

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Corso di Laurea in Biotecnologie



ELABORATO DI LAUREA

**Generazione di un vettore HSV-1 oncolitico
modificato per interagire con cellule carrier**

Tutor: Prof.ssa Arianna Calistri
Dipartimento di Medicina Molecolare

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

Laureanda: Alessandra Rossetto

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

*Alla mia mamma, per avermi trasmesso la forza
di credere nei miei sogni.
Al mio papà, per la sua estrema gentilezza
ed il suo amore incondizionato.
A Roberta, per essere stata con me sin dal primo giorno,
per essere la mia metà, la mia complice.
Ed a me stessa, per tutte le volte che
ho creduto di non essere all'altezza.*

INDICE

ABSTRACT	4
STATO DELL'ARTE	5
1. Tumori ed approcci terapeutici.....	5
2. Virus oncolitici.....	5
3. Herpes-simplex virus di tipo I.....	7
4. Cellule carrier.....	7
5. Scopo dello studio.....	9
APPROCCIO SPERIMENTALE	10
1. Plasmide pUL3-CD68mCherry-UL4.....	10
2. BAC pHSV-1- $\Delta\gamma$ 34.5/ Δ Us12/EGFP.....	12
3. Elettroporazione GS1783.....	13
4. Red recombination.....	13
5. Selezione dei cloni batterici GS1783 contenenti KanR.....	14
6. Risoluzione del BAC ricombinato.....	14
7. Selezione dei cloni batterici GS1783 contenenti il BAC risolto.....	15
8. Trasfezione e ricostituzione delle particelle virali.....	18
9. Amplificazione virale.....	19
10. Titolazione mediante saggi di placca.....	20
RISULTATI	22
1. BAC pHSV1(17+)Lox-EGFP- $\Delta\gamma$ 34.5Zeo- Δ ICP47-CD68-mCherry.....	22
2. I cloni batterici GS1783 contenenti il BAC risolto crescono solamente nel terreno privo di Kanamicina.....	22
3. Le colonie batteriche contenenti il BAC risolto producono ampliconi di dimensioni inferiori a 3918 bp.....	23
4. L'efficienza della trasfezione delle cellule 293T è evidenziata dall'espressione di EGFP e dall'insorgenza di effetti citopatici.....	23
5. Nelle cellule 293T trasfettate viene espressa mCherry.....	24
6. L'efficienza dell'amplificazione virale nelle cellule Vero è evidenziata dall'espressione di EGFP e dall'insorgenza di effetti citopatici.....	25
DISCUSSIONE	26
BIBLIOGRAFIA	27

ABSTRACT

La scarsa efficienza degli approcci terapeutici attualmente disponibili per il trattamento dei tumori solidi, rende necessario lo sviluppo di strategie innovative.

Un campo emergente è quello dei virus oncolitici, ovvero virus nativi o geneticamente modificati, in grado di replicarsi selettivamente e di uccidere le cellule tumorali, attraverso la lisi diretta delle stesse e/o l'attivazione della risposta immunitaria antitumorale sistemica.

Nonostante i diversi studi clinici con virus oncolitici si siano basati sulle iniezioni intratumorali per la somministrazione di tali agenti terapeutici, l'obiettivo ultimo è quello di sviluppare meccanismi che consentano la somministrazione sistemica degli stessi, in modo da ottenere una maggiore attivazione della risposta immunitaria sistemica e da infettare non solo il tumore primario ma anche le metastasi e le micrometastasi non identificabili dalle attuali tecniche di imaging.

Tale ricerca si è incentrata sulla generazione di un vettore oncolitico basato su HSV-1 modificato per interagire selettivamente con i monociti/macrofagi, proposti come cellule carrier per somministrazione sistemica di tale agente terapeutico in virtù del loro tropismo intrinseco per le neoplasie, della facilità di raccolta degli stessi e della loro capacità di raggiungere distretti corporei difficilmente accessibili.

STATO DELL'ARTE

1. Tumori ed approcci terapeutici

Una neoplasia, o tumore, è un disturbo della crescita cellulare scatenato da una serie di mutazioni acquisite, relative ad una singola cellula e alla sua discendenza clonale. Queste mutazioni conferiscono alle cellule neoplastiche una maggiore capacità di crescere e sopravvivere, dando origine ad un'eccessiva proliferazione, indipendente dai segnali fisiologici di crescita.

Per combattere il cancro, le strategie che possono essere utilizzate sono differenti. Gli approcci classici comprendono la rimozione chirurgica della massa tumorale, la chemioterapia, ovvero l'utilizzo di farmaci citotossici che inibiscono la divisione di cellule in rapida replicazione, oppure la radioterapia, che sfrutta i raggi X per distruggere le cellule cancerose.

Strategie terapeutiche più innovative, invece, comprendono l'utilizzo di inibitori di vie di segnalazione aberranti che vengono attivate dalle cellule tumorali per sostenere la crescita e la sopravvivenza delle stesse, oppure l'immunoterapia, che si basa sull'utilizzo di farmaci che stimolano la risposta immunitaria dell'ospite per eliminare le cellule neoplastiche che vengono riconosciute come estranee grazie all'espressione da parte delle stesse di antigeni tumorali.

Gli attuali protocolli di chemioterapia e radioterapia, pur essendo curativi in alcune neoplasie ematologiche, non si rivelano efficaci nei pazienti con tumori solidi avanzati. In questi casi l'unica possibilità di guarigione è rappresentata dalla rimozione chirurgica della massa tumorale che non è però sempre possibile a causa della diffusione locale o metastatica del tumore medesimo. Inoltre, l'utilizzo di inibitori delle vie di segnalazione di cui sopra non è ottimale poiché i tumori sviluppano frequentemente resistenza nei confronti di queste molecole; infine, anche i più recenti approcci di immunoterapia si sono rivelati inefficaci in numerose neoplasie solide [1].

Queste considerazioni hanno dato spinta ad un'intensa attività di ricerca con l'obiettivo di trovare nuove forme di cura e/o trattamento dei tumori solidi e, attualmente, vi è un forte interesse nel campo dei virus oncolitici.

2. Virus oncolitici

I virus oncolitici (OV) sono definiti come “virus in grado di replicarsi selettivamente e di uccidere le cellule tumorali” [1].

I meccanismi attraverso i quali i virus oncolitici esplicano la loro attività anti-tumorale sono due: essi possono replicarsi all'interno delle cellule tumorali ed indurre un effetto litico diretto delle stesse, e possono indurre l'attivazione della risposta immunitaria, innata ed adattativa, antitumorale sistemica. Quest'ultima è

conseguente al rilascio di antigeni associati al tumore e di DAMPs (Damage-associated Molecular Patterns) da parte delle cellule neoplastiche morenti, di PAMPs virali (Pathogen-associated Molecular Patterns) e di citochine ed è importante per mediare la regressione del tumore in siti che non sono stati esposti o iniettati con il virus [2].

Il contributo relativo di questi meccanismi può variare a seconda della natura e del tipo di cellula cancerosa, delle caratteristiche del vettore virale, e dell'interazione tra virus, microambiente tumorale e sistema immunitario dell'ospite [2].

