UNIVERSITAT DE BARCELONA

Adenovirus oncoselectius pel tractament de càncer de pàncreas

Combinació d'estratègies de direccionament a tumor i bioselecció de microRNAs potenciadors de l'activitat adenoviral

Maria Rovira i Rigau

Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència ***Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons***.

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia ***Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons***.

This doctoral thesis is licensed under the ***Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License***.

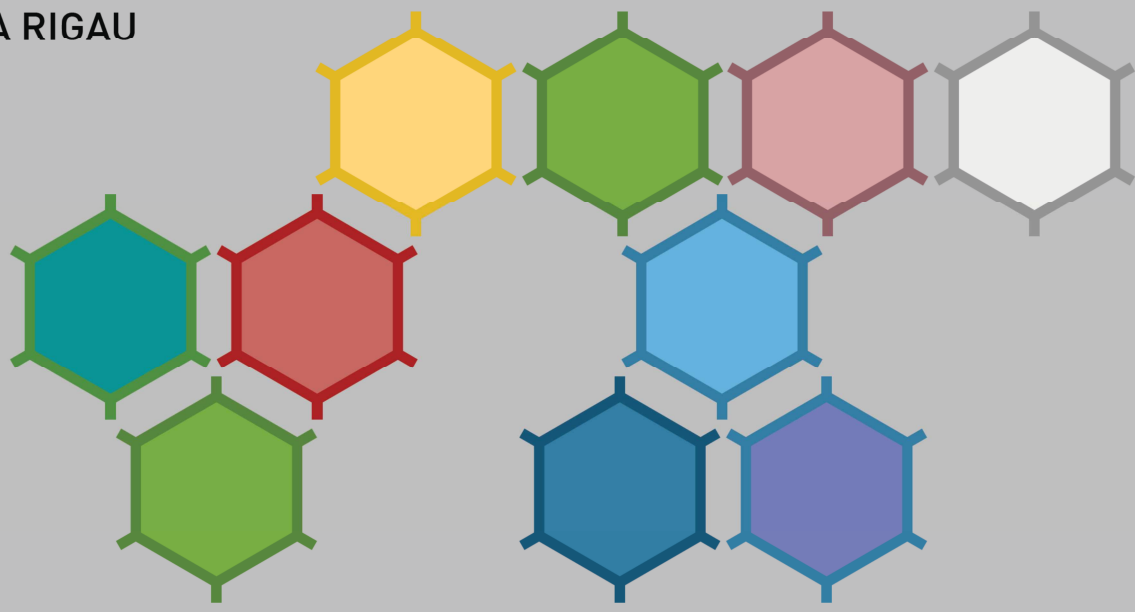
ADENOVIRUS ONCOSELECTIUS

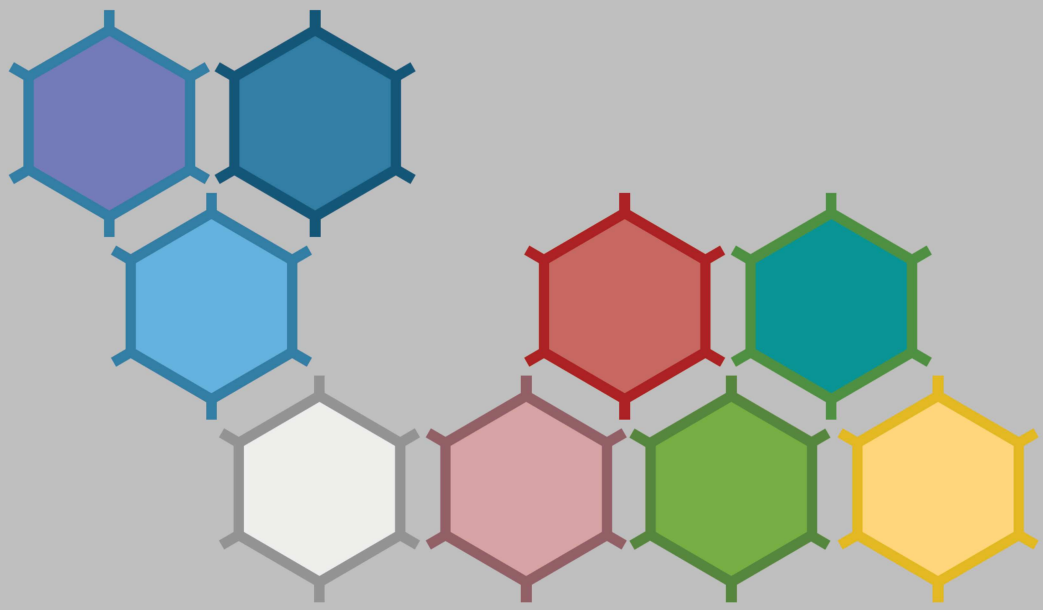
PEL TRACTAMENT DE CÀNCER DE PÀNCREES

Combinació d'estratègies de direccionament
a tumor i bioselecció de microRNAs
potenciadors de l'activitat adenoviral

TESI DOCTORAL

MARIA ROVIRA RIGAU





Adenovirus oncoselectius pel tractament de càncer de pàncrees

Combinació d'estratègies de direccionament a tumor i bioselecció de microRNAs potenciadors de l'activitat adenoviral

Memòria presentada per

Maria Rovira i Rigau

Beneficiària del Programa d'Ajudes per a la Formació de Personal Investigador del Ministerio de Economía y Competitividad del Govern d'Espanya

per optar al grau de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció de la Dra. Cristina Fillat Fonts al grup de Teràpia Gènica i Càncer de l'IDIBAPS, i sota la tutela del Dr. Marçal Pastor Anglada del departament de Bioquímica i Biomedicina Molecular de la Universitat de Barcelona

Cristina Fillat Fonts	Maria Rovira Rigau	Marçal Pastor Anglada
Directora	Candidata	Tutor

Barcelona, 2017

AGRAÏMENTS

A tots vosaltres, per haver estat presents en algun o en molts moments d'aquesta tesi.

- A la Cristina Fillat, per confiar en mi i donar-me l'oportunitat de formar part del grup CF ja fa uns quants anys. Gràcies pel teu suport, tant a nivell científic com a nivell personal.

- Als CF's! Als que encara hi sou i als que hi sou des de fora [Jeroluna, Raimondi, Pau, Estela, Cristina (la Castells...), Miguel, Sabri, Bofill!, Ana Mato i Dr. Villanu], per acompanyar-me tots aquests anys, per ensenyar-me i ajudar-me, per fer-me costat i per deixar-me remugar...
  Raimondi! Grazie mile! Sei una collega "PANCAd" fantastica, senza il tuo aiuto tutto questo lavoro non sarebbe stato possibile.
  Miguel! Gràcies per ser un gran pipiolo expert en nanopartícules.
  Jeroluna... et toca a part, a tu també, per ser la calma que em falta a mi.

- A l'Anabel, per haver-me acollit com a deixeble i com a amiga, per haver estat més que present al llarg de tot aquet temps i per la seva ajuda incondicional. Pels entrepans a mitges i els esmorzars sencers ;)

- A la "gent de la Ruth" [Antònia, Pepe, Mari i Amaia], per fer costat als "Fillatos" des de la diagonal més allunyada de la planta.
  Als companys de la 2a planta, per les hores compartides i per l'estima que es va creant. Als de la 4a, en especial a l'Elena i a les meves salvadores d'histologies, per formar un equip i no només de nom.

- Als calamars! Perquè sense amigues com vosaltres no seria el mateix. Perquè entre totes heu aconseguit estovar-me una mica... però no prou per escollir la primera versió "cursi" dels agraïments ;) Estefi, ànims que ja ho tenim!!!
  A les de "Manlleu" (i voltants), perquè tot i la distància segueixen al peu del canó.

- A la gran família de La Vall, que sempre hi és donant suport.
  A la Família Serrabassa-Batalla, pels sopars on, sí o sí, cal parlar de vaques, cavalls i malalties. En especial a la Sílvia, per cuidar-nos com una gran mare que es i per dissenyar-me aquesta fantàstica portada!
  A en Nepal i a l'Huni, que hi posen tot el cor setmana rere setmana.

- Als de casa, un GRÀCIES especial. A la Marta, “per aguantar-me” ;) i per ser la meva germana, que això ja ho diu tot... Al pare, per donar-me l’oportunitat de triar el meu camí amb tot el teu suport. Mare, hauries estat orgullosa d’aquesta tesi, et trobem a faltar. A l’avi, per ensenyar-nos que el que volem s’aconsegueix amb esforç i que la família és el més important. A la Montse, per cuidar-nos a tots.

- A l’Estrada, un GRÀCIES especial no és suficient. Per ser al meu costat i per fer-me costat, per cuidar-me com una “princesa”, per ensenyar-me a dividir els problemes grans en problemes petits, per la teva visió crítica però alhora constructiva. I sí, tens raó, per aguantar-me quan estic de mal humor ;) GRÀCIES.

TAULA D’ABREVIACIONS

5-FC	5-fluorocitosina
5-FU	5-fluorouracil
Adwt	Adenovirus salvatge espècie C serotip 5
ALT	alanina aminotransferasa
APS	persulfat d'amoni
AST	aspartat aminotransferasa
BAC	*Bacterial Artificial Chromosome* (cromosoma bacterià artificial)
BiTE	*Bi-specific T-cell Engager*
bp	parells de bases
CAF	*Cancer Associated Fibroblasts* (fibroblasts associats a tumor)
CAR	*Coxsackie and Adenovirus Receptor*
cDNA	DNA còpia
cm	centímetres
CMV	Citomegalovirus
CPE	*Cytoplasmatic Polyadenylation Element*
DMSO	dimetil sulfòxid
DNA	àcid desoxiribonucleic
dNTP	trifosfat deoxinucleòtid
DO	densitat òptica
DTT	Dithiothritol
E.coli	*Escherichia coli*
EGFP	*Enhanced Green Fluorescent Protein*
EGFR	*Epidermal Growth Factor Receptor*
FBS	*Fetal Bovine Serum* (sèrum fetal boví)
Fw	*Forward* (directe)
g	acceleració de la gravetat
G	Gauge
Gem	Gemcitabina
nP	nab-paclitaxel
GM-CSF	*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*
h	hora
HAdV-2	Adenovirus humà espècie C serotip 2
HAdV-C5	Adenovirus humà espècie C serotip 5
hTR	*human telomerase RNA* (RNA de la telomerasa humana)
IC_{50}	concentració inhibitòria 50
IP	*infective particles* (partícules infectives)
IPMN	*Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm* (neoplàsia intraductal papil·lar mucinosa)
ITR	*Inverted Terminal Repat*
Kb	Kilobase

Kg	Kilogram
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	mil·liamper
MCN	*Mucinous Cystic Neoplasm* (neoplàsia cística mucinosa)
Mg	mil·ligram
min	minut
miRISC	*miRNA-induced silencing complex*
miRNA / miR	microRNAs
ml	mil·lilitre
MLP	*Major Late Promoter*
mm	mil·límetre
mM	mil·limolar
MMP	*Matrix Metalloproteinase* (metal·loproteasa de matriu extracel·lular)
mRNA	RNA missatger
MTT	bromur de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli
Nab-paclitaxel	*nanoparticle albumin-bound* paclitaxel
NCCN	*National Comprehensive Cancer Network*
NGS	*Next Generation Sequencing*
nm	nanòmetres
ºC	graus centígrads
Orf	*Open reading frame*
PanIN	*Pancreatic Intraepithelial Neoplasia* (neoplàsia intraepitelial pancreàtica)
PBS	*phosphate-buffered saline*
PCR	*Polymerase Chain Reaction* (reacció en cadena de la polimerasa)
PDAC	*Pancreatic Ductal Adenocarcinoma* (adenocarcinoma ductal de pàncrees)
PVDF	polifluorur de vinilidè
qPCR	*quantitative Polymerase chain reaction* (PCR quantitativa)
Rb	Retinoblastoma
RDG	Arginina-Glicina-Aspàrtic
RLB	*Reporter Lysis Buffer*
RLU	*Relative Light Units* (unitats de llum relatives)
RNA	àcid ribonucleic
Rv	*Reverse* (revers)
s	segon
SDS	deodecilsulfat sòdic
SEM	error estàndard de la mitja
SPF	*Specific Pathogen Free* (lliure de patògens específics)
SPS	*Sequence Paired binding Sites*

TBS	*tris-buffered saline*
TCGA	*The Cancer Genome Atlas*
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TK	*Thymidine Kinase* (timidina quinasa)
U	unitats enzimàtiques
uPAR	*Urokinase Plasminogen Activator Receptor* (receptor activador del plasminogen de tipus uroquinasa)
UTR	*untranslated Region* (regió no traduïda)
VA-RNA	*Viral Associated RNA*
vp	*viral particles* (partícules virals)
Δ24	delta 24, deleció de 24 parells de bases
μg	micrograms
μl	microlitres
μM	micromolar

PRESENTACIÓ

L'adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC) és una neoplàsia molt agressiva a conseqüència de la seva elevada capacitat metastàtica i la gran resistència que presenta als tractaments convencionals de quimioteràpia i radioteràpia. Només un percentatge molt reduït de pacients és elegible per a la resecció quirúrgica del tumor, l'únic tractament amb opcions de cura. La major part dels casos són diagnosticats en estadis avançats de la malaltia en els que la supervivència a 5-anys se situa al voltant del 7%. La millora del pronòstic dels pacients amb càncer de pàncrees ha estat pràcticament nul·la en els últims 30 anys, de manera que existeix una clara necessitat de desenvolupar nous mètodes per facilitar la detecció precoç del tumor i teràpies més efectives pel seu tractament.

Els virus oncolítics estan guanyant importància com a teràpia pel tractament de neoplàsies agressives com el PDAC. Tanmateix, els adenovirus administrats fins al moment no han permès aconseguir respostes antitumorals complertes i és necessari disposar de virus més potents, però que alhora tinguin una replicació selectiva en tumor.

En el primer bloc d'aquesta tesi, ens hem fixat en algunes de les desregulacions que presenten les cèl·lules tumorals per tal de dissenyar estratègies de direccionament a tumor i obtenir adenovirus oncoselectius més segurs. Concretament, l'increment de l'expressió de metal·loproteases de matriu, la reactivació en els tumors de vies relacionades amb el desenvolupament embrionari i la pèrdua de l'expressió de miRNAs específics de teixit han estat el racional per a generar modificacions genètiques que permetessin regular l'entrada dels adenovirus a la cèl·lula i l'expressió del gen *E1A* a nivell transcripcional i post-transcripcional. D'aquesta manera, s'ha determinat que la combinació de diversos mecanismes de control de la replicació viral permet obtenir adenovirus més segurs per una administració sistèmica tot mantenint una activitat antitumoral significativa.

En el segon bloc de la tesi, ens hem centrat en conferir més potència als adenovirus oncolítics. Vam hipotetitzar que les desregulacions en els perfils d'expressió de miRNAs de les cèl·lules tumorals podrien tenir un impacte negatiu en el cicle adenoviral, limitar la formació de nova progènia viral i per tant, reduir l'eficàcia antitumoral dels adenovirus oncolítics. Amb l'objectiu de contrarestar aquestes possibles limitacions i obtenir adenovirus amb una activitat antitumoral augmentada, es va dur a terme la bioselecció d'una biblioteca de miRNAs humans en adenovirus per tal d'identificar miRNAs potenciadors de l'activitat adenoviral en PDAC. A través d'aquest sistema *high-throughput*, es va determinar que el miR-99b i el miR-485

milloraven l'expressió dels gens virals i la formació de virions infectius en cèl·lules de PDAC gràcies a la regulació, directa o indirecta, de factors cel·lulars amb expressió diferencial en cèl·lules neoplàsiques i cèl·lules no tumorals. Així doncs, la identificació de miRNAs que milloraven el *fitness* viral va permetre obtenir adenovirus oncoselectius més potents front a PDAC.

ÍNDEX

1. INTRODUCCIÓ 9

1.1. Càncer de pàncrees 11
1.1.1. Histopatologia del PDAC 13
1.1.2. Alteracions moleculars del PDAC 15
1.1.2.1. Vies de senyalització implicades en el desenvolupament embrionari . 16
1.1.2.2. Processos relacionats amb invasió 18
1.1.3. Components cel·lulars del PDAC 20
1.2. microRNAs 22
1.2.1. Biogènesi dels miRNAs 22
1.2.2. Reconeixement de dianes d'unió 24
1.2.3. Silenciament de l'expressió gènica a través de miRNAs 26
1.2.4. miRNAs en càncer 28
1.2.4.1. miRNAs en càncer de pàncrees 29
1.2.5. miRNAs en infeccions virals 30
1.3. Viroteràpia oncolítica 32
1.4. Adenovirus 34
1.4.1. Estructura del virió 34
1.4.2. Estructura i organització del genoma 35
1.4.3. El cicle viral infectiu 36
1.4.3.1. Unió i internalització del virió 37
1.4.3.2. Expressió de les proteïnes primerenques 38
1.4.3.3. Replicació del genoma 39
1.4.3.4. Expressió de les proteïnes tardanes 40
1.4.3.5. Formació i alliberament dels nous virions 41
1.5. Disseny d'adenovirus oncolítics 42
1.5.1. Estratègies de direccionament a tumor 42
1.5.1.1. Modificació del tropisme adenoviral 42
1.5.1.2. Control de l'expressió de gens virals 43
1.5.1.3. Supressió de la funció de gens virals 43
1.5.2. Estratègies per augmentar la potència oncolítica 44

1.5.2.1. Emmascarament del virió 44
1.5.2.2. Expressió de transgens 45
1.5.2.3. Mecanismes d'activació del sistema immune 45
1.5.2.4. Combinació amb agents quimioteràpics 46
1.5.3. Estratègies no racionals 46

2. OBJECTIUS 49

3. MATERIALS i MÈTODES 53

3.1. Tècniques de manipulació de bacteris 55
3.1.1. Soques bacterianes utilitzades 55
3.1.2. Condicions de cultiu i emmagatzematge bacterians 56
3.1.3. Recombinació homòloga i selecció positiva-negativa en bacteris (sistema AdZ) 56
3.2. Tècniques de manipulació de DNA 59
3.2.1. Tècniques d'aïllament de DNA 59
3.2.1.1. Aïllament de DNA plasmídic de cèl·lules procariotes 59
Preparacions de DNA a petita escala 59
Preparacions de DNA a gran escala 60
3.2.1.2. Aïllament de DNA de cèl·lules eucariotes i cèl·lules eucariotes infectades amb adenovirus 60
3.2.1.3. Aïllament de DNA viral del sobrenedant de cèl·lules infectades amb adenovirus 61
3.2.1.4. Aïllament de DNA viral a partir de virus purificat 61
3.2.1.5. Aïllament de DNA viral de teixits 62
3.2.2. Quantificació del DNA i determinació de la seva puresa 62
3.2.3. Digestió enzimàtica de DNA 63
3.2.4. Tècniques d'amplificació de DNA 64
3.2.4.1. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR) 64
3.2.4.2. Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (qPCR) 66
3.2.5. Seqüenciació d'un fragment de DNA 67

3.2.6. Generació de plasmidis recombinants amb el sistema AdZ 68
3.3. Tècniques de manipulació de l'RNA 72
3.3.1. Aïllament d'RNA i miRNAs 72
3.3.2. Quantificació de l'RNA i determinació de la seva puresa 72
3.3.3. Anàlisi de l'expressió d'RNAs missatgers 73
3.3.4. Anàlisi de l'expressió de miRNAs 74
3.4. Tècniques de manipulació de proteïnes 76
3.4.1. Aïllament de proteïnes 76
3.4.2. Quantificació de proteïnes 76
3.4.3. Western Blot 77
3.4.3.1. Electroforesi de proteïnes de condicions desnaturalitzants 77
3.4.3.2. Transferència de proteïnes a membranes 78
3.4.3.3. Immunodetecció de les proteïnes 79
3.4.3.4. Quantificació de les bandes d'immunodetecció 79
3.4.4. Assajos luciferasa 80
3.4.4.1. Assaig luciferasa de cèl·lules transduïdes amb adenovirus reporters. 80
3.4.4.2. Assaig luciferasa de teixits d'animals administrats amb adenovirus reporters 80
3.5. Tècniques de cultius cel·lulars eucariotes 81
3.5.1. Línies cel·lulars humanes utilitzades 81
3.5.2. Transfeccions transitòries 83
3.5.2.1. Transfecció mitjançant dendrímers activats 83
3.5.2.2. Transfecció mitjançant nanoplexes de poly-(□-aminoésters) 83
3.5.3. Tinció amb blau de metilè 84
3.6. Manipulació d'adenovirus 85
3.6.1. Generació de l'homogenat viral 85
3.6.2. Purificació d'adenovirus 86
3.6.3. Titulació d'adenovirus 86
3.6.3.1. Quantificació de partícules físiques per espectrometria (vp/ml) 86
3.6.3.2. Quantificació de partícules virals infectives (PI/ml) 87
3.6.4. Infeccions amb adenovirus 87
3.6.4.1. Estudi dels mecanismes d'entrada a la cèl·lula dels adenovirus modificats a la fibra 88
3.6.4.2. Assaig de bioselecció de la biblioteca d'adenovirus AdwtE miR-Lib ... 88
3.6.4.3. Anàlisi de fluorescència mitjançant microscopia 89
3.6.4.4. Assaig de producció i alliberament de partícules virals 90

3.6.4.5. Assaig de citotoxicitat adenoviral 90
3.7. Tècniques de manipulació animal 92
3.7.1. Generació de tumors a ratolins 92
3.7.1.1. Generació de tumors ortotòpics a pàncrees 92
3.7.1.2. Generació de tumors subcutanis 93
3.7.2. Administració de virus o fàrmacs *in vivo* 94
3.7.2.1. Administració sistèmica per via sanguínia 94
3.7.2.2. Aministració per via intraperitoneal 94
3.7.2.3. Administració intratumoral 94
3.7.2.4. Administració intraductal pancreàtica a través del conducte biliar 95
3.7.3. Monitorització de la bioluminiscència 95
3.7.4. Obtenció d'òrgans i teixits murins 96
3.7.4.1. Extracció de sang i obtenció del sèrum 96
3.7.4.2. Extracció d'òrgans sòlids 97
3.8. Tècniques histològiques 98
3.8.1. Inclusió de teixits en OCT 98
3.8.2. Immunofluorescència de talls histològics congelats 98
3.9. Recursos bioinformàtics 100
3.9.1. Recursos bioinformàtics relacionats amb miRNAs 100
3.9.2. Altres recursos bioinformàtics 100
3.10. Representació gràfica i anàlisi estadístic de les dades 101
3.10.1. Representació gràfica 101
3.10.2. Anàlisi estadístic 101
3.10.2.1. Anàlisi de comparació de mitges 101
3.10.2.2. Anàlisi de progressió tumoral i pèrdua de pes al llarg del temps 102
3.10.2.3. Anàlisi de les corbes de supervivència 102

4. RESULTATS 111

4.1. Combinació d'estratègies de direccionament a tumor per conferir als adenovirus una capacitat oncolítica selectiva 113
4.1.1. La modificació genètica activable per metal·loproteases TATMMP permet augmentar l'activitat antitumoral i millorar la toxicitat pancreàtica dels adenovirus administrats per via intraductal a pàncrees 113

4.1.1.1. El virus Ad^{RC}MMP mostra una activitat oncolítica i antitumoral augmentades en diferents models tumorals 115

4.1.1.2. La modificació TATMMP millora el perfil de toxicitat dels adenovirus després d'una administració intraductal al pàncrees però no després d'una administració sistèmica 118

4.1.1.3. La modificació genètica a la fibra TATMMP redirigeix l'entrada de l'adenovirus a l'endocitosi per caveoles 121

4.1.2. La incorporació de controls al gen *E1A* del virus PANCAd permet mantenir la capacitat antitumoral del virus i millorar-ne el perfil de toxicitat hepàtica 123

4.1.2.1. L'adenovirus PANCAd presenta un perfil de toxicitat hepàtica molt segur 124

4.1.2.2. L'adenovirus quimèric PANCAd mostra un efecte antitumoral significatiu en tumors derivats de pacient CP15 però no sinergitza amb el tractament quimioteràpic 127

4.1.2.3. Els adenovirus quimèrics PANCAd tenen una activitat antitumoral i un perfil de toxicitat hepàtica similars 135

4.2. Bioselecció de miRNAs potenciadors de l'activitat adenoviral en models de PDAC 139

4.2.1. Identificació de miRNAs potenciadors de l'activitat oncolítica adenoviral per bioselecció de la biblioteca AdwtE miRLib 140

4.2.2. Els virus codificants pel miR-99b i el miR-485 presenten un alliberament superior de partícules infectives al medi de cultiu de línies cel·lulars de PDAC . 146

4.2.3. L'expressió del miR-99b i del miR-485 permet augmentar la citotoxicitat dels adenovirus 156

4.2.4. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 mostren una replicació viral superior a l'AdwtE en models tumorals *in vivo* 157

4.2.5. La millora en la formació de partícules infectives dels adenovirus candidats vindria donada per una major expressió dels gens virals 159

4.2.6. El miR-99b i el miR-485 actuen sobre gens relacionats amb processos de transcripció i regulació de l'expressió gènica 163

4.2.7. El miR-99b i miR-485 confereixen una replicació viral i una capacitat citotòxica superiors a l'adenovirus oncoselectiu ICOVIR15 170

4.2.8. Els ICOVI15 miR-99b i miR-485 tenen una capacitat antitumoral superior a la del virus parental ICOVIR15 173

5. DISCUSSIÓ 177

5.1. La combinació d'elements de direccionament a tumor permet generar adenovirus amb una capacitat oncoselectiva millorada 180

5.2. La bioselecció d'una biblioteca d'adenovirus permet identificar el miR-99b i el miR-485 com a miRNAs potenciadors de la capacitat oncolítica adenoviral 187

6. CONCLUSIONS 197

7. BIBLIOGRAFIA 201

8. ANNEX 217

1. INTRODUCCIÓ

1.1. Càncer de pàncrees

El càncer engloba un conjunt de malalties que es caracteritzen per un creixement descontrolat i invasiu d'algunes cèl·lules del cos, les quals pateixen una acumulació de canvis a nivell genètic[1]. Els tumors són teixits complexes en els que tenen lloc interaccions entre cèl·lules tumorals i cèl·lules no tumorals que formen part de l'estroma i que faciliten la generació del microambient necessari per a la carcinogènesi. Durant la progressió neoplàsica, les cèl·lules adquireixen unes capacitats de proliferació, invasió i evasió del control per part de l'organisme que són essencials pel manteniment i desenvolupament de la patologia[2].

A nivell mundial, l'any 2012, es varen donar aproximadament 14 milions de casos nous de càncer i, malgrat l'increment de supervivència aconseguit en les últimes dècades, aquest conjunt de malalties representa la segona causa de mort al món[3,4]. En el context d'augment general de la supervivència, és necessari destacar l'escassa millora en l'evolució del pronòstic en els casos de càncer de pàncrees[4] (Figura 1.1).

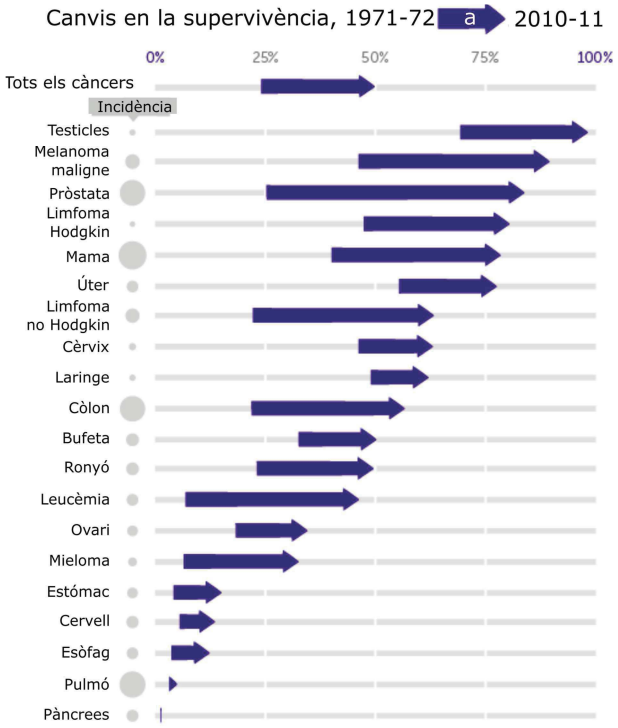


Figura 1.1. Evolució de la supervivència a 10 anys en adults (15-99 anys), estandarditzada per edat en adults, a Regne Unit entre 1971 i 2011 (versió adaptada de Cancer Research UK[4]).

El càncer de pàncrees engloba les neoplàsies causades pel creixement anormal i descontrolat de les cèl·lules exocrines o endocrines d'aquest òrgan. La major part de neoplàsies de pàncrees (85%) són adenocarcinomes ductals pancreàtics (PDAC), derivats de la fracció exocrina[5,6]. Tot i presentar una baixa incidència en països desenvolupats, el càncer de pàncrees està associat a una supervivència molt reduïda, motiu pel qual va ser la quarta causa de morts per càncer l'any 2016[7].

La baixa supervivència dels pacients de PDAC està associada a tres raons principals. La primera és la dificultat de diagnòstic. Molts pacients són asimptomàtics fins a estadis avançats de la malaltia, en els que el tumor ha envaït teixits adjacents i no és possible la seva resecció quirúrgica. La segona raó, propiciada per la detecció tardana, és l'elevada capacitat metastàtica d'aquests tumors, observant-se metàstasis en el 90% de casos de PDAC. Finalment, el PDAC es caracteritza per una gran resistència als tractament quimioteràpics i radioteràpics[8]. Tanmateix, en els pocs casos (15%-20%[9]) en que la resecció quirúrgica és possible, la supervivència a 5-anys no supera el 26%. En pacients diagnosticats en estadis avançats de la malaltia, la supervivència a 5-anys es situa al voltant del 7%[7].

Només un 5-10% dels casos de PDAC estan relacionats amb un desordre genètic a nivell germinal, incloent mutacions a gens com *CDKN2A*, *PRSS1*, *STK11*, *BRCA2* i *MSH2*. La resta de casos serien causats per alteracions genètiques adquirides. El principal factor de risc associat al desenvolupament de PDAC és el tabaquisme, el qual en causa un 20-25% dels casos; mentre que la diabetis, la pancreatitis crònica i l'obesitat són altres factors de risc[10].

Els tractaments pel PDAC depenen de l'estadi en que es trobi el tumor al moment del diagnòstic i inclouen la resecció quirúrgica, la quimioteràpia i la quimioradioteràpia, tot i que no és del tot clar que aquesta última aporti beneficis en la supervivència en comparació amb la quimioteràpia sola[8]. La cirurgia, consistent en l'extirpació del tumor mitjançant una pancreotaoduodectomia, és l'únic tractament per la cura però es pot aplicar en molts pocs casos[9]. Tot i que està recomanada per les directrius de la NCCN per tumors que es troben a la línia de frontera de la resecció, l'ús de quimioteràpia neoadjuvant, prèvia a la resecció, és controvertit. La quimioteràpia adjuvant, posterior a la resecció, és acceptada com a estàndard de tractament i sol basar-se en bolus de gemcitabina o 5-fluorouracil[9,11,12]. Pels casos de PDAC localment avançat o metastàtic el tractament depèn de l'estat de salut del pacient. En pacients que mostren un estat de salut deteriorat, els únics tractaments recomanats són la gemcitabina i els pal·liatius[11]. Per pacients en bon estat de salut, el

tractament estàndard durant l'última dècada va ser la gemcitabina. En els últims anys, múltiples tractaments per aquests pacients han estat testats en assajos clínics, dels quals cal destacar el nab-paclitaxel (*nanoparticle albumin-bound* paclitaxel) i el FOLFIRINOX, els quals han suposat un canvi en el tractament del PDAC. Ambdós tractaments permeten augmentar la supervivència global dels pacients tractats únicament amb gemcitabina (8,8 vs 6,6 mesos per la combinació amb nab-paclitaxel[13] i 11,1 vs 6,8 mesos pel FOLFIRINOX[14]). Tot i que el FOLFIRINOX ha mostrat ser més efectiu, també té associada una major toxicitat[8]. Aquest modest increment de la supervivència fa evident la necessitat de desenvolupar noves teràpies pel tractament del PDAC, motiu pel qual s'estan portant a terme assajos clínics basats en inhibidors de vies moleculars alterades, immunoteràpia, inhibidors de *checkpoints* immunes[12] i també virus oncolítics[15].

1.1.1. Histopatologia del PDAC

Els estudis de patologia molecular i anàlisis genètics han permès desenvolupar un model de progressió tumoral pel PDAC amb estadis caracteritzats per un patró d'adquisició de mutacions.

La major part de casos de PDAC es desenvolupen a partir d'unes lesions precursores no invasives microscòpiques, d'epiteli columnar mucinós, anomenades PanIN (neoplàsia intraepitelial pancreàtica). Aquestes lesions són classificades en PanIN-1, PanIN-2 o PanIN-3 segons el grau de desorganització cel·lular i atípia nuclear que presentin. Els PanIN de grau elevat acaben transformant-se en PDAC, canvi marcat per l'aparició de la invasió del tumor més enllà de la membrana basal[16] (Figura 1.2). Tot i que menys freqüents, existeixen altres tipus de lesions precursores: les neoplàsies intraductal papil·lars mucinoses (IPMN) i les neoplàsies cístiques mucinoses (MCN).

Les lesions precursores PanIN s'inicien amb un escurçament dels telòmers[17] i s'associen amb l'aparició de diverses les mutacions genètiques (Figura 1.2):

- *KRAS* – gen que codifica una GTPasa petita responsable de la transducció de senyals des dels receptors de factors de creixement. La mutació a *KRAS*, especialment al codó 12, es troba present en més d'un 99% de les lesions PanIN-1 i té com a conseqüència l'activació constant de la via de

senyalització amb independència de la presència de factors de creixement[8,17]. Cal destacar que per desencadenar l'aparició de tumors, *KRAS* no només ha d'estar mutat, sinó que és necessària la hiperactivació de la seva via per part d'estímuls inflamatoris, els quals generen un *feedback* positiu que n'augmenta l'expressió fins a nivells patològics[18].

- *CDKN2A* – gen que codifica pels supressors de tumors $p16^{INK4a}$ i $p14^{ARF}$, els quals actuen regulant la progressió del cicle cel·lular a fase S. La proteïna $p16^{INK4a}$ impedeix la unió de les CDK4/CDK6 a la ciclina D i, per tant, la fosforilació de RB, bloquejant així l'entrada a fase S. La proteïna $p14^{ARF}$ s'uneix a MDM2 i impedeix que indueixi la degradació de p53. Les mutacions a *CDKN2A*, que causen una pèrdua del control de la progressió en cicle, apareixen en lesions PanIN-2 i són presents a més del 90% dels PDAC[8,17].
- *TP53* – les mutacions al gen supressor de tumors *TP53*, codificant per la proteïna p53, són molt freqüents a partir de lesions PanIN-3[8,17]. p53 és un sensor d'estrès cel·lular que para el cicle o fa entrar la cèl·lula en apoptosi quan es detecten danys al DNA o la presència d'estrès oxidatiu. La pèrdua de p53 facilita l'aparició d'aberracions cromosòmiques i la inestabilitat genètica en PDAC[16].
- *SMAD4* – el gen supressor de tumors *SMAD4* intervé en la transducció de senyals de la via de TFGβ, bloquejant el cicle cel·lular i promovent l'apoptosi. SMAD4 es troba inactivat, a partir de lesions PanIN-3, en un 50% dels casos de PDAC.

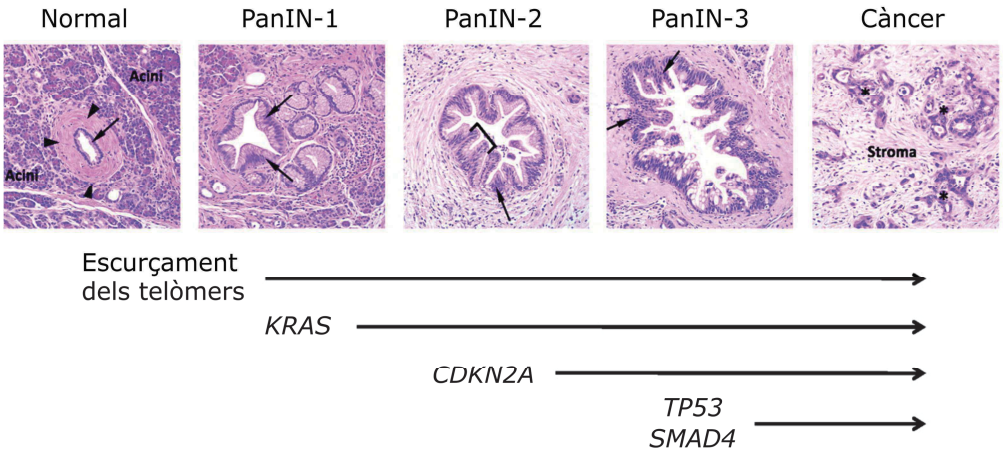


Figura 1.2. Model de progressió morfològica i genètica del PDAC amb exemples histològics d'un ducte pancreàtic normal, PanINs i adenocarcinoma (versió adaptada de Iacobuzio-Donahue, 2012[19]).

L'origen de les lesions precursores és controvertit, però existeixen evidències de que provenen d'una població de cèl·lules *stem-cell like* del pàncrees (cèl·lules centroacinars Hes1 positives o cèl·lules acinars que s'han transdiferenciat en epiteli ductal com a resposta a un dany cel·lular), o bé de verdaderes cèl·lules mare d'epiteli ductal[19]. Estudis recents proposen que la majoria de lesions PanIN es desenvoluparien per transdiferenciació de les cèl·lules acinars, mentre que les lesions IPMN s'originarien des dels progenitors de l'epiteli ductal[20].

El PDAC d'estat avançat es caracteritza per tenir un fenotip glandular, amb estructures en forma de ducte de diferents graus d'atípia, i per presentar una forta reacció desmoplàsica d'estroma dens amb presència de fibroblasts i cèl·lules inflamatòries. Els PDAC solen iniciar-se al cap del pàncrees, estenent-se cap a la resta de l'òrgan i infiltrant-se als nòduls limfàtics, melsa, i cavitat peritoneal, generant metàstasis a pulmons i fetge[16].

1.1.2. Alteracions moleculars del PDAC

A part de les alteracions als quatre gens *driver* principals, mutats ja en lesions precursores, els estudis de seqüenciació de l'exoma i genoma complets han permès identificar mutacions en altres gens, implicats en reparació del DNA (*ATM*, *BRCA2*), remodelació de la cromatina (*MLL2*, *MLL3* i *KDM6A*) i remodelació del nucleosoma (*ARID1A*, *ARID1B* i *SMARCA1*)[5]. Aquestes estudis també han posat de manifest l'existència de centenars de mutacions a altres gens, les quals és necessari identificar si tenen una implicació directe (*driver*) o indirecte (*passenger*) en el desenvolupament del PDAC[8].

Recentment, l'estudi genòmic integrat de més de 400 mostres ha permès identificar 32 gens mutats de forma recurrent en PDAC que s'agreguen en 10 vies principals: KRAS, TGF-β, WNT, NOTCH, ROBO/SLIT (amb funcions relacionades amb angiogènesi i orientació dels exons), transició G1/S, SWI-SNF, modificació de la cromatina, reparació del DNA i processament de l'RNA[21]. Els anàlisis d'expressió d'aquest conjunt de gens ha permès definir quatre tipus de PDAC: (1) escamós, que es caracteritza per tenir el pitjor pronòstic; (2) progenitor pancreàtic; (3) immunogènic, amb vies de supressió de la immunitat adquirida activades; i (4) exocrí endocrí aberrantment diferenciat[21].

Les alteracions que es presenten en més freqüència, a part de les de la via de KRAS i les de vies relacionades amb reparació del DNA i progressió de cicle cel·lular, són les alteracions a les vies de senyalització implicades en el desenvolupament embrionari (Notch, Wnt i Hedgehog)[22,23]. El PDAC també pateix freqüentment alteracions en processos relacionats amb invasió[23]. El coneixement de tot el conjunt de vies alterades és d'especial interès pel desenvolupament de teràpies més efectives pel tractament del PDAC.

1.1.2.1. Vies de senyalització implicades en el desenvolupament embrionari

El desenvolupament del PDAC es caracteritza per una reactivació de vies cel·lulars implicades en el desenvolupament embrionari: Notch, Wnt i Hedgehog.

Via de senyalització de Notch

La via de senyalització de Notch és una via conservada en mamífers que permet la transducció de senyals des de la membrana fins al nucli cel·lular per tal d'activar la transcripció de gens implicats en el desenvolupament embrionari. Existeixen quatre receptors transmembrana Notch i cinc lligands que interaccionen entre cèl·lules veïnes. Quan es produeix la interacció, s'allibera la regió intracel·lular del receptor Notch (NICD) a través d'una cadena d'accions proteolítiques. NICD interacciona amb el factor de transcripció CSL (o RBPJ) a l'interior del nucli per tal d'anular la repressió de l'expressió gènica que realitza CSL i activar conjuntament la transcripció dels gens de resposta a Notch[24,25] (Figura 1.3). Els promotors dels gens més sensibles a la via de Notch es caracteritzen per tenir dos llocs d'unió per CSL, orientats en sentit oposat i anomenats seqüències SPS (*Sequence Paired binding Sites*)[26]. La via de Notch s'ha vist implicada en el manteniment de l'estat indiferenciat de les cèl·lules progenitores del pàncrees, de manera que la seva reactivació en PDAC fa que les cèl·lules epitelials presentin un fenotip menys diferenciat de tipus ductal[25].

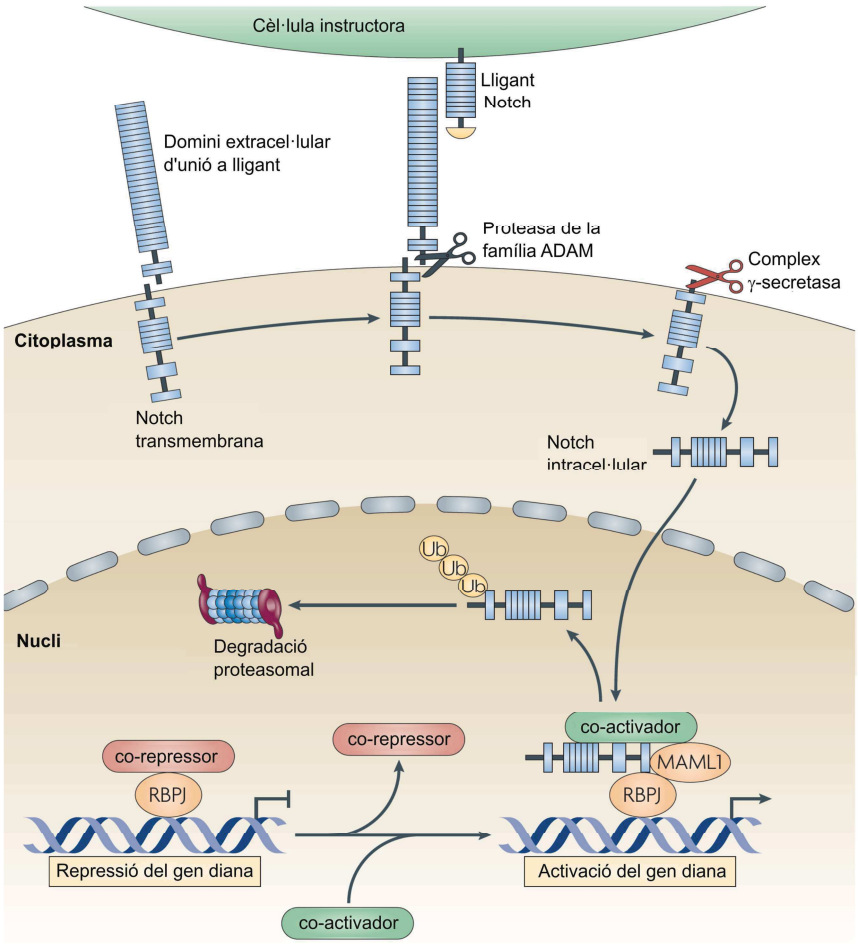


Figura 1.3. Representació esquemàtica de la via canònica de senyalització de Notch (versió adaptada de Amsen i col., 2009[27]).

Via de senyalització de Wnt

La via de Wnt és una altra via de senyalització involucrada en el desenvolupament embrionari, així com també en l'homeòstasi de l'autorenovació de teixits adults[28]. La cascada de senyalització s'inicia quan els lligants solubles interaccionen amb els receptors Frizzled i s'indueix la degradació del complex citoplasmàtic que marca per fosforilació la β-catenina per tal de que sigui proteolíticament degradada. Així doncs, quan s'activa la via de Wnt, la β-catenina pot translocar-se al nucli i actuar de factor de transcripció[25]. Les vies de Notch i Wnt interaccionen entre elles de formes diferents: NCID, la β-catenina i CSL formen un complex que activa l'expressió de gens arterials durant l'angiogènesi, i cadascuna de les vies de senyalització estimula l'expressió de lligants o altres proteïnes implicades en l'altra via[24].

Via de senyalització de Hedgehog

La via de senyalització de Hedgehog té nombrosos rols en el control de la proliferació cel·lular, l'homeòstasi tissular i el manteniment de les cèl·lules mare[29]. Tres proteïnes solubles anomenades Desert Hedgehog (DHH), Indian Hedgehog (IHH) i Sonic Hedgehog (SHH) s'uneixen al receptor de membrana PTC1, desencadenant l'activació de la via. En absència del lligant, el receptor inhibeix la proteïna SMO. Un cop el receptor s'activa, SMO és alliberada i permet la translocació dels factors de transcripció Gli al nucli, on actuaran induint l'expressió dels gens resposta d'aquesta via. L'activació continuada de la via de senyalització de Hedgehog és important pel desenvolupament del PDAC, en el qual s'ha observat una sobreexpressió que ja té lloc en lesions precursores PanIN-1[25].

1.1.2.2. Processos relacionats amb invasió

Durant el creixement d'un tumor és necessari que es generin canvis al seu entorn perquè pugui rebre els nutrients que li són necessaris i per poder-se expandir. Aquests canvis impliquen la inducció d'un procés d'angiogènesi i la remodelació de la matriu extracel·lular per poder-se expandir mitjançant l'expressió de diverses proteases.

Sistema de proteases uPA-uPAR

El receptor activador del plasminogen de tipus uroquinasa (uPAR) és un important regulador de la proteòlisi de la matriu extracel·lular i de la senyalització derivada de les interaccions entre la matriu i la cèl·lula[30].

El receptor uPAR uneix el lligant uPA i també el corresponent zimogen pro-uPA. Quan el lligant uPA es troba unit al receptor pot exercir la seva acció proteolítica sobre el zimogen plasminogen, activant-lo i generant la plasmina, la qual al seu torn talla i activa a pro-uPA. Aquest *feedback* positiu permet l'activació de les metal·loproteases de matriu, les quals degradaran i remodelaran la matriu extracel·lular i alliberaran o activaran factors de creixement que s'hi troben retinguts. El receptor uPAR també pot actuar com a receptor de senyalització, promovent la motilitat, invasió, proliferació i supervivència cel·lulars. Al no tenir un domini intracel·lular, el receptor uPAR requereix

de la interacció amb altres receptors transmembrana, com ara les integrines, per transduir la senyalització a nivell intracel·lular[30] (Figura 1.4).

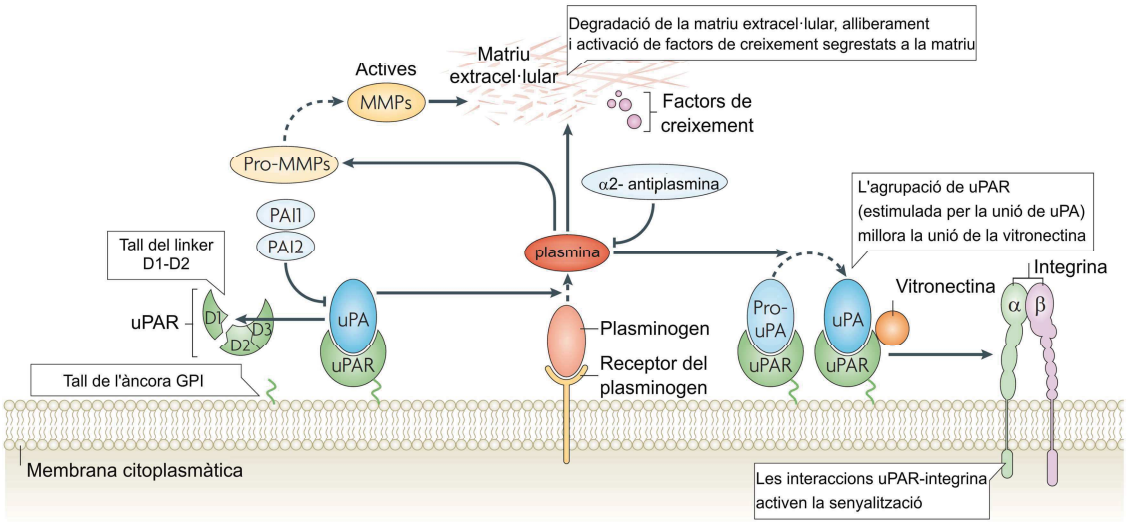


Figura 1.4. Representació esquemàtica del sistema de proteases i senyalització uPA-uPAR (versió adaptada de Smith i Marshall, 2010[30]).

En condicions normals l'expressió de uPAR és molt reduïda, però s'ha observat que tant el lligant uPA com el receptor uPAR es troben sobreexpressats en molts càncers sòlids, també en PDAC, i que aquesta sobreexpressió repercuteix negativament en la supervivència dels pacients[31]. L'expressió de uPAR també s'ha vist augmentada en fibroblasts de l'estroma tumoral i s'ha pogut correlacionar amb la generació de metàstasis de PDAC a fetge a través de la cascada uPA-plasminogen-MMP-2[32].

L'expressió de uPAR està desregulada en càncer a nivell transcripcional, ja que el promotor del gen conté llocs d'unió per factors de transcripció que presenten una activació o expressió aberrants en càncer: AP1, l'expressió del qual és promoguda per la via de Ras-ERK; HIF-1α, estabilitzat en condicions d'hipòxia; NF-κB i β-catenina[30,33].

Metal·loproteases de matriu

Les metal·loproteases de matriu són una família d'enzims proteolítics dependents de zinc que degraden la matriu extracel·lular i que, per tant, són essencials per l'avanç del tumor i la generació de nova vasculatura[28]. Aquests enzims són multifuncionals, poden tallar tot tipus de components de la matriu (col·lagen, laminina, fibronectina...), factors de creixement, receptors, etc. La família de metal·loproteases humanes està composta de 23 enzims, secretats o units a membrana (MT-MMP), dividits en col·lagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13, MT1-MMP...) o gelatinases (MMP-2 i MMP-9).

En condicions normals, les metal·loproteases són expressades en baixa quantitat i de manera molt controlada, tant a nivell transcripcional com post-transcripcional. Es secreten com a proenzims i s'activen amb el tall que els generen proteases com la plasmina o altres metal·loproteases de membrana. Un cop actives, les metal·loproteases són regulades pels inhibidors tissulars de metal·loproteases (TIMPs). Tant l'expressió de metal·loproteases com la dels TIMPs s'ha vist alterada en PDAC, observant-se un augment per a les primeres i una disminució per a les segones[28,34].

1.1.3. Components cel·lulars del PDAC

El càncer de pàncrees no conté únicament cèl·lules tumorals, sinó que també està format per cèl·lules mare tumorals, un estroma dens i cèl·lules de l'estroma.

Les cèl·lules mare tumorals representen menys del 5% de la població cel·lular del PDAC i es caracteritzen per tenir les capacitats d'autorenovació i de formació completa de tumors. Aquestes cèl·lules poden ser identificades per l'expressió de marcadors de membrana (CD133, CD44, CD24 i ESA) i són les principals responsables de la resistència als tractaments quimioteràpics i radioteràpics, probablement degut a la seva baixa taxa de divisió i a l'expressió elevada de transportadors de membrana que expulsarien els fàrmacs de l'interior cel·lular. Les cèl·lules mare tumorals solen tenir desregulades les cascades de senyalització de Wnt/Notch, Hedgehog i PTEN, característiques que poden ser utilitzades com a base per desenvolupar noves teràpies[28,35].

El PDAC es caracteritza per tenir un estroma dens i poc vascularitzat, el qual pot representar fins a un 90% del volum tumoral. L'estroma està format per components no cel·lulars, com ara col·lagen, àcid hialurònic, citocines i factors de creixement solubles; i per components cel·lulars: fibroblasts associats a tumor (essent les cèl·lules estelades la font més important d'aquests[36]), cèl·lules endotelials, cèl·lules immunosupressores (cèl·lules mieloides supressores i cèl·lules Treg) i macròfags associats a tumor[35,37].

Els fibroblasts associats a tumor (CAF) són responsables de la secreció de grans quantitats de matriu extracel·lular i expressen nivells elevats de metal·loproteases. Tot i així, el seu paper en el desenvolupament tumoral és controvertit. Mentre que alguns estudis han determinat que els CAF afavoreixen la progressió tumoral, altres estudis han conclòs que l'estroma, i especialment els CAF, reprimeixen el creixement tumoral impedint la formació de vasculatura[37].

1.2. microRNAs

Els microRNAs (miRNAs) són molècules de RNA de cadena senzilla no codificants, d'uns 20-23 nucleòtids, que actuen regulant l'expressió gènica en un ventall molt ampli de processos cel·lulars, els quals inclouen la diferenciació i proliferació cel·lulars, apoptosi i metabolisme[38,39]. El primer miRNAs va ser descobert l'any 1993 en *Caenorhabditis elegans*[40]. Des d'aleshores, el número de miRNAs anotats no ha parat de créixer. Actualment, la base de dades miRBase Release 21 (26 de juny de 2014) conté 28.645 entrades de precursors de miRNAs, dels quals s'expressen 35.828 miRNAs madurs pertanyents a 223 espècies diferents[41].

Els miRNAs s'uneixen per complementarietat de bases de tipus Watson-Crick als mRNA diana cel·lulars, bloquejant-ne la traducció i promovent-ne la desestabilització i degradació per tal d'aconseguir un silenciament gènic[39]. S'ha descrit que els miRNAs poden actuar sobre més del 60% dels gens humans codificants per proteïnes i que les seves seqüències d'aparellament estan àmpliament conservades entre les espècies[42]. Els estudis proteòmics han permès posar de manifest l'ampli impacte que té cadascun dels miRNAs en l'expressió de múltiples gens diana. Això significa que la seva desregulació té un impacte molt marcat sobre els processos cel·lulars[38,39].

1.2.1. Biogènesi dels miRNAs

Les seqüències codificants per miRNAs es poden trobar en varis contextos genòmics: poden localitzar-se formant part d'introns o exons d'un gen hoste, de manera que seran transcrits a partir del promotor del gen; o bé formar una unitat transcripcional independent amb promotor propi[43]. Alguns miRNAs formen transcrits policistrònics, indicant que els miRNAs que s'hi codifiquen requereixen una regulació coordinada en la seva funció[44].

El miRNA primari (pri-miRNA) és transcrit, habitualment, per la RNA polimerasa II, tot i que en alguns casos es porta a terme per la RNA polimerasa III. La majoria dels pri-miRNAs pateixen modificacions post-transcripcionals de *capping* i poliadenilació[39]. El pri-miRNA té una estructura de forqueta, amb un *loop* terminal i dues regions de RNA de cadena senzilla flanquejant la forqueta. El pri-miRNA és tallat pel complex

nuclear microprocessador, format per la RNasa III Drosha i per DGCR8, donant lloc al pre-miRNA. Els pre-miRNAs tenen uns 60-70 nucleòtids de llargada, estructura de forqueta i 2-3 nucleòtids penjants al seu extrem 3'[44]. En el cas dels miRNAs intrònics, aquests són processats co-transcripcionalment abans del procés d'*splicing* de l'mRNA. Alternativament, alguns miRNAs (RNAs petits intrònics no-canònics o mirtrons) són processats directament dels introns durant els processos d'*splicing*; adquireixen l'estructura del pre-miRNA sense el pas de tall de Drosha[45] (Figura 1.5).

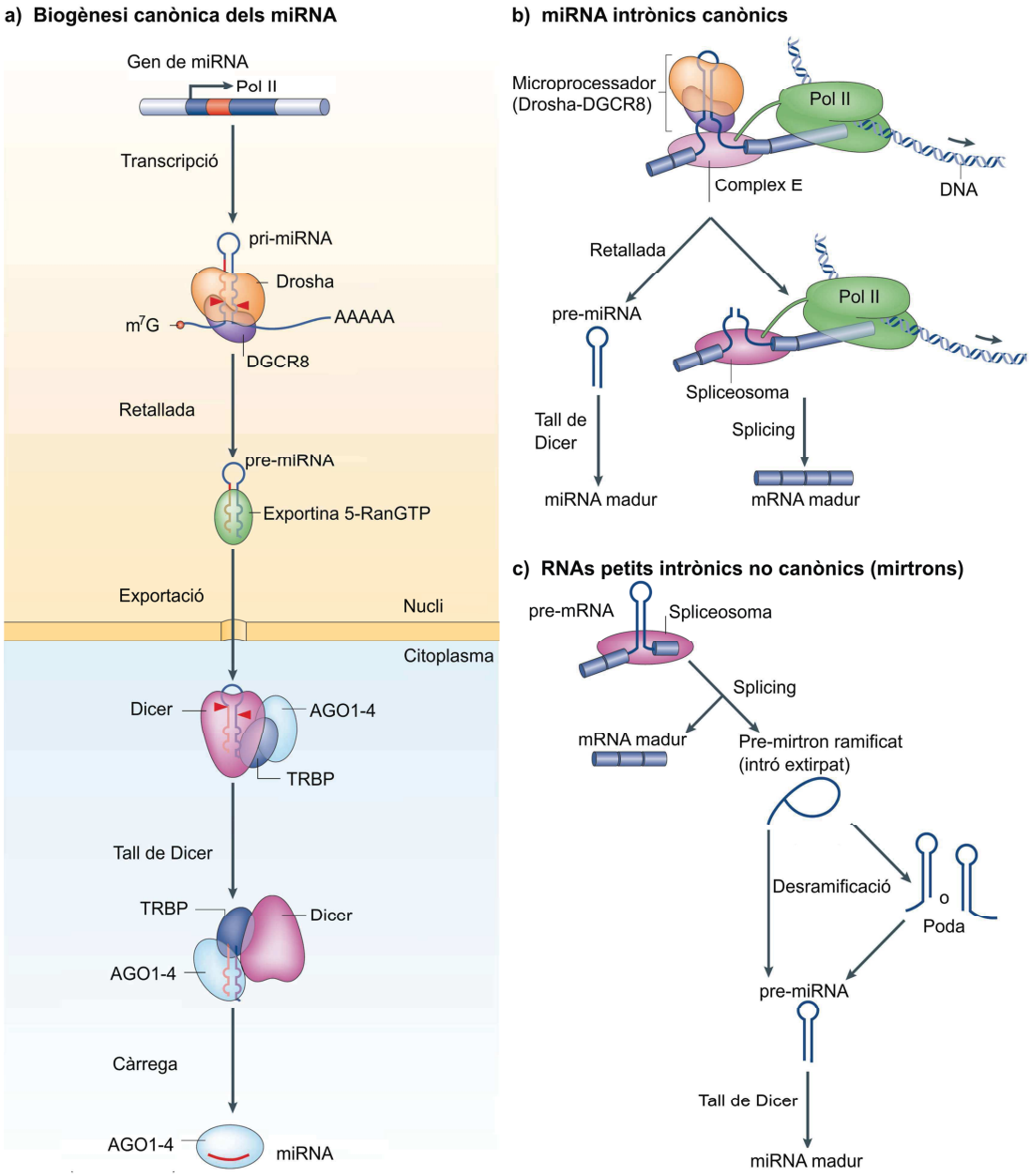


Figura 1.5. Representació esquemàtica del processos de biogènesi dels miRNAs: canònic (a), canònic de miRNAs intrònics (b) i no-canònic de mirtrons (c) (versió adaptada de Kim i col., 2009[45]).

Gràcies a l'acció de l'Exportina 5 (EXP5), formant un complex amb Ran-GTP, els pre-miRNAs són exportats del nucli cap al citoplasma de forma independent de la seqüència. L'alliberament del pre-miRNA es produeix al moment en que el GTP és hidrolitzat a GDP[39]. Un cop al citoplasma, l'RNA endonucleasa Dicer elimina el *loop* del pre-miRNA, donant lloc a un RNA de doble cadena imperfecte d'uns 22 nucleòtids[44]. A continuació, el dúplex és carregat al complex RISC, que conté les proteïnes Dicer, AGO, TRBP i PACT, i una de les cadenes del dúplex és eliminada per tal de formar el complex efector miRISC (*miRNA-induced silencing complex*) (Figura 1.5a). L'elecció de la cadena que es queda formant part del complex, anomenada cadena guia, es dóna durant el procés de càrrega del dúplex d'RNA i es regeix, principalment, en base a l'estabilitat termodinàmica dels extrems del dúplex. La cadena amb un extrem 5' terminal més inestable sol ser seleccionada com a guia. Un altre element de decisió és el primer nucleòtid de la cadena, les proteïnes AGO solen seleccionar cadenes amb el nucleòtid U a la primera posició. Aquesta elecció preferencial no implica que la cadena passatgera, la que es queda, no sigui mai carregada, però ho fa amb menys freqüència[46].

En humans existeixen quatre proteïnes AGO (AGO 1-4), les quals són responsables de la repressió de la síntesi proteica. De les quatre proteïnes AGO, només AGO-2 pot promoure la degradació directe de l'mRNA diana[38]. La funció de les proteïnes TRBP i PACT és la de facilitar la càrrega del dúplex d'RNA al complex RISC[46].

1.2.2. Reconeixement de dianes d'unió

El reconeixement de dianes d'unió dels miRNAs als mRNAs es basa en l'aparellament de bases tipus Watson-Crick i es porta a terme entre la part 5' del miRNAs, concretament a través de les posicions 2-7, anomenades llavor (*seed*), i la regió corresponent a l'mRNA anomenada regió llavor[47]. Els miRNAs s'agrupen en famílies que es caracteritzen per compartir la seqüència de la llavor, de manera que els gens sobre els quals actuen poden també ser comuns[46].

Una complementarietat de tipus Watson-Crick perfecte dóna lloc a una llavor astringent. Aquest tipus de llavor pot ser dividit en quatre categories (8mer, 7mer-m8, 7mer-A1 i 6mer) en funció de la combinació de nucleòtids a la posició 1 de la diana i

de l'aparellament a la posició 8. La categoria 8mer té una adenina a la posició 1 i un aparellament de bases a la posició 8. La categoria 7mer-A1 té una adenosina a la posició 1, mentre que la 7mer-m8 té aparellament de bases a la posició 8. La categoria 6mer no té cap d'aquestes dues característiques. L'adenina a la posició 1 permet augmentar l'eficiència de reconeixement (Figura 1.6). El segon tipus de llavor és el d'astringència moderada, en el que l'aparellament de bases no és perfecte a causa de l'existència de petits desajustos o aparellaments inestables G:U. L'existència d'un aparellament de bases addicional a la regió 3' del miRNA permet augmentar l'eficiència del reconeixement[47,48].

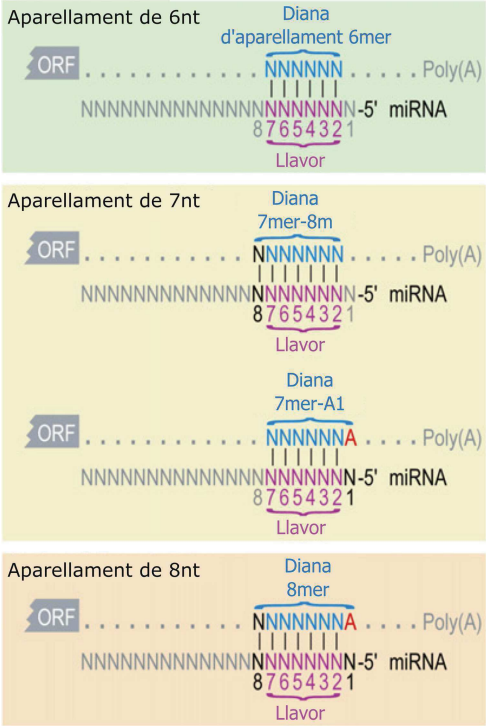


Figura 1.6. Representació de les categories d'astringència de les llavors segons el patró de complementarietat entre la seqüència del miRNA i de l'mRNA (versió adaptada de Grimson i col., 2007[48]).

Els llocs d'unió dels miRNAs es troben majoritàriament a la regió 3'UTR dels mRNAs. En 3'UTRs d'una llargada superior als 2000 nucleòtids, les regions llavor es troben sobretot als extrems, mentre que en 3'UTRs curts, els llocs d'unió tendeixen a trobar-se prop del codó stop però a una distància mínima de 15-20 nucleòtids d'aquest[47].

1.2.3. Silenciament de l'expressió gènica a través de miRNAs

El silenciament de l'expressió gènica a través de miRNAs es dóna mitjançant una inhibició de la traducció i una posterior deadenilació i degradació de l'mRNA[49].

Quan el complex miRISC s'uneix a la regió diana del miRNA també ho fa la proteïna GW182, gràcies a la interacció amb AGO. La proteïna GW182 interacciona amb la proteïna citoplasmàtica d'unió a poly-A (PABPC), de tal manera que impedeix la formació del *loop* de traducció bloquejant la unió de PABPC amb eIF4G, que està associat al cap de l'mRNA[38] (Figura 1.7). Addicionalment, la proteïna AGO2 impedeix el reclutament del factor eIF4E, a través d'un domini d'unió al cap m(7)G de l'mRNA[45].

Aquesta inhibició de la traducció precedeix una deadenilació i degradació de l'mRNA[49]. El complex AGO-GW182 recluta la maquinària de deadenilació (CAF1, CCR4 i NOT), la qual escurça la cua poly-A de l'mRNA diana. En alguns casos, l'mRNA pot ser emmagatzemat en la seva forma deadenilada i de traducció reprimida. Normalment però, els mRNAs deadenilats pateixen un procés de *decapping* per part del complex CDP1-EDC4-DDX6, que acaba promovent la seva degradació per part de l'exonucleasa XRN1[38] (Figura 1.7).

Tot aquest conjunt d'inhibicions i desestabilitzacions tenen lloc als P-bodies (*processing bodies*). Els P-bodies són focus dins del citoplasma en els que es concentren els enzims necessaris pels processos de repressió reversible i degradació dels mRNAs portats a terme per varis mecanismes, incloent els miRNAs[46,50]. Les proteïnes efectores AGO1-4, així com també GW182, els factors de deadenilació, els factors de *decapping* i els enzims de degradació d'RNA es troben en aquests cossos[50]. Alguns mRNAs poden escapar dels P-bodies i reiniciar la seva traducció, de manera que la repressió per miRNAs és reversible[46].

El reconeixement perfecte entre el miRNAs i l'mRNA causa la degradació de l'mRNA per part d'AGO2. Tot i així, aquest reconeixement perfecte es dóna rares vegades en animals, en la que la major part de les unions no tenen complementarietat perfecta[38].

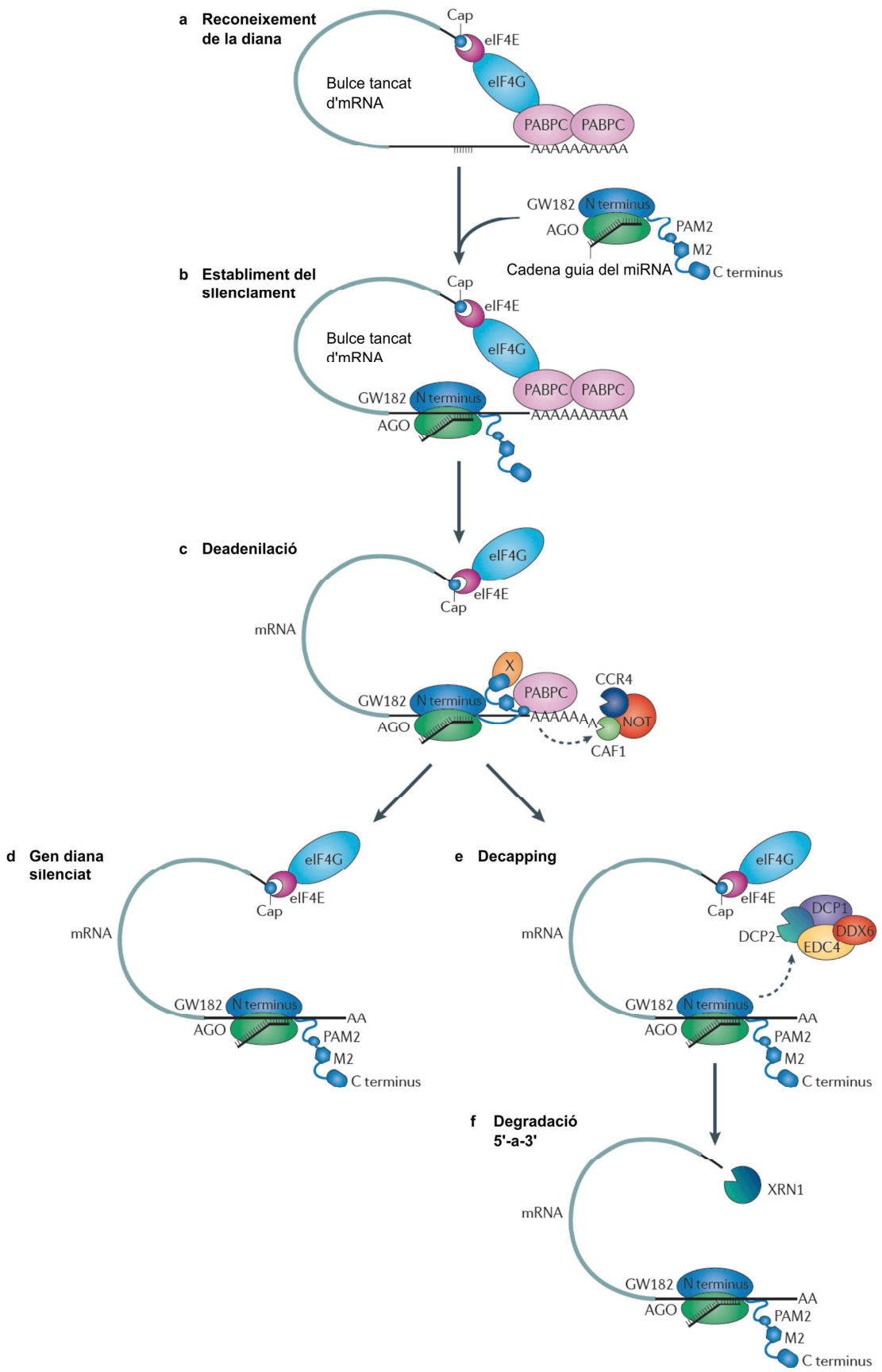


Figura 1.7. Representació esquemàtica del procés dels mecanismes de silenciament de l'expressió gènica a través de miRNAs (versió adaptada de Huntzinger i Izaurralde, 2011[38]).

1.2.4. miRNAs en càncer

Els miRNAs afecten l'expressió d'un número elevat de gens i cooperen en la coordinació de múltiples processos cel·lulars. Per això, la desregulació de l'expressió dels miRNAs contribueix en el desenvolupament de patologies, incloent el càncer. De fet, s'està veient que els miRNAs són uns elements de regulació molt importants en el control dels processos carcinogènics[51].

S'ha observat que l'expressió desregulada de miRNAs en cèl·lules tumorals, permet crear uns perfils d'expressió identificadors del tipus de neoplàsia, així com també de la prognosi d'aquesta. Aquest fet, junt amb la seva estabilitat en teixits i fluids, els fan unes eines molt útils pel diagnòstic i pronòstic de les neoplàsies a partir de mostres molt diverses (biòpsies, mostres d'aspiració amb agulla fina, sèrum, mostres en parafina...)[51,52].

En general, tot i que l'expressió d'alguns miRNAs es veu augmentada, la disminució de l'expressió dels miRNAs és un fenomen comú en diferents tipus de càncer. Els motius que es proposen per aquesta disminució generalitzada són la repressió de l'expressió per part de factors de transcripció oncogènics, com ara MYC; o bé pels nivells reduïts i activitats alterades que s'han observat pels components de la via de biosíntesi dels miRNAs en càncer[51,53]. Altres factors que poden contribuir en la desregulació dels miRNAs en càncer són el guany, pèrdua o translocació de regions cromosòmiques, l'expressió i activació aberrant de factors de transcripció i les alteracions epigenètiques[54].

