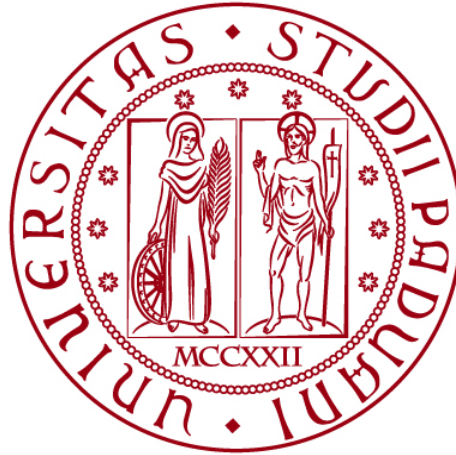


Università degli Studi di Padova
Dipartimento di Biologia
Corso di Laurea in Biotecnologie



Elaborato di Laurea

**Valutazione dell'infettività di diversi agenti
oncolitici basati sul virus dell'herpes simplex di
tipo 1**

Tutor: Prof.ssa Arianna Calistri
Dipartimento di Medicina Molecolare – DMM

Co-tutor: Dott.ssa Adriana Vitiello
Dipartimento di Medicina Molecolare - DMM

Laureanda: Emma Bettini

Anno Accademico 2021/2022

Indice

1. Sommario	3
1. Abstract	3
2. Introduzione	5
2.1 Tumori al seno e carcinoma triplo negativo	5
2.2 Viroterapia oncolitica	6
2.3 Herpes simplex virus 1 (HSV-1)	6
2.3 HSV-1 ingegnerizzati a scopo oncolitico	8
3. Scopo della tesi	11
4. Materiali e metodi	13
4.1 Materiali	13
4.1.1 Linee cellulari	13
4.1.2 Ceppi di HSV-1	13
4.2 Metodi	14
4.2.1 Immunofluorescenza	14
4.2.2 Saggio d'infezione	14
5. Risultati	17
5.1 Valutazione del volume ottimale dei diversi stock di HSV-1 oncolitici per ottenere una molteplicità di infezione pari a 0.01 PFU/cellula	17
5.2 Analisi dell'effetto citopatico dei virus e della sensibilità e permissività delle cellule ad essi mediante saggio d'infezione ed immunofluorescenza	19
6. Conclusioni e discussione	23
7. Bibliografia	25
Ringraziamenti	26

1. Sommario

Questo progetto di tesi si è inserito all'interno di un progetto più ampio che verte sullo sviluppo di agenti oncolitici basati sul virus dell'herpes simplex di tipo 1 per il trattamento dei tumori solidi. Nel momento in cui i virus oncolitici vengono valutati in vitro per la loro attività oncolitica e per la loro selettività nei confronti di particolari tipi di tumori, al fine di selezionare quale testare in vivo, è fondamentale partire da preparazioni virali standardizzate soprattutto in termini di infettività, ovvero la capacità del virus di entrare nelle cellule bersaglio e liberare il genoma che può essere replicato e trascritto.

In questa tesi è stata valutata l'infettività di diverse tipologie HSV-1 wild type e ricombinante, mediante saggio di immunofluorescenza eseguito su cellule di tumore mammario triplo negativo (MDA-MB-231) infettate con quantità paragonabili di particelle virali. Inoltre, i virus sono stati valutati per la loro capacità replicativa sempre utilizzando le stesse cellule bersaglio e un saggio di titolazione mediante formazione di placche su cellule di rene di scimmia Vero.

I risultati ottenuti ci hanno permesso di standardizzare gli stock virali prodotti e di valutarne con precisione la capacità replicativa in cellule tumorali.

1. Abstract

This thesis is part of a project focused on the development of oncolytic agents based on the herpes simplex virus type 1 for the treatment of solid tumors. In order to select the best performing recombinant HSV-1s to test in vivo, viruses are initially assayed in vitro for their lytic activity and specificity towards different types of tumors. In this context, it is crucial to adopt standardized viral preparations, especially in terms of infectivity, i.e. the ability of the virus to enter into target cells and make the genome available for replication and transcription.

In this thesis the infectivity of different types of wild-type and recombinant HSV-1s was evaluated, through an immunofluorescence assay run on breast cancer triple negative cells (MDA-MB-231) infected with comparable quantities of viral particles. Furthermore, viruses were tested for their replicative ability by adopting the same target cells and titrated by plaque formation on monkey kidney Vero cells. The obtained results allowed us to standardize the produced viral stocks and to precisely evaluate the recombinant HSV-1s replication ability in tumor cells.

2. Introduzione

2.1 Tumori al seno e carcinoma triplo negativo

Il tumore al seno è una condizione che coinvolge milioni di donne ogni anno. Secondo il rapporto del 2012 dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, i decessi causati da questa tipologia di tumore rappresentano il 23% nelle donne. In seguito, nel 2018, uno studio canadese è stato pubblicato su *"The Lancet Global Health"* ed ha reso noto che, grazie all'analisi di *Globocan* dell'Organizzazione Mondiale della Sanità, in quell'anno sono stati diagnosticati 2,1 milioni di nuovi casi in tutto il mondo, il 70% dei quali riguardano donne intorno al periodo della menopausa e i decessi sono stati circa 163 mila. Inoltre, dati del 2021, indicano che il tasso d'incidenza del tumore al seno a livello globale, calcolato in base ad uno standard d'età, è di 48/100.000; questo tasso ha lievi variazioni in alcune aree come l'Africa sub-sahariana che vede un tasso di 30/100.000 e un tasso di 70/100.000 nelle aree dell'Europa occidentale e del Nord America. (Wilkinson L. *et al.*, 2021)

Il tumore al seno può presentare diverse caratteristiche morfologiche che ne permettono la distinzione in luminal A, luminal B, HER2+ (fattore di crescita epidermico umano) B2, HER overespresso e tumore al seno triplo negativo (TNBC) basale. I tumori di tipo luminal A, luminal B, HER2+ B2, HER overespresso sono classificati "ormone positivo" in quanto esprimono uno o più recettori ormonali tra il recettore per estrogeni (ER), il recettore per il progesterone (PR) o il recettore per HER2. In particolare, luminal A è caratterizzato da ER/RR+ e HER2- , luminal B da ER/RR+ < 20% e HER2- , HER2+ B2 da ER/RR+ e HER2 overespresso, HER2 overespresso da ER-, PR-, HER2 overespresso. Oltre ai tumori "ormone positivo", esiste il tumore al seno triplo negativo (TNBC) ovvero una tipologia di tumore che manca dell'espressione di tutti questi recettori (ER-, PR-, HER2-). Il TNBC presenta un'elevata incidenza soprattutto nelle donne afroamericane o di etnia nera nel periodo della premenopausa e la percentuale di mortalità è del 40% nei primi 5 anni dalla diagnosi, di cui circa il 46% delle pazienti sviluppano metastasi soprattutto al cervello o agli organi viscerali. La sopravvivenza media a questa tipologia di tumore è di circa 13 mesi, decisamente più bassa rispetto alle altre tipologie di cancro alla mammella. (Yin L. *et al.*, 2020)