Si ricordi che le anomalie intrinseche nella risposta delle cellule cancerose allo stress, alla segnalazione cellulare e all'omeostasi, forniscono un vantaggio per la replicazione virale; il meccanismo antivirale della cellula ospite, difatti, può essere anormale nelle cellule tumorali [2].

L'interesse nei confronti di questi virus, comunque, è in continuo aumento grazie ad una migliore comprensione dell'immunologia dei tumori, della genetica molecolare e della biologia molecolare, che consente di operare modifiche precise dei genomi virali in modo da massimizzare l'efficacia e la sicurezza degli stessi [1]. In effetti, il genoma di molti OV può essere modificato attraverso l'inserimento in esso di geni terapeutici suddivisibili in due grandi categorie a seconda della loro funzione. Alcuni geni agiscono come “geni suicidi”, ovvero incrementano la capacità di uccisione delle cellule cancerose da parte dei virus oncolitici fornendo alle stesse una maggiore suscettibilità nei confronti dell'apoptosi oppure della terapia con altri farmaci. Altri geni, invece, si comportano come geni immunoterapici [2].

Comunque, i virus che sono stati testati come virus oncolitici in modelli preclinici di cancro e/o in studi clinici di fase I e II sono molteplici: fra questi vi sono numerosi ceppi attenuati di agenti patogeni umani come adenovirus, virus dell'herpes simplex di tipo 1, vaccinia virus, ecc... [1]

Finora i virus oncolitici non sono ancora sufficientemente potenti, soprattutto per i tumori solidi scarsamente immunogenici o immunosoppressivi, che sono abbastanza frequenti nella popolazione [1]. Pertanto, di tutti questi OV testati, l'unico ad essere stato autorizzato per l'uso clinico di routine da parte della FDA è il talimogene laherparepvec a base di HSV-1 o T-VEC. Questo, impiegato per il trattamento del melanoma metastatico, reca delle mutazioni in specifici geni che causano un'attenuazione della virulenza di questo virus nei neuroni (la cui infezione potrebbe causare encefalite erpetiche) e due copie della sequenza codificante per il fattore di crescita hGM-CSF (fattore stimolante le colonie di granulociti-monociti umane) [1].

3. Herpes Simplex Virus di tipo 1

Herpes Simplex Virus di tipo 1 (HSV-1) è un membro della sottofamiglia delle Alphaherpesvirinae, appartenente alla famiglia delle *Herpesviridae* [2].

È un importante agente patogeno umano, trasmesso mediante contatto diretto, che causa frequentemente infezioni orali (herpes labiale) o lesioni cutanee, e più raramente lesioni genitali (erpete genitale). Dopo l'infezione iniziale, HSV-1 rimane latente nei neuroni dei gangli sensitivi da cui può periodicamente riattivarsi, a causa di stress fisico/emotivo, immunosoppressione o esposizione eccessiva a raggi solari, determinando manifestazioni cliniche.

I virioni di HSV-1 sono particelle sferiche costituite da un envelope, da un tegumento formato da diverse proteine che circonda il capside icosaedrico, e da un core contenente il DNA virale [3].

Il genoma di questo virus consiste in una molecola di DNA a doppio filamento di grandi dimensioni (circa 152 kb) che contiene due regioni uniche (lunga U_L e corta U_S), affiancate da sequenze ripetute ed invertite terminali (TR_L e TR_S) ed interne (IR_L e IR_S) [3]. [Figura 1]

I geni di HSV-1 sono suddivisi in 3 differenti classi ovvero i geni α (immediate early) che codificano per fattori di trascrizione, i geni β (early), responsabili della replicazione del DNA virale ed i geni γ (late) che producono principalmente proteine strutturali [3].

Circa 30 kb del genoma, comunque, codificano per geni non essenziali per l'infezione virale [2]. Inoltre, la replicazione di HSV-1 ha sede nel nucleo cellulare ma tale virus non causa mutagenesi inserzionale; queste proprietà, rendono HSV-1 un candidato interessante per lo sviluppo di virus oncolitici [2].



Figura 1 Rappresentazione del genoma di HSV-1 in forma lineare, da Expasy

4. Cellule carrier

La maggior parte degli studi clinici con virus oncolitici ha utilizzato come via di somministrazione le iniezioni intratumorali in modo da aggirare le barriere architettoniche dei tumori quali la presenza di un'elevata quantità di matrice extracellulare e la loro scarsa vascolarizzazione [2].

Tale via, rispetto all'iniezione endovenosa, risulta più sicura e riduce le possibilità che i virus oncolitici vengano neutralizzati prima di raggiungere il sito tumorale da parte di preesistenti anticorpi circolanti nell'ospite, aspetto importante nel caso di virus ad alta sieroprevalenza nella popolazione come HSV-1 [4].

Tuttavia, le iniezioni intratumorali sono limitate ai tumori fisicamente accessibili attraverso la palpazione clinica o l'imaging diretto e sono solo parzialmente efficaci nell'attivazione di una risposta antitumorale sistemica (si parla di “effetto del vaccino in situ”) [2].

Per questi motivi, la migliore via di somministrazione dei virus oncolitici è la via sistemica o endovenosa: essa permette di infettare sia il tumore primario sia le metastasi e le micrometastasi non rilevabili dalle attuali tecniche diagnostiche, è relativamente non invasiva e le iniezioni possono essere ripetute frequentemente [1]. L'erogazione sistemica degli OV potrebbe essere ottenuta mediante cellule carrier, che vengono infettate da suddetti virus ex vivo e successivamente iniettate per via endovenosa; esse, difatti, proteggono il virus dall'inattivazione promossa dagli anticorpi dell'ospite e dall'assorbimento non specifico [4]. Cellule carrier ottimali per il rilascio di virus oncolitici devono possedere 3 differenti caratteristiche: devono avere un tropismo per i tumori, devono interiorizzare il virus o consentire allo stesso di associarsi stabilmente alla loro membrana plasmatica, e devono possedere una vitalità tale da consentire il trasporto del carico virale a livello della massa tumorale [4]. Tale approccio è ancora in via di sviluppo e le cellule che vengono studiate come possibili portatori di OV sono differenti quali cellule staminali mesenchimali, linfociti T e diverse classi di cellule mieloidi [4].

Le prime cellule ad essere state proposte come cellule carrier sono le cellule staminali mesenchimali (MSC) in virtù del loro tropismo per le neoplasie e delle loro proprietà immunosoppressive che impediscono che gli OV da esse trasportate vengano eliminati dal sistema immunitario; tuttavia, tali proprietà immunosoppressive possono essere controproducenti per la risposta immunitaria antitumorale che si cerca di ottenere mediante la terapia OV [4]. Inoltre, esse hanno problemi relativi alla propria biodistribuzione come conseguenza delle loro dimensioni ingenti [4].