Els miRNAs desregulats en càncer poden ser dividits en supressors de tumors i oncogènics, segons si regulen proteïnes amb activitat pro-tumoral o antitumoral[51] (Figura 1.8). Per exemple, la família de miRNAs Let-7, que regula negativament l'expressió de *Ras*, es troba menys expressada en tumors a causa d'una deleció gènica o a causa de la inactivació del promotor per metilació. En canvi, el clúster miR-17-92 es troba sobreexpressat en càncer a causa de l'acció de l'oncogen *MYC*. Alguns dels seus components poden induir la proliferació cel·lular, inhibir l'apoptosi i actuar de forma cooperativa amb MYC[51,53].

1.2.4.1. miRNAs en càncer de pàncrees

El grup del Dr. Schumittgen va ser el primer de crear un perfil d'expressió de miRNAs per PDAC. Els autors varen identificar els miR-376a i miR-301 com a específicament sobreexpressats en PDAC, i els miR-155, miR-21, miR-221 i miR-222 com a sobreexpressats en PDAC i altres tumors[55]. El miR-21 presenta un fort augment de la seva expressió en el 80% dels casos de PDAC, la qual es correlaciona amb una pitjor supervivència dels pacients[56].

Més endavant, Szafranska i col. varen identificar els miR-216 i miR-217 com a potencials biomarcadors de PDAC, ja que la seva expressió és pàncrees específica i es troben absents o mínimament expressats en mostres i línies cel·lulars de PDAC. A més, els autors varen identificar el miR-217 i miR-196 com a discriminadors entre pàncrees sa, pancreatitis crònica i PDAC[54,57]. Els miR-148a i miR-148b presenten també una expressió disminuïda en PDAC i correlacionen amb la supervivència dels pacients[58,59]. És important destacar la desregulació dels miRNAs supressors de tumors miR-96 i el miR-34 en PDAC. El miR-96 actua regulant l'expressió de *KRAS*, mentre que el miR-34, l'expressió del qual està directament regulada per p53, actua inhibint les cèl·lules mare tumorals de PDAC a través de la regulació de la via de Notch[58,60]. Recentment, s'ha determinat també que els miR-16, miR-548d-3p, miR-320 i, especialment, el miR-93 mostren una elevada precisió discrimitiva per PDAC[52].

Existeixen múltiples estudis de seqüenciació de miRNAs a gran escala que han permès crear perfils d'expressió per PDAC, però també s'han portat a terme estudis de perfils d'expressió per lesions pre-malignes PanIN i IPMN. En teixits humans s'ha observat que l'expressió dels miR-21, miR-221, miR-222 i Let-7a augmenta amb el grau de PanIN, mentre que les lesions IPMN es caracteritzen per una clara sobreexpressió dels miR-21 i miR-155[52,54]. L'estudi de Vila-Navarro E. i col. va observar que el PDAC i les lesions IPMN compartien 325 miRNAs desregulats, un fet indicatiu de que l'expressió aberrant de miRNAs és un esdeveniment primerenc en el desenvolupament del càncer de pàncrees[52].

Igual que en altres neoplàsies, el conjunt de miRNAs desregulats en PDAC té una contribució molt important en la regulació del conjunt de vies alterades en aquest càncer: control del cicle cel·lular, senyalització per KRAS, apoptosi, senyalització per la via de Wnt/β-catenina, Hedgehog, TGF-β, etc[61].

1.2.5. miRNAs en infeccions virals

Quan un virus infecta una cèl·lula es crea una complexa xarxa d'interaccions caracteritzada per una profunda remodelació de l'expressió dels gens cel·lulars, tant a nivell de mRNAs[62,63] com a nivell de miRNAs. Els canvis en el perfil d'expressió de miRNAs cel·lulars ha estat observat en infeccions amb diversos virus: adenovirus[64–67], virus del grip[68,69], HIV-1[70], virus Epstein-Barr (EBV)[71,72], citomegalovirus humà (HCMV)[73], virus de l'herpes tipus 1 (HSV-1)[74], etc. Només amb l'observació d'aquests canvis al perfil d'expressió és complicat esbrinar quin paper té la desregulació d'un miRNA concret: ajudar al sistema immune en la resposta antiviral o bé ajudar al virus a modular l'ambient cel·lular per fer-lo favorable a la seva replicació. Les comparacions entre infeccions amb diferents virus ajuden a establir patrons comuns de desregulació que permeten hipotetitzar sobre la funció de la desregulació dels diferents miRNAs.

La desregulació causada per la infecció adenoviral ha estat analitzada en varies situacions: en cèl·lules humanes epitelials de laringe infectades amb adenovirus tipus 3[64], en cultius primaris de fibroblasts pulmonars humans infectats amb adenovirus tipus 2[65], i en cèl·lules de càncer de pròstata infectades amb adenovirus tipus 5[67]. En la infecció amb adenovirus tipus 2 es va observar que es produeix una desregulació progressiva del perfil d'expressió de miRNAs a mesura que avança el cicle viral. Aquests canvis d'expressió presentaven un patró invertit en diferents moment del cicle viral: al principi de la infecció, la desregulació es caracteritzava per la sobreexpressió d'alguns miRNAs, mentre que a fases més tardanes es produïa una disminució generalitzada de l'expressió dels miRNAs[65]. Aquesta disminució de l'expressió de miRNAs a mesura que avança la infecció també es produeix en una infecció amb adenovirus tipus 5 i possiblement sigui deguda a l'expressió dels VA RNAs codificats pel virus, els quals poden competir amb el processament dels miRNAs endògens de la cèl·lula[66].

Tant en la infecció amb l'adenovirus tipus 2 com tipus 5 es va trobar el miR-155 sobreexpressat[65,66], un efecte que també es produeix en les infeccions amb virus de l'estomatitis vesicular (VSV)[75] i EBV[72], i en macròfags en resposta a l'activació de l via de l'interferó[76]. Així doncs, el conjunt de resultats suggeriria que el miR-155 actuaria com un miRNA antiviral. En contraposició, el miR-132, l'expressió del qual s'indueix en infeccions amb adenovirus[65,66], HSV, KSHV i HCMV, actuaria reprimint l'expressió dels gens de resposta a l'interferó i per tant, estaria facilitant la replicació viral[77].

El virus de l'herpes tipus 1 (HSV-1) també provoca canvis en el perfil d'expressió dels miRNAs cel·lulars. La inducció que produeix de l'expressió del miR-23a i del miR-649 li permeten antagonitzar la resposta antiviral disminuint l'expressió dels gens diana *IRF1* i *MALT1*, implicats en la via de senyalització de resposta antiviral[74,78]. Per altra banda, la proteïna ICP4 del mateix virus indueix l'expressió del miR-101, el qual limita la replicació del virus per assegurar la supervivència de la cèl·lula i obtenir una infecció persistent[79]. El virus de l'hepatitis C (HCV) i el virus del grip també indueixen l'expressió de miRNAs concrets per tal de frenar la resposta antiviral. El primer fa augmentar l'expressió del miR-21 per inhibir la producció d'interferó de tipus I[80], mentre que el segon activa l'expressió del miR-485 que inhibeix l'expressió del sensor citosòlic de RNA viral RIG-1[68]. L'HIV-1 actua de forma contraria, reprimeix l'expressió de dos miRNAs cel·lulars que perjudiquen la replicació del virus, el miR-17 i el miR-20a[81]. En les cèl·lules infectades amb el virus Reolysin, un reovirus salvatge que està essent testat pel tractament de diversos càncers[82], s'ha observat també la modulació d'alguns miRNAs, amb una disminució clara de l'expressió del Let-7d. Aquesta desregulació facilita una infecció productiva i la mort per apoptosi de les cèl·lules infectades[83].

Semblaria doncs, que els virus tendeixen a afavorir l'expressió d'aquells miRNAs que d'alguna forma poden facilitar la replicació viral i a disminuir l'expressió dels que actuen interferint-hi.

.

1.3. Viroteràpia oncolítica

La viroteràpia oncolítica és una teràpia experimental basada en l'ús de virus replicatius per aconseguir la destrucció de cèl·lules tumorals sense afectar les cèl·lules sanes. L'acció de l'agent viral, a part de la lisi cel·lular, tindrà dues conseqüències principals: la replicació del virus i per tant, una amplificació del tractament; i l'alliberament d'antígens tumorals que en alguns casos pot facilitar el desenvolupament d'una resposta immune antitumoral[84] (Figura 1.8).

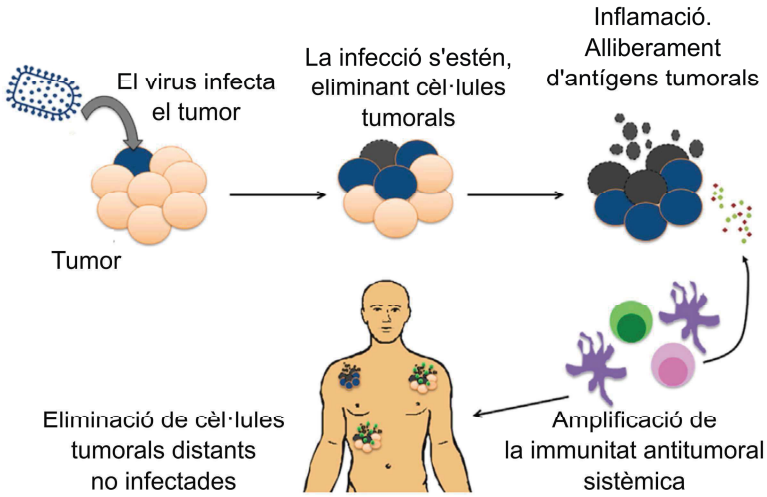


Figura 1.8. Paradigma de la viro-immunoteràpia. El virus infecta i es replica de forma selectiva en cèl·lules tumorals, induint la generació de nous virions, la lisi cel·lular i l'alliberament d'antígens de tumor que pot contribuir al desenvolupament d'una immunitat antitumoral sistèmica (versió adaptada de Russell i Peng, 2017[84]).

Alguns virus utilitzats en viroteràpia tenen una capacitat oncoselectiva natural. Aquest és el cas dels reovirus, uns virus de dsRNA que repliquen preferencialment en cèl·lules transformades perquè el seu cicle depèn de l'activació de la via de Ras. Actualment, el reovirus salvatge Reolysin està essent testat com a agent antiviral en assajos clínics per càncer de pàncrees, pulmó, ovari, melanoma, etc.[85,86] Altres virus, que no presenten un tropisme natural per tumors, requereixen de modificacions genètiques per tal d'evitar la seva replicació en cèl·lules sanes. Dins d'aquest últim

grup de virus cal remarcar-ne tres pel nombre d'assajos clínics en que estan essent provats: l'herpes simple tipus 1 (HSV-1), testat en assajos clínics per melanoma, glioma, mesotelioma, càncer de pàncrees i de mama; el vaccinia virus, testat en assajos clínics per melanoma, càncer colorectal, de pulmó, hepatocarcinoma, i altres tumors sòlids; i l'adenovirus, àmpliament testat en assajos clínics per càncer de pulmó, de pàncrees, colorectal, d'ovari, de ronyó, de bufeta, de pròstata, sarcoma i glioma[85].

És important destacar la comercialització de dos virus pel tractament de neoplàsies. El primer va ser l'adenovirus Oncorine (H101), aprovat a la Xina l'any 2005 pel tractament de tumors de cap i coll i càncer d'esòfag. L'Oncorine presenta una deleció al gen *E1B-55*, que li confereix selectivitat tumoral. El segon va ser el T-Vec, un HSV-1 aprovat per la FDA l'octubre de 2015 i per l'EMA el gener de 2016 pel tractament de melanoma avançat. El T-Vec, que té les dues còpies del gen γ-34.5 truncades per atenuar-lo, va ser modificat per tal de que induís una bona resposta immune antitumoral mitjançant la deleció del gen viral *ICP47*, que suprimeix la presentació d'antígens en cèl·lules infectades, i la incorporació de dues còpies del gen del *GM-CSF* per tal d'estimular l'activació i diferenciació de cèl·lules presentadores d'antígens presents al tumor[84,86].

1.4. Adenovirus

Els adenovirus són virus animals, de doble cadena de DNA, mida mitjana, icosaèdrics i sense envolta que varen ser aïllats per primera vegada l'any 1953 a partir de glàndules adenoides humanes[87]. Des d'aleshores han estat aïllats a partir d'una multitud d'hostes vertebrats. Encara que alguns adenovirus humans i animals poden causar malalties, i fins i tot la mort, la major part no són patogènics en individus sans[88].

Pertanyents a la família *Adenoviridae*, els adenovirus es divideixen en quatre gèneres: *Mastadenovirus*, *Aviadenovirus*, *Atadenovirus* i *Siadenovirus*; essent el primer el que agrupa els adenovirus humans. Dins de cada gènere, els adenovirus s'agrupen en espècies, anomenades d'acord amb el primer hoste que se'ls va descriure i una lletra. Per humans, hi ha sis espècies d'adenovirus, denominades HAdVA – HAdVF, de les quals la C, i especialment els serotips 2 i 5, han estat els més estudiats[88].

1.4.1. Estructura del virió

El virió adenoviral té una càpsida proteica pseudo-icosaèdrica d'uns 70-90nm de diàmetre que està composta per un total de 14 proteïnes diferents, en el cas de l'HAdV-C5, essent l'hexó, el pentó i la fibra les proteïnes majors. La càpsida conté un total de 240 capsòmers trimèrics de la proteïna hexó i 12 capsòmers que ocupen els vèrtex de l'icosaedre formats per dos components: la base del pentó, que és un pentàmer de 5 molècules de polipèptid del pentó (proteïna III) i un trímer del polipèptid de la fibra (proteïna IV) que en sobresurt[88,89]. Les fibres, de llargada entre 9 i 77,5nm, segons l'espècie, estan formades per tres parts: la part d'ancoratge a la càpsida, anomenada *tail*; un eix, el *shaft*, i un domini globular al final, el *knob*. Aquests tres components principals, juntament amb altres proteïnes estructurals (pIIIa, pVI, pVIII i pIX), creen una coberta de protecció pel nucli viral, format pel DNA, acomplexat a cinc polipèptids diferents (V, VII, mu, IVa2 i TP) i la proteasa viral[88,90] (Figura 1.9).

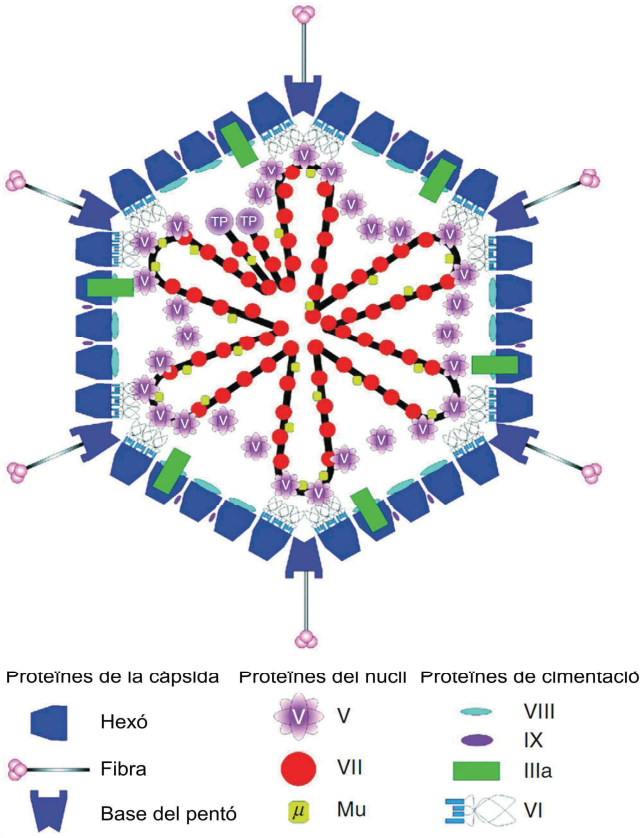


Figura 1.9. Representació esquemàtica de l'estructura del virió adenoviral. S'hi distingeixen els components principals i minoritaris de la càpsida així com també el DNA i les proteïnes del nucli viral (versió adaptada de Encyclopedia of Virology, 3rd Edition, 2008[90]).

1.4.2. Estructura i organització del genoma

El genoma adenoviral està format per una doble cadena de DNA lineal d'entre 26 i 45Kb, segons l'espècie; essent de 36Kb el de l'HAdV-2 i el de l'HAdV-5. Als extrems del genoma s'hi localitzen les seqüències ITR (*inverted terminal repeat*), a les quals s'hi uneix de forma covalent la proteïna TP. Adjacent a la ITR s'hi localitza la seqüència d'empaquetament del genoma, la qual permet introduir el genoma a la càpsida durant la formació dels nous virions[88].

El genoma dels adenovirus es caracteritza per tenir una alta densitat de seqüències codificants, localitzades a les dues cadenes del genoma i superposades entre elles. A més, la majoria de les unitats transcripcionals adenovirals són policistròniques, permetent l'expressió de múltiples seqüències codificants a través de mecanismes d'*splicing* alternatiu. D'aquesta manera, és possible que l'HAdV-2 codifiqui més de 40 proteïnes diferents en un genoma de mida reduïda[87].

La transcripció dels gens adenovirals la porta a terme la polimerasa II cel·lular. En funció del moment temporal de la infecció en què són expressades, les unitats transcripcionals adenovirals poden ser classificades en[87] (Figura 1.10):

- Immediatament primerenca (*Immediate early*) – la primera unitat transcripcional a ser expressada és la d'*E1A*, ja que requereix únicament de proteïnes cel·lulars per fer-ho. E1A estimularà l'expressió de les altres unitats transcripcionals.
- Primerenques (*Early*) – inclou les unitats transcripcionals *E1B*, *E2*, *E3* i *E4*.
- Intermèdies (*Intermediate*) – inclou les unitats transcripcionals *IX* i *IVa2*.
- Tardanes (*Late*) – cinc unitats transcripcionals (*L1* a *L5*) són expressades a fases més tardanes de la infecció gràcies a l'activació del promotor tardà major, o *Major Late Promoter* (MLP). Algunes de les proteïnes codificades en aquestes unitats transcripcionals formaran la part estructural del virió.

A part d'aquestes unitats transcripcionals, els adenovirus contenen dos RNA no codificants que són transcrits per la polimerasa III cel·lular, els VA RNA-I i II[88].

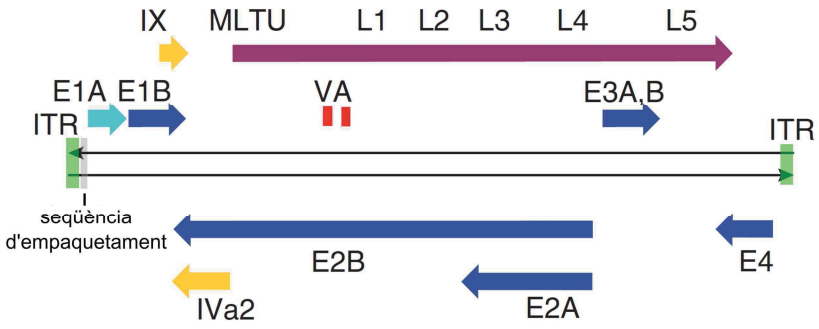


Figura 1.10. Representació esquemàtica de l'organització del genoma adenoviral (*Mastadenovirus*). S'hi distingeixen les unitats transcripcionals immediatament primerenca *E1A*, en blau clar; les primerenques, en blau fosc; les intermèdies, en groc; les tardanes, en morat; i els VA-RNAs, en vermell. També s'hi mostren les seqüències ITR, en verd; i la seqüència d'empaquetament del genoma, en gris (versió adaptada de Encyclopedia of Virology, 3rd Edition, 2008[90]).

1.4.3. El cicle viral infectiu

Els adenovirus presenten un cicle viral infectiu lític. A les primeres fases, el virus entra a la cèl·lula, el nucli viral és transportat fins al nucli cel·lular i s'expressen les

proteïnes immediatament primerenca i primerenques, les quals permetran que el virus prengui control dels mecanismes cel·lulars i repliqui el seu genoma. Més endavant en el cicle adenoviral, s'expressaran les proteïnes codificades a les unitats transcripcionals tardanes. A partir d'aquest moment es començaran a formar, per assemblatge de les càpsides i empaquetament del genoma, els nous virions, que aniran sortint de forma progressiva de la cèl·lula fins a causar-ne la lisi.

1.4.3.1. Unió i internalització del virió

Per tots els adenovirus, la primera interacció amb la cèl·lula hoste es dóna a través del domini *knob* de la fibra. Els adenovirus humans de les espècies A, C, E i F s'uneixen a la cèl·lula a través del receptor CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*), que conté dos dominis extracel·lulars de tipus immunoglobulina i s'expressa en una varietat de tipus cel·lulars. A continuació, es produeix una segona interacció entre el pèptid RGD de la proteïna del pentó i les integrines cel·lulars[88]. A conseqüència d'aquestes interaccions, el virus és internalitzat a la cèl·lula per endocitosi mitjançada per vesícules de clatrina[91] (Figura 1.11).

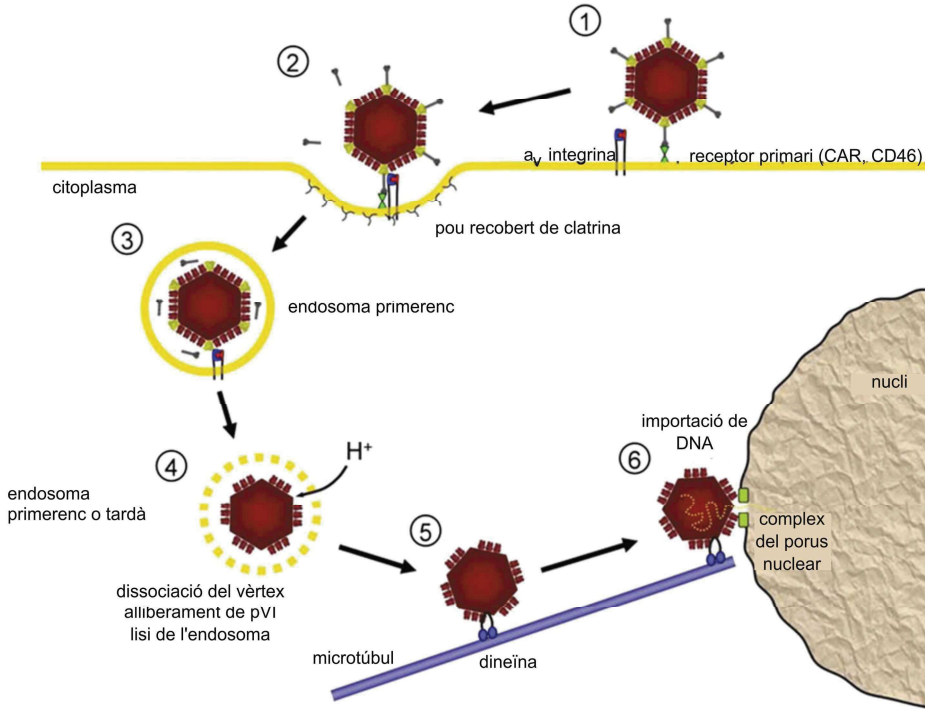


Figura 1.11. Representació esquemàtica de la interacció, entrada i transport a través del citoplasma d'una partícula adenoviral (versió adaptada de Nemerow i col., 2009[92]).

A mesura que l'endosoma s'acidifica, la càpsida del virió pateix canvis conformacionals que causen l'alliberament de les proteïnes fibra i VI, entre d'altres. La proteïna VI serà la responsable de lisar l'endosoma i permetre l'alliberament del virió al citoplasma cel·lular[88]. Unit als microtúbuls, gràcies a la interacció de les proteïnes de l'hexó amb les dineïnes, el virió és transportat cap als porus del nucli mentre va patint la pèrdua de més proteïnes estructurals[92]. Finalment, el genoma de l'adenovirus unit a les proteïnes que l'embolcallen entra al nucli a través dels porus nuclears, una acció possiblement guiada pel senyal de localització nuclear d'alguna de les proteïnes adenovirals[87] (Figura 1.11).

1.4.3.2. Expressió de les proteïnes primerenques

La primera unitat transcripcional adenoviral que s'expressa és *E1A*. Gràcies a l'*splicing* alternatiu, aquesta unitat transcripcional codifica per cinc transcrits: 13S, 12S, 11S, 10S i 9S. D'aquests, els productes majors d'E1A (derivats dels transcrits 13S i el 12S) s'expressen en major mesura a l'inici de la infecció i les funcions principals de les proteïnes que se'n deriven són activar l'expressió dels altres gens adenovirals, així com també fer entrar la cèl·lula en fase S mitjançant el segrest de pRb i alliberant E2F. Els productes majors d'E1A actuen transactivant l'expressió de la pròpia unitat, activant l'expressió d'*E3* i contribuint a augmentar l'expressió d'*E1B* i *E2*, expressió del qual és activada per E2F. E1A també actua reprimint l'expressió de diversos gens cel·lulars a través del segrest de l'acetilasa d'histones p300/CBP[87]. La proteïna E1A-55R, derivada de la isoforma 9S, s'expressa a fases més tardanes de la infecció i té la funció d'activar l'expressió dels gens virals i promoure una replicació del virus productiva[93] (Figura 1.12).

L'entrada en fase S induïda per E1A genera una acumulació de p53, la qual intenta arrestar el cicle cel·lular i fer entrar la cèl·lula en apoptosi. Les proteïnes codificades per la unitat transcripcional *E1B*, juntament amb algunes isoformes de *E3* i *E4*, participen en el bloqueig d'aquest procés d'apoptosi desencadenat per E1A i per la resposta cel·lular a una infecció viral[87]. El complex E4Orf6-E1B55K interacciona amb p53 i en promou la degradació[94], mentre que E1B-19K interacciona amb Bax per impedir la pèrdua de potencial de membrana dels mitocondris[94]. Una altra funció que desenvolupa el complex E4Orf6-E1B55K és la d'afavorir l'exportació dels mRNAs virals del nucli al citoplasma en detriment de l'exportació dels mRNAs cel·lulars[95].

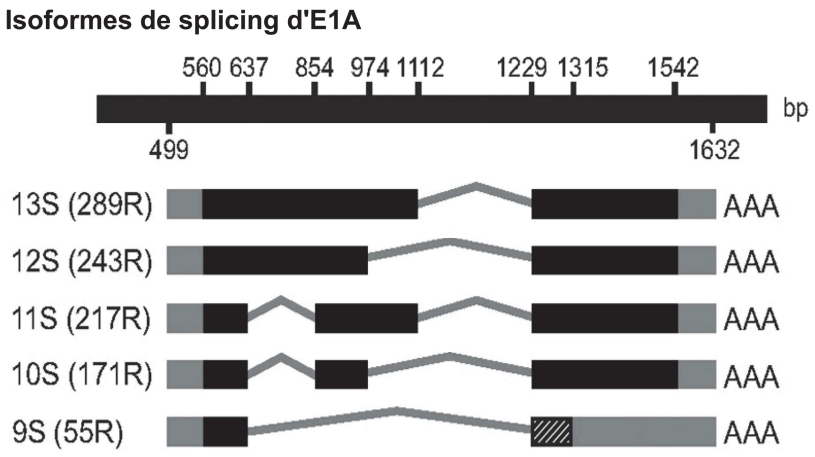


Figura 1.12. Representació esquemàtica de les cinc isoformes de *splicing* del gen immediatament primerenc *E1A*. Entre parèntesis es detallen les proteïnes que deriven (versió adaptada de Miller i col., 2012[93]).

La unitat transcripcional *E2*, subdividida en *E2A* i *E2B*, codifica per proteïnes essencials per la replicació del genoma adenoviral: la polimerasa de DNA, la proteïna pre-terminal (pTP) i la proteïna d'unió a DNA de cadena senzilla (DBP). Els productes genètics derivats de la unitat transcripcional *E3* tenen un paper important en el control de la resposta immunitària. La proteïna E3gp19K impedeix el transport del complex major d'histocompatibilitat I a la membrana cel·lular, evitant el reconeixement i lisi de la cèl·lula infectada per part de limfòcits T[87]. També amb l'objectiu de frenar la resposta antiviral, els VA RNAs impedeixen l'acció de PKR, la qual s'activa per acumulació d'RNA de doble cadena i bloqueja la traducció proteica[96].

La unitat transcripcional *E4* codifica fins a set proteïnes amb funcions diverses. És necessari destacar la funció d'E4Orf4, la qual s'uneix a la fosfatasa PP2A i indueix la desfosforilació de varis productes virals i cel·lulars, incloent els factors d'*splicing* SR. L'expressió d'*E4* i la subseqüent hipofosforilació dels factors SR facilita la regulació de l'*splicing* alternatiu dels gens adenovirals[97].

1.4.3.3. Replicació del genoma

La replicació del genoma adenoviral és un procés molt eficient. En un període de 40 hores, una cèl·lula infectada pot produir entre 10.000 i un milió de còpies de DNA viral. El procés de replicació del genoma requereix de tres proteïnes adenovirals: la

polimerasa, la proteïna precursora terminal (pTP) i la proteïna d'unió a DNA de cadena senzilla (DBP); i de tres proteïnes cel·lulars: els factors de transcripció cel·lulars NFI i Oct-1, que exacerben l'inici de la replicació, i la topoisomerasa I[88,98].

El procés de replicació s'inicia als orígens de replicació viral, presents als dos extrems del genoma, on es forma un complex amb la proteïna pTP i la polimerasa. Un cop iniciada la còpia del DNA, la pTP es queda ancorada a l'extrem 5' del genoma i la polimerasa segueix amb el procés d'elongació, en el qual passen a ser necessàries la DBP, per protegir el DNA de cadena senzilla de l'atac de nucleases, i la topoisomerasa I[87,88].

1.4.3.4. Expressió de les proteïnes tardanes

A mesura que avança la infecció, el virus necessita expressar la unitat transcripcional tardana regulada a partir *Major Late Promoter* (MLP) i que gràcies a l'*splicing* alternatiu codifica per més de 20 proteïnes, entre les quals es troben les proteïnes estructurals del virió. Tots els mRNAs derivats del MLP contenen la seqüència *tripartite leader* al seu extrem 5'. Aquesta seqüència està formada per tres exons, d'uns 200pb en total, que no són traduïts però faciliten l'entrada del ribosoma als mRNAs[87].

Tot i que la màxima activació del MLP es produeix després de la replicació del DNA viral, en fases més inicials de la infecció, gràcies a l'acció d'E1A, es produeix una lleu transcripció que no s'estén fins més enllà del transcrit *L1*[87,99]. Els mRNAs de la unitat transcripcional *L4* són expressats a partir de dos promotors segons el moment de la infecció. Les proteïnes adenovirals E1A, E4Orf3 i IVa2, i la proteïna cel·lular p53 són les responsables de l'activació d'un promotor propi de L4 (L4P). Aquesta activació permetrà l'expressió de les proteïnes L4-22K i L4-33K, que activaran un *feedback* negatiu per silenciar el L4P, facilitaran l'activació del MLP i actuaran afavorint els transcrits amb acceptors d'*splicing* més febles (normalment els distants de l'acceptor 5'). Així doncs, més tard en la infecció, els mRNAs de *L4* són expressats a partir del MLP igual que els altres gens tardans[99].

1.4.3.5. Formació i alliberament dels nous virions

L'última etapa del cicle viral infectiu dels adenovirus és la formació i alliberament de partícules madures. El DNA és copiat al nucli, mentre que les proteïnes adenovirals són sintetitzades al citoplasma. Així doncs, és necessari que aquestes siguin importades a l'interior nuclear per tal de que es doni l'empaquetament.

La formació de nous virions adenovirals es produeix seguint una seqüència de passos concrets. El primer consisteix en l'assemblatge de les proteïnes majoritàries i minoritàries de la càpsida amb l'ajuda d'altres proteïnes virals que fan de bastida. A continuació, es produeix la inserció del genoma viral a les càpsides buides, presumiblement a través d'un portal situat en un dels vèrtex de la càpsida. Aquesta inserció és facilitada pel reconeixement de la seqüència d'empaquetament, adjacent a la ITR dreta, per part de les proteïnes virals empaquetadores IVa2, L1-52.55K, L4-22K i L4-33K. Les proteïnes del nucli viral pV, pVII i mu són incorporades durant o després de l'empaquetament del genoma, mentre que les proteïnes que actuen de bastida i les proteïnes L4-22K i L4-33K són eliminades de la partícula viral durant el procés. Finalment, la proteasa adenoviral realitza un tall als seus substrats (pIIIa, L1-52.55K, pVI, pVII, pVIII, mu i pTP), el qual té com a resultat un canvi conformacional de la càpsida essencial per la infectivitat dels virions[87–89].

A mesura que es formen els nous virions, les cèl·lules infectades presenten un efecte citopàtic més marcat, caracteritzat per una morfologia arrodonida a causa de remodelacions del citoesquelet. Tot i que l'alliberament de les partícules virals es vagi produint paulatinament a mesura que es formen, aquest no és completament eficient fins que actua la proteïna E3-11.6K ADP (*Adenovirus Death Protein*), la qual indueix la lisi cel·lular al final del cicle[87,88].

1.5. Disseny d'adenovirus oncolítics

Els adenovirus no presenten un tropisme natural per les cèl·lules tumorals, de manera que és necessari modificar-los perquè no afectin les cèl·lules sanes de l'organisme al qual s'administren. Actualment, el desenvolupament d'adenovirus oncolítics busca l'obtenció de virus selectius però també amb una capacitat antitumoral superior.

1.5.1. Estratègies de direccionament a tumor

Les estratègies de direccionament a tumor poden ser classificades en tres grans grups: estratègies de modificació del tropisme adenoviral natural, estratègies de control dels gens virals (transcripcional, post-transcripcional o traduccional), i estratègies de supressió de funcions de gens virals que són complementades als tumors.

1.5.1.1. Modificació del tropisme adenoviral

Les estratègies de modificació del tropisme dels adenovirus, o de *targeting* transduccional, es basen en evitar les interaccions naturals d'aquests virus amb els receptors cel·lulars (*detargeting*) i redirigir-los cap a les cèl·lules tumorals (*retargeting*).

Aquestes estratègies inclouen l'ablació del domini d'unió de la proteïna al receptor canònic CAR[100], habitualment poc expressat en cèl·lules tumorals[101]; la substitució de la fibra o parts d'aquesta per fibres d'altres serotips adenovirals i la inserció a les proteïnes de la càpsida (fibra, hexó i base del pentó) de pèptids, anticossos o molècules adaptadores bi-específiques per dirigir l'entrada únicament a cèl·lules tumorals[102,103]. D'entre els lligands incorporats a la fibra és necessari destacar el pèptid RGD, el qual va ser inserit a la regió *knob* de la fibra per facilitar l'ús de les integrines, habitualment sobreexpressades en tumors sòlids, com a receptor primari i per tant, una entrada independent de CAR[101].

1.5.1.2. Control de l'expressió de gens virals

El control de l'expressió dels gens virals pot donar-se a tres nivells d'actuació: transcripcional, post-transcripcional i traduccional.

La regulació a nivell transcripcional es basa en la substitució del promotor salvatge del gen *E1A* per un promotor específic de tumor, és a dir, un promotor que en cèl·lules tumorals es trobi més actiu que en cèl·lules sanes. Aquest és el cas, per exemple, del promotor de la ciclooxigenasa-2 (*COX-2*)[104], del promotor de la telomerasa (*hTERT*)[105] o del promotor del gen *uPAR*[106]. Aquests promotors poden ser modificats per incorporar seqüències de resposta a vies de senyalització activades en cèl·lules mare tumorals, com ara seqüències de resposta a la via de Notch[107]. El promotor del gen *E1A* també ha estat modificat amb la incorporació de caixes d'unió del factor E2F, de manera que es pot aconseguir una repressió o activació de la transcripció segons si E2F està unit a retinoblastoma (cèl·lules sanes) o lliure (cèl·lules tumorals)[108].

A nivell post-transcripcional, una de les estratègies utilitzades ha estat la incorporació de dianes d'unió per miRNAs d'expressió disminuïda en tumors i elevada en cèl·lules sanes a les regions 3'UTR dels gens *E1A*[109,110] i *L5* (fibra)[111]. Una altra estratègia de control post-transcripcional ha estat l'addició d'elements rics en AU (ARE) a la regió 3'UTR del gen *E1A*, els quals estabilitzen l'mRNA en un ambient tumoral i el desestabilitzen en una cèl·lula sana[112].

Recentment, s'ha descrit la possibilitat de controlar la replicació adenoviral a nivell de traduccional mitjançant la inserció d'elements CPE al 3'UTR del gen *E1A*, elements reconeguts per les proteïnes CPEB i que permeten activar la traducció de l'mRNA en cèl·lules tumorals i reprimir-la en cèl·lules no transformades[113].

1.5.1.3. Supressió de la funció de gens virals

Els adenovirus, per poder-se replicar, necessiten forçar l'entrada de la cèl·lula en fase S. Per aconseguir-ho inhibeixen p53 i pRb, les quals acostumen a trobar-se inactives en cèl·lules tumorals. Les funcions virals encarregades de la inhibició dels mecanismes d'acció d'aquestes proteïnes són redundants en cèl·lules tumorals i, per tant, poden ser eliminades del virus i que la replicació només es vegi impedida en cèl·lules sanes.

L'adenovirus ONYX-015 incorpora una mutació a *E1B-55K* que li impedeix unir-se i inactivar p53, conferint-li a l'adenovirus selectivitat tumoral. Tot i així, aquest mecanisme de selectivitat ha estat qüestionat recentment i s'ha determinat que la selectivitat de l'ONYX-015 vindria donada per una exportació diferencial dels mRNAs virals tardans entre cèl·lules sanes i tumorals[113].

Per altra banda, per aconseguir adenovirus de replicació selectiva en cèl·lules defectuoses per la via de retinoblastoma (Rb) es va proposar mutar la regió CR2 de la proteïna E1A, encarregada d'unir-se a pRb i alliberar E2F. Aquesta mutació va ser anomenada Δ24[113]. Tot i aquesta mutació, els virus E1A-Δ24 no presenten una selectivitat completa, ja que la regió CR1 de la proteïna E1A i la proteïna E4Orf6/7 també participen en l'activació del cicle cel·lular[87].

1.5.2. Estratègies per augmentar la potència oncolítica

Apart de desenvolupar adenovirus selectius que puguin ser administrats de forma sistèmica sense presentar toxicitats, és necessari també desenvolupar estratègies que permetin superar les dificultats que es troben els virus per arribar, replicar, expandir-se i eliminar els tumors.

1.5.2.1. Emmascarament del virió

La primera dificultat que es presenta quan els adenovirus són administrats per via sanguínia és que aquests poden ser reconeguts per anticossos neutralitzants pre-existents[114]. Els adenovirus poden també ser reconeguts de manera inespecífica per altres proteïnes sanguínies (proteïnes del complement o el factor de coagulació X) que eliminen el virus de la sang, en disminueixen l'arribada al tumor i fan augmentar la transducció i toxicitat hepàtiques[115].

Així doncs, per tal de protegir els adenovirus durant la seva circulació pel torrent sanguini s'han desenvolupat diverses estratègies de recobriment, per exemple amb polímers sintètics[116] o bé inserint dominis d'unió a l'albúmina a la proteïna de l'hexó, de tal manera que l'adenovirus quedi recobert d'aquesta en una administració sistèmica[114].

1.5.2.2. Expressió de transgens

Una de les formes per augmentar la capacitat antitumoral dels adenovirus és a través de l'expressió de gens citotòxics que facilitin l'eliminació de les cèl·lules infectades. Les primeres estratègies que varen ser testades eren dos sistemes enzim/pro-droga: la timidina quinasa de l'HSV, que processa l'anàleg de nucleòsid ganciclovir (GCV) per incorporar-lo al DNA, impedint l'elongació d'aquest i induint l'apoptosi cel·lular; i la citosina desaminasa, que converteix la pro-droga 5-FC en l'agent citotòxic 5-FU[117]. Aquestes estratègies faciliten també la mort de cèl·lules no infectades ja que gràcies al *bystander efect* els metabòlits tòxics hi difonen des de les cèl·lules infectades[34]. Tot i que en virus amb *E1B-55K* mutat l'ús del sistema HSV-TK/GCV ha permès augmentar la citotoxicitat, l'ús d'aquest sistema en adenovirus amb *E1B-55K* salvatge és controvertit ja que redueix la potència del virus[118].

Una altra estratègia per augmentar la mort cel·lular ha estat la d'utilitzar gens que facilitin la propagació viral. S'han desenvolupat adenovirus que sobreexpressen la proteïna ADP[119], la qual facilita l'alliberament dels virions madurs; o adenovirus que expressen la hialuronidasa per tal de dissociar la matriu extracel·lular i permetre una millor expansió de la progènia viral[119].

1.5.2.3. Mecanismes d'activació del sistema immune

Els virus oncolítics produeixen un alliberament d'antígens tumorals en el moment de la lisi cel·lular, els quals poden promoure l'activació de limfòcits T i el desenvolupament d'una resposta immune antitumoral a nivell sistèmic[84]. El problema però, és que els adenovirus es caracteritzen per ser uns virus amb uns antígens molt immunodominants, els quals poden emmascarar la resposta del sistema immune contra el tumor que podria derivar-se de l'oncòlisi. Així doncs, és necessari desenvolupar estratègies que afavoreixin la resposta immune contra el tumor i no contra l'adenovirus, per exemple fusionant d'epítops tumorals a la proteïna adenoviral E3-19K, que es localitza al reticle endoplasmàtic, per facilitar-ne la presentació[120].

També a causa de la forta immunodominància dels antígens adenovirals, les cèl·lules infectades són eliminades per limfòcits T citotòxics infiltrats. Per contrarestar aquesta situació, s'ha desenvolupat un adenovirus oncolític que expressa un anticòs bi-específic activador de cèl·lules T (BiTE) contra EGFR, de tal manera que després

de la infecció, s'expressa el BiTE i es produeix una activació i redirecció de les cèl·lules T contra les cèl·lules tumorals, millorant la capacitat antitumoral del virus[120].

Per altra banda, també s'han desenvolupat adenovirus armats amb gens immunoestimuladors. Aquest és el cas de l'adenovirus ONCOS-102, armat amb el GM-CSF i que promou una resposta sistèmica antitumoral de cèl·lules T CD8+[121,122]; i de l'adenovirus CGTG-401, armat amb el CD40L per promoure una resposta de cèl·lules T helper[123].

1.5.2.4. Combinació amb agents quimioteràpics

Actualment, el tractament estàndard pel càncer de pàncrees està basat en la quimioteràpia. Per tant, és interessant identificar aquelles combinacions quimioteràpia-adenovirus oncolític que permetin augmentar l'activitat antitumoral que tinguin ambdós agents per separat.

Les combinacions de l'adenovirus ONYX-015 amb 5-FU i cisplatí han mostrat efectes sinèrgics en càncer de colon i osteosarcoma[124], així com també la combinació de l'adenovirus OBP-301 amb gemcitabina contra cèl·lules de càncer de pulmó, possiblement per la inducció de la fase S a les cèl·lules[125]. La combinació de l'adenovirus AduPARE1A, el qual té l'expressió del gen *E1A* controlada pel promotor del gen *uPAR*, amb gemcitabina va mostrar una sinèrgia contra càncer de pàncrees que venia donada per una sensibilització a la mort per apoptosi induïda per la gemcitabina[126].

1.5.3. Estratègies no racionals

Totes les estratègies que s'han mencionat fins al moment es basen en el disseny racional, el qual està limitat al coneixement que es té del virus i dels tumors. Evidentment, la situació que es produeix quan un virus entra a una cèl·lula és molt més complexa i pot estar alterada per múltiples factors que desconeixem. Així doncs, les estratègies no racionals per desenvolupar adenovirus oncolítics més potents, però també més selectius, poden ser útils per superar aquest inconvenient i s'han desenvolupat des de varis enfocs.

A nivell de transducció cel·lular, es va identificar un adenovirus d'infecció selectiva a cèl·lules tumorals gràcies al cribratge d'una biblioteca adenoviral de lligants inserits a la fibra en cèl·lules tumorals amb elevada expressió de mesotelina, una molècula de superfície cel·lular sobreexpressada en càncer de pàncrees, ovari i mesotelioma[127].

Un altre enfoc consisteix en facilitar la mutagènesi del virus i posteriorment identificar virus mutants amb capacitat oncolítica augmentada. Un exemple és la mutagènesi d'un adenovirus amb àcid nítric i la posterior bioselecció dels virus amb replicació augmentada en fibroblasts associats a tumor (CAFs), la qual va permetre identificar un adenovirus amb una mutació a la seqüència *i-leader* que facilitava l'alliberament viral i l'activitat antitumoral en tumors amb elevada presència de fibroblasts[128]. Una segona aproximació es basava en l'ús d'un adenovirus codificant per una polimerasa amb elevada taxa de mutació per tal de generar una progènia viral genèticament diversa que era bioseleccionada per identificar virus de capacitat citotòxica millorada. En aquest cas, es va identificar un adenovirus que contenia una mutació a l'acceptor d'*splicing* de l'ADP que en permetia una expressió superior[129].

Amb l'objectiu d'explorar el potencial de diversos serotips adenovirals pel tractament de càncer de colon, Kuhn I. i col. varen aplicar el que anomenen una estratègia d'evolució dirigida. Es portaven a terme infeccions amb *pools* de serotips adenovirals sota condicions experimentals que afavorien els esdeveniments de recombinació i, a continuació, infeccions successives per identificar els virus amb un *fitness* superior. Aquesta estratègia va permetre la generació del ColoAd1, un virus quimera complex dels serotips Ad3 i Ad11p que mostrava un fort augment de la potència antitumoral i que està essent testat en assajos clínics[130,131].

Un últim sistema que permet identificar processos per facilitar l'acció viral contra cèl·lules tumorals és el cribratge funcional de biblioteques de RNAs d'interferència o de compostos químics que puguin actuar sinèrgicament amb el virus. Aquests cribratges s'han portat a terme amb VSV i rhabdovirus[132–134]. En el cas dels adenovirus, el que s'ha realitzat és el cribratge funcional d'una biblioteca de miRNAs. Cèl·lules de càncer de pròstata eren transfectades amb la biblioteca i posteriorment infectades amb un adenovirus reporter i un adenovirus replicatiu. Els anàlisis d'expressió del gen reporter GFP i de citotoxicitat varen permetre identificar varis miRNAs candidats a alterar el cicle viral. D'entre aquests, el miR-26a va ser identificat com a potenciador de la propagació adenoviral a través d'un alliberament superior de partícules virals al medi[67].

2. OBJECTIUS

L'objectiu general d'aquesta tesi ha estat desenvolupar i caracteritzar adenovirus oncolítics selectius i potents front a l'adenocarcinoma ductal de pàncreas basant-se amb (i) la combinació d'estratègies de direccionament a tumor i (ii) la bioselecció de miRNAs potenciadors de l'activitat adenoviral.

Els objectius específics han estat:

1. Generar un adenovirus amb la fibra modificada amb un pèptid TAT* activable per metal·loproteases ($Ad^{RC}MMP$) i estudiar-ne l'activitat antitumoral, el perfil de toxicitat i el mecanisme d'entrada a les cèl·lules.

2. Avaluar l'activitat antitumoral i el perfil de toxicitat de l'adenovirus quimèric PANCAd, que combina la modificació a la fibra de l'$Ad^{RC}MMP$ amb l'expressió d'*E1A* regulada a nivell transcripcional i post-transcripcional. Valorar els efectes moduladors de la quimioteràpia sobre la seva activitat antitumoral.

3. Desenvolupar una biblioteca de miRNAs humans en adenovirus per tal d'identificar miRNAs potenciadors de l'activitat adenoviral en PDAC i caracteritzar els seus efectes sobre el cicle viral.

4. Estudiar els mecanismes cel·lulars que faciliten la sensibilització adenoviral per part dels miRNAs seleccionats.

5. Generar adenovirus oncoselectius que expressin els miRNAs seleccionats i estudiar la seva potència *in vitro* i *in vivo*.

3. MATERIALS i MÈTODES

3.1. Tècniques de manipulació de bacteris

3.1.1. Soques bacterianes utilitzades

En aquest treball es van utilitzar les soques d'*Escherichia coli* miR-Vec i *E.coli* SW102.

E.coli miR-Vec

La soca d'*E.coli* miR-Vec conforma cadascun dels clons de la biblioteca d'expressió de miRNAs (miR-Lib), generada per Voorhoeve[135] i comercialitzada per Source BioScience LifeSciences.

Cadascun dels clons bacterians d'aquesta soca conté un vector retroviral amb resistència a blasticidina (pMSCV-Blasticidin) que codifica, sota el control d'un promotor CMV, per una regió genòmica humana d'unes 500pb a partir de la qual s'expressa un miRNA concret. La biblioteca té clonats els miRNAs humans anotats a la base de dades Rfam release 6 (371 seqüències).

E.coli SW102

La soca d'*E.coli* SW102 va ser utilitzada per modificar els genomes adenovirals per recombinació homòloga amb el sistema AdZ.

La característica principal d'aquesta soca és la codificació al seu genoma el sistema de recombinases del fag λ, controlades per un promotor induïble per temperatura (42ºC), que permet la recombinació entre fragments de tan sols 40pb d'homologia. La soca SW102 té el gen de la subunitat 30S dels ribosomes mutat al genoma, de manera que és naturalment resistent a l'estreptomicina.

El present treball es va iniciar amb una soca cedida pel Dr. Ramon Alemany, la qual contenia un BAC (Cromosoma Bacterià Artificial) amb el genoma de l'adenovirus ICOVIR15-Fiber-RpsLNeo i un gen de resistència a cloramfenicol.

3.1.2. Condicions de cultiu i emmagatzematge bacterians

Tots els bacteris del treball van ser crescuts en medi de cultiu LB suplementat amb els antibiòtics corresponents. Els bacteris *E.coli* miR-Vec es van cultivar a 37ºC de temperatura, mentre que els SW102 es van cultivar a 32ºC per tal d'evitar l'expressió de les recombinases.

Els estocs de les diverses soques de bacteris es van emmagatzemar en forma de glicerinat (cultiu bacterià saturat amb 10% de glicerol) a -80ºC.

3.1.3. Recombinació homòloga i selecció positiva-negativa en bacteris (sistema AdZ)

El sistema AdZ (*adenovirus with zero cloning steps*) va ser desenvolupat pel Dr. Richard Stanton[136] i modificat posteriorment pel Dr. Ramon Alemany[128]. És un sistema que permet generar múltiples adenovirus recombinants de manera ràpida i eficient. S'utilitza la soca d'*E.coli* SW102, de manera que la modificació dels adenovirus es fa per recombinació homòloga directa entre el el BAC que conté el genoma adenoviral i un producte de PCR o una seqüència sintetitzada amb uns extrems de 40pb homòlegs al genoma adenoviral. El sistema AdZ permet un mètode de selecció positiva-negativa dels adenovirus recombinants gràcies al casset antibiòtic RpsLNeo.

Un cop escollida la regió del genoma que es vol modificar, s'amplifica per PCR amb una polimerasa d'alta fidelitat el casset antibiòtic RpsLNeo (sensibilitat a estreptomicina i resistència a kanamicina) amb uns braços d'homologia flanquejants a aquesta de com a mínim 40pb. Per recombinació homòloga, la regió diana serà substituïda pel casset RpsLNeo, donant bacteris resistents a cloramfenicol i a kanamicina però sensibles a estreptomicina. A continuació, cal substituir el casset RpsLNeo per la seqüència d'interès, que és amplificada per PCR amb una polimerasa d'alta fidelitat amb els mateixos braços d'homologia utilitzats en el primer pas. Per recombinació homòloga s'eliminarà el casset i s'introduirà la seqüència amplificada, donant bacteris resistents a cloramfenicol i a estreptomicina, però sensibles a kanamicina.

Per realitzar aquestes modificacions es va portar a terme el següent protocol d'inducció de la competència, electroporació i selecció antibiòtica. Un inòcul dels

bacteris es creix durant la nit a 32ºC en uns 5ml de medi LB suplementat amb els antibiòtics corresponents (cloramfenicol i kanamicina/estreptomicina). L'endemà, amb 1ml del cultiu saturat, es creix un nou inòcul en uns 15ml de medi per tal d'obtenir bacteris en fase exponencial de creixement. Quan el cultiu arriba a una densitat òptica a 600nm de 0,5-0,6, mesurada amb l'espectrofotòmetre *Ultrospec 10* (Amersham Biosciences), es procedeix a la inducció de les recombinases incubant el cultiu en un bany agitat a 42ºC durant 15min. A continuació, els bacteris s'incuben en gel durant 15min i es renten tres vegades amb ddH_2O estèril a 0ºC (precipitant els bacteris centrifugant a 4200rpm – 5min) per fer-los electrocompetents. En l'últim rentat, els bacteris s'homogeneïtzen en un volum reduït de ddH_2O estèril (aproximadament 400µl). És imprescindible realitzar tots aquests passos mantenint els bacteris en gel per tal d'assegurar una bona eficiència de transformació. 50µl dels bacteris competents es transformen amb 150ng del producte de PCR per electroporació i recuperats en 1ml de medi LB sense antibiòtics durant més de 70min a 32ºC en agitació.

Condicions d'electroporació	
Cubeta	0,1cm
Voltatge	1800V
Capacitància	25µF
Resistència	200Ω

En aquest punt es procedeix a la selecció antibiòtica dels bacteris que han fet la recombinació homòloga. 50µl del cultiu recuperat s'inoculen en 3ml de medi LB suplementat amb cloramfenicol en agitació a 32ºC durant una nit. L'endemà, 50µl d'aquest cultiu s'inoculen en 3ml de medi LB suplementat amb cloramfenicol i l'antibiòtic de selecció positiva i es creixen en agitació a 32ºC. Quan el cultiu de selecció positiva arriba a saturació (24-30h), els bacteris es sembren en estria escocesa en una placa d'agar amb medi LB adequadament suplementat per tal d'obtenir colònies aïllades.

El primer pas per la identificació de les colònies que han recombinat de forma satisfactòria és una discriminació antibiòtica. Cadascuna de les colònies a testar es pica amb una punta de pipeta estèril i es fa una petita estria en una placa d'agar amb

medi LB suplementat amb cloramfenicol i l'antibiòtic de selecció negativa. La mateixa punta serveix per inocular un cultiu líquid de 3ml de medi LB suplementat amb cloramfenicol i l'antibiòtic de selecció positiva. En el següent pas d'identificació de recombinants, de les colònies que no creixen a la placa d'agar però sí al cultiu líquid se'n realitza una extracció de DNA plasmídic a petita escala i es testen per PCR, restricció enzimàtica i seqüenciació. Els encebadors de la PCR es dissenyen flanquejant la regió modificada, de tal manera que la mida del producte de PCR obtingut permet fer una discriminació dels recombinants.

Concentracions de treball	
Cloramfenicol	12,5 μg/ml
Kanamicina	15 μg/ml
Estreptomicina	5 mg/ml

3.2. Tècniques de manipulació de DNA

3.2.1. Tècniques d'aïllament de DNA

3.2.1.1. Aïllament de DNA plasmídic de cèl·lules procariotes

El DNA plasmídic bacterià es va obtenir a partir de cultius bacterians pel mètode de la lisi alcalina. La soca que conté el plasmidi a purificar s'inocula en medi LB a partir d'un glicerinat o d'una colònia crescuda en placa. Aquest cultiu es creix en agitació, a la temperatura corresponent, fins a la saturació (com a mínim 16h).

En funció de la quantitat de DNA plasmídic desitjada es van realitzar preparacions a petita o a gran escala.

Preparacions de DNA a petita escala

Aquest procediment, basat en el protocol de lisi alcalina, permet obtenir petites quantitats de DNA plasmídic (25-50 μg) a partir d'uns 2-4 ml de cultiu.

Un alíquota de 1,5ml de cultiu saturat és centrifugada (6000g – 5min) per obtenir un pèl·let bacterià, el qual s'homogeneïtza amb 200μl de tampó isotònic que conté RNasa (Solució 1). Les cèl·lules es lisen químicament afegint 200μl d'una solució alcalina amb SDS (Solució 2), la qual és neutralitzada un cop finalitzada la reacció (5min) amb 200μl d'un tampó àcid (Solució 3). El lisat s'incuba 20min en gel i a continuació es centrifuga (15000g - 10min) per eliminar les restes cel·lulars i recuperar la fase aquosa que conté el DNA plasmídic.

El DNA plasmídic es precipita mitjançant l'addició de 450μl d'isopropanol i es recupera per centrifugació (15000g – 10min). El pèl·let de DNA plasmídic es renta amb etanol 70% i es deixa assecar abans de ser homogeneïtzat amb H_2O lliure de nucleases i congelat a -20ºC.

Solució 1 – Tampó isotònic	
Tris	50mM
EDTA	10mM

Solució 2 – Solució alcalina	
NaOH	0,1M
SDS	1%

Solució 3 – Tampó àcid	
Acetat potàssic	1,5mM
Àcid acètic	Fins a pH5.5

Preparacions de DNA a gran escala

Les preparacions de DNA a gran escala es van fer per obtenir DNA en quantitat i puresa elevades (>100 μg).

En funció del número de còpies per bacteri del plasmidi a purificar, es parteix de 250 o 500 ml de cultiu saturat. En aquest cas, un cop obtingut el pèl·let cel·lular per centrifugació (6000 g – 15min) es procedeix amb la purificació del plasmidi utilitzant el kit comercial *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen).

3.2.1.2. Aïllament de DNA de cèl·lules eucariotes i cèl·lules eucariotes infectades amb adenovirus

L'obtenció de DNA de cèl·lules eucariotes i de cèl·lules eucariotes infectades es va realitzar amb el kit comercial *UltraClean BloodSpin DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories Inc.). En el cas de l'extracció de DNA de cèl·lules infectades, s'extreu el DNA cel·lular i viral de manera conjunta en el mateix procediment.

Les cèl·lules són homogeneïtzades amb un tampó isotònic i lisades a continuació amb una solució que conté sals, detergent i proteïnasa K (10min – 65ºC).

Seguidament, s'afegeix etanol 100% i es carrega el lisat a la columna; el DNA s'adherirà a la membrana de sílice gràcies a l'alcohol, mentre que l'RNA i les proteïnes seran eliminats amb l'eluït. El DNA es renta amb dues solucions alcohòliques per netejar-lo de sals i s'elueix de la membrana amb H_2O lliure de nucleases.

3.2.1.3. Aïllament de DNA viral del sobrenedant de cèl·lules infectades amb adenovirus

L'obtenció de DNA dels virus presents al sobrenedant de cèl·lules es va realitzar amb el kit comercial *UltraClean BloodSpin DNA Isolation Kit* (MO BIO Laboratories Inc.) després d'eliminar les restes cel·lulars per centrifugació (400g – 5min).

El procediment que es va seguir és el mateix que per l'aïllament de DNA de cèl·lules eucariotes però partint de 50µl de sobrenedant que es dilueixen en tampó isotònic fins al volum de treball del kit comercial (200µl).

3.2.1.4. Aïllament de DNA viral a partir de virus purificat

L'obtenció de DNA de virus purificat es va realitzar mitjançant la lisi de les càpsides virals i posterior extracció i precipitació del DNA viral.

Una alíquota de 50µl d'adenovirus purificat és homogeneïtzada amb solució de lisi i incubada 2h a 55ºC. El DNA del lisat viral s'extreu mitjançant l'addició d'un volum de fenol:cloroform. Per centrifugació es recupera la fase aquosa que conté el DNA, el qual es fa precipitar afegint dos volums d'etanol 100% i un 2% d'acetat sòdic. El pèl·let de DNA es deixa assecar i s'homogeneïtza amb H_2O lliure de nucleases.

Solució de lisi	
EDTA 0,5M pH8.0	16µl
SDS 10%	20µl
Proteïnasa K 10mg/ml	8µl
TE pH8.0	Fins a 400µl

3.2.1.5. Aïllament de DNA viral de teixits

El DNA de virus en teixits infectats amb adenovirus es va obtenir, conjuntament amb el DNA del teixit de l'hoste, mitjançant una lisi cel·lular i la seva posterior extracció i precipitació.

Previ a la lisi, cal disgregar mecànicament el teixit fins a la completa polvorització amb l'ajuda d'un morter i nitrogen líquid per evitar-ne la descongelació. Una petita part de la pols de teixit s'homogeneïtza amb la solució de lisi i s'incuba a 55ºC durant unes 16h.

Un cop obtingut el lisat cel·lular, s'hi afegeix un volum de fenol:cloroform:alcohol isoamílic (25:24:1), es barreja per inversió i es centrifuga (13000g – 5min) per obtenir dues fases: la fase orgànica, que conté les proteïnes; i la fase aquosa, que conté el DNA. La fase aquosa es barreja amb un volum de cloroform:alcohol isoamílic (24:1) i es centrifuga (13000g – 5min) per recuperar novament la fase aquosa que conté el DNA sense restes de fenol.

El DNA de la fase aquosa es precipita amb l'addició de dos volums d'etanol 100% i 30µl de NaCl 5M i es recupera per centrifugació (13000g – 5min). El pèl·let de DNA es renta amb etanol 100%, es deixa assecar i s'homogeneïtza amb H_2O lliure de nucleases.

Solució de lisi	
NaCl	100mM
Tris-HCl pH8.0	10mM
EDTA pH8.0	25mM
SDS	0,5%
Proteïnasa K	0,1 mg/ml

3.2.2. Quantificació del DNA i determinació de la seva puresa

La concentració de DNA d'una mostra es determina a partir de l'absorbància a 260nm i posterior aplicació de la llei de Lambert-Beer (coeficient d'extinció molar 0,020 $(\mu g/ml)^{-1}cm^{-1}$). Es mesurava també l'absorbància a 280nm, longitud d'ona d'absorció de les proteïnes, de manera que la relació entre les absorbàncies 260/280 permetia

avaluar la puresa de la mostra, denotant una contaminació per proteïnes o solvents orgànics quan és inferior a 1,7.

Les quantificacions van ser realitzades amb l'espectrofotòmetre *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific).

La quantitat absoluta de molècules de DNA presents a una mostra es pot determinar amb l'aplicació de la següent fórmula:

Molècules de DNA = $([X \cdot 10^{-9} g/\mu l] / [Y \cdot 660]) \cdot 6{,}022 \cdot 10^{23}$

X = concentració de DNA determinada per absorbància

Y = número de parells de bases del fragment de DNA quantificat

660 = massa molecular mitja de les bases de DNA

$6{,}022 \cdot 10^{23}$ = número d'Avogadro

3.2.3. Digestió enzimàtica de DNA

El DNA pot ser tallat mitjançant l'ús d'endonucleases bacterianes, els enzims de restricció. Aquests enzims reconeixen seqüències específiques de nucleòtids i realitzen un tall en la doble cadena, deixant extrems roms o cohesius. El DNA a tallar s'incuba en presència de l'enzim a 37ºC entre 2 i 16h.

Reacció de digestió enzimàtica

DNA motlle	1-5µg
Tampó (enzim específic) 10x	3µl
Enzim 10U/µl (normalment)	0,5µl
H_2O lliure de nucleases	Fins a 30µl

Els resultats de les digestions enzimàtiques es van comprovar en un gel d'agarosa, en el qual s'ha d'observar un patró de bandes de mides específiques en funció de la seqüència de DNA digerit. Els fragments de DNA digerit, en alguns casos,

van ser recuperats del gel d'agarosa amb el kit comercial *QIAquick gel extraction kit (*Qiagen).

3.2.4. Tècniques d'amplificació de DNA

3.2.4.1. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacció en cadena de la polimerasa és una tècnica que ens permet amplificar fragments de DNA *in vitro* de manera específica. Aquesta reacció és possible gràcies a l'activitat enzimàtica de la DNA-polimerasa de *Thermophilus aquaticus* (Taq polimerasa) i l'ús d'encebadors que hibriden per aparellament de bases complementaries als extrems de la cadena de DNA parental que es pretén amplificar (encebador directe i encebador revers). Els encebadors són oligonucleòtids de 20-25 bases de DNA i actuen de punt d'ancoratge i inici per a la polimerització de desoxiribonucleòtids (dNTPs) que realitza la polimerasa. Es dissenyen de tal manera que la seva temperatura d'hibridació (T_h) amb la cadena parental de DNA asseguri l'especificitat de l'amplificació.

Per a les reaccions de PCR es van requerir els següents components:

Reacció de PCR	
DNA motlle	50-250ng
Tampó amb magnesi 10x	2µl
Encebadors (directe i revers) 10µM	0,5µl
dNTPs 1,25mM	3,2µl
Taq polimerasa 5U/µl	0,125µl
H_2O lliure de nucleases	Fins a 20µl

El tampó i la Taq polimerasa eren del kit comercial *DreamTaq™ Hot Start DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific) i els dNTPs, del *100mM dNTP Set* (Invitrogen – ThermoFisher Scientific). En el cas que el producte de PCR sigués necessari per un

procés de modificació de plasmidis recombinants o un procés que requerís una alta fidelitat en la còpia de la seqüència, l'enzim utilitzat va ser una DNA-polimerasa d'alta fidelitat, la qual té una taxa inferior d'incorporació de mutacions que la Taq polimerasa convencional. En aquest treball es va utilitzat la del kit comercial *Expand High Fidelity PCR System* (Roche), que inclou la polimerasa d'alta fidelitat i el tampó específic per aquesta.

La reacció de PCR consisteix en tres fases que es repeteixen diverses vegades per tal d'amplificar de forma exponencial les cadenes de DNA: desnaturalització del DNA, hibridació dels encebadors i elongació de les cadenes de DNA. El temps d'elongació (t_e) dependrà de la mida del fragment a amplificar (1min / Kb de DNA). Així doncs, les reaccions de PCR van tenir lloc de forma automatitzada en un termociclador seguint un programa definit per l'usuari:

Condicions del programa de PCR	
Desnaturalització inicial	95ºC – 5min
30-40 cicles de:	
Desnaturalització	95ºC – 30s
Hibridació	T_h – 30s
Elongació	72ºC – t_e
Elongació final	72ºC – 5min

La correcta amplificació del fragment desitjat es va comprovar en un gel d'agarosa, en el qual s'havia d'observar una banda de DNA de la mida esperada. El producte de la PCR, en alguns casos, va ser recuperat del gel d'agarosa amb el kit comercial *QIAquick PCR extraction kit (*Qiagen).

El conjunt d'encebadors utilitzats en aquest treball es detallen a la taula d'encebadors 3.1.

3.2.4.2. Reacció en cadena de la polimerasa quantitativa (qPCR)

La reacció en cadena de la polimerasa quantitativa permet determinar la quantitat d'un fragment de DNA específic present a una mostra. El fonament de la reacció és el mateix que per la reacció en cadena de la polimerasa, però s'hi afegeix un agent intercalant de DNA que desprèn fluorescència verda quan es troba entre les cadenes de DNA que formen la doble hèlix. Així doncs, la fluorescència augmenta a mesura que es donen els cicles d'amplificació. La quantificació es basa en la determinació del cicle de PCR en el que la fluorescència supera un llindar preestablert.

Per a la reacció de qPCR també és necessari l'ús d'encebadors que hibridin als extrems de la regió d'interès. Per limitacions de la tècnica però, és necessari que aquesta regió no superi els 500pb, essent els 200pb la mida òptima.

En aquest treball es va utilitzar el reactiu comercial *LightCycler 480 SYBR Green Master Mix* (Roche) en les següents condicions:

Reacció de qPCR	
DNA motlle	1µl (normalment)
SYBR Green 2x	5µl
Encebadors (directe i revers) 10µM	0,3µl
H_2O lliure de nucleases	Fins a 10µl

Les reaccions de qPCR van ser realitzades i analitzades en el termociclador *Viia7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) amb un programa definit per l'usuari, en el qual el t_e depèn de la mida del fragment a amplificar (25pb / 1 segon). La corba de deshibridació i rehibridació final permet determinar la temperatura de separació del producte de PCR format (valor corresponent a la meitat de la temperatura en la que s'assoleix la màxima fluorescència al rehibridar les cadenes de DNA). Una única temperatura de separació indicarà la formació d'un únic producte de PCR.

Condicions del programa de qPCR	
Desnaturalització inicial	95ºC – 10min
40 cicles de:	
Desnaturalització	95ºC – 30s
Hibridació	T_h – 30s
Elongació	72ºC – t_e
Elongació final	72ºC – 5min
Corba de deshibridació	

El conjunt d'encebadors utilitzats en aquest treball es detallen a la taula d'encebadors 3.1.

3.2.5. Seqüenciació d'un fragment de DNA

La seqüenciació de fragments de DNA es va portar a terme mitjançant el mètode de Sanger. Aquest mètode es basa en la incorporació aleatòria de dideoxinucleòtids, marcats amb fluoròfors específics per a cada base nucleotídica, en una reacció de PCR. La incorporació d'un d'aquests nucleòtids impedeix la continuació de la polimerització, de manera que es genera un patró de fragments acabats amb cadascuna de les bases del fragment, permetent així la lectura de la seqüència per fluorescència.

Les reaccions de seqüenciació d'aquest treball van ser realitzades pel servei de seqüenciació de Beckman Coulter Genòmics, als quals s'enviava el motlle de DNA i els encebadors corresponents a les concentracions requerides.

3.2.6. Generació de plasmidis recombinants amb el sistema AdZ

Per la generació de plasmidis amb el sistema AdZ, tots els productes de PCR van ser amplificats amb polimerasa d'alta fidelitat i purificats en un gel d'agarosa per tal d'eliminar restes de reactius i possibles productes inespecífics.

pAdZ-ICOVIR15-Fiber-EGFP

El punt de partida de la generació de plasmidis recombinants d'aquest treball va ser el BAC pAdZ-ICOVIR15-Fiber-RpsLNeo, que va servir de base per generar el pAdZ-ICOVIR15-Fiber-EGFP. La soca d'*E.coli* SW102 pAdZ-ICOVIR15-Fiber-RpsLNeo va ser cedida pel Dr. Ramon Alemany. Aquest BAC conté el genoma de l'adenovirus ICOVIR15 amb el casset de selecció antibiòtica RpsLNeo clonat a 3' del gen de la fibra, després d'un acceptor d'*splicing* que permet expressar el transgen que s'hi clona, substituint el casset, com un gen tardà més a partir del MLP.

Per PCR es va amplificar el gen de la *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP), utilitzant com a motlle una preparació de DNA a gran escala del plasmidi pEGFP-C1, adquirit a la casa comercial Clontech. Els encebadors utilitzats per amplificar la EGFP (Fiber EGFP Fw i Fiber EGFP Rv) tenien uns braços d'homologia a la regió flanquejant al casset RpsLNeo. Per recombinació homòloga es va portar a terme la substitució del casset pel gen de l'EGFP. Per identificar les colònies que havien recombinat de forma satisfactòria es va portar a terme una PCR amb els encebadors GFP_seq Fw i Rv, una restricció enzimàtica amb EcoRI (Fermentas – ThermoFisher Scientific) i una validació per seqüenciació.

pAdZ-Adwt EGFP

A partir del pAdZ-ICOVIR15-Fiber-EGFP es van realitzar dues modificacions amb el sistema AdZ per tal d'obtenir el BAC pAdZ-Adwt EGFP.

En primer lloc es va substituir la seqüència RGD del HI-loop de la fibra per la seqüència salvatge. Per PCR, utilitzant els encebadors RpsLNeo Fib Fw i RpsLNeo Fib polyA Rv, es va amplificar el casset RpsLNeo amb uns braços d'homologia

flanquejants a la regió HI-loop de la fibra que conté la seqüència RGD. Aquesta va ser substituïda pel casset per recombinació homòloga. A continuació, utilitzant els encebadors Fibra WT Fw i Rv i utilitzant com a motlle el plasmidi pVK50, es va amplificar per PCR la regió que mancava de la fibra amb la seqüència del virus salvatge i amb els mateixos braços d'homologia del pas anterior. El casset es va substituir per la seqüència salvatge per recombinació homòloga. Les colònies que havien recombinat correctament van ser identificades per PCR amb els encebadors Fibra WT testar Fw i Rv, una restricció enzimàtica amb EcoRI i seqüenciació.

