



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2019 00512**

(22) Data de depozit: **26/08/2019**

(41) Data publicării cererii:
30/07/2020 BOPI nr. **7/2020**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI
PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE
SIMIONESCU" BUCUREȘTI,
STR. B.P. HAȘDEU NR. 8, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **DUMITRESCU MĂDĂLINA,
BULEVARDUL CAMIL RESSU, NR.8, BL.1,
SC.B, AP.44, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **TRUSCA VIOLETA GEORGETA,
STR.GH.DUCA NR.3-11, BL.B, SC.B, ET.4,
AP.41, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **BURLACU ALEXANDRINA,
STR.SOLD. NICULAE SEBE NR.6, BL.L35,
AP.37, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **SIMIONESCU MAYA,
STR. LOUIS PASTEUR NR. 16, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ASKENASY NADIR, STR.FĂINARI, NR.31,
SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **GAFENCU ANCA VIOLETA,
STR.ANTON PANN, NR.48 A, ET.1,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **ADENOVIRUS CARE CONȚINE MINI-GENA FAS LIGAND
MURINA PENTRU INDUCEREA EXPRESIEI PROTEINEI FAS
LIGAND FUNCȚIONALĂ**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui adenovirus utilizat pentru supraexpresia tranzientă a FasLigand (FasL) în celule umane sau animale care vor fi ulterior transplantate pentru studii preclinice și clinice de testare ale unor strategii terapeutice pentru boli autoimune, boli cardiovasculare sau pentru cancer. Procedeu conform invenției constă în construcția unei gene FasL truncate, denumită mini-gena FasL, prin excizia intronului 2 din secvența codificatoare a ADN,

împachetarea și purificarea adenovirusului cu mini-gena FasL, înmulțirea adenovirusului cu mini-gena FasL, validarea adenovirusului prin inducerea expresiei FasL în celule transduse, și demonstrarea eficienței adenovirusului prin comparații între transducția mini-gena FasL-GFP-adenovirus și ADNc-FasL-adenovirus.

Revendicări: 2
Figuri: 6



**ADENOVIRUS CARE CONȚINE MINI-GENA FAS LIGAND MURINĂ
PENTRU INDUCEREA EXPRESIEI PROTEINEI FAS LIGAND FUNCȚIONALĂ**

Mădălina Dumitrescu, Violeta Georgeta Trușcă, Alexandrina Burlacu, Maya Simionescu,
Nadir Askenasy, Anca Violeta Gafencu

Institutul de Biologie si Patologie Celulara „Nicolae Simionescu” Bucuresti

REZUMATUL INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui adenovirus care induce expresia Fas Ligand (FasL) funcțional pe suprafața celulelor pe care le infectează și astfel le transformă în celule ucigașe, ce induc moartea celulelor țintă după un contact direct, prin activarea apoptozei mediată de interacțiunea FasL-FasR. Genomul adenoviral conține gena FasL truncată (mini-gena FasL), obținută prin excizia intronului 2 din secvența codificatoare a ADN, iar celule de impachetare folosite pentru înmulțirea adenovirusului sunt modificate pentru a rezista la apoptoza mediată de FasL prin supraexpresia moleculei FADD dominant negativă și cultivarea în prezența unui inhibitor de apoptoză.

DESCRIEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la un procedeu de obținere a unui adenovirus care induce expresia Fas Ligand (FasL) funcțional pe suprafața celulelor pe care le infectează și astfel le transformă în celule ucigașe.

FasL este o proteină care induce apoptoza celulelor țintă care exprimă FasR (receptorul specific pentru FasL). Acest adenovirus poate fi folosit pentru supraexpresia tranzientă a FasL în celule animale sau umane care vor fi ulterior transplantate pentru studii preclinice și clinice de testare ale unor strategii terapeutice pentru boli autoimune, boli cardiovasculare sau pentru cancer.

Inducerea FasL pe suprafața unor celule sau expunerea FasL prin diferite legături fizico-chimice (precum biotină-streptavidină) prezintă un interes real pentru cercetarea biomedicală. În acest

context, abordările terapeutice bazate pe apoptoza mediată de FasL au fost concepute ca urmare a succesului experimentelor de co-transplant în care mioblastele care exprimă FasL au protejat grefele insulare pancreatice de respingere (Lau și colab., 1996). De asemenea, s-a demonstrat că expresia endotelială a FasL diminuează inflamația și infiltrarea subendotelială a leucocitelor, având efecte benefice în ateroscleroză și alte boli cardiace cardiovasculare (Yang și colab., 2004).

O serie de studii anterioare au arătat că transplantul de limfocite T reglatoare ucigașe, manipulate in vitro pentru a deveni celule ucigașe prin expunerea moleculei FasL pe suprafața celulară, ameliorează boala greșă contra gazdă (Yolcu și colab., 2013), previn progresia insulitei autoimune la șoarecii NOD (non-obezi diabetici) și ameliorează colita cronică Franke pe modele animale (Yolcu și colab., 2008, Kaminitz și colab., 2011, Kaminitz și colab., 2013a, Kaminitz și colab., 2013b, Yolcu și colab., 2013). De asemenea, administrarea locală a FasL s-a dovedit a fi eficientă în reducerea melanomului malign oral și al osteosarcomului (Bianco și colab., 2003, Modiano și Bellgrau, 2016). Strategii terapeutice cu celule prezentatoare de antigen care exprimă FasL au fost folosite și pentru prevenirea dezvoltării unui atac imun în plămân, ficat, rinichi, articulații sau glândele salivare, prin eliminarea celulelor T infiltrate, fără a produce citotoxicitate hepatică (Zhan și colab., 2002).

Inducerea apoptozei este explorată în diverse strategii terapeutice medicale deoarece permite eliminarea unor celule dăunătoare, precum celulele responsabile de inducerea bolilor autoimune sau celulele maligne. Metodele de inducere a moleculelor FasL pe suprafața celulelor se pot clasifica în metode virale sau non-virale. Dintre acestea, metodele non-virale au ca dezavantaj randamentul mic de transfecție și expresia scăzută a proteinei induse. Dintre metodele virale, transducția adenovirală prezintă multiple avantaje: nu modifică genomul celulelor pe care le infectează (genele virale nu sunt inserate în genom), are un randament de transducție ridicat și induce o puternică expresie a genelor pe care le poartă.

