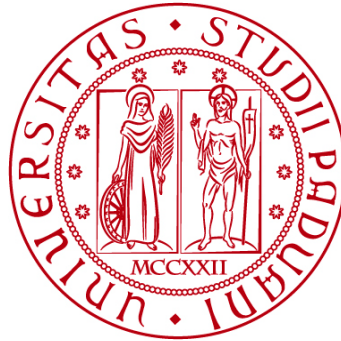


UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Validazione in vitro di agenti oncolitici basati su
virus dell'Herpes simplex di tipo 1 esprimenti
KillerRed per il trattamento del glioblastoma**

**Tutor: Prof.ssa Arianna Calistri
Dipartimento di Medicina Molecolare - DDM**

**Co-tutor: Dott. Alberto Reale
Dipartimento di Medicina Molecolare - DDM**

**Co-tutor: Dott.ssa Chiara Aiello
Dipartimento di Fisica e Astronomia "G. Galilei"**

Laureanda: Aurora Bordignon

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

1. Abstract.....	3
2. Introduzione.....	5
2.1. Glioblastoma.....	5
2.2. Viroterapia oncolitica.....	5
2.3. Il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1).....	6
2.4. HSV-1 come agente oncolitico.....	7
2.5. Terapia fotodinamica e proteina KillerRed (KR).....	8
3. Scopo della tesi.....	11
4. Materiali e metodi.....	13
4.1. Materiali.....	13
4.1.1. Terreni di coltura.....	13
4.1.2. Linee cellulari.....	13
4.1.3. Virus oncolitico.....	13
4.2. Metodi.....	14
4.2.1. Saggio di infezione con HSV-1 delle cellule LN-229.....	14
4.2.2. Saggio a placche per la titolazione virale di HSV-1.....	14
4.2.3. Irradiazione delle LN-229 infettate con oHSV-1-KR e fotoattivazione di KillerRed.....	15
4.2.4. Saggio di vitalità cellulare.....	16
5. Risultati.....	17
5.1. Le LN-229 sono suscettibili all'infezione con hsv-1-KR-Mir124.....	17
5.2. Validazione della vitalità cellulare in seguito a fotoattivazione di KR.....	19
6. Conclusioni e discussione.....	21
7. Bibliografia.....	25
Ringraziamenti.....	27

1. Abstract

La viroterapia oncolitica è una emergente strategia clinica che consiste nell'impiego di virus capaci di infettare selettivamente le cellule tumorali al fine di indurne la morte per lisi. L'obiettivo di questa tesi è quello di combinare l'effetto citotossico degli agenti oncolitici con la terapia fotodinamica per il trattamento del glioblastoma, uno fra i tumori cerebrali più aggressivi e ancora difficilmente curabile. Il suddetto lavoro si è concentrato sulla validazione di un agente oncolitico precedentemente prodotto in laboratorio, basato su HSV-1 "armato" con il gene che codifica per la "KillerRed" (KR), una proteina fotosensibilizzante che ad opportune lunghezze d'onda, stimola il rilascio di specie reattive dell'ossigeno (ROS), che causano morte cellulare. Il virus è stato validato nella sua capacità di infettare in vitro la linea cellulare di glioblastoma umano LN-229. I risultati ottenuti dimostrano l'effetto citolitico di oHSV-1-KR sulle LN-229. Inoltre, in questo elaborato ci si è interessati di valutare l'effetto citotossico della KR tramite saggio di vitalità su LN-229 infettate e irradiate. I risultati dimostrano una minore vitalità delle cellule infettate e irradiate, rispetto alle cellule infettate ma non irradiate e ai controlli negativi (non infettati). Questi risultati, seppur preliminari, offrono importanti basi per successivi studi in vivo.

2. Introduzione

2.1 Glioblastoma

Il glioblastoma (GBM) è fra le forme più aggressive di tumore maligno cerebrale ed è stato classificato nel 2007 dall'OMS come glioma di IV grado. Il GBM ha un'incidenza del 3.2 per 100,000 abitanti, con un impatto 1.6 volte superiore nei maschi rispetto alle femmine e 2.0 volte superiore nei caucasici rispetto agli africani e agli afroamericani. Il GBM è associato a una significativa mortalità: pochi pazienti sopravvivono a 2.5 anni e meno del 5% dei pazienti sopravvive a 5 anni dopo la diagnosi (De vleeSchouwer, 2017). I glioblastomi sono comunemente classificati come primari e secondari: i GBM primari hanno un'origine *de novo*, quelli secondari invece, derivano da un'astrocitoma diffuso o anaplastico. I GBM di tipo primario sono più frequenti e sono quelli aventi una prognosi peggiore, spesso si ripresentano come aggressive recidive e risultano essere ancor più resistenti alle cure. Lo *standard of care* consiste nella resezione chirurgica, anche se non sempre è possibile, soprattutto se il tumore ha invaso aree cerebrali funzionali. Per questo la chirurgia è in genere associata a radioterapia e chemioterapia con temozolomide. Nonostante l'avanzamento di terapie antitumorali, il GBM è considerato attualmente incurabile e i pazienti sono soggetti a recidiva. L'aggressività, la rapida progressione tumorale, l'infiltrazione di diverse aree cerebrali, e il microambiente tumorale (*Tumoral Microenvironment*, TME) immunosoppressivo, rappresentano i principali ostacoli allo sviluppo di terapie efficaci. Si pone dunque la necessità di sviluppare nuove strategie terapeutiche che, combinando trattamenti consolidati con nuovi approcci, siano in grado di mirare all'inibizione dell'angiogenesi, all'inibizione delle vie di trasduzione del segnale o all'induzione dell'apoptosi (Szklenner *et al*, 2022).

2.2 Viroterapia oncolitica

La viroterapia oncolitica è una strategia terapeutica innovativa per il trattamento di tumori solidi. La sua origine risiede nei primi anni del Novecento, quando vennero osservati casi di regressione tumorale in seguito a infezione virale. La viroterapia oncolitica consiste nell'utilizzo di virus oncolitici (OV) in grado di infettare selettivamente le cellule tumorali causandone la morte per lisi, senza danneggiare