Al giorno d'oggi grande interesse è rivolto, invece, ai monociti per le proprietà favorevoli degli stessi; infatti, possono essere ottenuti in gran numero ed in maniera semplice (mediante un prelievo di sangue periferico) dai pazienti affetti da cancro, hanno un elevato tropismo per i tessuti neoplastici poiché agiscono come precursori per i macrofagi associati al tumore (TAM), cellule che infiltrano il microambiente tumorale dove secernono fattori di crescita per le cellule neoplastiche e riducono la risposta immunitaria adattativa dell'ospite, e possono raggiungere compartimenti corporei, quali il sistema nervoso centrale, difficilmente accessibili [4].

5. Scopo dello studio

Tale esperimento è focalizzato sulla costruzione di un vettore oncolitico basato su HSV-1 modificato in modo da esprimere selettivamente mCherry all'interno dei monociti/macrofagi, potenziali cellule carrier per la somministrazione sistemica di suddetto agente terapeutico.

APPROCCIO SPERIMENTALE

1. Plasmide pUL3-CD68mCherry-UL4

Il plasmide pUL3-CD68mCherry-UL4 [Figura 2] contiene diversi elementi specifici; i più rilevanti sono:

- il gene codificante per mCherry, una proteina fluorescente rossa appartenente alla classe delle proteine reporter, ovvero macromolecole che sono utilizzate per analizzare l'espressione genica delle cellule oppure per identificare la localizzazione subcellulare di determinate proteine;
- il promotore CD68: regola l'espressione del gene codificante per mCherry. Questo, di circa 2.9 kb, è un promotore che fisiologicamente controlla la trascrizione del gene codificante per CD68, glicoproteina comunemente considerata come marcatore selettivo dei macrofagi e monociti umani;
- il gene per la resistenza alla Kanamicina (KanR) che fa parte di una cassetta di espressione e che codifica per l'enzima fosfotransferasi (APH) che trasferisce un radicale fosforilico su un gruppo OH della Kanamicina, inibendo la funzionalità di tale molecola.

La Kanamicina è un antibiotico aminoglicosidico con funzione battericida nei confronti dei batteri Gram – poiché inibisce la loro sintesi proteica; legandosi direttamente ai ribosomi di queste cellule, determina una lettura errata delle triplette degli mRNA e quindi una terminazione prematura della traduzione;

- UL3 e UL4 (Unique Long Regions): sono regioni di omologia derivanti dal genoma di HSV-1 localizzate ai lati del frammento plasmidico contenente CD68-mCherry e KanR.

Hanno la funzione di guidare il successivo evento di ricombinazione del frammento plasmidico (che delimitano) con il vettore BAC descritto in seguito;

- 2 siti di restrizione per I-CeuI: I-CeuI è un'endonucleasi di restrizione che riconosce sequenze non palindromiche di 26 bp.

Il taglio a livello di questi due siti consentirà l'ottenimento di un frammento plasmidico di circa 3918 bp che sarà ricombinato nel BAC;

- un sito di restrizione per HpaI: HpaI è un'endonucleasi che riconosce una sequenza palindromica di 6 bp e che effettua un taglio simmetrico, generando delle estremità blunt.

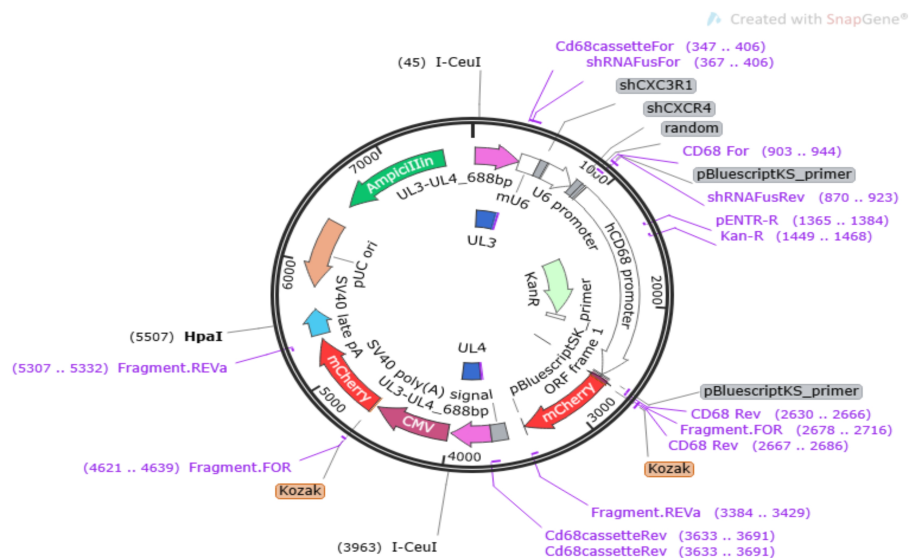


Figura 2 Mappa del plasmide pUL3-CD68mCherry-UL4

Per ricavare il gene codificante per mCherry, di cui si vuole verificare l'espressione specifica nei monociti, e la cassetta di espressione per KanR, necessaria per le successive fasi di selezione, il plasmide di cui sopra è stato tagliato mediante gli enzimi di restrizione I-CeuI e HpaI, ed i prodotti ottenuti sono stati separati mediante una corsa elettroforetica in gel di agarosio.

L'utilizzo di due enzimi di restrizione è stato reso necessario dal fatto che i frammenti ottenuti sottoponendo il plasmide alla sola attività di I-CeuI, presentavano dimensioni molto simili fra loro e quindi non potevano essere separati adeguatamente.

Utilizzando anche HpaI, il rimanente plasmidico ottenuto dal taglio precedente, è stato ulteriormente frammentato in porzioni più piccole; è stato possibile isolare, pertanto, il frammento plasmidico di circa 3918 bp, successivamente inserito nel BAC [Figura 3].

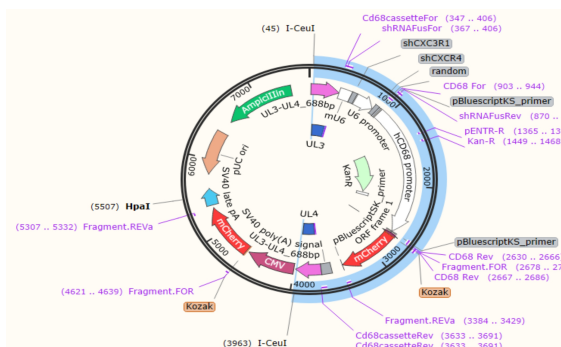


Figura 3 Frammento plasmidico ottenuto dal taglio di I-CeuI e HpaI

2. BAC pHSV-1- $\Delta\gamma34.5/\Delta Us12/EGFP$

I BAC, o cromosomi artificiali batterici, sono vettori di clonaggio derivanti dal plasmide F (fattore di fertilità) di *E. coli* che possono contenere inserti di DNA di dimensioni molto elevate, fino a 300 kb.

Il BAC pHSV-1- $\Delta\gamma34.5/\Delta Us12/EGFP$ [Figura 4] è un BAC che contiene l'intero genoma di HSV-1, con una delezione in entrambe le copie del gene di neurovirulenza $\gamma34.5$ e del gene *Us12*, coinvolto nell'evasione della risposta immunitaria dell'ospite.

