni mIL12-aPD1 per consentire il corretto inserimento della sequenza di poli-adenilazione SV40 poliA.

Successivamente i costrutti ottenuti saranno utilizzati per generare il plasmide pZeo-mIL12-aPD1-SV40 dotato del promotore umano RFPL4b, della cassetta di espressione dei geni terapeutici dell’interleuchina 12 murina e dell’anticorpo a singola catena aPD1, della sequenza di poli-adenilazione SV40 poliA e delle sequenze di omologia che mappano nella regione del BAC HSV-KR, in corrispondenza del locus deletato, in cui è stato inserito il gene per la resistenza alla zeocina (si veda Figura 29). Infatti, il costruito finale pZeo-mIL12-aPD1-SV40, mediante la tecnica della Red ricombinasi (vedi Paragrafo 3.2), dovrà essere inserito nel BAC che contiene il genoma di HSV-KR, per migliorare l’efficacia terapeutica del virus oncolitico, incrementando la stimolazione della risposta immunitaria verso le cellule tumorali.



**Figura 29. Schema riassuntivo dello sviluppo del plasmide pZeo-mIL12-aPD1-SV40.**

Partendo dal fondo dell'immagine e risalendo la figura, la sequenza RFPL4b del plasmide VB230916-1034vdk è amplificata in PCR e sottoposta a un clonaggio In-Fusion con il vettore pUC-ZeoH linearizzato, per generare il plasmide pZeo-RFPL4b. La sequenza mIL12-aPD1 del plasmide VB230628-1251tcv è amplificata in PCR e clonata nel vettore pZeo-RFPL4b linearizzato, per generare il plasmide pZeo-

*RFPL4b-mIL12-aPD1. La sequenza di poli-adenilazione SV40 poliA è amplificata in PCR dal plasmide pEF1-mSOCS3 e sottoposta al clonaggio In-Fusion con il vettore pZeo-RFPL4b-mIL12-aPD1 linearizzato, per generare il costrutto pZeo-mIL12-aPD1-SV40.*

## 6. CONCLUSIONI

La viroterapia oncolitica, che si basa sullo sviluppo di virus oncolitici ingegnerizzati, costituisce un ramo innovativo del trattamento dei tumori, volto a colpire selettivamente le cellule neoplastiche preservando i tessuti sani. In questo progetto di tesi sono stati discussi gli effetti dell'Herpes Simplex Virus di tipo 1 sulle cellule tumorali di glioblastoma murino combinando l'attività oncolitica del virus alla capacità citotossica della proteina Killer Red, con cui è stato armato, con l'obiettivo di riuscire ad eliminare tutte le cellule tumorali che, a causa dell'elevata eterogeneità del glioblastoma, sono sfuggite alla citolisi indotta dal virus. Abbiamo osservato che il virus esprimente Killer Red riesce a infettare e indurre l'espressione della proteina terapeutica nelle cellule tumorali di glioblastoma, generando degli eventi di mortalità cellulare in assenza e in presenza della fotoattivazione. In presenza di fotoattivazione, abbiamo osservato un aumento dei marcatori di apoptosi precoce. Nonostante la terapia fotodinamica costituisca ad oggi un trattamento clinico approvato per la cura del melanoma avanzato chirurgicamente non resecabile, rimane aperta la questione legata all'accessibilità della tecnica per il trattamento in vivo dei tumori solidi, come il glioblastoma. Infatti, sebbene la terapia fotodinamica sia descritta come un approccio minimamente invasivo, rimangono da definire quali metodi utilizzare per procedere con l'irradiazione ripetuta nel tempo della proteina Killer Red. Una strategia utilizzata ad oggi per il trattamento in toto del glioblastoma, mediata dalla terapia fotodinamica, ricorre all'impiego di una cannula guida che viene fissata, mediante una craniotomia, nel cranio del topo e al cui interno si inserisce una sottile fibra ottica impiantabile, posizionando l'estremità interna della fibra in prossimità del tumore. L'estremità esterna della fibra ottica invece, essendo collegata a un cavo che funge da connettore, è accoppiata alla sorgente luminosa e favorisce il passaggio del laser, responsabile della fotoattivazione della proteina KR.