Gena FasL este localizată pe cromozomul 1, atât la om cât și la șoarece, având structura similară la ambele specii. Gena murină FasL conține 4 exoni, cu mărimi de 395, 57, 46 și respectiv 342 pb, precum și 3 introni, cu mărimi de 979, 4102 și, respectiv, 795 pb. **O primă problemă tehnică** în obținerea adenovirusului ce codifică pentru gena FasL o reprezintă faptul că mărimea acestei gene (7805 perechi de baze, însumând lungimea tuturor intronilor și exonilor) este mai mare decât mărimea acceptabilă a insertului în sistemul AdEasy system, ceea ce face imposibilă clonarea

întregii gene FasL. **Soluția tehnică** pentru această problemă este construcția unei gene FasL truncate (numită mini-gena FasL). Comparativ cu gena FasL întreagă, mini-gena FasL (2887 pb) nu conține intronul 2 (4102 pb) și o parte din regiunea 3'-UTR a genei.

O a doua problemă tehnică în obținerea adenovirusului ce codifică pentru gena FasL o reprezintă faptul că celulele de împachetare necesare pentru multiplicarea adenovirusului sunt sensibile la apoptoza indusă de FasL, ceea ce scade randamentul de producere al adenovirusului. **Soluția tehnică** pentru această problemă este transfecția stabilă a celulelor de împachetare AD-293 cu forma dominant negativă a moleculei de semnalizare FADD (AD-293-FADD DN), ce împiedică apoptoza celulelor purtătoare de virus, concomitent cu cultivarea celulelor în prezența inhibitorului de apoptoză.

Datele noastre experimentale arată că adenovirusul care poartă mini-gena FasL împachetat în celule AD-293 rezistente la apoptoză este funcțional, inducând expresia proteinei FasL pe plasmalema celulelor transduse. Acest adenovirus poate fi utilizat pentru: (i) transducția unor celule care sunt ulterior transplantate în organisme cu boli autoimune (Diabet de tip I, colita cronică și altele); (ii) transducția unor celule care migrează în plăcile aterosclerotice; (iii) omorârea celulelor canceroase care exprimă receptorul Fas.

Brevetele identificate în prezent cu privire la FasL se referă la interacțiunea FasL în forma membranară, trimerică, cu receptorul sau specific, FasR, de pe suprafața celulelor țintă, în urma căreia este activată calea extrinsecă a apoptozei. Brevetele diferă prin modul de obținere și de funcționalizare a proteinei FasL și aplicațiile acestuia:

- **US7927602B2** descrie metoda de obținere a unei proteinei himere formată din proteina FasL fuzionată cu biotina. Proteina obținută se leagă specific de avidina/streptavidina imobilizată pe un suport solid (bile de cauciuc sau celule); expunerea limfocitelor activate la această proteină himeră determină activarea mecanismelor intracelulare de apoptoză, ceea ce contribuie la modularea răspunsului imun în cazul pacienților cu astm, alergii sau la cei cărora li se transplantează țesuturi;
- **US20040018170A1** are ca subiect o metodă de obținere a formei membranare a FasL rezistentă la clivarea proteolitică fuzionată cu streptavidina; această formă stabilă a FasL a fost obținută prin deleția din gena FasL a nucleotidelor care codifică cei 12 amino acizi care formează situsul de

- acțiune al metaloproteinazei responsabilă de clivarea FasL de pe membrana celulară. Ulterior, acest construct a fost clonat într-un vector de expresie ce codifică streptavidina și care este folosit pentru obținerea proteinei himere FasL- streptavidină cu aplicații în limitarea supraviețuirii limfocitelor T aloreactive contribuind la supraviețuirea alogrefei;
- **US20040131599A1** brevetează o metodă de transducție a celulelor stem hematopoietice cu un vector de expresie retroviral sau lentiviral care conține o genă ce codifică formă stabilă a FasL cu scopul inducerii pe suprafața celulară a proteinei FasL ce nu poate fi îndepărtată proteolitic de pe membrană; transplantul acestor celule într-un organism gazdă suprimă răspunsul imun al gazdei contra grefei;
 - **EP2823040B1** se referă la obținerea unui dispozitiv și a unui kit care permite selectarea celulelor cu capacitate de grefare (celule stem și celule imune), dintr-o populație heterogenă (celule izolate din măduva osoasă, sânge periferic sau din cordonul ombilical), concomitent cu eliminarea celulelor imune activate ce pot induce reacția grefă contra gazdă în cazul unui transplant alogenic; dispozitivul este realizat dintr-un material biocompatibil căptușit pe fața internă cu un ligand de moarte celulară (FasL, TNF- α , Trail sau Tweak) pentru a induce apoptoza celulelor imune activate.
 - **US20130287750A1** descrie o metodă de izolare a celulelor stem dintr-o populație heterogenă de celule pe baza rezistenței la apoptoza indusă de FasL (forma rezistentă la proteoliza metaloproteazelor), cu scopul transplantării sau diferențierii lor.
 - **US20150104428A1** brevetează strategia terapeutică de injectare sistemică a celulelor stromale mezenchimale izolate din măduva osoasă, care au FasL exprimat pe membrană; aceste celule au capacitatea de a induce apoptoza celulelor T pe calea mediată de FasL; de asemenea, FasL controlează secreția de MCP-1 care determină recrutarea celulelor T; celulele T apoptotice cresc secreția de TGF β care determină reglarea pozitivă a celulelor T reglatoare și inducerea toleranței pentru celulele stromale mezenchimale;
 - **US5858990A** brevetează utilizarea cateterului cu balon, acoperit cu polipeptidul FasL sau cu secvența de acid nucleic ce codifică pentru FasL, pentru oprirea proliferării celulelor musculare netede în procesul de ateroscleroză.

Etapele parcurse pentru realizarea adenovirusului care induce expresia FasL în celulele transduse sunt următoarele:

1. Obținerea mini-genei FasL. Strategia de clonare este ilustrată în Figura 1. Fragmentul 1-1690 al genei murine FasL (fragmentul FasL I), conținând Exonul 1, Intronul 1, Exonul 2 și o porțiune scurtă din capătul 5' al Intronului 2, a fost amplificat prin PCR din ADN genomic murin, folosind primerii descriși în Tabelul 1 și apoi clonat în vectorul pBluescript (PBSK, Stratagene) în situsurile KpnI/SalI din situsul de clonare multiplă, rezultând plasmida pBSK-FasL I. Fragmentul 4997-6970 al genei murine FasL (fragmentul FasL II), conținând o porțiune scurtă din capătul 3' al Intronului 2, Exonul 3, Intronul 3, Exonul 4 a fost clonat în situsurile SalI/NotI ale pBSK-FasL I. FasL mini-gena a fost construită prin excizia celor două capete scurte din intronul 2, prin PCR de suprapunere. Mini-gena amplificată a fost inserată direct în vectorul adenoviral pAdTrack-CMV, după un protocol descris în literatură. (He și colab., 1998).