le cellule sane circostanti. Gli OV possono penetrare sia nelle cellule sane che in quelle tumorali sfruttando recettori presenti sulla superficie cellulare, ma il loro ciclo litico è impedito nelle cellule sane dal fatto che, in queste, i *pathways* di risposta antivirale funzionano correttamente. Al contrario le alterazioni di molte vie di segnalazione intracellulare nelle cellule neoplastiche rendono queste ultime permissive alla replicazione virale e di conseguenza determinano la loro morte per lisi. Esempi di *pathways* alterati sono vie regolate dal rilascio dell'interferone (IFN) e innescate dal contatto tra virus e recettori Toll-like (TLR). I virus possono essere naturalmente oncolitici (nella loro forma *wild type*), ma spesso si tratta di virus modificati geneticamente, in modo da massimizzare la replicazione selettiva in cellule tumorali. Inoltre, gli OV possono essere "armati" con geni terapeutici e al tempo stesso è possibile anche eliminare altri geni come quelli associati alla virulenza per aumentare livelli di sicurezza nel loro impiego clinico. Ad esempio, nel 2015 negli USA e in Europa è stato approvato in clinica il Talimogene Laherparepvec o T-Vec, a partire dal virus dell'herpes simplex di tipo 1 per il trattamento di pazienti di melanoma in stadio avanzato. Questo virus è stato privato della doppia copia del gene associato alla neurovirulenza, $\gamma 34.5$. Gli OV causano la morte delle cellule tumorali attraverso vari meccanismi, tra cui apoptosi, piroptosi e necroptosi (Suryawanashi and Schulze, 2021), che rappresentano morti immunogeniche. Ciò determina il rilascio da parte delle cellule morte di una serie di antigeni associati al tumore (TAAs), associati al danno cellulare (DAMPs) e associati a patogeni (PAMPs), che innescano risposte infiammatorie nel TME. In questo senso gli OV funzionano anche come potenti agenti per l'immunoterapia, andando ad alterare lo stato immunosoppressivo che normalmente si crea nel TME di molti tumori, tra cui il glioblastoma.

2.3 Il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV - 1)

Il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) è un patogeno appartenente alla famiglia *Herpesviridae*, alla sottofamiglia *Alphaherpesvirinae* e al genere *Simplexvirus*. I virioni hanno forma sferica e regolare, con un diametro dai 150 ai 200 nm circa. Questi sono costituiti da un nucleocapside che avvolge il DNA a doppio filamento (dsDNA). Il capside è avvolto da una matrice proteica chiamata tegumento, che a sua volta è circondata da un involucro composto da un doppio

strato lipidico in cui si trovano incorporate delle glicoproteine. Il nucleocapside è icosaedrico e costituito da 162 capsomeri, nel virione si trova in posizione eccentrica ed è caratterizzato da quattro proteine principali, ovvero la proteina principale del capsido (VP5), la proteina dell'impalcatura (pre-VP22a) e il VP19C e VP23 (Arduino and Porter, 2008). Il tegumento invece è uno strato amorfo costituito da circa 26 proteine. L'involucro è formato da un doppio strato fosfolipidico e 11 glicoproteine, 4 delle quali (gD, gH, gL e gB) sono essenziali per l'ingresso dell'HSV nelle cellule. Il genoma di HSV-1 è formato da un dsDNA lineare di circa 152 kb, ricco in GC (~68%). È formato da due segmenti, L (lungo) e S (corto), uniti covalentemente e affiancati da 4 ripetizioni invertite. Esso codifica per 84 polipeptidi necessari per l'ingresso del virus nelle cellule ospiti, per la regolazione dell'espressione genica e per l'imballaggio dei virioni. L'espressione genica è a cascata, ovvero i primi geni ad essere trascritti ed espressi sono i geni immediati precoci (α), i quali sono coinvolti principalmente nella replicazione del genoma virale. Tra questi troviamo il gene ICP4, il quale una volta espresso, permette l'attivazione della trascrizione dei geni precoci (β) e questi dei geni tardivi (γ) che invece codificano prevalentemente per proteine strutturali e per proteine che impediscono al sistema immunitario di riconoscere l'agente patogeno e indurre l'apoptosi cellulare (Kukhanova *et al*, 2014). Tra questi il gene più importante è γ 34.5 che codifica per il principale fattore di neurovirulenza ICP34.5; questa proteina recluta la fosfatasi PP1 e lega il fattore di elongazione eIF2 α , in questo modo favorisce la defosforilazione di eIF2 α da parte di PP1 (Li *et al*, 2011). Ciò è vantaggioso per il patogeno in quanto, quando eIF2 α è nella forma fosforilata determina l'arresto della sintesi delle proteine virali; de-fosforilando il fattore di elongazione invece la sintesi proteica virale può proseguire. ICP34.5 inoltre permette ad HSV-1 di non essere autofagocitato e ciò grazie all'interazione con Beclin1.

2.4 HSV - 1 come agente oncolitico

HSV-1 presenta una serie di caratteristiche che lo rendono un ideale agente oncolitico. Infetta una grande varietà di cellule, ha un ciclo replicativo litico, e presenta un genoma di grandi dimensioni con molte regioni non essenziali per la replicazione, consentendo l'inserimento di transgeni terapeutici senza

compromettere la capacità litica del virus. Il suo genoma non si integra in quello della cellula ospite, limitando il fenomeno di mutagenesi inserzionale. Inoltre, sono disponibili dei farmaci antierpetici come Aciclovir o Vanciclovir. Sono numerosi gli oHSV-1 in fase di studio in ambito preclinico e clinico, e il più importante è il T-Vec, già citato in precedenza. Questo presenta la delezione della doppia copia del gene associato a neurovirulenza γ 34.5. Inoltre, presenta la delezione del gene codificante la proteina ICP47, che inibisce il trasportatore associato alla presentazione dell'antigene attraverso il complesso di maggiore istocompatibilità, con conseguente evasione della risposta immunitaria. Nonostante la delezione del gene associato alla neurovirulenza, il rischio che gli oHSV-1 così modificati possano determinare encefaliti erpetiche acute è ancora alto, e pertanto sono state sviluppate varie strategie per attenuare ulteriormente il virus. Una tra queste consiste nell'utilizzo di microRNA, RNA non codificanti di piccole dimensioni (19-25 nt) che regolano l'espressione genica post trascrizionale. Molti microRNA sono down-regolati in molti tumori, mentre sono ampiamente espressi nei tessuti sani e questo permette di discriminare i due tipi di tessuti. Ad esempio, il miR124 è un microRNA down-regolato nel glioblastoma (Mazzacurati *et al*, 2015).