Presenta, inoltre, una cassetta di espressione per il gene codificante per la green fluorescent protein (GFP), localizzata nella regione intergenica UL55-UL56, che è sotto il controllo del promotore immediato precoce del cytomegalovirus.

Si identifica poi una cassetta BAC, recante al proprio interno il gene (*cat*) per la resistenza al Cloramfenicolo, codificante per l'enzima cloramfenicolo acetiltrasferasi (CAT) che lega al gruppo OH di tale antibiotico uno o due gruppi acetili derivanti dall'acetil-S-coenzimaA, inibendo la possibilità per questo di legare il ribosoma, ed il gene codificante per la Cre ricombinasi, sotto il controllo di un promotore eucariotico. Tale cassetta è fiancheggiata da due siti *LoxP* che ne consentono la rimozione spontanea all'interno delle cellule eucariotiche.

Infine, si identificano un'origine di replicazione ed i geni *parA* e *parE* che permettono di ottenere, rispettivamente, la replicazione e la ripartizione del BAC all'interno delle cellule batteriche che lo contengono.

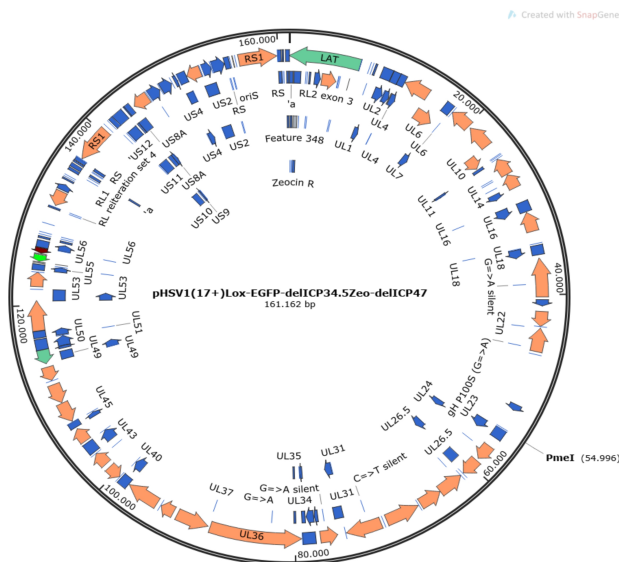


Figura 4 Mappa del BAC pHSV-1- $\Delta\gamma34.5/\Delta Us12/EGFP$

Tale vettore è stato inserito all'interno di cellule GS1783, ceppo di *E. coli*

caratterizzato dalla presenza di geni coinvolti nella ricombinazione Red, sotto il controllo di un promotore temperatura-sensibile, e dal gene codificante per l'endonucleasi I-SceI, sotto il controllo di un promotore arabinosio-inducibile.

3. Elettroporazione di GS1783

Il frammento plasmidico contenente mCherry e la cassetta di espressione per KanR, è stato elettroporato in batteri GS1783 elettrocompetenti, crescenti a 32 °C. L'elettroporazione è un metodo biofisico che consiste nell'applicazione di un campo elettrico esterno alle cellule, in modo da formare pori transitori e reversibili a livello della loro membrana plasmatica, attraverso i quali possono penetrare diverse molecole.

4. Red recombination

Il frammento plasmidico elettroporato, è stato integrato all'interno del BAC pHSV-1- $\Delta\gamma$ 34.5/ Δ Us12/EGFP mediante la tecnica della Red recombination che ha sfruttato le sequenze di omologia UL3 ed UL4 presenti in entrambe le molecole di DNA di cui sopra.

Il sistema della ricombinazione Red (“recombination defective”), scoperto inizialmente analizzando dei mutanti del fago λ che non erano in grado di ricombinare in cellule di *E.coli*, si basa sull'utilizzo di due differenti proteine che formano un complesso che accoppia i due step della reazione ricombinativa:

- Red α : è una esonucleasi 5'-3' che lega le estremità di un dsDNA e digerisce il filamento che presenta l'estremità 5'.
E' codificata dal gene *exo* o *red α* ;
- Red β : è una proteina legante il DNA ss (annealing protein) che interagisce con le estremità 3' a singolo filamento risultanti dalla digestione promossa da Red α e le lega ad un filamento ad esse complementare presente su un'altra molecola di DNA.

Questa proteina è codificata dal gene *red β* [5]. [Figura 5]

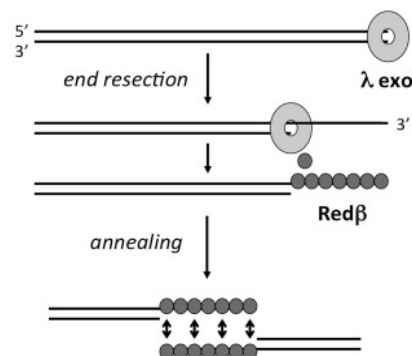


Figura 5 Meccanismo molecolare della Red recombination, da Caldwell & Bell (2019)

Omologhi delle proteine Red sono stati identificati in genomi di altri fagi, all'interno di elementi genetici mobili, in genomi batterici (sottoforma di attivi o difettivi profagi) e nei genomi a dsDNA di virus oncogeni infettanti cellule di mammifero come il virus di Epstein-Barr (EBV) [5].

Nel caso di *E. coli*, il sistema si compone di RecE, esonucleasi, e RecT, proteina di annealing [5].

Questa strategia di ricombinazione Red è estremamente efficiente; infatti, essa è in grado di promuovere ricombinazione in presenza di regioni di omologia corte, di circa 35-50 bp. Inoltre, non richiede la presenza di siti di restrizione unici ed assicura un'elevata fedeltà di ricombinazione: per questi motivi, è diventata estremamente importante nella mutagenesi di grandi molecole di DNA [5].

Diversi studi hanno inoltre dimostrato la possibilità di applicare questa strategia ricombinativa su molecole di ssDNA (questo potrebbe servire per inserire mutazioni puntiformi o larghe delezioni/inserzioni) e non più dsDNA. In questo caso, viene richiesta esclusivamente l'annealing protein in quanto gli oligonucleotidi di interesse sono già a singolo filamento [5].

5. Selezione dei cloni batterici GS1783 contenenti KanR

I cloni batterici contenenti la cassetta integrata sono stati selezionati mediante la loro semina in piastre Luria Bertani (LB) agar, a cui erano stati aggiunti gli antibiotici Kanamicina (50µg/mL) e Cloramfenicolo (34µg/mL).

Solamente i cloni batterici contenenti il BAC ricombinato, possono sopravvivere in questo terreno poiché solo questi possiedono il gene KanR.

Tale tecnica è un metodo di selezione diretta poiché permette di ottenere solamente i cloni che contengono i BAC ricombinati.

6. Risoluzione del BAC ricombinato

Identificati i cloni batterici contenenti i BAC ricombinati, si è proceduto con la risoluzione di suddetti BAC ovvero con l'eliminazione del gene KanR.

Inizialmente il BAC è stato digerito con I-SceI, enzima di restrizione che riconosce una sequenza non palindromica di 18 bp, effettuando un taglio asimmetrico. Essendo presente una sola copia di tale sequenza a livello del BAC, localizzata a monte del gene KanR, il taglio promosso da I-SceI ha determinato la linearizzazione del BAC.