Le terapie per il cancro alla mammella sono decise sulla base allo stadio del tumore e alle sue caratteristiche molecolari e, sulle base di queste informazioni, si beneficia di una strategia multimodale. Questo tipo di strategia si avvale della combinazione di più terapie tra la chemioterapia neoadiuvante il cui fine è quello di ridurre le dimensioni della massa tumorale tali per cui è possibile operare chirurgicamente, la rimozione chirurgica mediante lumpectomia (asportazione solo di una parte del tessuto mammario comprendente il tumore) o mastectomia (rimozione totale della mammella), la radioterapia o la chemioterapia adiuvante. I medicinali più noti e utilizzati in combinazione tra loro sono epirubicina, docetaxel, doxorubicina, ciclofosfamide e metotrexato, docetaxel e carboplatino. Con l'avvento

dell'immunoterapia sono stati introdotti altri agenti come l'anticorpo monoclonale trastuzumab ampiamente utilizzato per i tumori HER2 +, anche in combinazione con altri medicinali antitumorali come taxani, cisplatino e Heat shock protein 90. (Funmilola A. Fisusi *et al.*, 2019). La scelta di una combinazione piuttosto di un'altra, permette al paziente di beneficiare del trattamento migliore con il minor numero di effetti collaterali e recidive.

Questi trattamenti sono utilizzati principalmente per i tumori al seno "ormone positivi" mentre il TNBC non risponde alle classiche terapie menzionate in precedenza. Solitamente, il TNBC viene trattato con radioterapia e chemioterapia in aggiunta alla mastectomia ma, nonostante ciò, è caratterizzato da un'elevata invasività, metastatizzazione e una prognosi infausta. (Yin L. *et al.*, 2020)

Da ciò deriva la necessità di mettere a punto nuove terapie per la cura di questo tumore e la viroterapia oncolitica presenta delle ottime potenzialità per essere efficace contro il cancro alla mammella triplo negativo.

2.2 Viroterapia oncolitica

La viroterapia oncolitica risale ai primi del Novecento, quando pazienti colpiti da tumori maligni, mostrarono una regressione spontanea del tumore a seguito di un'infezione virale. (Kelly E, Russell SJ., 2007). Esperimenti condotti successivamente su modelli animali hanno dimostrato ulteriormente che i virus sono in grado di infettare e replicare nelle cellule tumorali, e pertanto hanno dato avvio al loro sviluppo e perfezionamento. La viroterapia oncolitica, ad oggi, prevede l'utilizzo di virus oncolitici ovvero virus opportunamente ingegnerizzati in grado di replicare e lisare in maniera selettiva solo le cellule tumorali, lasciando intatte le cellule sane. Questi virus rappresentano un'alternativa per il trattamento dei tumori solidi che non rispondono alle normali terapie attualmente presenti in clinica. (Fukuhara H. *et al.*, 2016)

2.3 Herpes simplex virus 1 (HSV-1)

HSV-1 è un virus appartenente alla famiglia *Herpesviridae* ed è classificato nella sottofamiglia degli *Alphaherpesvirinae*. Questo virus è provvisto di pericapside sul quale sono ancorate le glicoproteine necessarie per l'ingresso nella cellula ospite. Sul lato interno dell'envelope è presente uno strato proteico amorfo definito tegumento composto da circa 20 proteine fondamentali per la trascrizione di HSV-1 ed infine all'interno si trova il nucleocapside che racchiude il genoma virale.

Il genoma di HSV-1 è a doppio filamento di DNA lineare suddiviso in due componenti note come regioni UL e US, fiancheggiate da copie di due sequenze ripetute e invertite (Figura 1). Nella sequenza UL è presente l'origine di replicazione oriL, fiancheggiata dai geni codificanti per ICP8 e UL30, mentre all'interno di ciascuna delle sequenze fiancheggianti US è presente un'origine di replicazione oriS, fiancheggiata da ICP4 e ICP22/47. All'interno della regione UL sono presenti poi sette proteine virali fondamentali per la replicazione del core, in

particolare UL9 (proteina legante l'origine), ICP8 (proteina legante ssDNA), UL5, UL8 e UL52 (complesso elicasi-primasi), UL30 (DNA polimerasi) e UL42 (fattore di processività). (Packard J.E. et al., 2021)

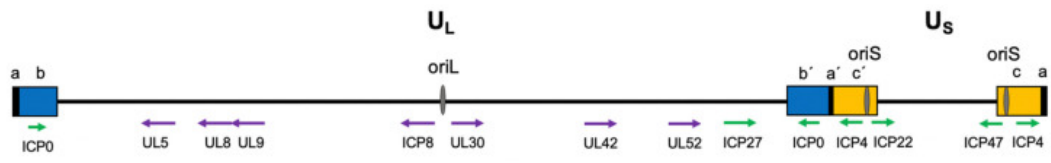


Figura 1: Genoma di *Herpes simplex virus 1* (da Packard J.E. et al., 2021)

La replicazione e la trascrizione di HSV-1 avvengono all'interno del nucleo della cellula ospite ed i geni sono espressi in ordine cronologico. Infatti, I geni di HSV-1 si distinguono in 3 categorie: geni immediati precoci (IE) espressi subito dopo l'ingresso di HSV-1 nel nucleo della cellula ospite, i geni precoci (E) ed i geni tardivi (L). (Jessica E. Packard *et al.*, 2021). Tra i geni IE troviamo il gene ICP4 codificante per l'omonima proteina. ICP4 è il principale fattore di trascrizione virale necessario per l'attivazione della trascrizione dei geni E ed L, reclutando anche altri fattori come la proteina TATA binding cellulare, TFIID e il complesso Mediator, per favorire l'inizio della trascrizione. Un altro gene IE fondamentale è Us12 che codifica per la proteina ICP47. ICP47 è in grado di inibire efficientemente la via di presentazione dell'antigene nel complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHC I) legandosi a TAP, trasportatore umano adibito alla presentazione dell'antigene, e bloccandone il legame con i peptidi antigenici. In questo modo, viene precluso il contatto tra linfociti T citotossici e HSV e ciò può contribuire a stabilire un'infezione perenne nell'ospite (J. Cheng *et al.*, 2018).

Per evadere dal sistema immunitario e, più precisamente, per evitare che la cellula avvii i normali processi di morte cellulare, l'HSV-1 codifica per due proteine fondamentali: US11 e ICP34.5. US11 codificata dal gene tardivo Us11, è una proteina anti-autofagica in grado di legare ed inibire la protein chinasi RNA-dipendente (PKR) e di conseguenza impedisce la fosforilazione del fattore di allungamento II della traduzione (EIFII α) e quindi l'apoptosi. Invece, ICP34.5 noto anche come il fattore di neurovirulenza, è codificata dal gene tardivo γ 34.5. ICP34.5 è in grado di inibire il processo autofagico legandosi alla proteina Beclin1 e blocca il processo di traduzione proteica legandosi alla proteina fosfatasi 1 α (PP1 α) favorendo la defosforilazione di eIFII α (Figura 2). ICP34.5 inoltre facilita l'uscita del virione dal nucleo della cellula ospite ed inverte l'arresto traslazionale portando al mantenimento dell'espressione dei fattori virali che caratterizzano l'evasione dalle difese dell'ospite. (R. Manivanh *et al.*, 2020).