2.5 Terapia fotodinamica e Proteina KillerRed (KR)

La terapia fotodinamica (*Photodynamic Therapy*, PDT) è un recente trattamento clinico per la cura di malattie neoplastiche e non. Il meccanismo sfrutta tre composti che di loro non sono tossici, ma che usati insieme sono in grado di produrre un effetto citotossico: i) un fotosensitizzatore (PS); ii) uno stimolo luminoso di lunghezza d'onda appropriata; iii) l'ossigeno (Kwiatkowski *et al*, 2018). I PS sono delle molecole in grado di assorbire i fotoni di una precisa lunghezza d'onda ed emettere luce ad una lunghezza d'onda differente, producendo durante la fotoreazione specie reattive dell'ossigeno (ROS). Esistono due meccanismi di reazione fotodinamica. Il primo passaggio è comune ai due meccanismi, e prevede che il PS una volta irradiato alla lunghezza d'onda adeguata al suo spettro di assorbimento, assorba fotoni e passi dallo stato di singoletto (S0) allo stato eccitato (S1). Una parte dell'energia acquisita viene emessa sotto forma di fluorescenza, un'altra parte invece porta il PS allo stato di tripletto eccitato (T1). Il meccanismo di tipo I della reazione fotodinamica, consiste nell'interazione del fotosensitizzatore

sotto forma di T1 con le biomolecole del microambiente tumorale, il trasferimento di elettroni e la generazione di ROS come lo ione superossido (O_2^-) o il radicale idrossile ($\cdot OH$). Se invece il PS allo stato di tripletto eccitato trasferisce energia direttamente verso l'ossigeno si viene a formare l'ossigeno singoletto (1O_2), e questo costituisce il meccanismo di tipo II della reazione fotodinamica. Entrambi i meccanismi contribuiscono alla distruzione selettiva delle cellule tumorali, anche se il loro apporto nel caso specifico è dipendente da molteplici fattori, tra cui la struttura e le proprietà del fotosensitizzatore, il pH e la costante dielettrica tessutale e la concentrazione di ossigeno. In ogni caso le specie reattive dell'ossigeno danno avvio ad una cascata di reazioni che causano lo stress ossidativo di componenti cellulari essenziali, con conseguente morte delle cellule cancerose (Liu *et al*, 2021). Inoltre, la PDT comporta un'azione antitumorale sistemica in quanto determina l'occlusione dei vasi sanguigni tumorali e l'attivazione del sistema immunitario.

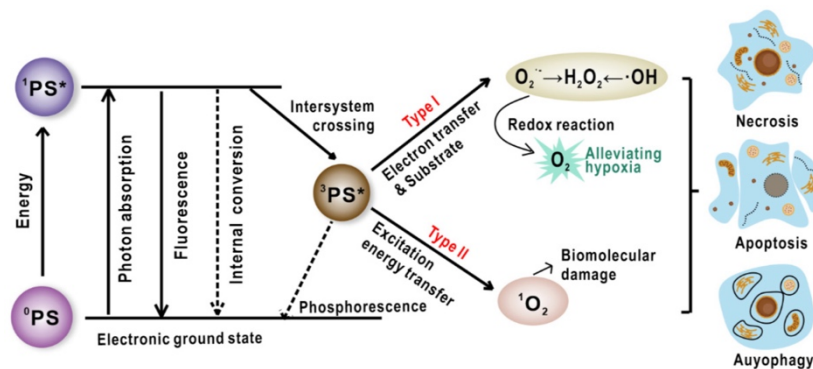


Figura 1: Rappresentazione schematica del meccanismo della reazione fotodinamica (da Liu et al, 2021).

La KillerRed fu la prima proteina fluorescente fototossica ad essere progettata (Bulina *et al*, 2006). È un dimero costituito da un β -barrel che attraverso il proprio asse si lega al cromoforo formando un canale pieno di acqua. Il cromoforo di KR ha massimi di eccitazione a 585 nm (luce verde) ed emissione 610 nm (emette nel rosso). Una volta irradiata con lunghezze d'onda comprese tra 520-590 nm, essa genera quantità di ROS circa 1000 volte maggiori rispetto a quelle prodotte da proteine fluorescenti verdi e rosse (ad es. GFP e DsRed).

3. Scopo della tesi

La viroterapia oncolitica è una promettente strategia per il trattamento di tumori solidi aggressivi e scarsamente responsivi ai trattamenti conosciuti, come il glioblastoma, una neoplasia localizzata nel sistema nervoso centrale (SNC). La viroterapia oncolitica sfrutta agenti virali in grado di replicarsi selettivamente nelle cellule tumorali, determinandone morte per lisi. Il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) è un virus particolarmente pronò a essere trasformato in un agente oncolitico per varie caratteristiche: i) ha un ampio tropismo cellulare, ii) effettua un ciclo litico e causa morte cellulare per lisi, iii) ha un genoma ampio e presenta geni non essenziali che possono essere facilmente eliminati senza compromettere la capacità replicativa del virus, iv) il suo genoma non causa mutagenesi inserzionale nell'ospite, v) il virus può essere controllato con farmaci. Un fattore che limita fortemente l'impiego di HSV-1 come base per lo sviluppo di agenti oncolitici è la sua capacità di determinare gravi encefaliti acute. La possibilità di eliminare la doppia copia del gene associato alla neurovirulenza $\gamma 34.5$ permette di limitare la replicazione del virus alle sole cellule tumorali in modo da aumentare il livello di sicurezza nell'impiego clinico di agenti basati su HSV-1. Sono state sviluppate ulteriori strategie per incrementare l'attenuazione di agenti oncolitici, come quelle basate sui microRNA, piccole sequenze di RNA non codificanti, coinvolte nella regolazione post-trascrizionale e che sono down-regolate in molti tumori. Ad esempio il miR-124 è silenziato a livello epigenetico nel glioblastoma. Inoltre il genoma di HSV-1 può essere "armato" con una vasta gamma di transgeni terapeutici e questo permette di combinare la viroterapia oncolitica con altre strategie di trattamento di molte neoplasie maligne, come ad esempio la terapia fotodinamica (*Photodynamic Therapy*, PDT). La PDT è una terapia moderna non invasiva che consiste nella stimolazione luminosa a opportune lunghezze d'onda di un fotosensitizzatore, per attivare una cascata di produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che causano danno cellulare inducendo le cellule tumorali verso morte per apoptosi e necrosi. In particolare, questo elaborato di Tesi si inserisce all'interno di un progetto più ampio, finanziato dall'Agenzia Italiana Ricerca Cancro, il cui scopo è combinare la viroterapia oncolitica con la terapia fotodinamica.

In questo progetto di Tesi è stato impiegato agente oncolitico (oHSV-1) precedentemente sviluppato in laboratorio in modo da possedere lo stesso *backbone* del T-Vec, un oHSV-1 già approvato in Europa e negli USA per il trattamento del melanoma avanzato. Il genoma di questo virus è delecto nei geni γ 34.5 e in US12 che codifica per la proteina coinvolta nell'immuno-evasione del virus *wild type*. Nell'ottica di coniugare viroterapia oncolitica e terapia fotodinamica, il genoma del virus impiegato in questa Tesi è armato con il gene che codifica per il fotosensitizzatore Killer Red. Inoltre, il virus reca nella regione 3' UTR del gene UL29, tre copie delle sequenze target delle isoforme del microRNA124. Quindi si è valutato il potenziale replicativo di oHSV-1-KR-miR124 all'interno di una linea cellulare di glioblastoma umano (LN-229). Inoltre, è stato performato un esperimento di fotoattivazione al fine di validare le proprietà della proteina KillerRed come fotosensitizzatore unitamente all'attività citolitica del virus.