La següent modificació consistia en substituir el promotor modificat de i la regió del gen *E1A* amb la mutació Δ24 del virus ICOVIR15 per les seqüències del virus salvatge. Per PCR, amb els encebadors RpsLNeo E1A Fw i RpsLNeo E1A polyA Rv, es va amplificar el casset RpsLNeo amb uns braços d'homologia que flanquejaven la regió del promotor i gen *E1A* a canviar. La regió que va ser substituïda pel casset per recombinació homòloga. Seguidament, el promotor i el fragment d'E1A que mancava, ambdós amb la seqüència salvatge i amb els mateixos braços d'homologia que en el pas anterior, van ser amplificats per PCR amb els encebadors E1A WT Fw2 i Rv, utilitzant com a motlle el plasmidi pVK50. La substitució del casset RpsLNeo per la seqüència salvatge es va portar a terme per recombinació homòloga. Les colònies que havien recombinat correctament van ser identificades per PCR amb els encebadors E1A WT testar Fw i Rv i per restricció enzimàtica amb HpaI (Fermentas – ThermoFisher Scientific) i validades per seqüenciació.

El plasmidi pAdZ-Adwt EGFP es va utilitzar per generar el virus AdwtE.

Biblioteca pAdZ-Adwt EGFP E4-miR-Lib

Gràcies a les característiques del sistema AdZ, les quals faciliten els clonatges múltiples a gran escala, es va poder generar la biblioteca de miRNAs en adenovirus a partir del BAC pAdZ-Adwt EGFP i de la biblioteca de miRNAs comercial miR-Lib.

El primer pas de la generació de la biblioteca consistia en introduir el casset RpsLNeo a la regió on posteriorment s'hi clonarien els miRNAs. Es va optar per inserir aquestes seqüències a 3 parells de bases 5' de la ITR dreta del virus, en direcció reversa, ja que era un punt en el qual no es truncava cap seqüència essencial pel virus. El casset RpsLNeo, amb uns braços d'homologia flanquejants al punt d'inserció, va ser amplificat per PCR amb els encebadors E4-RpsLNeo Fw i Rv i introduït al BAC per recombinació homòloga.

El següent pas era l'amplificació per PCR, a partir dels plasmidis de la biblioteca de miRNAs miR-Lib, la regió que ens interessava clonar als virus, la qual conté sota el control del promotor CMV regions de DNA genòmic que codifiquen un miRNA. Es van escollir els 243 dels clons de la biblioteca que codificaven per seqüències de miRNAs validats, ja que el moment de la generació de la biblioteca miR-Lib s'hi havien inclòs prediccions de miRNAs que van resultar no ser-ho. De cadascun dels clons es va fer una preparació de DNA plasmídic a petita escala. Aquest pas es va portar a terme en grups d'uns 20 clons (grups 1 a 17) per tal de agilitzar el procés però assegurant una diversitat de seqüències a la biblioteca final d'adenovirus. Per PCR i utilitzant els encebadors E4-miRNA cua 2 Fw i E4-miRNA cua Rv, que afegien els braços d'homologia utilitzats en la inserció del casset RpsLNeo, es van amplificar el promotor CMV i la regió de DNA genòmic. Després de verificar la correcta amplificació de cadascun dels clons, els productes de PCR es van purificar en un gel d'agarosa de forma conjunta. El casset RpsLNeo va ser substituït per recombinació homòloga donant lloc al pAdZ-Adwt EGFP E4-miR grup 1 a 17.

Per tal de comprovar que hi havia una diversitat de clons, per cada grup es van picar diverses colònies de bacteris aïllats i es va portar a terme una PCR amb els encebadors step3/4 Fw i Rv. D'aquesta manera es determinava el percentatge d'eficiència de recombinació per cadascun dels grups (requerint-se de més d'un 80% d'eficiència per ser acceptats) i s'observava la diversitat de productes de PCR de mides diferents corresponents a les diferències de mida dels fragments de genòmic de la biblioteca miR-Lib. Cadascun dels grups es va testar també per restricció enzimàtica amb EcoRI.

El conjunt de plasmidis pAdZ-Adwt EGFP E4-miR-Lib grup 1 a 17 es va utilitzar per generar la biblioteca adenoviral AdwtE miR-Lib.

pAdZ-Adwt EGFP E4-hTR

Per tal de poder generar un virus control amb una mida de genoma similar als virus de la biblioteca de miRNAs, es va generar el pAdZ-Adwt EGFP E4-hTR, que incorpora el promotor CMV i la seqüència hTR (l'RNA petit que utilitza la telomerasa per allargar els telòmers) al mateix punt del virus on es van clonar els miRNAs.

La seqüència hTR, juntament amb el promotor, va ser amplificats per PCR amb els encebadors E4-miRNA cua 2 Fw i E4-miRNA cua Rv, afegint els braços d'homologia utilitzats en la inserció del casset RpsLNeo necessària per generar la

biblioteca. El casset va ser substituït per la seqüència d'interès per recombinació homòloga. Per identificar les colònies que havien recombinat de forma satisfactòria es va portar a terme una PCR amb els encebadors step3/4 Fw i Rv, una restricció enzimàtica amb EcoRI i una validació per seqüenciació.

El plasmidi pAdZ-Adwt EGFP E4-hTR es va utilitzar per generar el virus AdwtE hTR.

pAdZ-ICOVIR15

Per generar el pAdZ-ICOVIR15 es va eliminar el casset RpsLNeo del pAdZ-ICOVIR15-Fiber-RpsLNeo. Per PCR amb els encebadors GFP_seq Fw i Rv es va amplificar una regió que contenia l'extrem 5' de la fibra i una part de seqüència a 3' d'aquesta, suficient per flanquejar el casset RpsLNeo. Per recombinació homòloga el casset va ser substituït per la seqüència salvatge del virus. Les colònies que havien recombinat es van identificar per PCR amb els encebadors RpsLNeo 3' Fib testar Fw i Rv, i per restricció enzimàtica amb EcoRI.

El plasmidi pAdZ-ICOVIR15 es va utilitzar per generar el virus ICOVIR15.

pAdZ-ICOVIR15 E4-miR-99b / miR-485

La introducció del casset RpsLNeo entre E4 i la ITR dreta del virus, així com la posterior substitució d'aquest pel miR-99b i miR-485 sota el control del promotor CMV, es va realitzar amb el mateix procediment que la generació de la biblioteca pAdZ-Adwt EGFP E4-miR-Lib. En aquest cas, però, es va utilitzar de punt de partida el pAdZ-ICOVIR15 i els clons de la biblioteca miR-Lib que codificaven pel miR-99b i el miR-485.

El plasmidis pAdZ-ICOVIR15 E4-miR-99b / miR-485 es van utilitzar per generar els virus ICOVIR15 miR-99b i miR-485.

3.3. Tècniques de manipulació de l'RNA

3.3.1. Aïllament d'RNA i miRNAs

L'RNA cel·lular (incloent els RNAs petits, i per tant, els miRNAs) i l'RNA viral van ser aïllats mitjançant el kit comercial *miRNeasy mini kit* (Qiagen), seguint el protocol del fabricant.

A grans trets, les cèl·lules són lisades amb una solució comercial de fenol i tiocianat de guanidina (*Qiazol Lysis Reagent*), la qual permet eliminar gran part del DNA i proteïnes cel·lulars per extracció orgànica. L'RNA, en presència d'etanol, s'uneix a unes columnes de purificació amb membrana de sílice, es renta amb solucions alcohòliques i s'elueix amb aigua lliure de RNases. Els RNAs purificats es guarden a -80ºC.

En el cas de realitzar l'extracció a partir de teixit, és necessari que prèviament es disgregui el teixit de forma mecànica fins a la completa polvorització amb l'ajuda d'un morter i nitrogen líquid per evitar-ne la descongelació. Una petita part d'aquesta pols és homogeneïtzada amb el *Qiazol Lysis Reagent* amb l'ajuda d'una agulla i una xeringa de 20G.

3.3.2. Quantificació de l'RNA i determinació de la seva puresa

La concentració d'RNA d'una mostra es determina a partir de l'absorbància a 240nm i posterior aplicació de la llei de Lambert-Beer (coeficient d'extinció molar 0,025 $(\mu g/ml)^{-1}cm^{-1}$). Es mesurava també l'absorbància a 280nm, longitud d'ona d'absorció de les proteïnes, de manera que la relació entre les absorbàncies 260/280 permetia avaluar la puresa de la mostra, denotant una contaminació per proteïnes o solvents orgànics quan és inferior a 2.

Les quantificacions van ser realitzades amb l'espectrofotòmetre *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific).

3.3.3. Anàlisi de l'expressió d'RNAs missatgers

L'anàlisi dels nivells d'expressió d'RNAs missatgers (mRNA) cel·lulars i virals es va realitzar mitjançant RT-qPCR. Degut a que la polimerasa utilitzada per les qPCRs no pot amplificar a partir d'RNA, és necessari que aquest sigui retrotranscrit a DNA prèviament.

La reacció de retrotranscripció genera fragments de DNA de doble cadena complementaris als mRNA presents a la mostra (cDNA) gràcies a l'activitat enzimàtica de la transcriptasa reversa del virus de la leucèmia murina Moloney (MLV-RT). Aquest enzim utilitza com a encebadors oligonucleòtids de 6 bases aleatòries (hexàmers aleatoris) o bé encebadors complementaris a la cua polyA dels mRNA (*OligodT*). En aquest treball es van usar únicament encebadors *OligodT*.

El kit comercial *PrimeScript RT Reagent Kit* (Takara) va servir per a realitzar les reaccions de retrotranscripció segons les condicions marcades pel fabricant:

Reacció de retrotranscripció	
RNA motlle	500ng
Tampó PrimeScript 5x	2µl
PrimeScript RT mix I (MLV-RT)	0,5µl
OligodT (50µM)	0,5µl
H_2O lliure de nucleases	Fins a 10µl
El volum es puja fins a 20ml amb aigua un cop acabada la reacció	

Condicions del programa de retrotranscripció	
Reacció de retrotranscripció	37ºC – 15min
Inactivació de la MLV-RT	85ºC – 5s

El cDNA obtingut per retrotranscripció va ser utilitzat com a motlle per quantificar les còpies d'mRNA d'interès presents a la mostra per reacció de qPCR (veure apartat 3.2.4.2).

3.3.4. Anàlisi de l'expressió de miRNAs

L'anàlisi dels nivells d'expressió de miRNAs madurs es va efectuar mitjançant RT-qPCR, malgrat que en aquest cas, a causa de la mida reduïda dels miRNAs, és necessari l'ús d'uns encebadors que allarguin el motlle.

Per a la retrotranscripció s'utilitza una sonda en forma de *stem-loop* que s'uneix específicament al miRNA a analitzar i a partir de la qual s'allargarà el cDNA. Per les reaccions de retrotranscripció van ser necessaris els kits comercials *Applied Biosystems™ TaqMan™ MicroRNA Reverse Transcription Kit* i *AppliedBiosystems™ TaqMan™ microRNA Assay* (ThermoFisher Scientific), utilitzats seguint les condicions del fabricant:

Reacció de retrotranscripció de miRNAs	
RNA (2ng/µl)	5µl
dNTS amb dTTP (100mM)	0,15µl
MultiScribe Reverse Transcriptase (50U/µl)	1µl
Tampó de retrotranscripció (10x)	1,5µl
Inhibidor de RNAses (20U/µl)	0,19µl
Sonda Taqman microRNA Assay 5x	3µl
H_2O lliure de nucleases	Fins a 15µl (4,16µl)

Condicions del programa de retrotranscripció de miRNAs	
Hibridació de la sonda stem-loop	16ºC – 30min
Retrotranscripció	42ºC – 30min
Inactivació de la retrotranscriptasa	85ºC – 5min

La quantificació dels miRNAs madurs es va realitzar per qPCR amb sonda TaqMan, utilitzant un encebador directe i una sonda d'hidròlisi específics pel miRNA analitzat, i un encebador revers estàndard. La sonda d'hidròlisi està marcada amb un fluoròfor i un extintor, el qual inhibeix l'emissió del fluoròfor. Quan la cadena de cDNA

és amplificada per la polimerasa, l'activitat exonucleasa d'aquesta degrada la sonda d'hidròlisi, alliberant el fluoròfor de la inhibició de l'extintor i permetent l'emissió de fluorescència. Igual que el cas d'utilitzar *SYBR Green*, el cicle de PCR en el qual la fluorescència supera el llindar preestablert s'utilitza per fer la quantificació dels miRNAs.

Per les qPCR de miRNAs es van requerir els kits comercials *Applied Biosystems™ TaqMan™ Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG* i *AppliedBiosystems™ TaqMan™ microRNA Assay* (ThermoFisher Scientific), utilitzats seguint les condicions del fabricant:

Reacció de qPCR de miRNAs	
Producte de la retrotranscripció (cDNA)	1,5µl
TaqMan microRNA Assay (20x)	0,5µl
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)	5µl
H_2O lliure de nucleases	Fins a 10µl (3µl)

Les qPCR van ser realitzades i analitzades en el termociclador *Viia7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) seguint un programa definit per l'usuari:

Condicions del programa de qPCR de miRNAs	
Desnaturalització inicial	95ºC – 10min
40 cicles de:	
Desnaturalització	95ºC – 15s
Hibridació i elongació	60ºC – 60s

A la taula 3.2 es detallen els assajos de miRNAs (*AppliedBiosystems™ TaqMan™ microRNA Assay*) utilitzats.

3.4. Tècniques de manipulació de proteïnes

3.4.1. Aïllament de proteïnes

L'extracció de proteïnes cel·lulars i virals es va portar a terme per lisi de les membranes cel·lulars: la mostra s'homogeneïtzava amb un tampó de lisi i es bullia a 98ºC durant 10min. Els lisats es van centrifugar (16000g – 5min) per eliminar les restes cel·lulars.

Tampó de lisi	
Tris-HCl pH 6.8	50mM
SDS	2%
Glicerol	1%
Complete Mini Protease Inhibitor (Roche)	1%

3.4.2. Quantificació de proteïnes

La concentració de proteïna d'una mostra es va determinar per assaig colorimètric amb el kit comercial *BCA Protein Assay Kit* (ThermoFisher Scientific). El fonament de l'assaig es basa en la capacitat dels enllaços peptídics de reduir el Cu^{+2} a Cu^{+}, el qual és immediatament quelat per l'àcid bicinconínic de la solució comercial, causant un canvi de color en aquesta.

Per tal de determinar la concentració proteica, els valors d'absorbància de les mostres a 562nm van ser comparats amb els valors d'una recta patró de concentracions creixents d'albúmina sèrica bovina. L'absorbància va ser mesurada amb l'espectrofotòmetre *Synergy HT* (BioTek).

3.4.3. Western Blot

3.4.3.1. Electroforesi de proteïnes de condicions desnaturalitzants

La separació de proteïnes en funció de la seva mida es va efectuar per electroforesi en gels d'acrilamida en presència de SDS i β-mercaptoetanol. El β-mercaptoetanol trenca els ponts disulfur de les proteïnes, mentre que l'SDS les desnaturalitza i els dóna una càrrega negativa homogènia. Les proteïnes corren a través de dos gels: el primer, el gel concentrador, té un baix percentatge d'acrilamida (3.9%) i permet que les proteïnes s'alineïn per entrar al segon gel, el gel separador. El gel separador es prepara a un percentatge d'acrilamida que varia en funció dels KDa de les proteïnes a estudiar, requerint-se percentatges més elevats per una correcte resolució de proteïnes més petites.

Gel concentrador (4%)	
Acrilamida 30% (37:5:1)	0,650ml
Tris-HCl 0,5M pH6.8	1,25ml
SDS 10%	50µl
Aigua	3ml
APS 10%	50µl
TEMED	10µl

Gel separador (7,5 / 8 / 10%)	
Acrilamida 30% (37:5:1)	2,5 / 2,7 / 3,3ml
Tris-HCl 1,5M pH8.8	2,5ml
SDS 10%	100µl
Aigua	4,8 / 4,6 / 4 ml
APS 10%	100µl
TEMED	20µl

Un total de 40µg de proteïna es preparen en tampó de càrrega 6x i es carreguen al gel d'acrilamida, submergit en tampó d'electroforesi. Les proteïnes, que gràcies a l'SDS tenen una càrrega negativa homogènia, migraran pel gel cap al pol positiu quan

s'aplica un camp elèctric (400 mA). La migració tindrà lloc, majoritàriament, en funció de la mida de les proteïnes.

Tampó de càrrega	
Tris base	300mM
DTT	600mM
SDS	12%
Blau de bromofentol	0,6%
Glicerol	60%

Tampó d'electroforesi pH8.3	
Tris base	25mM
Glicina	600mM
SDS	0,1%

3.4.3.2. Transferència de proteïnes a membranes

Un cop separades en un gel d'acrilamida, les proteïnes van ser transferides a una membrana per tal de poder-les detectar amb anticossos. Les membranes eren de nitrocel·lulosa, *Hybond™ C Extra* (Amsham Bioscience); o de PVDF, *Immunobilon® Transfer Membranes* (Merck Millipore Ltd.); segons els requeriments dels anticossos utilitzats.

Les proteïnes són transferides a la membrana per migració en un camp elèctric (400mA durant 1h) en presència de tampó de transferència. Per comprovar que la transferència ha estat satisfactòria, la membrana és incubada en solució de Ponceau S (Sigma Aldrich), que s'uneix de forma inespecífica a les proteïnes.

Tampó de transferència pH8.3	
Tris base	25mM
Glicina	200mM
Metanol	20%

3.4.3.3. Immunodetecció de les proteïnes

Per a la detecció de la proteïna d'interès s'utilitzen anticossos contra epítops específics d'aquesta. Per evitar unions inespecífiques la membrana s'incuba en solució de bloqueig (TBS-T amb llet al 10%) durant 1h a temperatura ambient. A continuació, s'incuba amb l'anticòs primari (adequadament diluït en TBS-T amb llet al 5%) durant 1h a temperatura ambient o tota la nit a 4ºC.

Un cop realitzada la hibridació, la membrana es renta amb TBS-T per eliminar l'excés d'anticòs i es procedeix a la hibridació d'un anticòs secundari marcat amb peroxidasa de rave durant 45min a temperatura ambient. L'anticòs secundari reconeix la cadena pesada de l'anticòs primari. Finalment, es renta la membrana tres vegades amb TBS-T per eliminar l'excés d'anticòs secundari.

Tampó TBS-T	
Tris-HCl pH7.5	10mM
NaCl	100mM
Tween	0,1%

La immunodetecció es va revelar amb el reactiu *ECL Amersham Prime Western Blotting Detection Reagent* (GE Healthcare Life Sciences), el qual conté peròxid d'hidrogen i luminol. La peroxidasa de l'anticòs degrada el peròxid d'hidrogen facilitant així una oxidació del luminol. Aquesta reacció quimioluminiscent va ser detectada en un lector *LAS-4000* (Fujifilm).

A les taules 3.3 i 3.4 es detallen els anticossos utilitzats en aquest treball.

3.4.3.4. Quantificació de les bandes d'immunodetecció

La intensitat de les bandes d'immunodetecció obtingudes per les proteïnes d'interès es va quantificar mitjançant densitometria amb el programa informàtic *ImageJ*. Els valors de la proteïna d'interès van ser relativitzats als valors de les proteïnes control (GAPDH o tubulina α) analitzades a la mateixa mostra.

3.4.4. Assajos luciferasa

Els assajos luciferasa d'aquest treball s'han realitzat seguint diversos protocols en funció de la mostra analitzada.

3.4.4.1. Assaig luciferasa de cèl·lules transduïdes amb adenovirus reporters

L'assaig luciferasa de cultius cel·lulars transduïts amb adenovirus no replicatius reporters, que expressen la luciferasa *firefly* sota el control d'un promotor CMV, es va realitzar utilitzant el kit comercial *Luciferase Assay System* (Promega).

Passades 72h de la transducció amb els virus, les cèl·lules eren lisades amb 50µl del tampó de lisi *Reporter Lysis Buffer* (RLB) 1x i tres cicles de congelació i descongelació (-80ºC / temperatura ambient). La reacció de luminescència es va portar a terme incubant 10µl del lisat cel·lular amb 30µl de luciferina en una placa blanca, la qual permetia la lectura immediata amb el luminòmetre *Synergy HT* (BioTek). Els valors de luminescència de la mostres eren normalitzats pels corresponents valors de proteïna total, determinats per BCA (veure apartat 3.4.2).

3.4.4.2. Assaig luciferasa de teixits d'animals administrats amb adenovirus reporters

En aquest cas, previ a la realització de l'assaig luciferasa dels òrgans amb el kit comercial *Luciferase Assay System* (Promega), era necessari disgregar de forma mecànica el teixit animal fins a la completa polvorització amb l'ajuda d'un morter i nitrogen líquid.

Una petita part de la pols de teixit s'homogeneïtzava amb 100µl de tampó de lisi RLB 1X i s'incubava 15min a 25ºC en agitació, agitant en un agitador tipus Vortex la mostra cada 5min. Seguidament, es realitzaven tres cicles de congelació i descongelació per a facilitar el trencament de les membranes cel·lulars. Les restes cel·lulars eren eliminades per centrifugació (10000g – 3min) i el sobrenedant es recollia per procedir amb l'assaig luciferasa tal com es detalla a l'apartat anterior.

3.5. Tècniques de cultius cel·lulars eucariotes

3.5.1. Línies cel·lulars humanes utilitzades

HT1080 – línia cel·lular humana derivada de fibrosarcoma. Cedida pel Dr. Ramon Alemany (ICO-IDIBELL, Barcelona).

PANC-1 – línia cel·lular humana derivada d'un adenocarcinoma ductal pancreàtic. Adquirida a través de la ATCC.

RWP-1 – línia cel·lular humana derivada d'una metàstasi hepàtica d'un adenocarcinoma ductal pancreàtic[136]. Cedida pel Dr. FX Real (CNIO, Madrid).

MIA PaCa-2 – línia cel·lular humana derivada d'un carcinoma de pàncrees. Adquirida a través de la ATCC.

CP15-Luc – línia cel·lular humana que expressa la luciferasa de *firefly*. Va ser prèviament generada al laboratori transduïnt la línia parental (derivada d'un fragment d'adenocarcinoma ductal pancreàtic humà perpetuat en ratolí[138]) amb un retrovirus codificant per la luciferasa, seleccionant-les amb 0,2 mg/ml d'higromicina, generant clons i testant l'expressió de luciferasa d'aquests.

MIA PaCa-2 Gem – línia cel·lular humana resistent a la gemcitabina. Va ser generada tractant la línia cel·lular MIA PaCa-2 amb dosis creixents de gemcitabina fins a una dosi de 100μM.

CP15-Luc Gem – línia cel·lular humana resistent a la gemcitabina. Va ser generada tractant la línia cel·lular CP15-Luc amb dosis creixents de gemcitabina fins a una dosi de 400μM.

PANC-1-Luc – línia cel·lular humana que expressa la luciferasa de *firefly*. Va ser prèviament generada al laboratori transduïnt la línia PANC-1 amb un retrovirus codificant per la luciferasa, seleccionant-les amb 0,2 mg/ml d'higromicina, generant clons i testant l'expressió de luciferasa d'aquests.

HPDE – línia cel·lular humana no tumoral derivada d'epiteli ductal de pàncrees sa i immortalitzada mitjançant l'expressió de les proteïnes E6 i E7 del virus del papil·loma humà[139]. Cedida pel Dr. FX Real (CNIO, Madrid).

CAF-28 – cultiu primari de fibroblasts humans establert a partir d'un adenocarcinoma ductal de pàncrees. Cedit per la Dra. Eva Vaquero (IDIBAPS, Barcelona).

CAF_Oct'16 – cultiu primari de fibroblasts humans establert a partir d'un adenocarcinoma ductal de pàncrees. Cedit per la Dra. Eva Vaquero (IDIBAPS, Barcelona).

Fibroblasts de pell FG1 i FG2 – cultius primaris de fibroblasts derivats de pell de pacients amb acidúria glutàrica amb la mutació A293T (FG1) o A293T/R402W (FG2). Cedits per la Dra. Antònia Ribes (IDIBAPS, Barcelona).

IMR-90 – cultiu primari de fibroblasts pulmonars fetals humans. Adquirida a través de la ATCC.

A549 – línia cel·lular humana derivada d'un carcinoma de pulmó. Cedida pel Dr. Ramon Alemany (ICO-IDIBELL, Barcelona). S'utilitza per l'amplificació d'adenovirus recombinants degut a la seva gran eficiència en la producció d'aquests virus.

HEK293 – línia cel·lular humana derivada de teixit embrionari de ronyó. Immortalitzada amb l'extrem 5' del genoma de l'adenovirus que inclou E1A. Cedida pel Dr. Ramon Alemany (ICO-IDIBELL, Barcelona). És una línia fàcilment transfectable que s'utilitza en el primer pas de la generació d'adenovirus i com a línia cel·lular empaquetadora per la producció d'adenovirus no replicatius.

Totes les línies cel·lulars emprades en aquest estudi creixen adherides formant una monocapa i eren mantingudes en un incubador humidificat a 37ºC de temperatura i amb una atmosfera al 5% de CO_2. Amb excepció de les HPDE, les cèl·lules van ser cultivades en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví, 100 U/ml de penicil·lina, 100 μg/ml d'estreptomicina i 2mM de L-glutamina. Les cèl·lules HPDE van ser cultivades en medi KSFM (*Keratinocyte serum-free medium*) suplementat amb 25 μg/ml de BPE (extracte de pituïtària bovina), 0,5 ng/μl de EGF (factor de creixement epidèrmic), 100 U/ml de penicil·lina, 100 μg/ml d'estreptomicina i 1mM de piruvat sòdic.

3.5.2. Transfeccions transitòries

La incorporació de DNA exogen a cèl·lules humanes per mètodes no virals es va portar a terme amb dues tècniques diferents:

3.5.2.1. Transfecció mitjançant dendrímers activats

Les transfeccions que requereixen d'una elevada eficiència es van portar a terme amb el kit comercial *SuperFect Reagent* (Qiagen). Aquest reactiu consisteix en uns dendrímers activats que s'uneixen al DNA a través del grup fosfat, embolcallant-lo i formant uns agregats compactes que són internalitzats a la cèl·lula per endocitosi no específica.

El DNA es dilueix amb medi sense sèrum fins a la concentració desitjada i s'incuba 10min a temperatura ambient amb el reactiu *SuperFect Reagent*. A continuació s'hi afegeix medi suplementat amb sèrum fins a un volum adequat per la placa de cultiu que conté les cèl·lules a transfectar i es posa en contacte amb aquestes. Al cap d'unes 8-16h es canvia el medi de les cèl·lules per eliminar agregats residuals i evitar toxicitats.

3.5.2.2. Transfecció mitjançant nanoplexes de poly-(β-aminoésters)

Les cèl·lules que no es transfecten bé amb el *CalPhos* o el *SuperFect Reagent* van ser transfectades amb nanoplexes de poly-(β-aminoésters) (PBAEs), una tecnologia posada a punt per l'empresa Sagetis Biotech. Els PBAEs són uns polímers catiònics que poden ensamblar-se amb el DNA formant nanopartícules amb càrrega positiva, les quals seran incorporades per les cèl·lules. Els PBAEs desenvolupats per Sagetis Biotech inclouen pèptids carregats positivament als extrems per tal d'obtenir una millor eficiència de transfecció[140].

En termes generals, el DNA es mescla amb els polímers, a unes concentracions i volums concrets prèviament establerts per garantir una bona eficiència de transfecció. Després d'incubar la mescla a 25ºC durant 30min, els nanoplexes es precipiten amb l'addició d'H_2O lliure de RNases, s'afegeixen els excipients (HEPES i glucosa) i la mostra es congela a -80ºC durant 30min per permetre una correcta formació dels nanoplexes. Finalment, la mostra es liofilitza.

Previament al seu ús per transfectar les cèl·lules, els nanoplexes són diluïts amb la quantitat desitjada de ddH_2O lliure d'RNases estèril.

3.5.3. Tinció amb blau de metilè

La tinció amb el colorant vital blau de metilè (Sigma Aldrich) permet tenyir les cèl·lules viables d'un cultiu que es troben adherides a la placa, de manera que s'obté una aproximació de la viabilitat o confluència del cultiu.

El medi de cultiu cel·lular s'elimina per aspiració i les cèl·lules s'incuben durant un minut en presència del colorant. A continuació, el colorant es retira, la placa es renta per immersió en dH_2O i es deixa assecar a temperatura ambient.

3.6. Manipulació d'adenovirus

3.6.1. Generació de l'homogenat viral

Per les construccions generades amb el Sistema AdZ, es va realitzar una preparació de DNA a gran escala dels plasmidis, de la qual 5μg van ser directament transfectats mitjançant dendrímers activats (*SuperFect Reagent* – Qiagen) a cèl·lules HEK293. Els plasmidis del Sistema AdZ codifiquen per l'endonucleasa Sce-I sota un promotor eucariota, de manera que quan arriben al nucli l'endonucleasa aquesta s'expressa i actua sobre unes dianes úniques que es troben adjacents als ITR virals.

Entre 3 i 15 dies post-transfecció, en funció del plasmidi transfectat, quan l'efecte citopàtic causat per la producció de virus és complet, es recullen les cèl·lules i el medi i s'homogeneïtzen mitjançant tres cicles de congelació (-80ºC) i descongelació (37ºC). Les restes cel·lulars són eliminades per centrifugació (600g – 10min), obtenint el sobrenedant d'homogenat P1.

El següent pas d'amplificació viral es realitza en cèl·lules A549: una placa de cultiu p100 s'infecta amb 2ml del P1. Passats entre 3 i 7 dies, determinats per l'observació d'efecte citopàtic, es recullen les cèl·lules i el medi, s'homogeneïtzen per congelació i descongelació i després de centrifugar (600g – 10min) s'obté el sobrenedant d'homogenat P2. El mateix procés es repeteix amb una placa de cultiu p150 d'A549 per obtenir el sobrenedant d'homogenat P3. En aquest i successius passos, al moment de la infecció, es canvia el medi de creixement (DMEM 10% FBS) per medi de producció de virus (DMEM 2% FBS). Finalment, amb el P3 s'infecten 15 p150 d'A549. En aquest pas d'infecció només es recullen les cèl·lules abans de que siguin llisades pel virus, descartant el sobrenedant. Les cèl·lules són homogeneïtzades en PBS++ i el virus s'allibera del seu interior fent tres cicles de congelació i descongelació. S'obté l'homogenat final eliminat les restes cel·lulars per centrifugació (600g – 10min).

Solució PBS++	
PBS	1x
$CaCl_2 \cdot H_2O$	0,68mM
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	5mM

3.6.2. Purificació d'adenovirus

A partir de l'homogenat final es purifiquen les partícules adenoviral per centrifugació en gradients de clorur de cesi (CsCl). Es realitza una primera centrifugació amb gradients de 1,5, 1,35 i 1,25g/ml de CsCl (2h – 35000rpm) en la que els virions madurs bandegen entre les densitats 1,35 i 1,25. La segona centrífuga es realitza amb un gradient continu de 1,35g/ml de CsCl (24h – 35000rmp). Gràcies a que les càpsides virals immadures migren menys en els gradients, és possible eliminar-les durant la purificació.

Un cop obtingut el virus pur a partir de l'homogenat, és necessari dessalar-lo per tal d'eliminar el CsCl i substituir-lo per en PBS++ amb un 10% de glicerol. Segons les necessitats de cada producció, es va dessalar amb una columna d'exclusió molecular *PD-10 Desalting Columns* (GE Healthcare) o bé amb un procés de diàlisi amb membranes *Dyalisi tubing cellulose membrane* (Sigma Aldrich). Un cop dessalats, els virus es van aliquotar i guardar immediatament a -80ºC.

3.6.3. Titulació d'adenovirus

La concentració de virus present a l'estoc purificat es va determinar per quantificació de partícules físiques per espectrometria i per quantificació de partícules virals infectives.

3.6.3.1. Quantificació de partícules físiques per espectrometria (vp/ml)

El títol del virus en partícules físiques (vp/ml) es determina mesurant l'absorbància del DNA viral a una longitud d'ona de 260nm. A partir de l'estoc viral es preparen diferents dilucions amb tampó de lisi, s'incuben 10min a 56ºC i se'n mesura la densitat òptica amb l'espectrofotòmetre *NanoDrop1000* (ThermoScientific). Es pot extrapolar el títol viral aplicant la següent fórmula:

$$vp/ml = DO_{260nm} \cdot \text{factor de dilució} \cdot 1{,}1 \cdot 10^{12}$$

Tampó de lisi	
Tris-HCl pH7.4	10mM
EDTA	1mM
SDS	0,1%

3.6.3.2. Quantificació de partícules virals infectives (PI/ml)

La concentració de partícules virals infectives, ja sigui de l'estoc de virus purificat o d'una mostra amb virus, es va determinar per quantificació de genomes internalitzats a les cèl·lules passades 4h des de la infecció amb la mostra.

Se sembren 10^5 cèl·lules A549 per pou en una placa de 24 pous. L'endemà, es preparen les dilucions 1/100 i 1/1000 de l'estoc viral i s'infecten les A549 amb 100µl d'aquestes. En el cas de titular una mostra que conté virus s'infecta directament amb un volum conegut de mostra. Passades 4h, les cèl·lules es renten tres cops amb PBS 1x i es recullen per fer un recompte cel·lular i per extreure'n el DNA (veure apartat 3.2.1.2). El contingut de DNA viral i de DNA cel·lular són determinats per qPCR amb els encebadors Hexo01 i Hexo02, i Albumin Fw i Rv, respectivament. Per extrapolació en unes rectes patró s'obtenen el número de molècules de DNA virals i cel·lulars (veure apartats 3.2.2 i 3.2.4.2). El número de molècules de DNA cel·lular, juntament amb el recompte cel·lular, permetrà corregir l'error entre pous i titulacions diferents.

Si la mostra a analitzar és teixit, és necessari que aquest sigui prèviament disgregat de forma mecànica fins a la completa polvorització amb l'ajuda d'un morter i nitrogen líquid per evitar-ne la descongelació. Una petita part d'aquesta pols és homogeneïtzada amb PBS 1x i el virus és alliberat de l'interior cel·lular per mitjà de tres cicles de congelació i descongelació. Les restes cel·lulars s'eliminen per centrifugació (600xg – 5min) i el sobrenedant s'utilitza per infectar les A549.

3.6.4. Infeccions amb adenovirus

Les infeccions amb adenovirus es van efectuar posant en contacte una dilució del virus a la concentració desitjada amb cèl·lules prèviament sembrades. En tots els

casos, passades 4h des del moment de la infecció, les partícules no internalitzades eren eliminades canviant el medi.

A la taula 3.5 es detallen els adenovirus utilitzats en aquest treball i les principals característiques de cadascun d'ells.

3.6.4.1. Estudi dels mecanismes d'entrada a la cèl·lula dels adenovirus modificats a la fibra

En aquest treball, el mecanisme d'entrada a la cèl·lula dels adenovirus que incorporen la modificació YTRGE-TATMMP a la fibra va ser avaluat de tres formes diferents: establint una competició d'infecció a través de CAR i integrines entre el virus a testar i dosis creixents d'adenovirus reporter AdTL inactivat per temperatura (56ºC – 5min); i tractant les cèl·lules abans de la infecció amb 2,5 o 5 µg/ml de clorpromazina (*Chlorpromazine* – Sigma Aldrich), un inhibidor de l'endocitosi mitjançada per clatrina; o bé amb 1 o 3,5 µg/ml de *Fillipin III* (Sigma Aldrich), un inhibidor de l'endocitosi mitjançada per caveoles.

En els tres casos, el tractament o competició es realitzava de forma simultània a la transducció amb els adenovirus reporters AdTL, AdYTRGE o AdTATMMP. En tots els casos, passades 4h des del moment de la transducció, les partícules no internalitzades i els inhibidors eren eliminats canviant el medi.

3.6.4.2. Assaig de bioselecció de la biblioteca d'adenovirus AdwtE miR-Lib

El procés de bioselecció de la biblioteca d'adenovirus AdwtE miR-Lib es va realitzar en dues línies cel·lulars de PDAC: PANC-1 i MIA PaCa-2. L'assaig consistia, en termes generals, en infeccions successives amb el sobrenedant enriquit amb virus altament replicatius.

L'assaig de bioselecció es va iniciar amb el sobrenedant d'homogenat P1 de la biblioteca, produït en HEK293. En el cas de les PANC-1, una placa p60 amb $1{,}2 \cdot 10^6$ cèl·lules va ser infectada amb 1 PI/cèl·lula del P1. El sobrenedant es va recollir a les 72h post-infecció i un 10% d'aquest va ser utilitzat per infectar una placa p100 de PANC-1 confluents (infecció successiva #2). El procediment es va repetir de forma successiva. A partir de la infecció successiva #4, el sobrenedant va ser recollit a les 48h post-infecció fins a la infecció successiva #20. Amb les MIA PaCa-2, la placa p60

inicial, sembrada amb $1,2 \cdot 10^6$ cèl·lules, va ser infectada amb 5 PI/cèl·lula del P1. El primer sobrenedant va ser recollit als 7 dies post-infecció. Fins a la infecció successiva #5 es va utilitzar el 70% del sobrenedant recollit a les 72h post-infecció per infectar plaques p100 de MIA PaCa-2 al 60-70% de confluència. A partir d'aquest punt, es va utilitzar el 30% del sobrenedant recollit a les 48h fins a la infecció successiva #20.

Un cop finalitzades les infeccions successives, els virus presents al sobrenedant van ser aïllats en forma de clons. En una placa de 6 pous, es van sembrar $2 \cdot 10^5$ PANC-1 o A549 (les MIA PaCa-2 no creixen en la monocapa confluent necessària per fer clons) per pou. L'endemà, les cèl·lules s'infectaven amb vàries dilucions del sobrenedant de la infecció successiva #20 per poder escollir la condició en que les calbes de virus es formessin sense superposar-se. A les 4h post-infecció, el medi s'eliminava i es substituïa per 2ml d'una mescla 1:1 d'agarosa 1,5% (preparada amb ddH_2O) i medi MEM (suplementat amb 10% de FBS, 1% de glutamina i 1% de penicil·lina i estreptomicina). La capa d'agarosa es cobria amb 2ml de medi MEM suplementat. Les plaques es van mantenir en cultiu fins a observar la formació de calbes d'infecció EGFP positives. Les calbes més grans i aïllades van ser picades amb l'ajuda d'una punta de pipeta estèril i transferides a un pou amb $5 \cdot 10^4$ de les cèl·lules corresponents (PANC-1 o MIA PaCa-2) sembrades el dia anterior en una placa de 24 pous. Quan totes les cèl·lules del pou van mostrar efecte citopàtic, tant cèl·lules com sobrenedant van ser recollides per obtenir un sobrenedant d'homogenat P1 corresponent a cada clon.

De cadascun dels sobrenedants es va realitzar una extracció de DNA genòmic. La regió codificant pels miRNAs va ser amplificada per PCR amb els encebadors step3/4 Fw i Rv i va ser enviada a seqüenciar amb els mateixos encebadors. Amb el programa bioinformàtic Nucleotide BLAST, es va poder identificar el miRNA que codificava cadascun dels clons. Els homogenats dels clons d'interès van ser amplificats i purificats per gradient de CsCl segons es detalla en l'apartat 3.6.2.

3.6.4.3. Anàlisi de fluorescència mitjançant microscopia

La fluorescència emesa per l'EGFP expressada en cèl·lules infectades amb virus es va visualitzar de forma directa per microscòpia estimulant les cèl·lules a una longitud d'ona de 480nm amb el microscopi *Olympus IX51*. Es van capturar imatges a diferents condicions i temps d'infecció i a partir de les quals es va quantificar la intensitat d'EGFP amb el programa informàtic *ImageJ*.

3.6.4.4. Assaig de producció i alliberament de partícules virals

Per tal de portar a terme un assaig de producció i alliberament de partícules virals es van sembrar $5 \cdot 10^4$ cèl·lules de PDAC o 10^5 HPDE per pou en una placa de 24 pous, les quals van ser infectades el dia següent amb la dosi de virus corresponent. El medi va ser canviat a les 4h post-infecció, moment en el que també es van recollir les cèl·lules per de determinar el número de partícules virals que hi havia entrat (veure apartat 3.6.3.2)

Segons el cas, es van recollir les cèl·lules infectades o el medi de cultiu d'aquestes a unes hores post-infecció concretes. Es van quantificar el número de partícules infectives, seguint el procediment de l'apartat 3.6.3.2; i/o el número de genomes virals totals per extracció de DNA genòmic i qPCR amb els encebadors Hexo01 i Hexo02.

3.6.4.5. Assaig de citotoxicitat adenoviral

La citotoxicitat adenoviral es va determinar mesurant la viabilitat cel·lular després d'una infecció de les cèl·lules amb adenovirus mitjançant un assaig MTT, un assaig colorimètric basat en la reducció metabòlica per part dels mitocondris cel·lulars del compost MTT (bromur de 3-(4,5-dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli) a formazà. Aquesta reducció només té lloc a les cèl·lules vives i metabòlicament actives, de manera que l'absorbància del color lila intens del formazà a 550nm és proporcional a la viabilitat del cultiu.

Per portar a terme un estudi de la citotoxicitat adenoviral, $5 \cdot 10^3$ cèl·lules de PDAC o 10^4 HPDE es van sembrar per pou en una placa de 96 pous. El dia següent, les cèl·lules es van infectar amb dilucions seriades de virus. Entre tres i set dies post-infecció, es va mesurar la viabilitat cel·lular per assaig MTT. Les cèl·lules s'incuben durant 30min amb medi suplementat amb 0,7mg/ml de *MTT Ultrapure* (Affymetrix, USB® Products). El formazà és insoluble, de manera que per mesurar-ne l'absorbància és necessari retirar el medi i permeabilitzar les cèl·lules amb dimetil sulfòxid (*DMSO*, Sigma Aldrich). La lectura d'absorbància a 550nm es va realitzar amb l'espectrofotòmetre *Synergy HT* (BioTek).

Els valors de la corba dosi-resposta es van representar relativitzats al valor dels pous amb cèl·lules no infectades (100% de viabilitat). A partir d'aquestes corbes es va

determinar la dosi necessària per eliminar el 50% de les cèl·lules (IC_{50}) per regressió no lineal amb el programa *GraphPad Prism v6.0*.

3.7. Tècniques de manipulació animal

Tots els protocols de manipulació animal realitzats en aquest treball van ser aprovats pel comitè d'ètica de la Universitat de Barcelona, la Direcció General de Polítiques Ambientals i Medi Natural de la Generalitat de Catalunya i seguien les directrius de la Unió Europea per la correcta cura i manipulació dels animals de laboratori 86/609/EEC.

En aquest treball es van utilitzar ratolins d'entre 6 i 8 setmanes i un pes de 20-30g de dues soques diferents: la soca immunocompetent C57BL/6J i la soca immunodeprimida *Athymic Nude Foxn 1nu nu/nu*. Els animals van ser adquirits a ENVIGO i estabulats a l'estabulari SPF de la Facultat de Medicina de la Universitat de Barcelona.

3.7.1. Generació de tumors a ratolins

3.7.1.1. Generació de tumors ortotòpics a pàncrees

Els models de tumor ortotòpic en ratolí són aquells que es generen a l'òrgan del qual procedeix el tumor que s'implanta, en el cas del present treball, al pàncrees. Aquest model permet obtenir un ambient tumoral més semblant al real, així com també l'estudi de formació de metàstasis. Amb el model de tumor ortotòpic és possible perpetuar mostres de tumors humans en ratolins o bé generar tumors a partir de línies cel·lulars humanes de PDAC.

Per implantar un fragment de tumor humà o cèl·lules humanes en ratolí es requereix d'animals immunodeprimits (*Athymic Nude Foxn 1nu nu/nu*) que no generin un rebuig contra cèl·lules que no són de la pròpia espècie. Mitjançant una petita laparotomia al costat esquerra de l'abdomen, s'externalitzen la melsa i el pàncrees. Un fragment de tumor d'aproximadament 1mm^3 es cus a la cua del pàncrees amb fil de sutura de 5/0 evitant pinçar els vasos sanguinis. Els òrgans són retornats a la cavitat abdominal, la capa muscular es sutura amb fil de 4/0 i la pell es grapa amb *Autoclips* (Stoelting Europe). 30min abans de l'operació i durant els dos dies posteriors, s'administra l'analgèsic meloxicam *Metacam®* (Boheringer Ingelheim) als animals. Les

grapes es retiren 7 dies després de l'operació. El procediment és pràcticament idèntic en el cas de generar tumors a partir de línies cel·lulars: les cèl·lules, contingudes en un volum de 50µl de DMEM no suplementat, són injectades a la cua del pàncrees utilitzant una agulla de 29G.

Durant les setmanes posteriors a l'operació es va fer un seguiment del creixement tumoral per palpació abdominal. Els animals es van sacrificar al finalitzar l'experiment, quan el volum tumoral era d'uns $2cm^3$ o quan les condicions generals de benestar de l'animal estaven alterades.

3.7.1.2. Generació de tumors subcutanis

Com en el cas de la generació de tumors ortotòpics, en aquest procediment també és necessari l'ús d'una soca immunodeprimida (*Athymic Nude Foxn 1nu nu/nu*) per evitar que generi rebuig contra les cèl·lules humanes. Igual que amb la generació de tumors ortotòpics, és possible implantar fragments derivats d'adenocarinoma ductal pancreàtic humà o bé línies cel·lulars.

El primer model es genera mitjançant la inserció subcutània d'un fragment d'$1mm^3$ derivat d'un adenocarcinoma ductal pancreàtic humà perpetuat ortotòpicament en ratolí. Concretament, en el present treball es van generar tumors del model $CP15^{137}$.

S'implanten dos fragments per animal, un a cada flanc inferior a sobre de la cuixa. Es realitza una petita incisió a la pell i es crea una cavitat en la qual s'insereix el fragment. La incisió es segella amb cola per teixits *Hystoacryl®* (B. Braun) i una grapa *Autoclips* (Stoelting Europe). La grapa es retira 7 dies després de l'operació.

Per generar tumors a partir de línies cel·lulars, aquestes són injectades subcutàniament a cadascun dels flancs inferiors del ratolí, utilitzant una agulla de 29G. S'administren $2 \cdot 10^6$ MIA PaCa-2 o $2 \cdot 10^6$ PANC-1 per tumor homogeneïtzades amb DMEM sense suplementar en una dilució 1:1 amb *Matrigel® Matrix Basement Membrane HC* (Corning) amb volum final 100µl.

Durant les setmanes posteriors a la implantació del fragment o de les cèl·lules es va monitoritzar el volum tumoral de forma directa utilitzant un peu de rei. Es mesura el diàmetre gran i petit del tumor i es calcula el volum aplicant la següent fórmula:

$$\text{Volum tumoral} = (D \cdot d^2 \cdot \pi) / 6$$

Els animals es van sacrificar al finalitzar l'experiment, quan el volum tumoral era d'1cm^3 o quan les condicions generals de benestar de l'animal estaven alterades.

3.7.2. Administració de virus o fàrmacs *in vivo*

3.7.2.1. Administració sistèmica per via sanguínia

Els tractaments administrats de forma sistèmica per via sanguínia es van realitzar per injecció a la vena lateral de la cua amb una agulla de 29G. Per facilitar l'administració, els animals s'immobilitzaven i a es propiciava la vasodilatació per aplicació de calor.

Els virus, a una dosi de $2{\cdot}10^{10}$, $4{\cdot}10^{10}$ o $5{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí, o el quimioteràpic nab-paclitaxel *Abraxane®* (Celgene), a una dosi de 30mg/kg, es van diluir en solució salina fins al volum final d'administració (100µl).

3.7.2.2. Aministració per via intraperitoneal

L'administració de tractaments per via intraperitoneal es va efectuar per injecció a l'abdomen dels animals amb una agulla de 29G.

El quimioteràpic gemcitabina (Gemzar) s'administrava a una dosi de 100mg/kg, diluït en solució salina fins al volum final d'administració (100µl). El meloxicam *Metacam®* (Boheringer Ingelheim) s'administrava a una dosi de 1-2mg/kg, diluït en solució salina fins al volum final d'administració (50µl). La *firefly D-luciferin* (PerkinElmer, Inc) s'administrava a una dosi de 16mg/kg, diluïda en solució salina fins al volum final d'administració (100µl).

3.7.2.3. Administració intratumoral

L'administració intratumoral d'adenovirus es va portar a terme per injecció directe al tumor amb una xeringa de precisió Hamilton, un cop l'animal es trobava immobilitzat.

Els virus, a una dosi de $2 \cdot 10^{10}$ vp/tumor s'administraven diluïts en solució salina en el menor volum possible: 10-20µl repartits en dues injeccions en axis oposats del tumor per tal de facilitar la màxima difusió del virus en aquest.

3.7.2.4. Administració intraductal pancreàtica a través del conducte biliar comú

Pel fet de ser una tècnica invasiva que requereix de cirurgia laparoscòpica, 30min abans de l'operació, els animals eren tractats amb una dosi de l'analgèsic *Metacam®* (Boheringer Ingelheim), que es va re-administrar durant els tres dies posteriors a la cirurgia.

Els animals van ser anestesiats i la regió abdominal esterilitzada amb solució iodada abans de realitzar-hi una laparotomia d'1cm entre el melic i el xifoide. La pell i la capa muscular es van mantenir separades gràcies a l'acció d'un colibrí retractor. Utilitzant unes pinces d'anell el duodè era exposat i l'ampul·la de Vater localitzada. A continuació, el conducte biliar comú es bloquejava amb uns clamps, tant a prop del fetge com es pogués per tal d'evitar l'arribada del tractament al fetge. Immediatament, una agulla de 30G s'introduïa per l'ampul·la de Vater a través del conducte biliar, on era subjectada amb un clamp, i 50µl del tractament eren injectats molt lentament (aproximadament, 10µl/10s). Un cop finalitzada l'administració s'esperava un minut abans de retirar el clamp duodenal i l'agulla per evitar un retorn del tractament. L'obertura a l'ampul·la de Vater era segellada amb *Hystoacryl®* (B. Braun) i un minut més tard el clamp del conducte biliar era retirat.

Finalment, els òrgans eren retornats a la cavitat abdominal, la qual s'hidratava amb una mica de solució salina, i la capa muscular era suturada amb fil de 4/0 i la pell era grapada amb *Autoclips* (Stoelting Europe). Els animals eren mantinguts sota una font de calor fins a la completa recuperació de l'anestèsia.

3.7.3. Monitorització de la bioluminiscència

En aquest treball es va monitoritzar la bioluminescència generada pels tumors de cèl·lules PANC-1-Luc amb l'equip d'imatge *in vivo Hamamatsu* (Hamamatsu

Photonics) i el reactiu *firefly D-luciferin* (PerkinElmer, Inc). Els valors de bioluminescència obtinguts eren proporcionals a la mida del tumor.

El substrat *firefly D-luciferin* era administrat als ratolins a una dosi de 16 mg/kg 10min abans de procedir a la detecció de luminescència. Els animals eren anestesiats i situats en posició ventral a l'interior del Hamamatsu, amb el qual s'obtenien les imatges que eren posteriorment analitzades amb el software *Wasabi* (Hamamatsu Photonics).

Un cop l'animal era sacrificat, es procedia a la detecció de bioluminescència en òrgans aïllats per tal d'identificar l'existència de metàstasis de cèl·lules Luc positives.

3.7.4. Obtenció d'òrgans i teixits murins

3.7.4.1. Extracció de sang i obtenció del sèrum

L'extracció de grans volums de sang es va realitzar per punció intracardíaca amb una agulla de 26G en animals anestesiats. Un cop finalitzada l'extracció, es practicava l'eutanàsia a l'animal per dislocació cervical.

La sang obtinguda es deixava reposar un mínim de 30min a temperatura ambient i a continuació es centrifugava (3500rpm – 15min). El sèrum era transferit a un tub net i guardat a -80ºC fins al seu anàlisi.

Anàlisi bioquímica dels sèrums

Els sèrums murins van ser analitzats bioquímicament per tal de determinar els nivells d'aspartat aminotransferasa (AST) i alanina aminotransferasa (ALT), indicadors bioquímics sanguinis de dany hepàtic; i lipasa i amilasa, indicadors bioquímics sanguinis de dany pancreàtic. Els anàlisis van ser realitzats pel Servei de Bioquímica Clínica de la Facultat de Veterinària de l'Universitat Autònoma de Barcelona o pel servei d'anàlisis bioquímics de l'Hospital Clínic de Barcelona.

3.7.4.2. Extracció d'òrgans sòlids

Els animals van ser sacrificats per dislocació cervical. A continuació es procedia a l'obtenció dels òrgans per resecció quirúrgica: tumors subcutanis, paquet intestinal, del qual s'aïllava el tumor ortotòpic, el pàncrees i la melsa; fetge, ronyons, múscul esquelètic, pulmons i cor. Els òrgans eren immediatament emmagatzemats en vials i congelats en nitrogen líquid o processats amb tècniques histològiques. Per a la seva conservació les mostres eren congelades a -80ºC.

3.8. Tècniques histològiques

3.8.1. Inclusió de teixits en OCT

Un cop realitzada la resecció dels tumors, un fragment representatiu d'aquests era inclòs, de forma immediata, en un bloc d'OCT.

Els fragments es col·locaven en suports *Criomold* (Tissue-Tek Sakura) en els que prèviament s'havia afegit una mica de matriu crioprotectora *OCT* (Tissue-Tek Sakura). Seguidament, es cobrien amb més OCT i es congelaven ràpidament en neu carbònica. Les mostres es van guardar a -80ºC fins al seu processament.

3.8.2. Immunofluorescència de talls histològics congelats

Les mostres congelades en blocs d'OCT van ser talles en seccions de 5µm de gruix, amb l'ajuda d'un criòstat, i col·locades en porta-objectes tractats amb poly-L-lisina. Els talls histològics van ser realitzats per la plataforma de serveis Biobanc-IDIBAPS. Les crioseccions es van guardar a -80ºC fins al moment de la tinció.

En aquest treball s'han realitzat immunofluorescències de talls congelats per tal de detectar la proteïna adenoviral E1A en tumors d'animals tractats amb adenovirus. La immunofluorescència permet la detecció fàcil i sensible de l'adenovirus, però té l'inconvenient que l'estructura i morfologia del teixit no es conserven bé.

Les seccions es van deixar temperar durant 20min a temperatura ambient per després fixar-les amb una solució de paraformaldehid al 4% durant 5min. A continuació es va realitzar un rentat de 5min amb aigua destil·lada i tres rentats de 5min amb PBS + 0.1% Triton™. Per bloquejar les seccions, aquestes es van incubar durant 1h a temperatura ambient amb 100µl de PBS + 20% sèrum de cabra. Després d'eliminar l'excés de solució de bloqueig, les seccions es van incubar amb 150µl d'anticòs primari, en aquest cas l'anticòs *Adenovirus-2/5 E1A [M73]* (Santa Cruz Biotechnology) diluït 1:50 en PBS + 5% sèrum de cabra, durant tota la nit a 4ºC en una cambra humida. Les seccions que es van utilitzar com a control de l'anticòs secundari es van incubar sense anticòs primari.

L'endemà, les seccions es van deixar temperar durant 20min a temperatura ambient i van realitzar tres rentats de 5min amb PBS + 0,1% Triton™. Seguidament, es van incubar les seccions amb 150µl d'anticòs secundari, en aquest cas l'anticòs *Goat anti-rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa 633* (Invitrogen) diluït 1:200 en PBS + 5% sèrum de cabra, durant 1h a temperatura ambient en una cambra humida. Un cop finalitzada la hibridació, es van realitzar tres rentats de 5min amb PBS + 0,1% Triton™, es van incubar les seccions amb 300µl de DAPI a 100 ng/ml i es van rentar durant 5min amb PBS. Finalment, les seccions van ser recobertes amb una gota de *Vectashield®* (Vector Laboratories) i un cobreobjectes.

Les imatges van ser obtingudes amb el microscopi de fluorescència Nikon i processades amb el programa ImageJ.

3.9. Recursos bioinformàtics

3.9.1. Recursos bioinformàtics relacionats amb miRNAs

Per l'estudi dels miRNAs es van utilitzar els recursos bioinformàtics que es detallen a continuació:

miRBase – base de dades de seqüències i anotacions de miRNAs (Release 21).

microRNA.org – programa bioinformàtic de predicció de dianes de miRNAs basant en els algorismes de conservació de seqüència i de termodinàmica de la unió miRanda (August 2010 release).

miRWalk – programa bioinformàtic d'integració d'algorismes de predicció de dianes de miRNAs. Es van treballar amb els algoritmes de miRWalk, miRanda, miRDB, Pictar2, PITA, RNA22 i TargetScan.

3.9.2. Altres recursos bioinformàtics

Nucleotide BLAST – plataforma bioinformàtica per l'alineament de seqüències de DNA. L'algorisme compara la seqüència problema amb les seqüències d'una base de dades per tal d'identificar les que tenen més homologia. En aquest treball es va utilitzar per a identificar els miRNAs codificats ens els clons bioseleccionats de la AdwtE miR-Lib.

PANTHER GO – programa bioinformàtic que permet classificar una llista de productes gènics en famílies d'ontologia genètica. En el cas d'aquest treball s'hi va carregar la llista de predicció de dianes cel·lulars pels miRNAs candidats.

TCGA (The Cancer Genome Atlas) – base de dades de dades de seqüenciació de teixits tumorals i corresponents teixits sans.

3.10. Representació gràfica i anàlisi estadístic de les dades

3.10.1. Representació gràfica

Les dades obtingudes durant aquest estudi van representar-se com la mitja dels valors ±SEM (error estàndard de la mitja). La majoria dels experiments contenen entre 4 i 6 rèpliques.

La supervivència dels individus al llarg del temps va representar-se amb corbes de Kaplan-Meier. La línia corresponent a la fracció de supervivència d'un grup descendeix cada vegada que un individu mor.

Totes les dades van ser graficades amb el programa *GraphPad Prism v6.0*.

3.10.2. Anàlisi estadístic

3.10.2.1. Anàlisi de comparació de mitges

Les dades obtingudes en aquest treball van ser analitzades per comparació de mitges sense assumir normalitat de la mostra amb el test estadístic Mann-Whitney U o amb el t-test ones ample, que compara la mitja dels valors amb el valor de referència 1, amb el suport del programa *GraphPad Prism v6.0*.

Les diferències es van considerar significativament diferents quan s'obtenia un p valor inferior a 0,05. Els p valors van marcar-se sobre les dades mitjançant asteriscs: (*), (**) i (***) per p valors inferiors a 0,05, 0,01, 0,001, respectivament.

3.10.2.2. Anàlisi de progressió tumoral i pèrdua de pes al llarg del temps

Els valors de volum tumoral o pèrdua de pes al llarg del temps dels diferents grups van ser comparats mitjançant models lineals mixtes en R v2.14.1 utilitzant el paquet lme4. Les diferències entre mitges es van avaluar amb el test de contrasts de Turkey.

3.10.2.3. Anàlisi de les corbes de supervivència

Les supervivències de dos grups representades en una corba de Kaplan-Meier van ser comparades mitjançant el test estadístic no paramètric log-rank amb el programa *GraphPad Prism v6.0*. Aquet test compara la funció d'estimació del risc dels dos grups estudiats al llarg del temps.

Taula 3.1. Taula d'encebadors

Encebadors utilitzats per la modificació de plasmidis mitjançant el sistema AdZ

Set	Nom	Seqüència (5' → 3')
1	Fiber-GFP Fw	caattggtactaagcggtgatgtttctgatcagccaccATGGTGAGCAAGGGCGAGG
	Fiber-GFP Fw	gacttgaaattttctgcaattgaaaaataaagtttattaCTTGTACAGCTCGTCCATGC
2	GFP_seq Fw	CTGGTCTGGCCACAACTACA
	GFP_seq Rv	GGAGGTGGCAGGTTGAATAC
3	RpsLNeo Fib Fw	aaggctatggttcctaaactaggaactggccttagttttgGGCCTGGTGATGATGGCG
	RpsLNeo Fib polyA Rv	gtaccaattgaaaaataaacacgttgaaacataacacaaagcagtgaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttattTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG
4	Fibra WT Fw	aaggctatggttcctaaactaggaactggccttagttttgACAGCACAGGTGCCATTAC
	Fibra WT Rv	gtaccaattgaaaaataaacacgttgaaacataacacaaaCGATTCTTTATTCTTGGGCAATG
5	Fibra WT testar Fw	AGCCATTAATGCAGGAGATGGGC
	Fibra WT testar Rv	TGAACTTGTGGCCGTTTACGTCG
6	RpsLNeo E1A Fw2	ggcggatgttgtagtaaatttgggcgtaaccgagtaagatttggccGGCCTGGTGATGATGGCG
	RpsLNeo E1A polyA Rv	atcacccactgcccataattttcacttactgtagacaaacgcagtgaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttattTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCG
7	E1A WT Fw	gtagtgtggcggaagtgtgatgttgcaagtgtggcggaacACATGTAAGCGACGGATGTG
	E1A WT Rv	atcacccactgcccataattttcacttactgtagacaaacATGCCACAGGTCCTCATATAGC
8	E1A WT testar Fw	TTACCCTGTTATCCCTACATCATC
	E1A WT testar Rv	ACTGGTTTAATGGGGCACAG
9	E4-RpsLNeo Fw	gaaaactacaattcccaacacatacaagttactccgccctaagcagtgaaaaaatgctttatttgtgaaatttgtgatgctattgctttattTCAGAAGAACTCGTCA
	E4-RpsLNeo Rv	cgtggcgcggggcgtgggaacggggcgggtgacgtaggttGGCCTGGTGATGATG
10	E4-miRNA cua 2 Fw	gaaaactacaattcccaacacatacaagttactccgccctaaCTTTTATTTTATCGAATCTGC
	E4-miRNA cua Rv	cgtggcgcggggcgtgggaacggggcgggtgacgtaggttACATTGATTATTGACTAG
11	Step3/4 Fw	CCAGAAACGAAAGCCAAAAA
	Step3/4 Rv	TAATGAGGGGGTGGAGTTTG

12	RpsLNeo 3' Fibra testar Fw	ACTGCCAAAAGTAACATTGTCAGTCAAG
	RpsLNeo 3' Fibra testar Rv	GATGAGCGTTTGGCTCGACAGG

Encebadors utilitzats per qPCR

Set	Nom	Seqüència (5' → 3')
13	MMP-2 Fw	TGATGGCATCGCTCAGATCC
	MMP-2 Rv	CACAGCCTTCTCCTCCTGTG
14	MMP-9 Fw	TCACCTTCACTCGCGTGTAC
	MMP-9 Rv	GAAATGGGCGTCTCCCTGAA
15	E1A Fw	ATCGAAGAGGTACTGGCTGA
	E1A Rv	TTCCTCCGGTGATAATGACAAGACCTGCAAC
16	qPCR-Hexon Fw	GTCTACTTCGTCTTCGTTGTC
	qPCR-Hexon Rv	TGGCTTCCACGTACTTTG
17	qPCR-Fiber Fw	CTCCAACTGTGCCTTTTC
	qPCR Fiber Rv	GGCTCACAGTGGTTACATT
18	Hexo01	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC
	Hexo02	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAG
19	Albumin Fw	GCTGTCATCTCTTGTGGGCTGT
	Albumin Rv	GGCTATCCAAACTCATGGGAG
20	5' E4 Fw	GCCAAGTGCAGAGCGAGTAT
	Adwt R-ITR Rv2	CGGGGCGGGTGACGTAGGTTTTA
	AdmiR-99b Rv	CTATACGGCCTCCTAGCTTTCCGAATTC
	AdmiR-485 Rv	CTGGGGCACTACCAACTTTAGGCAATTC
21	E1A total Fw	TCCGGTCCTTCTAACACACC
	E1A total Rv	GGCGTTTACAGCTCAAGTCC

22	E1A 13S+12S Fw	TTTTGAACCACCTACCCTTC
	E1A 11S+10S Fw	GATCGAAGAGCCCGAGCA
	E1A 13S+11S Rv	CCACAGGTCCTCATATAGCAAA
	E1A 12S+10S v2 Rv	CAGGTTCAGACACAGGACCC
	E1A 9S v2 Fw	TGATCGAAGAGGTCCTGTGTCT
	E1A 9S Rv	TCAGGATAGCAGGCGCCA
23	SRPK1 Fw	GATATTCAGGGGAAGAAATTTG
	SRPK1 Rv	ATCCACTTGAGCAGATGATG
24	ELF4 Fw	TCCTGGATGAGAAGCAGATCTTCA
	ELF4 Rv	ATGGTGCTGCCTTTGCCATC
25	KLF8 Fw	TGCTGGATCAGTGAAAGTTGACC
	KLF8 Rv	TTTATAAGGCTTCTCTCCTGTATGGATTCTG
26	MDM2 Fw	ACAAGAGACCCTGGTTAGACCAAAG
	MDM2 Rv	CCTGAGTCCGATGATTCCTGCTG
27	ACTB Hs Fw	CTGGAACGGTGAAGGTGACA
	ACTB Hs Rv	GGGAGAGGACTGGGCCATT
28	GAPDH Fw	TGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGA
	GAPDH Rv	TTACTCCTTGGAGGCCATGTGGG
29	GDX Fw	GGCAGCTGATCTCCAAAGTCCTGG
	GDX Rv	AACGTTCGATGTCATCCAGTGTTA

Taula 3.2. Taula sondes Taqman™ microRNAs Assay (ThermoFisher Scientific)

ID	Nom de l'assaig	Cadena reconeguda	Seqüència de la diana
001093	RNU6B		CGCAAGGATGACACGCAAATTC GTGAAGCGTTCCATATTTTT
000470	hsa-miR-148a-3p	hsa-miR-148a-3p	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU
002196	hsa-miR-99b*	hsa-miR-99b-3p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG
000436	hsa-miR-99b	hsa-miR-99b-5p	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG
001277	hsa-miR-485-3p	hsa-miR-485-3p	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU
001036	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-485-5p	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC

Taula 3.3. Taula d'anticossos primaris

Anticossos primaris	Casa comercial	Referència	Mida molecular (KDa)	Membrana	Dilució	Condicions d'hibridació
Adenovirus-2/5 E1A [M73]	Santa Cruz Biotechnology	Sc-25	48-54	Nitrocel·lulosa	1/200 (WB) 1/50 (IF)	1h – T.A.
Adenovirus type 5 (hexó)	ABCAM	ab6982	107	Nitrocel·lulosa	1/200	1h – T.A.
Adenovirus type 5 (pentó)	ABCAM	ab6982	64	Nitrocel·lulosa	1/200	1h – T.A.
Adenovirus fiber trimer [2A6]	GeneTex	GTX23232	62	Nitrocel·lulosa	1/200	1h – T.A.
ELF4 [AB1]	Sigma Aldrich	AV38028	71	PVDF	1/500	O/N – 4ºC
KLF8	Aviva Systems Biology	ARP32859_P050	39	PVDF	1/1000	O/N – 4ºC
MDM2 [SM14]	Santa Cruz Biotechnology	sc-965	90/60	PVDF	1/200	O/N – 4ºC
GAPDH	Merck Millipore	ABS16	38-40	Nitrocel·lulosa / PVDF	1/10000	1h – T.A. / O/N – 4ºC
Alpha-tubulin	Sigma Aldrich	T9026	50	PVDF	1/500	O/N – 4ºC

Taula 3.4. Taula d'anticossos secundaris

Anticossos secundaris	Casa comercial	Referència	Dilució	Condicions d'hibridació
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins HRP	Agilent Technologies (DAKO)	P0161	1/2000	1h – T.A.
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins HRP	Agilent Technologies (DAKO)	P0160	1/2000	1h – T.A.
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 633	Invitrogen	A-21071	1/500	1h – T.A.

Taula 3.5. Taula de virus

Nom	Aïllant	Promotor E1A	E1A	Fibra	Transgèn	Sistema de generació	Origen
AdTL	-	Delecionat	Delecionat	Salvatge	Luciferasa / GFP	AdEasy	Dr. Alemany
AdYTRGE	-	Delecionat	Delecionat	YTRGE	Luciferasa / GFP	AdEasy	Jose, A. i col.[141]
AdTATMMP	-	Delecionat	Delecionat	TATMMP	Luciferasa / GFP	AdEasy	Jose, A. i col.[141]
$Ad^{RC}MMP$	-	Salvatge	Salvatge	TATMMP	-	AdEasy	Jose, A. i col.[141]
Adwt	-	Salvatge	Salvatge	Salvatge	-	-	ATCC
AdNuPARmE1A	SINE	uPAR modificat	Salvatge	Salvatge	-	AdEasy	Mato, A. i col.[107]
PANCAd	SINE	uPAR modificat	Salvatge	TATMMP	-	AdEasy	Treball màster N. Moragas
PANCAd Fwt	SINE	uPAR modificat	Salvatge	Salvatge	-	AdEasy	Treball màster N. Moragas
AdwtE	-	Salvatge	Salvatge	Salvatge	EGFP	AdZ	En aquesta tesi
AdwtE miR-Lib	-	Salvatge	Salvatge	Salvatge	EGFP / miR-Lib	AdZ	En aquesta tesi
AdwtE miR-99b	-	Salvatge	Salvatge	Salvatge	EGFP / miR-99b	AdZ	En aquesta tesi

AdwtE miR-485	-	Salvatge	Salvatge	Salvatge	EGFP / miR-485	AdZ	En aquesta tesi
AdwtE hTR	-	Salvatge	Salvatge	Salvatge	EGFP / snRNA hTR	AdZ	En aquesta tesi
ICOVIR15	-	Salvatge modificat	Δ24	RGD en HI-Loop	-	AdZ	En aquesta tesi / Rojas, i col.[108]
ICOVIR15 miR-99b	-	Salvatge modificat	Δ24	RGD en HI-Loop	miR-99b	AdZ	En aquesta tesi
ICOVIR15 miR-485	-	Salvatge modificat	Δ24	RGD en HI-Loop	miR-485	AdZ	En aquesta tesi

4. RESULTATS

4.1. Combinació d'estratègies de direccionament a tumor per conferir als adenovirus una capacitat oncolítica selectiva

L'adenocarcinoma ductal pancreàtic és una neoplàsia amb una gran capacitat invasiva[8], de manera que els tractaments per combatre-la han de ser administrats per via sistèmica. Per administrar adenovirus oncolítics de forma segura a través d'aquesta via és necessari restringir la seva transducció i replicació únicament a cèl·lules tumorals, evitant l'afectació de cèl·lules sanes. Per aconseguir-ho, modifiquem genèticament els adenovirus seguint estratègies de direccionament a tumor basades en factors que es trobin desregulats en l'adenocarcinoma ductal pancreàtic.

En aquest treball s'han estudiat modificacions genètiques que regulen l'entrada del virus a la cèl·lula i l'expressió del gen *E1A* a nivell transcripcional i post-transcripcional per tal de conferir selectivitat antitumoral als adenovirus.

4.1.1. La modificació genètica activable per metal·loproteases TATMMP permet augmentar l'activitat antitumoral i millorar la toxicitat pancreàtica dels adenovirus administrats per via intraductal a pàncrees

Els resultats d'aquest apartat es troben publicats a l'article *A genetic fiber modification to achieve matrix-metalloprotease-activated infectivity of oncolytic adenovirus. José, A*., Rovira-Rigau, M*., et al. Journal of Controlled Release, 192:148-156 (2014)*[141] *igual contribució.

El receptor canònic adenoviral CAR sol tenir una expressió baixa en cèl·lules neoplàsiques[142] i per tant, per tal d'obtenir una bona transducció a les cèl·lules tumorals i disminuir l'entrada a les cèl·lules sanes és convenient modificar el tropisme dels adenovirus. Amb aquest objectiu, al laboratori es va generar un adenovirus amb una modificació genètica a la fibra consistent en l'ablació del domini d'unió al receptor

CAR i al factor de coagulació IX[100] (mutació YTRGE), i en l'addició d'un pèptid de transducció TAT-*like* (TAT*) al domini *knob* per tal de recuperar l'eficiència de transducció del virus[143]. El pèptid TAT* estava bloquejat per interacció electrostàtica amb una tira de glutàmics, a la qual es trobava unit a través d'un connector amb la seqüència de tall de les metal·loproteases de matriu MMP-2 i MMP-9. Amb aquesta estratègia es pretenia donar selectivitat de transducció al virus. En un ambient tumoral, caracteritzat per una elevada presència de metal·loproteases a la matriu extracel·lular[34], les metal·loproteases MMP-2 i MMP-9 actuarien sobre el connector i alliberarien el pèptid de bloqueig deixant el pèptid TAT* exposat i actiu. Aquesta modificació genètica a la fibra rep el nom de TATMMP.