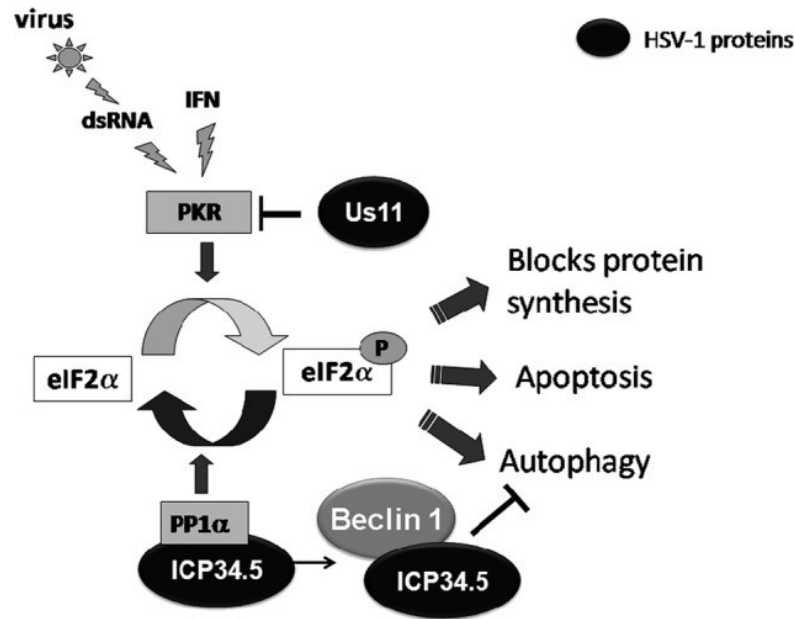


Figura 2: Rappresentazione schematica del meccanismo di azione di ICP34.5 e Us11 (da M. Lussignol et al., 2013)

2.3 HSV-1 ingegnerizzati a scopo oncolitico

HSV-1 è un ottimo candidato per lo sviluppo di virus oncolitici per diverse caratteristiche biologiche: i) HSV-1 è facilmente ingegnerizzabile inserendo o eliminando geni non essenziali senza che si vada ad alterare la sua capacità replicativa; ii) HSV-1 ha un ampio tropismo ovvero è in grado di infettare un gran numero di cellule di diverse specie; iii) HSV-1 lisa la cellula ospite; iv) esistono farmaci in grado di eliminare il virus come l'Aciclovir, Valaciclovir, Vanciclovir e altri ancora (M. K. Kukhanova et al., 2014). Attualmente, l'unico HSV-1 oncolitico approvato in clinica per il trattamento del melanoma non resecabile chirurgicamente, è il Talimogene Laherparepvec o T-VEC. Il T-VEC iniettato direttamente nel tumore, è in grado di riconoscere, replicare e lisare in maniera specifica le sole cellule tumorali con effetti minimi nei confronti delle cellule sane e dell'intero organismo. A livello genico, il T-VEC presenta la delezione dei geni $\gamma 34.5$ presenti in duplice copia in modo che il virus risulti neuroattenuato ed inoltre è stato deleto il gene Us12 che codifica per la proteina ICP47. La delezione di $\gamma 34.5$ è stata sostituita dalla sequenza codificante per il fattore GM-CSF (*Human Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*). GM-CSF permette il reclutamento delle cellule presentanti l'antigene nella regione tumorale in modo da promuovere la risposta dei linfociti T citotossici (D. B. Johnson et al., 2015).

Nel laboratorio dove ho svolto il mio tirocinio, sono presenti virus HSV-1 appartenenti a ceppi diversi quali ceppo F ed il ceppo 17+ e in particolare, sono presenti i virus wildtype di entrambi i ceppi ed i virus con la delezione del gene $\gamma 34.5$, rispettivamente R3616 e HSV-1 $\Delta\gamma 34.5$ HCMV-FLuc. Quest'ultimo presenta poi il gene della firefly luciferasi sotto il promotore forte del citomegalovirus umano nella regione intergenica UL55-UL56. A partire dal virus

HSV-1 $\Delta\gamma34.5$ HCMV-Fluc è stata eliminata, mediante la tecnica della BAC mutagenesi, il gene Us12 codificante per la proteina ICP47, generando così il virus HSV-1 $\Delta\gamma34.5/\Delta$ ICP47 HCMV-Fluc. Successivamente, il gene della luciferasi è stato sostituito, sempre utilizzando la tecnica della BAC mutagenesi, con la proteina EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein) e con la citochina interleuchina 12 umana generando rispettivamente HSV-1 $\Delta\gamma34.5/\Delta$ ICP47 HCMV-EGFP e HSV-1 $\Delta\gamma34.5/\Delta$ ICP47 HCMV-hIL12.

3. Scopo della tesi

La viroterapia oncolitica è una strategia terapeutica innovativa basata sull'utilizzo di virus oncolitici, al fine di migliorare i trattamenti oncologici. I virus oncolitici sono virus, naturali o ingegnerizzati, in grado di replicare in maniera selettiva nelle cellule tumorali. Tra questi, il virus oncolitico T-VEC basato sull'herpes simplex di tipo 1 è l'unico, ad oggi, approvato in clinica per il trattamento del melanoma non resecabile chirurgicamente.

Il presente elaborato di tesi si inserisce all'interno di un progetto più ampio che studia l'uso di virus ingegnerizzati basati sull'herpes simplex di tipo 1 per il trattamento del tumore alla mammella triplo negativo. Il tumore al seno presenta un'incidenza elevata nelle donne e in particolare, il tumore triplo negativo non risponde alle normali terapie oggi utilizzate.

In questo elaborato è stata valutata la capacità di infezione di diversi virus oncolitici basati sull'HSV-1 rispetto al virus wild type del ceppo F e 17+ al fine di ottimizzare l'efficienza di infezione nelle cellule target di tumore al seno triplo negativo MDA-MB-231. In parallelo, è stata valutata la differenza di infezione da parte di due ceppi di HSV-1, il ceppo F e il ceppo 17+.

4. Materiali e metodi

4.1 Materiali

4.1.1 Linee cellulari

Le cellule impiegate in questo progetto di tesi sono:

-**cellule VERO** (ATCC® CCL-81™) sono cellule epiteliali derivate dal tessuto di rene della scimmia *Cercopithecus aethiops*. In questo progetto sono state utilizzate per tecniche di titolazione e di immunofluorescenza.

-**cellule MDA-MB-231** (ATCC® CRM-HTB-26™) sono cellule di adenocarcinoma mammario di Homo Sapiens e rappresentano il tumore alla mammella triplo negativo.

Entrambe le linee crescono in terreno DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) addizionato al 10% v/v di FBS (Fetal Bovine Serum) in incubatore ad una temperatura di 37° C, con il 5% di CO₂ ed al 95% di umidità.

4.1.2 Ceppi di HSV-1

I virus utilizzati in questo elaborato di tesi sono HSV-1 appartenenti al ceppo F ed al ceppo 17+ e sono i seguenti:

HSV-1 wt appartenente al ceppo F:

- **R3616**: virus appartenente al ceppo F in cui sono stati eliminati i geni γ 34.5 presenti in duplice copia. γ 34.5 codifica per la proteina ICP34.5, nota anche come fattore di neurovirulenza.