L'eliminazione vera e propria è stata condotta attraverso l'utilizzo del sistema inducibile Red recombination, che ha riconosciuto due sequenze omologhe di circa 50 bp, presentanti il medesimo orientamento, localizzate ai due lati del gene KanR.

7. Selezione dei cloni batterici GS1783 contenenti il BAC risolto

Replica plating

La selezione dei cloni contenenti il BAC risolto è stata ottenuta, inizialmente, attraverso un esperimento di replica plating o replicazione su piastra.

Tale tecnica, permette di comparare la crescita cellulare di una piastra primaria con quella di piastre secondarie, caratterizzate da un terreno di coltura, che si differenzia da quello della coltura primaria per la presenza di determinati inibitori della crescita o l'assenza di specifici nutrienti.

Nello specifico, colonie cellulari vengono prelevate dalla piastra primaria e posizionate in corrispondenza di piastre secondarie, dove le suddette cresceranno (o meno) rispettando la disposizione spaziale identificabile a livello della piastra primaria.

Nell'esperimento, le due piastre secondarie utilizzate contenevano un terreno completo (LB agar) e l'antibiotico Cloramfenicolo, ma una delle due presentava in aggiunta l'antibiotico Kanamicina.

Estrazione del DNA plasmidico

Dalle colonie batteriche cresciute esclusivamente nel terreno contenente il Cloramfenicolo, per verificare l'effettiva presenza in esse del BAC ricombinato, si è proceduto con l'estrazione del DNA plasmidico attraverso l'utilizzo del ZymoPURE Plasmid Mini Kit (ZymoPURE™). [Figura 6]

La purificazione plasmidica di cui sopra prevede la lisi alcalina delle cellule batteriche ed il successivo legame del DNA plasmidico ad una resina, contenuta in una colonna da microcentrifuga, dalla quale viene poi eluito.

La lisi alcalina è ottenuta mediante l'utilizzo di un Lysis Buffer (buffer di lisi), contenente NaOH che induce la solubilizzazione delle membrane e la denaturazione del DNA, attraverso la rottura dei legami a idrogeno presenti all'interno di questa macromolecola.

La separazione del DNA plasmidico dal DNA genomico, invece, è resa possibile dall'utilizzo di un Neutralization Buffer, caratterizzato da un pH acido che induce la rinaturazione del DNA; mentre il DNA plasmidico riacquisisce la sua conformazione originale in presenza di suddetto buffer, i filamenti del DNA cromosomico si aggregano in una massa insolubile che sedimenta, insieme alle proteine denaturate, in seguito a centrifugazione.

Infine, l'eluizione del DNA plasmidico dalla resina alla quale è adeso saldamente, è promossa da un Elution Buffer. Si ricordi che questa operazione viene eseguita in seguito alla rimozione, dal DNA plasmidico, delle contaminazioni quali RNA e proteine.

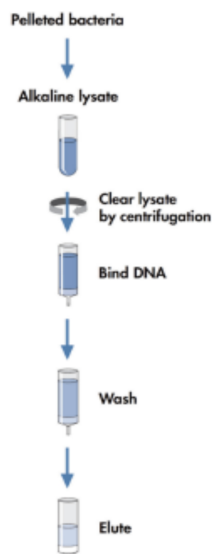


Figura 6 Estrazione di DNA plasmidico attraverso l'utilizzo di un ZymoPURE Plasmid Mini Kit

Spettrofotometria UV-Vis

La purezza e la concentrazione del DNA plasmidico estratto sono state verificate attraverso la spettrofotometria in assorbanza in luce ultravioletta da parte dello stesso, condotta al Nanodrop.

La spettrofotometria UV-Vis sfrutta la capacità posseduta da alcune molecole di assorbire radiazioni nel campo UV-Vis per ottenere informazioni qualitative e quantitative sulle stesse.

Per quanto concerne il DNA, che ha il suo massimo di assorbanza a 260 nm, un rapporto di assorbanza a 260/280 nm inferiore a 1,8 è indicativo di una contaminazione da parte di proteine o composti fenolici, mentre un rapporto di assorbanza 260/230 nm inferiore a 2,2 è rappresentativo di contaminazione da parte di carboidrati.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Il BAC estratto, e nello specifico la regione dello stesso contenente il frammento plasmidico integrato in seguito a Red recombination, è stato amplificato attraverso PCR.

La PCR è una tecnica che consente di ottenere molteplici copie di un frammento di DNA a patto che si conoscano le sequenze che ne delimitano le estremità [6].

Un ciclo di tale reazione si compone di 3 passaggi:

- denaturazione del DNA: è ottenuta scaldando la miscela a 94°C, temperatura alla quale i legami a idrogeno che tengono uniti i due

filamenti della doppia elica si spezzano;

- annealing (associazione) degli inneschi ai filamenti di DNA denaturato: si abbassa la temperatura a circa 50-60°C per consentire l'ibridazione dei due primer alle sequenze complementari;
- sintesi del DNA: la temperatura viene innalzata per garantire alla DNA polimerasi di allungare gli inneschi in direzione 5' → 3'.

Tale ciclo viene ripetuto numerose volte [6].

Elettroforesi su gel

Gli amplificati di PCR sono stati visualizzati attraverso l'allestimento di una reazione elettroforetica su gel di agarosio 1%, ottenuto sciogliendo 0,5 g di polvere di agarosio in 50 ml di buffer TBE 1x.

L'elettroforesi su gel è una tecnica che sfrutta le differenze di carica elettrica per separare le molecole presenti in una miscela; essendo il DNA dotato di carica negativa (per la presenza al proprio interno di gruppi fosfato), quando viene posto in un campo elettrico, migra verso il polo positivo (anodo) attraverso un gel (complessa matrice porosa) con una velocità dipendente dalla sua forma e dal rapporto carica/massa [7].

Sequenziamento Sanger

La struttura del BAC risolto è stata verificata, infine, mediante sequenziamento Sanger (condotto da BMR genomics, Padova, Italia).

Tale tecnica, o sequenziamento a terminazione di catena, avviene grazie ad una DNA polimerasi che utilizza come stampo il DNA di cui si vuole determinare la sequenza [7].

All'inizio della reazione di sequenziamento, al DNA stampo si ibrida un corto oligonucleotide che funge da innesco per la sintesi di un nuovo filamento di DNA complementare allo stesso [7].

La reazione di sintesi utilizza come substrato i quattro deossiribonucleotidi trifosfati (dNTPs) e una piccola quantità di ognuno dei quattro dideossinucleotidi (ddNTPs), ciascuno marcato con un gruppo fluorescente diverso [7]. Nel momento in cui questi ultimi vengono incorporati nella molecola di DNA nascente, si arresta l'allungamento della stessa poiché sono privi del gruppo 3'-OH, necessario per la formazione del legame fosfodiesterico con il nucleotide successivo. Si ottengono, quindi, frammenti tronchi di lunghezza differente, ciascuno dei quali termina con uno specifico ddNTP [7].