Prèviament a la realització d'aquesta tesi, José, A. i col. varen validar que el virus reporter que incorporava la modificació a la fibra, l'AdTATMMP, presentava una transducció activada per metal·loproteases. La transducció de l'AdTATMMP es veia incrementada en cèl·lules resistents a l'entrada del virus de fibra salvatge AdTL, segurament a causa d'una expressió reduïda de CAR en aquestes, i correlacionava amb els nivells d'expressió d'mRNA d'*MMP-2* i *MMP-9*. El virus AdTATMMP va mostrar una transducció augmentada del teixit tumoral en diversos models *in vivo* de càncer de pàncrees, amb tumors en el propi pàncrees, així com també una reducció dels nivells d'entrada a teixit pancreàtic sa després d'una administració sistèmica o intraductal pancreàtica a través del ducte biliar[141].

En el marc d'aquesta tesi, es va procedir a la generació d'un adenovirus replicatiu que incorporés la modificació genètica a la fibra, l'Ad^{RC}MMP (Figura 4.1), per tal de testar la seva activitat oncolítica selectiva.

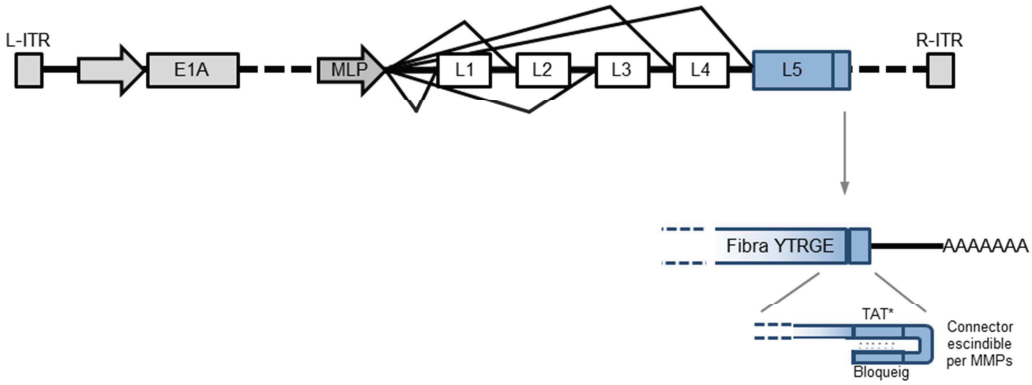


Figura 4.1. Representació esquemàtica del genoma de l'adenovirus Ad^{RC}MMP. L'esquema mostra la modificació genètica TATMMP incorporada a l'extrem C-terminal de la fibra adenoviral.

4.1.1.1. El virus Ad^{RC}MMP mostra una activitat oncolítica i antitumoral augmentades en diferents models tumorals

La primera característica testada del virus Ad^{RC}MMP va ser la seva citotoxicitat en línies cel·lulars tumorals, comparant-lo amb l'adenovirus salvatge Adwt. Les línies cel·lulars de PDAC PANC-1 i RWP-1, la línia cel·lular de fibrosarcoma HT1080 i el cultiu primari de fibroblasts associats a tumor CAF-28, derivats d'una mostra de pacient de PDAC, varen ser infectats amb dosis creixents d'Adwt i Ad^{RC}MMP. Per poder magnificar els efectes de la transducció mitjançada per la fibra TATMMP, es va mesurar la citotoxicitat als cinc dies post-infecció, de manera que els virus completaven més d'un cicle de replicació. La viabilitat de les cèl·lules PANC-1, HT1080 i RWP-1 va ser analitzada per assaig MTT, mentre que pels CAF-28, que processen el compost MTT de forma molt lenta, es va utilitzar un assaig per tinció amb blau de metilè. L'efecte citotòxic del virus Ad^{RC}MMP era superior al de l'Adwt a totes les dosis virals en cèl·lules PANC-1, HT1080 i CAF-28 (Figura 4.2A, B i D), però inferior en cèl·lules RWP-1 (Figura 4.2C). Els resultats obtinguts estan en consonància amb la capacitat d'entrada del virus salvatge a les cèl·lules (RWP-1, HT1080 i PANC-1, per ordre de facilitat de transducció amb un virus de fibra salvatge)[141], i amb els nivells d'expressió de les metal·loproteases de matriu *MMP-2* i *MMP-9*, analitzats per RT-qPCR (Figura 4.2E).

José, A. i col. havien determinat que la modificació TATMMP augmentava l'entrada del virus a cèl·lules PANC-1 i la reduïa en RWP-1[140]. Es va voler determinar si aquestes diferències de transducció afectarien la producció viral i per tant, amplificarien les diferències entre virus a mesura que es produïssin cicles de replicació. Cèl·lules PANC-1 i RWP-1 varen ser infectades a una dosi de 50 vp/cèl·lula d'Adwt o Ad^{RC}MMP i als tres i cinc dies post-infecció es varen recollir extractes cel·lulars totals. Per qPCR es va determinar el número de genomes virals presents a la mostra. D'acord amb els resultats de citotoxicitat, el virus Ad^{RC}MMP presentava un rendiment de producció viral de fins a 33 vegades superior al del virus Adwt al cap de 5 dies d'infecció en cèl·lules PANC-1, mentre que en cèl·lules RWP-1 l'efecte era el contrari (Figura 4.2F).

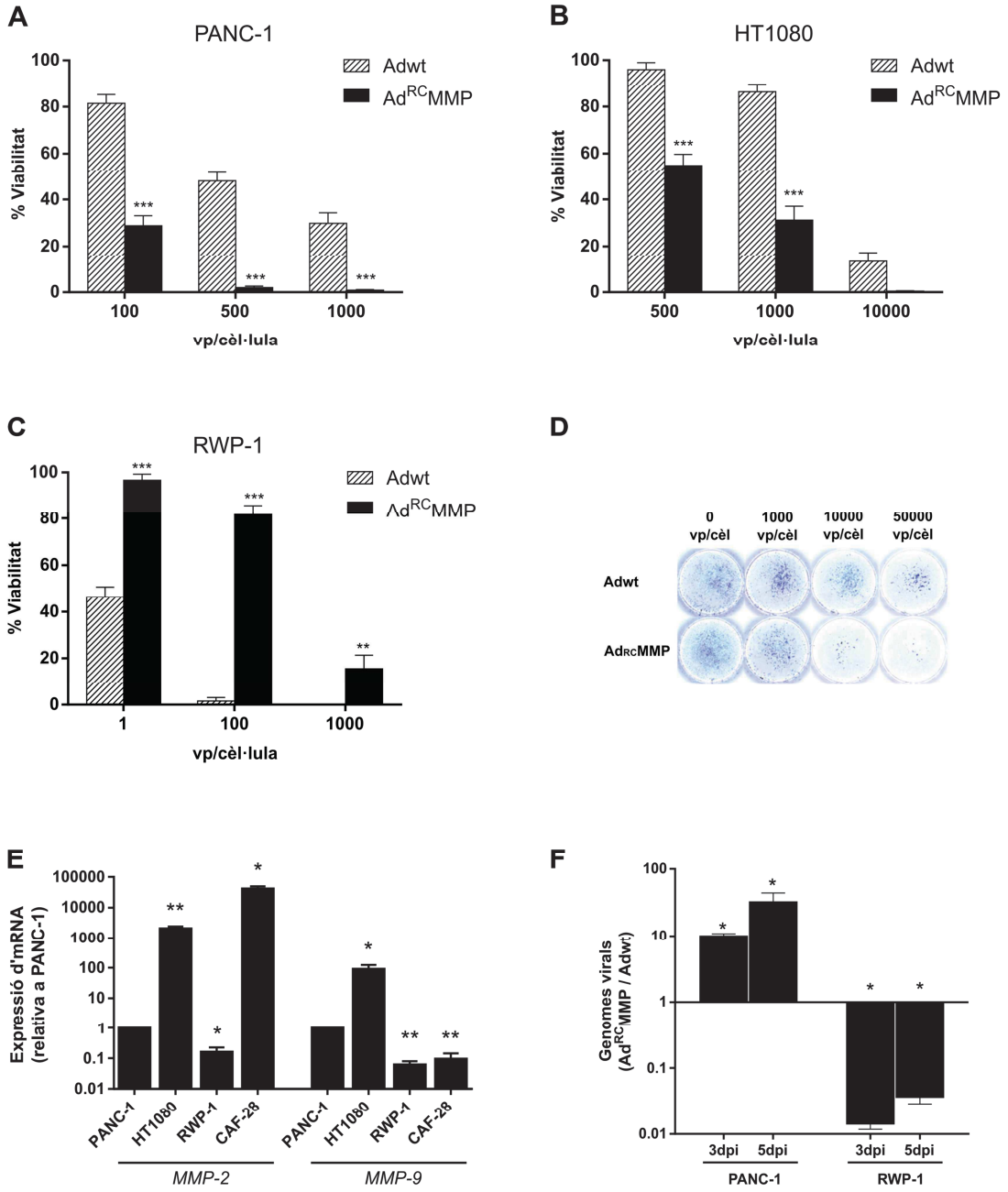


Figura 4.2. Les diferències de transducció causades per la modificació TATMMP a la fibra afecten la capacitat citotòxica i de producció viral de l'adenovirus Ad^{RC}MMP.

A, B i C. Valors de viabilitat cel·lular de cèl·lules PANC-1, HT1080 o RWP-1, determinats per assaig MTT, als cinc dies post-infecció amb els adenovirus Adwt i Ad^{RC}MMP.

D. Viabilitat cel·lular dels CAF-28 als cinc dies post-infecció amb Adwt i Ad^{RC}MMP. Imatge representativa d'una tinció amb blau de metilè.

E. Quantificació relativa, per RT-qPCR, dels nivells d'expressió d'mRNA de *MMP-2* i *MMP-9*. Els nivells de *GAPDH* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió. Les dades es donen com a valors relatius als nivells d'expressió en PANC-1.

F. Quantificació, per qPCR, de la producció de genomes virals en cèl·lules PANC-1 i RWP-1 tres i cinc dies després de la infecció amb 50 vp/cèl·lula d'Adwt i Ad^{RC}MMP.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim tres experiments independents. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

A continuació, es va procedir a avaluar l'activitat antitumoral del virus Ad^{RC}MMP *in vivo*. Es varen generar tumors ortotòpics mixtes de cèl·lules PANC-1-Luc i fibroblasts CAF-28 al pàncrees de ratolins immunodeprimits atímic *nude*. Les cèl·lules PANC-1-Luc expressen el gen de la luciferasa de *firefly*, que permet fer un seguiment del creixement del tumor. Es varen injectar 350.000 cèl·lules a una proporció PANC-1-Luc:CAF-28 de 10:1 a la cua del pàncrees i quan els tumors varen tenir una bioluminescència de $5 \cdot 10^3$ fotons/s es va administrar una dosi de solució salina o de $5 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí d'Adwt o Ad^{RC}MMP a través del ducte pancreàtic.

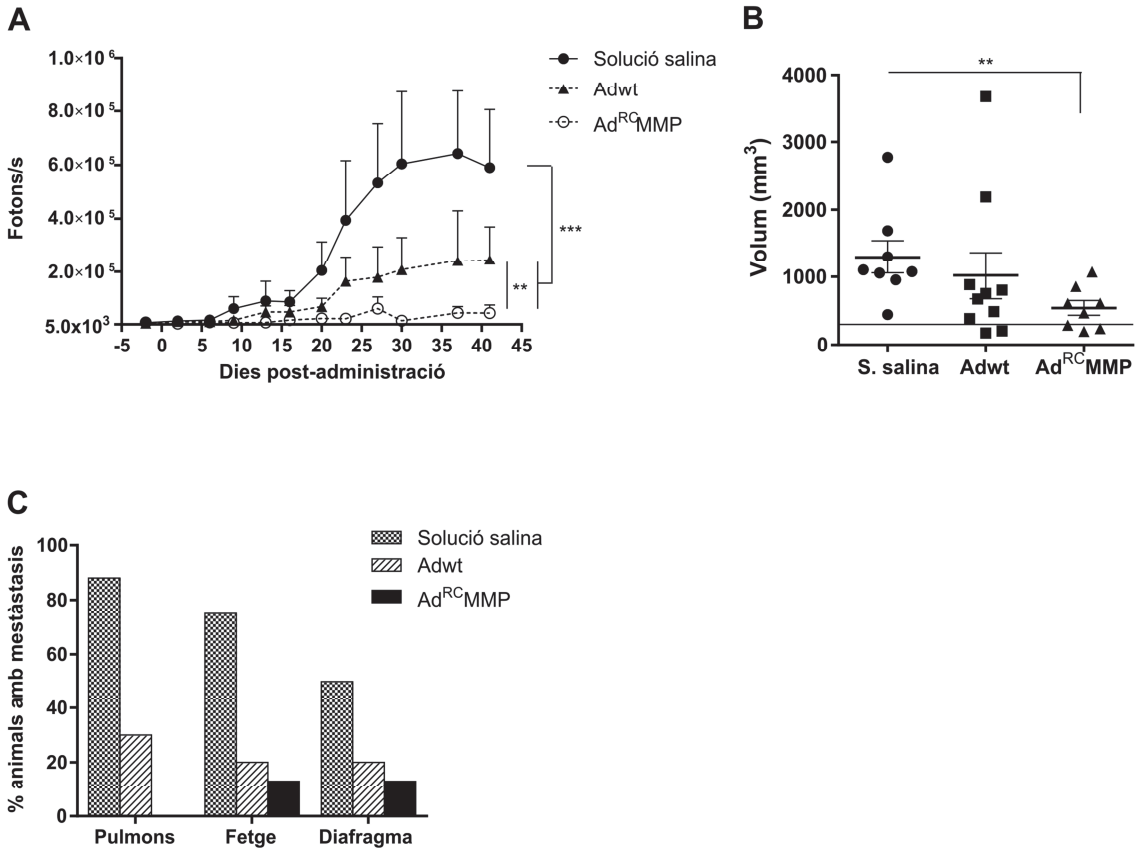


Figura 4.3. El virus oncolític Ad^{RC}MMP presenta una activitat antitumoral millorada en tumors ortotòpics mixtes PANC-1-Luc/CAF-28

A. Seguiment de la bioluminescència de tumors ortotòpics de cèl·lules PANC-1-Luc/CAF-28, implantats al pàncrees d'animals immunodeprimits atímics *nude*, després del tractament amb solució salina (n=8) o $5 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí d'Adwt (n=10) o Ad^{RC}MMP (n=10) per via intraductal pancreàtica.

B. Valors de volum pancreàtic total (pàncrees + tumor) al moment del sacrifici dels animals. La línia correspon al volum d'un pàncrees de ratolí sa.

C. Percentatge d'animals amb presència de focus metastàtics a pulmons, fetge i diafragma al moment del sacrifici.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

El creixement dels tumors va ser monitoritzat per bioluminescència, evidenciant que el virus $Ad^{RC}MMP$ permetia un control significatiu del creixement tumoral i millor que el del virus parental de fibra salvatge Adwt (Figura 4.3A). Passats 42 dies de l'administració dels tractaments, els animals varen ser sacrificats i es va procedir a la mesura del volum pancreàtic final (pàncrees + tumor) i a la detecció de metàstasis a pulmons, fetge i diafragma. Tal com s'havia observat amb els valors de bioluminescència, els virus Adwt i $Ad^{RC}MMP$ varen reduir de forma significativa el volum pancreàtic, conduint a la regressió tumoral en 2 de 10 i 3 de 8 animals, respectivament (Figura 4.3B). Els tractaments amb virus varen reduir el percentatge d'animals amb focus metastàtics, especialment en el cas de l'$Ad^{RC}MMP$ a pulmons, on no se'n detectaren a cap animal (Figura 4.3C). Així doncs, l'$Ad^{RC}MMP$ presentava una bona capacitat antitumoral en aquest model tumoral.

4.1.1.2. La modificació TATMMP millora el perfil de toxicitat dels adenovirus després d'una administració intraductal al pàncrees però no després d'una administració sistèmica

En una administració intraductal a pàncrees, el tractament arriba a la part tumoral però també a la part sana de l'òrgan, de manera que el virus podria causar una toxicitat pancreàtica. Per tant, calia estudiar el perfil de toxicitat pancreàtica que es derivava de la injecció d'Adwt i $Ad^{RC}MMP$ per aquesta via en animals immunocompetents.

Els adenovirus Adwt i $Ad^{RC}MMP$, a una dosi de $5 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí, varen ser injectats intraductalment al pàncrees d'animals immunocompetents C57BL/6J. Quatre dies post-administració, els animals varen ser sacrificats i es varen analitzar els nivells d'amilasa i de lipasa en sèrum, indicadors de dany pancreàtic. L'administració del virus Adwt va comportar un augment significatiu dels nivells d'aquests marcadors en sèrum, mentre que després de l'administració d'$Ad^{RC}MMP$ aquest augment no es va produir (Figura 4.4A i B). Aquests resultats, estan en concordança amb la disminució de la transducció del pàncrees sa observada per José, A. i col. amb el virus reporter AdTATMMP[141] i demostren que la modificació genètica a la fibra millora el perfil de toxicitat després d'una administració intraductal del virus.

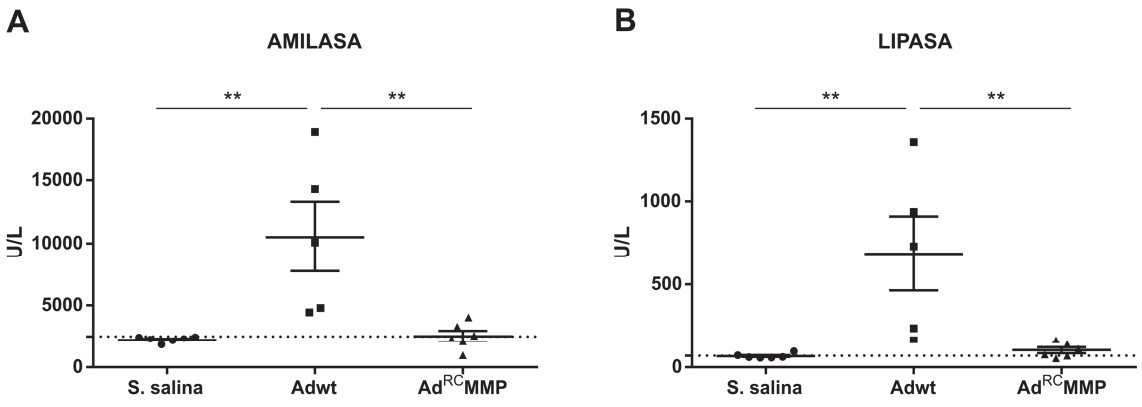


Figura 4.4. Els virus amb fibra TATMMP permeten una disminució de la toxicitat pancreàtica després d'una administració intraductal.

Estudi de la toxicitat pancreàtica en animals immunocompetents C57BL/6J passats quatre dies de l'administració de solució salina (n=6) o $5{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí d'Adwt (n=5) o $Ad^{RC}MMP$ (n=6) per via intraductal a pàncrees.

A. Valors d'amilasa al sèrum dels animals tractats.

B. Valors de lipasa al sèrum dels animals tractats.

** $p<0.01$

Tot i que l'administració intraductal de l'$Ad^{RC}MMP$ permetia un bon control del creixement tumoral, calia valorar si aquest efecte també es donava després de l'administració del virus per via sistèmica. Per una banda, l'administració intravenosa és una via més accessible que la intraductal i, per altra banda, facilita que el virus arribi als focus metastàtics. En primer lloc es va voler estudiar si el virus modificat a la fibra s'acumulava específicament a algun òrgan després d'una administració per via sanguínia, posant especial atenció al fetge, òrgan diana dels adenovirus en aquest tipus d'administracions; i teixits com el múscul esquelètic o epitelial glandular (ronyons), els quals presenten expressió de metal·loproteases[144].

Els adenovirus reporters AdTL, amb fibra salvatge; AdYTRGE, amb la fibra que incorpora la mutació YTRGE; i AdTATMMP, amb la fibra TATMMP; varen ser administrats a una dosi de $5{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí intravenosament a animals immunocompetents. Quatre dies post-injecció, els animals varen ser sacrificats i es va mesurar l'activitat luciferasa *ex vivo* en una bateria d'òrgans. Es va observar una disminució de l'activitat luciferasa a fetge, pulmons i melsa, la qual denotava que la modificació genètica TATMMP permetia una reducció de la transducció d'aquests òrgans. En teixits on hi havia alta expressió de metal·loproteases, el virus AdTATMMP

presentava uns nivells de transducció similars als del virus de fibra salvatge AdTL (Figura 4.5A).

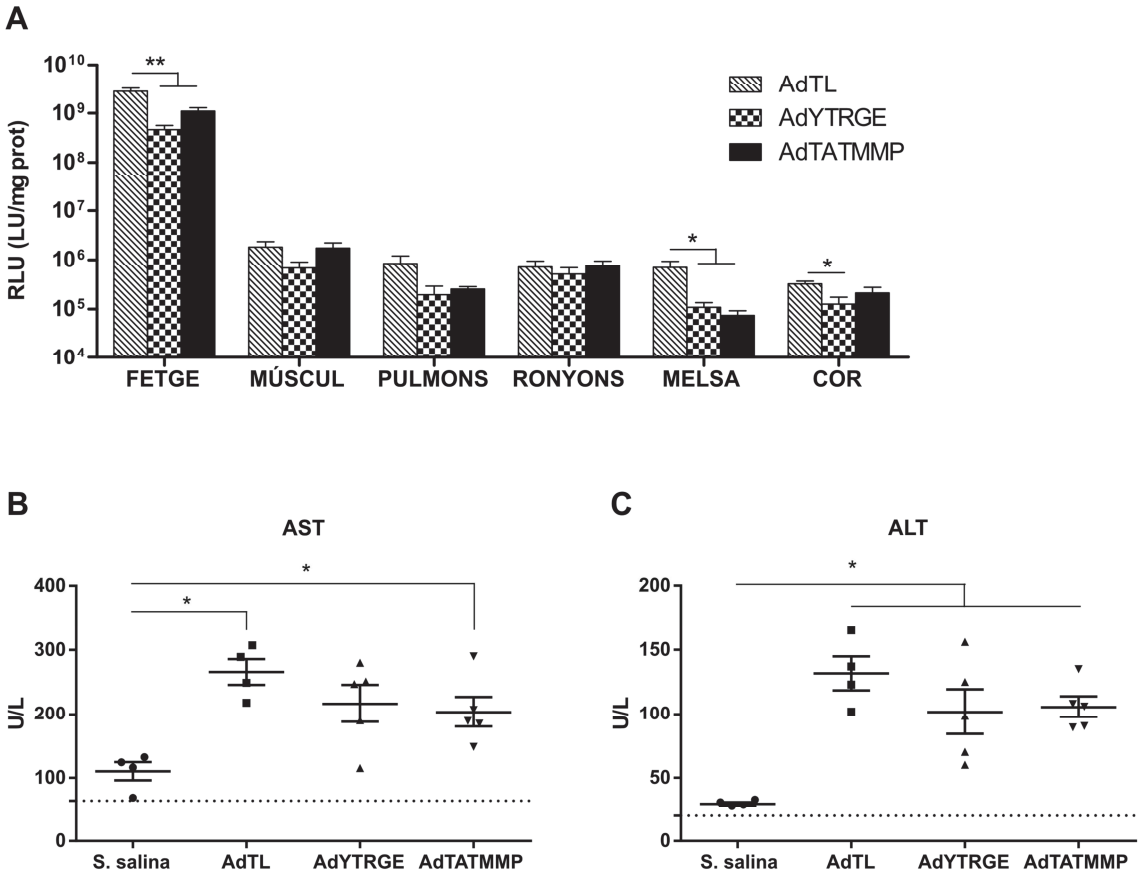


Figura 4.5. La fibra TATMMP redueix la transducció adenoviral a fetge però no disminueix la toxicitat hepàtica després d'una administració sistèmica.

Animals immunocompetents C57BL/6J varen ser administrats intravenosament amb una dosi de solució salina (n=4) o $5{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí d'AdTL (n=4), AdYTRGE (n=5) o AdTATMMP (n=5). Quatre dies després, els animals varen ser sacrificats.

A. Anàlisi per assaig luciferasa *ex vivo* de la biodistribució adenoviral en una bateria d'òrgans dels animals tractats. RLU (*Relative Light Units*).

B. Estudi de la toxicitat hepàtica per determinació dels valors d'AST en el sèrum dels animals tractats.

C. Estudi de la toxicitat hepàtica per determinació dels valors d'ALT en el sèrum dels animals tractats.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

En aquests animals també es va estudiar la toxicitat hepàtica mesurant els valors de transaminases AST i ALT en sèrum. La toxicitat observada va ser similar entre els tres tractaments amb virus (Figura 4.5B i C). Encara que el virus AdTATMMP reduís la transducció a fetge, la modificació a la fibra no era suficient per millorar el perfil de toxicitat hepàtica d'un adenovirus de fibra salvatge en una administració sistèmica.

4.1.1.3. La modificació genètica a la fibra TATMMP redirigeix l'entrada de l'adenovirus a l'endocitosi per caveoles

El fet d'alterar la transducció de l'adenovirus a la cèl·lula amb la incorporació d'una modificació genètica a la fibra, feia necessària la comprovació de l'ablació del tropisme pel receptor CAR i investigar per quin mecanisme podia tenir lloc l'entrada a la cèl·lula.

Primer, es va valorar la independència del receptor CAR en la transducció del virus de fibra modificada AdTATMMP. Cèl·lules RWP-1, les quals presenten una bona transducció depenent de CAR, varen ser infectades amb 10^3 vp/cèl·lula dels virus reporters AdTL, AdYTRGE i AdTATMMP. Per tal de bloquejar el receptor CAR i evitar una entrada depenent d'aquest, les infeccions es varen realitzar en presència de concentracions creixents d'AdTL inactivat per calor 5 minuts a 56ºC (AdTLi), condicions a les quals el virus deixa de ser infectiu però les fibres i hexons mantenen la seva estructura i capacitat d'interacció[145]. Es va poder observar que la màxima concentració d'AdTLi bloquejava la transducció CAR-depenent del virus AdTL, mentre que amb els virus que incorporaven la mutació YTRGE (AdYTRGE i l'AdTATMMP), aquest bloqueig no es produïa. Aquests resultats, doncs, validaven que el virus de fibra TATMMP té una transducció cel·lular independent de CAR (Figura 4.6A).

A continuació, es va estudiar la via alternativa que utilitzava el virus AdTATMMP per entrar a les cèl·lules. S'ha descrit que l'adenovirus serotip 5 utilitza la via d'endocitosi mitjançada per vesícules de clatrina[91], mentre que el pèptid TAT facilita una endocitosi mitjançada per caveoles[146]. Així doncs, cèl·lules HT1080, que es transdueixen bé amb virus de fibra salvatge i de fibra TATMMP, varen ser infectades amb 10^3 vp/cèl·lula dels virus reporters AdTL, AdYTRGE i AdTATMMP en presència de clorpromazina i Fillipin III, inhibidors de l'endocitosi mitjançada per vesícules de clatrina i depenent de caveoles, respectivament. El tractament amb clorpromazina no va tenir efectes inhibidors en la capacitat de transducció de cap dels tres virus (Figura 4.6B), mentre que el tractament amb Fillipin III va inhibir de forma específica l'entrada

del virus AdTATMMP a la cèl·lula (Figura 4.6C), indicant que el pèptid TAT* facilitaria la transducció a través d'una endocitosi depenent de caveoles.

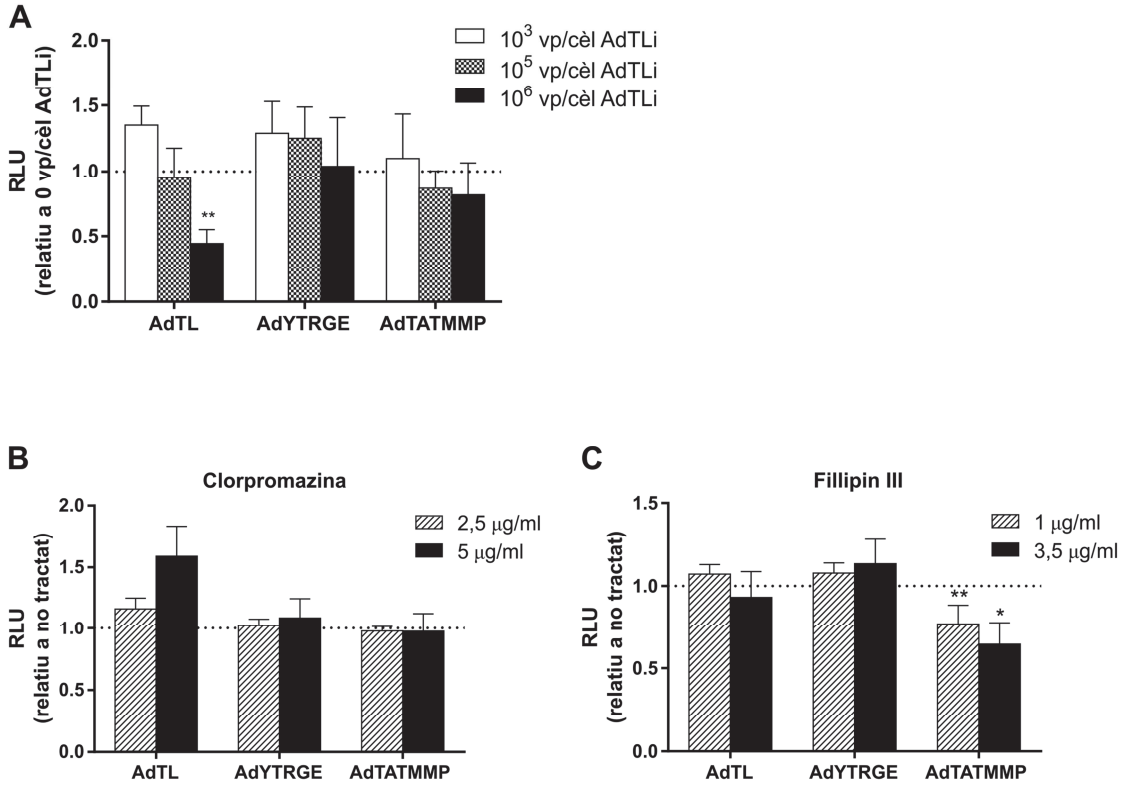


Figura 4.6. La transducció del virus AdTATMMP és independent de CAR i té lloc a través de l'endocitosi mitjançada per caveoles.

A. Assaig luciferasa de l'estudi de transducció dependent de CAR dels virus AdTL, AdYTRGE i AdTATMMP. Cèl·lules RWP-1 varen ser infectades amb 10^3 vp/cèl·lula de cadascun dels virus en presència de concentracions creixents d'AdTLi (5' a 56ºC). Els valors de luciferasa varen ser mesurats 72 hores post-transducció.

B. Assaig luciferasa de l'estudi de la transducció dels virus AdTL, AdYTRGE i AdTATMMP a través d'endocitosi per vesícules de clatrina. Cèl·lules HT1080 varen ser infectades amb 10^3 vp/cèl·lula de cadascun dels virus en presència de 2,5 o 5 μg/ml de clorpromazina. Els valors de luciferasa varen ser mesurats a les 72 hores post-transducció.

C. Assaig luciferasa de l'estudi de la transducció dels virus AdTL, AdYTRGE i AdTATMMP a través d'endocitosi mitjançada per caveoles. Cèl·lules HT1080 varen ser infectades amb 10^3 vp/cèl·lula de cadascun dels virus en presència de 1 o 3,5 μg/ml de Fillipin III. Els valors de luciferasa varen ser mesurats a les 72 hores post-transducció.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim tres experiments independents. RLU (*Relative Light Units*)

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

4.1.2. La incorporació de controls al gen *E1A* del virus PANCAd permet mantenir la capacitat antitumoral del virus i millorar-ne el perfil de toxicitat hepàtica

La modificació TATMMP conferia una bona capacitat de transducció a cèl·lules tumorals i era interessant introduir-la en un virus terapèutic pel tractament de PDAC. Tot i així, la necessitat d'injectar el tractament per via sistèmica va conduir-nos a afegir altres elements de direccionament a tumor al genoma del virus per tal d'obtenir un millor perfil de toxicitat hepàtica.

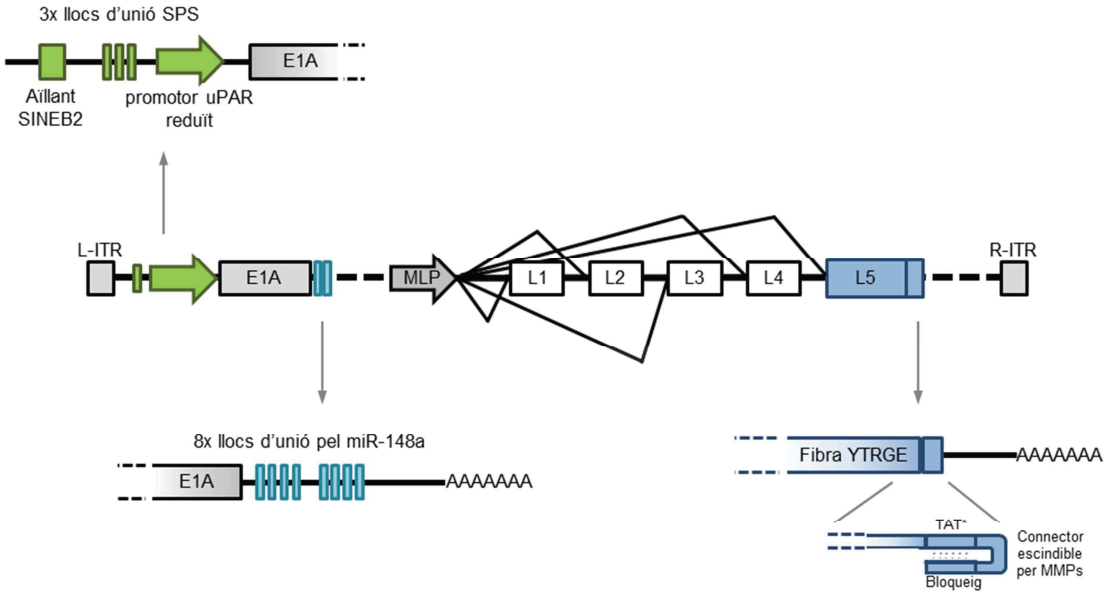


Figura 4.7. Representació esquemàtica del genoma de l'adenovirus PANCAd. L'esquema mostra les modificacions genètiques incorporades al gen *E1A* a nivell de promotor i 3'UTR així com també la modificació genètica TATMMP a la fibra.

Amb aquest objectiu, es va dissenyar i generar l'adenovirus quimèric PANCAd (Figura 4.7). En primer lloc, es va canviar el promotor salvatge del gen *E1A* per un promotor *uPAR* de seqüència reduïda que incorporava elements de resposta a la via de Notch (tres seqüències SPS – *sequence-paired CSL binding sites*). A 5' del promotor s'hi va inserir l'element aïllador SINEB2. Aquestes modificacions varen ser prèviament testades al laboratori amb el virus AdNuPARmE1A, el qual permetia un fort efecte citotòxic contra línies cel·lulars i cèl·lules mare tumorals de PDAC, tot mantenint

una activitat atenuada en teixits sans. L'AdNuPARmE1A actuava de forma sinèrgica amb el tractament quimioteràpic combinat de gemcitabina i nab-paclitaxel[107]. En segon lloc, es va afegir un control post-transcripcional a la regió 3'UTR del gen *E1A* basat en 8 dianes d'unió pel miR-148a. Aquest miRNA presenta una expressió alta en fetge i pàncrees sans, mentre que la seva expressió en tumors de PDAC es veu fortament reduïda. Aquesta desregulació dóna lloc a un control de la traducció d'E1A específic de tumor. El virus amb dianes pel miR-148a va ser dissenyat per Bofill-De Ros, X. i col·laboradors i mostrava una toxicitat hepàtica i pancreàtica reduïdes així com també una forta activitat antitumoral[110].

4.1.2.1. L'adenovirus PANCAd presenta un perfil de toxicitat hepàtica molt segur

Per començar, era necessari determinar la capacitat que tenien les modificacions de direccionament a tumor introduïdes al PANCAd d'evitar l'afectació de teixits sans i, sobretot, de reduir la toxicitat hepàtica associada a una administració sistèmica del virus. Una dosi de solució salina o de $5 \cdot 10^{10}$ d'Adwt, AdNuPARmE1A o PANCAd va ser administrada a animals immunocompetents C57BL/6J per la vena de la cua. Durant els tres dies posteriors a l'administració es va fer un seguiment del pes dels animals i, a punt final, es varen mesurar els nivells de marcadors de dany hepàtic ALT i AST.

Mentre que l'adenovirus salvatge Adwt causava una pèrdua de pes progressiva i molt marcada als animals, l'administració dels virus de replicació selectiva no va causar pèrdues de pes significatives (Figura 4.8A i B). Els nivells d'ALT i AST en sèrum eren molt elevats en els animals tractats amb Adwt. En canvi, amb l'AdNuPARmE1A i sobretot amb el PANCAd la toxicitat es reduïa significativament fins a valors de transaminases equiparables als dels animals control (Figura 4.8C). Així doncs, l'administració intravenosa del PANCAd va mostrar ser molt ben tolerada.

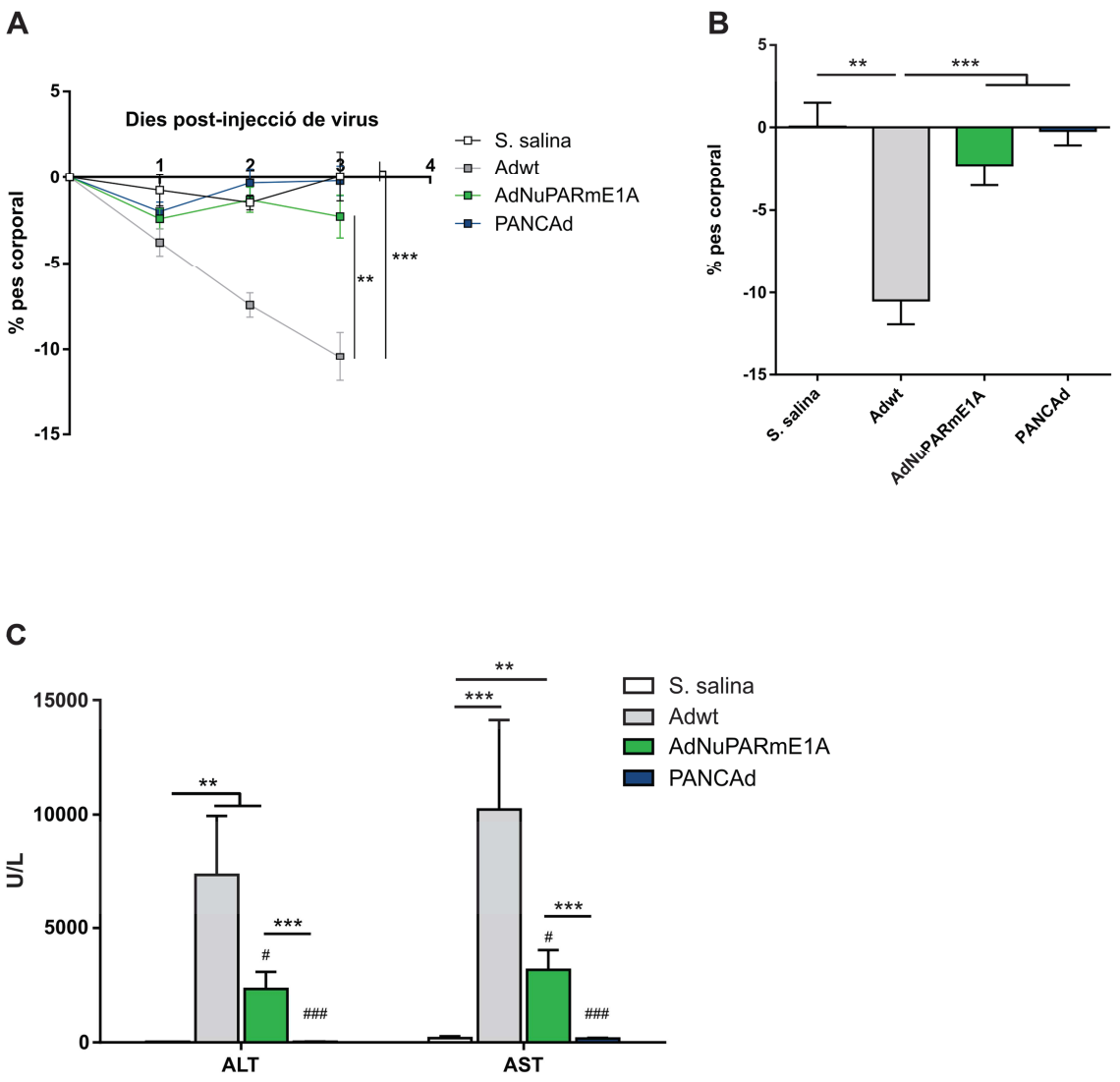


Figura 4.8. L'adenovirus PANCAd presenta una toxicitat hepàtica molt atenuada.

Ratolins immunocompetents C57BL/6J varen ser tractats intravenosament amb una dosi de solució salina (n=5) o de $5 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí d'Adwt (n=9), AdNuPARmE1A (n=12) o PANCAd (n=6).

A. Variacions de pes dels ratolins en els dies posteriors al tractament.

B. Canvi final de pes dels ratolins als tres dies post-injecció.

C. Valors de transaminases hepàtiques ALT i AST al sèrum dels animals als tres dies post-injecció.

Els símbols # representen les diferències estadístiques amb els valors d'Adwt.

$p<0.001$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

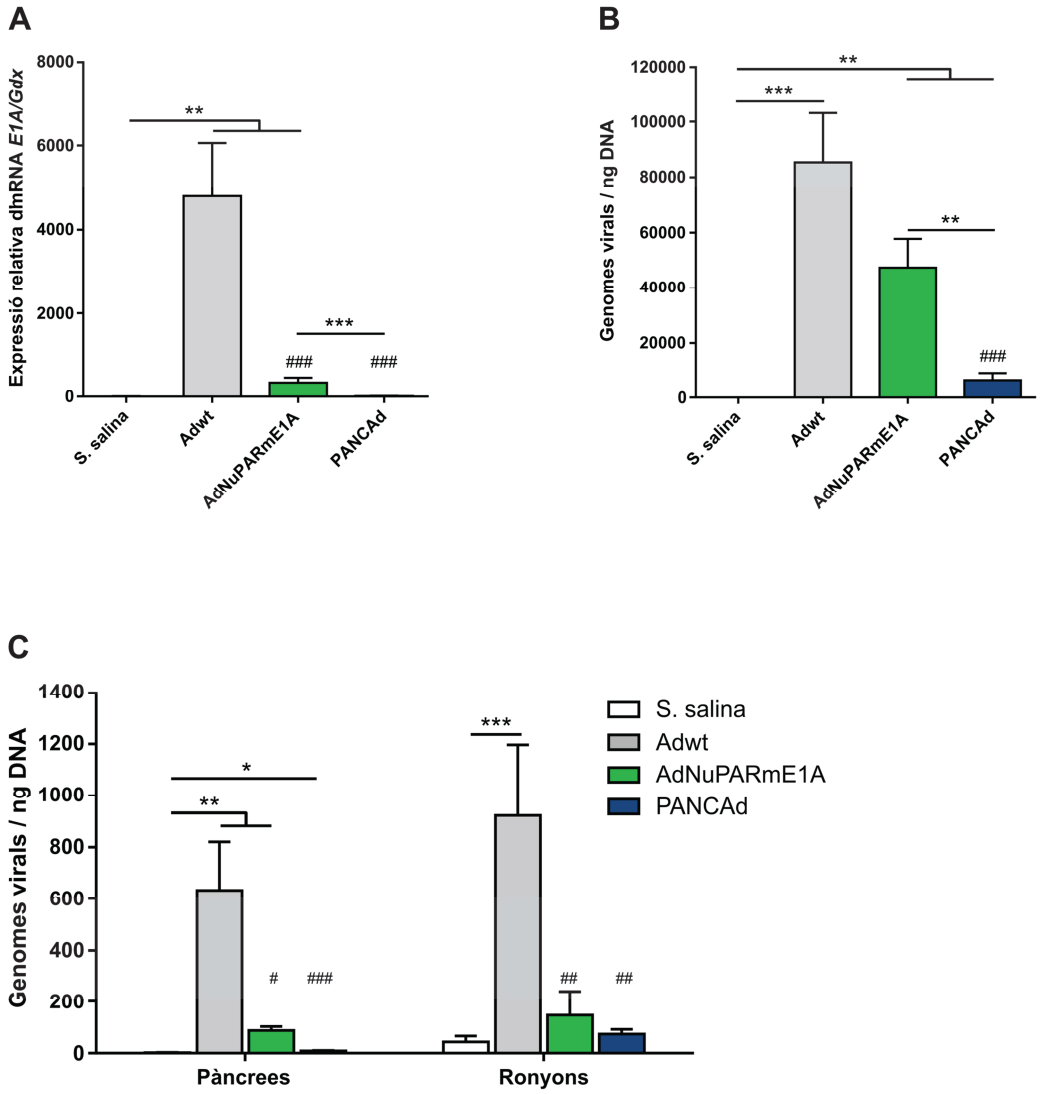


Figura 4.9. Les modificacions genètiques introduïdes al virus PANCAd permeten inhibir l'expressió d'*E1A* i la replicació dels genomes adenovirals a fetge.

Ratolins immunocompetents C57BL/6J varen ser tractats intravenosament amb una dosi de solució salina (n=5) o de $5 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí d'Adwt (n=9), AdNuPARmE1A (n=12) o PANCAd (n=5).

A. Quantificació relativa, per RT-qPCR, de l'expressió d'mRNA d'*E1A* al fetge d'animals immunocompetents C57BL/6J als tres dies post-injecció. Els nivells de *Gdx* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió.

B. Quantificació per qPCR dels genomes virals presents al fetge dels animals als tres dies post-injecció.

C. Quantificació per qPCR dels genomes virals presents al pàncrees i ronyons dels animals als tres dies post-injecció.

Els símbols # representen les diferències estadístiques amb els valors d'Adwt.

# $p<0.05$, ## $p<0.01$, ### $p<0.001$, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

La toxicitat hepàtica causada pels adenovirus es deu, principalment, a l'expressió d'E1A. Per aquest motiu es varen quantificar els nivells d'mRNA d'*E1A* al fetge dels animals tractats. L'expressió d'*E1A* a fetge era molt menor en animals administrats amb PANCAd que en animals administrats amb AdNuPARmE1A o Adwt, essent més marcada la diferència en aquest últim cas (Figura 4.9A). Els genomes virals presents a fetge, ronyons i pàncrees varen ser quantificats per qPCR. El perfil de genomes seguia un patró similar al d'expressió d'*E1A*, de manera que els òrgans dels animals injectats amb PANCAd varen presentar els nivells més reduïts de genomes adenovirals (Figura 4.9B i C). Així doncs, aquests resultats recolzaven la idea de que la reduïda toxicitat hepàtica del virus PANCAd seria deguda al bon control que exercien les diferents modificacions genètiques sobre l'expressió del gen *E1A*.

4.1.2.2. L'adenovirus quimèric PANCAd mostra un efecte antitumoral significatiu en tumors derivats de pacient CP15 però no sinergitza amb el tractament quimioteràpic

Amb la finalitat de comprovar que el PANCAd tenia la capacitat d'arribar i infectar tumors derivats de pacient implantats a pàncrees, es va procedir a analitzar la presència de virus als tumor després d'administrar-lo sistèmicament.

Fragments de tumor derivats de pacient de PDAC CP15 varen ser implantats ortotòpicament al pàncrees de ratolins immunodeprimits atímic *nude*. A les quatre setmanes, moment en el que els tumors eren detectables per palpació, es va injectar una dosi de solució salina o de $5 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí de PANCAd als animals per la vena de la cua. Dotze dies post-injecció, els animals varen ser sacrificats i es varen quantificar els genomes virals presents al tumor, fetge, ronyons i pàncrees (Figura 4.10A), així com també l'expressió del gen *E1A* a tumor (Figura 4.10C). La quantitat de genomes virals presents al fetge dels animals era superior que en altres òrgans sans a causa de l'elevada transducció hepàtica que es dóna durant una administració d'adenovirus per via sanguínia. En canvi, la quantitat de genomes present als tumors va ser gairebé 30 vegades superior que als fetges (Figura 4.10B). Es va detectar expressió d'mRNA d'*E1A* als tumors, la qual reflectia l'existència de virus actius (Figura 4.10C). Per tant, els resultats indicaven que el PANCAd podia infectar i replicar en tumors derivats de pacient CP15.

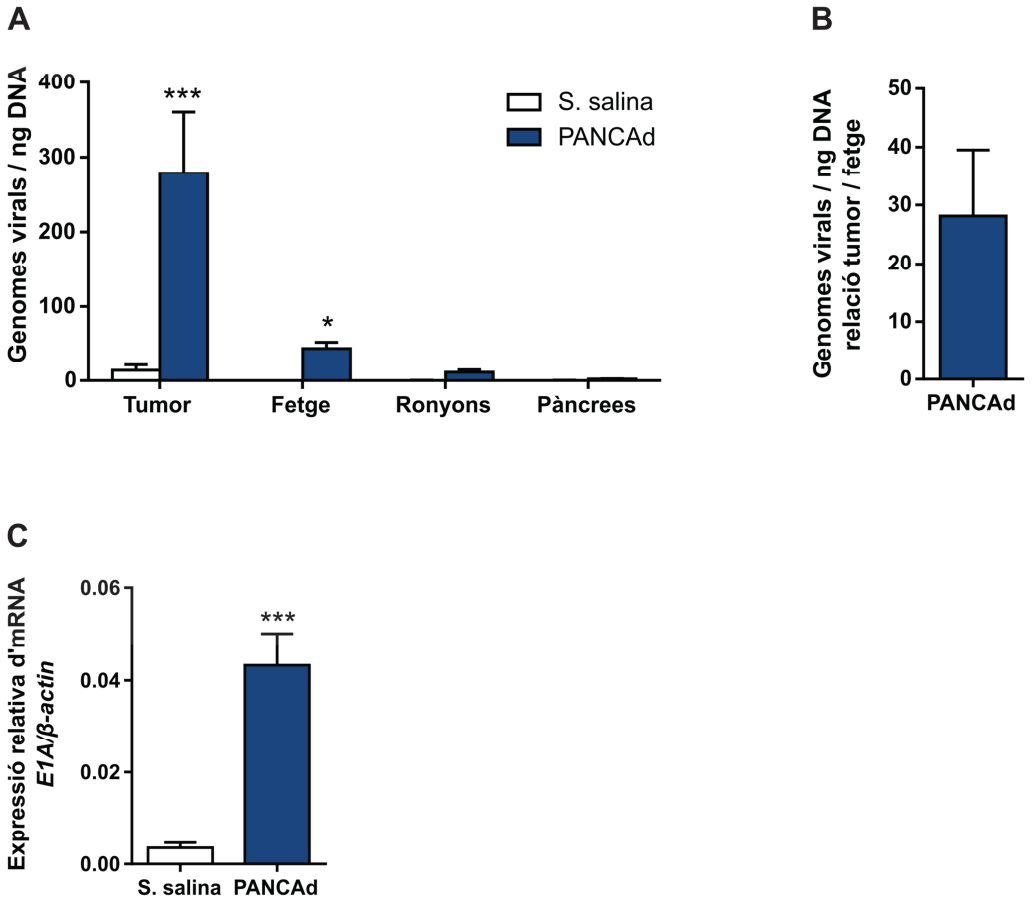


Figura 4.10. El virus PANCAd administrat intravenosament pot infectar i replicar en tumors derivats de pacient CP15.

Una dosi de solució salina (n=8) o de $5 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí de PANCAd (n=15) va ser administrada per via sanguínia a ratolins immunodeprimits atímic *nude* amb tumors ortotòpics a pàncrees derivats de pacient CP15.

A. Quantificació per qPCR dels genomes virals presents a tumor, fetge, ronyons i pàncrees als 12 dies post-administració.

B. Relació del número de genomes present a tumor respecte a fetge als 12 dies post-administració.

C. Quantificació, per RT-qPCR, dels nivells d'expressió d'mRNA d'*E1A* als tumors dels animals als 12 dies post-administració. L'expressió de *β-actina* va ser utilitzada per normalitzar l'expressió.

* $p<0.05$, *** $p<0.001$

A continuació, es va estudiar si aquesta arribada i replicació als tumors dotava al virus PANCAd d'activitat antitumoral. Mato, A. i col. havien observat que el promotor quimèric de l'AdNuPARmE1A desencadenava un sinergisme entre el virus i la

quimioteràpia que facilitava l'eliminació dels tumors[107]. Per aquest motiu, l'activitat del PANCAd va ser estudiada en combinació amb gemcitabina i nab-paclitaxel. Fragments de tumors derivats de pacient CP15 varen ser implantats ortotòpicament al pàncrees de ratolins immunodeprimits atímic *nude*. Passades quatre setmanes de la implantació, quan els tumors eren detectables per palpació, els animals varen ser tractats amb una dosi de solució salina, una dosi intravenosa de $5{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí de PANCAd, un règim bi-setmanal de quimioteràpia (gemcitabina i nab-paclitaxel) de tres setmanes de durada o un règim combinat de quimioteràpia i PANCAd. Un cop finalitzat el tractament quimioteràpic, es varen monitoritzar els animals fins a 20 dies (Figura 4.11).

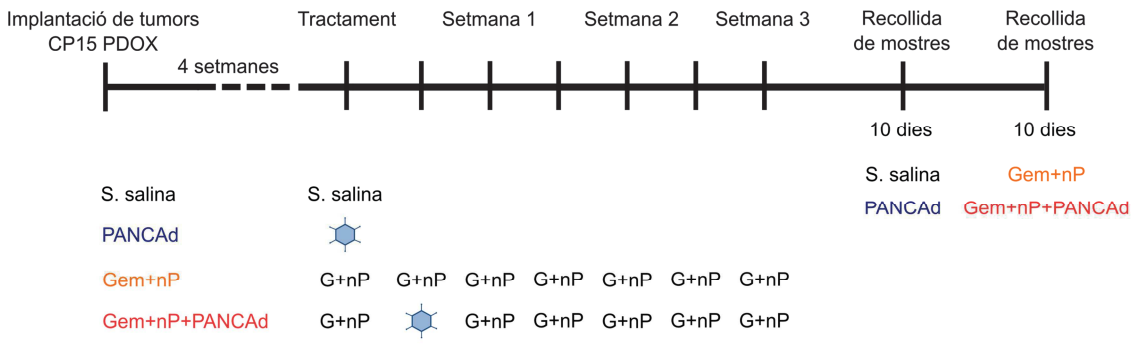


Figura 4.11. Pauta de tractaments per avaluar l'activitat antitumoral del PANCAd.

Tumors ortotòpics CP15 varen ser implantats al pàncrees de ratolins immunodeprimits atímic nude. Quatre setmanes després varen ser tractats amb una dosi de solució salina (n=7), una dosi de $5{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí de PANCAd (n=8), un règim de gemcitabina i nab-paclitaxel de tres setmanes de durada (n=7) o un règim combinat de gemcitabina, nab-paclitaxel i una dosi de $5{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí de PANCAd (n=9). Els animals varen ser sacrificats als 10 o 20 dies de la fi del tractament quimioteràpic.

Quan per palpació es va determinar que el volum tumoral dels animals control afectava el benestar animal, es varen sacrificar els ratolins tractats amb solució salina i PANCAd i es varen mesurar i pesar els tumors. El tractament amb PANCAd va reduir significativament el volum i pes tumorals, indicant que el virus permetia controlar el creixement dels tumors ortotòpics. La monitorització dels animals tractats amb el règim de quimioteràpia sola o combinada amb virus va seguir uns dies més amb l'objectiu de deixar més marge d'actuació al virus. El règim de quimioteràpia sola i combinada amb virus, en comparació amb el tractament amb PANCAd, varen permetre una major

reducció del volum i pes tumorals. Tanmateix, el tractament combinat permetia la mateixa acció antitumoral que la quimioteràpia sola (Figura 4.12A i B). En aquest cas, l'efecte sinèrgic que havien observat Mato, A. i col. amb l'AdNuPARmE1A no es va produir.

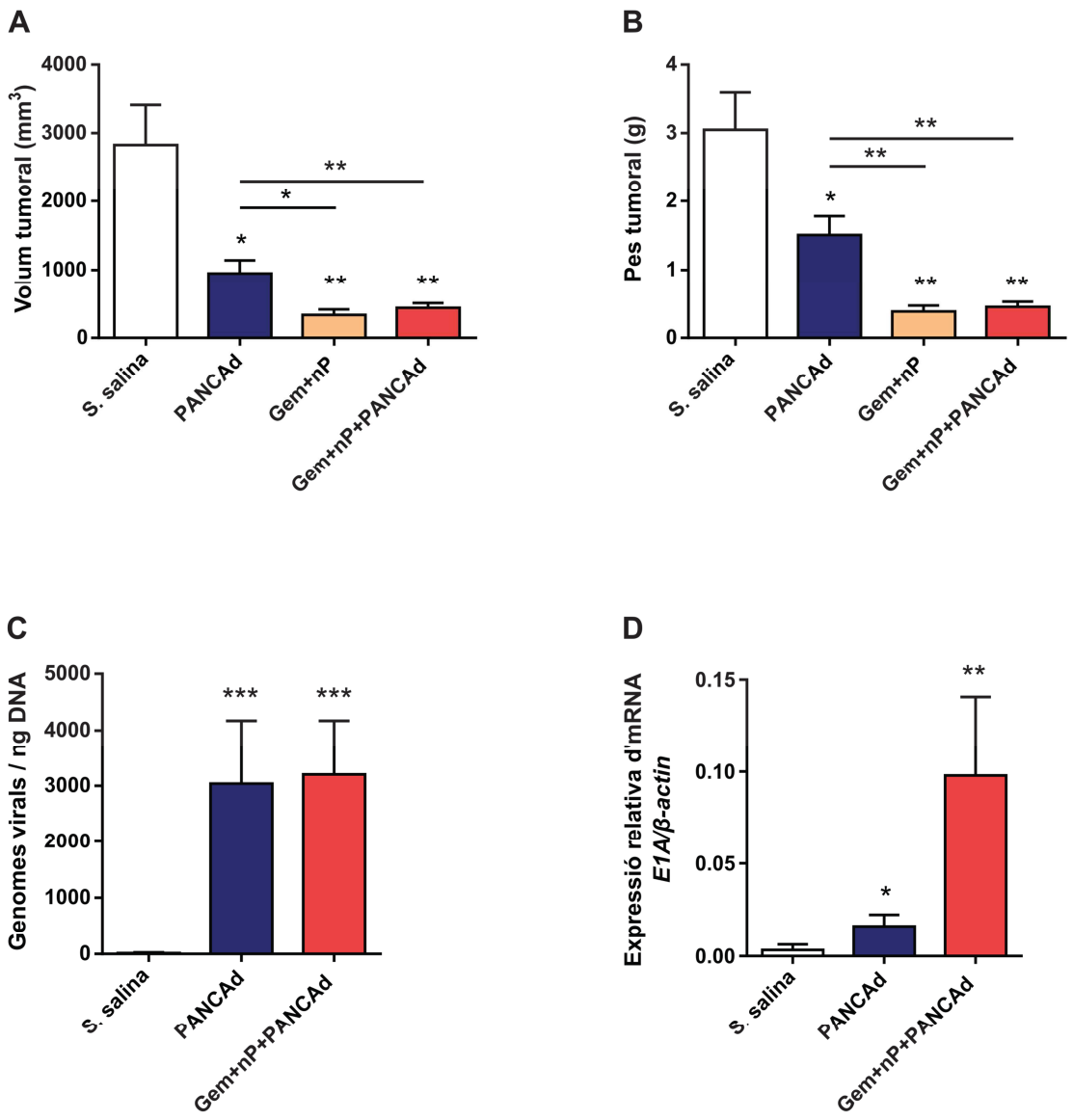


Figura 4.12. L'adenovirus PANCAd té activitat antitumoral front a tumors ortotòpics derivats de pacient CP15, però no sinergitza amb el tractament quimioteràpic.

A. Volum tumoral al moment del sacrifici.

B. Pes dels tumors al moment del sacrifici.

C. Quantificació per qPCR dels genomes virals presents als tumors al moment del sacrifici.

D. Quantificació, per RT-qPCR, dels nivells d'expressió d'mRNA d'*E1A* als tumors al moment del sacrifici. Els nivells de *β-actina* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

L'expressió d'mRNA d'*E1A* i la quantitat de genomes virals presents als tumors va ser analitzada. Es va observar una quantitat significativa de genomes virals i una elevada expressió d'*E1A* als tumors d'animals tractats amb virus, indicant la presència de focus actius de replicació viral (Figura 4.12C i D). L'expressió d'*E1A* en el grup tractat amb virus i quimioteràpia era lleugerament superior a la del grup administrat únicament amb PANCAd. Per tant, tot i no existir sinèrgia en l'activitat antitumoral dels dos elements, sí que es produïa una major activació de l'expressió d'*E1A* (Figura 4.12D).

Seguidament, es va avaluar si els tractaments amb PANCAd i amb la teràpia combinada permetien allargar la supervivència dels animals. Amb aquest propòsit es va procedir com en l'assaig *in vivo* anterior, però amb una pauta d'administració setmanal de quimioteràpia i sacrificant els animals en el moment que per palpació es determinava que el volum tumoral era proper als 2cm^3, o abans si el benestar animal es veia compromès (Figura 4.13).

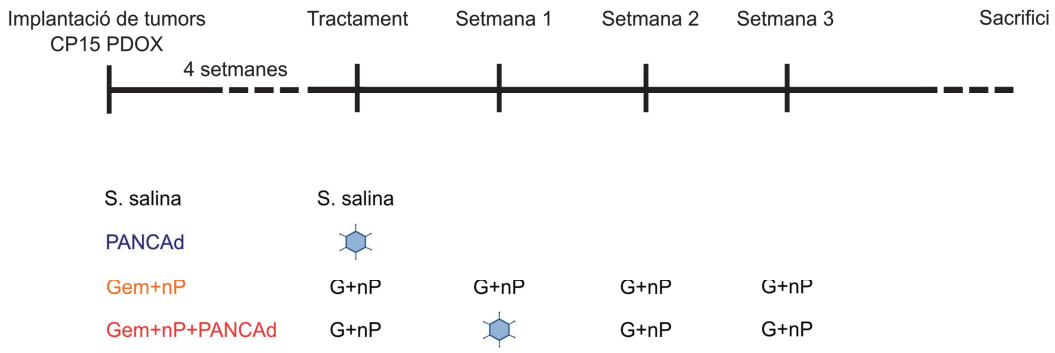
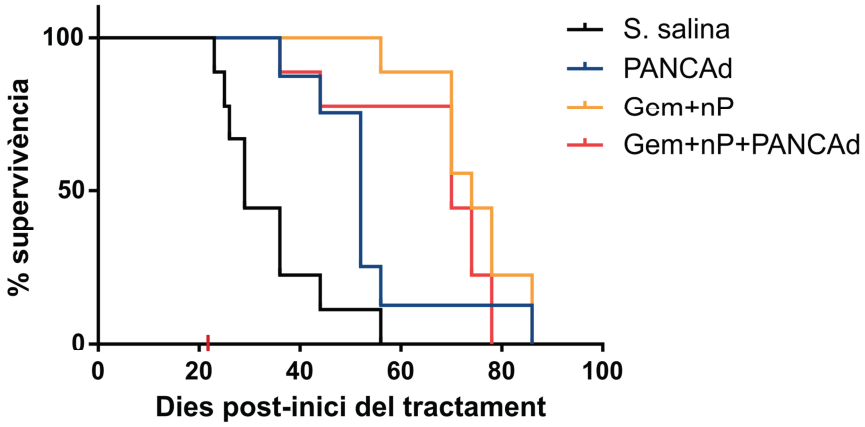


Figura 4.13. Pauta de tractaments per avaluar l'efecte del PANCAd en la supervivència dels animals.

Tumors ortotòpics CP15 varen ser implantats al pàncrees de ratolins immunodeprimits atímic *nude*. Quatre setmanes després varen ser tractats amb una dosi de solució salina (n=9), una dosi de $5{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí de PANCAd (n=8), un règim de gemcitabina i nab-paclitaxel de tres setmanes de durada (n=9) o un règim combinat de gemcitabina, nab-paclitaxel i una dosi de $5{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí de PANCAd (n=9). Es va fer un seguiment del volum tumoral per palpació i els animals eren sacrificats quan aquest arribava als 2cm^3 o quan es veia afectat el seu benestar.

L'anàlisi de la supervivència va demostrar que aquells animals tractats amb una dosi de PANCAd incrementaven la supervivència de forma significativa de 29 a 52 dies

post-tractament respecte els animals que només havien rebut solució salina. El tractament quimioteràpic i la pauta combinada tenien un major efecte antitumoral que es traduïa en un increment de la supervivència fins als 70 i 74 dies, respectivament. Tanmateix, la combinació del PANCAd amb la quimioteràpia tampoc va aportar un benefici addicional en quant a supervivència (Figura 4.14).



	P valor		
	PANCAd	**Gem+nP**	**Gem+nP+PANCAd**
S. salina	0,0124 (*)	0,0001 (***)	0,0002 (***)
PANCAd		0,0266 (*)	0,3112 (ns)
Gem+nP			0,1889 (ns)

Figura 4.14. L'adenovirus PANCAd augmenta la supervivència dels animals amb tumors derivats de pacient CP15, però no sinergitza amb la quimioteràpia.

Corbes de supervivència dels ratolins tractats amb solució salina, PANCAd, un règim de quimioteràpia o un règim de quimioteràpia combinada amb PANCAd. La línia vermella a l'eix de les x marca la finalització del règim de quimioteràpia.

* $p<0.05$, *** $p<0.001$

Els resultats ens indicaven que el PANCAd tenia una activitat antitumoral significativa, però que no actuava sinèrgicament amb la quimioteràpia, a diferència del que tenia lloc amb l'AdNuPARmE1A.

Tenint en compte que el que diferenciava el PANCAd de l'AdNuPARmE1A eren les dianes d'unió pel miR-148a al 3'UTR del gen *E1A* i la modificació TATMMP, es va

generar un adenovirus PANCAd de fibra salvatge, el PANCAd Fwt (Figura 4.15), per tal d'estudiar l'efecte de la gemcitabina sobre els elements de control que diferenciaven els virus.

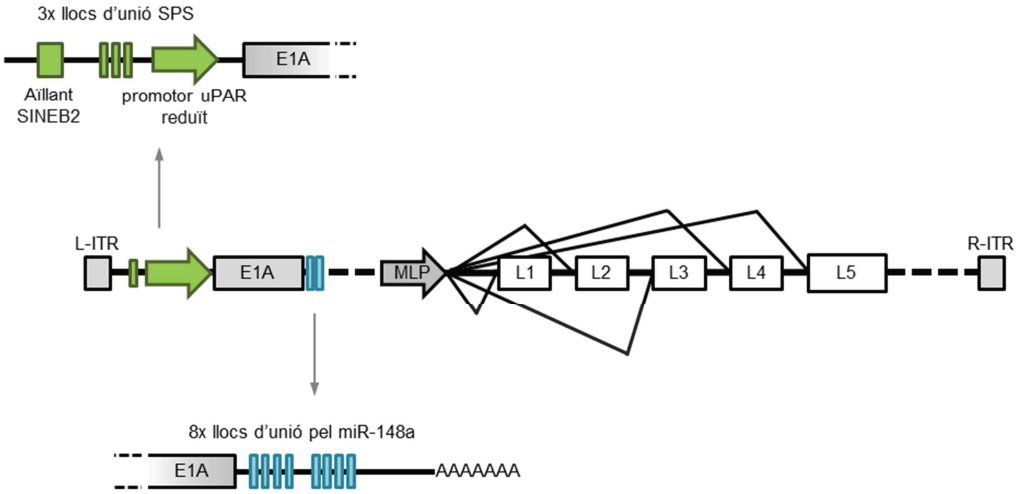


Figura 4.15. Representació esquemàtica del genoma de l'adenovirus PANCAd Fwt. L'esquema mostra les modificacions genètiques incorporades al gen *E1A* a nivell de promotor i 3'UTR.

La citotoxicitat de l'Adwt i dels dos virus PANCAd va ser testada en línies cel·lulars CP15-Luc (derivada del tumor de pacient CP15) i MIA PaCa-2 resistents a la gemcitabina. Ambdues línies cel·lulars varen ser generades a base de tractaments amb dosis creixents del fàrmac. Les línies sensibles i resistents a la gemcitabina varen ser infectades amb Adwt, PANCAd i PANCAd Fwt, a unes dosis que permetessin obtenir una viabilitat del 40-60% en cèl·lules sensibles. La viabilitat cel·lular va ser avaluada per MTT als tres dies post-infecció. El PANCAd Fwt va causar una reducció de la viabilitat més marcada en cèl·lules resistents a la gemcitabina que en cèl·lules sensibles, tant en la línia CP15-Luc com en MIA PaCa-2. En canvi, la infecció de MIA PaCa-2 amb PANCAd va resultar en una viabilitat cel·lular similar entre cèl·lules resistents i sensibles, mentre que en cèl·lules CP15-Luc la viabilitat de les cèl·lules resistents era significativament superior a la de les cèl·lules sensibles (Figura 4.16A i B). Aquests resultats indicaven que la resistència a gemcitabina induïa canvis cel·lulars, sobretot a les CP15-Luc, que afectaven negativament al PANCAd.

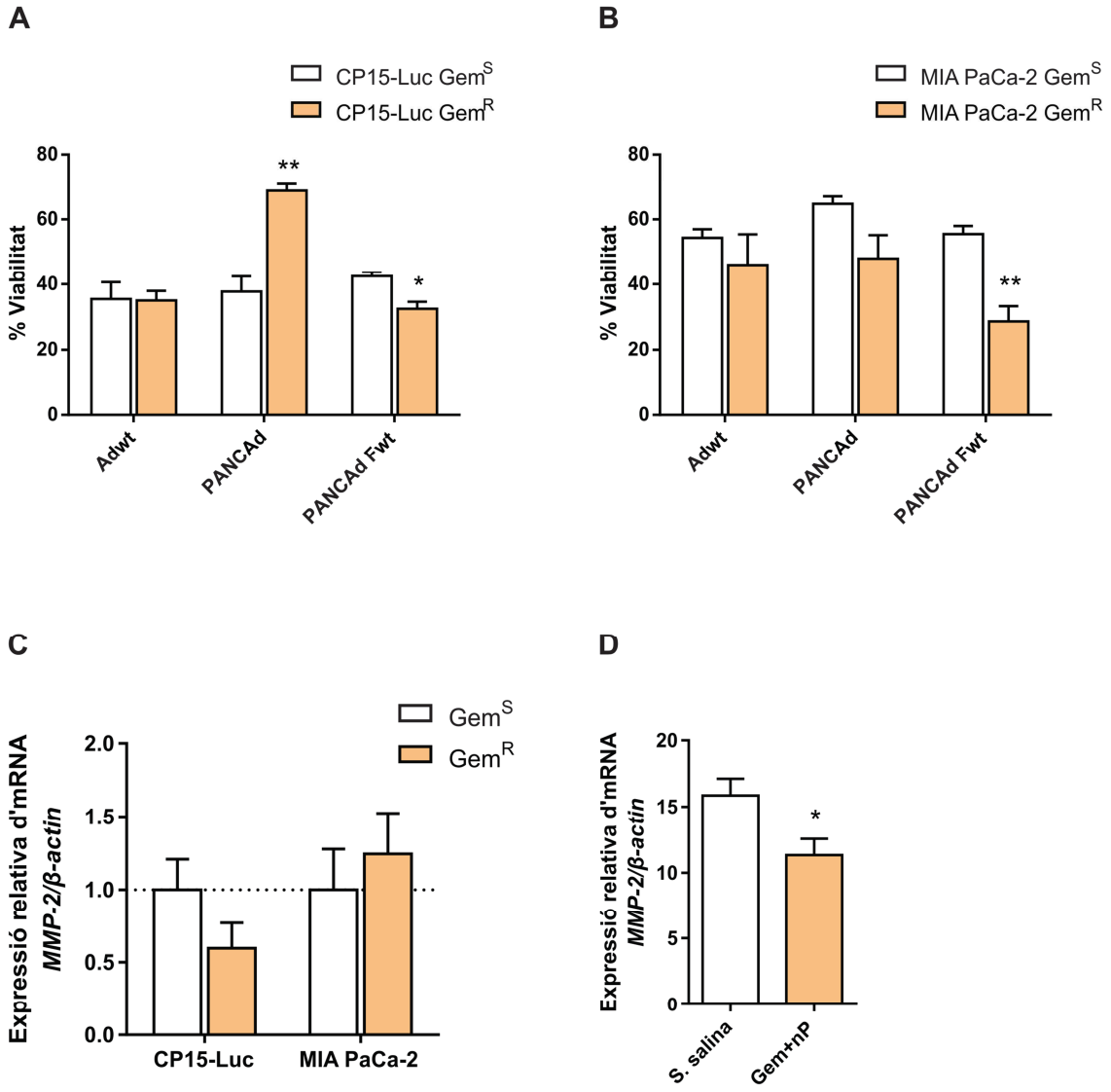


Figura 4.16. La disminució de l'expressió de *MMP-2* en cèl·lules tractades amb gemcitabina té un efecte limitant en l'activitat citotòxica del PANCAd.