HSV-1 wt appartenente al ceppo 17+:

- **HSV-1 $\Delta\gamma$ 34.5 HCMV-Fluc**: virus appartenente al ceppo 17+ in cui sono stati eliminati, come nel virus R3616, i geni γ 34.5 presenti in duplice copia. Inoltre, il virus presenta il gene per la luciferasi sotto il promotore forte del Citomegalovirus umano nella regione intergenica UL55-UL56.
- **HSV-1 $\Delta\gamma$ 34.5/ Δ ICP47 HCMV-Fluc**: virus del ceppo 17+ che presenta la delezione dei geni γ 34.5 e del gene Us12 codificante la proteina ICP47. Il virus presenta il gene per la luciferasi sotto il promotore forte del Citomegalovirus umano nella regione intergenica UL55-UL56.
- **HSV-1 $\Delta\gamma$ 34.5/ Δ ICP47 HCMV-eGFP**: virus del ceppo 17+ che presenta la delezione dei geni γ 34.5 e del gene Us12 codificante la proteina ICP47. Il virus presenta il gene per la EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*) sotto il promotore forte del Citomegalovirus umano nella regione intergenica UL55-UL56.
- **HSV-1 $\Delta\gamma$ 34.5/ Δ ICP47 HCMV-hIL12**: virus del ceppo 17+ che presenta la delezione dei geni γ 34.5 e del gene Us12 codificante la proteina ICP47. Il virus presenta il gene per l'interleuchina 12 umana (hIL12) sotto il

promotore forte del Citomegalovirus umano nella regione intergenica UL55-UL56.

4.2 Metodi

4.2.1 Immunofluorescenza

In una piastra da 24 pozzetti, in ciascun pozzetto è stato adagiato un vetrino sul quale sono state seminate 100.000 cellule VERO CCL81 per pozzetto. Il giorno seguente, considerando una concentrazione di 100 particelle virali in 100µl (MOI 0.01), le cellule sono state infettate con i virus HSV-1 Wt ed R3616 appartenenti al ceppo F e con i virus HSV-1 Wt, HSV-1 $\Delta\gamma34.5$ HCMV-Fluc, HSV-1 $\Delta\gamma34.5/\Delta$ ICP47 HCMV-Fluc, HSV-1 $\Delta\gamma34.5/\Delta$ ICP47 HCMV-eGFP e HSV-1 $\Delta\gamma34.5/\Delta$ ICP47 HCMV-hIL12 appartenenti al ceppo 17+ utilizzando 50 µl, 75 µl, 100 µl, 150 µl e 200 µl in un volume finale di 200 µl per 1 ora a 37° C. Trascorso il periodo di incubazione e dopo un lavaggio il buffer salino 1X (PBS1X), sono stati aggiunti 500 µl /pozzetto di terreno DMEM 10% FBS e la piastra è stata nuovamente incubata per 6 ore a 37° C. A questo punto, dopo un lavaggio con PBS1X, la piastra è stata fissata con Metanolo 100% per 10 minuti in congelatore a -20° C e poi mantenuta in frigo a 4° C con PBS1X fino al momento del suo utilizzo. Eliminato il PBS1X, i vetrini vengono incubati con una soluzione di PBS1X 5% BSA (*Bovine serum albumine*, utilizzata come bloccante per impedire che l'anticorpo si leghi a recettori aspecifici) per 1 ora a temperatura ambiente al fine di bloccare i siti recettoriali aspecifici. Successivamente si procede con aggiungendo l'anticorpo primario anti-ICP4 [*10F1*] (*ab6514*) diluito 1:200 in PBS1X 2,5% BSA e incubando per tutta la notte a 4° C.

Il giorno seguente, si eseguono lavaggi con PBS1X e poi si applica l'anticorpo secondario "goat anti-mouse" (*Alexa Fluor® 488, ab150113*; derivato dalla capra) diluito 1:500 insieme al colorante nucleare DAPI (*ab104139*) diluito 1:1000 in PBS1X ed i vetrini vengono incubati per 1 ora a temperatura ambiente al buio. Trascorsa l'ora d'incubazione, si effettuano ancora lavaggi con il PBS1X per poi procedere con il montaggio dei vetrini sui vetrini porta-oggetto mediante l'uso di una soluzione montante a base di glicerolo e la loro visualizzazione al microscopio a fluorescenza.

4.2.2 Saggio d'infezione

Cellule MDA-MB-231 (180000 per pozzetto) sono state seminate in tre piastre da 24 pozzetti di cui due contenenti un vetrino tondo per pozzetto su cui, in un secondo momento, verrà eseguita l'immunofluorescenza. Il giorno successivo, dopo un lavaggio con PBS1X, le cellule sono state infettate con HSV-1 WT F, HSV-1 WT 17+, HSV-1 R3616 e HSV-1 $\Delta\gamma34.5$ HCMV-Fluc alla MOI 0.01 PFU/cellula diluiti in DMEM privo di siero per un volume finale di 250 µl /pozzetto. Il virus viene incubato per un'ora a 37° C, le cellule vengono nuovamente lavate con PBS1X per

eliminare eventuale virus residuo ed infine si aggiungono 500 μ l per pozzetto di DMEM con 10% di siero.

Alle tempistiche di 6, 24, 48 e 72 ore, le cellule vengono fotografate al microscopio ottico per osservare l'evoluzione degli effetti citopatici e contemporaneamente viene prelevata un'aliquota di 50 μ l di surnatante da ogni pozzetto per eseguire in un secondo momento le titolazioni mediante saggio a placche. Invece, le due piastre nelle quali le cellule sono state infettate su vetrini tondi, sono state bloccate dopo 6 e 72 ore di incubazione con metanolo 100% per 10 minuti a -20° C e poi mantenute a 4° C con PBS1X fino al momento dell'immunofluorescenza come descritta nel paragrafo 4.2.1.

5. Risultati

5.1 Valutazione del volume ottimale dei diversi stock di HSV-1 oncolitici per ottenere una molteplicità di infezione pari a 0.01 PFU/cellula

I diversi virus oncolitici (oHSV) descritti al paragrafo 4.1.2 di questa tesi sono stati innanzitutto titolati mediante titolazione su cellule Vero CCL81 ottenendo un valore espresso in unità formanti placche per ml (PFU/ml). Considerando che questa procedura non è priva di errori sperimentali, al fine di determinare il volume più appropriato dei diversi stock per ottenere una molteplicità di infezione (MOI) pari a 0.01 PFU/cellula, abbiamo proceduto come segue. Cellule VERO CCL81 sono state seminate su vetrini tondi opportunamente trattati e posti all'interno di piastre con più pozzetti. Dopo 24 ore, le cellule sono state infettate con volumi crescenti dei diversi stock virali. In particolare, sono stati utilizzati: 50, 75, 100, 150 e 200 μ l. I 100 μ l sono ottenuti dallo stock virale di partenza titolato diluito opportunamente in terreno di coltura senza siero al fine di ottenere una quantità di particelle virali di partenza che, una volta messe a contatto con le cellule, diano una MOI teorica di 0.01 PFU/cellula. Successivamente le cellule vengono fissate e si procede ad una immunofluorescenza che ha come target il gene ICP4 di HSV-1. Suddetta proteina è l'elemento fondamentale che permette la trascrizione dei geni virali E ed L, inoltre recluta complessi che favoriscono l'inizio della trascrizione come la proteina TATA binding cellulare, il complesso Mediator e TFIID. Perciò, andando a valutare la presenza di ICP4, è stato possibile valutare le cellule in cui il virus penetra anche se poi non necessariamente si replica. Il confronto tra le infezioni effettuate con la percentuale attesa di cellule positive al virus in caso di MOI corretta (1%) permette di identificare tra i volumi testati quello più idoneo da adottare nei successivi studi.