Tali frammenti sono, infine, separati in base alla propria lunghezza mediante elettroforesi capillare su gel di poliacrilammide, ed analizzati tramite l'utilizzo di

un rilevatore di fluorescenza, che distingue i diversi fluorofori legati a ciascun ddNTP [7]. [Figura 7]

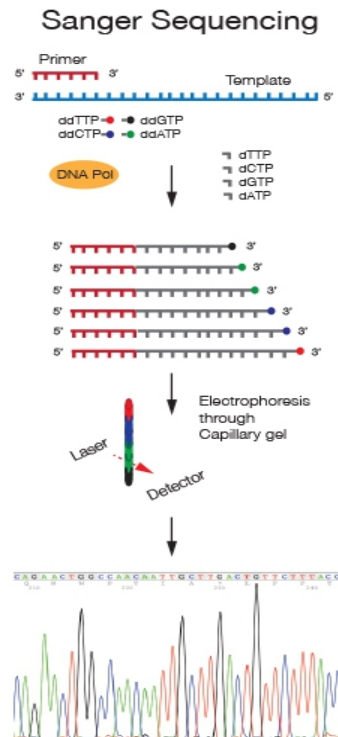


Figura 7 Sequenziamento Sanger; da Cogentech

8. Trasfezione e ricostituzione delle particelle virali

In seguito alla validazione dei cloni batterici contenenti il BAC risolto, si è proceduto con la purificazione del DNA plasmidico in essi contenuto mediante il Qiagen MIDIPrep Kit (Qiagen).

Il BAC risolto, contenuto in un terreno Opti-MEM, è stato successivamente trasfettato in cellule 293T, presenti in uno stato semiconfluente in una cell culture flask di 25 cm², per ottenere la ricostituzione delle particelle virali.

Per introdurre DNA esogeno all'interno di cellule della linea delle 293T, cellule che derivano da fegato embrionale umano, contengono l'antigene T del virus SV40 (proteina trasformante), sono facili da mantenere, altamente riproducibili e caratterizzate da una elevata trasfettabilità, è stato utilizzato il metodo di trasfezione basato su lipofectamine (Invitrogen™ Lipofectamine™ 2000 reagent, ThermoFisher Scientific).

Le lipofectamine sono lipidi cationici che formano un liposoma unilamellare,

caratterizzato da una superficie carica positivamente; quest'ultima permette l'associazione, senza internalizzazione, con il DNA (carico negativamente) e quindi la formazione di un complesso di trasfezione detto lipoplesso [8]. Il lipoplesso viene localizzato sulla superficie delle cellule mediante interazioni elettrostatiche che si instaurano tra i lipidi cationici e le membrane cellulari (cariche negativamente), in modo da poter essere successivamente endocitato [8]. La maggior parte delle vescicole endosomali contenenti le molecole di DNA esogeno viene degradata; solo una piccola quantità di queste è in grado di trasportare il DNA a livello nucleare dove può essere espresso [8].

Dopo 5 ore di incubazione con lipofectamina 2000, le cellule trasfettate sono state incubate a 37°C in un terreno DMEM supplementato con il 10% di FBS; nei 3 giorni successivi, per verificare la riuscita del processo di trasfezione, le 293T sono state analizzate al microscopio a fluorescenza.

9. Amplificazione virale

Il virus ottenuto dalla trasfezione delle cellule 293 T è stato amplificato in cellule della linea Vero CCL81, ottenuta dal tessuto renale derivato da una green monkey adulta africana.

Trascorse 72 ore, le cellule 293T infettate ed il surnatante delle stesse sono stati trasferiti in una cell culture flask di 75 cm² contenente uno strato confluyente di cellule Vero CCL81, seminate il giorno precedente.

Dopo aver analizzando suddette cellule per 72 ore ed aver valutato gli effetti citopatici promossi dalle particelle virali in esse presenti, il surnatante delle stesse è stato prelevato ed utilizzato per infettare altre 5 flask di 75 cm² contenenti un monostrato confluyente di cellule Vero. Dopo un'ora circa di infezione, il surnatante è stato rimosso e sostituito con terreno contenente DMEM 2% FBS 1% penicillina/streptomomicina.

Trascorsi tre giorni dall'infezione delle cellule Vero, si è proceduto con l'arresto dell'amplificazione virale e con lo stock delle particelle virali ottenute.

Le superfici delle flask di 75 cm² sono state grattate con lo scraper in modo da distaccare le cellule adese alle stesse e tutto il medium è stato centrifugato, per ottenere un pellet cellulare da cui ricavare il virus (infatti il virus intracellulare permette di ottenere titoli virali più alti rispetto a quello contenuto nel surnatante). Successivamente, sono stati condotti 3 cicli di congelamento (in ghiaccio secco) e scongelamento, in modo da ottenere la lisi cellulare; la formazione di cristalli di ghiaccio durante la fase di congelamento e la contrazione degli stessi durante lo scongelamento, inducono un indebolimento delle membrane cellulari e la loro conseguente rottura. Il processo di disgregazione delle membrane cellulari è stato

completato mediante una reazione di sonicazione (tecnica basata sull'utilizzo di ultrasuoni) di 3 minuti.

Infine, tramite centrifugazione, il pellet, contenente i detriti cellulari, è stato separato dal surnatante, presentante elevate concentrazioni di virus. Il surnatante è stato poi aliquotato in Eppendorf da 25µl per la successiva titolazione.

10. Titolazione mediante saggi di placca

La titolazione delle particelle virali ottenute dall'amplificazione precedente è stata condotta su cellule Vero CCL81 coltivate in piastre Multiwell da 48 pozzetti.

La titolazione ha utilizzato la strategia del saggio di placca, tecnica che quantifica i virioni attraverso il conteggio di placche discrete (unità infettive e zone morte cellulari) in colture cellulari [9]. Nonostante siano stati sviluppati metodi alternativi per la quantificazione virale, quali saggi immunologici e qRT-PCR (Real-Time Quantitative Reverse Transcription), i saggi di placca rappresentano il gold standard nella determinazione delle concentrazioni virali, poiché solo questi consentono di definire il numero effettivo di particelle virali infettive presenti in un dato campione [9].

Durante un saggio di placca, un monostrato confluyente cellulare viene infettato da un virus litico di concentrazione sconosciuta, precedentemente diluito in serie, e, successivamente, viene ricoperto con un mezzo immobilizzante per limitare la diffusione delle particelle virali e quindi per ottenere la formazione di placche distinte [9]. Tali placche, infine, sono contate, spesso in seguito a colorazione delle stesse con appositi coloranti, in modo da ottenere la titolazione dei campioni di stock virali [9].

Il titolo virale si ricava applicando la seguente formula:

$$\text{Titolo (PFU/ml)} = \frac{(\text{Media delle placche} \times \text{Diluizione})}{(\text{Volume di infezione})}$$

Nell'esperimento in questione, i surnatanti di cui sopra sono stati diluiti in serie in terreno DMEM privo di siero, e sono stati impiegati per infettare le cellule Vero; per ogni diluizione sono state infettate due piastre.