A. Valors de viabilitat cel·lular de cèl·lules CP15-Luc sensibles i resistents a la gemcitabina, determinats per assaig MTT, als tres dies post-infecció amb els adenovirus Adwt (10^4 vp/cèl·lula), PANCAd (10^4 vp/cèl·lula) i PANCAd Fwt ($3{\cdot}10^4$ vp/cèl·lula).

B. Valors de viabilitat cel·lular de cèl·lules MIA PaCa-2 sensibles i resistents a la gemcitabina, determinats per assaig MTT, als tres dies post-infecció amb els adenovirus Adwt, PANCAd i PANCAd Fwt ($1{,}5{\cdot}10^3$ vp/cèl·lula).

C. Quantificació relativa, per RT-qPCR, dels nivells d'expressió d'mRNA de *MMP-2* a CP15-Luc i MIA PaCa-2 sensibles i resistents a la gemcitabina. Els nivells de *β-actina* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió. Les dades es donen com a valors relatius als nivells d'expressió en cèl·lules sensibles a la gemcitabina.

D. Quantificació relativa, per RT-qPCR, dels nivells d'expressió d'mRNA de *MMP-2* a tumors derivats de pacient CP15 implantats en ratolins immunodeprimits atímic *nude* tractats amb solució salina (n=7) o un règim de gemcitabina i nab-paclitaxel (n=7). Els nivells de *β-actina* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim cinc experiments independents. * $p<0.05$, ** $p<0.01$

Els resultats indicaven que els canvis podien estar relacionats amb la via d'entrada del PANCAd a la cèl·lula. Per valorar aquesta hipòtesi, es varen analitzar els nivells d'expressió d'mRNA d'*MMP-2* a les línies cel·lulars gemcitabina sensibles i resistents, així com també als tumors CP15 d'animals tractats amb solució salina o quimioteràpia (gemcitabina i nab-paclitaxel). Els resultats varen posar de manifest que l'expressió d'*MMP-2* disminuïa en cèl·lules CP15-Luc gemcitabina resistents i en tumors tractats amb quimioteràpia, però no en cèl·lules MIA PaCa-2 resistents (Figura 4.16C i D). Així doncs, els canvis en l'expressió d'*MMP-2* podrien estar contribuint en la manca de sinèrgia entre el virus i la quimioteràpia.

4.1.2.3. Els adenovirus quimèrics PANCAd tenen una activitat antitumoral i un perfil de toxicitat hepàtica similars

Per tal d'esbrinar si els virus PANCAd i PANCAd Fwt presentaven alguna diferència en quant a activitat antiviral en tumors subcutanis derivats de pacient CP15, ambdós virus varen ser comparats *in vivo* amb el virus parental AdNuPARmE1A. Fragments de tumor CP15 varen ser implantats subcutàniament als flancs d'animals immunodeprimits atímic *nude*. A un volum tumoral de $100mm^3$, els animals varen ser tractats amb una dosi de solució salina o de $5 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí d'AdNuPARmE1A, PANCAd o PANCAd Fwt, per via intravenosa, i es va realitzar un seguiment del volum tumoral durant 35 dies. Tant el virus PANCAd com el PANCAd Fwt varen presentar una capacitat antitumoral similar a la de l'AdNuPARmE1A. L'addició de les dianes pel miR-148a al 3'UTR del gen *E1A* permetia mantenir la capacitat antitumoral del virus parental, mentre que la fibra TATMMP no aportava una avantatge al virus en aquest model tumoral (Figura 4.17).

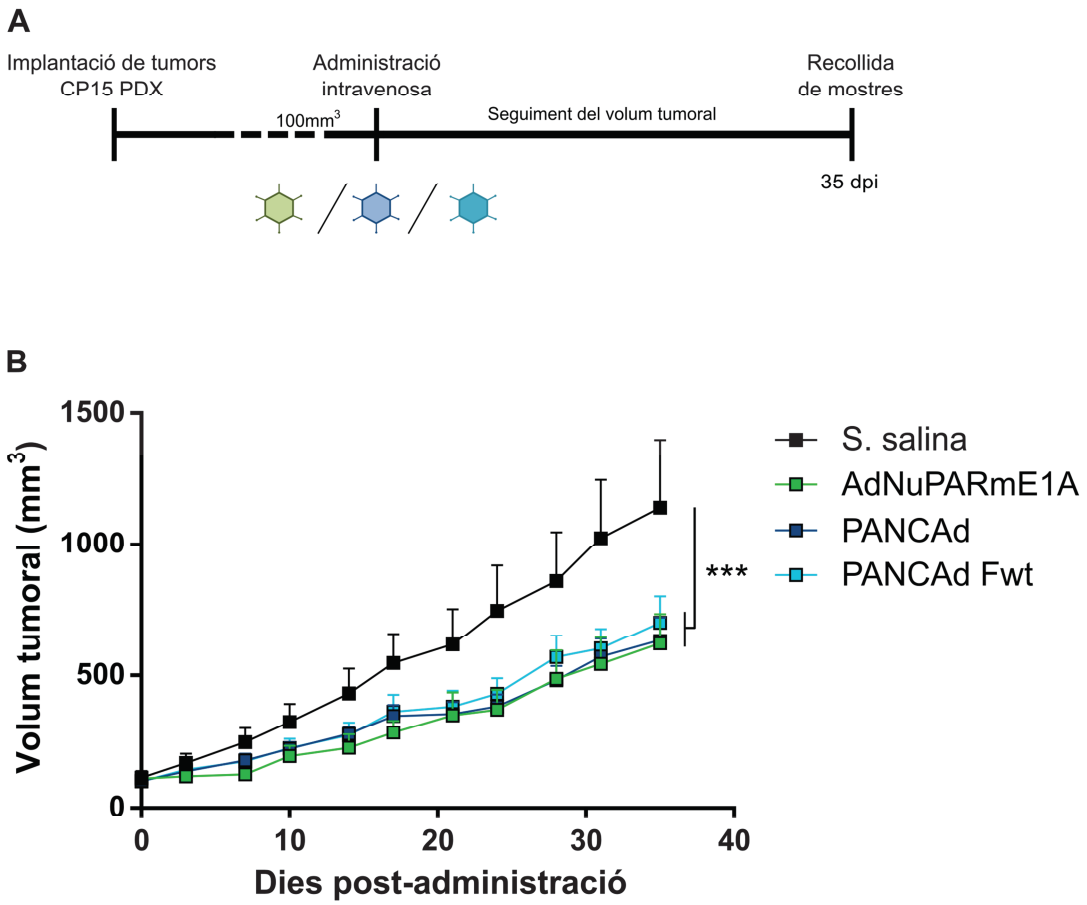


Figura 4.17. Els virus PANCAd i PANCAd Fwt tenen una activitat antitumoral comparable a la del virus AdNuPARmE1A.

A. Esquema representatiu de l'experiment. Fragments 1mm^3 de tumors CP15 varen ser implantats subcutàniament als flancs de ratolins immunodeprimits atímic *nude*. Quan els tumors tenien un volum de 100mm^3 es va administrar intravenosament als ratolins una dosi de solució salina (n=10) o de $5{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí d'AdNuPARmE1A (n=8), PANCAd (n=12) o PANCAd Fwt (n=12).

B. Corba de creixement tumoral. *** $p<0.001$

A continuació, es va avaluar la toxicitat hepàtica derivada d'una administració sistèmica del PANCAd Fwt. Una dosi de solució salina o de $5{\cdot}10^{10}$ d'AdNuPARmE1A, PANCAd o PANCAd Fwt va ser injectada a animals immunocompetents C57BL/6J per la vena de la cua. Tres dies després del tractament es va determinar la pèrdua de pes que havien patit els animals i es varen mesurar els nivells de marcadors de dany hepàtic en sèrum sanguini (ALT i AST). Els animals administrats amb PANCAd i PANCAd Fwt no varen perdre pes i presentaven uns nivells d'ALT i AST menors que els animals administrats amb AdNuPARmE1A (Figura 4.18A i B). Els dos virus PANCAd no mostraven diferències en el perfil de toxicitat hepàtica (Figura 4.18B).

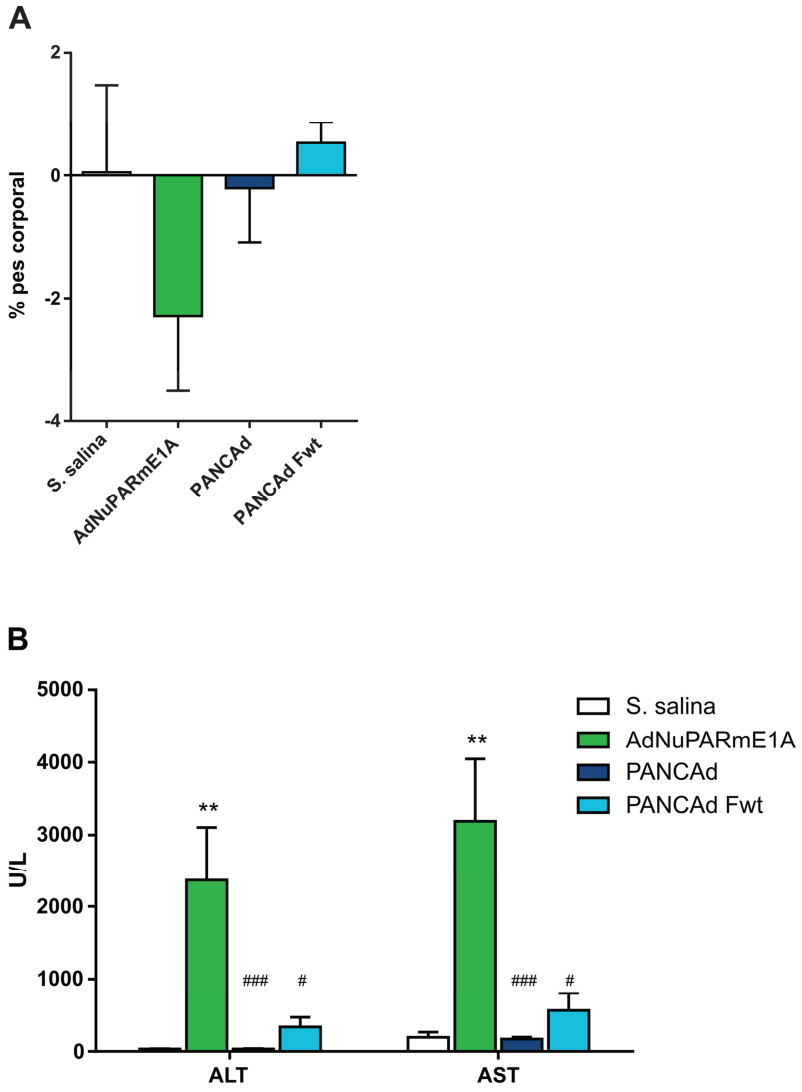


Figura 4.18. Els adenovirus PANCAd i PANCAd Fwt presenten una toxicitat hepàtica similar i molt atenuada.

Ratolins immunocompetents C57BL/6J varen ser tractats intravenosament amb una dosi de solució salina (n=5) o de $5 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí d'AdNuPARmE1A (n=12), PANCAd (n=6) o PANCAd Fwt (n=7).

A. Variacions de pes dels ratolins als tres dies post-injecció.

B. Valors de transaminases hepàtiques ALT i AST al sèrum dels animals als tres dies post-injecció.

Els símbols # representen les diferències estadístiques amb els valors d'AdNuPARmE1A.

# $p<0.05$, ### $p<0.001$, ** $p<0.01$

Els nivells d'expressió d'mRNA d'*E1A* i els genomes virals presents als fetges dels animals varen ser quantificats, essent menors en animals tractats amb PANCAd i PANCAd Fwt que en animals tractats amb AdNuPARmE1A. Els dos virus PANCAd no presentaven diferències significatives entre ells (Figura 4.19A i B). Així doncs, tant el virus PANCAd com PANCAd Fwt tenien un perfil de toxicitat hepàtica millorat i molt segur gràcies a l'expressió reduïda del gen *E1A*.

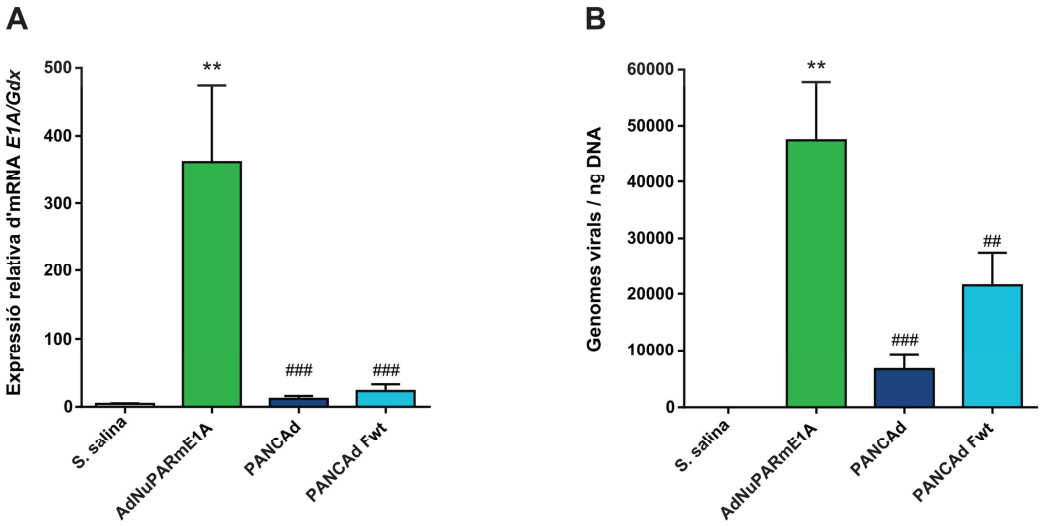


Figura 4.19. Els adenovirus PANCAd i PANCAd Fwt presenten un expressió d'*E1A* i una quantitat de genomes virals a fetge molt reduïdes.

Ratolins immunocompetents C57BL/6J varen ser tractats intravenosament amb una dosi de solució salina (n=5) o de $5 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí de PANCAd (n=6) o PANCAd Fwt (n=7).

A. Quantificació relativa, per RT-qPCR, de l'expressió d'mRNA d'*E1A* al fetge dels animals als tres dies post-injecció. Els nivells de *Gdx* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió.

B. Quantificació per qPCR dels genomes virals presents al fetge dels animals als tres dies post-injecció.

Els símbols # representen les diferències estadístiques amb els valors d'AdNuPARmE1A.

$p<0.01$, ### $p<0.001$, ** $p<0.01$

4.2. Bioselecció de miRNAs potenciadors de l'activitat adenoviral en models de PDAC

En el transcurs de la infecció, i per tal de poder completar el seu cicle, l'adenovirus necessita prendre el control de varis mecanismes cel·lulars: cicle cel·lular, reparació del DNA, vies de mort cel·lular, etc. En cèl·lules tumorals, caracteritzades per una àmplia desregulació d'aquests mecanismes[2], la presa de control per part del virus pot veure's dificultada, limitant la formació de nova progènia viral. En PDAC, per exemple, s'han descrit, subgrups de pacients i línies cel·lulars que es caracteritzen per tenir diferent nivell d'expressió basal de gens estimulats per interferons. Aquestes diferències podrien tenir una implicació en la permissibilitat a la infecció adenoviral[147].

Els miRNAs, que regulen l'expressió de múltiples gens, tenen un paper rellevant en la interacció entre el virus i la cèl·lula. Durant una infecció adenoviral el patró d'expressió de miRNAs cel·lulars canvia[66], ja sigui perquè la resposta antiviral l'altera per frenar el virus o bé perquè el virus el modula per crear un ambient òptim per la seva replicació. Tenint en compte aquesta rellevància i que en càncer l'expressió de miRNAs està desregulada[57], el miRNoma tumoral pot representar un element important en el bloqueig de la replicació viral.

Així doncs, el resultat final d'una infecció no només depèn del virus, sinó que el component cel·lular en la relació hoste-virus també és important. Estudiar aquest component i alterar-lo per tal de beneficiar el virus pot ser complicat. Fins al moment, estratègies no dirigides amb biblioteques d'RNAs d'interferència, compostos farmacològics i miRNAs han ajudat a identificar vies i factors cel·lulars que modulen la producció viral[64,148,149].

En aquest treball ens vàrem proposar identificar miRNAs que facilitessin la replicació viral i conferissin una capacitat oncolítica superior als adenovirus a través del bloqueig de l'expressió de factors limitants de l'activitat viral desregulats en tumors. Hem utilitzat una estratègia basada en la bioselecció *high-throughput* d'una biblioteca de miRNAs codificats al propi virus, de tal manera que l'expressió del miRNA estigués estretament relacionada amb la infecció viral i no impliqués la suma de varis elements, fent el producte més atractiu per usos terapèutics.

4.2.1. Identificació de miRNAs potenciadors de l'activitat oncolítica adenoviral per bioselecció de la biblioteca AdwtE miRLib

Amb l'objectiu d'identificar miRNAs potenciadors de l'activitat oncolítica adenoviral es va generar la biblioteca d'adenovirus AdwtE miRLib. La biblioteca està formada per un *pool* d'adenovirus que codifiquen per 243 seqüències diferents del genoma humà a partir de les quals s'expressen miRNAs sota el control d'un promotor CMV. Aquestes seqüències varen ser obtingudes de la biblioteca comercial miRLib, generada per Voorhoeve, P. i col. segons les anotacions de la base de dades Rfam release 6[135], i comercialitzada per Source BioScience LifeSciences. El promotor CMV i cadascun dels fragments de genoma humà, d'una mida total d'entre 1,3 i 1,4Kb, varen ser introduïts al genoma de l'adenovirus AdwtE a una distància de 3bp del final de la ITR dreta, en direcció reversa, punt en el que es preveia una mínima afectació del virus al no truncar cap seqüència imprescindible per la seva replicació. El virus AdwtE expressa la proteïna verd fluorescent EGFP sota el control del MLP, característica que permet dur a terme un seguiment de la infecció adenoviral per fluorescència (Figura 4.20).

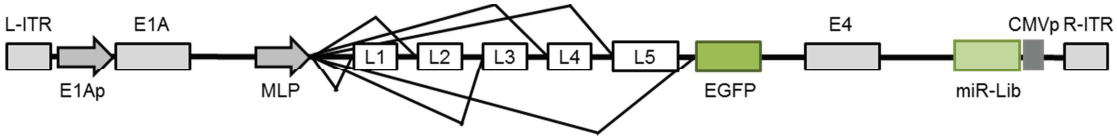


Figura 4.20. Representació esquemàtica del genoma dels adenovirus que formen part de l'AdwtE miRLib.

Es destaca, en verd, el gen de l'*EGFP*, sota el control del MLP; i el conjunt de 243 seqüències genòmiques humanes codificants per miRNAs, sota el control del promotor CMV, a la regió propera a la ITR dreta.

Les seqüències varen ser amplificades per PCR amb polimerasa d'alta fidelitat i introduïdes al genoma de l'AdwtE utilitzant el sistema AdZ, que permet realitzar modificacions en format *high-throughput* per recombinació homòloga[128,136]. D'aquesta forma es varen obtenir els genomes virals els quals, transfectats en cèl·lules HEK-293, permeteren generar un sobrenedant d'homogenat de l'AdwtE miRLib (Figura 4.20). Abans de la producció de la biblioteca complerta, es va generar un petit grup de virus

codificants per miRNAs que va sevir per comprovar que els miRNAs s'expressaven correctament i que la introducció de seqüències al punt escollit no impedia el cicle viral.

El sobrenedant d'homogenat va ser utilitzat per infectar les línies de PDAC PANC-1 i MIA PaCa-2 amb 1 i 5 partícules infectives/cèl·lula (PI/cèl·lula), respectivament, i començar el procés de bioselecció basat en la replicació viral. Aquestes dosis permetien obtenir un percentatge d'infecció relativament baix i evitar que molts virus entressin a una mateixa cèl·lula, reduint les opcions de recombinació entre ells. Quan les cèl·lules varen presentar efecte citopàtic, es va recollir el medi de cultiu, enriquit amb virus altament replicatius, i es va utilitzar per fer una nova ronda d'infecció. Per ambdues línies cel·lulars es varen realitzar fins a 20 infeccions successives. Un cop finalitzat el procés de bioselecció, es varen aïllar els virus presents al medi de cultiu mitjançant la generació de clons i es va determinar per seqüenciació quin miRNA codificava cadascun (Figura 4.21).

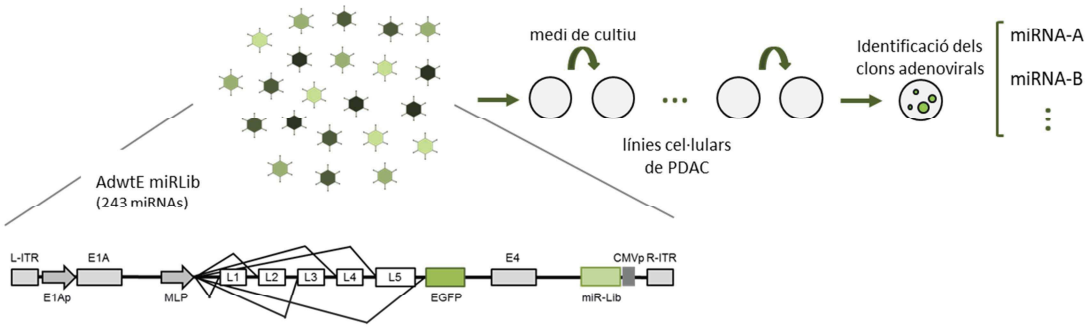


Figura 4.21. Esquema representatiu del procés de bioselecció en línies cel·lulars de PDAC.

La biblioteca AdwtE miRLib, formada per fins a 243 adenovirus diferents codificants per miRNAs va ser bioseleccionada en un procés basat en la replicació viral a través de 20 infeccions successives de les línies cel·lulars PANC-1 i MIA PaCa-2. Els virus altament replicatius varen ser aïllats del sobrenedant i el miRNA codificat per aquests, identificat.

Els resultats de seqüenciació varen posar de manifest que, malgrat haver-hi certa heterogeneïtat, els AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 es trobaven enriquits en les dues línies cel·lulars, essent el miR-485 el més freqüent en PANC-1 i el miR-99b el

més freqüent en MIA PaCa-2 (Taula 4.1). A partir d'aquest moment, es va decidir continuar els estudis amb aquests dos adenovirus.

PANC-1		MIA PaCa-2	
miRNA	**% clons**	**miRNA**	**% clons**
miR-99b	7,1	**miR-99b**	87,9
miR-485	28,6	**miR-485**	9,1
miR-200c	21,4	miR-142	3,0
miR-183	14,3		
miR-324	14,3		
miR-511	7,1		
miR-345	7,1		

Taula 4.1. Percentatge de clons adenovirals codificants per miRNAs que influeixen en el cicle adenoviral.

Cadascun dels clons aïllats del medi de cultiu cel·lular de la infecció successiva número 20 de la bioselecció de l'AdwtE miRLib en PANC-1 i MIA PaCa-2 va ser seqüenciat per tal d'identificar el miRNA que codificava.

Per tal de valorar quin era l'estat d'expressió del miR-99b i del miR-485 en pacients de PDAC, es va partir dels resultats de *next generation sequencing* (NGS) cedits pel grup de la Dra. Gironella, en els quals es comparaven els nivells d'expressió de pacients de PDAC i controls sans. Segons els resultats de NGS, les cadenes 3p dels dos miRNAs candidats es trobaven significativament disminuïdes en pacients de PDAC respecte els controls sans (Taula 4.2).

A continuació, es va dur a terme una anàlisi de les dades del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) per tal de determinar si l'expressió dels miRNAs candidats correlacionava amb la supervivència dels pacients. Les dades de supervivència de 175 pacients de PDAC s'ordenaren en funció dels nivells d'expressió de miR-99b o de miR-485 i es dividiren els pacients en dos grups (expressió alta i baixa) utilitzant la mediana de les dades d'expressió com a punt de tall. Els pacients amb nivells d'expressió baixa dels miRNAs tenien una supervivència menor, especialment pel miR-485, evidenciant una correlació entre l'expressió del miRNA i la supervivència (Figura 4.22A i B).

miRNA	FC (PDAC vs CS)	FDR
miR-99b-5p	1,85	0,14
miR-99b-3p	**-1,50**	**0,03**
miR-485-5p	-1,10	1,00
miR-485-3p	**-2,35**	**0,0016**

Taula 4.2. Variació dels nivells d'expressió dels miR-99b i miR-485.

Resultats de la NGS de mostres de PDAC i controls sans (CS) expressats com a canvi en l'expressió FC (*Fold Change*) i el corresponent FDR (*False Discovery Rate*). Es consideren variacions estadísticament significatives quan FDR<0,05.

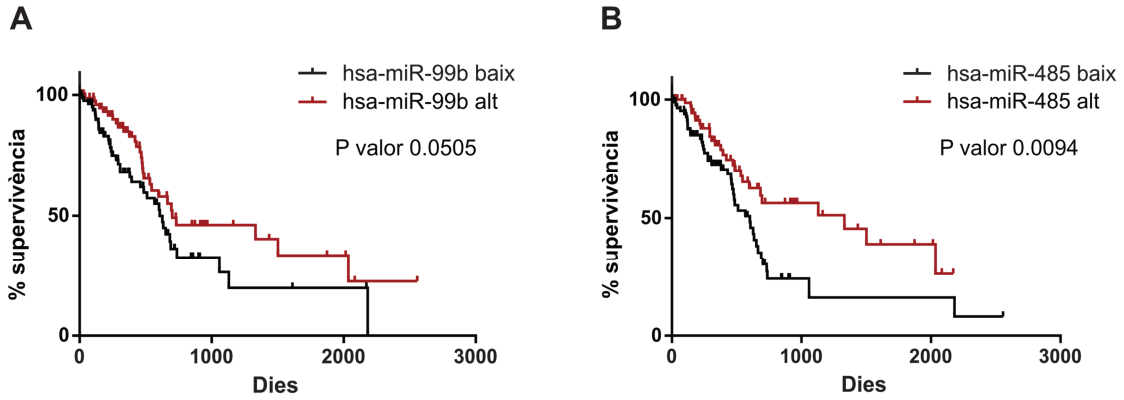


Figura 4.22. Els nivells d'expressió del miR-99b i del miR-485 correlacionen amb la supervivència de pacients de PDAC.

Representació Kaplan-Meyer, a partir de les dades del TCGA, de la supervivència de pacients de PDAC en funció dels nivell d'expressió dels miRNA candidats

A. Supervivència en funció dels nivells d'expressió del hsa-miR-99b.

B. Supervivència en funció dels nivells d'expressió del hsa-miR-485.

Un cop es varen haver identificat el miR-99b i el miR-485 com a possibles miRNAs potenciadors de l'activitat adenoviral, i tenint en compte que es troben molt poc expressats en PDAC, es va procedir a amplificar i purificar els virus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 a partir d'un dels clons corresponents. Els virus control AdwtE i AdwtE hTR també varen ser amplificats i purificats. L'AdwtE hTR expressa el snRNA utilitzat per la telomerasa com a encebador per allargar els telòmers (hTR). Aquest

virus servia de virus control perquè té un genoma de mida i modificacions similars a les dels candidats però no expressa cap miRNA (Figura 4.23).

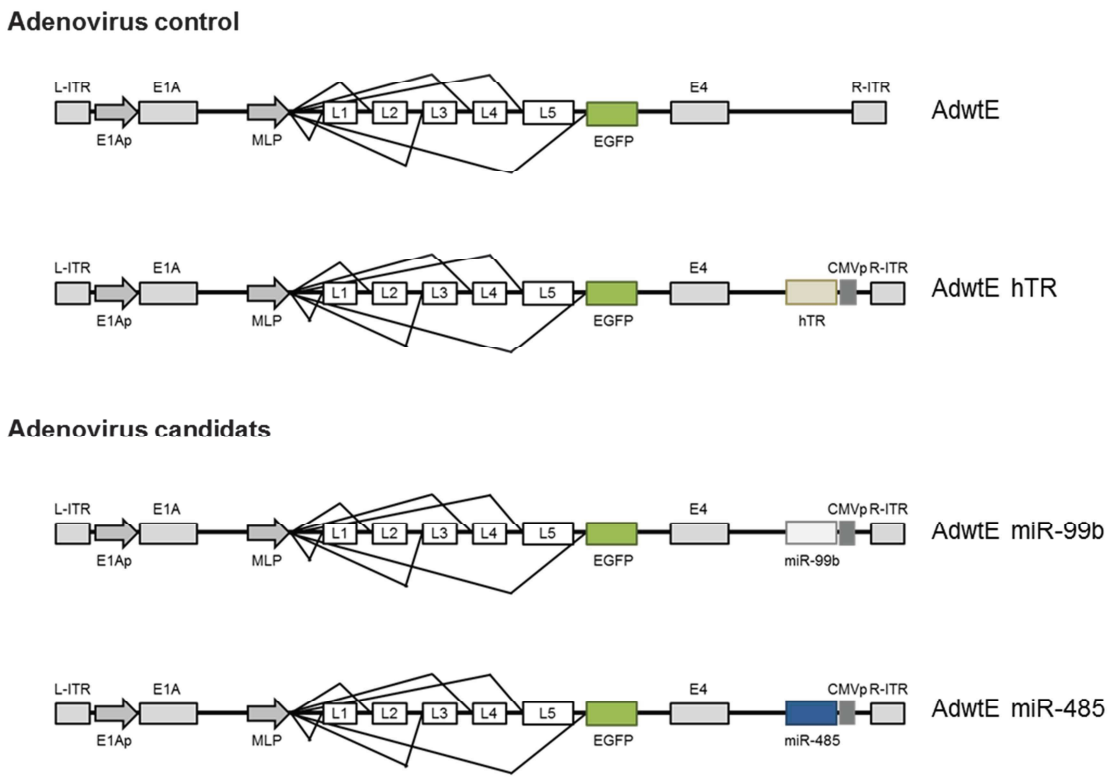


Figura 4.23. Esquema representatiu dels genomes dels adenovirus control AdwtE i AdhTR, i dels adenovirus candidats AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485.

Es destaca el gen de l'EGFP, sota el control del MLP; i la seqüència hTR o els miRNAs, sota el control del promotor CMV.

La primera verificació que es va dur a terme va ser la comprovació de que les cadenes 5p i 3p dels miRNAs s'expressaven, de manera que els seus nivells a la cèl·lula augmentessin en una infecció amb el virus candidat corresponent. Cèl·lules PANC-1 varen ser infectades a una dosi elevada, per obtenir un 100% d'infecció, d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 i l'expressió dels miRNAs candidats va ser analitzada per RT-qPCR a les 24 hores post-infecció. El nivell d'expressió de les quatre cadenes dels miRNAs candidats augmentava després d'una infecció amb els virus candidats: 2,9 i 5,4 vegades per les respectives cadenes del miR-99b, i 110 i 160 vegades per les del miR-485 (Figura 4.24A i B).

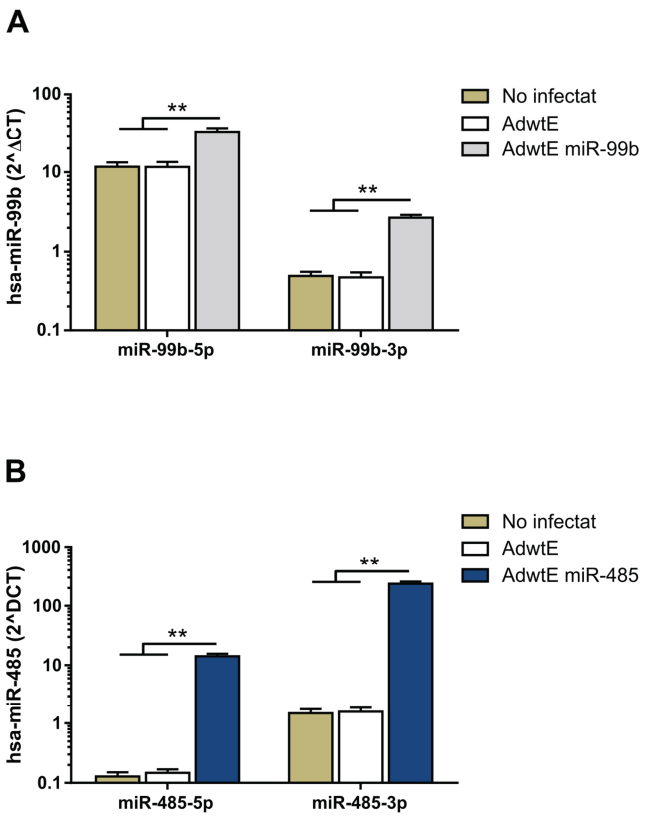


Figura 4.24. Els miRNAs candidats presenten una expressió augmentada després d'una infecció amb els adenovirus que els codifiquen.

Nivells d'expressió de les cadenes 5p i 3p dels miRNA candidats en cèl·lules PANC-1 no infectades o a les 24 hores de ser infectades amb 10 PI/cèl·lula d'AdwtE i dels virus candidats. Valors relativitzats als nivells d'expressió d'U6B.

A. Nivells d'expressió del miR-99b-5p i del miR-99b-3p.

B. Nivells d'expressió del miR-485-5p i del miR-485-3p.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim cinc experiments independents.

** $p<0.01$

4.2.2. Els virus codificants pel miR-99b i el miR-485 presenten un alliberament superior de partícules infectives al medi de cultiu de línies cel·lulars de PDAC

Un com vàrem haver comprovat l'expressió dels miRNAs a partir dels virus, vàrem decidir validar els resultats obtinguts en el procés de bioselecció realitzant un experiment d'enriquiment de virus al medi de cultiu basat en tres infeccions successives. Cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2 varen ser infectades amb una dosi baixa dels virus AdwtE, AdwtE hTR, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485. Quan l'efecte citopàtic va ser visible, una part del medi de cultiu es va utilitzar per realitzar una nova ronda d'infecció. Els nivells d'EGFP en cada infecció varen ser avaluats i quantificats per fluorescència. Mentre que amb els virus control la fluorescència es mantenia o disminuïa al llarg de les infeccions, amb els virus candidats la fluorescència augmentava, indicant que aquests tenien un *fitness* superior al dels virus control. L'efecte s'observava ja des de la primera infecció, però la superioritat en l'enriquiment de partícules infectives es magnificava a mesura que s'acumulaven infeccions (Figura 4.25 i 4.26). Els adenovirus candidats també varen ser testats en la línia cel·lular derivada de tumor de pacient CP15-Luc. Tot i que l'efecte no era tan marcat, en aquestes cèl·lules els AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 també presentaven un major enriquiment de partícules infectives que l'AdwtE, i sobretot, que l'AdwtE hTR (Figura 4.27).

A continuació, es va avaluar si aquest enriquiment també es produïa en infeccions de cèl·lules no tumorals. Es va realitzar un experiment d'enriquiment de virus al medi de cultiu amb cèl·lules d'epiteli ductal pancreàtic immortalitzades HPDE. En aquestes cèl·lules, els adenovirus candidats presentaven un enriquiment de partícules infectives menor que els virus control (Figura 4.28). Seguidament, l'activitat dels adenovirus candidats i AdwtE va ser avaluada, per expressió d'EGFP, en fibroblasts procedents de diversos teixits: fibroblasts associats a tumor (CAF Oct'16), fibroblasts de pell (FG1 i FG2) i fibroblasts de pulmó (IMR-90). En tots els casos, l'AdwtE miR-99b va mostrar una expressió d'EGFP igual o disminuïda en comparació amb l'AdwtE, mentre que els nivells d'EGFP per l'AdwtE miR-485 es varen mantenir a nivells similars als de l'AdwtE (Figura 4.29A, B i C). Aquests resultats indicaven que l'efecte dels miRNAs candidats sobre el *fitness* viral presenta certa selectivitat tumoral.

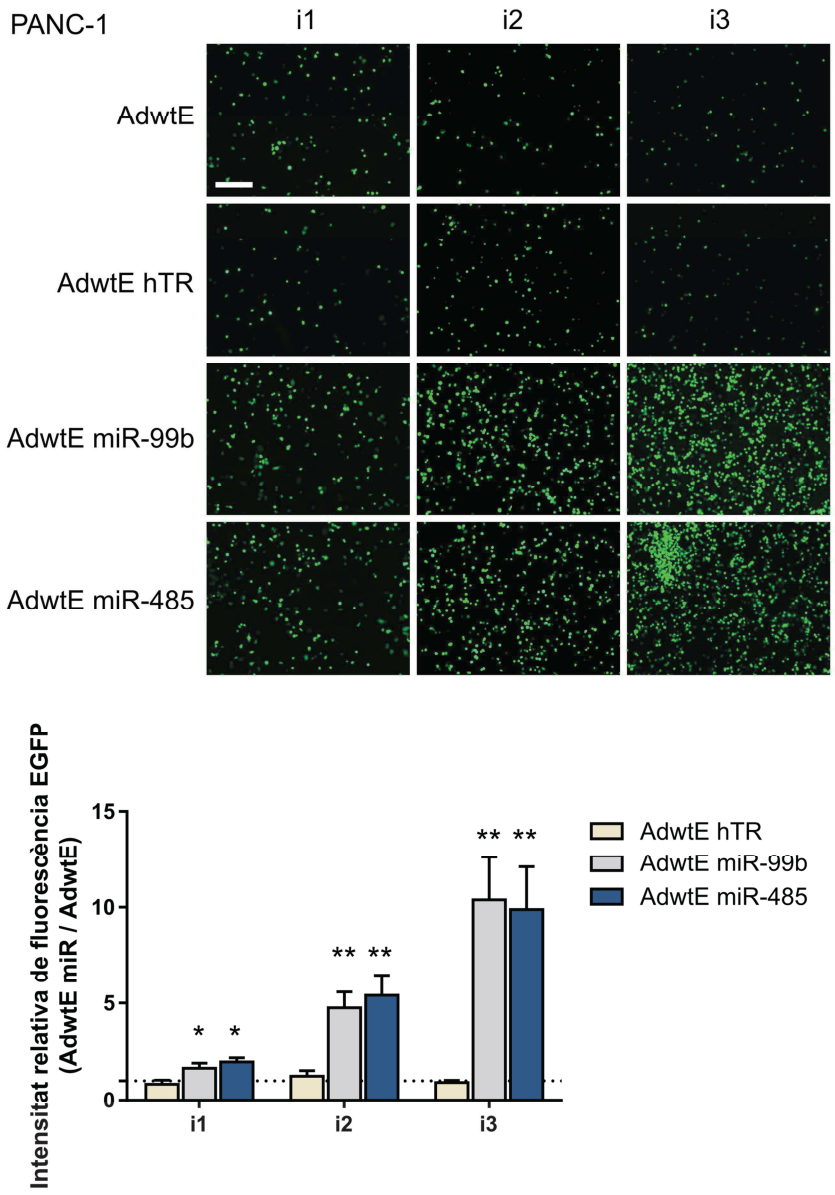


Figura 4.25. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 presenten un enriquiment de partícules infectives al medi de cultiu superior al dels virus control en cèl·lules PANC-1.

Imatges representatives i quantificació dels nivells relatius de fluorescència EGFP de les tres infeccions successives de PANC-1. Les cèl·lules varen ser infectades a una dosi de 1 Pl/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE hTR, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 (i1). 48 hores post-infecció es varen obtenir imatges de fluorescència i el 10% de medi de cultiu va ser utilitzat per a realitzar una nova infecció (i2). Es va repetir el procediment per fer la següent infecció (i3).

Les imatges varen ser quantificades amb el software ImageJ. Barra d'escala = 200µm. La línia puntejada indica el valor relatiu d'intensitat d'EGFP de les infeccions amb AdwtE.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim cinc experiments independents.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

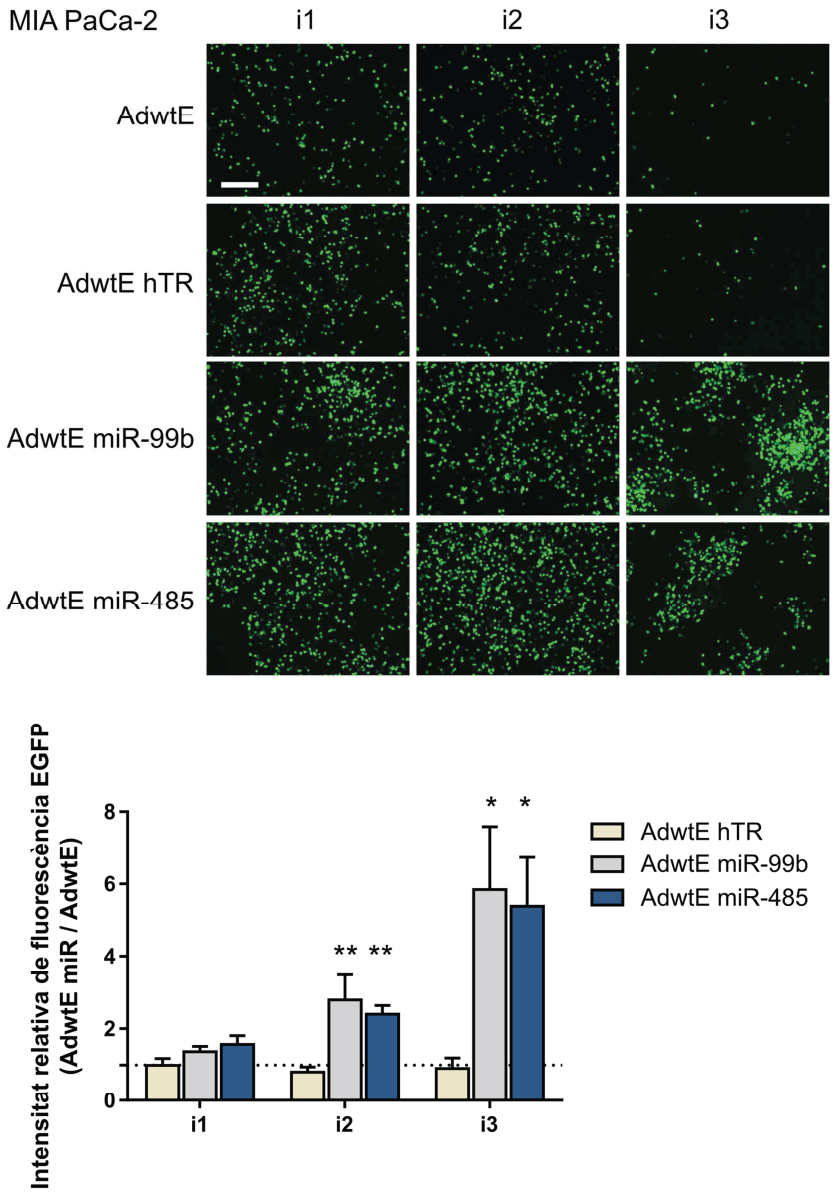


Figura 4.26. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 presenten un enriquiment de partícules infectives al medi de cultiu superior al dels virus control en cèl·lules MIA PaCa-2.

Imatges representatives i quantificació dels nivells relatius de fluorescència EGFP de les tres infeccions successives de MIA PaCa-2. Les cèl·lules varen ser infectades a una dosi de 5 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE hTR, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 (i1). 48 hores post-infecció es varen obtenir imatges de fluorescència i el 50% de medi de cultiu va ser utilitzat per realitzar una nova infecció (i2). Cinc dies post-infecció es va repetir el procediment (i3).

Les imatges varen ser quantificades amb el software ImageJ. Barra d'escala = 200µm. La línia puntejada indica el valor relatiu d'intensitat d'EGFP de les infeccions amb AdwtE.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim cinc experiments independents.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

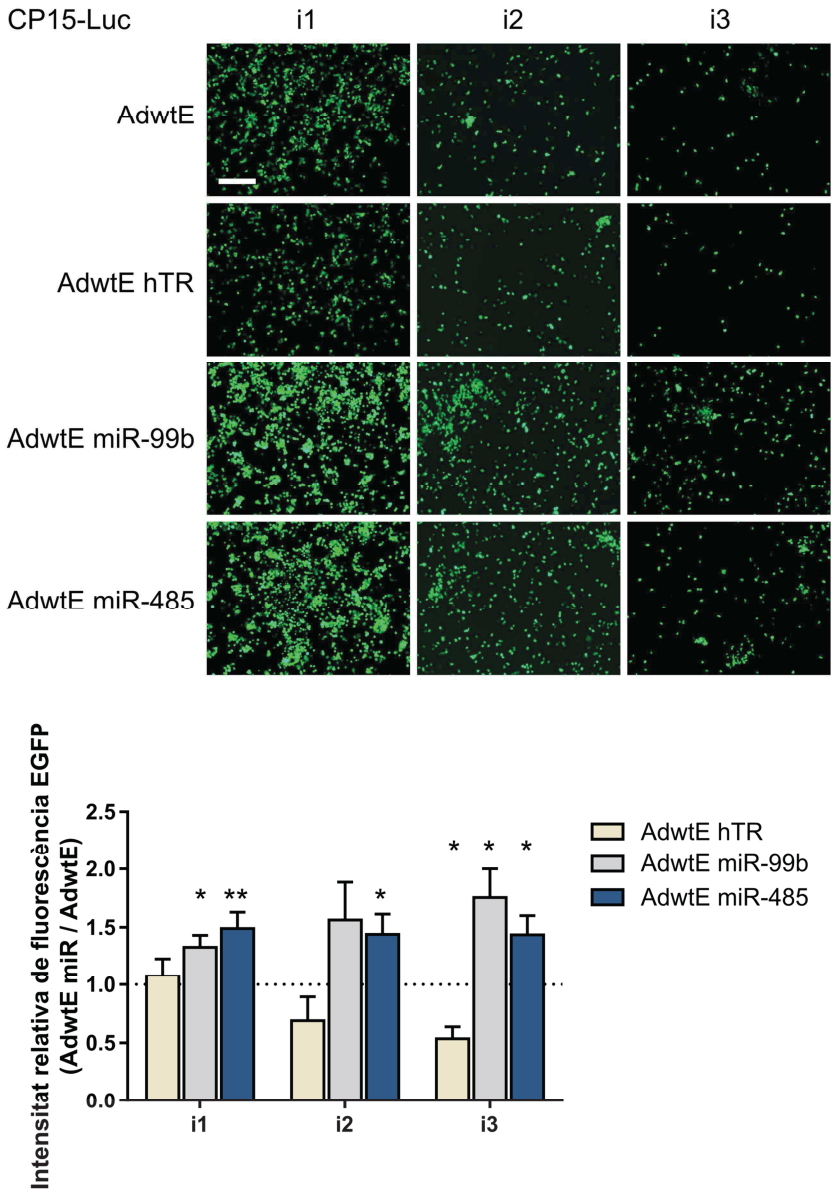


Figura 4.27. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 presenten un enriquiment de partícules infectives al medi de cultiu superior al dels virus control en cèl·lules CP15-Luc.

Imatges representatives i quantificació dels nivells relatius de fluorescència EGFP de les tres infeccions successives de CP15-Luc. Les cèl·lules varen ser infectades a una dosi de 10 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE hTR, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 (i1). 48 hores post-infecció es varen obtenir imatges de fluorescència i el 50% de medi de cultiu va ser utilitzat per realitzar una nova infecció (i2). Cinc dies post-infecció es va repetir el procediment (i3).

Les imatges varen ser quantificades amb el software ImageJ. Barra d'escala = 200µm. La línia puntejada indica el valor relatiu d'intensitat d'EGFP de les infeccions amb AdwtE.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim cinc experiments independents.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

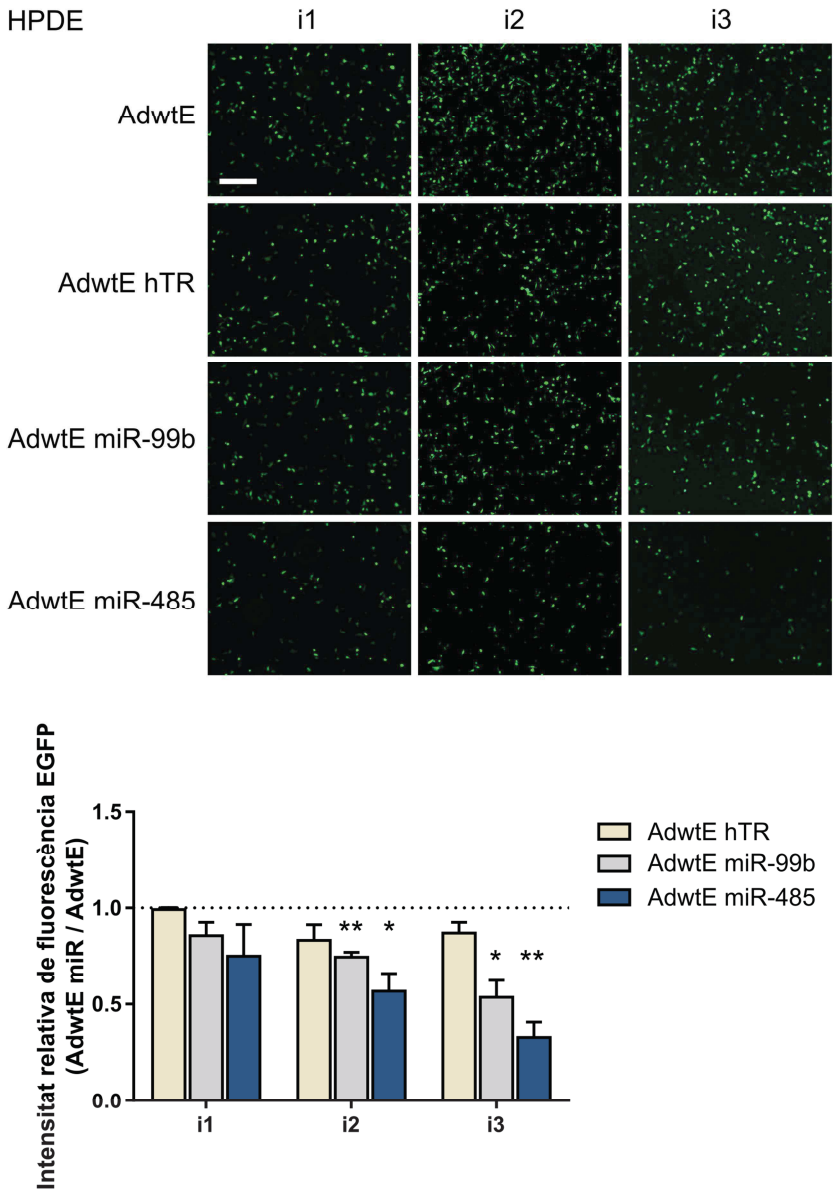


Figura 4.28. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 presenten un menor enriquiment de partícules infectives al medi de cultiu que els virus control en cèl·lules no tumorals HPDE.

Imatges representatives i quantificació dels nivells relatius de fluorescència EGFP de les tres infeccions successives d'HPDE. Les cèl·lules varen ser infectades a una dosi de 1 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE hTR, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 (i1). 48 hores post-infecció es varen obtenir imatges de fluorescència i el 10% de medi de cultiu va ser utilitzat per realitzar una nova infecció (i2). Es va repetir el procediment per fer la següent infecció (i3).

Les imatges varen ser quantificades amb el software ImageJ. Barra d'escala = 200µm. La línia puntejada indica el valor relatiu d'intensitat d'EGFP de les infeccions amb AdwtE.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim cinc experiments independents.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

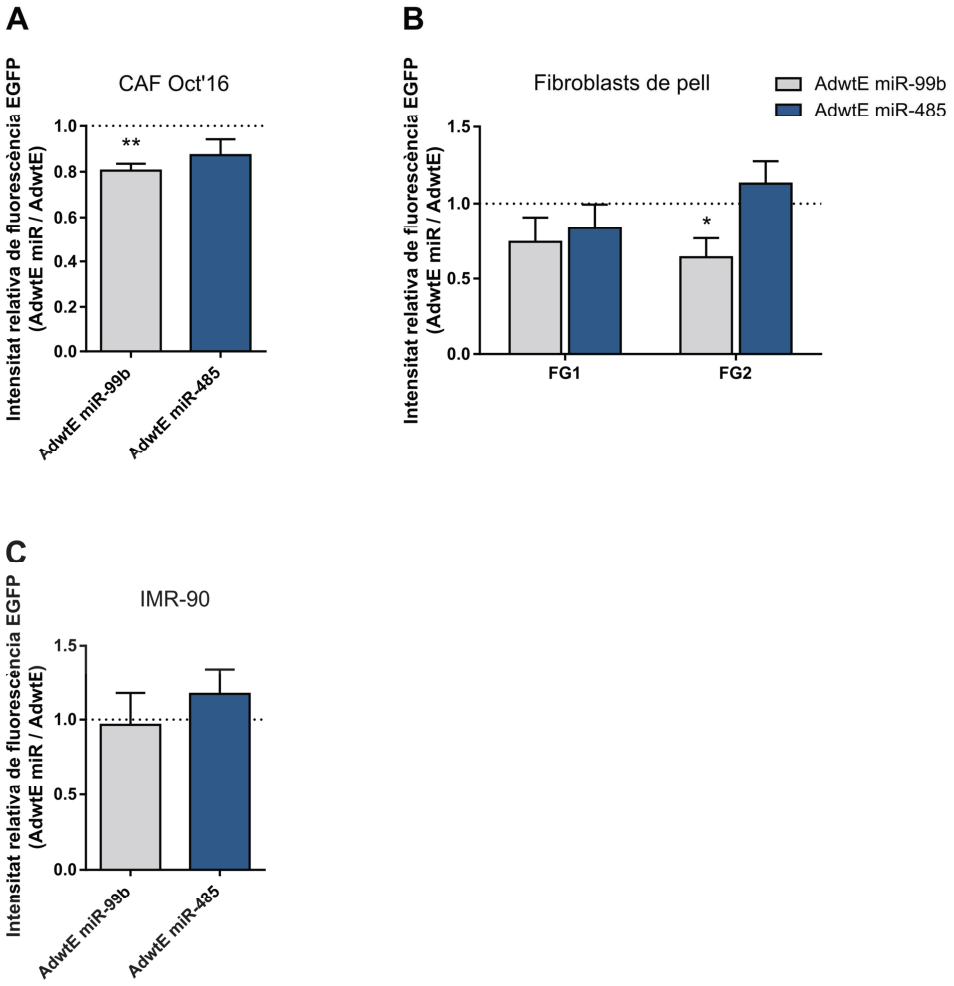


Figura 4.29. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 presenten uns nivells d'expressió d'EGFP similars o menors als del virus control AdwtE en infeccions de fibroblasts.

A. Quantificació dels nivells relatius de fluorescència EGFP de la infecció de CAF Oct'16 als 6 dies de la infecció amb 10 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485.

B. Quantificació dels nivells relatius de fluorescència EGFP de la infecció de fibroblasts de pell als 6 dies de la infecció amb 10 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485.

C. Quantificació dels nivells relatius de fluorescència EGFP de la infecció de IMR-90 als 6 dies de la infecció amb 10 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485.

La línia puntejada indica el valor relatiu d'intensitat d'EGFP de les infeccions amb AdwtE.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de cinc experiments independents.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

Una vegada validat l'enriquiment, es varen quantificar les partícules infectives presents al medi de cultiu de les cèl·lules infectades amb els adenovirus candidats i control. Cèl·lules PANC-1, MIA PaCa-2 i HPDE varen ser infectades amb una dosi baixa d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485. A les 48 hores post-infecció es va recollir el medi de cultiu i es quantificaren les partícules virals infectives que contenia. Aquests valors d'alliberament es varen corregir pels valors d'entrada de virus a les cèl·lules a les quatre hores post-infecció. D'acord amb els resultats prèviament obtinguts, els virus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 alliberaven més partícules infectives que el virus AdwtE en línies cel·lulars de PDAC, sobretot en PANC-1, en les que els virus candidats presentaven un alliberament fins a 4 vegades superior. En la línia no tumoral HPDE els tres virus presentaven un alliberament similar de partícules virals infectives (Figura 4.30A). L'alliberament de partícules infectives al medi de cultiu es va avaluar també en cèl·lules PANC-1 infectades amb un rang creixent de dosis virals. A dosis de 0,5, 1 i 5 PI/cèl·lula els adenovirus candidats varen mostrar un alliberament de partícules infectives superior al de l'AdwtE, mentre que a dosis altes l'alliberament dels tres virus s'igualava (Figura 4.30B).

Per tal de comprovar que l'augment de l'alliberament de partícules virals infectives era conseqüència de l'expressió dels miRNAs candidats, es va estudiar com afectava l'expressió transitòria en trans d'aquests a la replicació de l'AdwtE. Cèl·lules PANC-1 varen ser transfectades amb plasmidis d'expressió pel miR-99b i miR-485 (miRVec-99b i miRVec-485) mitjançant nanopartícules de poly-β-aminoésters. A les 24 hores post-transfecció, les cèl·lules varen ser infectades amb una dosi de 5 PI/cèl·lula d'AdwtE. El plasmidi miRVec-hTR, que va ser utilitzat com a control, no tenia cap efecte sobre l'AdwtE. En canvi, l'expressió en trans del miR-99b i, especialment, del miR-485, feia augmentar l'alliberament de partícules infectives del virus (Figura 4.31A).

A continuació, vàrem voler assegurar-nos de que l'augment de la capacitat replicativa dels adenovirus no fos un efecte inespecífic causat per un bloqueig en la via de biogènesi de miRNAs, la qual impedís la maduració d'altres miRNAs cel·lulars; o bé un efecte de la incorporació de les seqüències al genoma adenoviral. Amb aquest objectiu, es va generar un adenovirus que expressava el miR-759, miRNA pel qual no s'han descrit canvis d'expressió en infeccions adenovirals[66,74]. Cèl·lules PANC-1 varen ser infectades amb una dosi baixa d'AdwtE, AdwtE hTR i AdwtE miR-759. A les 48 hores post-infecció es varen quantificar els genomes virals presents al medi de cultiu. Es va comprovar que els tres virus presentaven un alliberament viral similar (Figura 4.31B). Així doncs, aquest conjunt de resultats ens va permetre atribuir específicament al miR-99b i al miR-485 l'increment de l'alliberament de partícules virals infectives.

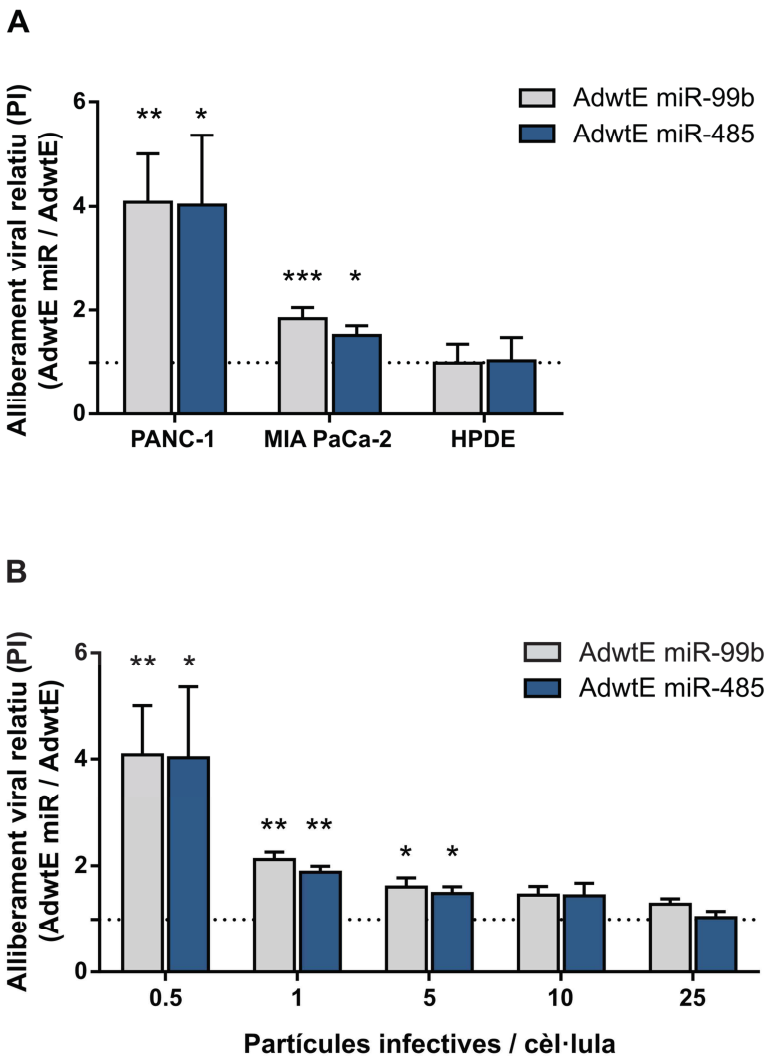


Figura 4.30. L'AdwtE miR-99b i l'AdwtE miR-485 presenten un alliberament de partícules virals infectives al medi de cultiu superior al de l'AdwtE.

A. Quantificació relativa de partícules virals infectives alliberades al medi de cultiu de cèl·lules PANC-1, MIA PaCa-2 i HPDE a les 48 hores de la infecció. Les cèl·lules varen ser infectades amb 0,5, 5 i 1 PI/cèl·lula, respectivament, d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485. Els valors d'alliberament es varen corregir per l'entrada a les cèl·lules de cadascun dels virus a les 4 hores post-infecció.

B. Quantificació relativa de partícules virals infectives alliberades al medi de cultiu de cèl·lules PANC-1 a les 48 hores de la infecció amb dosis creixents d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485. Els valors d'alliberament es varen corregir per l'entrada a les cèl·lules de cadascun dels virus a les 4 hores post-infecció.

La línia puntejada indica els valors relatius de les infeccions amb AdwtE.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim cinc experiments independents. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, ***$p<0.001$

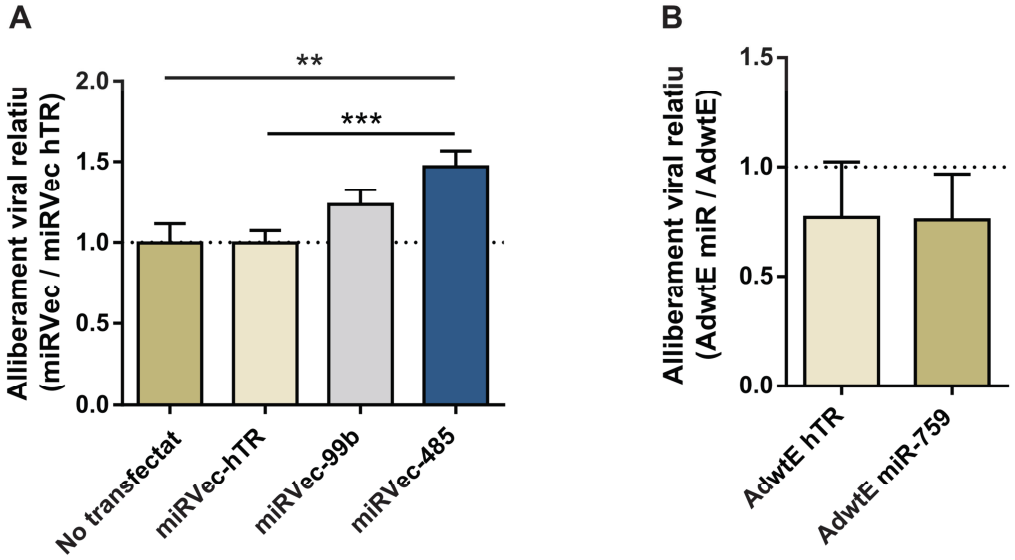


Figura 4.31. L'increment de l'alliberament de partícules virals infectives al medi de cultiu és degut a l'expressió del miR-99b i del miR-485.

A. Quantificació relativa de partícules virals infectives alliberades al medi de cultiu de cèl·lules PANC-1 no transfectades o transfectades amb miRVec-hTR, miRVec-99b i miRVec-485 i infectades amb d'AdwtE. Les cèl·lules varen ser transfectades amb 2µg de DNA plasmídic mitjançant nanopartícules de poly-β-aminoésters i 24 hores post-transfecció varen ser infectades amb 5 PI/cèl·lula d'AdwtE. Les partícules infectives del medi varen ser quantificades a les 48 hores de la infecció. Els valors d'alliberament es varen corregir per l'entrada a les cèl·lules de cadascun dels virus a les 4 hores post-infecció.

B. Quantificació relativa de genomes virals alliberats al medi de cultiu de cèl·lules PANC-1 a les 48 hores de la infecció amb 1 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE hTR i AdwtE miR-759.

La línia puntejada indica els valors relatius de les transfeccions amb miRVec-hTR o de les infeccions amb AdwtE, segons correspongui.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim tres experiments independents.

** $p<0.01$, ***$p<0.001$

Seguidament, es va estudiar si la major presència de partícules infectives al medi en cèl·lules infectades amb els virus candidats era causada per un major alliberament d'aquestes, o bé si era conseqüència d'un increment en la formació de les partícules infectives a l'interior cel·lular. Cèl·lules PANC-1 varen ser infectades amb 0,5 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 i a les 24, 30, 48 i 72 hores post-infecció es varen quantificar les partícules virals infectives presents al medi de cultiu i a l'interior cel·lular. Els genomes virals totals presents a l'interior cel·lular varen ser

quantificats a les 12, 24, 30, 48 i 72 hores post-infecció. Tots els valors varen ser corregits per l'entrada dels virus a les cèl·lules a les 4 hores post-infecció.

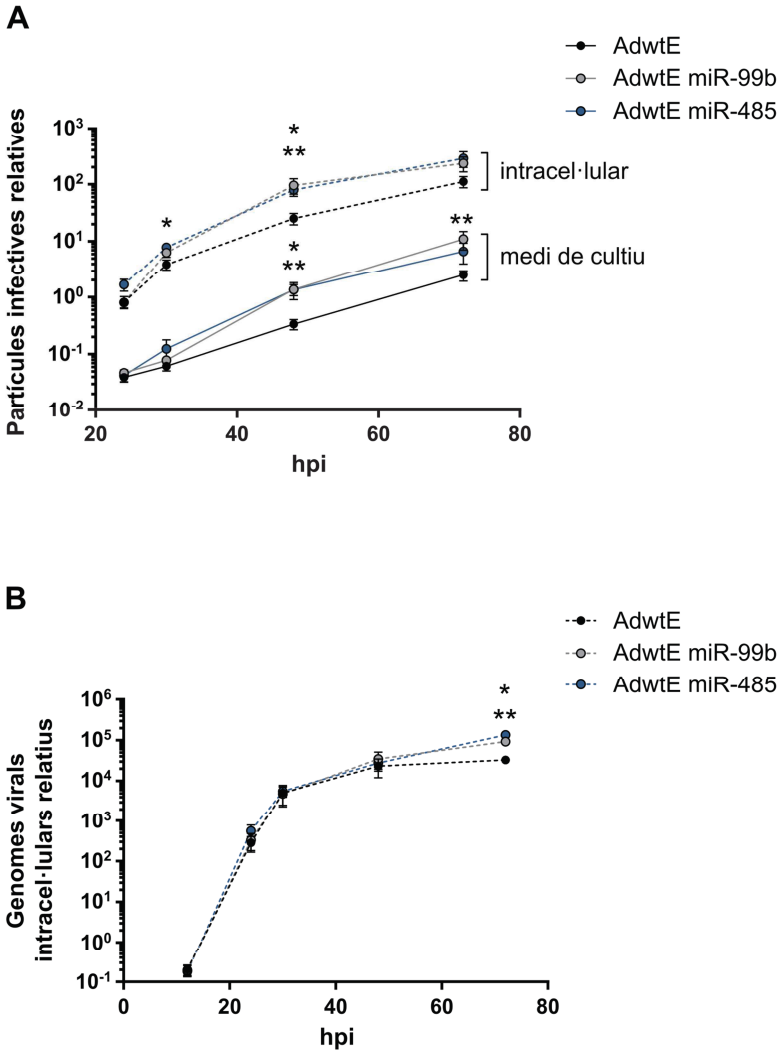


Figura 4.32. El miR-99b i el miR-485 acceleren l'alliberament de partícules virals infectives al medi gràcies a una major formació d'aquestes a l'interior cel·lular.

A. Quantificació absoluta de partícules virals infectives presents a l'interior cel·lular i al medi de cultiu de cèl·lules PANC-1 a les 24, 30, 48 i 72 hores de la infecció amb 0,5 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485. Els valors d'alliberament es varen corregir per l'entrada a les cèl·lules de cadascun dels virus a les 4 hores post-infecció.

B. Quantificació absoluta de genomes virals presents a l'interior de cèl·lules PANC-1 a les 12, 24, 30, 48 i 72 hores de la infecció amb 0,5 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485. Els valors d'alliberament es varen corregir per l'entrada a les cèl·lules de cadascun dels virus a les 4 hores post-infecció.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim cinc experiments independents.

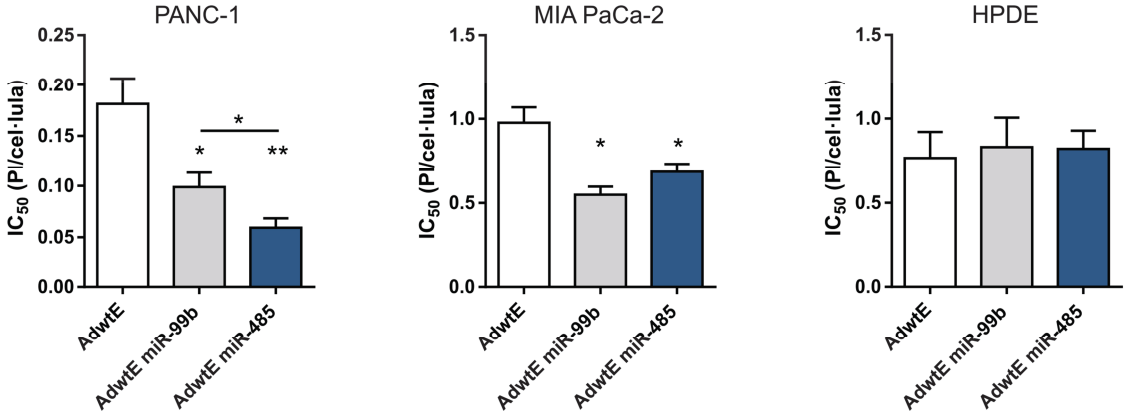
* $p<0.05$, ** $p<0.01$

A nivell extracel·lular, es va poder observar que els virus candidats presentaven un major alliberament de partícules infectives que l'AdwtE a partir de les 48 hores post-infecció. A nivell intracel·lular, aquest augment va ser visible des de les 30 hores post-infecció i menys marcat a les 72 hores, moment en el que els primers virus candidats alliberats havien reinfectat (Figura 4.32A). Per tant, els miRNAs causaven un alliberament accelerat dels virions que anava acompanyat d'una major formació de partícules infectives a l'interior cel·lular. Els genomes totals presents a l'interior cel·lular eren idèntics pels tres adenovirus fins al moment en que es sumaven els efectes de la reinfecció a les 72 hores (Figura 4.32B). Aquests resultats varen posar de manifest que els efectes observats es devien a una millor formació de partícules infectives i no a un augment de la replicació del genoma adenoviral.

4.2.3. L'expressió del miR-99b i del miR-485 permet augmentar la citotoxicitat dels adenovirus

A continuació, vàrem estudiar els efectes dels adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 sobre la citotoxicitat cel·lular. Cèl·lules PANC-1, MIA PaCa-2 i HPDE varen ser infectades amb un rang de dosis d'AdwtE i dels virus candidats. Als 7 dies post-infecció es va determinar la viabilitat cel·lular per assaig MTT i es va calcular l'IC_{50} de cada virus. Es va observar que els virus candidats tenien una citotoxicitat major que l'AdwtE en les línies cel·lulars de PDAC PANC-1 i MIA PaCa-2, però no en les cèl·lules no tumorals HPDE (Figura 4.33). La disminució dels valors d'IC_{50}, de fins a 3 vegades per l'AdwtE miR-485 en PANC-1, s'ajustava als resultats de la bioselecció en aquestes cèl·lules, en els que els virus codificants pel miR-485 estaven més representats.