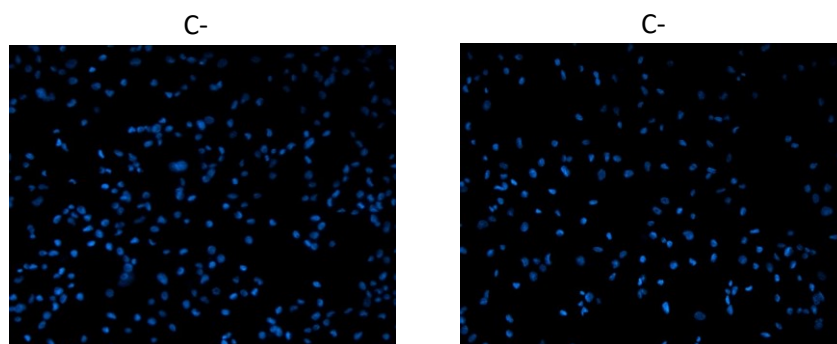


Figura 3: controlli negativi dell'immunofluorescenza

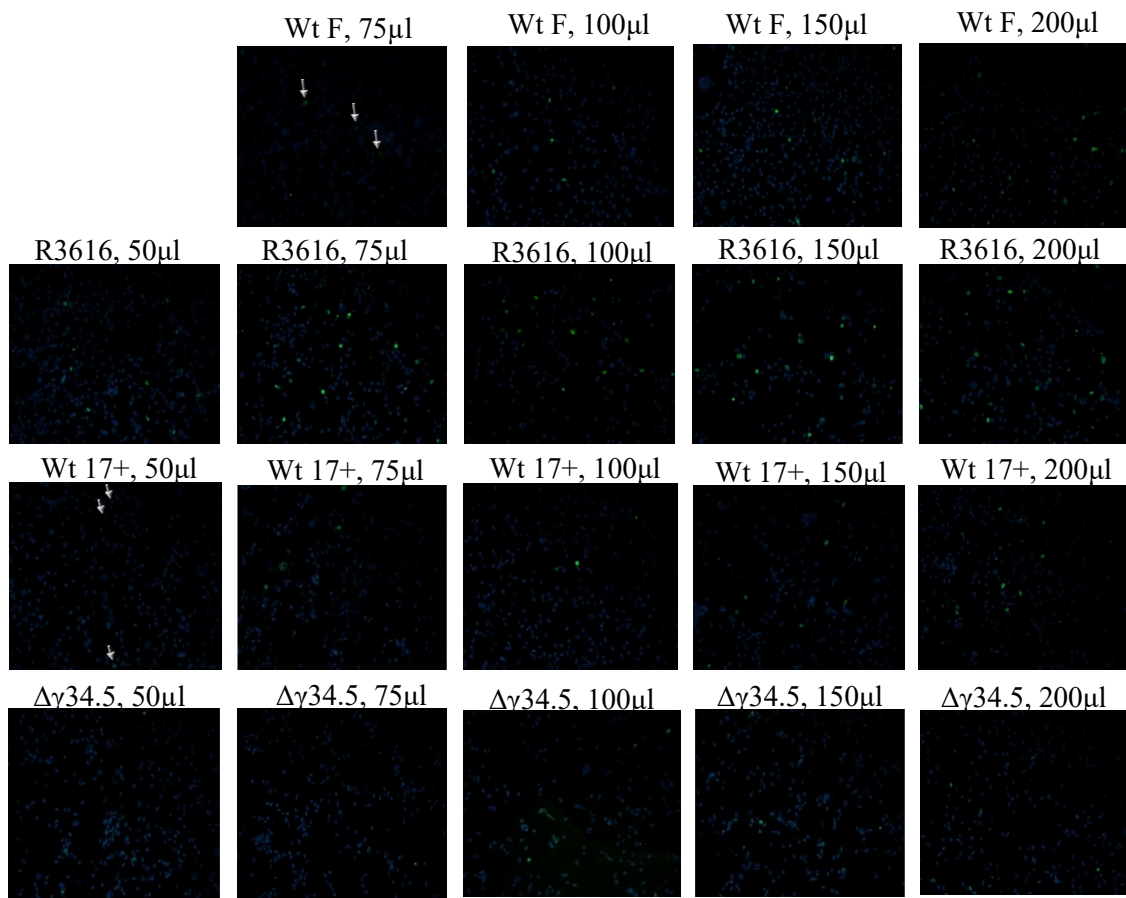


Figura 4: Pannello A: immagini dei pozzetti del virus Wt F. Pannello B: immagini dei pozzetti del virus R3616. Pannello C: immagini dei pozzetti del virus Wt 17+. Pannello D: immagini dei pozzetti del virus $\Delta\gamma$ 34.5.

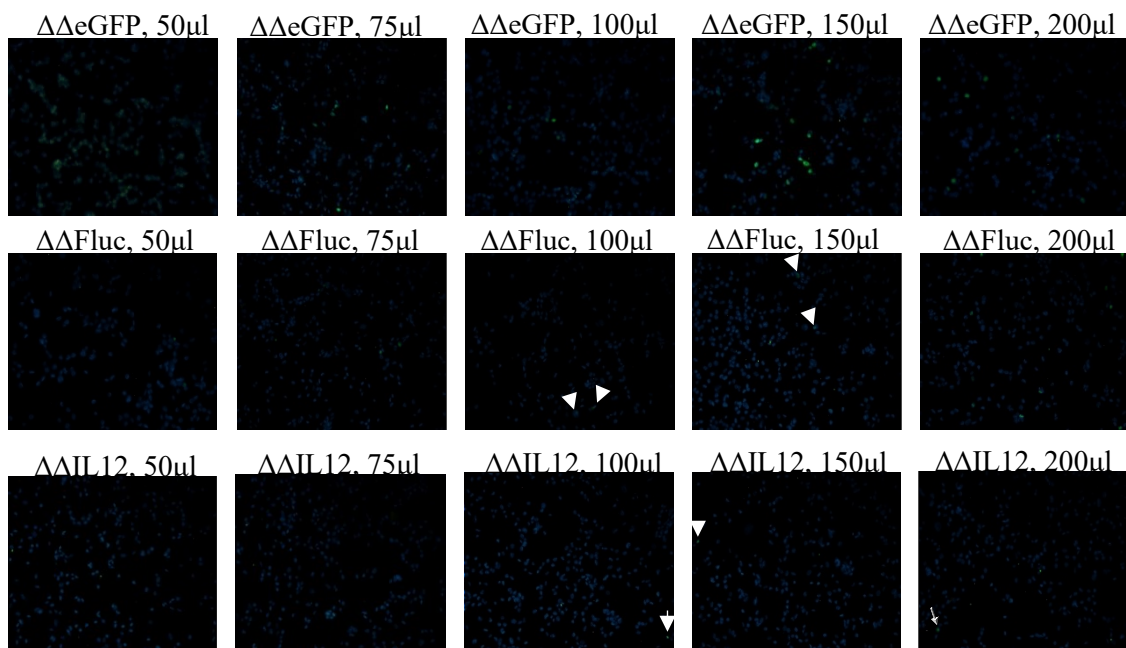


Figura 5: Pannello A: immagini dei pozzetti del virus $\Delta\Delta$ eGFP. Pannello B: immagini dei pozzetti del virus $\Delta\Delta$ Fluc. Pannello C: immagini dei pozzetti del virus $\Delta\Delta$ IL12.