Prima etapă a clonării mini-genei FasL a constat în amplificarea celor două fragmente, FasL I (1670 pb) și FasL II (1974 pb), utilizând o polimerază de înaltă fidelitate (Figura 2A). Fragmentul FasL I a fost clonat în vectorul pBluescript SK (pBSK) între situsurile de restricție KpnI/SalI, rezultând plasmida pBSK-FasL I. Digestia plasmidei pBSK-FasL I cu KpnI și SalI a determinat excizia fragmentului FasL I (1670 pb), așa cum este ilustrat în Figura 2B. Fragmentul FasL II a fost clonat în plasmida pBSK-FasL I, între situsurile SalI și NotI, rezultând plasmida pBSK-FasL I + FasL II. Digestia plasmidei pBSK-FasL I + FasL II cu diferite enzime de restricție (PstI, Scal și BglII) a confirmat fragmentele așteptate, așa cum este ilustrat în Figura 2C. Plasmida pBSK-FasL I + FasL II conține la capetele 5' și 3' fragmente scurte din cel de-al doilea intron legate prin situsul de restricție SalI. Aceste fragmente au fost îndepărtate prin PCR de suprapunere (Figura 2D), iar produsul rezultat a fost inserat în vectorul adenoviral pAdTrack-CMV (care exprimă GFP sub un al doilea promotor CMV), obținându-se plasmidul pAdTrack-GFP-FasL. Introducerea corectă a mini-genei FasL în vectorul pAdTrack a fost verificată prin digestie cu diferite enzime de restricție (PstI, BamHI, EcoRI, BglII, KpnI/XhoI); digestiile au avut ca rezultat produșii de dimensiuni așteptate, așa cum este prezentat în Figura 2E.

Pentru a verifica dacă ARN mesager produs de mini-gena FasL este procesat normal prin splicing, celulele HEK-293 au fost transfectate cu plasmida pAdTrack-GFP-FasL. La două zile după transfecție, celulele au fost recoltate și s-a izolat ARN total. Rezultatele RT-PCR au arătat că mini-



gena FasL este funcțională, obținându-se prin amplificare o bandă adecvată de 931 pb (Figura 2F, Probă), cu aceeași mărime ca și banda obținută prin amplificarea FasL din ADN complementar (Figura 2F, Control).

Secvențierea mini-genei FasL s-a făcut prin metoda Sequencing Sanger Dye-terminator DNA, folosind primerii ilustrați în tabelul 2, kitul de secvențiere a ciclului Dye Terminator și un aparat secvențiere Sequencer Beckman Coulter. Rezultatele au arătat că secvența FasL din plasmida pAdTrack-FasL conține 5 substituții punctiforme: una în primul intron (649 C → T), una în al treilea intron (2054 T → C) și alte trei mutații în ultimul exon (2378 G → A, 2361 A → G și 2464 A → G). Mutațiile găsite în introni și una din substituțiile în ultimul exon (2378 G → A) sunt silențioase și nu afectează structura proteinei FasL. Celelalte două substituții găsite în al patrulea exon afectează structura proteinelor prin transformarea 184 Thr → Ala și respectiv 218 Glu → Gly. Aceste mutații sunt raportate în literatură ca polimorfisme pentru șoarecii Balb/c (Kayagaki și colab., 1997), iar secvențele sunt depozitate în GenBank (nr. U58995.1). În plus, aceste mutații punctiforme nu afectează funcționalitatea proteinei FasL (Kayagaki și colab., 1997).

2. Împachetarea și purificarea adenovirusului cu mini-gena FasL. Plasmidele pAdTrack conținând mini-gena FasL au fost linearizate cu PmeI, purificate și apoi utilizate la transformarea bacteriilor BJ5183 ce conțin plasmida pAdEasy1 (celule AdEasier-1, primite cadou de la Dr. Bert Vogelstein). Bacteriile AdEasier-1 competente au fost preparate folosind kitul de transformare Mix & Go E. coli (Zymo Research). După transformare, celulele au fost crescute în mediu îmbogățit cu nutrienți (SOC) timp de 1 h și apoi au fost însămânțate pe mediu LB solid conținând kanamicină. Coloniile au fost preluate și testate prin PCR (pentru integritatea pAdTrack și pentru prezența mini-genei FasL). Integritatea pAdTrack a fost testată (Figura 3A) folosind primeri pAdTrack 4631F și pAdTrack 5616R complementari cu fragmente de ADN adiacente situsului PmeI din pAdTrack (Tabelul 1). Obținerea unui produs de 986 pb prin PCR demonstrează că recombinația nu s-a efectuat, deoarece plasmida pAdTrack este intactă (Figura 3A, liniile 3, 4 și 6). Absența produsului de 986 pb după reacția de PCR indică o posibilă recombinație, deoarece inserția unui fragment mare de ADN în pAdTrack, face imposibilă amplificarea fragmentului de către polimerază. Prezența FasL a fost testată prin PCR a utilizând primeri FasL 471F și FasL 1070R care generează un produs de 600 pb (Figura 3B). Drept control pozitiv a fost folosită plasmida pAdTrack-GFP-FasL ca matriță care a dat banda de 986 pb pentru integritatea pAdTrack

(Figura 3A, linia 1) și o bandă de 600 pb pentru FasL (Figura 3B, linia 3). Clonele negative pentru integritatea pAdTrack (Figura 3A, liniile 2 și 5) și pozitive pentru FasL (Figura 3B, liniile 1 și 2) au fost selectate crescute în 4 ml mediu SOC cu kanamicină, iar ADN plasmidial a fost izolat prin liză alcalină și utilizat ulterior pentru transformarea bacteriilor DH5 α . Plasmidele recombinante amplificate în DH5 α au fost izolate utilizând InnuPREP Plasmid Minikit (Analytic Jena) și testate prin digestie enzimatică cu HindIII. Rezultatele au arătat că cele două clone pozitive testate au prezentat un model similar cu vectorul pAdEasy (Figura 3C, linia 3), având însă și benzi suplimentare. În urma digestiei cu PacI a unei clone pozitive a fost obținut un fragment de mărimea așteptată (Figura 3D, linia 1). Plasmida recombinantă neclivată este reprezentată în Figura 3D, linia 2. Markerul de greutate moleculară a ADN este reprezentat în Figura 3C, linia 4 și Figura 3D, linia 3.