4. Materiali e metodi

4.1 Materiali

4.1.1 Terreni di coltura

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) è un terreno di coltura derivante dal Basal Medium Eagle (BME), ma contenente circa quattro volte più vitamine e aminoacidi. La formulazione originale del DMEM conteneva una bassa concentrazione di glucosio (1 g/L) e piruvato di sodio. Tuttavia, il DMEM è ora disponibile in una varietà di formulazioni, comprese quelle con livelli di glucosio più elevati e con o senza piruvato di sodio. Questo terreno viene in genere addizionato con il siero bovino fetale (**FBS**), ovvero un sottoprodotto della raccolta del bestiame che viene utilizzato come integratore alla crescita e mantenimento delle cellule in coltura, in quanto offre fattori di crescita essenziali quali proteine, oligoelementi, vitamine e ormoni.

4.1.2 Linee Cellulari

Vero (ATCC ® CCL-81™) sono cellule epiteliali derivate da tessuto renale della scimmia verde africana (*Cercopithecus aethiops*). Spesso vengono utilizzate in quanto possono essere oggetto di varie applicazioni; sono un ospite adatto alle trasfezioni virali in quanto non presentano una risposta antivirale di tipo interferonico.

LN-299 (ATCC ® CRL-2611™) sono cellule derivanti dalla corteccia parieto-occipitale frontale destra di una paziente bianca di 60 anni affetta da glioblastoma.

4.1.3 Virus oncolitico

$\Delta\gamma34.5/\Delta$ ICP47/KillerRed UL29mir124 oHSV-1 è un virus geneticamente modificato derivante dal ceppo +17 dell'Herpes Simplex Virus di tipo 1. Esso è stato ottenuto ricostruendo pHSV-1(+17) Lox-Luc- $\Delta\gamma34.5$ -Zeo- Δ US12-killerred-UL29miR124 BAC in cellule di mammifero. Questo virus si caratterizza per la delezione di entrambe le copie del gene che codifica per il fattore neurovirulenza $\gamma34.5$. Un'altra delezione importante è quella che coinvolge il gene US12, il quale codifica per la proteina ICP47. Nella regione intergenica UL55-UL56 è stata inserita la cassetta di espressione del gene KillerRed, la quale è preceduta dalla

sequenza di localizzazione mitocondriale COX8. Inoltre, al fine di incrementare la neuroattenuazione di oHSV-1, tre copie delle sequenze target delle due isoforme del microRNA 124 (Mir124) sono state inserite nella regione 3' UTR del gene UL29.

4.2 Metodi

4.2.1 Saggio di infezione con HSV-1 delle cellule LN-229

Le LN-229 sono state seminate in una piastra da 24 pozzetti, nella quantità di 10^5 cellule per pozzetto in un volume finale di 500 μ l. Il giorno successivo si è controllato che le cellule avessero raggiunto la confluenza; quindi, è stato rimosso il mezzo di coltura e il monostrato è stato lavato con PBS (1X). Dopo aver rimosso il PBS si è eseguita l'infezione aggiungendo 250 μ l della diluizione del virus in DMEM senza FBS in modo che la MOI (*Multiplicity of Infection*), ossia n° particelle virali / n° cellule fosse di 1. Tutte le infezioni sono fatte in terreno senza siero per evitare che questo interferisca con il legame delle particelle virali con i recettori target sulle cellule. Le cellule così infettate sono state incubate a 37° C per 1h. Successivamente è stato rimosso il terreno contenente il virus e si è effettuato un lavaggio con PBS; quindi, si è aggiunto DMEM al 2% di FBS. Per i controlli negativi (ovvero pozzetti con cellule non infettate) si è effettuata la stessa procedura, con la differenza che le cellule sono state incubate 1h a 37°C in DMEM senza siero e senza virus. Quindi, al fine di sottoporre tutte le cellule alle stesse condizioni, anche nei controlli negativi si è proceduto rimuovendo il terreno, lavando le cellule con PBS e conservandole in DMEM fresco con il 2% di FBS. Nei giorni successivi, è stato monitorato l'effetto citopatico di oHSV-1-KR-Mir124 sulle cellule infette, in particolare se ne è osservata la fluorescenza tramite il microscopio a fluorescenza. Ai *timepoints* di 0h, 24h, 48h, 72h sono stati prelevati surnatanti da ogni pozzetto e sono conservati a -80°C al fine di poter eseguire in un secondo momento la titolazione virale mediante saggio a placche.

4.2.2 Saggio a placche per la titolazione virale di HSV-1

Il calcolo del titolo virale (PFU/ml) permette di quantificare il numero effettivo di particelle virali in un campione. Il saggio per placche è stato eseguito utilizzando le cellule Vero, poiché sono ampiamente permissive all'infezione virale.

Le cellule sono state seminate in piastre a 48 pozzi (5×10^4 per pozzetto), al fine di raggiungere la confluenza il giorno successivo. Dopo 24h il monostrato cellulare è stato lavato con PBS e dopo si è proceduto con le infezioni delle cellule con i surnatanti derivanti dal saggio di infezione delle LN-229. Pertanto, sono state preparate diluizioni seriali del virus in base 10 considerando per ciascun pozzetto un volume finale di 125 μ l in DMEM senza FBS. Ogni diluizione è stata utilizzata per infettare 2 pozzi in modo da ridurre l'errore statistico. La piastra è stata successivamente incubata 1h a 37°C. Quindi il terreno infetto è stato rimosso, le cellule sono state lavate con PBS e incubate nuovamente a 37°C con 250 μ l di DMEM integrato con 2% di FBS e 0,75% di carbossimetilcellulosa. La formulazione di questo terreno è stata studiata e sviluppata in modo che il terreno di coltura riesca a mantenere le cellule nonostante la bassa concentrazione di FBS. La carbossimetilcellulosa è necessaria per consentire la formazione di singole placche virali ma impedendo che i virioni diffondano passivamente nella soluzione ed infettino le cellule adiacenti. Si sono quindi attese 72h in quanto sono il tempo necessario per ottenere placche singole e separate tra loro che possono essere osservate e contate. Dopo la rimozione del terreno, le cellule sono state lavate con PBS e fissate con formaldeide al 5% in PBS per 10 minuti a temperatura ambiente. Le cellule fissate sono quindi state colorate per 5 minuti con una soluzione di cristalvioletto allo 0.1% in acqua deionizzata. Successivamente si è rimosso il cristalvioletto in eccesso e si è effettuato un lavaggio finale con acqua deionizzata. Le piastre sono state lasciate asciugare dell'acqua in eccesso, e le placche sono state contate al microscopio ottico. Le PFU/ml sono state ricavate con la seguente formula:

$$PFU/ml = (media\ delle\ placche \times\ fattore\ di\ diluizione) / volume\ di\ infezione$$