	50 μ l	75 μ l	100 μ l	150 μ l	200 μ l
Wt F	/	0.84%	1.38%	2.98%	5.54%
R3616	2.14%	5.56 %	8.15%	8.42%	8.69%
Wt 17+	0.91%	1.47%	0.78%	3.16%	4.41%
$\Delta\gamma$ 34.5	0.58%	0.38%	2.15%	0.65%	2.11%
$\Delta\Delta$ Fluc	0.48%	0.67%	0.9%	0.6%	2.77%
$\Delta\Delta$ IL12	0%	0%	0.3%	0.31%	0.35%
$\Delta\Delta$ eGFP	>14.6%	1.43%	>13%	5.49%	4.89%

Tabella 1: percentuale di cellule ICP4 positive nei pozzetti infettati con i sette virus

Dall'analisi dei risultati riportati nelle Figure 3-5 e in Tabella 1 risulta che la MOI 0.01 PFU/cellula è stata ottenuta utilizzando i seguenti volumi dello stock:

- HSV-1 wt ceppo F: 100 μ l.
- R3616: 50 μ l.
- HSV-1 wt ceppo 17+: 100 μ l.
- HSV-1 $\Delta\gamma$ 34.5 HCMV-Fluc: 150 μ l.
- HSV-1 $\Delta\gamma$ 34.5/ Δ ICP47 HCMV-Fluc: 100 μ l.
- HSV-1 $\Delta\gamma$ 34.5/ Δ ICP47 HCMV-EGFP: 75 μ l.
- HSV-1 $\Delta\gamma$ 34.5/ Δ ICP47 HCMV-hIL12: 150 μ l.

5.2 Analisi dell'effetto citopatico dei virus e della sensibilità e permissività delle cellule ad essi mediante saggio d'infezione ed immunofluorescenza

Una volta valutato il volume più opportuno da utilizzare, le cellule tumorali target MDA-MB-231 sono state infettate con i virus HSV-1 wt e R3616 appartenenti al ceppo F e con HSV-1 wt e HSV-1 $\Delta\gamma$ 34.5 HCMV-Fluc appartenenti al ceppo 17+, secondo i volumi ottenuti nell'esperimento precedente in modo da avere una MOI di 0.01 PFU/cellula. Trascorse 6, 24, 48 e 72 ore dall'infezione, le cellule infettate sono state fotografate al microscopio ottico per valutare l'effetto citopatico indotto dai virus. In parallelo, dopo 6 e 72 ore dall'infezione, sono stati fissati vetrini sui cui erano state seminate le cellule MDA-MB-231 ed infettate seguendo lo stesso protocollo. Come si può osservare dalle immagini ottenute al microscopio ottico (Figura 6), gli effetti citopatici sono visibili già dopo 24 ore per quanto riguarda i virus wt di entrambi i ceppi. Diversamente è il risultato che si osserva nel caso dei virus deleti. Per quanto riguarda R3616, 72, mentre per quanto riguarda HSV-1 $\Delta\gamma$ 34.5, 48.

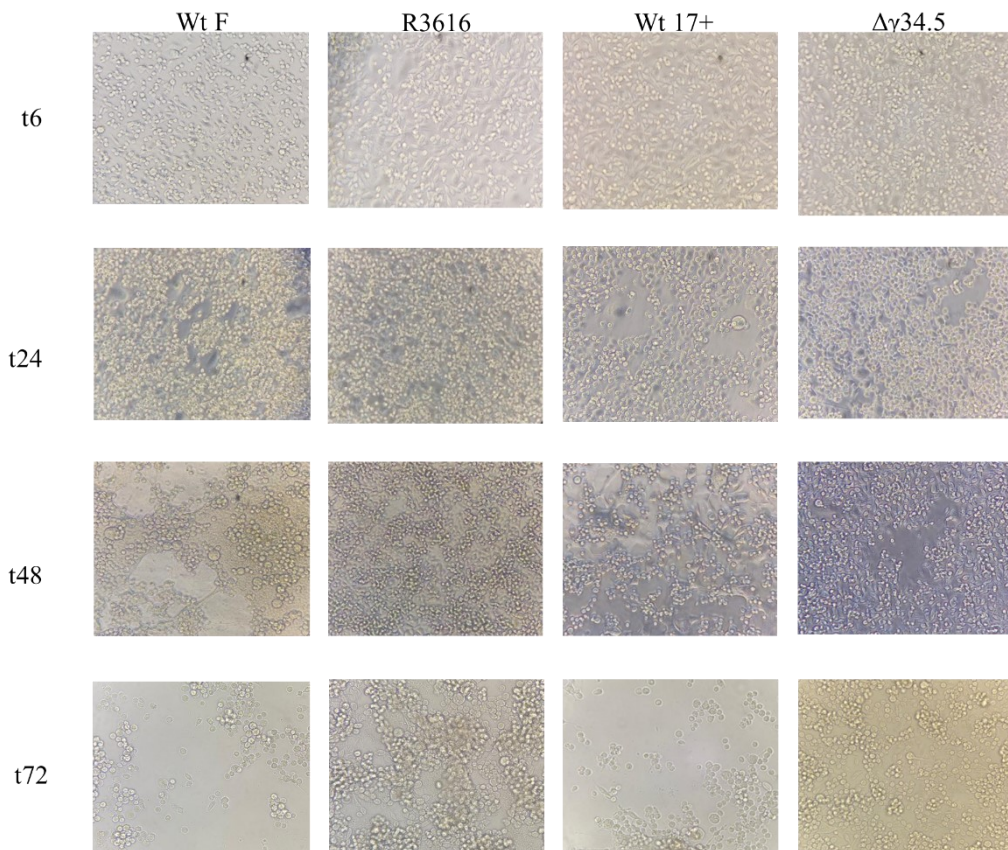


Figura 6: effetto citopatico dei virus Wt F, R3616, Wt 17+ e HSV-1 $\Delta\gamma34.5$ HCMV-Fluc sulle cellule MDA-MB-231, osservato al microscopio ottico (ingrandimento 20x).