3. Înmulțirea adenovirusului cu mini-gena FasL. Plasmida recombinantă a fost folosită pentru transfecția celulelor de împachetare AD-293, utilizând reactivul de transfecție K2 (Biontex Laboratories GmbH) și urmând instrucțiunile producătorului. Pentru un randament mare de obținere a unor șarje de adenovirus cu FasL, a fost necesară inhibarea apoptozei în celulele de împachetare, care s-a făcut prin două căi:

- Blocarea semnalizării căilor apoptotice în celule de împachetare AD-293 prin supraexpresia formei dominant negative (DN) a FADD (Fas Death Domain). Astfel, prin expresia proteinei FADD DN care conține domeniul de moarte FADD (aa30-124), dar nu conține domeniul efector al morții care se leagă de caspaza-8, celulele de împachetare AD-293 modificate sunt mai rezistente la apoptoza indusă de către FasL. Pentru aceasta, celulele AD-293 au fost transfectate stabil cu o plasmidă care codifică forma dominant negativă a moleculei FADD, obținându-se celulele AD-293-FADD-DN care au fost folosite la împachetarea adenovirusului. Plasmidul pLVX-FADD-DD a fost primit de la Dr. Joan Massague (Addgene plasmid # 58263).

- Inhibarea apoptozei prin folosirea unor inhibitori. Pe tot parcursul împachetării și amplificării adenovirale, celule au fost crescute în prezența de inhibitor de Caspaza-3 Z-VAD-FMK (0.8 μ M) de la R&D System, (Minneapolis, USA).

Celulele AD-293-FADD-DN au fost însămânțate la o densitate de $0,5 \times 10^6$ celule în flacoane T25 în DMEM cu glucoză 4,5 % și 10% ser fetal bovin. Cu două ore înainte de transfecție, s-a adăugat 50 μ l de amplificator K2 în flaconul cu celule. Transfecția s-a realizat utilizând 6 μ g plasmidă

liniarizată cu PacI și 21,6 μ l reactiv de transfecție K2. După 24 de ore, mediul care conține amestecul de transfecție a fost schimbat cu mediu complet proaspăt. La momentul înlăturării amestecului de transfecție, ~50% dintre celule au exprimat deja GFP. Cultura a fost menținută în același flacon în incubatorul cu 5% CO₂, timp de 10-12 zile, în prezența de inhibitor de Caspaza-3. Ulterior, celulele au fost lizate (prin trei cicluri de congelare în azot lichid și decongelare la 37°C) pentru a elibera particulele virale. Adenovirusul a fost amplificat prin transducția succesivă a unui număr tot mai mare de celule AD-293-FADD-DN. Astfel, lizatul celular și mediul au fost adăugate într-un flacon T75 care conținea 70-80% celule AD-293-FADD-DN confluențe. După 3-5 zile, celulele transduse au fost lizate prin șoc termic și omogenatul celular a fost utilizat pentru transducerea celulelor însămânțate în flacon T175. Omogenatul obținut dintr-un flacon T175 a fost utilizat pentru transducerea a cinci flacoane T175.

În scopul purificării adenovirusului FasL, douăzeci și cinci de flacoane T175 au fost transduse cu virus conținând omogenat de celule. După 3-5 zile, celulele (aproape desprinse de pe flacon) s-au lizat în tampon Tris 10 mM pH 8 și omogenatul obținut a fost supus ultracentrifugării (18 ore la 100.000 g, rotor SW41Ti) pe un gradient discontinuu de CsCl format dintr-o soluție de CsCl cu următoarele densități: 1,2 g/l și, respectiv, 1,4 g/l.

Pentru a crește randamentul de producție a particulelor virale, în paralel cu izolarea adenovirusului din celulele de împachetare, particulele adenovirale au fost izolate și din mediul de cultură (eliberate prin liza celulelor infectate). Pentru aceasta, în mediul de cultură au fost adăugate 242 g sulfat de amoniu pentru fiecare litru de mediu cu adenovirus (asigurându-se o saturație a soluției de 40-42% sulfat de amoniu). După solubilizarea sulfatului de amoniu, amestecul a fost lăsat la incubat minim 2,5 ore la temperatura camerei pentru precipitarea particulelor adenovirale. După centrifugarea la 1614xg, 15 min, sedimentul a fost solubilizat în 3 ml TrisHCl 10 mM pH 8, iar amestecul rezultat a fost supus ultracentrifugării pe gradient de clorură de cesiu în vederea purificării adenovirusului, în mod similar cu lizatul celular. Banda inferioară observată pe gradient, reprezentând virusul purificat, a fost colectată, dializată cu tampon 10 mM Tris pH 8 conținând 2 mM MgCl₂ și utilizată în continuare pentru transducția celulelor țintă. În scopul depozitării pe termen lung a adenovirusului, a fost adăugată o concentrație finală de 4% zaharoză înainte de înghețarea stocului adenoviral la -80°C.

Pentru determinarea titrului viral (exprimat în unități infecțioase per ml stoc adenoviral) s-au folosit serii de diluții FasL-adenovirus ($1/10^5$ - $1/10^7$) pentru infectarea celulelor AD-293; după 48 ore, procentul celulelor care exprimă gena reporter (GFP) a fost determinat prin citometrie în flux. În mediul, titrul adenoviral obținut prin procedeul descris a fost de $\sim 10^{10}$ TU/ml.