L'infezione delle Vero, condotta a 37 °C per un'ora in un'atmosfera contenente 5% CO₂, è stata seguita da un lavaggio delle cellule stesse con PBS1x e dalla loro copertura con DMEM, 2% FBS, 0.75% carbossimetilcellulosa per limitare l'infezione cellulare al monostrato circostante. Infine, dopo 72 ore dall'infezione, per poter contare le placche, si è proceduto con la fissazione del campione mediante l'utilizzo di formaldeide 5% (10 minuti, temperatura ambiente) e con la

colorazione dello stesso mediante l'utilizzo di una soluzione 0.1% di Cristal Violetto. Sono state prese in considerazione le diluizioni che hanno prodotto un numero medio di placche $20 < n < 100$.

RISULTATI

1. BAC pHSV1(17+)Lox-EGFP- $\Delta\gamma$ 34.5Zeo- Δ ICP47-CD68-mCherry

Il processo ricombinativo tra il BAC pHSV-1- $\Delta\gamma$ 34.5/ Δ Us12/EGFP ed il frammento plasmidico ottenuto dal taglio, mediato da I-CeuI e HpaI, del plasmide pUL3-CD68mCherry-UL4, promosso dal sistema Red recombination, ha determinato la formazione del BAC pHSV1(17+)Lox-EGFP- $\Delta\gamma$ 34.5Zeo- Δ ICP47-CD68-mCherry. [Figura 8]

Come precedentemente descritto, tale BAC è stato successivamente risolto attraverso un secondo evento ricombinativo che ha consentito la rimozione del gene KanR.

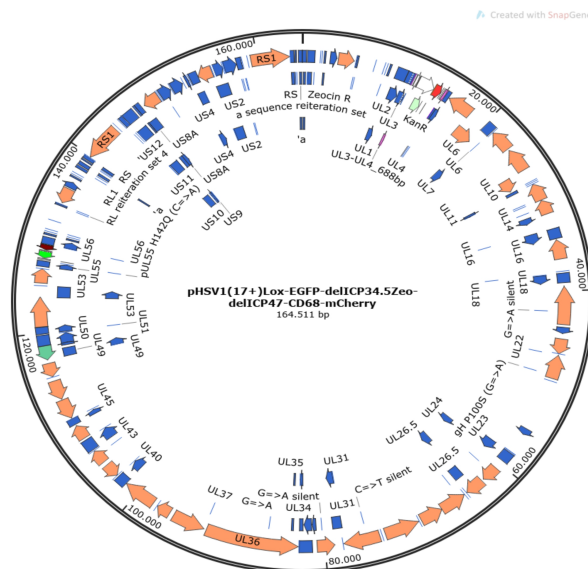


Figura 8 Mappa del BAC pHSV1(17+)Lox-EGFP- $\Delta\gamma$ 34.5Zeo- Δ ICP47-CD68-mCherry

2. I cloni batterici GS1783 contenenti il BAC risolto crescono solamente nel terreno privo di Kanamicina

I cloni batterici GS1783 contenenti il BAC pHSV1(17+)Lox-EGFP- $\Delta\gamma$ 34.5Zeo- Δ ICP47-CD68-mCherry risolto, al termine dell'esperimento di replica plating, sono cresciuti esclusivamente nella piastra secondaria contenente LB agar e Cloramfenicolo. Essendo essi privi del gene KanR, in presenza di tale antibiotico sono indotti a morire.

Le due colonie batteriche presentanti il BAC ricombinato, inoltre, hanno assunto dimensioni più ingenti rispetto a quelle contenenti il BAC non risolto; quest'ultime, caratterizzate da un BAC linearizzato (come conseguenza del taglio

promosso da I-SceI), hanno un'emivita inferiore rispetto alle prime.

3. Le colonie batteriche contenenti il BAC risolto producono ampliconi di dimensioni inferiori a 3918 bp

Le colonie batteriche GS1783 contenenti il BAC pHSV1(17+)Lox-EGFP- $\Delta\gamma$ 34.5Zeo- Δ ICP47-CD68-mCherry risolto hanno prodotto, in seguito a PCR, ampliconi di dimensioni inferiori rispetto a quelle degli amplificati (di circa 3918 bp) ottenuti da cloni batterici presentanti il BAC di cui sopra che ha mantenuto il gene KanR.

Al termine della corsa elettroforetica condotta su gel di agarosio 1%, la banda relativa agli ampliconi delle prime colonie si trova più in basso rispetto a quella delle seconde, a dimostrazione del fatto che suddetti prodotti di amplificazione sono dotati di un peso molecolare inferiore. [Figura 9]

Si ricordi che le molecole lineari di dsDNA migrano a velocità inversamente proporzionali al logaritmo in base 10 del numero di paia di basi che le costituisce.



Figura 9 Elettroforesi su gel di agarosio degli amplificati di PCR ottenuti da una colonia batterica recante il BAC pHSV1(17+)Lox-EGFP- $\Delta\gamma$ 34.5Zeo- Δ ICP47-CD68-mCherry risolto

4. L'efficienza della trasfezione delle cellule 293T è evidenziata dall'espressione di EGFP e dall'insorgenza di effetti citopatici

Nei tre giorni successivi alla trasfezione basata su lipofectamine (Invitrogen™ Lipofectamine™ 2000 reagent, ThermoFisher Scientific) delle cellule 293T, presenti in uno stato semiconfluente in una cell culture flask di 25 cm², si è proceduto con l'analisi delle stesse mediante l'utilizzo di un microscopio a

fluorescenza.

Tramite questo strumento, è stata rilevata l'espressione, sempre più ingente con il passare dei giorni, di EGFP da parte di suddette cellule. Ciò ha consentito di dimostrare che la procedura di trasfezione ha avuto successo e che, quindi, ha garantito la ricostituzione di particelle virali contenenti il BAC pHSV1(17+)Lox-EGFP- $\Delta\gamma$ 34.5Zeo- Δ ICP47-CD68-mCherry risolto.

Dall'analisi al microscopio, è stato possibile evidenziare anche alcuni degli effetti citopatici che le particelle virali hanno avuto nei confronti delle cellule 293T. Infatti, HSV-1 è un virus che induce importanti cambiamenti morfologici-strutturali nelle cellule da esso infettate: i principali comprendono rigonfiamento delle cellule suddette, produzione di corpi inclusi nucleari Cowdry di tipo A, migrazione della cromatina e formazione di cellule giganti multinucleate. Anche queste alterazioni cellulari si evincono in maniera più evidente con il passare dei giorni. [Figura 10]