Il virus HSV-1 ingegnerizzato con la triplice delezione e armato con la proteina Killer-Red è stato anche oggetto di studio per valutare come l'inserimento nel genoma delle sequenze target del mir124 influenzino la capacità del virus di replicarsi e di diffondere nelle cellule tumorali di glioblastoma murino. L'aggiunta nel genoma della attenuazione mir124, mirata alle cellule neuronali, costituisce infatti un evento importante per aumentare il profilo di biosicurezza del virus e limitare la replicazione virale alle sole cellule tumorali, preservando le cellule neuronali da una possibile infezione da parte di HSV-1.

Infine, poiché è noto che uno dei principali meccanismi d'azione dei virus oncolitici per il trattamento del cancro è la capacità di stimolare il sistema immunitario per convertire il microambiente tumorale freddo in una regione ricca di cellule immunitarie, sono stati eseguiti degli esperimenti finalizzati all'inserimento della cassetta di espressione dei geni terapeutici mIl12-aPD1 nel genoma di HSV-KR neuro-attenuato. Combinando quindi l'attività oncolitica e fotodinamica all'immunoterapia, è possibile potenziare la risposta immunitaria dell'organismo al trattamento antitumorale.

Sebbene i diversi approcci per il trattamento del glioblastoma affrontati in questo progetto di tesi siano ancora in fase di sviluppo e mostrino delle criticità, presentano anche delle potenzialità che, se combinate insieme, possono essere sfruttate per fornire un valore aggiunto nel trattamento dei tumori solidi, come il glioblastoma, rispetto al loro utilizzo singolo. Diventa infatti sempre più importante ampliare le conoscenze sui meccanismi d'azione dei tumori, dei virus e delle cellule coinvolte nel sistema immunitario per poter intervenire su più fronti contemporaneamente, in modo da ottenere dei risultati terapeutici amplificati.



## 7. BIBLIOGRAFIA

- Aldrak N, Alsaab S, Algethami A, Bhere D, Wakimoto H, Shah K, Alomary MN, Zaidan N. Oncolytic Herpes Simplex Virus-Based Therapies for Cancer. *Cells*. 2021 Jun 18;10(6):1541. doi: 10.3390/cells10061541. PMID: 34207386; PMCID: PMC8235327.
- Caldwell BJ, Bell CE. Structure and mechanism of the Red recombination system of bacteriophage  $\lambda$ . *Prog Biophys Mol Biol*. 2019 Oct;147:33-46. doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2019.03.005. Epub 2019 Mar 21. PMID: 30904699; PMCID: PMC8054440.
- D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int*. 2019 Jun;43(6):582-592. doi: 10.1002/cbin.11137. Epub 2019 Apr 25. PMID: 30958602.
- Denes CE, Everett RD, Diefenbach RJ. Tour de Herpes: Cycling Through the Life and Biology of HSV-1. *Methods Mol Biol*. 2020;2060:1-30. doi: 10.1007/978-1-4939-9814-2\_1. PMID: 31617170.
- Donohoe C, Senge MO, Arnaut LG, Gomes-da-Silva LC. Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2019 Dec;1872(2):188308. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.07.003. Epub 2019 Aug 8. PMID: 31401103.
- Fatima M, Amraiz D, Navid MT. Oncolytic Virotherapy. *Cancer Treat Res*. 2023;185:105-126. doi: 10.1007/978-3-031-27156-4\_7. PMID: 37306907.
- Hamad A, Yusubalieva GM, Baklaushev VP, Chumakov PM, Lipatova AV. Recent Developments in Glioblastoma Therapy: Oncolytic Viruses and Emerging Future Strategies. *Viruses*. 2023 Feb 16;15(2):547. doi: 10.3390/v15020547. PMID: 36851761; PMCID: PMC9958853.
- Kaufman HL, Kohlhapp FJ, Zloza A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov*. 2015 Sep;14(9):642-62. doi: 10.1038/nrd4663. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2016 Aug 30;15(9):660. doi: 10.1038/nrd.2016.178. PMID: 26323545; PMCID: PMC7097180.
- Knipe. D. M.; Howley. P.; *Fields Virology, Volume 2*; Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
- Kohlhapp FJ, Kaufman HL. Molecular Pathways: Mechanism of Action for Talimogene Laherparepvec, a New Oncolytic Virus Immunotherapy. *Clin Cancer Res*. 2016 Mar 1;22(5):1048-54. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-15-2667. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26719429.
- Kuznetsova DS, Shirmanova MV, Dudenkova VV, Subochev PV, Turchin IV, Zagaynova EV, Lukyanov SA, Shakhov BE, Kamensky VA. Photobleaching and phototoxicity of KillerRed in tumor spheroids induced by continuous wave and pulsed laser illumination. *J Biophotonics*. 2015 Nov;8(11-12):952-60. doi: 10.1002/jbio.201400130. Epub 2015 Feb 3. PMID: 25648724.
- Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, Kotlińska J, Michel O, Kotowski K, Kulbacka J. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed Pharmacother*. 2018 Oct;106:1098-1107. doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049. Epub 2018 Jul 17. PMID: 30119176.