4. Validarea adenovirusului prin inducerea expresiei FasL în celulele transduse. Pentru a examina dacă adenovirusul purtător al mini-genei FasL are capacitatea de a infecta celule eucariote și de a induce sinteza mRNA FasL, translația proteică și expresia membranară a FasL, a fost utilizată linia de celule Hepa 1-6, cu o mare capacitate de transducție adenovirală. Rezultatele au arătat că aproape 100% din celule au fost pozitive pentru GFP după transducția cu 5 MOI. Expresia ARNm pentru FasL și actină a fost evaluată prin RT-PCR utilizând primeri specifici. Așa cum este prezentat în Figura 4, transducția celulelor Hepa 1-6 cu adenovirusul FasL a indus expresia ARNm pentru FasL (Figura 4A, FasL banda 2). În experimentele de control, în care celulele nu au fost transfectate (Figura 4A, FasL banda 1) nu a fost obținută o bandă specifică pentru FasL. Cantități minore de ARNm pentru FasL au fost detectate în celulele transfectate cu adenovirusul control (fără mini-gena FasL; Figura 4A, FasL banda 3). Controlul endogen, ARNm al β -actinei a fost exprimat în mod similar în toate probele (Figura 4A, β -actina). După validarea expresiei FasL mRNA, s-a evaluat dacă adenovirusul care transportă mini-gena FasL este capabil să inducă expresia proteinei FasL în celulele transduse. Pentru aceasta, celulele Hepa 1-6 au fost transduse cu adenovirusul FasL, iar proteina FasL a fost determinată după 48 de ore de la transducție prin Western blot. Rezultatele au arătat că proteina FasL este puternic sintetizată în celulele transduse cu adenovirusul FasL (Figura 4B, FasL banda 2), în timp ce celulele netransduse nu conțin FasL (Figura 4B, FasL banda 1). În mod surprinzător, adenovirusul control a indus o expresie slabă de FasL în celule Hepa 1-6 (Figura 4B, FasL banda 3). Controlul endogen, β -actina, a fost detectată în mod similar în toate probele (Figura 4B, β -actină).

În final, s-a investigat dacă adenovirusul induce distribuția FasL pe membrana celulară. Pentru aceasta, s-au utilizat celule endoteliale aortice bovine care au fost transduse cu 50 MOI FasL-GFP-adenovirus, pentru a obține o expresie a GFP în mai mult de 95% din celule (Figura 5). Analiza prin citometrie de flux a arătat că $\sim 64\%$ endoteliale transduse cu 50 MOI FasL-GFP-adenovirus (reprezentând 2/3 din totalul de celule transduse) exprimă FasL pe suprafața celulară. Aceste

rezultate confirmă functionalitatea moleculei de FasL introdusă în celule prin transducție adenovirală utilizând mini-gena FasL-GFP-adenovirus.

5. Demonstrarea eficienței adenovirusului prin comparații între transducția cu mini-gena FasL-GFP-adenovirus și ADNc-FasL-adenovirus. Transducția celulelor Hepa1-6 cu 5 MOI/celulă adenovirus conținând mini-gena FasL-GFP-adenovirus sau cDNA-FasL-adenovirus a arătat că faptul că adenovirusul care conține ADN complementar (ADNc) codificator pentru FasL a indus formarea de ARN mesager târziu și în cantitate mică, comparativ cu mini-gena FasL-GFP-adenovirus. Acest rezultat arată superioritatea mini-genei FasL-GFP-adenovirus, comparativ cu cDNA-FasL-adenovirus în transducția celulelor eucariote (Figura 6).

Bibliografie

- BIANCO, S. R., SUN, J., FOSMIRE, S. P., HANCE, K., PADILLA, M. L., RITT, M. G., GETZY, D. M., DUKE, R. C., WITHROW, S. J., LANA, S., MATTHIESEN, D. T., DOW, S. W., BELLGRAU, D., CUTTER, G. R., HELFAND, S. C. & MODIANO, J. F. 2003. Enhancing antimelanoma immune responses through apoptosis. *Cancer Gene Ther*, 10, 726-36.
- HE, T. C., ZHOU, S., DA COSTA, L. T., YU, J., KINZLER, K. W. & VOGELSTEIN, B. 1998. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 2509-14.
- KAMINITZ, A., ASKENASY, N. & YOLCU, E. S. 2013a. Immunomodulation with regulatory T cells and Fas-ligand ameliorate established inflammatory colitis. *Gut*, 62, 1228-30.
- KAMINITZ, A., YOLCU, E. S., MIZRAHI, K., SHIRWAN, H. & ASKENASY, N. 2013b. Killer Treg cells ameliorate inflammatory insulinitis in non-obese diabetic mice through local and systemic immunomodulation. *Int Immunol*, 25, 485-94.
- KAMINITZ, A., YOLCU, E. S., STEIN, J., YANIV, I., SHIRWAN, H. & ASKENASY, N. 2011. Killer Treg restore immune homeostasis and suppress autoimmune diabetes in prediabetic NOD mice. *J Autoimmun*, 37, 39-47.
- KAYAGAKI, N., YAMAGUCHI, N., NAGAO, F., MATSUO, S., MAEDA, H., OKUMURA, K. & YAGITA, H. 1997. Polymorphism of murine Fas ligand that affects the biological activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3914-9.
- LAU, H. T., YU, M., FONTANA, A. & STOECKERT, C. J., JR. 1996. Prevention of islet allograft rejection with engineered myoblasts expressing FasL in mice. *Science*, 273, 109-12.
- MODIANO, J. F. & BELLGRAU, D. 2016. Fas ligand based immunotherapy: A potent and effective neoadjuvant with checkpoint inhibitor properties, or a systemically toxic promoter of tumor growth? *Discov Med*, 21, 109-16.
- TIMMER, T., DE VRIES, E. G. & DE JONG, S. 2002. Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application? *J Pathol*, 196, 125-34.
- YANG, J., SATO, K., APRAHAMIAN, T., BROWN, N. J., HUTCHESON, J., BIALIK, A., PERLMAN, H. & WALSH, K. 2004. Endothelial overexpression of Fas ligand decreases

atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1466-73.

YOLCU, E. S., ASH, S., KAMINITZ, A., SAGIV, Y., ASKENASY, N. & YARKONI, S. 2008. Apoptosis as a mechanism of T-regulatory cell homeostasis and suppression. *Immunol Cell Biol*, 86, 650-8.

YOLCU, E. S., KAMINITZ, A., MIZRAHI, K., ASH, S., YANIV, I., STEIN, J., SHIRWAN, H. & ASKENASY, N. 2013. Immunomodulation with donor regulatory T cells armed with Fas-ligand alleviates graft-versus-host disease. *Exp Hematol*, 41, 903-11.

ZHAN, H. G., MOUNTZ, J. D., FLECK, M., ZHOU, T. & HSU, H. C. 2002. Specific deletion of autoreactive T cells by adenovirus-transfected, Fas ligand-producing antigen-presenting cells. *Immunol Res*, 26, 235-46.

Prezentarea pe scurt a figurilor:

Figura 1. Etapele clonării moleculare pentru generarea vectorului adenoviral care poartă mini-gena FasL murină. Fragmentele FasL 5' (FasL I) și fragmentul FasL 3' (FasL II) au fost clonate succesiv în pBSK. Fragmentele rămase ale intronului II au fost îndepărtate prin PCR de suprapunere, iar mini-gena obținută a fost clonată în vectorul adenoviral pAdTrack în situsul de restricție KpnI/NotI.