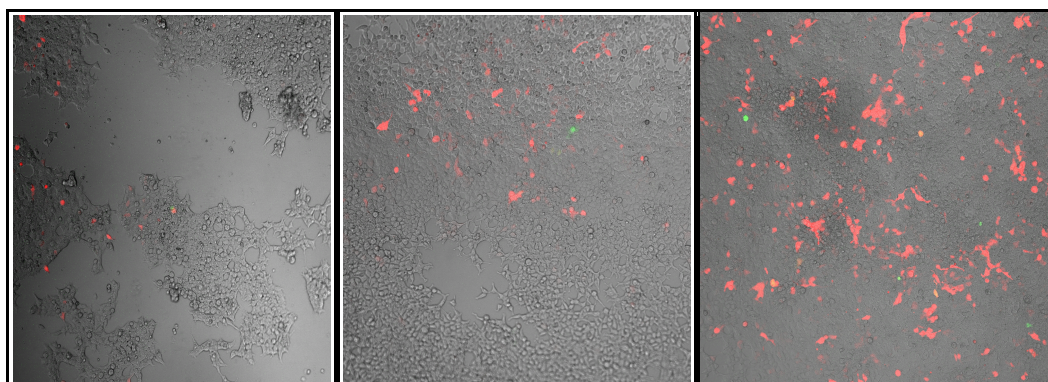


Figura 10 Trasfezione delle 293T con il BAC pHSV1(17+)Lox-EGFP- $\Delta\gamma$ 34.5Zeo- Δ ICP47-CD68-mCherry risolto dopo 24, 48 e 72h

5. Nelle cellule 293T trasfettate viene espressa mCherry

L'indagine al microscopio a fluorescenza delle cellule 293T trasfettate di cui sopra [Figura 10], ha evidenziato la produzione, da parte delle stesse, della proteina fluorescente rossa mCherry, codificata da un gene che, all'interno del BAC pHSV1(17+)Lox-EGFP- $\Delta\gamma$ 34.5Zeo- Δ ICP47-CD68-mCherry risolto, è sotto il controllo del promotore umano CD68.

Fisiologicamente, suddetto promotore regola l'espressione del gene codificante per CD68, glicoproteina transmembranaria altamente glicosilata localizzata principalmente negli endosomi tardivi, dove svolge probabilmente un ruolo nell'elaborazione dell'antigene oppure nella protezione delle membrane lisosomiali contro le idrolasi lisosomiali [10]. L'espressione dell'mRNA

codificante per CD68 è rilevabile non solo in macrofagi e monociti umani, ma anche in cellule endoteliali, fibroblasti, linfociti e cellule tumorali di diversa origine, anche se a livelli inferiori rispetto a quanto si osserva in monociti e macrofagi. [10]. Ciò è indicativo della presenza, a livello del promotore stesso, di elementi cis-regolatori cellulo-specifici e di architetture promotrici [10].

Esperimenti precedenti di trasfezioni transitorie hanno dimostrato che il promotore CD68 dirige l'espressione di geni reporter non solo in linee cellulari di macrofagi, ma anche in linee cellulari di non macrofagi, quali cellule di epatoma umano HepG2, cellule HeLa, 293T e CHO, evidenziando che la selettività di suddetto promotore non è assoluta[10].

6. L'efficienza dell'amplificazione virale nelle cellule Vero è evidenziata dall'espressione di EGFP e dall'insorgenza di effetti citopatici

In maniera analoga a quanto descritto precedentemente per le cellule 293T, le cellule Vero CCL81, residenti in cell culture flask di 75 cm² ed infettate con le particelle virali ottenute dalla trasfezione delle prime, sono state analizzate al microscopio a fluorescenza per tre giorni consecutivi.

Tramite queste indagini, si sono evidenziate l'espressione di EGFP da parte delle cellule Vero e la presenza di effetti citopatici a carico delle stesse, a dimostrazione dell'efficienza del processo di amplificazione virale. Entrambi questi fenomeni erano più marcati con il passare dei giorni.

DISCUSSIONE

Al termine di questo progetto di ricerca è stato ottenuto un virus oncolitico basato su HSV-1 modificato per interagire selettivamente con monociti umani, cellule potenzialmente utilizzabili come carrier per la somministrazione sistemica di tale agente terapeutico.

Le particelle virali prodotte nelle cellule Vero CCL81 e titolate sono state successivamente impiegate a MOI diverse (1, 3 e 5) per infettare colture cellulari di THP-1 (ATCC TIB-202™), linea cellulare monocitica umana originariamente ottenuta da un paziente affetto da leucemia monocitica acuta. L'infezione di tali cellule, piastrate in un terreno privo di siero, è stata condotta a 37 °C in un'atmosfera contenente il 5% di CO₂ per un'ora circa. In seguito, il terreno privo di siero è stato sostituito con un terreno completo e le cellule THP-1 sono state incubate.

Nei tre giorni successivi, si è proceduto con l'analisi delle colture cellulari THP-1 al microscopio a fluorescenza, operazione che ha evidenziato un progressivo incremento della fluorescenza verde e rossa a livello cellulare. La produzione delle proteine EGF e mCherry, ha dimostrato la capacità del virus oncolitico di cui sopra di infettare i monociti e di replicarsi in essi, nonostante durante le infezioni naturali di HSV-1 questi leucociti non siano il target primario virale.

Tale risultato è favorevole alla possibilità di utilizzare i monociti come carrier per un virus oncolitico basato su HSV-1.

BIBLIOGRAFIA

1. Reale, A.; Vitiello, A.; Conciatori, V.; Parolin, C.; Calistri, A.; Palù, G. Perspectives on Immunotherapy via Oncolytic Viruses. *Infectious Agents and Cancer* 2019, 14, doi: 10.1186/s13027-018-0218-1.
2. Kaufman, H.L.; Kohlhapp, F. J.; Zloza, A. Oncolytic viruses: a new class of immunotherapy drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2015, 14, doi:10.1038/nrd4663.
3. Kukhanova, M. K.; Korovina, A. N.; Kochetkov, S. N. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry*, 2014, 79, doi: 10.1134/S0006297914130124.
4. Reale, A.; Calistri, A.; Altomonte, J. Giving Oncolytic Viruses a Free Ride: Carrier Cells for Oncolytic Virotherapy. *Pharmaceutics*, 2021,13, doi: 10.3390/pharmaceutics13122192.
5. Caldwell, B. J.; Bell, C. E. Structure and mechanism of the Red recombination system of bacteriophage. *Progress in biophysics and molecular biology*, 2019, 147, doi: 10.1016/j.pbiomolbio.2019.03.005.
6. Amaldi, F.; Benedetti, P.; Pesole, G.; Plevani, P. *Biologia Molecolare, Terza edizione, Bologna, Casa Editrice Ambrosiana, 2018.*
7. Brown, A. T.; *Biotechnologie Molecolari, Principi e Tecniche, Seconda edizione, Milano, Zanichelli Editore, 2017.*
8. Han, P.; Hanlon, D.; Sobolev, O.; Chaudhury, R.; Edelson, R. L. Immunobiology of Dendritic Cells Part B. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 2019.
9. Baer, A.; Kehn-Hall, K. Viral Concentration Determination Through Plaque Assays: Using Traditional and Novel Overlay System. *Immunology and Infection*, 2014, doi: 10.3791/52065.
10. Gottfried, E.; Kunz-Schughart, L. A.; Weber, A.; Rehli, M.; Peuker, A.; Muller, A.; Kastenberger, M.; Brockhoff, G.; Andreesen, R.; Kreutz, M. Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. *Scandinavian Journal of Immunology*, 2008.