- Lei Q, Wang D, Sun K, Wang L, Zhang Y. Resistance Mechanisms of Anti-PD1/PDL1 Therapy in Solid Tumors. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Jul 21;8:672. doi: 10.3389/fcell.2020.00672. PMID: 32793604; PMCID: PMC7385189.
- Lester JT, DeLuca NA. Herpes simplex virus 1 ICP4 forms complexes with TFIID and mediator in virus-infected cells. *J Virol.* 2011 Jun;85(12):5733-44. doi: 10.1128/JVI.00385-11. Epub 2011 Mar 30. PMID: 21450820; PMCID: PMC3126299.
- Li W, Yang J, Luo L, Jiang M, Qin B, Yin H, Zhu C, Yuan X, Zhang J, Luo Z, Du Y, Li Q, Lou Y, Qiu Y, You J. Targeting photodynamic and photothermal therapy to the endoplasmic reticulum enhances immunogenic cancer cell death. *Nat Commun.* 2019 Jul 26;10(1):3349. doi: 10.1038/s41467-019-11269-8. PMID: 31350406; PMCID: PMC6659660.
- Li X, Fang F, Gao Y, Tang G, Xu W, Wang Y, Kong R, Tuyihong A, Wang Z. ROS Induced by KillerRed Targeting Mitochondria (mtKR) Enhances Apoptosis Caused by Radiation via Cyt c/Caspase-3 Pathway. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Mar 7;2019:4528616. doi: 10.1155/2019/4528616. PMID: 30984335; PMCID: PMC6431512.
- Liu J, Wang F, Qin Y, Feng X. Advances in the Genetically Engineered KillerRed for Photodynamic Therapy Applications. *Int J Mol Sci.* 2021 Sep 20;22(18):10130. doi: 10.3390/ijms221810130. PMID: 34576293; PMCID: PMC8468639.
- Ma R, Li Z, Chiocca EA, Caligiuri MA, Yu J. The emerging field of oncolytic virus-based cancer immunotherapy. *Trends Cancer.* 2023 Feb;9(2):122-139. doi: 10.1016/j.trecan.2022.10.003. Epub 2022 Nov 17. PMID: 36402738; PMCID: PMC9877109.
- Mohiuddin E, Wakimoto H. Extracellular matrix in glioblastoma: opportunities for emerging therapeutic approaches. *Am J Cancer Res.* 2021 Aug 15;11(8):3742-3754. PMID: 34522446; PMCID: PMC8414390.
- Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas: A Clinical Review. *JAMA.* 2013;310(17):1842–1850. doi:10.1001/jama.2013.280319.
- Ongaro T, Guarino SR, Scietti L, Palamini M, Wulhfard S, Neri D, Villa A, Forneris F. Inference of molecular structure for characterization and improvement of clinical grade immunocytokines. *J Struct Biol.* 2021 Mar;213(1):107696. doi: 10.1016/j.jsb.2021.107696. Epub 2021 Jan 23. PMID: 33493635.
- Reale A, Calistri A, Altomonte J. Giving Oncolytic Viruses a Free Ride: Carrier Cells for Oncolytic Virotherapy. *Pharmaceutics.* 2021 Dec 18;13(12):2192. doi: 10.3390/pharmaceutics13122192. PMID: 34959474; PMCID: PMC8709025.
- Rezayi M, Hosseini A. Structure of PD1 and its mechanism in the treatment of autoimmune diseases. *Cell Biochem Funct.* 2023 Oct;41(7):726-737. doi: 10.1002/cbf.3827. Epub 2023 Jul 20. PMID: 37475518.
- Rius-Rocabert S, García-Romero N, García A, Ayuso-Sacido A, Nistal-Villan E. Oncolytic Virotherapy in Glioma Tumors. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 14;21(20):7604. doi: 10.3390/ijms21207604. PMID: 33066689; PMCID: PMC7589679.
- Scanlan H, Coffman Z, Bettencourt J, Shipley T, Bramblett DE. Herpes simplex virus 1 as an oncolytic viral therapy for refractory cancers. *Front Oncol.* 2022 Jul 27;12:940019. doi: 10.3389/fonc.2022.940019. PMID: 35965554; PMCID: PMC9364694.
- Shimizu K, Kahramanian A, Jabbar MADA, Turna Demir F, Gokyer D, Uthamacumaran A, Rajan A, Saad MA, Gorham J, Wakimoto H, Martuza RL, Rabkin SD, Hasan T, Wakimoto H. Photodynamic augmentation of oncolytic virus therapy for central nervous