Figura 2. Validarea construcției mini-genei FasL (A) Evidențierea în gel de agaroză a celor două fragmente FasL I și FasL II prin PCR; (B) Prin digestia plasmidei pAdTrack-GFP-FasL I cu KpnI/SalI (care excizează insertul) s-au obținut două benzi: FasL I (1670 pb) și restul plasmidei pBSK (2940 pb). (C) Digestia plasmidei pAdTrack-GFP-FasL I + FasL II cu enzima PstI a produs două benzi: 1959 pb și 4425 pb, digestia cu ScaI a produs 3 benzi de 1359 pb, 2025 pb și 3000 pb, iar digestia cu BglII a produs 2 fragmente de 2732 pb și respectiv 3652 pb; (D) Mini-gena FasL (2715 pb) a fost obținută prin PCR de suprapunere care a îndepărtat total fragmentele celui de-al doilea intron. (E) Mini-gena FasL clonată în pAdTrack a fost supusă digestiei cu enzime de restricție care au clivat ADN în fragmente de dimensiuni așteptate: 6090 pb și 5615 pb (nediferențiate pe gel) pentru BamHI, 3718 pb și 7986 pb pentru EcoRI, 84 pb, 1932 pb și 9689 pb pentru BglII, 2714 pb și 8991 pb pentru KpnI/XhoI. (F) Transfecția tranzientă a celulelor HEK-293 cu plasmida pAdTrack-GFP-FasL a arătat că mini-gena FasL este funcțională, iar banda de ARN mesager este amplificată prin RT-PCR (Proba) și are aceeași mărime (931 pb) cu cea obținută prin amplificarea ADN complementar clonat în plasmidă (Control).

Figura 3. Obținerea genomului adenoviral cu mini-gena FasL integrată. Recombinarea vectorului adenoviral pAdTrack-GFP-FasL cu plasmida pAdEasy a fost testată prin PCR pentru integritatea pAdTrack (A) cât și pentru prezența mini-genei FasL (B). Clonele negative la testul integrității pAdTrack (A, godeurile 2 și 5) au dat rezultate pozitive pentru prezența FasL (B, godeurile 1 și 2). Banda control pozitivă pentru integritatea pAdTrack are 986 pb (A, linia 1), iar banda pentru FasL are 600 pb (B, linia 3). Clonele negative pentru recombinare (în care pAdTrack rămâne intact) sunt reprezentate în A, godeurile 3, 4 și 6. Digestia enzimatică cu HindIII a două clone pozitive (C, godeurile 1 și 2) a arătat un model similar cu cel obținut prin digestia plasmidei pAdEasy (C, linia 3) dar cu benzi adiționale. Digestia cu PacI a două clone pozitive a excizat un fragment de 4500 pb, așa cum era de așteptat (D, linia 1). Plasmida recombinantă ne-clivată este redată în D, linia 2. Markerul ADN este reprezentat în C, linia 4 și D, linia 3.

Figura 4. Expresia FasL în celulele Hepa 1-6 transduse cu adenovirus FasL. Hepatocitele Hepa 1-6 au fost transduse cu 5 MOI / celulă. Rezultatele RT-PCR (A) și Western Blot (B) au arătat că expresia FasL este indusă puternic în celulele transduse cu FasL (banda 2 FasL, A și, respectiv, B). Celulele care nu au fost transduse n-au exprimat FasL (banda 1 FasL, A și B), în timp ce celulele transduse cu adenovirusul control exprimă cantități minore de FasL (banda 3 FasL, A și B). Controlul endogen, β -actina a fost exprimat în mod similar în toate probele (β -actina, A și B).

Figura 5. Expresia FasL de către celulele endoteliale aortice bovine transduse. Celulele au fost transduse cu 50 MOI FasL-GFP-AdV și analizate prin microscopie de fluorescență (imaginea de sus) și prin citometrie în flux. Se observa că mai mult de 95% din celule transduse cu FasL-GFP-Ad sunt pozitive la GFP. Dintre acestea, expresia FasL a fost identificată în ~64 % din celule.

Figura 6. Testarea eficienței mini genei-FasL-Adenorirus. Celule Hepa 1-6 au fost transduse cu 5 MOI / celulă adenovirus care poartă minigena FasL sau FasL- ADN complementar și analizate comparativ în timp prin RT-PCR.

Tabelul 1. Primerii utilizați pentru clonare, selecția recombinanților și reacția de RT-PCR. Primerii de clonare conțin situsuri de restricție (roșu, italic) pentru enzimele numite în coloana din stânga. Cifrele din denumirea primerilor arată poziționarea lor în gena FasL murină.

Primer	Secvența
mFasL1F (<i>KpnI</i>)	5'- <i>ggggtacc</i> TGAGGCTTCTCAGCTTCAGATGCAAG
mFasL1690R (<i>Sall</i>)	5'- <i>ggggtcgac</i> AAGGAGCCAAGGGAGAAGGTCCAGG
mFasL 4997F (<i>Sall</i>)	5'- <i>ggggtcgac</i> TGGGAATAGACTGTAGGATGATAACC
mFasL 6970R	5'- <i>ggcgccgc</i> CCTGGTGCCCATGATAAAGAATAGTAG
mFasLgene 364R	5'-CAGAGGGTGTACTGGGGTTGGCTATAAGCATTTCAAAAGATGATAC
mFasLgene 409F	5'-GTATCATCTTTGAAAAGCAAATAGCCAACCCAGTACACCCTCTG
pAdTrack4631F	5'-CAGTAGTCGGTGCTCGTCCAG
pAdTrack5616R	5'-TATGGGGGCTGTAATGTTGTCTC
FasL 471F	5'-TGTGGGCTACTGTGTTGCTTGC
FasL 1070R	5'-CCGAGTTAGGGTTTAGCCAC

Tabelul 2. Primerii utilizați pentru secvențiere.