Successivamente, sui vetrini fissati dopo 6 e 72 ore di infezione, è stata eseguita un'immunofluorescenza usando sempre l'anticorpo che riconosce la proteina virale ICP4. Grazie a questa immunofluorescenza è possibile valutare la % di cellule effettivamente infettate dal virus, indipendentemente dalla sua successiva capacità replicativa nelle stesse.

Come riportato nelle immagini di Figura 7, tutti i virus sono in grado di penetrare la cellula già dopo 6 ore di infezione. Dopo 72 ore di infezione, nel caso dei virus wt si osserva il 100% di cellule ICP4 positive mentre per quanto riguarda i singoli deleti, solo 12.1% per R3616 e 32.3% di cellule per HSV-1 $\Delta\gamma34.5$ HCMV-Fluc risultano ICP4 positive. Questo risultato dimostra che, nel caso del saggio di infezione, la mancata presenza delle placche di lisi è dovuta al fatto che i virus singoli deleti non si replicano efficientemente nelle MDA-MB-231 nonostante infettino positivamente le cellule.

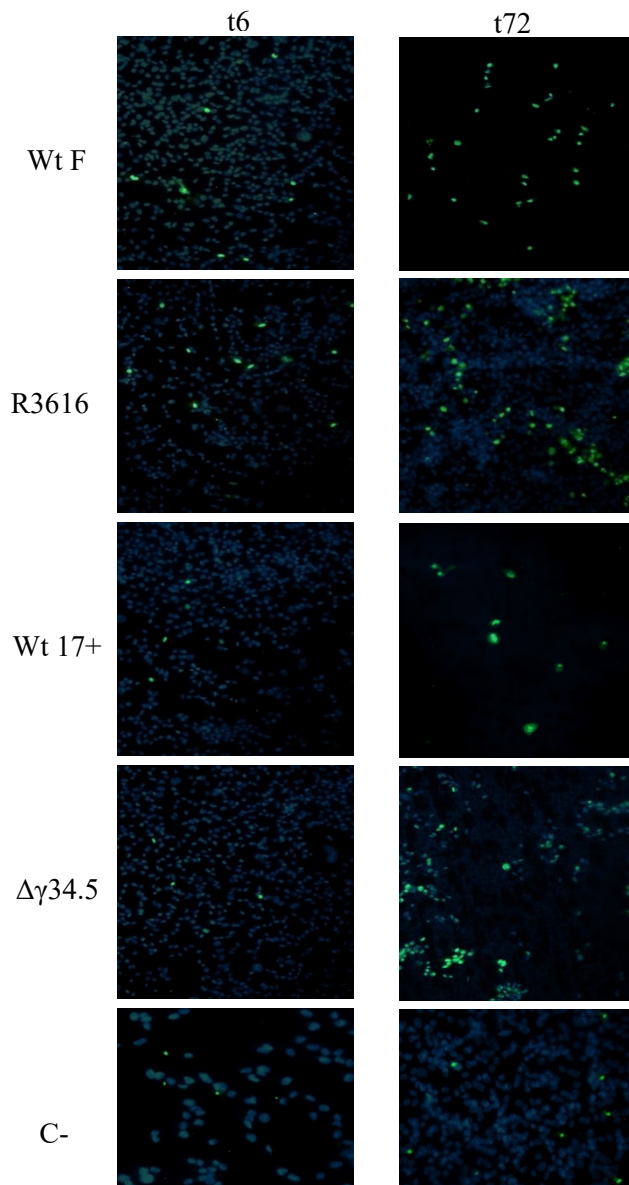


Figura 7: Pannello A: osservazione delle cellule positive ad ICP4 dopo 6 ore dall'infezione mediante i virus Wt F, Wt 17+, R3616 e HSV-1 $\Delta\gamma34.5$ HCMV Fluc. Pannello B: osservazione delle cellule positive ad ICP4 dopo 72 ore dall'infezione mediante i virus Wt F, Wt 17+, R3616 e HSV-1 $\Delta\gamma34.5$ HCMV Fluc. Ingrandimento 20x.

L'effetto citopatico dei virus Wt F e Wt 17+ è evidente. Con la sovrapposizione delle immagini ottenute con il filtro del DAPI e con quello della fluoresceina, a t72 si osserva che le poche cellule rimaste sul vetrino identificate dal DAPI combaciano perfettamente con le cellule identificate mediante fluoresceina, indicando che in tutte le rimanenti il virus è penetrato. Per quanto riguarda il virus R3616 è chiaro avere un effetto citopatico ridotto rispetto a $\Delta\gamma34.5$. In questo caso, il numero delle cellule presenti, sia infettate che sane, per $\Delta\gamma34.5$ è decisamente ridotto rispetto a R3616, il che indica che il primo porta a termine il ciclo replicativo e successiva lisi cellulare con successo, contrariamente al secondo.

Da questi dati, ci si può aspettare un titolo virale minore per R3616 rispetto a $\Delta\gamma34.5$.

Dall'analisi dei risultati ottenuti, si può concludere che le cellule siano suscettibili ma non permissive a R3616, mentre sono sia suscettibili che permissive a $\Delta\gamma34.5$. Perciò la migliore opzione per continuare la progressione delle tecniche di viroterapia oncolitica è quella di proseguire con lo sviluppo e il miglioramento di virus ingegnerizzati dal ceppo Wt 17+, visti i promettenti risultati ottenuti dal virus $\Delta\gamma34.5$.

6. Conclusioni e discussione

La viroterapia oncolitica si basa sull'uso di virus naturali o opportunamente ingegnerizzati in grado di replicare selettivamente nelle cellule tumorali. In particolare, sono stati discussi gli effetti dell'Herpes Simplex Virus di tipo 1 sulle cellule tumorali di carcinoma mammario triplo negativo (TNBC), un tumore estremamente aggressivo con un'alta incidenza e generalmente avente prognosi sfavorevole con un'elevata probabilità di metastasi e ricadute. Questo tipo di carcinoma mammario non esprime né i recettori per estrogeni e progesterone (ER e PR) né il recettore per il fattore di crescita epidermico umano HER2, risultando quindi insensibile alle classiche terapie ormonali utilizzate invece per i tumori ormono-responsivi. Per questi motivi, la viroterapia oncolitica rappresenta un'innovazione nella terapia del TNBC e di tutti i tumori solidi che non presentano una terapia efficace.

Inoltre, i virus oncolitici basati su HSV-1 hanno già dato prova di essere efficaci contro numerose tipologie di tumori solidi quali carcinomi o melanomi. Nel 2015 l'FDA (Food and Drug Administration) e l'anno successivo EMA (European Medicine Agency), hanno approvato il primo virus oncolitico basato su HSV-1, il talimogene laherparepvec (T-VEC) per il trattamento del melanoma non operabile (H. Fukuhara *et al*, 2016).

In questo progetto di tesi, si dimostra come la viroterapia oncolitica sia una risorsa promettente per la cura dei tumori solidi che non rispondono in maniera efficace alle terapie antitumorali classiche, quali chemioterapia, radioterapia ed immunoterapia.