4.2.3 Irradiazione delle LN-229 infettate con oHSV-1-KR e fotoattivazione di KillerRed

Al fine di validare l'effetto citotossico di KillerRed (KR) e l'azione citolitica del virus su cellule di glioblastoma, le LN-229 sono state seminate in una piastra da 96 pozzetti, nella quantità di 5×10^3 cellule per pozzetto in 100 μ l di terreno di coltura. Il giorno successivo si è controllato che le cellule avessero raggiunto la confluenza;

quindi, è stato rimosso il mezzo di coltura e il monostrato è stato lavato con PBS (1X). Il virus è stato diluito in DMEM 0% FBS in modo da effettuare infezioni con MOI 1 PFU/cellula. Per ciascun pozzetto è stato usato un volume finale di 50 μ l. Quindi le cellule infettate sono state incubate a 37° C per 1h per permettere l'adsorbimento dell'agente virale. Successivamente il terreno infetto è stato rimosso e si è effettuato un lavaggio con PBS per eliminare i virioni non penetrati nelle cellule. Quindi si è aggiunto DMEM al 2% di FBS per mantenere le cellule. Per i controlli negativi (ovvero pozzetti con cellule non infettate) si è effettuata la stessa procedura con la differenza che le cellule sono state incubate per 1h a 37°C in terreno senza siero e senza virus. Dopodiché si è proceduto rimuovendo il vecchio medium, facendo un lavaggio che PBS e mettendo le cellule non infettate in DMEM fresco al 2% di FBS, questo per mantenerle alle stesse condizioni delle cellule infettate. Il giorno seguente sia le cellule così infettate, sia quelle non infettate sono state sottoposte all'azione di un LED a lunghezza d'onda di 561 nm per circa 30 minuti al fine di attivare la KR dove presente. Tale irradiazione è stata eseguita per coppia di pozzetti e non per triplicato, questo per minimizzare il tempo intercorso tra l'irradiazione dei pozzetti contenenti cellule non infettate ma irradiate, e l'irradiazione dei pozzetti contenenti cellule infettate ed irradiate. La piastra è stata incubata nuovamente a 37°C fino al giorno successivo e si è quindi valutato l'effetto della KR sulla vitalità nelle LN299 tramite il saggio di vitalità descritto nel paragrafo seguente.

4.2.4 Saggio di vitalità cellulare:

Il giorno successivo all'irradiazione è stato rimosso il terreno vecchio e dopo un lavaggio con PBS le cellule sono state staccate da ciascun pozzetto di ogni condizione con l'aggiunta di 25 μ l di tripsina. Dopo l'attesa di 5 minuti, tempo utile alle cellule per staccarsi dal pozzetto, sono stati aggiunti 25 μ l di DMEM 10% FBS per inattivare l'azione proteolitica della tripsina. Le cellule sono state diluite in altri 50 μ l di PBS. Si è poi proseguito con la diluizione 1:1 delle cellule in Trypan blue per la conta delle cellule vitali, tramite camera di Burker.

5. Risultati

5.1 Le LN-229 sono suscettibili all'infezione con HSV-1-KR-Mir124:

Le cellule LN-229 sono state infettate con HSV-1 $\Delta\gamma34.5/\Delta\text{ICP}47/\text{KillerRed UL29mir124}$ ad una MOI di 1 PFU/cellula come descritto nel paragrafo 4.2.1. Nei giorni seguenti all'infezione si è valutata l'intensità della fluorescenza emessa dalle cellule tramite microscopio a fluorescenza. Come evidenziato dal pannello 4 in figura 2 già dopo 24 ore dall'infezione le LN-229 infettate sono rosse. Al contrario le LN-229 non infettate dei controlli negativi non appaiono rosse al microscopio a fluorescenza, come dimostra il pannello 2 in figura 2. Nelle cellule infettate è possibile osservare l'effetto citopatico del virus che determina tipica forma rotondeggiante, che invece non è osservata nei pozzetti dei controlli negativi.

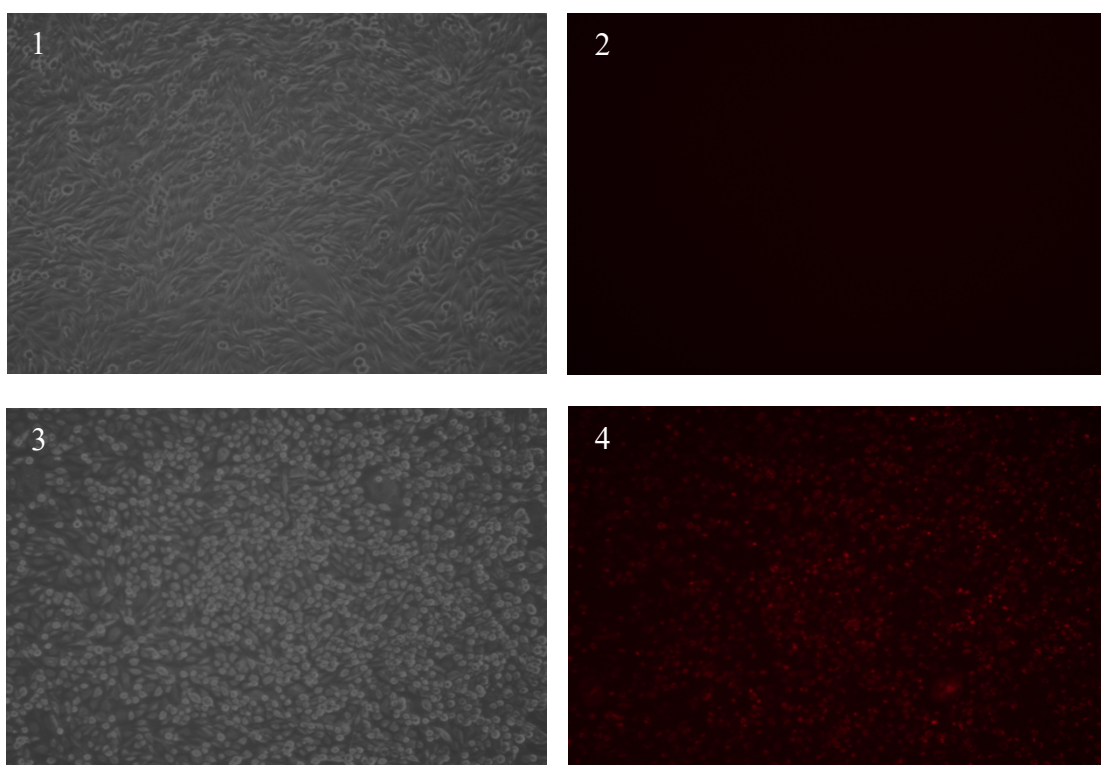


Figura 2: fotografie acquisite tramite microscopio a fluorescenza con ingrandimento 10X. 1. LN-229 non infettate (controlli negativi, nc), luce visibile. 2. LN-229 nc, fluorescenza rossa. 3. LN-229 infettate con HSV-KR-Mir124 a MOI 1 PFU/cellula 24h dopo l'infezione, luce visibile. 4. LN-229 infettate con HSV-KR-Mir124 a MOI 1 PFU/cellula 24h dopo l'infezione, fluorescenza rossa.