Primer	Secvența
FasL 516 R	5'- CAACAACAACAACCCCAAATC
FasL 471 F	5'- TGTGGGCTACTGTGTTGCTTGC
FasL 1070 R	5'- CCGAGTTAGGGTTTAGCCAC
FasL 965 F	5'- AATTTGTGTCTTGTTCAG
FasL 1631 R	5'- TTACACCAAACCACTTCTTCAC
FasL 1591F	5'- GAGTTCTGGCATTGTGGGC
FasL 2281R	5'- GGGATGGACCTTGAGTGG
FasL 2143 F	5'- TACCTCCTCAGCCACTTTTTC

REVENDICĂRI

1. Tehnologia de producere a unui adenovirus ce conține mini-gena FasL obținută prin excizia intronului 2 din secvența codificatoare a ADN și care determină inducerea expresiei FasL pe suprafața celulelor pe care le infectează.
2. Tehnologia de producere a adenovirusului conform revendicării 1 prin impachetarea în celule de impachetare transfectate stabil pentru expresia moleculei FADD dominant negativă și/sau în prezența unui inhibitor de apoptoză.

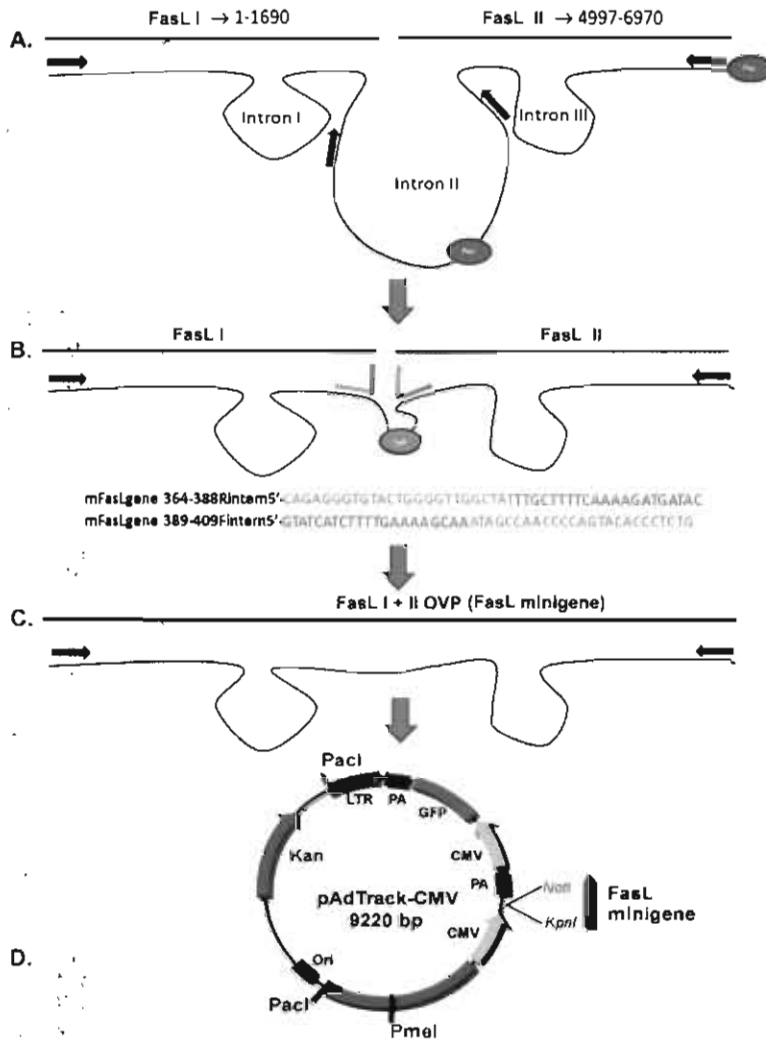


Figura 1.

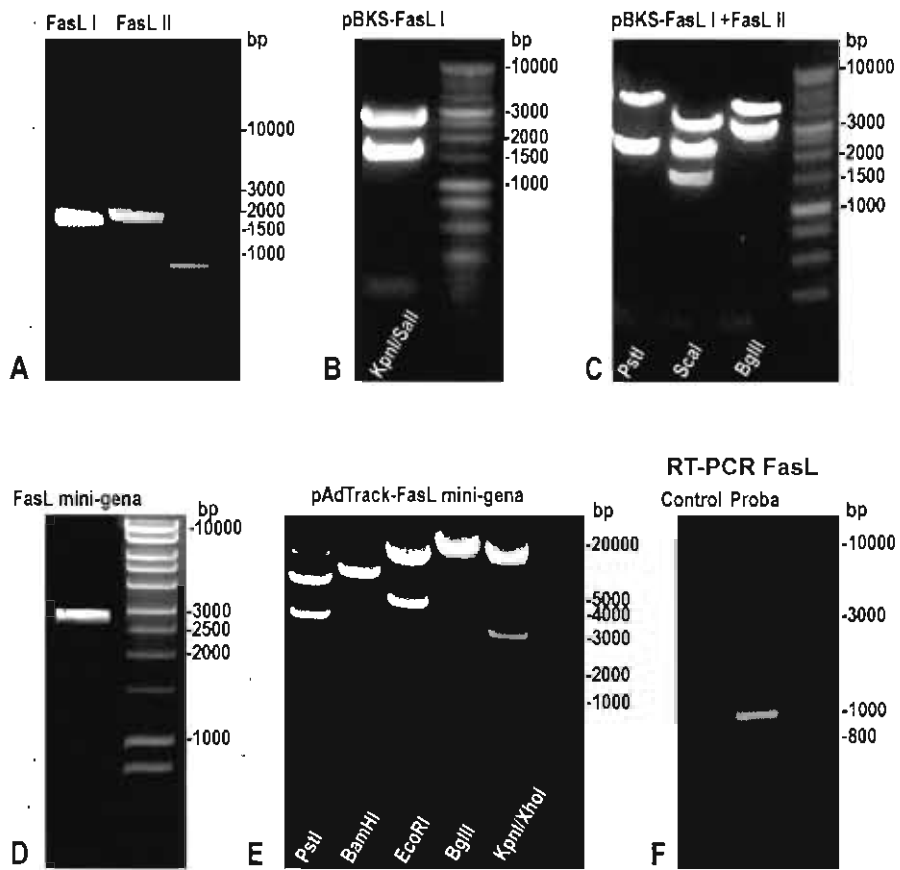
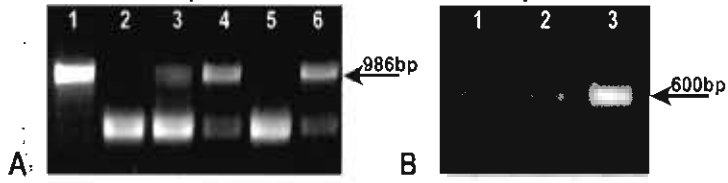


Figura 2.