Amb aquest conjunt de resultats es va poder afirmar que el miR-99b i el miR-485 facilitaven la formació i alliberament de partícules adenovirals infectives i que en conseqüència incrementaven la capacitat citotòxica dels adenovirus candidats.



IC_{50} (PI/cèl·lula) ± SEM (P valor)

	AdwtE	AdwtE miR-99b	AdwtE miR-485
PANC-1	**0,181** ± 0,023	**0,099** ± 0,013 (0,0043)	**0,058** ± 0,008 (0,0260)
MIA PaCa-2	**0,903** ± 0,099	**0,548** ± 0,044 (0,0023)	**0,682** ± 0,049 (0,0082)
HPDE	**0,769** ± 0,139	**0,832** ± 0,159 (0,7984)	**0,824** ± 0,094 (0,8745)

Figura 4.33. El miR-99b i el miR-485 milloren la capacitat citotòxica dels adenovirus en línies cel·lulars de PDAC però no en la línia cel·lular no tumoral HPDE.

Valors d'IC_{50} en cèl·lules PANC-1, MIA PaCa-2 i HPDE als 7 dies de la infecció amb AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485. Els valors d'IC_{50} varen ser calculats a partir de les corbes de dosi-resposta de cadascun dels virus.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim cinc experiments independents. * $p<0.05$, ** $p<0.01$

4.2.4. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 mostren una replicació viral superior a l'AdwtE en models tumorals *in vivo*

La capacitat augmentada de replicació dels adenovirus codificants pel miR-99b i miR-485 va ser avaluada *in vivo* en tumors subcutanis generats en ratolins immunodeprimits atímic *nude* mitjançant un experiment de competició en tumors.

Tumors PANC-1 i MIA PaCa-2 varen ser implantats subcutàniament als flancs de ratolins immunodeprimits atímic *nude* injectant-los $2 \cdot 10^6$ cèl·lules/tumor. Una barreja, a parts iguals, del virus control AdwtE i cadascun dels virus candidats va ser administrada intravenosament als ratolins quan els tumors mesuraven $200mm^3$ (Figura 4.34A). Dotze dies després de l'administració, s'analitzaren les partícules virals infectives de cada virus presents als tumors.

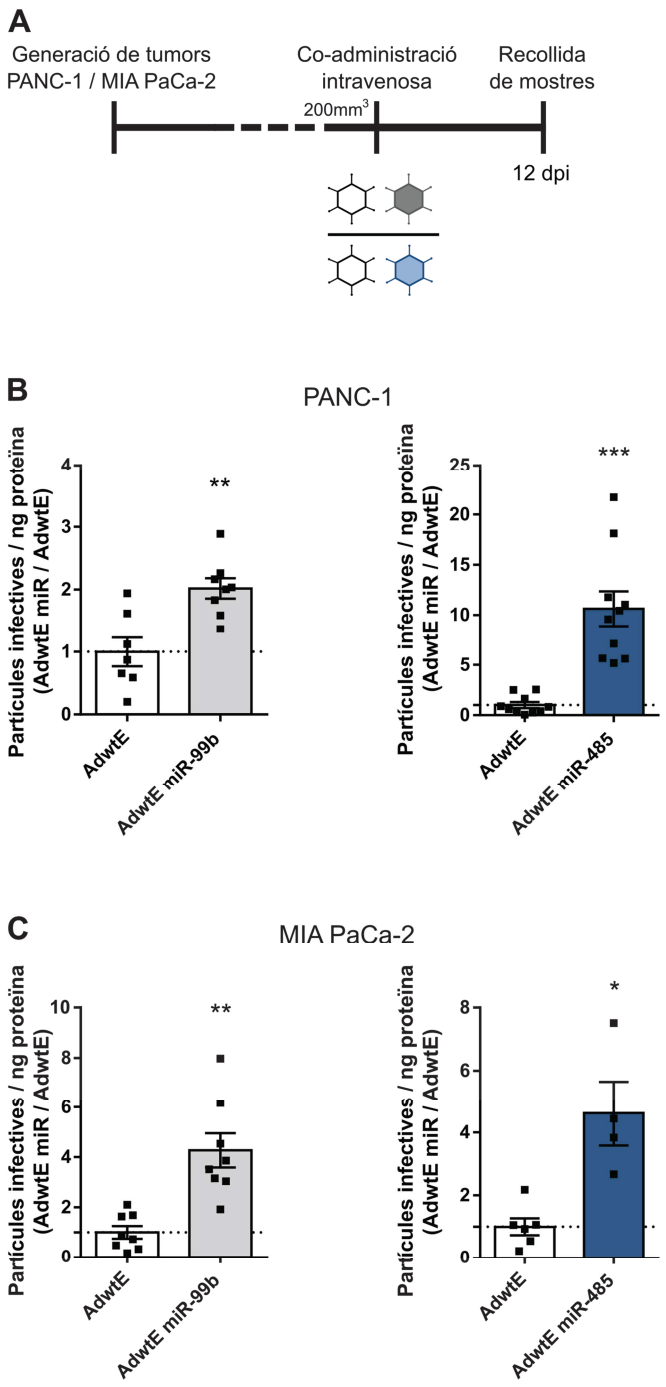


Figura 4.34. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 tenen una capacitat de replicació augmentada *in vivo* en diferents models de tumors subcutanis.

A. Esquema representatiu de l'experiment de competició en tumors de cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2. $2{\cdot}10^6$ cèl·lules/tumor varen ser implantades subcutàniament als flancs de ratolins immunodeprimits atímic *nude*. Quan els tumors tenien un volum de $200mm^3$ es va administrar intravenosament als ratolins una dosi de $2{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí d'una barreja, a parts iguals (10^{10} vp/ratolí de cada virus), d'AdwtE i AdwtE miR-99b (n=4) o d'AdwtE i AdwtE miR-485 (n=5 PANC-1 i n=3 MIA PaCa-2). 12 dies post-injecció els animals varen ser sacrificats i es va determinar, per qPCR amb encebadors específics, la proporció de partícules infectives de cada virus present als tumors.

B. Quantificació relativa de partícules infectives d'AdwtE i dels adenovirus candidats presents en tumors PANC-1 al moment del sacrifici.

C. Quantificació relativa de partícules infectives d'AdwtE i dels adenovirus candidats presents en tumors MIA PaCa-2 al moment del sacrifici.

La línia puntejada indica els valors relatius d'AdwtE present als tumors.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

En ambdós models tumorals, els adenovirus candidats varen replicar més que l'AdwtE, especialment l'AdwtE miR-485, pel qual es varen detectar fins a 10 vegades més de partícules infectives que d'AdwtE en tumors PANC-1 (Figura 4.34B i C). Així doncs, es va poder determinar que els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 tenien un *fitness* superior al de l'AdwtE també en un context *in vivo*.

4.2.5. La millora en la formació de partícules infectives dels adenovirus candidats vindria donada per una major expressió dels gens virals

Els resultats obtinguts fins al moment indicaven que la replicació del genoma dels virus candidats no era superior que la del virus AdwtE però que, en canvi, els virus candidats presentaven una formació de partícules infectives superior. Per aquest motiu, es va analitzar l'expressió dels gens virals tardans implicats en la formació de la càpsida del virió, a nivell d'mRNA i de proteïna. Cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2 varen ser infectades a una dosi baixa d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 i a les 24 hores post-infecció es va extreure l'RNA total i es va quantificar, per RT-qPCR, l'expressió dels gens *L3* (hexó) i *L5* (fibra). El mateix procediment d'infecció es va portar a terme en cèl·lules PANC-1, MIA PaCa-2 i HPDE per tal d'obtenir extractes proteics i analitzar, per western blot, l'expressió de les proteïnes hexó, pentó i fibra.

En les línies cel·lulars de PDAC, els adenovirus candidats mostraven una major transcripció dels mRNAs d'hexó i fibra (Figura 4.35) així com també una major expressió de les proteïnes tardanes estudiades (Figura 4.36A). En canvi, en cèl·lules no tumorals HPDE, l'AdwtE miR-99b presentava uns nivells d'expressió de proteïnes

tardanes equivalents als de l'AdwtE, mentre que amb l'AdwtE miR-485 s'observava una menor expressió de les proteïnes hexó i pentó (Figura 4.36B).

L'augment de l'expressió dels gens tardans podia ser produït per un efecte únic sobre el MLP o bé perquè hi hagués també una expressió superior del gen *E1A*, que conseqüentment promouria una activació més marcada del MLP. Així doncs, es va procedir a analitzar l'expressió d'*E1A* a nivell d'mRNA, per RT-qPCR, i a nivell de proteïna, per western blot, en cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2 a les 8 hores de la infecció amb una dosi baixa d'AdwtE i dels virus candidats. Es va poder determinar que l'expressió d'*E1A* en PANC-1 i MIA PaCa-2 infectades amb els virus candidats era superior, a nivell d'mRNA i de proteïna, que en cèl·lules infectades amb AdwtE (Figura 4.37A i B). Amb aquests resultats, es va poder afirmar que el miR-99b i el miR-485 causaven un augment de la transcripció dels gens virals, sobretot els tardans, que es traduïa en una major expressió de les proteïnes corresponents.

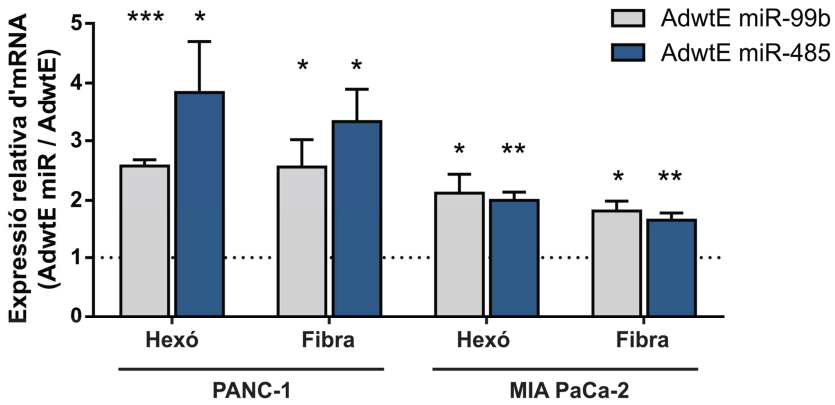


Figura 4.35. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 presenten una expressió augmentada dels gens virals tardans a nivell d'mRNA en cèl·lules de PDAC.

Quantificació relativa, per RT-qPCR, dels nivells d'mRNA dels gens *L3* (hexó) i *L5* (fibra) en cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2 a les 24 hores de ser infectades amb 1 i 5 PI/cèl·lula, respectivament. Els nivells de *β-actina* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió.

La línia puntejada indica els valors relatius de les infeccions amb AdwtE.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de cinc experiments independents.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

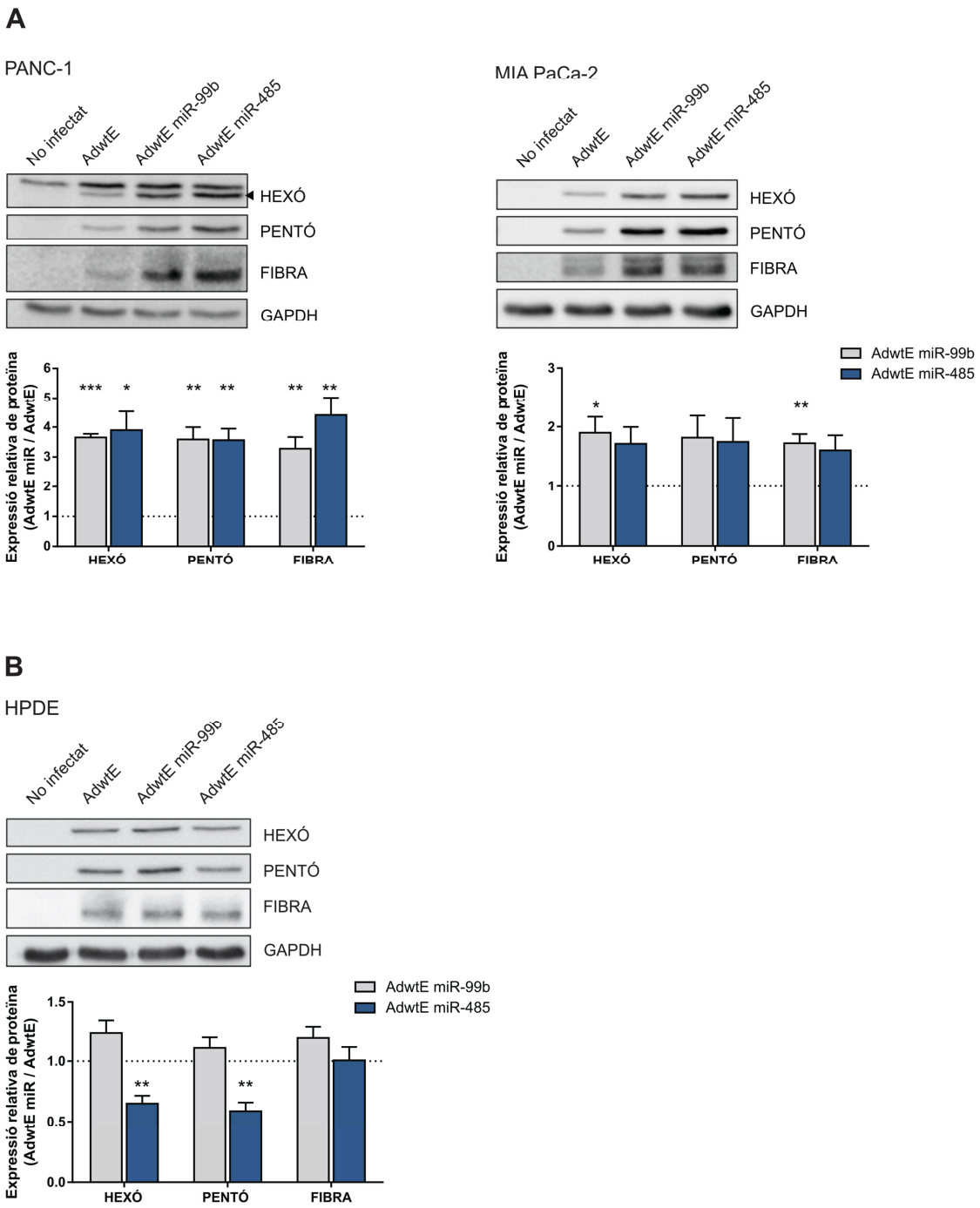


Figura 4.36. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 presenten una expressió augmentada de les proteïnes tardanes en cèl·lules de PDAC però no en cèl·lules HPDE.

A. Western blot representatiu i quantificació relativa dels nivells d'expressió de les proteïnes hexó, pentó i fibra en cèl·lules PANC-1 (panell esquerra) i MIA PaCa-2 (panell dret) a les 24 hores de ser infectades amb 1 i 5 PI/cèl·lula, respectivament. Els nivells de GAPDH varen ser utilitzats com a control de càrrega.

B. Western blot representatiu i quantificació relativa dels nivells d'expressió de les proteïnes hexó, pentó i fibra en cèl·lules HPDE a les 24 hores de ser infectades amb 1 PI/cèl·lula. Els nivells de GAPDH varen ser utilitzats com a control de càrrega.

La línia puntejada indica els valors relatius de les infeccions amb AdwtE. Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de experiments independents. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$

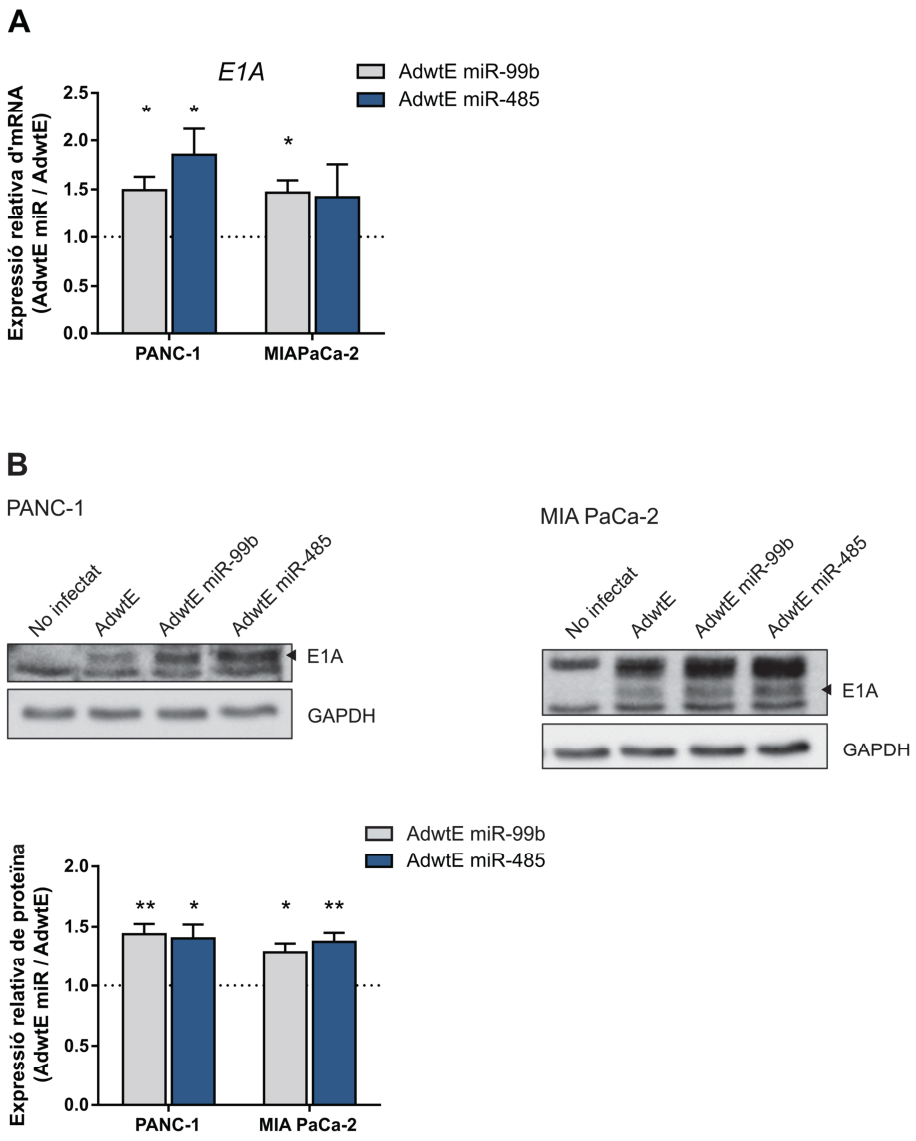


Figura 4.37. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 tenen una expressió augmentada del gen primerenc immediat *E1A*.

A. Quantificació relativa, per RT-qPCR, dels nivells d'mRNA d'*E1A* en cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2 a les 8 hores de ser infectades amb 1 i 5 PI/cèl·lula, respectivament. Els nivells de *β-actina* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió.

B. Western blot representatiu i quantificació relativa dels nivells de proteïna E1A en cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2 a les 8 hores de ser infectades amb 1 i 5 PI/cèl·lula, respectivament. Els nivells de GAPDH varen ser utilitzats com a control de càrrega.

La línia puntejada indica els valors relatius de les infeccions amb AdwtE.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de cinc experiments independents.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

4.2.6. El miR-99b i el miR-485 actuen sobre gens relacionats amb processos de transcripció i regulació de l'expressió gènica

Per tal d'identificar sobre quins processos cel·lulars i, més concretament, sobre quins gens podien estar actuant els miRNAs candidats, es varen analitzar els seus potencials gens diana utilitzant el programa bioinformàtic miRWalk (amb els algorismes de miRWalk, miRanda, miRDB, Pictar2, PITA, RNA22 i Targetscan). Les llistes de potencials gens diana varen ser analitzades amb el programa bioinformàtic Panther GO, el qual classifica els elements entrats en famílies d'ontologia gènica. El primer terme ontològic que tenia relació amb l'augment de transcripció observat amb els virus candidats era el terme anomenat *Regulation of gene expression* (P valor = $1{,}20 \cdot 10^{10}$ pel miR-99b i P valor = $1{,}42 \cdot 10^{16}$ pel miR-485). En una classificació en famílies ontològiques generals es va poder observar la implicació dels miRNAs candidats en la regulació de gens relacionats amb processos de transcripció i amb processos de regulació de l'expressió gènica (taules 8.1 i 8.2 de l'annex).

Del terme *Regulation of gene expression*, es varen seleccionar els potencials gens diana que estaven predits per més de 4 o 5 algorismes al programa miRWalk (pel miR-99b o pel miR-485, respectivament). De la selecció, es varen identificar els gens que poguessin estar implicats en la modulació de les infeccions virals, i més concretament, en el cicle adenoviral. D'aquest anàlisi en varen sorgir quatre gens diana destacats: *SRPK1*, relacionat amb processos d'*splicing* alternatiu, *ELF4*, *KLF8* i *MDM2*, tres gens relacionats amb l'activació o repressió de la transcripció (Figura 4.38).

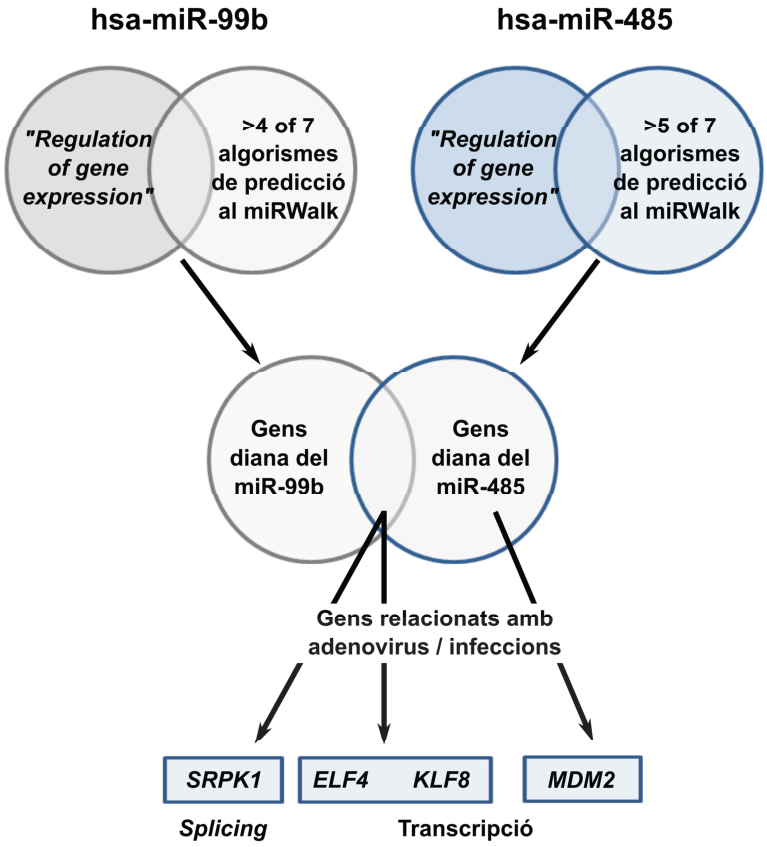


Figura 4.38. *SRK1*, *ELF4*, *KLF8* i *MDM2* varen ser identificats a través d'un anàlisi bioinformàtic com a potencials gens diana dels miRNAs candidats.

Esquema de l'anàlisi bioinformàtic realitzat per la identificació de potencials gens diana del miR-99b i del miR-485 que poden estar implicats en l'alteració del cicle adenoviral.

Gen	miR-99b-3p	miR-99b-5p	miR-485-3p	miR-485-5p
SRPK1	3	-	1	2
ELF4	1	-	-	1
KLF8	1	1	1	2
MDM2	-	-	1	7

Taula 4.3. Dianes predites pel miR-99b i pel miR-485 al 3'UTR d'*SRPK1*, *ELF4*, *KLF8* i *MDM2* segons l'algorisme miRanda.

Dianes predites per cadascuna de les cadenes dels miRNAs candidats segons l'algorisme miRanda al 3'UTR dels gens estudiats. La predicció es va portar a terme a través de microRNAs.org.

```
3' gccuGGGUGUCUGUGCUC -GAAc 5'     hsa-miR-99b-3p    mirSVR score -0,2686
          | : | |   | | : |   | | | |   | | |
1039:5' uuuuCUCAGAGGCUCGAGUCUUu 3'   SRPK1

3' cuuaaguagugccgGUCGGAGa 5'       hsa-miR-485-5p    mirSVR score -0,7510
                 | | | | | | |
237:5' acuaaaaugugaaaCAGCCUCu 3'     SRPK1


3' gccugggugucUGUGCUCGAAc 5'       hsa-miR-99b-3p    mirSVR score -0,2947
              |   | | | | | | | |
1440:5' cucccuucuuuAAACGAGCUUg 3'    ELF4

3' cuuaaguagugccGGUCGGAGa 5'       hsa-miR-485-5p    mirSVR score -0,1703
                 | | | | | | | |
883:5' gaugaagugcccuCCAGCCUCa 3'     ELF4


3' ucucuccUCUCGGCACAUACUg 5'       hsa-miR-485-3p    mirSVR score -0,2564
            |   | : :   | | | | | | |
2907:5' ggaaccaACAGUU -UGUAUGAa 3'   MDM2


3' gcguuccagccaagAUGCCCAc 5'       hsa-miR-99b-5p    mirSVR score -0,5192
                 | | | | | | |
1565:5' acagaugagacaaaUACGGGUc 3'    KLF8

3' cuUAAGUAGUGCCGGUCGGAGa 5'       hsa-miR-485-5p    mirSVR score -0,6288
     : | | | |     | |     : | | | | | | |
1383:5' gaAUUUA - GAC - - UCAGCCUCu 3'   KLF8
```

Figura 4.39. Dianes predites amb millor puntuació pel miR-99b i pel miR-485 al 3'UTR d'*SRPK1*, *ELF4*, *KLF8* i *MDM2* segons l'algorisme miRanda.

Dianes predites pels miRNAs candidats segons l'algorisme miRanda al 3'UTR dels gens estudiats. La predicció es va portar a terme a través de microRNAs.org.

SRPK1 és una quinasa de factors de *splicing*[150] que es troba sobreexpressada en múltiples càncers[151]. En el transcurs de la infecció, els adenovirus desfosforil·len factors regulats per SRPK1 per tal de modular l'*splicing* alternatiu dels seus gens[97,152]. El 3'UTR del gen *SRPK1* conté dianes d'unió predites per ambdós miRNAs candidats (Taula 4.3 i Figura 4.39). Si el miRNA candidat estigués actuant sobre el gen diana, caldria esperar una disminució en l'expressió del gen en les cèl·lules infectades amb els virus que expressen el miRNA. Per avaluar si aquesta disminució es produïa, cèl·lules PANC-1 varen ser infectades amb 10 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 i s'avaluaren els nivells d'mRNA d'*SRPK1* a les 24 hores post-infecció. En la infecció amb el virus codificant pel miR-485, el qual tenia una diana d'unió amb

millor puntuació de predicció, es va observar una reducció dels nivells d'expressió d'mRNA d'*SRPK1*. El miR-99b permetia retornar a nivells basals el lleuger augment d'expressió d'*SRPK1* que produïa la infecció amb AdwtE (Figura 4.40A).

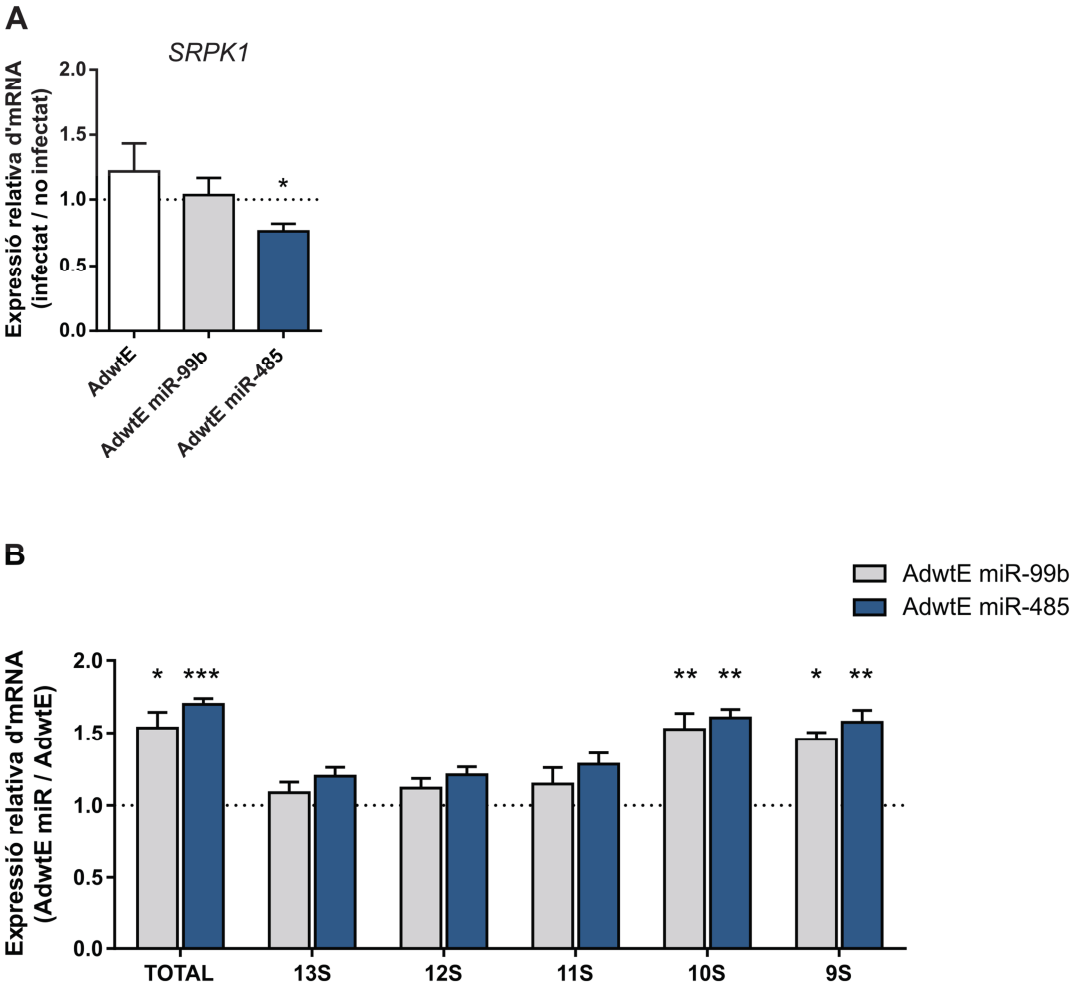


Figura 4.40. Els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 influeixen en el procés d'*splicing* alternatiu del gen *E1A*.

A. Quantificació relativa, per RT-qPCR, dels nivells d'mRNA d'*SRPK1* en cèl·lules PANC-1 a les 24 hores de ser infectades amb 10 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485. Els nivells de *GAPDH* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió.

B. Quantificació relativa, per RT-qPCR, dels nivells d'mRNA total i de cadascuna de les isoformes d'*splicing* d'*E1A* en cèl·lules PANC-1 a les 24 hores de ser infectades amb 1 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485. Els nivells de *GAPDH* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió.

La línia puntejada indica els valors relatius de les infeccions amb AdwtE.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim quatre experiments independents.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

Per estudiar si l'expressió dels miRNAs candidats produïa algun canvi al patró d'*splicing* dels gens adenovirals, es varen analitzar les diferents isoformes d'splicing del gen *E1A*, per RT-qPCR amb primers específics per cadascuna d'elles, en cèl·lules PANC-1 a les 24 hores post-infecció. Els virus candidats, respecte l'AdwtE, presentaven una expressió significativament superior d'mRNA total d'*E1A* i de les isoformes 10S i 9S, mentre que per les isoformes 13S, 12S i 11S només s'observava una expressió lleugerament superior (Figura 4.40B). Així doncs, el gen *E1A* no només estava més expressat en les infeccions amb els virus candidats, sinó que els miRNAs promovien l'ús d'acceptors d'*splicing* més distants, relacionats amb fases més avançades de la infecció i que podrien contribuir a una major activació del MLP.

Pel que fa als processos relacionats amb la transcripció, ens vàrem centrar amb els gens *ELF4*, *MDM2* i *KLF8*. L'expressió del factor de transcripció ELF4 és induïda durant la resposta cel·lular antiviral. ELF4 promou la progressió en el cicle cel·lular i activa l'expressió d'*MDM2*[153]. El seu 3'UTR conté dianes d'unió predites per ambdós miRNAs candidats (Taula 4.3 i Figura 4.39).

MDM2 és una ubiqüitina lligasa E3 que reprimeix l'activitat transcripcional de p53 i la marca per tal de que sigui degradada al proteasoma[154,155]. MDM2 presenta una expressió augmentada en càncer[156] i és un gen diana validat pel miR-485[157] (Taula 4.3 i Figura 4.39). Yang H. i col. varen descriure que un *knockdown* d'aquesta proteïna permetia augmentar l'expressió dels gens adenovirals[158].

KLF8 és un factor de transcripció, sobreexpressat en PDAC i altres càncers[159], que s'uneix a les caixes CACCC dels promotors i actua reprimint l'expressió dels gens a través de la interacció amb CtBP2[160]. Les caixes CACCC són presents a promotors de gens virals i s'ha descrit que un *knockdown* de CtBP2 facilita la replicació adenoviral[161]. KLF8 té dianes d'unió predites pels dos miRNAs candidats (Taula 4.3 i Figura 4.39).

En primer lloc es va analitzar l'expressió d'mRNA dels tres gens en cèl·lules PANC-1 infectades amb AdwtE i amb els adenovirus candidats. L'expressió d'*ELF4* era menor en cèl·lules infectades amb AdwtE miR-99b que en la resta de condicions. L'expressió d'*MDM2* augmentava lleugerament a causa de la infecció amb AdwtE, però tornava a nivells basals durant la infecció amb AdwtE miR-99b i era reduïda significativament amb la infecció amb AdwtE miR-485. Pel gen *KLF8* no s'observaren canvis marcats a nivell d'mRNA en cap de les condicions (Figura 4.41A).

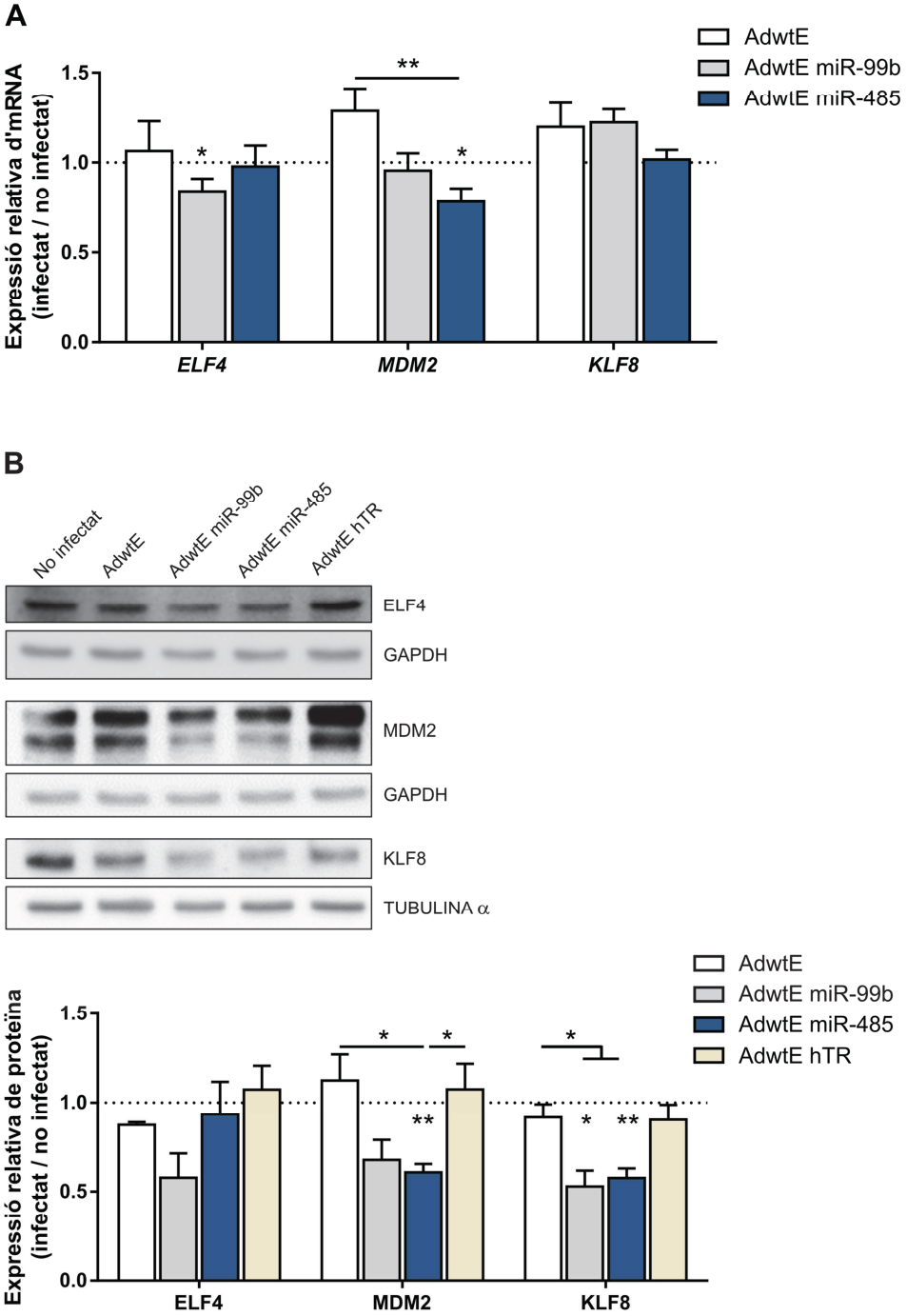


Figura 4.41. ELF4, MDM2 i KLF8 presenten una reducció dels seus nivells d'expressió en una infecció amb els adenovirus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485.

A. Quantificació relativa, per RT-qPCR, dels nivells d'mRNA d'*ELF4*, *MDM2* i *KLF8* en cèl·lules PANC-1 no infectades i a les 24 hores de ser infectades amb 10 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485. Els nivells de *GAPDH* varen ser utilitzats per normalitzar l'expressió.

B. Western blot representatiu i quantificació relativa dels nivells d'expressió de les proteïnes ELF4, MDM2 i KLF8 en cèl·lules PANC-1 no infectades i a les 24 hores de ser infectades amb 10 PI/cèl·lula d'AdwtE, AdwtE miR-99b, AdwtE miR-485 i AdwtE hTR. Els nivells de GAPDH varen ser utilitzats com a control de càrrega.

La línia puntejada indica els valors relatius de les PANC-1 no infectades.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim tres experiments independents.

* $p<0.05$, ** $p<0.01$

Cal tenir en compte que l'efecte dels miRNAs sol ser més marcat a nivell de proteïna que a nivell d'mRNA. Per tant, vàrem analitzar per western blot l'expressió de les proteïnes ELF4, MDM2 i KLF8 en cèl·lules PANC-1 a les 24 hores de ser infectades amb els virus control AdwtE i AdwtE hTR i amb els virus candidats. ELF4 mostrava nivells d'expressió menors en les infeccions amb AdwtE miR-99b que en la resta de condicions, tal com s'havia observat a nivell d'mRNA. Els dos virus candidats reduïren l'expressió d'MDM2, especialment el virus codificant pel miR-485. MDM2 no és un gen diana predit pel miR-99b, de manera que la regulació negativa possiblement sigui deguda als efectes del miRNA sobre ELF4. Per KLF8, a diferència del que s'havia observat a nivell d'mRNA, l'expressió a nivell de proteïna va disminuir de forma significativa en les infeccions amb els dos virus candidats (Figura 4.41B). Així doncs, aquests resultats indiquen que el miR-99b i el miR-485 regularien, directe o indirectament, l'expressió dels factors cel·lulars ELF4, MDM2 i KLF8.

Amb l'objectiu de determinar si ELF4, MDM2 i KLF8 podien estar implicats en l'efecte diferencial observat pels adenovirus candidats entre cèl·lules de PDAC i cèl·lules no tumorals, es va avaluar la seva expressió en les cèl·lules de PDAC PANC-1, MIA PaCa-2 i CP15-Luc i en les línies no tumorals HPDE, FG1, FG2 i IMR-90. Amb més o menys intensitat, els tres factors estaven expressats en cèl·lules de PDAC. En canvi, les HPDE no expressaven ELF4 i expressaven poc MDM2, mentre que els fibroblasts tenien uns nivells molt reduïts d'expressió d'MDM2 i KLF8 (Figura 4.42). Per tant, l'expressió diferencial entre cèl·lules de PDAC i cèl·lules no tumorals podrien explicar, almenys parcialment, la selectivitat tumoral observada en l'efecte potenciador de l'activitat adenoviral dels miRNAs candidats.

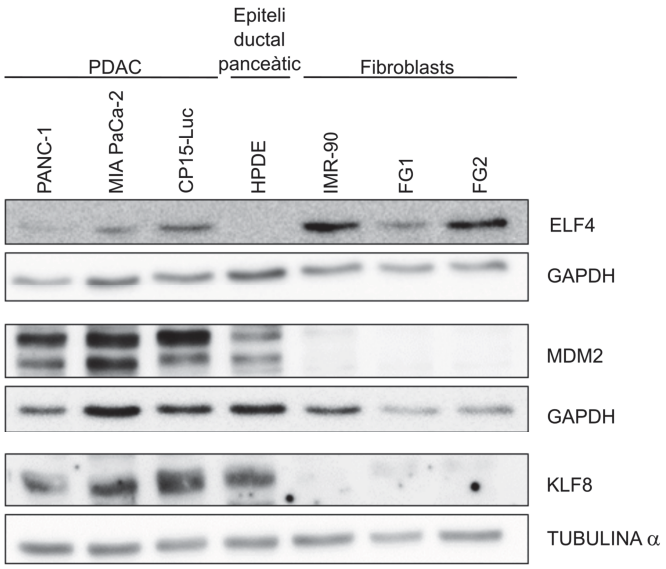


Figura 4.42. ELF4, MDM2 i KLF8 presenten una expressió diferencial entre línies cel·lulars de PDAC i cèl·lules no tumorals.

Western blot representatiu de l'expressió de les proteïnes ELF4, MDM2 i KLF8 en un ventall de cèl·lules de PDAC i cèl·lules no tumorals. Els nivells de GAPDH varen ser utilitzats com a control de càrrega.

4.2.7. El miR-99b i miR-485 confereixen una replicació viral i una capacitat citotòxica superiors a l'adenovirus oncoselectiu ICOVIR15

L'AdwtE no és un virus de replicació selectiva en tumor i la seva administració sistèmica pot causar danys a teixits sans. Per aquest motiu es va testar l'acció dels miRNAs candidats en un virus oncolític de replicació selectiva en tumor. Els resultats obtinguts fins al moment mostraven que els miRNAs permetien augmentar l'expressió d'*E1A*, probablement per una inducció de la transcripció a partir del seu promotor. Per tant, es va descartar l'ús del PANCAd, testat en el primer bloc de la tesi, ja que no té l'expressió del gen *E1A* controlada per un promotor salvatge, sinó per un promotor uPAR modificat. Així, es va optar per testar els miRNAs en el context del virus ICOVIR15 (cedit pel Dr. Alemany). Aquest adenovirus manté gairebé intacte la regió corresponent a la unitat transcripcional d'*E1A*, tan sols modificada amb l'addició de caixes d'unió d'E2F al promotor i amb la mutació Δ24 a la regió codificant. L'ICOVIR15 incorpora també el pèptid RGD al *knob* de la fibra, que facilita l'entrada del virus a la cèl·lula a través d'integrines. Aquestes conjunt de modificacions permet que

l'ICOVIR15 tingui una replicació selectiva i augmentada en cèl·lules tumorals[108]. Les regions de DNA genòmic humà codificants pel miR-99b i pel miR-485, sota el control del promotor CMV, varen ser incorporades a 3bp del final de la ITR dreta de l'ICOVIR15 (Figura 4.43).

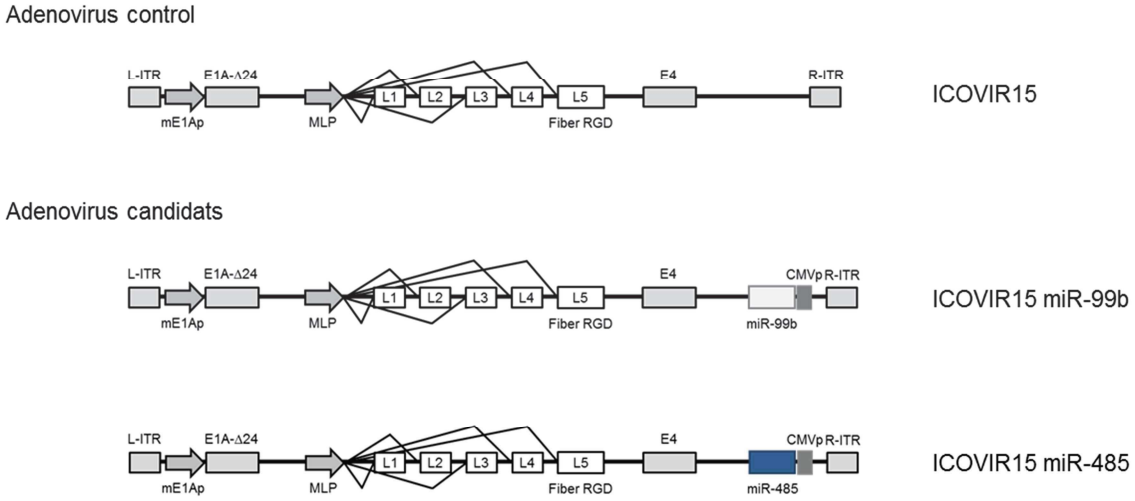


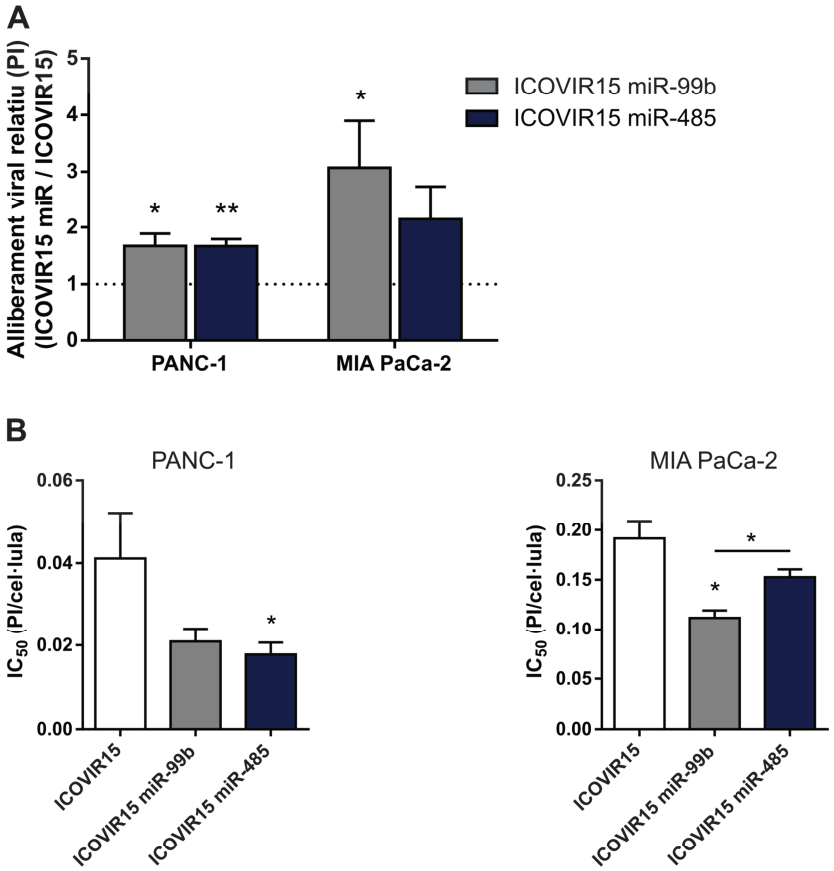
Figura 4.43. Esquema representatiu dels genomes de l'adenovirus control ICOVIR15 i dels adenovirus candidats ICOVIR15 miR-99b i ICOVIR15 miR-485.

Es destaquen les modificacions al promotor i gen *E1A*, la fibra RGD i la incorporació de la seqüència dels miRNAs sota el control del promotor CMV.

En primer lloc, es va estudiar la capacitat per alliberar partícules infectives al medi de cultiu del virus parental ICOVIR15 i dels dos virus candidats, l'ICOVIR15 miR-99b i l'ICOVIR15 miR-485. Cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2 varen ser infectades amb una dosi baixa dels tres virus i, a les 48 hores post-infecció, es varen quantificar les partícules virals infectives presents al medi de cultiu. Tots els valors varen ser corregits per l'entrada dels virus a les cèl·lules a les 4 hores post-infecció. L'expressió dels miRNAs permetia que els virus candidats alliberessin més partícules infectives al medi que el virus parental ICOVIR15 (Figura 4.44A). Mentre que en PANC-1 ambdós virus candidats mostraren un augment similar de l'alliberament, en MIA PaCa-2 el miR-99b tenia un major impacte sobre el virus.

A continuació, es va testar la citotoxicitat dels tres virus. Cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2 varen ser infectades amb un rang de dosis d'ICOVIR15, ICOVIR15 miR-99b i

ICOVIR15 miR-485 i, als 7 dies post-infecció, es va avaluar la viabilitat cel·lular amb un assaig MTT. Els virus candidats varen mostrar-se més potents que l'ICOVIR15 en cèl·lules PANC-1, reduint els valors d'IC_{50} fins a dues vegades. En cèl·lules MIA PaCa-2, només l'ICOVIR15 miR-99b va mostrar una major citotoxicitat que l'ICOVIR15 (Figura 4.44B).



IC_{50} (PI/cèl·lula) ± SEM (P valor)

	ICOVIR15	ICOVIR15 miR-99b	ICOVIR15 miR-485
PANC-1	**0,041** ± 0,010	**0,024** ± 0,004 (0,1775)	**0,018** ± 0,003 (0,0173)
MIA PaCa-2	**0,192** ± 0,016	**0,112** ± 0,007 (0,0159)	**0,153** ± 0,007 (0,2222)

Figura 4.44. El miR-99b i el miR-485 augmenten la replicació viral i la citotoxicitat de l'adenovirus ICOVIR15.

A. Quantificació relativa de partícules virals infectives alliberades al medi de cultiu de cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2 a les 48 hores de la infecció amb 1 PI/cèl·lula d'ICOVIR15, ICOVIR15 miR-99b i ICOVIR15 miR-485. La línia puntejada indica els valors relatius de les infeccions amb ICOVIR15.

B. Valors d'IC_{50} en cèl·lules PANC-1 i MIA PaCa-2 als 7 dies de la infecció amb ICOVIR15, ICOVIR15 miR-99b i ICOVIR15 miR-485. Els valors d'IC_{50} varen ser calculats a partir de les corbes de dosi-resposta de cadascun dels virus.

Els resultats es mostren com la mitja ± SEM de com a mínim cinc experiments independents. * $p<0.05$, ** $p<0.01$

4.2.8. Els ICOVI15 miR-99b i miR-485 tenen una capacitat antitumoral superior a la del virus parental ICOVIR15

Després d'observar que el miR-99b i el miR-485 permetien augmentar la citotoxicitat de l'ICOVIR15, vàrem testar la seva activitat antitumoral *in vivo*. Tumors PANC-1 subcutanis ($2 \cdot 10^6$ cèl·lules/tumor) varen ser generats als flancs de ratolins immunodeprimits atímic *nude*. Quan els tumors varen mesurar $120mm^3$, els ratolins varen ser tractats, per via intravenosa, amb una dosi de solució salina, o una dosi de $2 \cdot 10^{10}$ o $4 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí dels virus ICOVIR15, ICOVIR15 miR-99b i ICOVIR15 miR-485. El creixement tumoral va ser monitoritzat durant 35 dies (Figura 4.45A).

Tant el virus parental ICOVIR15 com els dos virus codificants pels miRNAs varen controlar el creixement tumoral de forma significativa, especialment a la dosi de $4 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí. A més a més, l'ICOVIR15 miR-99b i l'ICOVIR15 miR-485 varen millorar l'activitat antitumoral de l'ICOVIR15 (Figura 4.45B i C). Cal destacar que els tractaments amb dosis baixes del virus candidats igualaven l'activitat antitumoral del tractament amb dosi alta d'ICOVIR15 (Figura 4.46). Tanmateix, la dosi de $4 \cdot 10^{10}$ vp/ratolí dels adenovirus ICOVIR15 miR-99b i miR-485 va causar la mort d'alguns animals (2 de 7 i 3 de 7 animals, respectivament).

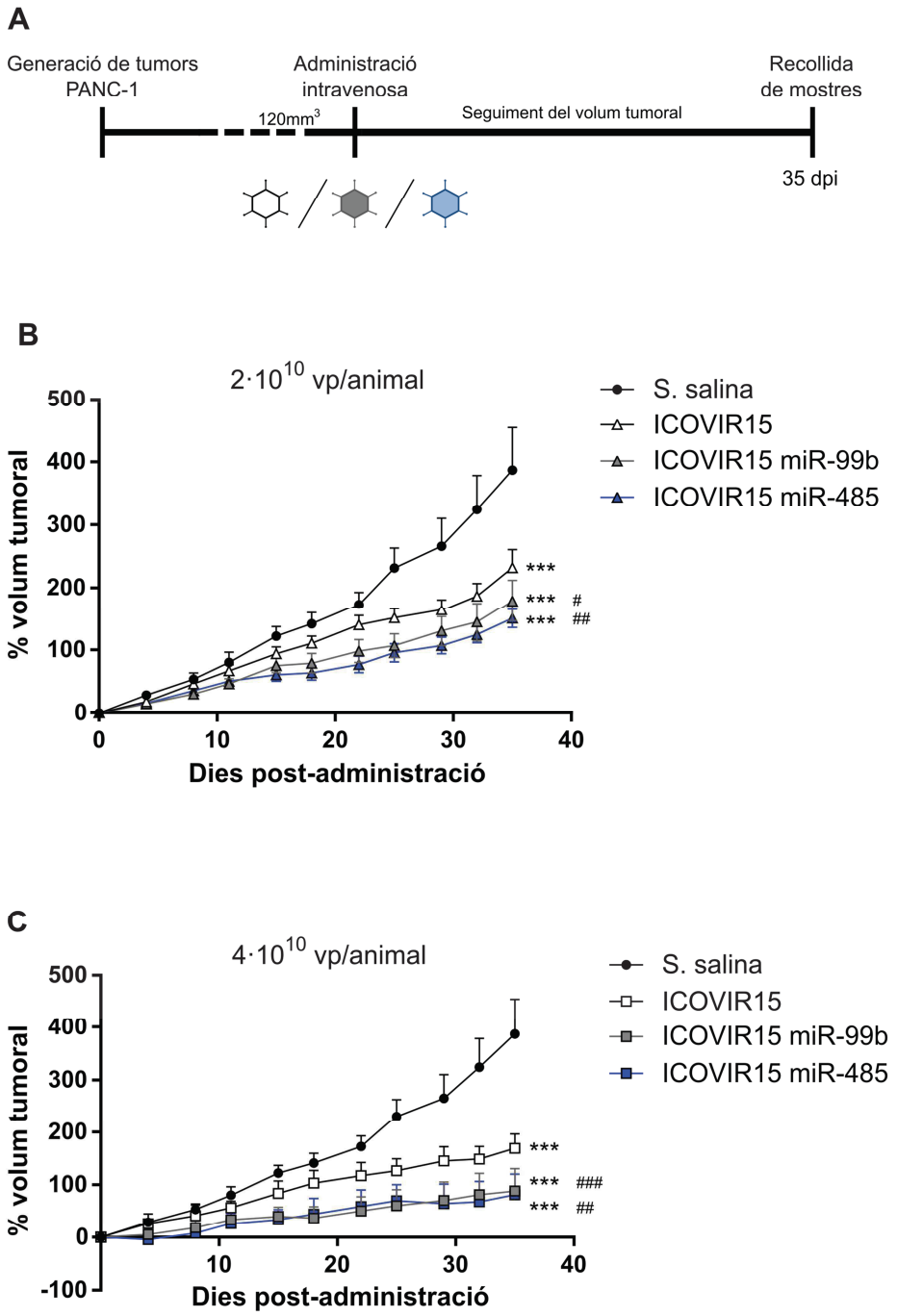


Figura 4.45. Els virus ICOVIR15 miR-99b i miR-485 presenten una capacitat antitumoral superior a la del virus parental ICOVIR15.

A. Esquema representatiu de l'experiment. $2{\cdot}10^6$ PANC-1/tumor varen ser implantades subcutàniament als flancs de ratolins immunodeprimits atímic *nude*. Quan els tumors tenien un volum de $120mm^3$ es va administrar intravenosament als ratolins una dosi de solució salina (n=14) o d'ICOVIR15 (n=12), ICOVIR15 miR-99b (n=10 o 12) o ICOVIR15 miR-485 (n=8 o 12) ($2{\cdot}10^{10}$ o $4{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí). Es va realitzar un seguiment del creixement tumoral durant 35 dies.

B. Corba de creixement tumoral dels animals tractats amb una dosi de solució salina o de $2{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí.

C. Corba de creixement tumoral dels animals tractats amb una dosi de solució salina o de $4{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí.

Els símbols # representen les diferències estadístiques amb les corbes de creixement dels tractaments amb ICOVIR15.

# p<0.05, ## p<0.01, ### p<0.001, *** p<0.001

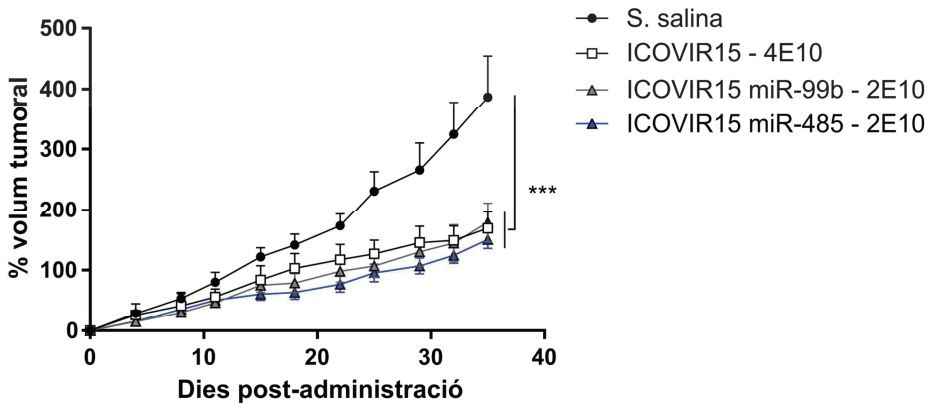


Figura 4.46. Els tractaments amb dosi baixa dels virus ICOVIR15 miR-99b i miR-485 presenta una capacitat antitumoral equiparable a la dosi alta d'ICOVIR15.

Corba de creixement tumoral dels animals tractats amb una dosi solució salina (n=14), una dosi de $2{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí d'ICOVIR15 miR-99b (n=12) i ICOVIR15 miR-485 (n=12) i una dosi de $4{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí d'ICOVIR15 (n=12).

*** p<0.001

Per tal de determinar si hi seguia havent presència de virus actius als tumors, es va analitzar l'expressió del gen *E1A* als tumors tractats amb la dosi elevada de virus. L'expressió va ser quantificada a nivell d'mRNA, per RT-qPCR, i avaluada per immunofluorescència. L'expressió d'*E1A* a nivell d'mRNA era major en tumors tractats amb ICOVIR15 miR-485 que en tumors tractats amb ICOVIR15 (Figura 4.47A). Per immunofluorescència es va poder observar una major quantitat de cèl·lules positives per E1A en els tumors tractats amb ICOVIR15 miR-99b i, sobretot, en els tractats amb ICOVIR15 miR-485. Així doncs, els resultats evidenciaren que existien focus actius de replicació viral i que la millora en l'efecte antitumoral dels virus candidats vindria donada per un augment de l'activitat viral (Figura 4.47B).

Així doncs, també en un context *in vivo*, els miRNAs candidats conferien una major activitat oncolítica a l'adenovirus ICOVIR15.

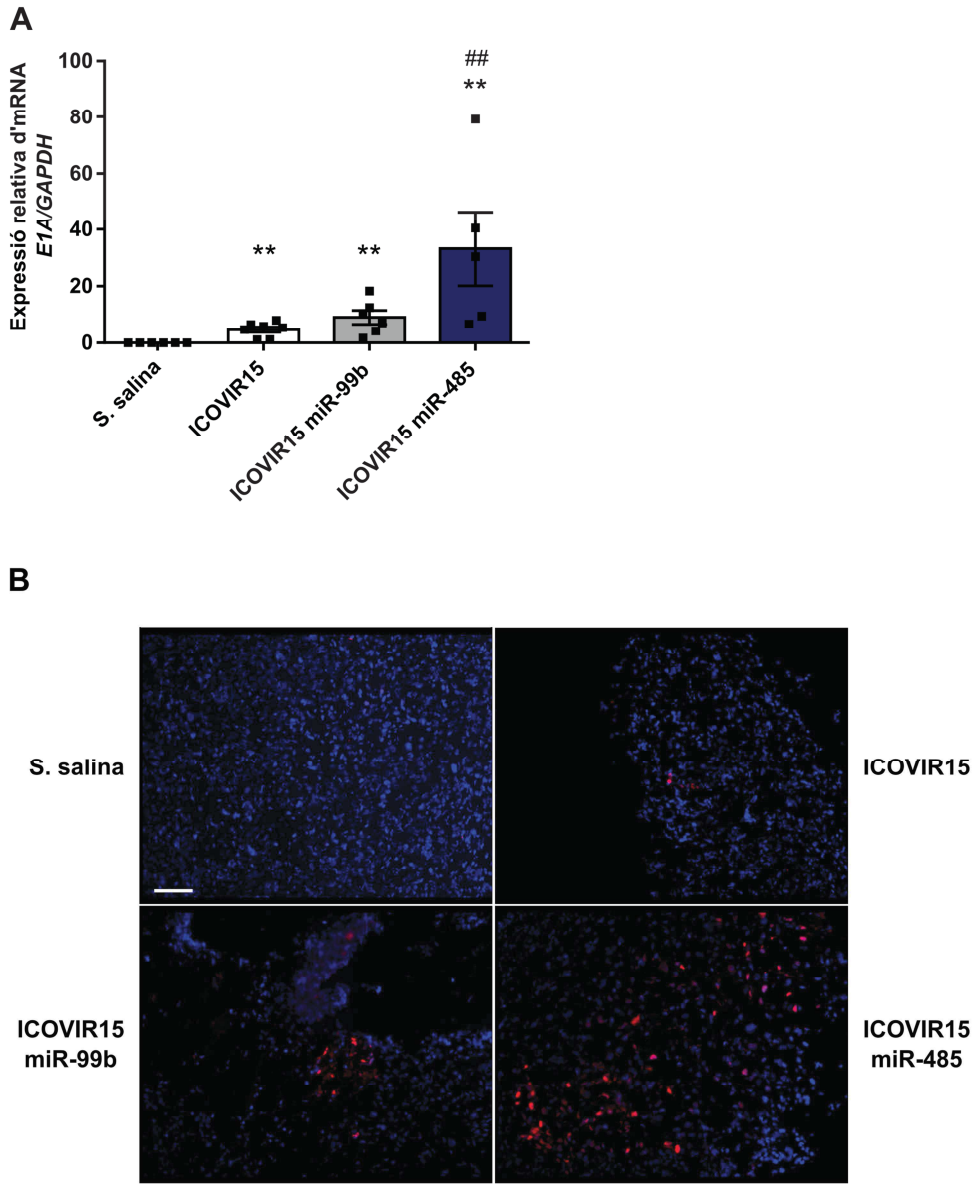


Figura 4.47. Els virus ICOVIR15 miR-99b i miR-485 presenten una capacitat antitumoral superior a la del virus parental ICOVIR15.

A. Quantificació, per RT-qPCR, dels nivells d'expressió d'mRNA d'*E1A* als tumors dels animals tractats amb una dosi de solució salina (n= 6) o $4{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí d'ICOVIR15 (n=7), ICOVIR15 miR-99b (n=6) o ICOVIR15 miR-485 (n=5) al moment del sacrifici. L'expressió de *GAPDH* va ser utilitzada per normalitzar l'expressió.

B. Imatges representatives de les immunofluorescències de seccions criopreservades dels tumors dels animals tractats amb una dosi de solució salina o $4{\cdot}10^{10}$ vp/ratolí d'ICOVIR15, ICOVIR15 miR-99b o ICOVIR15 miR-485. En blau es marquen els nuclis cel·lulars i en vermell es marca E1A. Barra d'escala = 100µm.

Els símbols # representen les diferències estadístiques amb els valors d'ICOVIR15. ## $p<0.01$, ** $p<0.01$

5. DISCUSSIÓ

L'adenocarcinoma ductal pancreàtic (PDAC) és una neoplàsia associada a un pronòstic molt desfavorable, els pacients presenten una taxa mitjana de supervivència a 5 anys del 7%, essent del 26% en el millor dels casos[7]. Malgrat els esforços que s'han portat a terme per ampliar el coneixement sobre la biologia d'aquests tumors i per desenvolupar nous tractaments, no ha estat possible millorar de forma substancial la supervivència dels pacients de PDAC al llarg dels últims 30 anys[4]. Per tant, cal treballar des de diferents focus. Primerament, és essencial desenvolupar eines de diagnòstic més eficients per facilitar una detecció precoç del tumor, ja que sovint, els pacients comencen a presentar símptomes clínics quan la patologia es troba en estadis massa avançats per portar a terme una resecció quirúrgica[8]. En paral·lel, és imperatiu desenvolupar tractaments més efectius que permetin allargar l'esperança de vida i el benestar dels pacients. El PDAC presenta elevada capacitat metastàtica des de fases inicials del tumor[162] i per tant, és necessari que els tractaments que es desenvolupin per combatre'l tinguin un efecte a nivell sistèmic. En aquest sentit estan guanyant importància les teràpies antitumorals basades en virus replicatius, especialment si a part d'induir la destrucció de les cèl·lules tumorals a través del cicle lític, els virus són capaços d'activar una resposta immune sistèmica que permeti combatre també els focus neoplàsics primaris i metastàtics no infectats[84].

Els adenovirus han estat testats com a agents oncolítics en nombrosos assajos clínics i tot i que han mostrat capacitat antitumoral, no aconsegueixen l'eliminació completa dels tumors[121]. Per tant, cal desenvolupar sistemes per augmentar la seva potència i la seva activitat antitumoral. D'altra banda, per poder administrar els adenovirus per via sistèmica, cal evitar que actuïn en cèl·lules no tumorals. Potència i selectivitat presenten una relació contraposada: un augment de potència podria anar acompanyat d'un major risc d'afectació dels teixits sans, mentre que un virus de replicació molt atenuada no aconseguiria l'efecte antitumoral desitjat. És evident que la correcta combinació d'ambdues característiques és essencial per obtenir agents oncolítics eficients i segurs.

Durant el desenvolupament d'aquesta tesi s'han portat a terme dues línies d'investigació centrades en donar selectivitat i potència als adenovirus. Una de les línies s'ha basat en la combinació de modificacions genètiques pel control del cicle adenoviral, a nivell transduccional, transcripcional i post-transcripcional, per tal d'obtenir un adenovirus oncoselectiu. La segona línia, enfocada a obtenir un adenovirus de potència oncolítica augmentada, ha permès la identificació de miRNAs potenciadors de l'activitat antitumoral adenoviral a través de la bioselecció d'una biblioteca d'adenovirus codificants per miRNAs.

5.1. La combinació d'elements de direccionament a tumor permet generar adenovirus amb una capacitat oncoselectiva millorada

Els adenovirus, a diferència d'altres virus, no presenten un tropisme natural per les cèl·lules tumorals. Per tant, l'administració sistèmica d'adenovirus oncolítics només és possible si es modifiquen genèticament per impedir el seu cicle lític en cèl·lules no tumorals. Al llarg dels anys s'han generat adenovirus oncolítics selectius a través d'estratègies diverses basades en la modificació del tropisme adenoviral (control transduccional), en el control de l'expressió dels gens virals – tant a nivell transcripcional, post-transcripcional com traduccional –, i en la supressió de funcions de gens virals que poden ser complementades únicament en cèl·lules tumorals. El conjunt d'estratègies és variat i cadascuna d'elles té limitacions i avantatges, però, tal com s'ha observat en aquest treball, la seva combinació és possible i permet obtenir adenovirus oncolítics amb perfils de toxicitat millorats.

Quan els adenovirus són administrats per via sanguínia, interaccionen amb múltiples factors, entre els quals s'inclouen els factors de coagulació IX i X i els anticossos neutralitzants preexistents. Aquestes interaccions, a part de reduir l'arribada del virus al tumor, són responsables d'una elevada transducció hepàtica i del desenvolupament d'una resposta immunitària[100,115,163,164]. A més a més, la transducció dels adenovirus de serotip 5 a cèl·lules tumorals pot veure's reduïda en cèl·lules tumorals degut a que l'expressió del seu receptor canònic, el receptor CAR, acostuma a trobar-se reduïda en neoplàsies[142,165,166].

Amb l'objectiu d'actuar sobre aquestes limitacions, la primera estratègia de direccionament a tumor que va ser estudiada en aquesta tesi va ser de caràcter transduccional i consistia en la introducció de la mutació YTRGE al domini *knob* de la fibra adenoviral i la inserció d'un pèptid de fusió TAT-like (TAT*) d'activació sensible a metal·loproteases a l'extrem C-terminal de la fibra. La modificació va ser anomenada TATMMP. Està descrit que la mutació YTRGE permet fer una ablació del domini d'unió a CAR, així com també impedir la unió del factor IX[100]. Per altra banda, s'ha vist que el pèptid de fusió TAT permet augmentar l'eficiència de transducció i augmentar els

efectes terapèutics d'adenovirus que l'incorporen. No obstant això, el pèptid TAT no confereix selectivitat per sí sol i els virus necessitaven altres elements de control de la replicació, com ara promotors específics de tumor, per evitar l'afectació de teixits sans[167]. L'estratègia de selectivitat que es va proposar en el nostre cas va ser modificar el pèptid TAT* de manera que actués únicament quan el virus es trobés en un ambient ric en metal·loproteases, com és el cas de l'ambient tumoral de PDAC[34]. Es va afegir una cua polianiònica al pèptid TAT*, unida a través d'un connector sensible per metal·loproteases de matriu, la qual actuava bloquejant-ne l'acció per unió electrostàtica. Aquesta estratègia de selectivitat havia estat prèviament testada en retrovirus, virus Sendai i virus del xarampió. Aquests virus, però, mantenien el mecanisme d'entrada propi a través de les proteïnes de l'envolta un cop realitzada l'activació[168–172]. És important destacar que, tot i que el pèptid TAT i altres pèptids utilitzats per alterar el tropisme adenoviral havien estat incorporats al HI-loop de la fibra adenoviral[101,173], en aquest cas era necessari incorporar la modificació a l'extrem C-terminal per tal de fer factible l'eliminació del pèptid de bloqueig.

Prèviament a l'inici d'aquesta tesi, en el nostre grup, José, A. havia validat que la fibra TATMMP permetia que l'adenovirus restaurés la infectivitat perduda amb la mutació YTRGE i millorés la transducció del virus de fibra salvatge en aquelles línies cel·lulars resistents a la infecció adenoviral, les quals, probablement, presentin una baixa expressió del receptor CAR. La transducció de l'AdTATMMP era depenent dels nivells d'expressió de les metal·loproteases MMP-2 i MMP-9, per les quals estava dissenyada la seqüència del connector. Administrat per via intraductal en un model tumoral mixt de cèl·lules tumorals PANC-1 i CAFs, els quals es caracteritzen per tenir una elevada expressió de metal·loproteases, el virus AdTATMMP va mostrar un fort augment de la transducció tumoral al mateix temps que una reducció de la transducció de la part sana del pàncrees[141]. Havent observat aquest direccionament a tumor, en el marc d'aquesta tesi, es va procedir a la generació d'un adenovirus replicatiu que incorporés la modificació genètica TATMMP, l'Ad^{RC}MMP, i a estudiar-ne la seva activitat oncolítica tant en un context *in vitro* com en un context *in vivo*.