- system malignancies. *Cancer Lett.* 2023 Sep 28;572:216363. doi: 10.1016/j.canlet.2023.216363. Epub 2023 Aug 22. PMID: 37619813; PMCID: PMC10529118.
- Tait Wojno ED, Hunter CA, Stumhofer JS. The Immunobiology of the Interleukin-12 Family: Room for Discovery. *Immunity.* 2019 Apr 16;50(4):851-870. doi: 10.1016/j.immuni.2019.03.011. PMID: 30995503; PMCID: PMC6472917.
  - Tan E, Chin CSH, Lim ZFS, Ng SK. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021 Dec 13;9:796991. doi: 10.3389/fbioe.2021.796991. PMID: 34966729; PMCID: PMC8711270.
  - Tang G, Wang D, Zhao X, Feng Z, Chen Q, Shen Y. The Dilemma of HSV-1 Oncolytic Virus Delivery: The Method Choice and Hurdles. *Int J Mol Sci.* 2023 Feb 12;24(4):3681. doi: 10.3390/ijms24043681. PMID: 36835091; PMCID: PMC9962028.
  - Telikani Z, Monson EA, Hofer MJ, Helbig KJ. Antiviral response within different cell types of the CNS. *Front Immunol.* 2022 Nov 15;13:1044721. doi: 10.3389/fimmu.2022.1044721. PMID: 36458002; PMCID: PMC9706196.
  - Vitiello A, Reale A, Conciatori V, Vicco A, Garzino-Demo A, Palù G, Parolin C, von Einem J, Calistri A. Simultaneous Expression of Different Therapeutic Genes by Infection with Multiple Oncolytic HSV-1 Vectors. *Biomedicines.* 2024 Jul 16;12(7):1577. doi: 10.3390/biomedicines12071577. PMID: 39062150; PMCID: PMC11274547.
  - Yoshikawa T, Misu M, Kurosu T, Takamatsu Y, Sugimoto S, Shimojima M, Ebihara H, Saijo M. Markerless bacterial artificial chromosome manipulation method by red proteins of phage  $\lambda$  mediated homologous recombination utilizing fluorescent proteins for both positive and counter selection. *Heliyon.* 2023 Aug 7;9(8):e18983. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e18983. PMID: 37600421; PMCID: PMC10432722.
  - Zhu S, Viejo-Borbolla A. Pathogenesis and virulence of herpes simplex virus. *Virulence.* 2021 Dec;12(1):2670-2702. doi: 10.1080/21505594.2021.1982373. PMID: 34676800; PMCID: PMC8923070.