45

Selectia plasmidelor recombinante prin PCR



Selectia plasmidelor recombinante prin digestie enzimatica

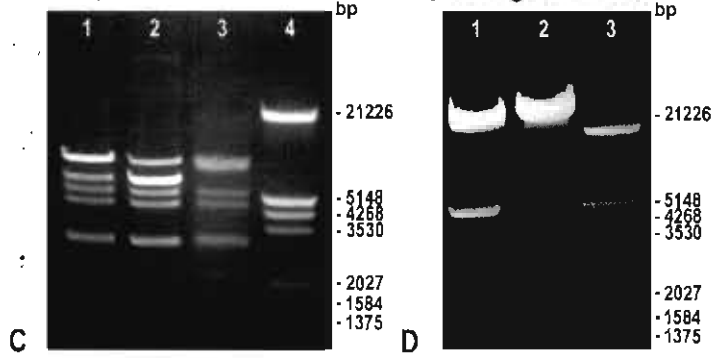


Figura.3.

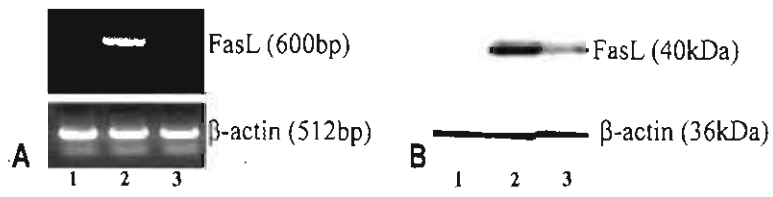


Figura 4.

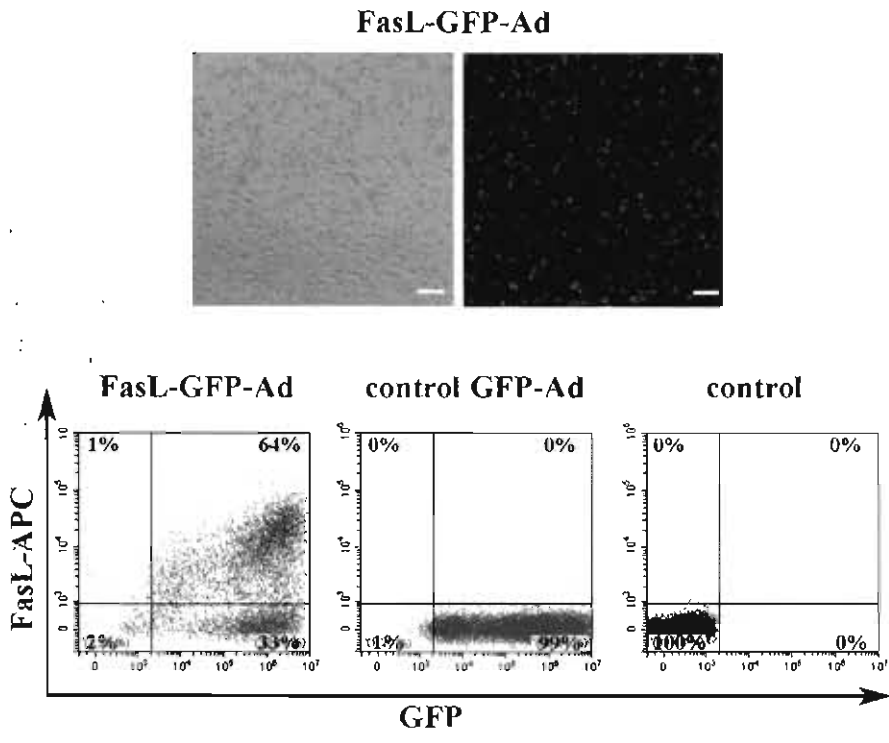


Figura 5.

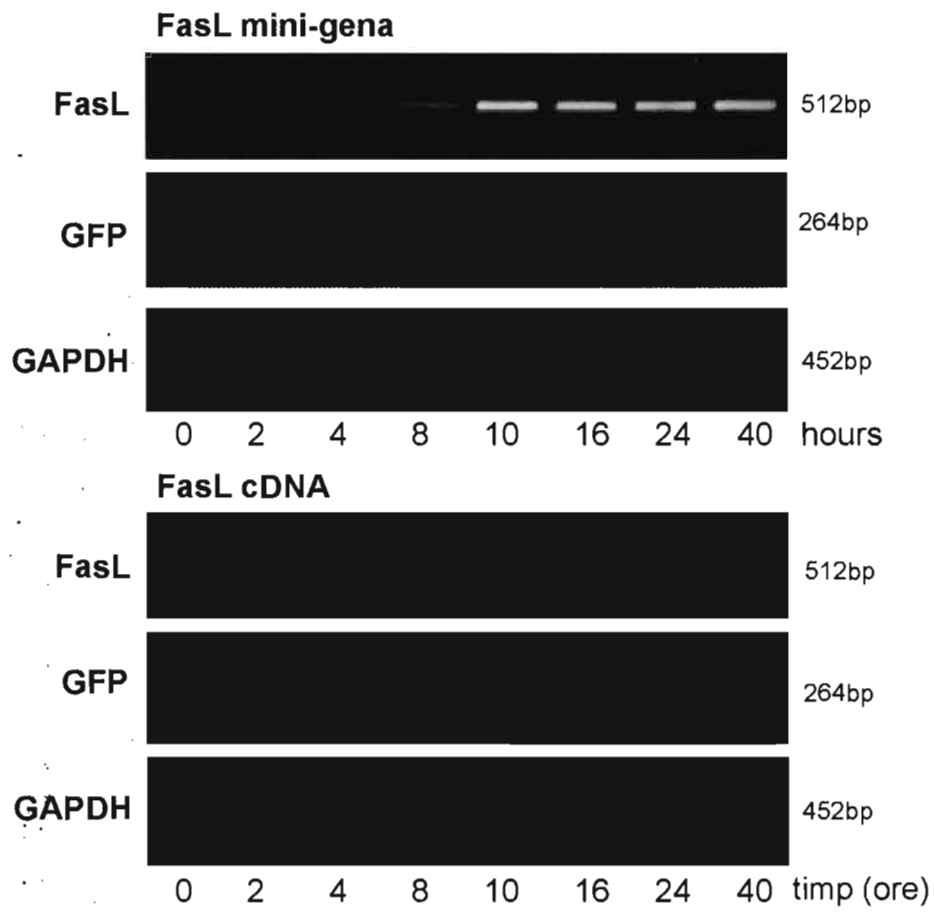


Figura 6.