D'acord amb els resultats de transducció obtinguts amb els adenovirus reporters, el grau de millora de la citotoxicitat del virus de fibra TATMMP anava en relació amb la resistència que presentaven les línies cel·lulars a ser infectades amb el virus de fibra salvatge i amb els seus nivells d'expressió de metal·loproteases. Es va poder determinar que les diferències de transducció repercutien en la producció de virus, especialment quan es permetia que els virus completessin més d'un cicle de replicació. Les diferències de replicació en cèl·lules permissives i no permissives eren

molt marcades, fet que podria tenir un impacte important en un context *in vivo* i en el tractament de pacients de PDAC. La citotoxicitat de l'Ad^{RC}MMP també va ser major que la de l'Adwt en CAFs, probablement gràcies a l'elevada expressió d'*MMP-2* i *MMP-9* que presentaven aquestes cèl·lules. El PDAC es caracteritza per una extensa desmoplasia amb un contingut elevat de CAFs, responsables de la secreció dels components de l'estroma[174]. Alguns estudis proposen que l'eliminació dels CAFs podria ser beneficiosa ja que s'ha observat que afavoreixen la progressió dels tumors de pàncrees i que la disrupció de l'estroma cel·lular facilita la difusió dels tractaments, ja siguin quimioteràpics o adenovirals[175,176]. En canvi, altres estudis recolzen que l'eliminació dels CAFs és desfavorable perquè aquestes cèl·lules actuarien impedint la immunosupressió, la vascularització i l'avenç del tumor[177–179].

L'administració de l'adenovirus Ad^{RC}MMP per via intraductal va donar lloc a una activitat antitumoral superior a la de l'adenovirus salvatge en tumors mixtes de cèl·lules PANC-1 i CAFs. A més a més, l'administració intraductal de l'Ad^{RC}MMP també es va poder associar a una baixa toxicitat pancreàtica.

L'elevada capacitat metastàtica del PDAC fa que sigui considerada una malaltia sistèmica. Estudis amb animals transgènics indiquen que les cèl·lules tumorals del PDAC tenen la capacitat de metastatitzar a fetge en estadis molt primerencs de la malaltia, en els quals no és ni possible la detecció del tumor a pàncrees[162]. Tot i que s'han realitzat assajos clínics en que els adenovirus han estat administrats de forma local al tumor, per tal de poder actuar sobre les metàstasis és necessari que el virus sigui administrat sistèmicament i, a ser possible, que desencadeni una resposta immune contra les cèl·lules neoplàsiques. Així doncs, vàrem estudiar el comportament dels virus modificats a la fibra després d'una administració sistèmica. L'anàlisi de biodistribució va posar de manifest que no hi havia una entrada superior del virus de fibra TATMMP en òrgans que expressen metal·loproteases, com podrien ser el múscul esquelètic o els ronyons, de manera que, en una administració sistèmica, la possibilitat d'afectar teixits sans no seria superior a la d'un adenovirus de fibra salvatge. Es va observar també que hi havia una reducció de la transducció hepàtica gràcies a la mutació YTRGE, la qual genera una ablació del domini d'unió a CAR i impedeix la unió del factor de coagulació IX a la fibra[100]. Ara bé, aquesta disminució de la transducció hepàtica no va ser suficient per obtenir un perfil de toxicitat hepàtica millorat respecte al d'un virus de fibra salvatge. En models murins s'ha observat que, tan bon punt l'adenovirus entra en circulació sanguínia, el factor de coagulació X (FX) interacciona amb les regions hipervariables (HVR) de la proteïna hexó i facilita la transducció dels hepatòcits[115,180]. Aquesta transducció derivarà en toxicitat hepàtica a causa,

principalment, de l'expressió de la proteïna adenoviral E1A, que és molt immunogènica[181]. Per altra banda, la interacció del FX amb els adenovirus produeix una activació de la resposta immunitària innata a través de NF-κB que podria contribuir a augmentar l'hepatotoxicitat en ratolins[182]. Malauradament, fins al moment aquests estudis han estat portats a terme en ratolins i el coneixement del que passa en humans és més reduït. De totes maneres, impedir la unió del FX per reduir la toxicitat hepàtica podria ser interessant i prudent en el cas de voler administrar l'Ad^{RC}MMP de forma sistèmica. A nivell preclínic s'han portat a terme varies estratègies per tal d'obtenir virus que no interaccionessin amb el FX, per exemple substituint la proteïna hexó del serotip 5 per la del serotip 3[183], la qual no és reconeguda pel FX; o bé introduint una mutació a la HVR-7 que genera una ablació de la unió del FX[180].

En ratolins, l'embolcallament del virus amb FX evita que les proteïnes del complement i les IgM naturals s'uneixin al virus i en facilitin l'eliminació de la circulació sanguínia a través de les cèl·lules de Kupffer, eliminació que comporta una menor arribada de virus al tumor i desencadena toxicitats[163]. En humans, en canvi, tot i que el FX també protegiria el virus d'agents neutralitzants, l'activació de la cascada clàssica del complement segueix produint-se en presència del factor de coagulació[164]. A més a més, és important destacar que el FX no protegeix de l'acció neutralitzant dels anticossos IgG anti-adenovirus preexistents al sèrum de gran part de la població (més d'un 50% als Estats Units)[184].

Una bona estratègia per protegir els adenovirus de les interaccions no desitjables mentre es troben en circulació sanguínia consisteix en embolcallar-los. En aquest sentit s'han portat a terme estudis amb adenovirus embolcallats utilitzant polímers[116], que protegeixen el virus únicament en la primera administració; així com també un estudi en el que, gràcies a la modificació genètica de l'hexó adenoviral, el virus queda recobert d'albúmina cada vegada que entra en circulació sanguínia[114].

Una altra opció per evitar que el virus creï toxicitat, ja no només a nivell de fetge, sinó a altres òrgans, i que pot utilitzar-se de forma complementària a l'embolcallament, és la modificació del virus a nivell genètic introduint elements que permetin impedir la replicació viral en cèl·lules no tumorals. Aquesta opció és amb la que es va seguir el projecte, utilitzant elements de direccionament a tumor que havien estat prèviament testats al laboratori.

Per tal de generar un virus de replicació selectiva a cèl·lules tumorals i que per tant pogués ser administrat intravenosament de forma segura, es varen afegir dos elements de direccionament a tumor al gen *E1A* del virus Ad^{RC}MMP: un promotor quimèric basat en el promotor del gen *uPAR* i uns elements de resposta a Notch intracel·lular[107], i unes dianes d'unió pel miR-148a al 3'UTR del gen[110].

El promotor quimèric consistia en una versió reduïda del promotor del gen *uPAR*, que es troba més actiu en condicions tumorals i s'havia demostrat amb anterioritat que aporta oncoselectivitat[181]. A l'extrem 5' del promotor s'hi varen afegir tres seqüències SPS per aconseguir la unió del factor de transcripció CSL. Aquest factor és un efector en l'activació de la via de Notch, implicada en el desenvolupament de tumors. La seqüència aïllant SINEB2 es va afegir abans del promotor quimèric per tal d'evitar l'efecte de les seqüències *enhancer* virals, que es troben entre la L-ITR i el gen *E1A* i la fidelitat de la resposta del promotor. Aquest conjunt de modificacions havien estat validades prèviament per Mato, A. i col·laboradors, en l'adenovirus oncolític AdNuPARmE1A. L'AdNuPARmE1A presentava una activitat antitumoral notable facilitada per l'activació del promotor quimèric en cèl·lules neoplàsiques i en cèl·lules mare tumorals, en les que existeix una major activació del sistema uPA/uPAR i de la via de Notch. Gràcies a que l'activació d'aquestes vies és baixa en cèl·lules no tumorals, els elements de control del gen *E1A* de l'AdNuPARmE1A li conferien un perfil de seguretat millorat respecte al d'un Adwt[107].

La inserció de 8 dianes d'unió pel miR-148a al 3'UTR del gen *E1A* havia estat testada prèviament per Bofill-De Ros, X. i col·laboradors. El miR-148a és un miRNA que presenta una expressió elevada en fetge i pàncrees sa, la qual es perd en PDAC. La incorporació de les dianes d'unió per aquest miRNA permetia reduir l'expressió d'E1A en cèl·lules hepàtiques i pancreàtiques sanes sense limitar-ne l'expressió en cèl·lules tumorals, de manera que el virus retenia la potència antitumoral en PDAC[110]. Tanmateix, tot i les millores obtingudes, tant l'AdNuPARmE1A com el virus que contenia les dianes d'unió pel miR-148a seguien presentant certa toxicitat hepàtica. Així doncs, es va decidir combinar ambdós sistemes de regulació en un virus que contenia també la modificació TATMMP a la fibra, donant lloc a l'adenovirus quimèric PANCAd.

L'administració sistèmica del PANCAd a ratolins immunocompetents va mostrar que el virus tenia un molt bon perfil de seguretat; els animals no presentaven afectacions ni a nivell de pèrdua de pes ni a nivell de transaminases en sèrum. Això es va poder associar a una molt baixa expressió del gen *E1A* i a un nombre reduït de

genomes virals presents a fetge, probablement com a resultat de la poca expressió d'*E1A*. Cal destacar que el model de ratolí, tot i no ser permissiu a la replicació de l'adenovirus serotip 5, sí que permet l'expressió d'E1A, causa principal de la toxicitat hepàtica, i una la replicació parcial dels genomes virals. En conseqüència, aquests dos paràmetres són un reflex del control del virus per part dels sistemes de regulació en aquest model.

Per altra banda, l'administració sistèmica del PANCAd a ratolins amb tumors pancreàtics va demostrar que el virus podia transduir i replicar en els tumors. La relació entre el número de genomes virals presents al tumor respecte al fetge era positiva al cap de 12 dies de l'administració, indicant que el virus es trobava actiu als tumors. Aquests resultats eren rellevants tenint en compte que els model de tumor utilitzat per l'estudi, el CP15, és derivat de pacient. A part de mantenir moltes de les característiques histològiques i d'expressió gènica dels tumors primaris, aquests models presenten una heterogeneïtat i estructura més fidels als tumors reals que els tumors derivats de línies cel·lulars.

La capacitat de transducció i replicació del virus PANCAd en tumors CP15 va traduir-se en una activitat antitumoral significativa que permetia no només reduir la mida dels tumors, sinó també augmentar la supervivència dels ratolins. A diferència del que havien observat Mato, A. i col amb l'AdNuPARmE1A, el PANCAd no sinergitzava amb el tractament quimioteràpic de gemcitabina i nab-paclitaxel, ni en el control del creixement tumoral ni en l'augment de supervivència. L'efecte sinèrgic en la teràpia combinada és produït per un segrest d'NF-κB per part del promotor uPAR present al genoma de l'adenovirus, el qual conté dianes d'unió per aquest factor. L'expressió d'NF-κB s'activa com a mecanisme de supervivència cel·lular en els tractaments amb quimioteràpia i afavoreix l'aparició de resistències. Per tant, el seu segrest sobre el genoma de l'adenovirus evita que realitzi les seves funcions d'activació de gens antiapoptòtics i propicia la mort cel·lular per apoptosi desencadenada per la quimioteràpia[107]. La unió d'NF-κB també causa una activació del promotor uPAR i de l'expressió d'*E1A*. Aquesta activació de l'expressió d'*E1A* es va poder observar als tumors tractats amb el règim combinat de PANCAd i quimioteràpia. Tanmateix, l'augment de l'expressió d'*E1A* no va repercutir en la replicació dels genomes virals i per tant, és possible que l'efecte del segrest d'NF-κB no fos prou marcat com per desencadenar un sinergisme. Al comparar el PANCAd amb un PANCAd de fibra salvatge (PANCAd Fwt) en línies resistents a la gemcitabina es va poder determinar que la falta de sinèrgia es podria explicar per l'alteració d'un procés relacionat amb la

modificació TATMMP i, per tant, relacionat amb els mecanismes d'entrada dels virus a la cèl·lula. La transducció cel·lular del PANCAd Fwt és depenent del receptor CAR. S'ha descrit, que els nivells d'aquest receptor en membrana augmenten en tumors resistents a gemcitabina[185] i Paclitaxel[186], de manera que existeix la possibilitat que els virus de fibra salvatge veiessin afavorida la seva entrada a cèl·lules resistents a gemcitabina. En canvi, la transducció del PANCAd de fibra TATMMP, és independent de CAR però depenent dels nivells d'expressió d'*MMP-2*, dels qual s'ha observat una reducció en cèl·lules i tumors CP15 després del tractament amb gemcitabina. Cal tenir en compte que el PANCAd, però no el PANCAd Fwt, utilitza la via d'endocitosi mitjançada per caveoles per entrar a la cèl·lula i per tant, no es pot descartar que la gemcitabina pogués tenir efectes inhibidors sobre aquesta via.

D'aquests experiments va sorgir la necessitat de comparar la capacitat antitumoral i el perfil de seguretat dels dos virus quimèrics, juntament amb l'AdNuPARmE1A, per tal de determinar si la modificació TATMMP conferia un avantatge clar. Els tres virus varen mostrar una activitat antitumoral significativa i molt similar entre ells. Tal com havien observat Bofill-De Ros i col.[110], l'addició de les dianes d'unió pel miR-148a al 3'UTR del gen *E1A* no afectava la potència antitumoral del virus parental. En aquest model tumoral, la modificació TATMMP no atorgava al virus una capacitat antitumoral superior, a diferència del que s'havia observat al comprar l'Ad^{RC}MMP i l'Adwt en el model tumoral PANC-1/CAF. És possible que els virus PANCAd i PANCAd Fwt presentin millor o pitjor capacitat de transducció segons l'expressió de CAR i de metal·loproteases del model amb el que es treballi. A nivell de perfil de seguretat, el PANCAd i el PANCAd Fwt mostraven una nul·la o mínima pèrdua de pes i afectació de les transaminases, suggerint que el doble control d'*E1A* era suficient per regular el virus.

Per altra banda, és important tenir en compte que si un adenovirus oncolític vol ser estudiat a fases clíniques cal que el producte sigui caracteritzat de forma exhaustiva i que compleixi uns mínims de seguretat a nivell pre-clínic marcats per les agències de regulació del medicament (EMEA i FDA, principalment). Probablement el disseny d'estudis de biodistribució, farmacologia i toxicitat per testar un virus de càpsida modificada, la qual no ha estat testada prèviament sota els estàndards de les agències de regulació, seria més complicat i més exigent. Així doncs, ja que la fibra TATMMP no aporta un avantatge molt clar, seria preferible continuar el desenvolupament d'adenovirus oncolítics amb les modificacions del PANCAd Fwt, i abandonar la inclusió del TATMMP. Actualment estem estudiant la possible sinèrgia del PANCAd Fwt en combinació amb quimioteràpia.

5.2. La bioselecció d'una biblioteca d'adenovirus permet identificar el miR-99b i el miR-485 com a miRNAs potenciadors de la capacitat oncolítica adenoviral

Paral·lelament al desenvolupament d'adenovirus oncolítics més segurs, és important aconseguir virus amb una millor activitat lítica en cèl·lules tumorals. Varis adenovirus han estat testats en assajos clínics per càncer de pàncrees però no han mostrat una eficàcia terapèutica destacada[102,175,187]. L'arribada limitada als focus neoplàsics, un estroma dens que impedeix la difusió dins del tumor i la desregulació de factors que confereixen resistència a la infecció són algunes de les causes que poden dificultar l'eliminació del tumor per part dels virus i que cal contrarestar per obtenir teràpies més efectives[102,175,187,188].

Els miRNAs permeten regular múltiples gens, de manera que canvis en els seus perfils d'expressió poden tenir repercussions importants en els processos cel·lulars. Durant una infecció adenoviral la cèl·lula pateix múltiples alteracions, les quals inclouen canvis en el perfil d'expressió de miRNAs. Aquests canvis són deguts als processos desencadenats per la cèl·lula per tal d'intentar eliminar la infecció viral, però també són conseqüència de l'expressió de proteïnes virals que actuen per aconseguir un ambient favorable per la replicació viral[66]. En els processos neoplàsics també es produeix una desregulació de l'expressió dels miRNAs[189]. És possible que si aquesta desregulació no es dóna en una direcció favorable al virus, a les cèl·lules tumorals hi hagi una expressió augmentada de factors que frenin la replicació adenoviral i que per tant, redueixin la formació de nova progènie viral. Revertir l'expressió de factors limitants desregulats a les cèl·lules tumorals a través de la restauració de miRNAs podria ser beneficiós per augmentar l'activitat antitumoral dels adenovirus.

En aquesta tesi s'ha pretès identificar miRNAs que permetessin fer aquesta reversió i augmentar el *fitness* viral en cèl·lules de càncer de pàncrees. L'estratègia utilitzada va consistir en portar a terme una bioselecció basada en la replicació d'una biblioteca d'adenovirus codificants per miRNAs. Aquesta estratègia presenta uns avantatges front a la recentment publicada per Hodzic, J. i col·laboradors, que testaven una biblioteca de mímics de miRNAs en combinació amb la infecció adenoviral[74]. El sistema desenvolupat en aquesta tesi permet l'expressió del miRNA al moment en que es produeix la infecció adenoviral, fet que evita que la cèl·lula activi

mecanismes compensatoris; i es genera com un únic producte final, de manera que és més atractiu per a una possible administració clínica.

La bioselecció de la biblioteca d'adenovirus codificants per miRNAs en línies cel·lulars de PDAC va permetre identificar el miR-99b i el miR-485 com a miRNAs potenciadors de l'activitat adenoviral. L'expressió del miR-99b i, especialment, la del miR-485 mostra una correlació amb la supervivència dels pacients de PDAC: aquells pacients amb menor expressió presenten una menor supervivència. Aquests resultats van en concordança amb la reducció de l'expressió de les cadenes 3p d'ambdós miRNAs en condicions tumorals, pels quals altres autors n'han descrit una implicació en neoplàsies. En un context de càncer de pàncrees s'ha determinat que el miR-99b té una expressió menor en IPMNs d'alt risc[190], així com també que la disminució de la seva expressió, causada pels tractaments amb radiació ionitzant, fa augmentar l'expressió d'mTOR i afavoreix l'aparició de resistències[191]. Els nivells baixos de miR-99b s'han pogut relacionar amb estadis avançats de glioma[192] i amb l'aparició de metàstasis limfàtiques en càncer cervical[193]. Pel miR-485 s'ha descrit que la disminució de la seva expressió correlaciona amb un pitjor pronòstic de càncer gàstric[194], i es coneix que té un paper en la inhibició de la capacitat metastàtica en adenocarcinoma de pulmó, càncer de mama i de bufeta[195–197].

Canvis en l'expressió del miR-99b i del miR-485 també han estat descrits en el context d'una infecció adenoviral. Durant una infecció de fibroblasts de pulmó amb HAdV-C2, l'expressió del miR-99b-5p i especialment l'expressió del miR-485-5p es troben augmentades a les 24 hores post-infecció[66]. En canvi, en línies cel·lulars de càncer de pròstata (PC3) i de glioma (U87MG), l'expressió del miR-485 és gairebé nul·la i no varia durant una infecció amb HAdV-C5, mentre que les cadenes 5p i 3p del miR-99b pateixen una disminució de la seva expressió[74]. Tenint en compte que els canvis d'expressió en fibroblasts i cèl·lules tumorals són diferents, i que tant el miR-99b com el miR-485 presenten una expressió disminuïda en diversos càncers, és possible que revertir la seva expressió pugui tenir un efecte beneficiós pels adenovirus oncolítics. En els nostres estudis no s'ha observat canvis en l'expressió dels miRNAs candidats en cèl·lules PANC-1 després d'una infecció amb l'AdwtE, però sí que s'ha pogut observar que, en aquesta línia cel·lular, l'expressió del miR-485 és baixa. És important destacar que l'augment de l'expressió del miR-485 també es produeix en infeccions amb virus del grip per tal de regular els nivells del sensor de RNA citosòlic RIG-1[67]. Per tant, és possible que el miR-485 tingui una funció pro-viral que no es pugui portar a terme en cèl·lules tumorals a causa de la seva expressió disminuïda.

Tant els resultats d'enriquiment *in vitro* com de competició *in vivo* mostren que el miR-99b i el miR-485 tenen una capacitat de millora de la replicació adenoviral en cèl·lules tumorals.

Es va determinar que l'enriquiment dels virus candidats era degut a un major alliberament de partícules virals infectives al medi de cultiu, un efecte que era específicament depenent dels miRNAs, ja que la seva aportació en trans per transfecció també causava un augment de l'alliberament viral. A dosis elevades de virus, els miRNAs perdien el seu efecte potenciador. Aquesta dosi-dependència podria ser conseqüència de dos factors: a dosis superiors l'alliberament de partícules virals es dóna més aviat en la infecció, de manera que al punt estudiat les diferències ja no són tant marcades (l'AdwtE encara estaria alliberant virions al medi mentre que pels virus candidats ja s'haurien produït reinfeccions); o bé que els mecanismes sobre els quals tenen efecte els miRNAs candidats també són inhibits pel virus salvatge quan es troba a suficient dosi a la cèl·lula, de manera que l'activitat dels miRNAs fos negligible.

S'observà que el virus AdwtE hTR no millorava la capacitat de replicació del virus control AdwtE i, per tant, la inserció d'un transgèn a la regió escollida no tenia un impacte positiu en el *fitness* viral. En alguns casos l'AdwtE hTR presentava una capacitat de replicació lleugerament menor, efecte no degut a l'expressió de l'hTR, ja que la transfecció amb el miRVec hTR no afectava la replicació viral. El conjunt de modificacions introduïdes al genoma del virus el situa just dins del límit per un empaquetament eficient[198] i per tant, és possible que l'augment de mida tingui un impacte negatiu sobre el virus. De cara a millorar els virus candidats seria interessant poder reduir la mida del fragment que conté el miRNA.

D'altra banda, l'expressió d'un miRNA exogen pel qual no s'han descrit canvis d'expressió en infeccions adenovirals[66,74], el miR-759, no repercuteix positivament en la replicació del virus i per tant la millora de la capacitat oncolítica per part dels miRNA candidats no vindria donada, o com a mínim no de forma exclusiva, per un bloqueig de la via de processament dels miRNAs. Aquest conjunt de resultats ens permet afirmar que els efectes observats són específicament dependents dels miRNAs bioseleccionats.

La millora de l'alliberament de partícules virals infectives al medi es traduïa en una reducció de la IC_{50} dels virus candidats. Aquests efectes serien causats per una optimització de la formació de virions infectius a l'interior cel·lular gràcies a una major expressió de la proteïna E1A i de les proteïnes virals tardanes que formen la càpsida. Aquest augment de l'expressió es donava a nivell transcripcional, possiblement gràcies

a una major activació dels promotors virals. Es descarta que hi haguessin més còpies dels gens per actuar de motlle a l'interior cel·lular ja que el número de genomes totals intracel·lulars era equivalent entre els virus candidats en un primer cicle d'infecció.

En cèl·lules infectades, la quantitat de genomes totals presents a l'interior cel·lular és molt superior al número de partícules infectives formades, de manera que els primers no són un element limitant en el cicle viral. La limitació vindria donada per les proteïnes que formen la càpsida viral i/o les que faciliten el procés d'encapsidació. Si la major formació de proteïnes estructurals que s'observa als resultats (hexó, pentó i fibra) es donés també a tot el conjunt de proteïnes implicades en la formació de nous virions, aquest podria ser el mecanisme pel qual en les infeccions amb virus candidats aquest procés es dóna de forma més efectiva. Podem especular que l'efecte dels miRNAs faria augmentar l'expressió de proteïnes virals primerenques, de manera que el virus podria modular millor l'ambient cel·lular i activar en major grau els promotors dels altres gens virals, incloent el MLP. D'altra banda, tenint en compte que la sobreexpressió dels gens tardans és més marcada que la d'*E1A*, és possible que hi hagi altres factors implicats en la inducció del MLP que siguin regulats pels miRNA candidats.

L'anàlisi bioinformàtic portat a terme per identificar possibles gens diana del miR-99b i/o del miR-485 que poguessin exercir un efecte limitant sobre la replicació adenoviral, va donar com a resultat quatre gens candidats: *SRPK1*, relacionat amb processos d'*splicing* alternatiu; *MDM2*, *KLF8* i *ELF4*, relacionats amb l'activació i repressió de promotors. *SRPK1* i *KLF8* contenen llocs d'unió predits per ambdós miRNAs al seu 3'UTR. *MDM2* és un gen diana validat pel miR-485 i no té dianes d'unió predites pel miR-99b. *ELF4* també conté llocs d'unió per ambdós miRNAs, però els resultats indiquen que el miR-485 no n'afectaria l'expressió.

SRPK1 és una quinasa de factors de *splicing* SR[151], anomenats així per tenir un domini ric en serina i arginina. Aquests factors tenen una funció en la regulació dels processos d'*splicing* constitutiu i alternatiu. Quan es troben hipofosforilats, després de portar a terme la reacció d'*splicing*, els factors SR surten del nucli i cal que siguin fosforilats per tornar-hi a entrar. S'ha suggerit que durant la seva sortida del nucli faciliten l'exportació de l'mRNA tallat[199]. L'adenovirus indueix una desfosforilació dels factors SR gràcies al reclutament de la PP2A per part de la proteïna E4-Orf4. D'aquesta manera, el virus aconsegueix fer un canvi en el seu patró d'*splicing* alternatiu, promovent les formes amb acceptors més febles[97,200]. En estudis recents s'ha reportat que *SRPK1* presenta una expressió augmentada en càncer de pròstata,

de mama, de pulmó i glioma[151]. Tenint en compte que l'adenovirus requereix una hipofosforilació dels factors SR durant el transcurs de la seva infecció, és possible que una sobreexpressió d'aquesta quinasa en condicions tumorals dificulti el canvi de patró d'*splicing* i per tant, l'expressió de proteïnes virals. A les infeccions amb els adenovirus codificants pels miRNAs candidats s'ha pogut observar una disminució dels nivells d'mRNA d'*SRPK1*, especialment amb el miR-485, així com també un augment més marcat de les formes d'*splicing* més curtes del gen *E1A*, isoformes amb acceptors d'*splicing* 5' més distants de l'acceptor 3' (isoformes 10S i 9S). Aquests resultats són coherents amb el que està descrit pel processos d'*splicing* d'aquest gen en relació amb els factors SR que el regulen. El factor ASF/SF2, que és fosforilat per SRPK1[150], promou l'ús d'acceptors d'*splicing* 5' més propers a l'acceptor 3', per tant, ASF/SF2 fosforilat afavoreix les isoformes 13S i 12S en detriment de la 9S[201]. Hi ha evidències de que una sobreexpressió d'ASF/SF2 redueix la formació de nova progènia viral, així com també *l'splicing* d'isoformes relacionades amb fases més tardanes de la infecció, incloent la 9S[202]. De fet, el que determina la selecció de l'acceptor d'*splicing* és la proporció entre ASF/SF2 i el factor hnRNPA1. Quan hnRNPA1 es troba fora del nucli a causa d'un estímul i la proporció ASF/SF2/hnRNPA1 és favorable al primer factor, es dóna un augment de la isoforma 13S, un lleuger augment de la 12S i una reducció de la 9S[203]. Així doncs, durant la infecció adenoviral, és possible es doni la situació inversa gràcies a l'acció d'E4-Orf4, que induiria la sortida d'ASF/SF2 del nucli per desfosforilació. Per tant, evitar la refosforilació d'ASF/SF2 reduint els nivells d'*SRPK1* podria ajudar el virus en aquest procés (Figura 5.1).

Les funcions de les proteïnes d'E1A 171R (10S) i 55R (9S) no han estat caracteritzades en profunditat. Es coneix, però, que E1A-55R actua activant la transcripció a partir dels promotors virals, col·laborant amb E1A-243R (12S) per donar lloc a infeccions més productives[93]. Així doncs, part dels efectes observats en els virus candidats podrien venir donats per aquests canvis en el patró d'*splicing*. Ara bé, no podem descartar que part de l'efecte sigui degut a un possible augment de l'expressió d'E4-Orf4, el qual també podria afavorir la formació de les isoformes 10S i 9S.

Els altres tres factors estudiats tindrien un paper més directe en la inducció de la transcripció a partir dels promotors virals. Tant KLF8 com MDM2 presenten una expressió disminuïda en les infeccions amb els adenovirus codificants pels miRNAs candidats, mentre que l'expressió d'ELF4 es redueix només en la infecció amb l'AdwtE miR-99b.

KLF8 és un factor de transcripció de la família Sp/Krüppel-like que funciona com a repressor transcripcional unint-se a caixes CACCC, presents als promotors d'alguns gens cel·lulars, i reclutant el corepressor CtBP2[160]. El gen *KLF8* es troba sobreexpressat en tumors que, com el PDAC, tenen la via de Wnt/β-catenina activa i promou l'estabilització de la β-catenina i la progressió en el cicle cel·lular[159,204]. L'expressió de *KLF8* s'ha relacionat amb un pitjor pronòstic de càncer de pàncrees i se n'ha descrit una expressió elevada en fenotips més metastàtics de càncer colorectal, mama, pulmó i gàstric[205–209]. En el context viral, KLF8 és interessant ja que existeixen caixes CACCC a promotors i enhancers virals[160]. A través de la seva interacció amb CtBP2, KLF8 podria reprimir l'expressió d'alguns gens de l'adenovirus als qual hem pogut identificar caixes CACCC: una al promotor d'*E2A* i *E2B*, una altra a poques bases del promotor intern de *L4* (L4P) i tres al promotor de *IVa2*. S'ha descrit que un *knockdown* de CtBP2 permet millorar el títol de producció viral en una infecció amb adenovirus gràcies a l'augment de l'expressió de la proteïna E1A i de les proteïnes de la càpsida[161,210]. A més a més, la interacció entre E1A i CtBP2 és essencial pel correcte desenvolupament del cicle viral. E1A impedeix la repressió dels promotors als quals s'uneix CtBP2 i una mutació al domini d'unió d'E1A a CtBP2 fa caure la producció de nova progènie[161]. Per tant, si CtBP2 té un efecte inhibidor sobre l'expressió dels gens virals a través de la unió amb KLF8, la disminució d'aquest factor amb els miRNAs candidats seria parcialment responsable dels resultats observats. Amb aquest conjunt de dades, formulem la hipòtesi de que una reducció de KLF8 permetria augmentar l'expressió de IVa2 i de les proteïnes derivades del L4P (L4-22K i L4-33K). A part de formar part de les proteïnes empaquetadores, la proteïna IVa2, juntament amb E1A, E4-Orf3 i p53 activa l'expressió del promotor L4P[211]. L4-22K i L4-33K tenen funcions relacionades amb l'activació del MLP, l'empaquetament de genomes virals i la inducció d'isoformes d'*splicing* més febles dels gens tardans[212–215]. Per tant, la sobreexpressió d'aquests gens podria contribuir a la millor formació de virions infectius (Figura 5.1).

Per altra banda, KLF8 pot actuar com a inductor transcripcional reclutant p300 i PCAF als promotors cel·lulars[216]. E1A redirigeix aquests factors per tal de reprimir l'activació transcripcional de certs gens que actuarien limitant la replicació viral, entre ells els de resposta antiviral[217]. Així doncs, disminuir els nivells de KLF8 podria facilitar el segrest de p300 i PCAF per part d'E1A en situacions tumorals en les que KLF8 es troba sobreexpressat.

La regulació dels miRNAs sobre l'expressió d'MDM2 també podria explicar les millores en el *fitness* viral. És important destacar que l'expressió de CtBP2 és activada

per MDM2[218], proteïna per la qual s'ha observat una disminució de l'expressió per part dels dos virus candidats. *MDM2* és un gen diana validat pel miR-485[157], però no conté dianes d'unio pel miR-99b. En canvi però, s'ha pogut determinar que el miR-99b regula negativament l'expressió d'ELF4, un factor de transcripció pertanyent a la família ETS (*E26 transformation-specific*). A través de la inhibició d'ELF4, el miR-99b podria estar causant la disminució d'MDM2 que s'observa en la infecció amb el virus candidat AdwtE miR-99b (Figura 5.1). S'ha descrit que en cèl·lules amb la via de KRAS activada es produeix un augment de l'expressió d'ELF4 que, al seu torn, indueix l'expressió de *MDM2* i bloqueja la de *p16*, de manera que s'inhibeixen processos de senescència cel·lular i es facilita la tumorigènesi[219]. ELF4 s'ha pogut relacionar amb el potencial maligne de cèl·lules de càncer d'ovari[220], així com també amb el desenvolupament de glioblastomes amb característiques més *stem-cell like*[221].

La funció més destacada d'MDM2 és la d'ubiquitina E3 lligasa, amb la qual pot regular l'activitat de p53 enviant-la a degradació proteasomal[222]. No obstant, MDM2 també pot actuar reprimint l'activitat transcripcional de p53 i promovent la progressió tumoral gràcies a activitats de regulació de la transcripció i remodelació d'histones independents de p53[218]. A conseqüència de l'activitat augmentada de Ras, MDM2 està sobreexpressada en càncer de pàncrees i s'associa a un pitjor pronòstic d'aquesta malaltia[223–225]. Pel que fa al context adenoviral, dos grups han descrit la relació d'aquest factor amb una replicació viral limitada. Van Beusechem, V. i col. varen determinar que l'expressió exògena de p53 permetia augmentar l'eficàcia antitumoral dels adenovirus oncolítics, eficàcia que quedava bloquejada en cèl·lules amb elevada expressió d'MDM2[226]. Més endavant, Yang, H. i col. observaren que un *knockdown* d'*MDM2* o *MDM4* permetia augmentar l'expressió dels gens adenovirals[158]. Segons els autors, la infecció adenoviral causa una reducció dels nivells d'MDM2, la qual no hem pogut observar en les nostres condicions. Es proposen vàries hipòtesis de com MDM2 actuaria reprimint la replicació viral. Una possibilitat és que MDM2 ubiquitinés i enviés a degradació algunes proteïnes adenovirals primerenques (E1A i E1B-55K)[158] i proteïnes necessàries per un cicle viral productiu (PP2A)[227]. Per altra banda, MDM2 podria actuar de repressor transcripcional inhibint l'expressió de gens virals interaccionant amb la subunitat 34K del factor de transcripció basal TFIIE[227,228] (Figura 5.1).

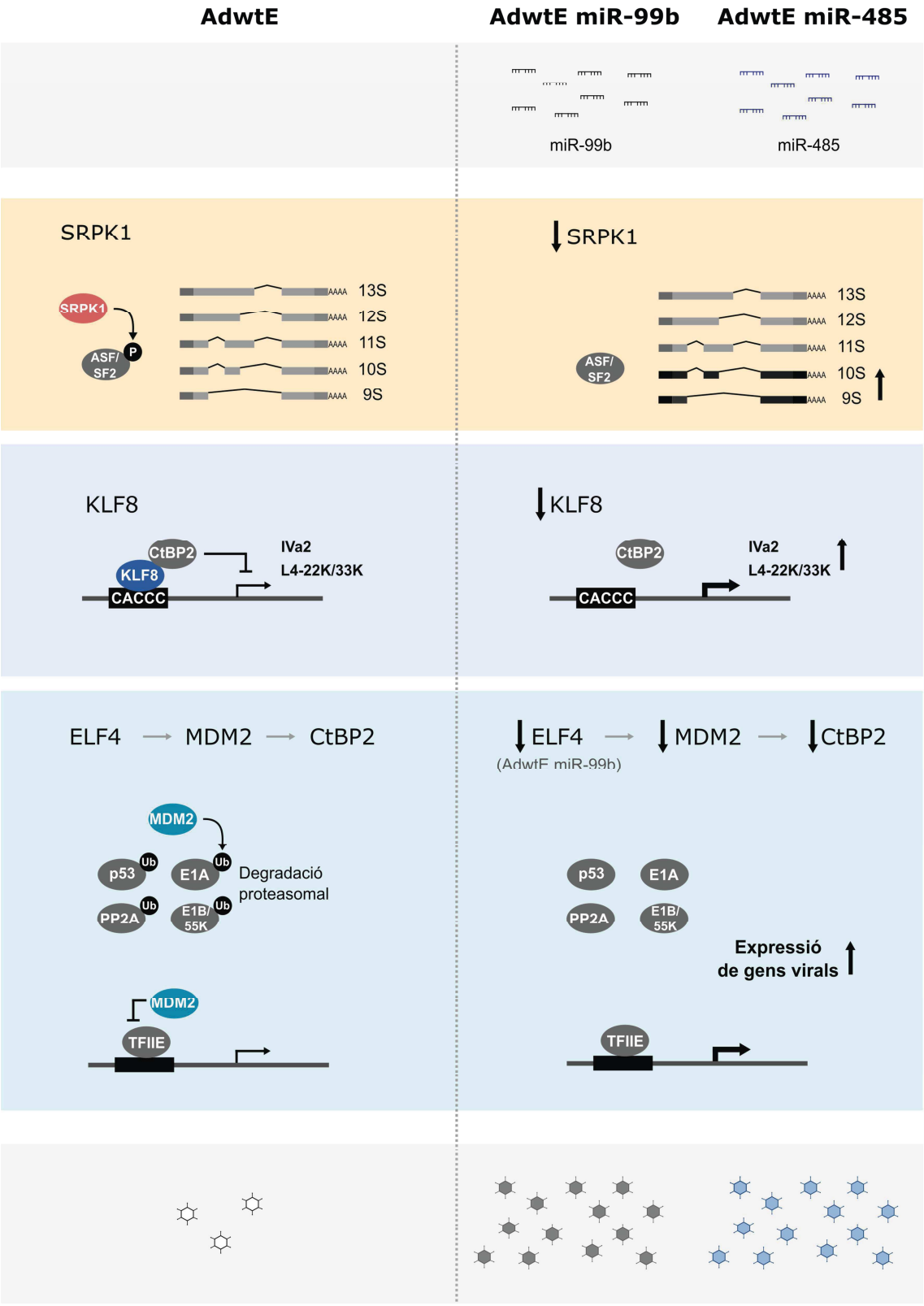


Figura 5.1. Representació esquemàtica dels possibles mecanismes cel·lulars alterats pels miRNAs candidats i que permetrien augmentar el fitness adenoviral.

Els quatre factors estudiats podrien tenir un paper en la selectivitat tumoral observada amb els virus candidats, els quals no presentaven una major activitat que l'AdwtE en cèl·lules no tumorals. L'absència d'ELF4 i la baixa expressió d'MDM2 en HPDE, així com la baixa expressió d'MDM2 i KLF8 als fibroblasts podria explicar les diferències observades en aquests contextos cel·lulars; els miRNAs no podrien generar un ambient més favorable que el ja prèviament existent a les cèl·lules no tumorals. Tanmateix, tenint en compte els canvis d'expressió descrits pels miRNAs candidats en les infeccions de fibroblasts i de cèl·lules tumorals són diferents[66,74] i que els miRNAs es caracteritzen per actuar sobre un gran ventall de dianes cel·lulars, no es poden descartar efectes sobre altres gens que no han estat estudiats en aquesta tesi i que podrien tenir una implicació en la relació hoste-virus.

Per testar la capacitat antitumoral en un context d'adenovirus oncolític, els miRNAs candidats varen ser clonats a l'adenovirus ICOVIR15[108]. Els miRNAs varen mostrar un augment de la citotoxicitat i un clar efecte potenciador de l'activitat antitumoral, el qual permetia frenar el creixement dels tumors més eficientment que el virus parental a diferents dosis virals. A dosis elevades els virus candidats varen causar una toxicitat no observada amb el virus parental ICOVIR15. En les infeccions *in vitro* de cèl·lules no tumorals amb els virus AdwtE miR-99b i miR-485, aquest augment de la toxicitat no fou detectat. És important destacar que l'expressió d'ambdós miRNAs humans, tot i que no s'hagi comprovat, s'hauria de poder donar en teixits murins ja que es troben conservats entre humans i ratolins[229]. Existeixen vàries opcions per explicar la toxicitat observada *in vivo*. És possible que en cèl·lules hepàtiques els miRNAs candidats sí que potenciïn l'expressió de proteïnes virals, o bé que la sobreexpressió d'aquests miRNAs en un context *in vivo* creï una disrupció de l'homeòstasi cel·lular i tissular que tingui efectes perjudicials pels animals. Per tal de reduir aquesta toxicitat caldria impedir l'expressió dels miRNAs candidats a cèl·lules no tumorals controlant-la amb un promotor específic de tumor, a ser possible un promotor potent i de mida reduïda.

En conjunt, els resultats mostren que l'estratègia de bioselecció utilitzada és adequada per la identificació de miRNAs que potencien l'activitat adenoviral gràcies a la disminució del contingut de factors limitants del *fitness* viral.

6. CONCLUSIONS

1. La inserció d'un pèptid TAT* activable per metal·loproteases a la fibra facilita l'entrada de l'adenovirus a la cèl·lula a través d'endocitosi depenent de caveoles, confereix a l'adenovirus una major capacitat oncolítica en cèl·lules amb elevada expressió de MMPs i millora l'activitat antitumoral d'un virus de fibra salvatge quan s'administra per via intraductal; però no per via sistèmica.

2. La inserció d'un pèptid TAT* activable per metal·loproteases a la fibra millora el perfil de toxicitat de l'adenovirus quan s'administra per via intraductal; però no després d'una administració sistèmica.

3. La regulació de l'expressió d'*E1A* a nivell transcripcional i post-transcripcional permet que els adenovirus de fibra modificada (PANCAd) o de fibra salvatge (PANCAd Fwt) presentin un perfil de seguretat molt millorat després d'una administració sistèmica.

4. La modificació de la fibra adenoviral amb un pèptid TAT* activable per metal·loproteases limita l'activitat de l'adenovirus en combinació amb quimioteràpia, no observant-se sinergisme *in vivo*. Aquest efecte estaria d'acord amb la pèrdua de citotoxicitat del virus en cèl·lules resistents a gemcitabina associada a una reducció en l'expressió de MMP-2.

5. El miR-99b i el miR-485, identificats mitjançant la bioselecció d'una biblioteca de miRNAs en adenovirus, confereixen al virus una capacitat oncolítica superior en cèl·lules de PDAC però no en cèl·lules no tumorals.

6. Els virus AdwtE miR-99b i AdwtE miR-485 presenten un major alliberament de partícules virals infectives que l'AdwtE en cèl·lules i tumors de PDAC com a conseqüència d'una millora en la formació de partícules virals infectives a l'interior cel·lular, així com també d'una major expressió dels gens virals.

7. Els virus que codifiquen pel miR-99b i el miR-485 canvien el patró d'*splicing* alternatiu del gen *E1A*, induint la formació d'isoformes relacionades amb fases més tardanes del cicle viral, en part a través de la regulació de l'expressió d'*SRPK1*.

8. Els virus que codifiquen pel miR-99b i el miR-485 indueixen una activació de l'expressió dels gens virals, en part a través de la modulació d'*ELF4*, *MDM2* i

KLF8. Aquests factors mostren una expressió diferencial en cèl·lules de PDAC i en cèl·lules no tumorals HPDE i fibroblasts que podria explicar la dualitat de resposta que hi presenten els virus.

9. El miR-99b i el miR-485 confereixen una major capacitat antitumoral a l'adenovirus oncolític ICOVIR15.

7. BIBLIOGRAFIA

1. What Is Cancer? - National Cancer Institute. Available at: https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer. (Accessed: 15th April 2017)

2. Hanahan, D. *et al.* Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144,** 646–674 (2011).

3. WHO | Cancer. *WHO* (2017).

4. Cancer survival for common cancers | Cancer Research UK. Available at: http://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/survival/common-cancers-compared#heading-Three. (Accessed: 15th April 2017)

5. Ryan, D. P., Hong, T. S. & Bardeesy, N. Pancreatic Adenocarcinoma. 1039–1049 (2014). doi:10.1056/NEJMra1404198

6. What Is Pancreatic Cancer? Available at: https://www.cancer.org/cancer/pancreatic-cancer/about/what-is-pancreatic-cancer.html. (Accessed: 15th April 2017)

7. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* **66,** 7–30 (2016).

8. Kamisawa, T., Wood, L. D., Itoi, T. & Takaori, K. Pancreatic cancer Seminar. *Lancet* **388,** 73–85 (2016).

9. Conroy, T. *et al.* Current standards and new innovative approaches for treatment of pancreatic cancer. *Eur. J. Cancer* **57,** 10–22 (2016).

10. Raimondi, S., Maisonneuve, P. & Lowenfels, A. B. Epidemiology of pancreatic cancer: an overview. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **6,** 699–708 (2009).

11. Carlson, R. H. Pancreatic Cancer. *Oncol. Times* **36,** 27 (2014).

12. Garrido-Laguna, I. & Hidalgo, M. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **12,** 319–334 (2015).

13. Goldstein, D. *et al.* Nab-paclitaxel plus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer: Long-term survival from a phase III trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **107,** 1–10 (2015).

14. Conroy, T. *et al.* FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N Engl J Med* **364,** 1817–1825 (2011).

15. Xu, C., Li, H., Su, C. & Li, Z. Viral therapy for pancreatic cancer: Tackle the bad guys with poison. *Cancer Lett.* **333,** 1–8 (2013).

16. Hezel, A. F., Kimmelman, A. C., Stanger, B. Z., Bardeesy, N. & Depinho, R. A. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* **1,** 355–385 (2006).

17. Yachida, S. & Iacobuzio-Donahue, C. a. Evolution and dynamics of pancreatic cancer progression. *Oncogene* **32,** 5253–60 (2013).

18. Daniluk, J. *et al.* An NF-κB pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. *J. Clin. Invest.* **122,** 1519–28 (2012).

19. Iacobuzio-Donahue, C. A. Genetic evolution of pancreatic cancer: lessons learnt from the pancreatic cancer genome sequencing project. *Gut* **61,** 1085–94 (2012).

20. Yamaguchi, J., Yokoyama, Y., Kokuryo, T., Ebata, T. & Nagino, M. Cells of origin of pancreatic neoplasms. *Surg. Today* 1–9 (2017). doi:10.1007/s00595-017-1501-2

21. Bailey, P. *et al.* Genomic analyses identify molecular subtypes of pancreatic cancer. *Nature* **531,** 47–52 (2016).

22. Witkiewicz, A. K. *et al.* Whole-exome sequencing of pancreatic cancer defines genetic diversity and therapeutic targets. *Nat. Commun.* **6,** 6744 (2015).

23. Jones, S. *et al.* Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses. **321,** 1801–1807 (2008).

24. Collu, G. M., Hidalgo-Sastre, A. & Brennan, K. Wnt–Notch signalling crosstalk in development and disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **71,** 3553–3567 (2014).

25. Rhim, A. D. & Stanger, B. Z. *Molecular biology of pancreatic ductal adenocarcinoma progression: Aberrant activation of developmental pathways*. *Progress in Molecular Biology and Translational Science* **97,** (Elsevier Inc., 2010).

26. Nam, Y., Sliz, P., Pear, W. S., Aster, J. C. & Blacklow, S. C. Cooperative assembly of higher-order Notch complexes functions as a switch to induce transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104,** 2103–2108 (2007).

27. Amsen, D., Antov, A. & Flavell, R. A. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation. *Nat. Rev. Immunol.* **9,** 116–124 (2009).

28. Wong, H. H. & Lemoine, N. R. Pancreatic cancer: molecular pathogenesis and new therapeutic targets. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **6,** 412–22 (2009).

29. Gorojankina, T. Hedgehog signaling pathway: a novel model and molecular mechanisms of signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* **73,** 1317–1332 (2016).

30. Smith, H. W. & Marshall, C. J. Regulation of cell signalling by uPAR. (2010). doi:10.1038/nrm2821

31. Cantero, D. *et al.* Enhanced expression of urokinase plasminogen activator and its receptor in pancreatic carcinoma. *Br. J. Cancer* **75,** 388–95 (1997).

32. He, Y. *et al.* Interaction between Cancer Cells and Stromal Fibroblasts Is Required for Activation of the uPAR-uPA-MMP-2 Cascade in Pancreatic Cancer Metastasis. *Clin. Cancer Res.* **13,** 3115–3124 (2007).

33. Büchler, P. *et al.* Transcriptional regulation of urokinase-type plasminogen activator receptor by hypoxia-inducible factor 1 is crucial for invasion of pancreatic and liver cancer. *Neoplasia* **11,** 196–206 (2009).

34. Gardian, K., Janczewska, S., Durlik, M. & Durlik, M. Microenvironment elements involved in the development of pancreatic cancer tumor. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2012,** 585674 (2012).

35. Hidalgo, M. Pancreatic Cancer. **17,** (2010).

36. Nielsen, M. F. B., Mortensen, M. B. & Detlefsen, S. Key players in pancreatic cancer-stroma interaction: Cancer-associated fibroblasts, endothelial and inflammatory cells. *World J. Gastroenterol.* **22,** 2678 (2016).

37. Ying, H. *et al.* Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes and Development* **30,** (2016).

38. Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **12,** 99–110 (2011).

39. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* **11,** 228–234 (2009).

40. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75,** 843–54 (1993).

41. Kozomara, A. & Griffiths-Jones, S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* **42,** D68–D73 (2014).

42. Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19,** 92–105 (2009).

43. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* **14,** 1902–10 (2004).

44. He, L. & Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* **5,** 522–531 (2004).

45. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10,** 126–139 (2009).

46. Ha, M. & Kim, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15,** 509–524 (2014).

47. Saito, T. & Sætrom, P. MicroRNAs – targeting and target prediction. *N. Biotechnol.* **27,** 243–249 (2010).

48. Grimson, A. *et al.* MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* **27,** 91–105 (2007).

49. Béthune, J., Artus-Revel, C. G. & Filipowicz, W. Kinetic analysis reveals successive steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep.* **13,** 716–23 (2012).

50. MacFarlane, L.-A. & Murphy, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Curr. Genomics* **11,** 537–561 (2010).

51. Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. *Nature* **482,** 347–355 (2012).

52. Vila-Navarro, E. *et al.* MicroRNAs for Detection of Pancreatic Neoplasia: Biomarker Discovery by Next-generation Sequencing and Validation in 2 Independent Cohorts. *Ann. Surg.* 1 (2016). doi:10.1097/SLA.0000000000001809

53. Hata, A. & Lieberman, J. Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer. *Sci. Signal.* **8,** (2015).

54. Park, J. Y. *et al.* MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* **17,** 817–827 (2011).

55. Lee, E. J. *et al.* Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **120,** 1046–1054 (2006).

56. Dillhoff, M., Liu, J., Frankel, W., Croce, C. & Bloomston, M. MicroRNA-21 is overexpressed in pancreatic cancer and a potential predictor of survival. *J. Gastrointest. Surg.* **12,** 2171–6 (2008).

57. Szafranska, a E. *et al.* MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* **26,** 4442–4452 (2007).

58. Humeau, M., Torrisani, J. & Cordelier, P. MiRNA in clinical practice: Pancreatic cancer. *Clin. Biochem.* **46,** 933–936 (2013).

59. Zhao, G. *et al.* miR-148b functions as a tumor suppressor in pancreatic cancer by targeting AMPKα1. *Mol. Cancer Ther.* **12,** 83–93 (2013).

60. Ji, Q. *et al.* MicroRNA miR-34 Inhibits Human Pancreatic Cancer Tumor-Initiating Cells. *PLoS One* **4,** e6816 (2009).

61. Sun, L. *et al.* MicroRNA Signaling Pathway Network in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *J. Genet. Genomics* **42,** 563–577 (2015).

62. Hu, B. *et al.* Cellular responses to HSV-1 infection are linked to specific types of alterations in the host transcriptome. *Sci. Rep.* **6,** 28075 (2016).

63. Zhao, H., Dahlö, M., Isaksson, A., Syvänen, A. C. & Pettersson, U. The transcriptome of the adenovirus infected cell. *Virology* **424,** 115–128 (2012).

64. Hodzic, J., Sie, D., Vermeulen, A. & van Beusechem, V. W. Functional Screening Identifies Human miRNAs that Modulate Adenovirus Propagation in Prostate Cancer Cells. *Hum. Gene Ther.* hum.2016.143 (2017). doi:10.1089/hum.2016.143

65. Qi, Y. *et al.* High-Throughput Sequencing of MicroRNAs in Adenovirus Type 3 Infected Human Laryngeal Epithelial Cells. **2010,** (2010).

66. Zhao, H., Chen, M., Tellgren-Roth, C. & Pettersson, U. Fluctuating expression of microRNAs in adenovirus infected cells. *Virology* **478,** 99–111 (2015).

67. Ingle, H. *et al.* The microRNA miR-485 targets host and influenza virus transcripts to regulate antiviral immunity and restrict viral replication. **8,** 1–13 (2015).

68. Praianantathavorn, K., Jinato, T. & Poovorawan, Y. Human microRNAs profiling in response to influenza A viruses. 409–420 (2016). doi:10.1177/1535370215611764

69. Chang, S. T. *et al.* Next-Generation Sequencing of Small RNAs from HIV-Infected Cells Identifies Phased microRNA Expression Patterns and Candidate Novel microRNAs Differentially Expressed upon Infection. **4,** 1–10 (2013).

70. Imig, J. *et al.* microRNA profiling in Epstein – Barr virus-associated B-cell lymphoma. **39,** (2011).

71. Gatto, G., Rossi, A., Rossi, D., Kroening, S. & Mallardo, M. Epstein – Barr virus latent membrane protein 1 trans -activates miR-155 transcription through the NF- i B pathway. **36,** 6608–6619 (2008).

72. Wang, F. *et al.* Human Cytomegalovirus Infection Alters the Expression of Cellular MicroRNA Species That Affect Its Replication ・. **82,** 9065–9074 (2008).

73. Zhang, Y., Dai, J., Tang, J., Zhou, L. & Zhou, M. MicroRNA-649 Promotes HSV-1 Replication by Directly Targeting MALT1. 1–11 (2016). doi:10.1002/jmv

74. Hodzic, J., Sie, D., Vermeulen, A. & van Beusechem, V. W. Functional screening identifies human miRNAs that modulate adenovirus propagation in prostate cancer cells. *Hum. Gene Ther.* **X,** hum.2016.143 (2017).

75. Elton, T. S., Selemon, H., Elton, S. M. & Parinandi, N. L. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene* **532,** 1–12 (2013).

76. O'Connell, R. M., Taganov, K. D., Boldin, M. P., Cheng, G. & Baltimore, D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 1604–9 (2007).

77. Lagos, D. *et al.* miR ‐ 132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nat. Publ. Gr.* **12,** 513–519 (2010).

78. Ru, J. *et al.* MiR-23a Facilitates the Replication of HSV-1 through the Suppression of Interferon Regulatory Factor 1. (2014). doi:10.1371/journal.pone.0114021

79. Wang, X. *et al.* ICP4-induced miR-101 attenuates HSV-1 replication. *Nat. Publ. Gr.* 1–15 (2016). doi:10.1038/srep23205

80. Chen, Y. *et al.* HCV-Induced miR-21 Contributes to Evasion of Host Immune System by Targeting MyD88 and IRAK1. **9,** (2013).

81. Triboulet, R. *et al.* Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* **315,** 1579–82 (2007).

82. Noonan, A. M. *et al.* Randomized Phase 2 Trial of the Oncolytic Virus Pelareorep (Reolysin) in Upfront Treatment of Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma. *YMTHE* **24,** 1150–1158 (2016).

83. Nuovo, G. J. *et al.* Reovirus-associated reduction of microRNA- let-7d is related to the increased apoptotic death of cancer cells in clinical samples. **25,** 1333–1344 (2012).

84. Russell, S. J. & Peng, K.-W. Oncolytic virotherapy: a contest between apples and oranges. *Mol. Ther.* **25,** 1–10 (2017).

85. Russell, S. J., Peng, K.-W. & Bell, J. C. Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.* **30,** 658–670 (2012).

86. Fukuhara, H., Ino, Y. & Todo, T. Oncolytic virus therapy: A new era of cancer treatment at dawn. *Cancer Sci.* **107,** 1373–1379 (2016).

87. Seth, P. & Ph, D. *Adenoviruses : Basic Biology to Gene Therapy I NTELLIGENCE U NIT 15 Adenoviruses : Basic Biology to Gene Therapy*.

88. Mahy, B. W. J. & Scd, M. A. *Encyclopedia of microbiology 3rd edition*. (2008).

89. Ahi, Y. S. & Mittal, S. K. Components of adenovirus genome packaging. *Front. Microbiol.* **7,** 1–15 (2016).

90. Russell, W. C. Adenoviruses: Update on structure and function. *J. Gen. Virol.* **90,** 1–20 (2009).

91. Meier, O. & Greber, U. F. Adenovirus endocytosis. *J. Gene Med.* **6,** S152–S163 (2004).

92. Nemerow, G. R., Pache, L., Reddy, V. & Stewart, P. L. Insights into adenovirus host cell interactions from structural studies. *Virology* **384,** 380–388 (2009).

93. Miller, M. S. *et al.* Characterization of the 55-Residue Protein Encoded by the 9S E1A mRNA of Species C Adenovirus. *J. Virol.* **86,** 4222–4233 (2012).

94. Querido, E. *et al.* Identification of Three Functions of the Adenovirus E4orf6 Protein That Mediate p53 Degradation by the E4orf6-E1B55K Complex. *J. Virol.* **75,** 699–709 (2001).

95. Yatherajam, G., Huang, W. & Flint, S. J. Export of adenoviral late mRNA from the nucleus requires the Nxf1/Tap export receptor. *J. Virol.* **85,** 1429–38 (2011).

96. Vachon, V. K. & Conn, G. L. Adenovirus VA RNA: An essential pro-viral non-coding RNA. *Virus Res.* **212,** 39–52 (2016).

97. Nilsson, C. E. *et al.* The adenovirus E4-ORF4 splicing enhancer protein interacts with a subset of phosphorylated SR proteins. *EMBO J.* **20,** 864–871 (2001).

98. Hoeben, R. C. & Uil, T. G. Adenovirus DNA replication in vitro. 1–12 (2013).

99. Biasiotto, R. & Akusj??rvi, G. Regulation of human adenovirus alternative RNA splicing by the adenoviral L4-33K and L4-22K proteins. *Int. J. Mol. Sci.* **16,** 2893–2912 (2015).

100. Shayakhmetov, D. M., Gaggar, A., Ni, S., Li, Z.-Y. & Lieber, A. Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity. *J. Virol.* **79,** 7478–91 (2005).

101. Kanerva, A. *et al.* Gene transfer to ovarian cancer versus normal tissues with fiber-modified adenoviruses. *Mol. Ther.* **5,** 695–704 (2002).

102. Lucas, T. *et al.* Hexon modification to improve the activity of oncolytic adenovirus vectors against neoplastic and stromal cells in pancreatic cancer. *PLoS One* **10,** 1–26 (2015).

103. Nicklin, S. A. & Baker, A. H. Tropism-Modification Strategies for Targeted Gene Delivery Using Adenoviral Vectors. 2290–2355 (2010). doi:10.3390/v2102290

104. Yamamoto, M. *et al.* Infectivity enhanced, cyclooxygenase-2 promoter-based conditionally replicative adenovirus for pancreatic cancer. *Gastroenterology* **125,** 1203–1218 (2003).

105. Kim, E. *et al.* Development of a Conditional Replication Competent Adenovirus, Controlled by the Human Telomerase Promoter (hTERT). *Cancer Res. Treat.*

35, 191–206 (2003).

106. Huch, M. *et al.* Urokinase-type plasminogen activator receptor transcriptionally controlled adenoviruses eradicate pancreatic tumors and liver metastasis in mouse models. *Neoplasia* **11,** 518–28, 4 p following 528 (2009).

107. Mato-berciano, A., Raimondi, G., Maliandi, M. V., Montoliu, L. & Fillat, C. A NOTCH-sensitive uPAR-regulated oncolytic adenovirus effectively suppresses pancreatic tumor growth and triggers synergistic anticancer effects with gemcitabine and nab-paclitaxel. (2017).

108. Rojas, J. J. *et al.* Minimal RB-responsive E1A promoter modification to attain potency, selectivity, and transgene-arming capacity in oncolytic adenoviruses. *Mol. Ther.* **18,** 1960–71 (2010).

109. Ylosmaki, E. *et al.* Generation of a Conditionally Replicating Adenovirus Based on Targeted Destruction of E1A mRNA by a Cell Type-Specific MicroRNA. *J. Virol.* **82,** 11009–11015 (2008).

110. Ros, X. B., Gironella, M. & Fillat, C. Adenoviruses Targeting Pancreatic Tumors Attenuate Tissue Damage Without Perturbation of miRNA Activity. *Mol. Ther.* **22,** 1665–1677 (2014).

111. Ros, X. B., Villanueva, E. & Fillat, C. Late-phase miRNA-controlled oncolytic adenovirus for selective killing of cancer cells. **6,** (2015).

112. Särkioja, M. *et al.* The cyclo-oxygenase 2 promoter is induced in nontarget cells following adenovirus infection, but an AU-rich 3′-untranslated region destabilization element can increase specificity. *J. Gene Med.* **10,** 744–753 (2008).

113. Villanueva, E. *et al.* Translational reprogramming in tumour cells can generate oncoselectivity in viral therapies. *Nat. Commun.* **8,** 14833 (2017).

114. Rojas, L. A. *et al.* Albumin-binding adenoviruses circumvent pre-existing neutralizing antibodies upon systemic delivery. *J. Control. Release* **237,** 78–88 (2016).

115. Kalyuzhniy, O. *et al.* Adenovirus serotype 5 hexon is critical for virus infection of hepatocytes in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 5483–8 (2008).

116. Choi, J.-W., Lee, Y. S., Yun, C.-O. & Kim, S. W. Polymeric oncolytic adenovirus for cancer gene therapy. *J. Control. Release* **219,** 181–91 (2015).

117. Cody, J. J. & Douglas, J. T. Armed replicating adenoviruses for cancer virotherapy. *Cancer Gene Ther.* **16,** 473–488 (2009).

118. Wildner, O. & Morris, J. C. The role of the E1B 55 kDa gene product in oncolytic adenoviral vectors expressing herpes simplex virus-tk: assessment of antitumor efficacy and toxicity. *Cancer Res.* **60,** 4167–74 (2000).

119. Doronin, K. *et al.* Tumor-specific, replication-competent adenovirus vectors overexpressing the adenovirus death protein. *J. Virol.* **74,** 6147–55 (2000).

120. Fajardo, C. A. *et al.* Oncolytic adenoviral delivery of an EGFR-targeting T cell engager improves antitumor efficacy. *Cancer Res.* **77,** canres.1708.2016 (2017).

121. Shaw, A. R. & Suzuki, M. ScienceDirect Recent advances in oncolytic

adenovirus therapies for cancer. *Curr. Opin. Virol.* **21,** 9–15 (2016).

122. Bramante, S. *et al.* oncolytic adenovirus coding for GM-CSF : Results in vitro , in rodents and in humans. (2015). doi:10.1002/ijc.29536

123. Pesonen, S. *et al.* Oncolytic immunotherapy of advanced solid tumors with a CD40L-expressing replicating adenovirus: assessment of safety and immunologic responses in patients. *Cancer Res.* **72,** 1621–31 (2012).

124. Heise, C. *et al.* ONYX-015, an E1B gene-attenuated adenovirus, causes tumor-specific cytolysis and antitumoral efficacy that can be augmented by standard chemotherapeutic agents. *Nat. Med.* **3,** 639–45 (1997).

125. Liu, D. *et al.* Preclinical evaluation of synergistic effect of telomerase-specific oncolytic virotherapy and gemcitabine for human lung cancer. *Mol. Cancer Ther.* **8,** 980–987 (2009).

126. Maliandi, M. V. *et al.* AduPARE1A and gemcitabine combined treatment trigger synergistic antitumor effects in pancreatic cancer through NF-κB mediated uPAR activation. *Mol. Cancer* **14,** 146 (2015).

127. Miura, Y. *et al.* Infectivity-selective oncolytic adenovirus developed by high-throughput screening of adenovirus-formatted library. *Mol. Ther.* **21,** 139–48 (2013).

128. Puig-saus, C., Gros, A., Alemany, R. & Cascalló, M. Adenovirus i-Leader Truncation Bioselected Against Cancer-associated Fibroblasts to Overcome Tumor Stromal Barriers. *Mol. Ther.* **20,** 54–62 (2012).

129. Uil, T. G. *et al.* Directed adenovirus evolution using engineered mutator viral polymerases. *Nucleic Acids Res.* **39,** (2011).

130. Phase I / Dose Expansion Study of Enadenotucirev in Ovarian Cancer Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02028117. (Accessed: 19th April 2017)

131. Kuhn, I. *et al.* Directed Evolution Generates a Novel Oncolytic Virus for the Treatment of Colon Cancer. **3,** 1–11 (2008).

132. Mahoney, D. J. & Stojdl, D. F. Functional genomic screening to enhance oncolytic virotherapy. *Br. J. Cancer* **108,** 1–5 (2012).

133. Diallo, J.-S. *et al.* A High-throughput Pharmacoviral Approach Identifies Novel Oncolytic Virus Sensitizers. *Mol. Ther.* **18,** 1123–1129 (2010).

134. Mahoney, D. J. *et al.* Virus-Tumor Interactome Screen Reveals ER Stress Response Can Reprogram Resistant Cancers for Oncolytic Virus-Triggered Caspase-2 Cell Death. *Cancer Cell* **20,** 443–456 (2011).

135. Voorhoeve, P. M. *et al.* A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **604,** 17–46 (2007).

136. Stanton, R. J., McSharry, B. P., Armstrong, M., Tomasec, P. & Wilkinson, G. W. G. Re-engineering adenovirus vector systems to enable high-throughput analyses of gene function. *Biotechniques* **45,** 659–668 (2008).

137. Dexter, D. L. *et al.* Establishment and Characterization of Two Human

Pancreatic Cancer Cell Lines Tumorigenic in Athymic Mice. *Cancer Res.* **42,** (1982).

138. Pérez-Torras, S. *et al.* Characterization of human pancreatic orthotopic tumor xenografts suitable for drug screening. *Cell. Oncol.* (2011). doi:10.1007/s13402-011-0049-1

139. Liu, N. *et al.* Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *Am. J. Pathol.* **153,** 263–9 (1998).

140. Núñez-Toldrà, R. *et al.* Improvement of osteogenesis in dental pulp pluripotent-like stem cells by oligopeptide-modified poly(ß-amino ester)s. *Acta Biomater.* 1–13 (2017). doi:10.1016/j.actbio.2017.01.077

141. José, A. *et al.* A genetic fi ber modi fi cation to achieve matrix-metalloprotease-activated infectivity of oncolytic adenovirus. **192,** 148–156 (2014).

142. Anders, M. *et al.* Loss of the coxsackie and adenovirus receptor contributes to gastric cancer progression. *Br. J. Cancer* **100,** 352–359 (2009).

143. Kurachi, S. *et al.* Fiber-modified adenovirus vectors containing the TAT peptide derived from HIV-1 in the fiber knob have efficient gene transfer activity. *Gene Ther.* **14,** 1160–1165 (2007).

144. Roomi, M. W., Monterrey, J. C., Kalinovsky, T., Rath, M. & Niedzwiecki, A. Distinct patterns of matrix metalloproteinase-2 and -9 expression in normal human cell lines. *Oncol. Rep.* **21,** 821–826 (2009).

145. Pereira, H. G., Russell, W. C. & Valentine, R. C. The Effect of Heat on the Anatomy of the Adenovirus. *J. Gen. Virol.* **1,** 509–522 (1967).

146. Yamano, S. *et al.* Long-term efficient gene delivery using polyethylenimine with modified Tat peptide. *Biomaterials* **35,** 1705–15 (2014).

147. Monsurrò, V. *et al.* Anti-viral state segregates two molecular phenotypes of pancreatic adenocarcinoma: potential relevance for adenoviral gene therapy. *J. Transl. Med.* **8,** 10 (2010).

148. Beard, P. M. *et al.* A Loss of Function Analysis of Host Factors Influencing Vaccinia virus Replication by RNA Interference. *PLoS One* **9,** e98431 (2014).

149. Wang, L., Li, W. & Li, S. A High Throughput Assay for Screening Host Restriction Factors and Antivirals Targeting Influenza A Virus. *Front. Microbiol.* **7,** 858 (2016).

150. Mao, D. Y. L., Ceccarelli, D. F. & Sicheri, F. 'Unraveling the Tail' of How SRPK1 Phosphorylates ASF/SF2. *Mol. Cell* **29,** 535–537 (2008).

151. Bullock, N. & Oltean, S. The many faces of SRPK1: SRPK1 in cancer. *J. Pathol. J Pathol* **241,** 437–440 (2017).

152. Akusjarvi, G. [Frontiers in Bioscience 5006-5015, May 1, 2008] Temporal regulation of adenovirus major late alternative RNA splicing Goran Akusjarvi. 5006–5015 (2008).

153. Suico, M. A., Shuto, T. & Kai, H. Roles and regulations of the ETS transcription factor ELF 4 / MEF. 1–10 (2016).

154. Pei, D., Zhang, Y. & Zheng, J. Regulation of p53: a collaboration between Mdm2 and Mdmx. *Oncotarget* **3,** 228–235 (2012).

155. Mirnezami, A. H. *et al. Hdm2 Recruits a Hypoxia-Sensitive Corepressor to Negatively Regulate p53-Dependent Transcription*. *Current Biology* **13,** (2003).

156. Oliner, J. D., Saiki, A. Y. & Caenepeel, S. The Role of MDM2 Amplification and Overexpression in Tumorigenesis. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6,** a026336 (2016).

157. Ratovitski, E. A. & Ratovitski, E. A. carcinomas Phospho- Δ Np63 α / microRNA network modulates epigenetic regulatory enzymes in squamous cell carcinomas. **4101,** (2014).

158. Yang, H., Zheng, Z., Zhao, L. Y., Li, Q. & Liao, D. Downregulation of Mdm2 and Mdm4 enhances viral gene expression during adenovirus infection. *Cell Cycle* **11,** 582–593 (2012).

159. Yi, X., Li, Y., Zai, H., Long, X. & Li, W. KLF8 knockdown triggered growth inhibition and induced cell phase arrest in human pancreatic cancer cells. (2016). doi:10.1016/j.gene.2016.03.025

160. van Vliet, J., Turner, J. & Crossley, M. Human Krüppel-like factor 8: a CACCC-box binding protein that associates with CtBP and represses transcription. *Nucleic Acids Res.* **28,** 1955–62 (2000).

161. Subramanian, T., Zhao, L. jun & Chinnadurai, G. Interaction of CtBP with adenovirus E1A suppresses immortalization of primary epithelial cells and enhances virus replication during productive infection. *Virology* **443,** 313–320 (2013).

162. Rhim, A. D. *et al.* EMT and Dissemination Precede Pancreatic Tumor Formation. *Cell* **148,** 349–361 (2012).

163. Xu, Z., Tian, J., Smith, J. S. & Byrnes, A. P. Clearance of adenovirus by Kupffer cells is mediated by scavenger receptors, natural antibodies, and complement. *J. Virol.* **82,** 11705–13 (2008).

164. Duffy, M. R., Doszpoly, A., Turner, G., Nicklin, S. A. & Baker, A. H. The relevance of coagulation factor X protection of adenoviruses in human sera. *Gene Ther.* **23,** 592–596 (2016).

165. Matsumoto, K., Shariat, S. F., Ayala, G. E., Rauen, K. A. & Lerner, S. P. Loss of coxsackie and adenovirus receptor expression is associated with features of aggressive bladder cancer. *Urology* **66,** 441–446 (2005).

166. Ma, Y. *et al.* Loss of coxsackie and adenovirus receptor expression in human colorectal cancer: A potential impact on the efficacy of adenovirus-mediated gene therapy in Chinese Han population. *Mol. Med. Rep.* **14,** 2541–7 (2016).

167. Jin, C. *et al.* Tat-PTD-Modified Oncolytic Adenovirus Driven by the SCG3 Promoter and ASH1 Enhancer for Neuroblastoma Therapy. *Hum. Gene Ther.* **24,** 766–775 (2013).

168. Kinoh, H. *et al.* Generation of a recombinant Sendai virus that is selectively activated and lyses human tumor cells expressing matrix metalloproteinases. *Gene Ther.* **11,** 1137–1145 (2004).

169. Springfeld, C. *et al.* Oncolytic Efficacy and Enhanced Safety of Measles Virus Activated by Tumor-Secreted Matrix Metalloproteinases. *Cancer Res.* **66,** (2006).

170. Szécsi, J. *et al.* Targeted retroviral vectors displaying a cleavage site-engineered hemagglutinin (HA) through HA–protease interactions. *Mol. Ther.* **14,** 735–744 (2006).