La capacità del virus prodotto in laboratorio è avvalorata anche dai saggi di titolazione per placche (descritti nel paragrafo 4.2.2) che sono stati effettuati sui surnatanti dell'infezione delle LN-229 raccolti dopo 0, 24, 48 e 72 ore dall'infezione. Il titolo raggiunge un picco dopo 48 ore di infezione e questo indica la suscettibilità delle LN-229 alla replicazione del virus.

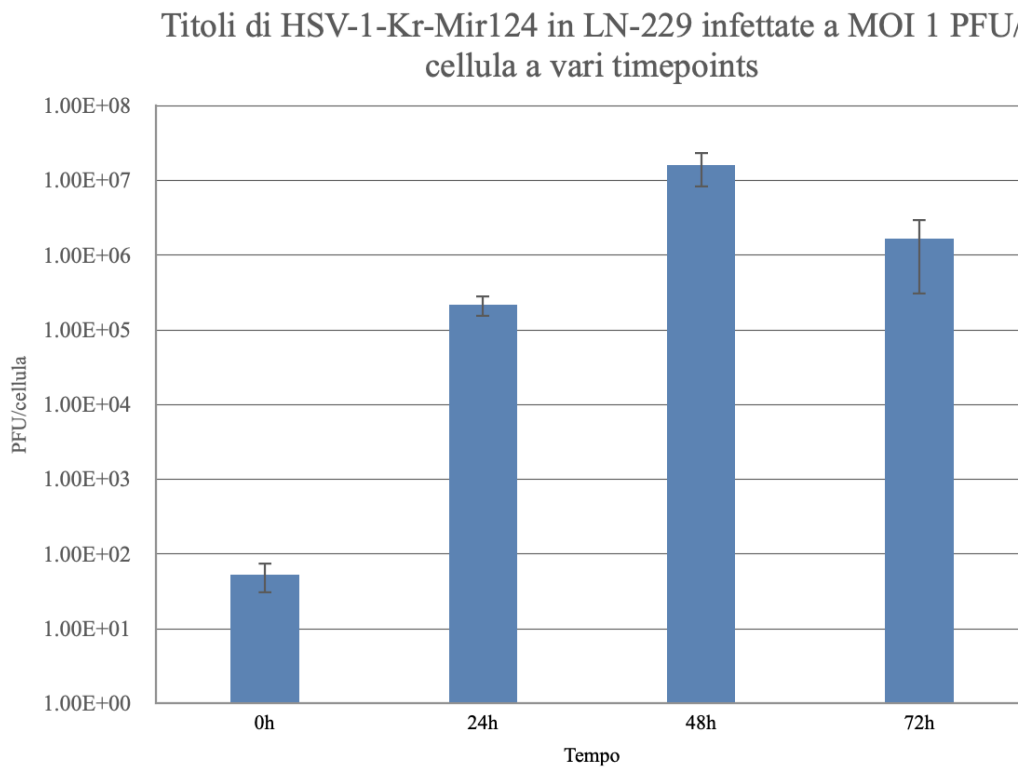


Figura 3: Saggio delle placche per la titolazione dei surnatanti raccolti dalle cellule Vero CCL81 infettate a MOI 1 PFU/cellula. I surnatanti sono stati raccolti a 0h, 24h, 48h, 72h dopo l'infezione. Il grafico è stato costruito ponendo lo scorrere del tempo in ascissa ed in ordinata le unità di formazione di placca medie per ml (PFU/ml). Le barre di errore si riferiscono alla deviazione standard.

5.2 Validazione della vitalità cellulare in seguito a fotoattivazione di KR

Dopo aver validato l'espressione della proteina KillerRed nelle cellule infettate e la suscettibilità delle LN-229 al virus, il passo successivo è stato la validazione dell'effetto citotossico della proteina Killer Red e dell'effetto citolitico del virus. Per questo scopo si è proceduto con un saggio di stimolazione della Killer Red (fotoattivazione) seguito da un saggio di vitalità cellulare. Le LN-229 sono state infettate con HSV-1-KR-miR124 a MOI 1 PFU/cellula e il giorno successivo si è proceduto ad irradiare le cellule infettate e non infettate per 30 minuti con LED a lunghezza d'onda 561 nm. Per ottenere maggiori dati alcune cellule infettate e non infettate non sono state irradiate come controlli aggiuntivi, come descritto nel paragrafo 4.2.3. Il giorno successivo le cellule trattate nei vari modi sono state staccate e si è fatta una conta delle cellule vitali per ciascuna diversa condizione. Come emerge dalla tabella e dal grafico rispettivamente in figura 4 e 5, la differenza nel numero delle cellule vitali infettate e irradiate rispetto alle cellule infettate ma non irradiate è statisticamente significativa.

Figura 4:

Cellule/ml	Media	Deviazione standard
Infettate, Irradiate	50,000	36,056
Non infettate, Irradiate	160,00	113,431
Infettate, Non irradiate	76,666.66	20,816.66
Non infettate, Non irradiate	170,000	45,825.76