In laboratorio, HSV-1 è ingegnerizzato al fine di creare nuovi virus oncolitici "armati" per il trattamento del TNBC. In particolare, durante il mio tirocinio, mediante tecnica dell'immunofluorescenza abbiamo valutato l'efficienza di infezione dei virus Wt ceppo F, Wt ceppo 17+, R3616, HSV-1 $\Delta\gamma34.5$ HCMV-Fluc, HSV-1 $\Delta\gamma34.5/\Delta$ ICP47 HCMV-Fluc, HSV-1 $\Delta\gamma34.5/\Delta$ ICP47 HCMV-eGFP e HSV-1 $\Delta\gamma34.5/\Delta$ ICP47 HCMV-hIL12 al fine di ottimizzare le condizioni di infezione utilizzate. In parallelo, mediante un saggio di infezione, abbiamo dimostrato una differenza nella capacità replicativa tra virus HSV-1 wt e deleti del gene codificante per la neurovirulenza $\gamma34.5$ dei ceppi F e 17+.

I virus oncolitici sono quindi molto promettenti nell'ambito del trattamento oncologico e pongono le basi per numerosi possibili sviluppi futuri. Si potrebbe pensare ad un ulteriore sviluppo nell'utilizzo dei virus oncolitici, potrebbe essere la combinazione tra l'ingegnerizzazione di HSV-1 con gene immunostimolatori ed un'overespressione della proteina VP16/UL48. VP16 è una proteina essenziale del tegumento ed è un attivatore fondamentale dei geni precoci immediati del virus. Overesprimendo VP16 si potrebbe ottenere una riduzione dei tempi necessari per osservare gli effetti dovuti dal virus e quindi una diminuzione nella durata del trattamento.

Si potrebbe poi procedere combinando l'azione oncolitica dei virus con altre terapie e/o farmaci come l'estratto etanolicò di *Pandanus amaryllifolius*. *Pandanus amaryllifolius* è una pianta della famiglia Pandanaceae utilizzata nel sud-est asiatico per alleviare disturbi minori come febbre, raffreddore e mal di testa ed inoltre, in alcune comunità è utilizzato per le sue proprietà diuretiche e cardiotoniche e per problemi legati alla tiroide. Successivi studi hanno dimostrato che l'estratto del *P. amaryllifolius* presenta una forte attività antitumorale in quanto mostra un'attività antiproliferativa nei confronti del tumore al seno non ormonale. In particolare, Chong e colleghi hanno dimostrato che l'estratto di etanolo di questa pianta induce l'attivazione del processo apoptotico (H. Z. Chong et al., 2012). Sarebbe quindi interessante valutare il trattamento combinatorio dei virus oncolitici anche con queste sostanze naturali. Infine, ma fondamentale, è lo studio *in vivo* in modelli animali quali il topo. Un modello ottimale potrebbero essere i topi PyMT in cui il promotore della ripetizione terminale lunga del virus del tumore mammario murino (MMTV-LTR) guida l'espressione dell'antigene T del polyomavirus specifico della ghiandola mammaria, portando ad un rapido sviluppo di tumori altamente metastatici (S. Attalla et al., 2021). Lo studio *in vivo* è essenziale sia per capire l'effetto di eventuali geni immunomodulatori inseriti nel genoma virale, sia per valutare gli effetti del virus a livello sistemico.

In conclusione, i virus oncolitici come quelli utilizzati in questo progetto di tesi, rappresentano una valida alternativa ai trattamenti convenzionali per i tumori solidi come il tumore al seno triplo negativo ma, a differenza delle classiche terapie, vi è la possibilità di creare terapie personalizzate grazie all'ingegnerizzazione del genoma virale.

7. Bibliografia

- Lussignol M., Queval C., Bernet-Camard M.-F. et al. The Herpes Simplex Virus 1 Us11 Protein Inhibits Autophagy through Its Interaction with the Protein Kinase PKR. *J Virol.* 2013; 87(2): 859–871. doi: 10.1128/JVI.01158-12.
- Packard J. E., Dembowski J. A. HSV-1 DNA Replication- Coordinated Regulation by Viral and Cellular Factors. *Viruses.* 2021. 13(10):2015. Published 2021 Oct 7. doi: 10.3390/v13102015.
- Fukuhara H., Ino Y., Todo T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* 2016. 107(10):1373-1379. Published 2016 Sep 9. doi: 10.1111/cas.13027.
- Johnson D. B., Puzanov I., Kelley M. C. Talimogene Laherparepvec (T-VEC) for the treatment of advanced melanoma. *Immunotherapy.* 2015. 7(6):611-9. doi: 10.2217/imt.15.35.
- Fisusi F. A., Akala E. O. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy. *Pharm Nanotechnol.* 2019. 7(1):3-23. doi: 10.2174/2211738507666190122111224
- Hong B., Chapa V., Saini U. et al. Oncolytic HSV Therapy Modulates Vesicular Trafficking Inducing Cisplatin Sensitivity and Antitumor Immunity. *Clin Cancer Res.* 2021. 27(2):542-553. Published 2021 Jan 15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2210.
- Yin L., Duan JJ., Bian XW., Yu S. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. *Breast Cancer Research.* 2020. 22(1):61. Published 2020 Jun 9. doi: 10.1186/s13058-020-01296-5.
- Metzger-Filho O., Tutt A., de Azambuja E. et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2012. 30(15):1879-87. Published 2012 May 20. doi: 10.1200/JCO.2011.38.2010.
- Manivanh R., Merhbach J., Charron AJ et al. Herpes Simplex Virus 1 ICP34.5 Alters Mitochondrial Dynamics in Neurons. *J Virol.* 2020. 94(14):e01784-19. Published 2020 Jul 1. doi: 10.1128/JVI.01784-19.
- Kukhanova MK, Korovina AN, Kochetkov SN. Human herpes simplex virus: life cycle and development of inhibitors. *Biochemistry (Mosc.).* 2014. 79(13):1635-52. doi: 10.1134/S0006297914130124.
- Attalla S., Taifour T., Bui T., Muller W. Insights from transgenic mouse models from PyMT-induced breast cancer: recapitulating human breast cancer progression in vivo. *Oncogene.* 2021. 40(3): 475–491. doi: 10.1038/s41388-020-01560-0

Ringraziamenti

Dedico questo spazio per ringraziare tutte le persone che mi sono state accanto durante la realizzazione di questo elaborato di laurea e hanno anche contribuito alla sua concretizzazione.

Un primo ringraziamento va alla mia relatrice, la Prof.ssa Arianna Calistri, per la sua immancabile disponibilità, la sua affabilità e dolcezza e per avermi saputo indicare con chiarezza il percorso da intraprendere.

Inoltre, ringrazio di cuore la Dott.ssa Adriana Vitiello, per avermi guidato con impegno, passione e infinita pazienza durante i mesi trascorsi in laboratorio e anche in seguito, durante la stesura di questa tesi. La sua presenza forte ed entusiasta è stata di grande incoraggiamento durante gli ultimi mesi e fonte d'ispirazione per il mio percorso futuro.

Ringrazio, infine, i miei amici e familiari che mi sono sempre stati accanto passo dopo passo, incoraggiando la mia crescita e senza farmi mai mancare il loro sostegno, l'affetto e per aver creduto in me anche quando mancavo di farlo.

Ringrazio Alessandra Ciaralli per essere ciò che è.