oHSV-1-KR LN229 MOI 1, MW96
Saggio di vitalità cellulare

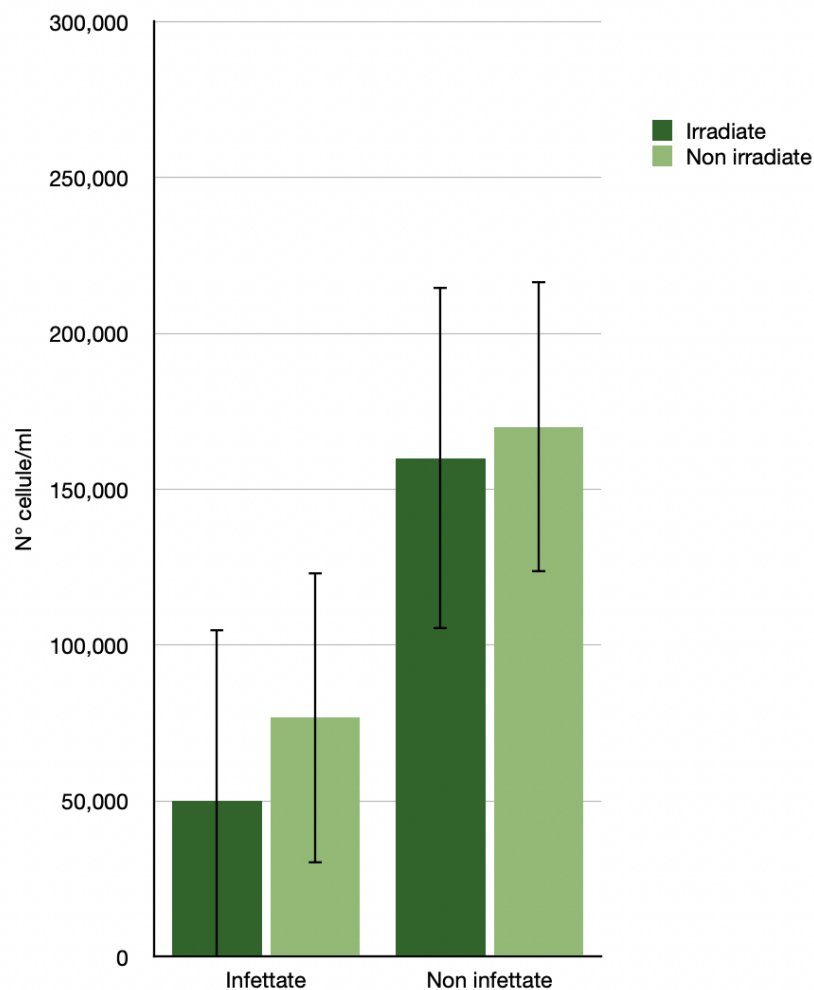


Figura 5: Conta delle cellule LN-229 vive 24h dopo l'irradiazione. Si sono utilizzate sia cellule non infettate (verde chiaro), sia cellule infettate (verde scuro) con HSV-KR-Mir124 alla MOI 1 PFU/cellula. L'esperimento è stato eseguito in triplice copia per poi calcolarne la media e riportarla nel grafico illustrato. La barra di errore indica la deviazione standard.

6. Conclusioni e discussione

Il glioblastoma è un tumore cerebrale estremamente invasivo e purtroppo ancor oggi difficilmente curabile. Il GBM, oltre a diminuire la probabilità di sopravvivenza dei pazienti, invade aree cerebrali deputate al controllo dell'umore, del comportamento e del ragionamento cognitivo, deteriorando anche la qualità di vita delle persone (De vleeSchouwer, 2017). Nonostante il progresso della medicina i GBM hanno una prognosi sfavorevole poiché questi contengono cellule con proprietà simili a cellule staminali neurali adulte, che contribuiscono a dare inizio alla proliferazione cellulare incontrollata, all'eterogeneità, alla resistenza terapeutica e alla frequente comparsa di recidive del tumore stesso (Szklenner *et al*, 2022). È proprio l'eterogeneità intratumorale unitamente al microambiente tumorale (TME) immunosoppressivo il fattore che complica l'esito delle terapie applicate. Considerando l'importanza che il sistema immunitario assume in questo tipo di tumore, l'immunoterapia risulta essere una strategia promettente, ed è in questo contesto che si inserisce la viroterapia oncolitica. Quest'ultima si basa sulla capacità di virus oncolitici (OVs) di infettare e replicarsi soltanto all'interno delle cellule tumorali, causandone la morte per lisi (Suryawanashi and Schulze, 2021).

Il virus dell'herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) possiede molte caratteristiche che lo rendono un promettente agente per la viroterapia oncolitica. HSV-1 riesce ad infettare una grande varietà di cellule (ha un ampio tropismo), e ne causa la morte per lisi. Si tratta di un virus a DNA, il che lo rende più facilmente manipolabile. Il genoma virale non si integra all'interno del genoma dell'ospite e presenta vari geni non essenziali per il ciclo replicativo che possono essere rimossi e sostituiti da uno o più geni terapeutici. Nel 2015 è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) e dall'European Medicines Agency (EMA) il T-Vec per il trattamento del melanoma metastatico non resecabile. La sicurezza dell'utilizzo di questo agente oncolitico deriva dal fatto che il genoma virale è stato privato della doppia copia del fattore di neurovirulenza γ 34.5. Inoltre, il virus è caratterizzato dalla delezione del gene che codifica la proteina ICP47, coinvolta nel processo di evasione dalla risposta immunitaria dell'ospite.

La viroterapia oncolitica da sola presenta ancora vari limiti, tra cui la resistenza ai farmaci e l'inefficacia contro le recidive. Risultano molto promettenti gli approcci che combinano OV con altre terapie oncologiche, facendole agire in sinergia. Nel lavoro descritto in questo elaborato, si è cercato di combinare tra viroterapia oncolitica e terapia fotodinamica (PDT). La PDT è una nuova strategia applicabile nei confronti di molteplici malattie. Essa consiste nell'attivazione di un fotosensitizzatore (PS) tramite stimolo luminoso (o fotoattivazione), che in presenza di ossigeno determina la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). I ROS scatenano all'interno della cellula una cascata di reazioni di ossidazione, causando di conseguenza la morte della cellula. Il target di questo studio concentrare l'attività del PS all'interno delle cellule tumorali al fine di causarne la morte. Il fotosensitizzatore utilizzato in questo progetto di tesi è KillerRed (KR), una proteina con picchi di assorbimento a lunghezze d'onda comprese tra i 520-590 nm. L'irradiamento di KR a tali lunghezze d'onda comporta due eventi: parte dei fotoni assorbiti viene rilasciata con emissione di fluorescenza nella banda del rosso, una parte dell'energia invece determina il passaggio della proteina alla sua forma fotoattivata. Il gene della KR è quindi stato inserito all'interno del genoma di HSV-1 ingegnerizzato, preceduto dalla sequenza COX8, che stabilisce la localizzazione della proteina a livello mitocondriale. Ciò è importante perché la fotoattivazione di KR nei mitocondri determina la produzione di specie reattive dell'ossigeno che, in questo specifico organello, causano morte cellulare per apoptosi.

Una prima fase del lavoro svolto in laboratorio ha riguardato la validazione della capacità di oHSV-1-KR-Mir124 di infettare la linea cellulare LN299 alla MOI di 1 PFU/cellula. L'analisi al microscopio a fluorescenza ha permesso di valutare che dopo 24 ore di infezione, il virus ha infettato le cellule che emettono luce fluorescente rossa. Altro aspetto che è stato interessante notare è la morfologia rotondeggiante delle cellule infettate già dopo 24 ore di infezione, che invece non è stata riscontrata nei controlli negativi con cellule non infettate. Per validare la qualità della replicazione del virus nelle LN-229 sono stati raccolti e titolati i surnatanti delle cellule infettate a vari timepoints dall'inizio dell'infezione: 0, 24, 48 e 72 ore.

I risultati mostrano che il picco di replicazione virale è dopo due giorni dall'infezione. Una volta dimostrata la suscettibilità delle LN229 all'infezione con il virus prodotto, seconda serie di esperimenti condotti in laboratorio ha permesso di studiare l'azione citotossica della KillerRed nelle LN-299. Per questo scopo si è proceduto con un saggio di vitalità cellulare condotto in seguito all'esposizione di LN229 infettate con HSV-1-KR-miR124 ad una irradiazione di 561 nm per 30 minuti. Nello specifico le cellule sono state infettate con MOI 1 e il giorno seguente sono state irradiate. Il saggio di vitalità è stato effettuato il giorno successivo all'irradiazione per ottenere una stima precisa del numero di cellule vitali. I risultati dimostrano che esiste una differenza statisticamente significativa nel numero di cellule vive che sono state infettate e irradiate, rispetto alle cellule infettate ma non irradiate e ai controlli negativi (cellule non infettate).

In conclusione, lo studio condotto in questo progetto di tesi ha cercato di combinare la viroterapia oncolitica alla terapia fotodinamica; i risultati ottenuti *in vitro* sembrano dimostrare che l'infezione di cellule di glioblastoma infettate dal virus oncolitico HSV-1-KR $\Delta\gamma34.5/\Delta\text{ICP47}$ miR124mitoKR esprimono KillerRed a livello mitocondriale. La proteina dopo opportuno stimolo luminoso (fotoattivazione) innesca la produzione di ROS che sono causa della morte cellulare. Ulteriori studi *in vivo* saranno necessari per testare l'effettiva efficacia di OV e PDT, che in sinergia potrebbero costituire una nuova metodica clinica per la cura di neoplasie invasive come il glioblastoma.

7. Bibliografia

1. Arduino, P. G. and Porter, S. R., (2008), “Herpes Simplex Virus Type 1 infection: overview on relevant clinico-pathological features.”, *Journal of oral pathology & medicine*, vol. 37(2), pp. 107–121.
2. Bulina, M., Chudakov, D., Britanova, O. *et al*, (2006), “A genetically encoded photosensitizer.”, *Nature Biotechnology*, vol. 24, pp. 95–99.
3. De vleeSchouwer, S, MD, PhD, Department of Neurosurgery, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium, (2017), “Glioblastoma”, Codon Publications, Brisbane, QLD 4122, Australia.
4. Kukhanova, M. K., Korovina, A. N. and Kochetkov, S. N., (2014), “Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors.”, *Biochemistry*, vol. 79(13), pp. 1635–1652.
5. Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D. *et al*, (2018), “Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations.”, *Biomedicine & pharmacotherapy*, vol. 106, pp. 1098–1107.
6. Li, Y., Zhang, C., Chen, X. *et al*, (2011), “ICP34.5 protein of herpes simplex virus facilitates the initiation of protein translation by bridging eukaryotic initiation factor 2alpha (eIF2alpha) and protein phosphatase 1.”, *The Journal of biological chemistry*, vol. 286(28), pp. 24785–24792.
7. Liu, J., Wang, F., Qin, Y., and Feng, X., (2021), “Advances in the Genetically Engineered KillerRed for Photodynamic Therapy Applications.”, *International journal of molecular sciences*, vol. 22(18), p. 10130.
8. Mazzacurati, L. *et al*, (2015), “Use of miRNA response sequences to block off-target replication and increase the safety of an unattenuated, glioblastoma-targeted oncolytic HSV.”, *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*, vol. 23(1), pp. 99–107.
9. Suryawanshi, Y. R. and Schulze, A. J., (2021). “Oncolytic Viruses for Malignant Glioma: On the Verge of Success?”, *Viruses*, vol. 13(7), p. 1294.
10. Szklener, K., Mazurek, M., Wieteska, M. *et al*, (2022), “New Directions in the Therapy of Glioblastoma.”, *Cancers*, vol. 14(21), p. 5377.

Ringraziamenti

Eccomi arrivata alla fine di questo percorso che non è stato solo universitario. In questi tre anni sono cresciuta tanto, ho imparato tanto, a tal punto da ritrovarmi ad essere una persona completamente differente rispetto a quando sono partita, forse anche più sicura di me, ma con la consapevolezza che non sarei stata in grado di arrivare fino a qui senza le persone che mi hanno accompagnata.

Primo tra tutti Francesco, lo sai, ti ringrazierò sempre e non dimenticherò mai tutto quello che hai fatto per me, per esserci sempre stato, per avermi capito, supportato e spronato. Ti prometto che non tornerò mai indietro.

Grazie di cuore alle mie amiche e amici conosciuti in aula, senza di voi non sarebbe stato lo stesso. Grazie ad Erica, perché sei l'unica persona con cui mi sono aperta totalmente e tu non mi hai mai giudicata, sei veramente una persona stupenda, avevo bisogno di un'amica come te. Grazie a Rachele, perché non mi sono mai sentita distante da te, possono passare settimane ma ci siamo sempre l'una per l'altra. Grazie al mio papà, grazie perché nonostante tutto sei sempre stato al mio fianco e sei sempre stato pronto ad accogliermi quando tornavo. Grazie per avermi permesso di vivere tutto quello che ho vissuto, sono fortunata ad averti. Grazie a Paola e Antonio, mi avete accolta a casa vostra, senza farmi domande, e non avete idea di quanto sia stato essenziale. Senza tutti voi non sarei arrivata fin qua. Grazie anche alla mamma, non è facile ma so che ce la stai mettendo tutta. Grazie poi a tutta la mia famiglia, alle cugine, alle nonne, ai fratelli e agli zii. Grazie alla dottoressa Foscarini e alla dottoressa Baron per l'aiuto che mi avete dato e per non aver lasciato perdere con me. Grazie anche tutta la famiglia di Francy, le relazioni fra voi sono bellissime.

Mi sento così fortunata e così grata per avere così tante persone da ringraziare.

Infine, voglio ringraziare la mia relatrice, la Professoressa Arianna Calistri. Vorrei ringraziarla per la gentilezza e la grande disponibilità che ha dimostrato nei miei confronti durante questo periodo di tirocinio e stesura dell'elaborato. Un grazie speciale a Chiara che mi ha seguita in questo progetto, grazie anche ad Alberto e a tutte le ragazze del laboratorio, da voi ho imparato molto.