171. Duerner, L. J., Schwantes, A., Schneider, I. C., Cichutek, K. & Buchholz, C. J. Cell entry targeting restricts biodistribution of replication-competent retroviruses to tumour tissue. *Gene Ther.* **15,** 1500–1510 (2008).

172. Mühlebach, M. D. *et al.* Liver Cancer Protease Activity Profiles Support Therapeutic Options with Matrix Metalloproteinase–Activatable Oncolytic Measles Virus. *Cancer Res.* **70,** (2010).

173. Kurachi, S. *et al.* Fiber-modified adenovirus vectors containing the TAT peptide derived from HIV-1 in the fiber knob have efficient gene transfer activity. *Gene Ther.* **14,** 1160–1165 (2007).

174. Whatcott, C., Han, H., Posner, R. G. & Von Hoff, D. D. Tumor-stromal interactions in pancreatic cancer. *Crit. Rev. Oncog.* **18,** 135–51 (2013).

175. Guedan, S. *et al.* Hyaluronidase expression by an oncolytic adenovirus enhances its intratumoral spread and suppresses tumor growth. *Mol. Ther.* **18,** 1275–1283 (2010).

176. Provenzano, P. P. *et al.* Enzymatic Targeting of the Stroma Ablates Physical Barriers to Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **21,** 418–429 (2012).

177. Rhim, A. D. *et al.* Stromal Elements Act to Restrain, Rather Than Support, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Cell* **25,** 735–747 (2014).

178. Lee, J. J. *et al.* Stromal response to Hedgehog signaling restrains pancreatic cancer progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111,** E3091–E3100 (2014).

179. Özdemir, B. C. *et al.* Depletion of Carcinoma-Associated Fibroblasts and Fibrosis Induces Immunosuppression and Accelerates Pancreas Cancer with Reduced Survival. *Cancer Cell* **25,** 719–734 (2014).

180. Krutzke, L. *et al.* Substitution of blood coagulation factor X-binding to Ad5 by position-specific PEGylation: Preventing vector clearance and preserving infectivity. *J. Control. Release* **235,** 379–392 (2016).

181. Huch, M. *et al.* Urokinase-Type Plasminogen Activator Receptor Transcriptionally Controlled Adenoviruses Eradicate Pancreatic Tumors and Liver Metastasis in Mouse Models 1,2. *Neoplasia* **11,** 518–528 (2009).

182. Doronin, K. *et al.* Coagulation factor X activates innate immunity to human species C adenovirus. *Science* **338,** 795–8 (2012).

183. Short, J. J. *et al.* Substitution of Adenovirus Serotype 3 Hexon onto a Serotype 5 Oncolytic Adenovirus Reduces Factor X Binding, Decreases Liver Tropism, and Improves Antitumor Efficacy. *Mol Cancer Ther* **9,** 2536–44

184. Sumida, S. M. *et al.* Neutralizing Antibodies to Adenovirus Serotype 5 Vaccine Vectors Are Directed Primarily against the Adenovirus Hexon Protein. *J.*

Immunol. **174,** (2005).

185. Hemminki, A. *et al.* Modulation of Coxsackie-Adenovirus Receptor Expression for Increased Adenoviral Transgene Expression. *Cancer Res.* **63,** (2003).

186. Ingemarsdotter, C. K. *et al.* Paclitaxel resistance increases oncolytic adenovirus efficacy via upregulated CAR expression and dysfunctional cell cycle control. *Mol. Oncol.* **9,** 791–805 (2015).

187. Rosewell Shaw, A. & Suzuki, M. Recent advances in oncolytic adenovirus therapies for cancer. *Curr. Opin. Virol.* **21,** 9–15 (2016).

188. Liikanen, I. *et al.* Induction of interferon pathways mediates in vivo resistance to oncolytic adenovirus. *Mol Ther* **19,** 1858–1866 (2011).

189. Calin, G. a & Croce, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **6,** 857–66 (2006).

190. Permuth-Wey, J. *et al.* A Genome-Wide Investigation of MicroRNA Expression Identifies Biologically-Meaningful MicroRNAs That Distinguish between High-Risk and Low-Risk Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas. *PLoS One* **10,** e0116869 (2015).

191. Wei, F. *et al.* miR-99b-targeted mTOR induction contributes to irradiation resistance in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* **12,** 81 (2013).

192. Song, T. *et al.* Roles of microRNA-99 family in human glioma. *Onco. Targets. Ther.* **9,** 3613 (2016).

193. Wang, L. *et al.* miR-99a and -99b inhibit cervical cancer cell proliferation and invasion by targeting mTOR signaling pathway. *Med. Oncol.* **31,** 934 (2014).

194. Jing, L.-L. & Mo, X.-M. Reduced miR-485-5p expression predicts poor prognosis in patients with gastric cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20,** 1516–20 (2016).

195. Chen, Z., Li, Q., Wang, S. & Zhang, J. miR‑485‑5p inhibits bladder cancer metastasis by targeting HMGA2. *Int. J. Mol. Med.* **36,** 1136–42 (2015).

196. Lou, C. *et al.* MiR-485-3p and miR-485-5p suppress breast cancer cell metastasis by inhibiting PGC-1α expression. *Cell Death Dis.* **7,** e2159 (2016).

197. Mou, X. & Liu, S. MiR-485 inhibits metastasis and EMT of lung adenocarcinoma by targeting Flot2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **477,** 521–526 (2016).

198. Bett, A. J., Prevec, L. & Graham, F. L. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J. Virol.* **67,** 5911–21 (1993).

199. Long, J. C. & Caceres, J. F. The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression. *Biochem. J.* **417,** 15–27 (2009).

200. Kanopka, a *et al.* Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins. *Nature* **393,** 185–187 (1998).

201. Krainer, A. R., Conway, G. C. & Kozak, D. The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5′ splice site selection by activating proximal sites. *Cell* **62,** 35–42 (1990).

202. Molin, M. & Akusjärvi, G. Overexpression of essential splicing factor ASF/SF2 blocks the temporal shift in adenovirus pre-mRNA splicing and reduces virus progeny formation. *J. Virol.* **74,** 9002–9 (2000).

203. Misteli, T. Different site, different splice. *Nat Cell Biol* **2,** E98–E100. (2000).

204. Yang, T. *et al.* Krüppel-Like Factor 8 Is a New Wnt/Beta-Catenin Signaling Target Gene and Regulator in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* **7,** e39668 (2012).

205. Liu, N. *et al.* Kruppel-like factor 8 involved in hypoxia promotes the invasion and metastasis of gastric cancer via epithelial to mesenchymal transition. *Oncol. Rep.* **32,** 2397–404 (2014).

206. Wang, X. *et al.* KLF8 promotes human breast cancer cell invasion and metastasis by transcriptional activation of MMP9. *Oncogene* **30,** 1901–1911 (2011).

207. Shi, H., Ji, Y., Zhang, D., Liu, Y. & Fang, P. MiR-135a inhibits migration and invasion and regulates EMT-related marker genes by targeting KLF8 in lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **465,** 125–130 (2015).

208. Yan, Q. *et al.* KLF8 promotes tumorigenesis, invasion and metastasis of colorectal cancer cells by transcriptional activation of FHL2. *Oncotarget* **6,** 25402–25417 (2015).

209. Wei, Y., Chen, G., You, L. & Zhao, Y. Krüpel-like factor 8 is a potential prognostic factor for pancreatic cancer. *Chin. Med. J. (Engl).* **127,** 856–9 (2014).

210. Grand, R. J. A. *et al.* The Significance of the CtBP -AdEIA Interaction during Viral Infection and Transformation.

211. Wright, J. & Leppard, K. N. The human adenovirus 5 L4 promoter is activated by cellular stress response protein p53. *J. Virol.* **87,** 11617–25 (2013).

212. Wu, K., Guimet, D. & Hearing, P. The adenovirus L4-33K protein regulates both late gene expression patterns and viral DNA packaging. *J. Virol.* **87,** 6739–47 (2013).

213. Morris, S. J. & Leppard, K. N. Adenovirus serotype 5 L4-22K and L4-33K proteins have distinct functions in regulating late gene expression. *J Virol* **83,** 3049–3058 (2009).

214. Ostapchuk, P., Anderson, M. E., Chandrasekhar, S. & Hearing, P. The L4 22-kilodalton protein plays a role in packaging of the adenovirus genome. *J. Virol.* **80,** 6973–81 (2006).

215. Guimet, D. & Hearing, P. The adenovirus L4-22K protein has distinct functions in the posttranscriptional regulation of gene expression and encapsidation of the viral genome. *J Virol* **87,** 7688–7699 (2013).

216. Urvalek, A. M., Wang, X., Lu, H. & Zhao, J. KLF8 recruits the p300 and PCAF co-activators to its amino terminal activation domain to activate transcription.

217. Ferrari, R. *et al.* Adenovirus Small E1A Employs the Lysine Acetylases p300/CBP and Tumor Suppressor Rb to Repress Select Host Genes and Promote Productive Virus Infection. *Cell Host Microbe* **16,** 663–676 (2014).

218. de Barrios, O. *et al.* ZEB1-induced tumourigenesis requires senescence inhibition via activation of DKK1/mutant p53/Mdm2/CtBP and repression of macroH2A1. *Gut* gutjnl-2015-310838 (2016). doi:10.1136/gutjnl-2015-310838

219. Sashida, G. *et al.* ELF4/MEF activates MDM2 expression and blocks oncogene-induced p16 activation to promote transformation. *Mol. Cell. Biol.* **29,** 3687–99 (2009).

220. Yao, J. J. *et al.* Tumor promoting properties of the ETS protein MEF in ovarian cancer. *Oncogene* **26,** 4032–7 (2007).

221. Bazzoli, E. *et al.* MEF promotes stemness in the pathogenesis of gliomas. *Cell Stem Cell* **11,** 836–44 (2012).

222. Wade, M., Li, Y.-C. & Wahl, G. M. MDM2, MDMX and p53 in oncogenesis and cancer therapy. (2013). doi:10.1038/nrc3430

223. Grochola, L. F. *et al.* Elevated Transcript Levels From the MDM2 P1 Promoter and Low p53 Transcript Levels Are Associated With Poor Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas* **40,** 265–270 (2011).

224. Sui, X. *et al.* Hdm2 is regulated by K-Ras and mediates p53-independent functions in pancreatic cancer cells. *Oncogene* **28,** 709–720 (2009).

225. Sheng, W. *et al.* The clinicopathological significance and relationship of Gli1, MDM2 and p53 expression in resectable pancreatic cancer. *Histopathology* **64,** 523–535 (2014).

226. van Beusechem, V. W., van den Doel, P. B. & Gerritsen, W. R. Conditionally replicative adenovirus expressing degradation-resistant p53 for enhanced oncolysis of human cancer cells overexpressing murine double minute 2. *Mol. Cancer Ther.* **4,** (2005).

227. Riley, M. F. & Lozano, G. The Many Faces of MDM2 Binding Partners. *Genes Cancer* **3,** 226–39 (2012).

228. Thut, C. J., Goodrich, J. A. & Tjian, R. Repression of p53-mediated transcription by MDM2: A dual mechanism. *Genes Dev.* **11,** 1974–1986 (1997).

229. microRNAviewer-all. Available at: http://people.csail.mit.edu/akiezun/microRNAviewer/. (Accessed: 20th May 2017)

8. ANNEX

Taula 8.1. Famílies d'ontologia gènica a les quals pertanyen els gens diana predits pel hsa-miR-99b.

Anàlisis portats a terme amb els programes bioinformàtics miRWalk i Panther GO Slim. Es classifiquen les famílies segons pel valor de *–Log P value*. Es destaquen amb vermell les famílies relacionades amb processos de transcripció i expressió gènica.

GO biological process	-Log P value
regulation of biological quality	5,90
intracellular signal transduction	5,85
regulation of transport	5,09
positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	**3,91**
embryo development	3,07
protein localization	2,98
animal organ morphogenesis	2,80
response to oxygen-containing compound	2,79
protein phosphorylation	2,64
transcription from RNA polymerase II promoter	**2,42**
anatomical structure formation involved in morphogenesis	2,41
neuron projection development	2,39
regulation of intracellular signal transduction	2,33
regulation of neuron projection development	2,31
regulation of cellular protein localization	2,31
positive regulation of cellular component organization	2,25
endomembrane system organization	2,16
negative regulation of response to stimulus	2,10
tube development	2,08
negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	**2,05**
positive regulation of catalytic activity	2,00

Taula 8.2. Famílies d'ontologia gènica a les quals pertanyen els gens diana predits pel hsa-miR-485.

Anàlisis portats a terme amb els programes bioinformàtics miRWalk i Panther GO Slim. Es classifiquen les famílies segons pel valor de *–Log P value*. Es destaquen amb vermell les famílies relacionades amb processos de transcripció i expressió gènica.

GO biological process	-Log P value
transcription, DNA-templated	**7,95**
response to abiotic stimulus	7,14
single-organism organelle organization	6,03
cellular component assembly	5,61
cellular protein localization	5,60
single-organism transport	5,45
cellular response to stress	5,43
single-organism metabolic process	5,22
regulation of cellular component biogenesis	4,22
protein transport	4,12
neuron projection development	4,09
cellular response to oxygen-containing compound	3,95
vesicle-mediated transport	3,77
positive regulation of transport	3,74
protein phosphorylation	3,73
regulation of organelle organization	3,62
negative regulation of multicellular organismal process	3,61
negative regulation of signal transduction	3,60
peptidyl-amino acid modification	3,49
cytoskeleton organization	3,42
regulation of cellular protein localization	3,34
positive regulation of GTPase activity	3,22
negative regulation of gene expression	**3,10**
regulation of cell morphogenesis	3,05
regulation of protein transport	2,84
negative regulation of cellular macromolecule biosynthetic process	2,75
regulation of intracellular transport	2,69
modulation of synaptic transmission	2,67
cell migration	2,67
anatomical structure formation involved in morphogenesis	2,65
negative regulation of cell proliferation	2,54
brain development	2,48
response to hormone	2,42
positive regulation of intracellular signal transduction	2,40
macromolecular complex subunit organization	2,38
regulation of cellular response to stress	2,38
animal organ morphogenesis	2,31
regulation of cell migration	2,31
cellular response to organic cyclic compound	2,22
chemical homeostasis	2,21

single-organism cellular localization	2,18
response to lipid	2,14
negative regulation of nucleobase-containing compound metabolic process	2,13
ion transmembrane transport	2,11
plasma membrane organization	2,01
tissue development	2,01

Journal of Controlled Release 192 (2014) 148–156

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Controlled Release

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jconrel

A genetic fiber modification to achieve matrix-metalloprotease-activated infectivity of oncolytic adenovirus

Anabel José [a,b,1], Maria Rovira-Rigau [a,b,1], Jeroni Luna [a,b], Marta Giménez-Alejandre [f], Eva Vaquero [a,c,d], Beatriz García de la Torre [e], David Andreu [e], Ramon Alemany [f], Cristina Fillat [a,b,*]

[a] Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi iSunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain
[b] Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Barcelona, Spain
[c] Department of Gastroenterology, Institut de Malalties Digestives i Metabòliques, Hospital Clínic, Barcelona, Spain
[d] Centro de Investigación Biomédica en Red de enfermedades hepáticas y digestivas (CIBERehd), Barcelona, Spain
[e] Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain
[f] Laboratori de Recerca Traslacional IDIBELL, Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 25 February 2014
Accepted 8 July 2014
Available online 15 July 2014

Keywords:
Pancreatic cancer
Oncolytic adenovirus
Tumor targeting
Cancer-associated fibroblasts
Metalloproteases

ABSTRACT

Selective tumor targeting of oncolytic adenovirus at the level of cell entry remains a major challenge to improve efficacy and safety. Matrix metalloproteases (MMPs) are overexpressed in a variety of tumors and in particular in pancreatic cancer. In the current work, we have exploited the expression of MMPs together with the penetration capabilities of a TAT-like peptide to engineer tumor selective adenoviruses. We have generated adenoviruses containing CAR-binding ablated fibers further modified with a C-terminus TAT-like peptide linked to a blocking domain by an MMP-cleavable sequence. This linker resulted in a MMP-dependent cell transduction of the reporter MMP-activatable virus AdTATMMP and in efficient transduction of neoplastic cells and cancer-associated fibroblasts. Intravenous and intraductal administration of AdTATMMP into mice showed very low AdTATMMP activity in the normal pancreas, whereas increased transduction was observed in pancreatic tumors of transgenic Ela-myc mice. Intraductal administration of AdTATMMP into mice bearing orthotopic tumors led to a 25-fold increase in tumor targeting compared to the wild type fiber control. A replication competent adenovirus, Ad^{RC}MMP, with the MMP-activatable fiber showed oncolytic efficacy and increased antitumor activity compared to Adwt in a pancreatic orthotopic model. Reduced local and distant metastases were observed in Ad^{RC}MMP treated-mice. Moreover, no signs of pancreatic toxicity were detected. We conclude that MMP-activatable adenovirus may be beneficial for pancreatic cancer treatment.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Adenovirus serotype 5 (Ad5) is commonly used in the development of oncolytic agents for cancer gene therapy. Ad5 infectivity depends on the expression of the coxsackievirus–adenovirus-receptor (CAR) on the surface of target cells. However, since CAR is frequently downregulated in tumor cells, Ad5 neoplastic cell transduction is often inefficient, limiting the anti-cancer effects of oncolytic adenoviruses. Hence, efforts to improve adenoviral tumor cell transduction have been developed. Strategies such as fiber pseudotyping [1], the addition of high affinity ligands to different adenovirus capsid proteins [2–5], and the incorporation of chemically or conjugated surface modifications have been studied [6–8]. In particular, the protein transduction domain Tat-PTD from the HIV-1 Tat protein has been inserted into the HI Loop or the C-terminus of the fiber knob [3] and into the hexon hypervariable region 5 (HVR5) of the virus capsid showing increased transduction efficacy on a variety of tumor cells [5].

An optimal retargeted virus should combine an efficient tumor cell transduction with tumor selectivity. Viral activation through cancer-specific proteases is an approach that has been tested to redirect enveloped viruses to cancer cells. Since most enveloped viruses require protease cleavage of viral glycoproteins for productive cell entry, retroviral glycoproteins have been engineered with matrix metalloproteases (MMP)-cleavable linkers to provide retroviruses with cancer specificity [9,10]. Measles and Sendai viruses have also been modified with similar strategies showing tumor selectivity [11,12].

In the current work we studied the potential to confine adenoviral oncolysis to tumor tissue with the dual objective to: i) improve adenoviral tumor transduction and ii) achieve adenoviral specific activation in tumor cells. We have generated a fiber-modified adenovirus with a TAT-like domain exposed upon cleavage with tumor-specific proteases. We show MMP-dependent selectivity of the virus, increased tumor

* Corresponding author at: Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi iSunyer-IDIBAPS, Rosselló 149-153, 08036-Barcelona, Spain. Tel.: +34 932275400x4579.
E-mail address: cfillat@clinic.ub.es (C. Fillat).
[1] Anabel José and Maria Rovira-Rigau equally contributed to the work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.008
0168-3659/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

targeting and remarkable oncolytic antitumoral efficacy in pancreatic xenografts.

2. Materials and methods

2.1. Cell lines

HEK293, NIH-3T3 cells, and the human pancreatic adenocarcinoma cell line PANC-1 were obtained from the American Type Cancer Collection (ATCC). The human pancreatic adenocarcinoma cell line RWP-1 and the HT1080 fibrosarcoma cell line were kindly provided by Dr F.X. Real and Dr. R. Alemany, respectively. Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics, and cultured as described [13]. PSC-21, CAF-25, and CAF-28 cells were isolated from fresh pancreatic specimens obtained from adult patients undergoing surgical resection for pancreatic cancer at the Hospital Clinic in Barcelona. All human samples were obtained under the approval of the Institutional Ethics Committee. Tissue blocks were cut into small pieces and dissociated in collagenase solution. Digested tissue was filtered and later centrifuged on a 12% Optiprep density gradient. A resultant fuzzy band at the interface and the cell pellet were collected separately, suspended in DMEM/F-12 medium, and cultured with DMEM-F-12 medium containing 15% FBS, Glutamax, antibiotics, HEPES, insulin, and IGF-1. Fibroblasts collected from the interface were identified as quiescent pancreatic stellate cells (PSCs) and fibroblasts growing out from pellets were considered as cancer associated fibroblasts (CAFs). Activated PSCs and CAFs were characterized by immunostaining. Both cell types showed abundant expression of α-smooth muscle actin and vimentin and were negative for E-cadherin.

2.2. Adenovirus construction

AdCMVGFPLuc (AdTL) has been previously described [14]. Adwt, the wild-type adenovirus, was obtained from the ATCC (Manassas, VA). In the present work we have generated the recombinant adenoviruses AdYTRGE, AdTATMMP, and the replication-competent virus Ad^{RC}MMP. AdTL, AdYTRGE, and AdTATMMP express the enhanced GFP gene and the firefly luciferase gene under the control of a CMV promoter.

The AdYTRGE was generated modifying the plasmid backbone of pAdTL. Three modifications were performed on the fiber gene: i) the Y477A mutation (TAT changed to GCT), ii) deletion of T489 A490 Y491 T492 residues (sequence deleted 5′-ACAGCCTATACA-3′); and iii) insertion of residues SKCDCRGECFCD (sequence inserted: 5′-TCAAAATGTG ACTGCCGCGGAGAATGTTTCTGCGAC-3′) between T546 and P547 of the HI-loop. All modifications were done by homologous recombination in yeast [15].

The AdTATMMP was generated by inserting the TATMMP fragment from the plasmid pGEM-T fiber TATMMP end into the NcoI/MfeI sites of the pXK3.1 plasmid, which contains the wild type fiber, generating the pXK3.1–YTRGE–TATMMP. TATMMP fragment was obtained by cloning TATMMP sequence at the end of the fiber sequence by two consecutive Touch Down-PCR. First, TAT-like (TAT*) sequence was amplified from the plasmid pBSatYTRGE using the primers Fiber1Fw (5′-GCACCAAACACAAATCCC-3′) and FiberRv1 (5′GCGCCGCCTCTTCGTCGC TGTCTCCGCTTCTTGCTGCCATATTCTTGGGCAATGTATGA-3′). The PCR product, that contained the YTRGE mutations and TAT* sequence, was cloned into a T-vector following the manufacturer's instructions (pGEM®-T Easy Vector System I, Promega). Then, the MMP-cleavable linker-Blockage-3′ UTR sequence was amplified from the recently generated plasmid using the primers Fiber1Fw and FiberRv2 (5′-GCAATTGA AAAATAAACACGTTGAAACATAACACAAACGATTCTTTACTCCTCTTCCTCC TCGCCCTCTTCCTCGCCGCCCTTGTACAGGCCCTTGGCGCCGCCTCTTCGTC GCTGTCT-3′) and cloned into a T-vector generating the plasmid pGEM-T fiber TATMMP end. Next, homologous recombination of XbaI/KpnI digested TATMMP fragment with the linearized plasmid pVK50TL (adenoviral genome) was carried following a standard protocol. Viral particles were obtained and propagated in HEK293 cells.

The Ad^{RC}MMP is a replication-competent adenovirus, containing the wild-type Ad5 genome with the modified fiber TATMMP. It was generated by homologous recombination of XbaI/KpnI digested TATMMP fragment with the linearized plasmid pVK50 (adenoviral genome) following standard protocol. Viral particles were obtained in HEK293 cells and propagated in A549 cells.

All viruses were purified by standard cesium chloride banding and the physical particle concentration (vp/ml) was determined by optical density reading (OD_{260}). Viral titers for Adwt: $5{,}61 \times 10^{12}$ vp/ml and for Ad^{RC}MMP: $3{,}79 \times 10^{12}$ vp/ml. Correct fiber was verified by PCR and by PCR-product sequencing using Fiber1Fw, described above, and Fiber4Rv (5′-GTATAAGCTATGTGGTGGTGG-3′) primers.

2.3. Transduction efficiency assays

Cells were seeded in triplicate in 96-well plates. After 24 h, cells were infected with the corresponding adenovirus at 10^3 vp/cell or 10^4 vp/cell. Virus was removed 6 h later and cells were further cultured in a complete medium. Luciferase expression was measured three days later according to manufacturer's instructions (Luciferase Assay System; Promega). For experiments using pre-cleaved AdTATMMP, 24 h after cell seeding, AdTATMMP was incubated without or with different doses of MMP-9 (Calbiochem) in FBS-depleted medium, at 37 °C for 2 h, previous to cell infection.

2.4. In vitro cytotoxicity assays

A total of 3×10^3 cells (HT1080, PANC-1and RWP-1) or 10^3 cells (CAF-28) were seeded in triplicate in a 96-well plate and infected with either Adwt or Ad^{RC}MMP at different doses. Virus was removed 6 h later and cells were further cultured in a complete medium. Cell viability was measured 5 days later by an MTT colorimetric assay (Roche Molecular Biochemicals) (HT1080, PANC-1, and RWP-1) or by methylene blue staining (CAF-28).

2.5. Viral yield

PANC-1 and RWP-1 cells were seeded (4×10^4 cells per well in duplicate in 24-well plates) and infected with either Adwt or Ad^{RC}MMP at 50 vp/cell in the absence of FBS. Virus was removed 6 h later and cells were washed with PBS and cultured in FBS-complete medium. Total cell extracts were collected at 3 and 5 days post-infection and genomic DNA was extracted using UltraClean® BloodSpin® DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA) according to the manufacturer's instructions. Viral genomes were determined by Real Time quantitative PCR (qPCR), performed on ViiA™ 7 System (Applied Biosystems, Life Technologies™) using SYBR Green mastermix (Roche) and hexon specific primers: AdHEXO1: GCCGCAGTGGTCTTAC ATGCACATC, AdHEXO2: CAGCACGCCGCGGATGTCAAAG. The adenovirus copy number was quantified with a standard curve, consisting of adenovirus DNA dilutions (10^2–10^7 copies) in a background of genomic DNA. Values were corrected by the number of cells per well, determined by qPCR of albumin intron 4. S-albumin: CTGTCATCTCTTGTGG GCTGT and aS-albumin: GGCTATCCAAACTCATGGGAG.

2.6. MMP expression analysis

Total RNA was obtained from pancreatic tissue with the RNeasy® Mini Kit (Qiagen) and reverse transcribed with Retroscript RT kit (Ambion, Life Technologies ™), using random decamers, in accordance with the manufacturer's protocols. Real Time quantitative PCR was performed on ViiA™ 7 System (Applied Biosystems, Life Technologies ™) using SYBR Green mastermix (Roche) and MMP-2 and GAPDH specific primers: MMP2-Fw: TGATGGCATCGCTCAGATCC, MMP2-Rv: CACAGC

CTTCTCCTCCTGTG, GAPDH-Fw: TGTCAAGCTCATTTCCTGGTATGA, GAPDH-Rv: CTTACTCCTTGGAGGCCATGTAG.

2.7. Mouse models

Animal procedures followed the guidelines of European Community Directive 86/609/EEC and were approved by the Local Ethical Committee. Transgenic Ela-myc and wt C57BL/6 mice of 16 weeks of age were used; they were genotyped by multiplex PCR analysis as previously described [16]. Male athymic nu/nu mice (8 weeks old, Harlan Iberica) were used to generate orthotopic pancreatic tumors. PANC-1 or PANC-1/CAF-25, and PANC-1-Luc/CAF-28 mixed orthotopic tumors were generated by injecting a total of 350,000 cells (ratio 10:1) into the pancreas of athymic nude mice, in a final volume of 50 μl, as previously described [17].

2.8. Bioluminescence assay and quantification of luciferase expression

Firefly D-Luciferin (PerkinElmer, Inc) was administered i.p. (32 mg/kg) to mice and 10 min later were anesthetized with a mixture of isoflurane and oxygen preparation. In vivo and ex vivo luciferase activity was visualized and images were quantified using the Wasabi image analysis software (Hamamatsu Photonics) as described [18].

Luciferase transgene expression in tissue extracts was quantified using the reporter Luciferase Assay System (Promega) as previously described [19].

2.9. Antitumoral efficacy study

PANC-1/CAF-28 tumor-bearing mice were intraductally injected as previously reported [16] with saline, 5×10^{10}vp of Adwt or Ad^{RC}MMP, and tumor growth was monitored by measuring in vivo luciferase emission. Animals were sacrificed 42 days after virus administration and pancreatic-tumor tissue was isolated; metastatic foci were also analyzed. Ex vivo luciferase emission of pancreatic tissue was determined and pancreatic-tumor volume was measured as follows: $V\,(mm^3) = a \times b \times c/2$, where a = length, b = width, and c = height of pancreas.

2.10. Immunohistochemistry

Paraformaldehyde-fixed paraffin-embedded tissues were prepared as previously described [17]. Five-micrometer sections were treated with 10 mM citrate buffer (pH 6.0) and incubated overnight at 4 °C with anti-GFP (A6455, Invitrogen) or with anti-α-SMA (ab7817, Abcam) antibodies. Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 633 (A11001 and A21071 respectively, Molecular Probes, Life Technologies™) were used as secondary antibodies. Nucleus were counterstained with 5 μg/ml bis-benzimide (Hoechst 33342; Sigma) and visualized under a fluorescent microscope (Nikon Eclipse 50i). The fluorescent images were captured using a digital camera (Cool Cube1, MetaSystems).

2.11. Toxicity analysis

Blood samples were collected by intracardiac puncture under anesthesia. Serum alanine transaminase (ALT), aspartate transaminase (AST), amylase and lipase were determined on an Olympus AU400 Analyzer.

2.12. Statistical analysis

Results are expressed as mean ± SEM of at least three independent experiments. Statistical differences were determined using Prism (version 5; GraphPad Software Inc.) and were considered significant for P values less than 0.05. A Mann–Whitney nonparametric test was used for the statistical analysis (2-tailed) of in vitro and in vivo studies. Regular two-way ANOVA was used to compare differences between tumor growth curves from saline, Adwt and Ad^{RC}MMP treated groups.

3. Results

3.1. AdTATMMP transduction is activated by matrix metalloproteases MMP2 and MMP9

We hypothesized that an MMP-activatable adenovirus containing a TAT-like peptide in the fiber could selectively enhance tumor cell transduction independently of CAR expression. To test this hypothesis we generated a fiber-modified recombinant adenovirus (AdTATMMP) expressing the reporter gene luciferase and GFP (Fig. 1A and B). Fiber modifications included the insertion of a TAT-derived peptide (TAT*) in the fiber knob domain followed by an MMP-cleavable linker, recognized by MMP-2 and MMP-9, and a polyanionic sequence designed to neutralize the polycations of the TAT sequence by forming intramolecular hairpins (Fig. 1C). To achieve non-tumor cell detargeting, these modifications were engineered in a backbone of a mutated fiber to ablate binding to CAR and to coagulation factor IX (YTRGE mutations) [20]. To first confirm that the MMP-linker was susceptible to be cleaved by matrix metalloproteases in the context of the TAT* peptide and the polyanionic block, a 30-aa peptide containing the indicated sequences was chemically synthesized, incubated in the presence of recombinant MMP-2 protein and analyzed by HPLC at different time points. Cleavage of the peptide was evidenced by the appearance of two new peaks corresponding to the two fragments expected from proteolysis at the Gly – Leu peptide bond of the MMP-linker, and was almost complete at 240 min (Supplementary Fig. S1).

Next, we investigated the capacity of the AdTATMMP to transduce cells in response to protease cleavage. AdTATMMP was incubated with increased concentrations of recombinant MMP-9 protein for 2 h. Then cells were exposed to pre-treated virus and luciferase activity was measured 3 days later. A dose-dependent effect on viral transduction was observed in all the cell lines, with the highest activity observed at the

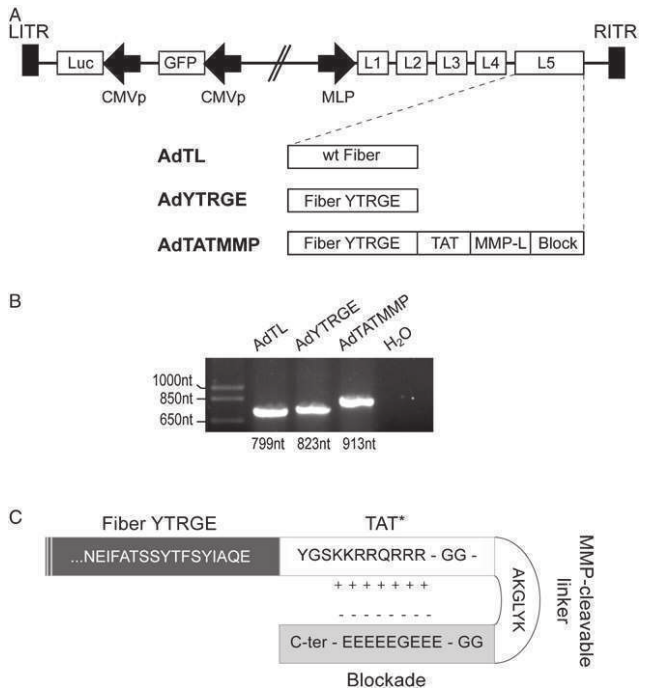


Fig. 1. AdTATMMP adenovirus. A, schematic representation of AdTL, AdYTRGE and AdTATMMP. B, fiber detection: PANC-1 cells were infected with purified adenovirus. Two days later, cells were harvested and total DNA was obtained and used for PCR analyses. C, schematic diagram of C-terminal fiber protein of AdTATMMP. TAT*$_{PTD}$ is blocked by a stretch of acidic residues attached by an MMP cleavable linker.

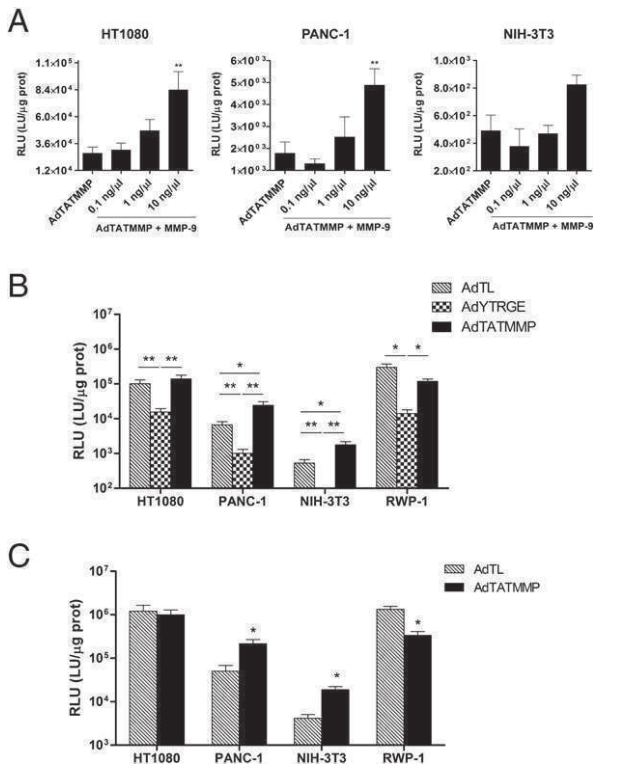


Fig. 2. AdTATMMP transduction efficiency. A total of 10^4 cells were seeded in triplicate and infected with the corresponding adenovirus at 10^3 vp/cell (A, B) and 10^4 vp/cell (C). Luciferase expression was measured three days later. Results are represented as the mean ± SEM of at least 3 independent experiments. A, AdTATMMP was incubated with different doses of MMP-9 (0, 0.1, 1, and 10 ng/µl) at 37 °C for 2 h, previous to cell infection. $^*p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$.

maximal MMP-9 concentration tested (Fig. 2A). Similar data was observed by incubation with MMP-2 protein, in agreement with the MMP linker being recognized by the two metalloproteases (data not shown). Moreover, no differences on AdTL transduction efficiency were observed by pre-treatment with MMP-9, highlighting the specificity of the effect to the TATMMP fiber modifications (Supplementary Fig. S2). Viral entrance of AdTATMMP was independent of CAR expression, in line with the fiber genetic modifications introduced, since AdTATMMP cell transduction was not inhibited by the presence of increasing concentrations of an inactivated virus with wild-type fiber, whereas competitive inhibition of transduction was observed with the inactivated wild type fiber virus and AdTL (Supplementary Fig. S3).

3.2. AdTATMMP transduction efficiency is superior to AdTL in neoplastic cells and cancer associated fibroblasts in vitro

We then sought to evaluate the transduction efficiency of AdTATMMP compared to the control AdYTRGE in a battery of cells expressing variable levels of MMP-2 and MMP-9 (Supplementary Fig. S4A). The control CAR-ablated virus AdYTRGE had a low capacity to infect cells. However, AdTATMMP fiber-modified virus rescued the infectivity in all the cell lines tested (Fig. 2B). Interestingly, AdTATMMP showed increased transduction compared to the wild-type fiber virus AdTL in cells that have limited infectivity with AdTL (PANC-1 and NIH-3T3). In contrast, in cells highly susceptible to wild-type fiber mediated-transduction, the transduction efficiency achieved by AdTATMMP was similar to AdTL (in HT1080) or lower (in RWP-1) (Fig. 2B and C). Expression of MMP-2 and MMP-9 in these two cell lines showed high levels of MMPs in HT1080, but moderate in RWP-1 (Supplementary Fig. S4A). Thus the efficiency of AdTATMMP transduction correlated with endogenous MMP content in the studied cell lines.

Pancreatic tumors are characterized by a highly abundant stroma composed of extracellular matrix and a heterogeneous population of CAFs, PSCs, endothelial and inflammatory cells [21]. CAFs and PSCs present tumor promoting capabilities and produce fibronectin and collagens, thus becoming important barriers to the distribution of oncolytic adenovirus. In fact, oncolytic adenoviruses active in CAFs have been shown to improve tumor virotherapy [22]. Based on these findings, we set out to investigate the susceptibility to adenoviral infection of CAFs and PSC cells from 3 different patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). Cell transduction was significantly increased by AdTATMMP compared to AdTL ranging from 35-fold to 108-fold (Fig. 3A and B). This result was in line with the abundant or moderate expression of MMP-2 and MMP-9 in CAFs and PSCs, respectively (Supplementary Fig. S4B).

3.3. AdTATMMP exhibits enhanced tumor transduction in mouse models of PDAC

To evaluate the tumor-targeting selectivity of AdTATMMP, wild type (wt) and transgenic Ela-myc mice, which develop tumors in the pancreas, were intravenously injected with a single dose of AdTL, AdYTRGE, or AdTATMMP at 5×10^{10} vp/mouse. At viral injection, transgenic mice displayed ductal and acinar tumors with abundant stroma [16] and a pancreatic volume that was 2-fold that of a normal pancreas (Supplementary Fig. S5). Four days later, bioluminescence was measured in the liver and the pancreas. As shown in Fig. 4A, a reduction in the liver transduction was observed with AdYTRGE and AdTATMMP viruses compared to AdTL, in agreement to their impairment to bind coagulation factor IX and CAR. Of notice, transduction of the pancreatic tissue in wt animals was highly impaired by both AdYTRGE and AdTATMMP compared to AdTL. However, pancreatic tumors from Ela-myc mice were efficiently transduced with AdTATMMP but not with AdYTRGE showing the in vivo tumor targeting capacity of AdTATMMP (Fig. 4B). Furthermore, tumor selectivity of AdTATMMP could also be observed upon intraductal delivery of AdTL and AdTATMMP in wt and Ela-myc mice. AdTL injection in wt mice resulted in a large number of pancreatic cells staining for GFP that was reduced in the tumorigenic pancreas of Ela-myc mice. On the contrary, a low number of GFP stained cells were detected in the pancreas of wt mice receiving AdTATMMP, whereas increased GFP staining was observed in Ela-myc tumors (Fig. 4C).

Since AdTATMMP efficiently transduced both neoplastic and CAF cells in vitro, we next assessed its in vivo tumor targeting activity in a mixed xenograft model generated from tumor cells (PANC-1) and human fibroblasts (CAF-25). Although human fibroblasts are unable to survive long-term, at least a 19-day long survival has been reported in some models [22] and this transient presence can promote tumor growth [23]. In this line, our mice model of PANC-1 + CAF-25 intrapancreatic tumors showed a 2.6-fold increased volume 30 days post-cell inoculation, when compared to PANC-1 tumors (Supplementary Fig. S6). Since the selectivity of AdTATMMP relies on the expression of tumor metalloproteases, we compared the expression of MMP-2 in PANC-1 + CAF-25 tumor areas versus tumor-free areas from the pancreas of the same animals. RT-qPCR analysis revealed a statistically significant increase of MMP-2 mRNA levels in tumor areas (Fig. 5A). To evaluate the selectivity of AdTATMMP in this mouse model, AdTL and AdTATMMP were intraductally injected in the pancreas of mice bearing PANC-1 + CAF-25 tumors and luciferase activity was measured four days later. Interestingly a 9-fold increase in AdTATMMP luciferase activity was measured in tumor areas compared to AdTL. Of note, the ratio of luciferase activity between tumor and tumor free areas was of 25-fold for AdTATMMP, whereas AdTL showed an inverse ratio, with a reduced luciferase activity in PANC-1 + CAF-25 tumors versus normal pancreas (Fig. 5B). These results highlight the tumor targeting capacity of AdTATMMP.

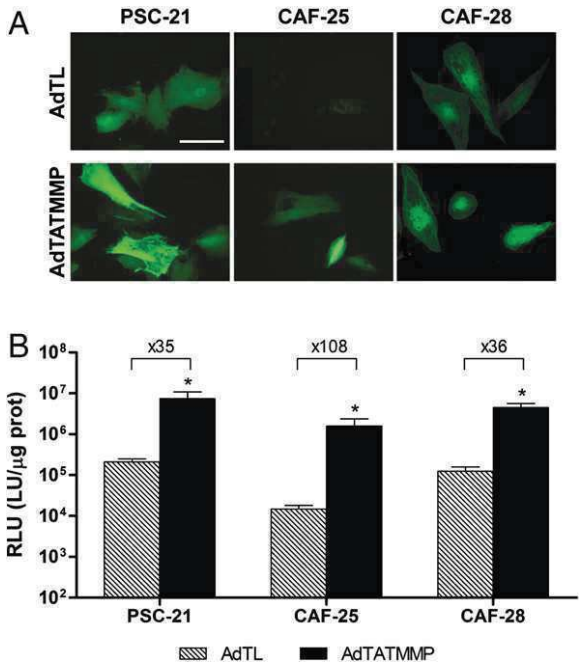


Fig. 3. AdTATMMP transduction efficiency in CAF and PSC cell lines. A total of 10^3 cells were seeded in triplicate and infected with either AdTL or AdTATMMP at 10^4 vp/cell. GFP and luciferase expression were measured three days later. A, representative GFP images. Scale bar = 200 µm. B, luciferase expression normalized to total protein levels. Results are represented as the mean ± SEM of at least 3 independent experiments. AdTATMMP fold change infection with respect of AdTL is shown above graph bars. *p < 0.05, **p < 0.01.

3.4. Ad^{RC}MMP shows significant oncolytic activity and triggers strong antitumoral response in orthotopic xenografts

To test whether the TATMMP fiber modification could provide oncolytic selectivity, we generated a replication competent adenovirus with the engineered fiber from AdTATMMP and designated this virus as Ad^{RC}MMP (Fig. 6A). Tumor cell cytotoxicity of Ad^{RC}MMP virus was first explored in vitro in HT1080, PANC-1, RWP-1, and in CAF-28 cells and compared to Adwt. The cytotoxic effect triggered by Ad^{RC}MMP virus was significantly higher than that of Adwt at all the viral doses tested in HT1080, PANC-1 and CAF-28, although less activity was detected in RWP-1 cells (Fig. 6B and C). Furthermore, the analysis of viral genomes in PANC-1 cells infected with Ad^{RC}MMP showed a significant increase of 10 and 33-fold at 3 and 5 days of viral production, respectively, when compared to Adwt. In contrast, reduced viral genomes were detected in RWP-1 cells infected with Ad^{RC}MMP (Fig. 6D). These results are in agreement with the transduction efficiency experiments shown in Fig. 2C, and with the CAR/MMP ratio. To evaluate the antitumor activity of Ad^{RC}MMP virus, PANC-1 cells engineered to express the luciferase gene (PANC-1Luc) were coinjected with CAF-28 fibroblasts in the pancreas of nude mice. Twenty-one days after cell inoculation animals received intraductally either saline, Adwt, or Ad^{RC}MMP at 5×10^{10} vp/mouse and tumor growth was monitored. Tumor progression was attenuated with both treatments for the 42 days period of the study, as shown by the tumor luciferase activity follow-up (Fig. 6E). Animals receiving Ad^{RC}MMP showed a statistically significant reduced luciferase activity when compared to Adwt treated mice.

At sacrifice, tumors were excised and primary tumors and metastatic foci were analyzed. Animals treated with Adwt or Ad^{RC}MMP showed statistically significant reduced tumor volumes compared to the saline group. In 2 out of 10 Adwt and in 3 out of 8 Ad^{RC}MMP treated mice, tumors completely regressed (Fig. 6F). Animals from all groups displayed metastatic foci in the liver and diaphragm, although in the Ad^{RC}MMP group these foci were detected only in 10% of mice. Interestingly, Ad^{RC}MMP treated mice did not show any metastasis in the lungs, whereas they were detected in 30% of Adwt-treated animals and in 90% of the saline group (Fig. 6G).

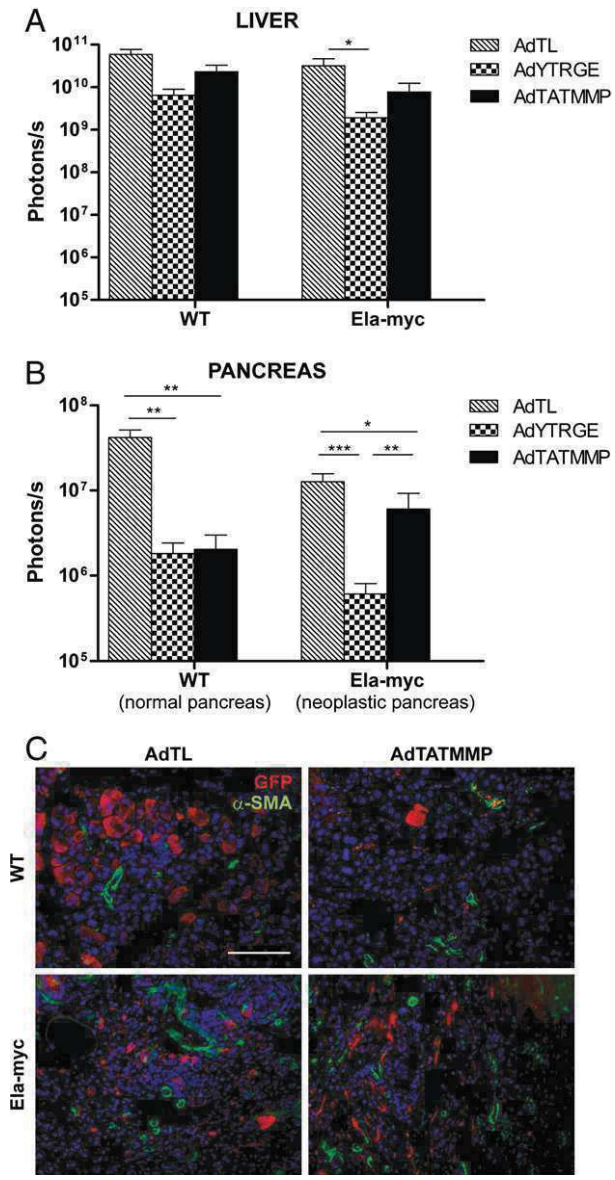


Fig. 4. AdTATMMP transduction efficiency in transgenic Ela-myc mice. A,B, 5×10^{10} vp of AdTL (n = 8), AdYTRGE (n = 6), or AdTATMMP (n = 8) were intravenously administered to Ela-myc and wt mice. Four days later, bioluminescence emission of liver and pancreas was measured. Luciferase expression was quantified from captured images and expressed as photons/s. C, representative images of GFP and α-SMA expression in pancreas of wt and Ela-myc mice intraductally injected with 5×10^{10} vp of AdTL or AdTATMMP. Scale bar = 40 µm. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001.

3.5. TATMMP-fiber modified adenovirus displays improved toxicological profile after intraductal delivery but not after systemic delivery

Since Ad^{RC}MMP intraductal delivery into mice bearing pancreatic tumors showed good antitumoral response, we sought to evaluate the toxicological profile of Ad^{RC}MMP in immunocompetent mice. As an indication of the pancreatic toxicity we analyzed the activity of the pancreatic enzymes amylase and lipase in serum of saline, Adwt, and Ad^{RC}MMP treated mice. A significant increase in both amylase and lipase

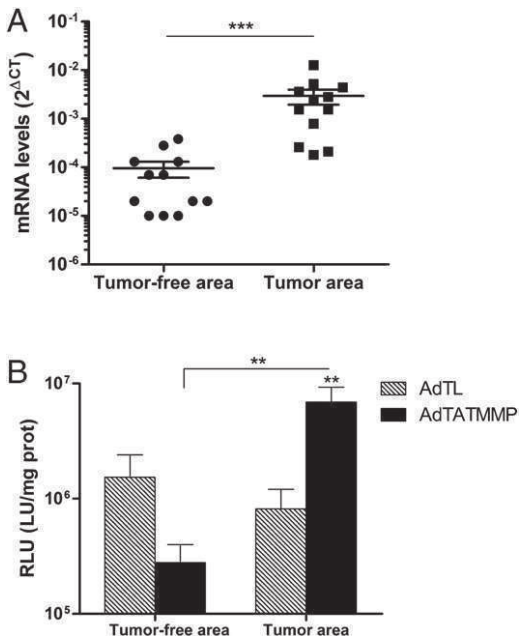


Fig. 5. AdTATMMP transduction efficiency in mixed orthotopic pancreatic tumors. A total of 3.5×10^5 PANC-1 plus CAF-25 cells (ratio 10:1) were orthotopically injected into the pancreas of nude mice. When tumors achieved a mean volume of 100 mm^3, animals were randomized and injected intraductally with 5×10^{10} vp of AdTL (n = 6) or AdTATMMP (n = 6). Animals were sacrificed four days later, the pancreas was obtained, and tumor areas were isolated from tumor-free areas. A, RT-qPCR expression of MMP-2 from tumor-free areas and PANC-1/CAF-25 tumors. B, luciferase activity in tissue extracts from tumor-free and tumor areas. *$p < 0.05$,** $p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

was observed upon Adwt administration. In contrast, Ad^{RC}MMP showed pancreatic enzyme levels similar to saline treated mice (Fig. 7A). These data indicated that the intraductal delivery of Ad^{RC}MMP showed a good safety profile. These results are in line with the reduced transduction efficiency of non-tumoral pancreas by AdTATMMP after intraductal delivery (Fig. 4C and 5B).

To explore for the potential benefits of systemic delivery of TATMMP-fiber modified viruses and to discard their potential to accumulate in specific organs triggering undesired toxicities, we performed biodistribution studies with AdTL, AdYTRGE, and AdTATMMP reporter adenoviruses, and analyzed luciferase activity in a battery of organs. No preference for any organ by AdTATMMP was observed. In fact, AdYTRGE and AdTATMMP showed significantly decreased luciferase activity in liver and spleen, and a tendency to reduced levels in heart and lung. However similar transduction efficiency with all three viruses was observed in muscle

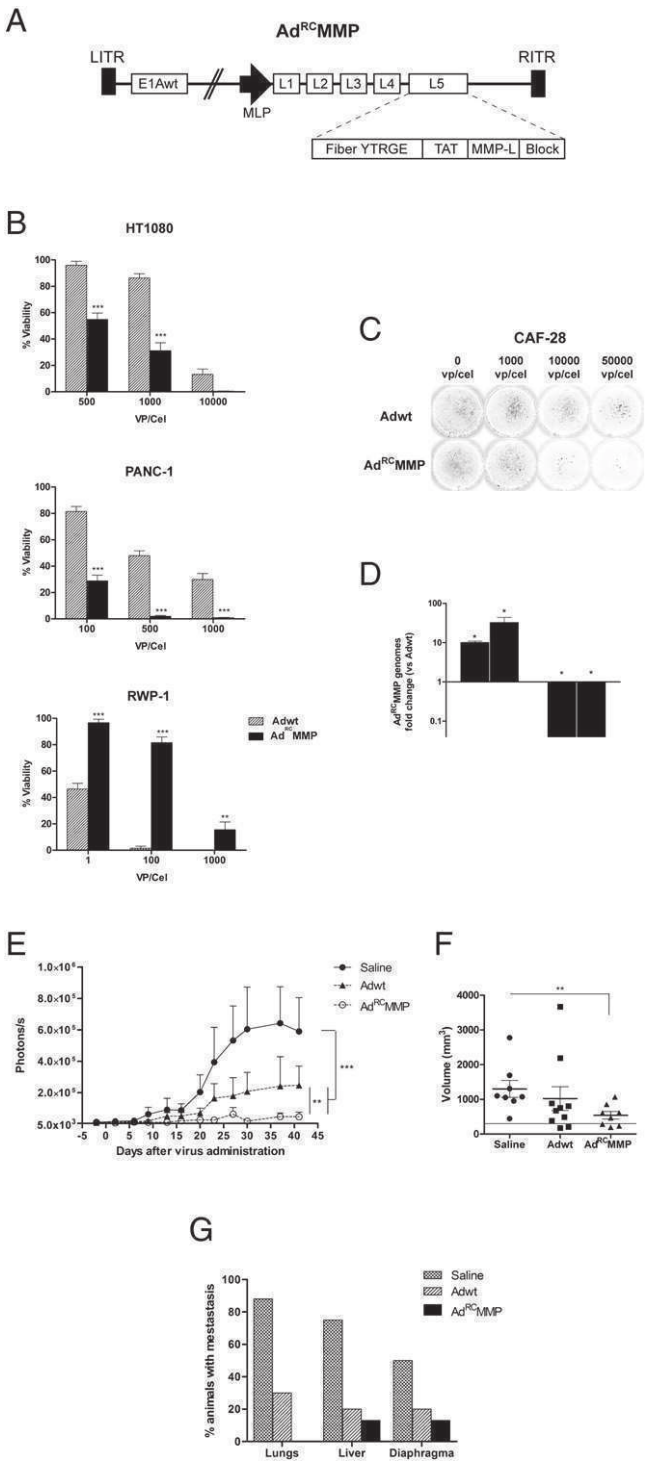


Fig. 6 Oncolytic effects of Ad^{RC}MMP in vitro and in PANC-1/CAF-28 tumor-bearing mice. A, schematic representation of Ad^{RC}MMP. B, a total of 3×10^3 cells were seeded in triplicate in a 96-well plate and infected with either Adwt or Ad^{RC}MMP at the indicated doses. Cell viability was measured 5 days later by an MTT assay. Results are represented as the mean ±SEM of at least 3 independent experiments. C, a total of 10^3 CAF-28 cells were seeded and infected as in A. Cell viability was measured 5 days later by methylene blue staining. D, PANC-1 and RWP-1 cells were seeded at 40,000 cells per well in duplicate in 24-well plates and infected with either Adwt or Ad^{RC}MMP at 50 vp/cell in the absence of FBS. Genomic DNA was extracted at 3 and 5 days post-infection and viral yield determined by qPCR. Results are represented as the mean ± SEM of at least 3 independent experiments. E–G, PANC-1-Luc/CAF-28 orthotopic tumors were generated in nude mice. Animals were randomized and intraductally injected with saline (n = 8), 5×10^{10} vp of Adwt(n = 10) or Ad^{RC}MMP (n = 8), 21 days after cell injection. Tumor growth was monitored by in vivo luciferase emission. Animals were sacrificed 42 days after virus administration. E, luciferase quantification of bioluminescent emission images from saline, Adwt, and Ad^{RC}MMP treated mice. Results are expressed as photons/s. F, pancreatic volume at animal sacrifice, the line corresponds to the pancreatic volume of wt mice. G, presence of lung, liver, and diaphragm metastasis at sacrifice. *$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$.

and kidney (Fig. 7B). Despite a reduction in liver uptake this was not sufficient to completely abrogate the liver damage triggered by viral-driven gene expression, in this case mainly due to the reporter luciferase, since serum ALT and AST were significantly increased in AdTL, AdYTRGE and AdTATMMP treated groups with respect to saline treated mice (Fig. 7C).

4. Discussion

PDAC remains a neoplasia highly refractory to conventional treatments [24]. Although some clinical improvement has been achieved with FOLFIRINOX [25] and more recently with the combination of nab-paclitaxel and gemcitabine [26], there is a need for more effective therapeutic approaches.

Oncolytic virotherapy is a promising anticancer therapy. Nevertheless, limited results from clinical trials indicate a need for improvement. One of the obstacles of adenovirus virotherapy with the most commonly used adenovirus type 5 is that the transduction of tumor cells is limited because CAR expression is often lost in neoplastic cells during tumorigenesis. Another hurdle of virotherapy is that CAFs, the major cell type in the tumor stromal compartment, are resistant to adenovirus infection. Adenoviruses modified with TAT peptides to broaden tropism have shown high transduction efficiency and enhanced therapeutic effects. However combination with other targeting strategies, such as the use of tumor-specific promoters driving viral genes, was needed to achieve tumor selectivity [27]. The insertion of peptide ligands into the HI loop or at the C-terminus of the Ad5 fiber has resulted in an enhanced infectivity, as in the case of the RGD peptide insertion [4]. However, structural constrains have often limited the success of some fiber modifications [28].

In the present study we have modified the tropism of replication competent adenovirus type 5 in a tumor-selective approach, by the modification of the adenovirus fiber. We engineered the C-terminal end of the adenoviral fiber with a TAT-like peptide sequence followed by a metalloprotease cleavable linker and a glutamic stretch. This was performed in a mutated adenoviral fiber background that was CAR and FIX binding ablated. We hypothesized that the TAT-like peptide will increase cell transduction, as previously reported [3,5] and the MMP-linker-blocking system will confer tumor selectivity. We speculated that the glutamic stretch would block the positively charged TAT-peptide, limiting its activity. Upon protease cleavage, the glutamic stretch would be released from the viral particles and the TAT-peptide would be exposed and fully active. Such a blocking strategy is novel, although polyanionic peptides inhibiting the entry of closely opposed cell penetrating peptides have been previously developed and they have shown that if the inhibitory moiety diffuses away, the activity is restored [29].

The success of our strategy requires the cleavage of the adenoviral fiber by MMP to expose the TAT-like peptide that facilitates viral entry. Our data shows that upon incubation of AdTATMMP with metalloproteases, viral transduction efficiency was increased in a dose-dependent manner, suggesting that MMP cleavage was successful exposing the TAT-like peptide and triggering viral entry. The concept of MMP-dependent virus activation has been successfully tested in enveloped viruses whose natural transduction process often requires cleavage of surface glycoproteins by intracellular proteases [12,30,31]. To our knowledge, the current work is the first report demonstrating that MMP-dependent virus transduction is compatible with genomic fiber modification, facilitating the development of entry-targeted adenoviruses.

AdTATMMP rescued the control CAR-ablated virus (AdYTRGE) infectivity in all the cancer cells tested, and significantly enhanced transduction of cell lines refractory to adenovirus infection (compared to the wild-type fiber AdTL). CAFs and PSCs from the tumor microenvironment showed higher transduction with AdTATMMP than with the CAR-binding AdTL virus. This was not surprising since in CAF cells MMP-2 and MMP-9 were highly expressed, in line with data reporting that

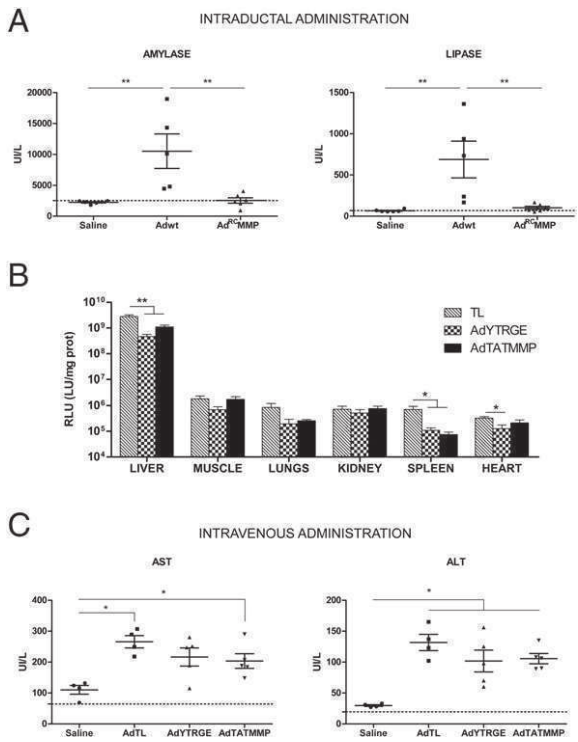


Fig. 7. Biodistribution and toxicity assays of TATMMP-fiber modified adenovirus. A. Saline (n = 6) or 5×10^{10} vp of Adwt (n = 5) or $Ad^{RC}MMP$ (n = 6) were intraductally administered to wt C57BL/6 mice. Animals were sacrificed four days later and blood samples were obtained. Serum amylase and lipase were determined for pancreatic toxicity assessment. B–C. Saline (n = 4) or 5×10^{10}vp of AdTL (n = 4), AdYTRGE (n = 5) or AdTATMMP (n = 5) were intravenously administered to wt C57BL/6 mice. Animals were sacrificed four days later and blood and organ samples were obtained for posterior analysis. B, Luciferase activity in tissue extracts from isolated organs. C, serum AST and ALT levels. Dashed lines correspond to the reference values for C57BL/6 mice.*$p < 0.05$, **$p < 0.01$.

pancreatic tumors are highly enriched in MMPs, with MMP-2 and MMP-9 among the most abundant proteases in PDAC [32]. Moreover, the AKGLYK linker in AdTATMMP may also serve as a substrate for other proteases also contributing to the selective infectivity [33]. The possibility that adenoviruses could efficiently act on cells from the tumor microenvironment may be crucial to improve virotherapy-based treatments, and of special relevance in pancreatic cancer since these tumors present extensive desmoplasia with high content of CAFs and PSCs [34]. We show that AdTATMMP transduces tumors 9-fold more efficiently than AdTL in a mouse model generated by the co-inoculation of tumor cells and CAFs. This was a highly aggressive model where CAFs promote pancreatic tumor growth or tumor initiation, since PANC-1 + CAF tumors had larger volumes than PANC-1 tumors. In fact, there are compelling evidences that tumor microenvironment is an important regulator of tumor growth, tumor initiation, and metastasis [35]. Moreover, the contribution of CAFs to tumorigenesis has also been described for breast tumors [36]. In the PANC-1 + CAF-25 mixed model, MMP expression was high in the tumors what triggered efficient activation of AdTATMMP thus facilitating tumor transduction.

AdTATMMP showed strong tumor selectivity in vivo, since low transduction of the pancreas of wt animals was observed when it was delivered intravascularly or through a locoregional route. AdTATMMP pancreatic transduction was similar to AdYTRGE and 60 times less than that of AdTL in wt mice. Of note, in pancreatic tumors from transgenic Ela-myc mice, AdTATMMP showed increased transduction whereas AdYTRGE and AdTL virus displayed reduced activity than in wt animals. This AdTL and AdYTRGE in vivo reduced tumor transduction could be

the consequence of an impaired viral spreading in tumors. Although such impairment would affect all viruses, the tumor MMP activation of AdTATMMP might compensate for it and result in increased AdTATMMP tumor transduction. This tumor-transduction selectivity was also observed in the PANC-1 + CAF mixed model, in which AdTATMMP showed 25-fold enhanced transduction in tumor versus non-tumor areas of the pancreas, while AdTL showed a tendency to display less activity in tumors than in non-tumor areas.

Intravascular delivery showed some degree of liver detargeting, but this was not sufficient to ameliorate liver damage. Although AdTATMMP contains mutations that blocked FIX binding in the blood, this was insufficient, since major hepatic infection would be mediated by interactions between hexon viral protein with the blood coagulation factor X [37] and with the scavenger receptor in Kupffer cells [38]. Further improvement of AdTATMMP detargeting might be obtained by introducing genetic modifications to ablate FX binding in the capsid hexon protein [39] and by the strategies aimed at blocking scavenger receptor adenovirus interaction [40].

The fiber modifications in AdTATMMP, when introduced into a replication-competent virus, Ad^{RC}MMP, confer an increased lytic activity, superior to that of Adwt in cancer and CAF cells, in line with its enhanced transduction efficiency. Accordingly, a superior in vivo therapeutic activity was observed with Ad^{RC}MMP when compared to Adwt in orthotopic xenografts derived from the mixed PANC-1 + CAF model. Antitumor activity, as well as reduced number of metastatic foci, was observed in Ad^{RC}MMP animals showing the beneficial outcomes of the treatment. Interestingly, a good toxicological profile with Ad^{RC}MMP was obtained when administered intraductally.

In conclusion we present a novel adenoviral tumor targeting approach that improves oncolytic antitumor response in pancreatic cancer models that may be attractive for clinical adenoviral virotherapy against PDAC.

Supplementary data to this article can be found online at http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.07.008.

Acknowledgments

We are indebted to the Biobank unit of the IDIBAPS for technical help. This work was supported by grants from MINECO, Spain BIO2011-30299-C02-01/02. CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. CF group is partially financed by the Instituto de Salud Carlos III (IIS10/00014) and co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and receives partial support from the Generalitat de Catalunya SGR091527. AJ was recipient of a FPU fellowship from the Spanish Ministry of Education. MR is recipient of a FPI fellowship from MINECO. This work was developed at the Centro Esther Koplowitz, Barcelona, Spain.

References

[1] E. Brouwer, M.J. Havenga, O. Ophorst, B. de Leeuw, L. Gijsbers, G. Gillissen, R.C. Hoeben, M. ter Horst, D. Nanda, C. Dirven, C.J. Avezaat, J. Goudsmit, P. Sillevis Smitt, Human adenovirus type 35 vector for gene therapy of brain cancer: improved transduction and bypass of pre-existing anti-vector immunity in cancer patients, Cancer Gene Ther. 14 (2007) 211–219.
[2] I. Dmitriev, V. Krasnykh, C.R. Miller, M. Wang, E. Kashentseva, G. Mikheeva, N. Belousova, D.T. Curiel, An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism, J. Virol. 72 (1998) 9706–9713.
[3] S. Kurachi, K. Tashiro, F. Sakurai, H. Sakurai, K. Kawabata, K. Yayama, H. Okamoto, S. Nakagawa, H. Mizuguchi, Fiber-modified adenovirus vectors containing the TAT peptide derived from HIV-1 in the fiber knob have efficient gene transfer activity, Gene Ther. 14 (2007) 1160–1165.
[4] K. Suzuki, J. Fueyo, V. Krasnykh, P.N. Reynolds, D.T. Curiel, R. Alemany, A conditionally replicative adenovirus with enhanced infectivity shows improved oncolytic potency, Clin. Cancer Res. 7 (2001) 120–126.
[5] D. Yu, C. Jin, J. Leja, N. Majdalani, B. Nilsson, F. Eriksson, M. Essand, Adenovirus with hexon Tat-protein transduction domain modification exhibits increased therapeutic effect in experimental neuroblastoma and neuroendocrine tumors, J. Virol. 85 (2011) 13114–13123.
[6] M. Huch, D. Abate-Daga, J.M. Roig, J.R. Gonzalez, J. Fabregat, B. Sosnowski, A. Mazo, C. Fillat, Targeting the CYP2B 1/cyclophosphamide suicide system to fibroblast growth factor receptors results in a potent antitumoral response in pancreatic cancer models, Hum. Gene Ther. 17 (2006) 1187–1200.
[7] J. Morrison, S.S. Briggs, N.K. Green, C. Thoma, K.D. Fisher, S. Kehoe, L.W. Seymour, Cetuximab retargeting of adenovirus via the epidermal growth factor receptor for treatment of intraperitoneal ovarian cancer, Hum. Gene Ther. 20 (2009) 239–251.
[8] Y. Yoshioka, R. Asavatanabodee, Y. Eto, H. Watanabe, T. Morishige, X. Yao, S. Kida, M. Maeda, Y. Mukai, H. Mizuguchi, K. Kawasaki, N. Okada, S. Nakagawa, Tat conjugation of adenovirus vector broadens tropism and enhances transduction efficiency, Life Sci. 83 (2008) 747–755.
[9] F.J. Morling, K.W. Peng, F.L. Cosset, S.J. Russell, Masking of retroviral envelope functions by oligomerizing polypeptide adaptors, Virology 234 (1997) 51–61.
[10] K.W. Peng, R. Vile, F.L. Cosset, S. Russell, Selective transduction of protease-rich tumors by matrix-metalloproteinase-targeted retroviral vectors, Gene Ther. 6 (1999) 1552–1557.
[11] H. Kinoh, M. Inoue, K. Washizawa, T. Yamamoto, S. Fujikawa, Y. Tokusumi, A. Iida, Y. Nagai, M. Hasegawa, Generation of a recombinant Sendai virus that is selectively activated and lyses human tumor cells expressing matrix metalloproteinases, Gene Ther. 11 (2004) 1137–1145.
[12] C. Springfeld, V. von Messling, M. Frenzke, G. Ungerechts, C.J. Buchholz, R. Cattaneo, Oncolytic efficacy and enhanced safety of measles virus activated by tumor-secreted matrix metalloproteinases, Cancer Res. 66 (2006) 7694–7700.
[13] L. Garcia-Rodriguez, S. Perez-Torras, M. Carrio, A. Cascante, I. Garcia-Ribas, A. Mazo, C. Fillat, Connexin-26 is a key factor mediating gemcitabine bystander effect, Mol. Cancer Ther. 10 (2011) 505–517.
[14] R. Alemany, D.T. Curiel, CAR-binding ablation does not change biodistribution and toxicity of adenoviral vectors, Gene Ther. 8 (2001) 1347–1353.
[15] M. Gimenez-Alejandre, A. Gros, R. Alemany, Construction of capsid-modified adenoviruses by recombination in yeast and purification by iodixanol-gradient, Methods Mol. Biol. 797 (2012) 21–34.
[16] A. Jose, L. Sobrevals, J. Miguel Camacho-Sanchez, M. Huch, N. Andreu, E. Ayuso, P. Navarro, R. Alemany, C. Fillat, Intraductal delivery of adenoviruses targets pancreatic tumors in transgenic Ela-myc mice and orthotopic xenografts, Oncotarget 4 (2013) 94–105.
[17] A. Jose, L. Sobrevals, A. Ivorra, C. Fillat, Irreversible electroporation shows efficacy against pancreatic carcinoma without systemic toxicity in mouse models, Cancer Lett. 317 (2012) 16–23.
[18] M. Alieva, J.R. Bago, E. Aguilar, C. Soler-Botija, O.F. Vila, J. Molet, S.S. Gambhir, N. Rubio, J. Blanco, Glioblastoma therapy with cytotoxic mesenchymal stromal cells optimized by bioluminescence imaging of tumor and therapeutic cell response, PLoS One 7 (2012) e35148.
[19] M. Huch, A. Gros, A. Jose, J.R. Gonzalez, R. Alemany, C. Fillat, Urokinase-type plasminogen activator receptor transcriptionally controlled adenoviruses eradicate pancreatic tumors and liver metastasis in mouse models, Neoplasia 11 (2009) 518–528.
[20] D.M. Shayakhmetov, A. Gaggar, S. Ni, Z.Y. Li, A. Lieber, Adenovirus binding to blood factors results in liver cell infection and hepatotoxicity, J. Virol. 79 (2005) 7478–7491.
[21] M. Korc, Pancreatic cancer-associated stroma production, Am. J. Surg. 194 (2007) S84–S86.
[22] C. Puig-Saus, A. Gros, R. Alemany, M. Cascallo, Adenovirus i-leader truncation bioselected against cancer-associated fibroblasts to overcome tumor stromal barriers, Mol. Ther. 20 (2012) 54–62.
[23] J.A. Parrott, E. Nilsson, R. Mosher, G. Magrane, D. Albertson, D. Pinkel, J.W. Gray, M.K. Skinner, Stromal–epithelial interactions in the progression of ovarian cancer: influence and source of tumor stromal cells, Mol. Cell. Endocrinol. 175 (2001) 29–39.
[24] J. Werner, S.E. Combs, C. Springfeld, W. Hartwig, T. Hackert, M.W. Buchler, Advanced-stage pancreatic cancer: therapy options, Nat. Rev. Clin. Oncol. 10 (2013) 323–333.
[25] T. Conroy, F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouche, R. Guimbaud, Y. Becouarn, A. Adenis, J. L. Raoul, S. Gourgou-Bourgade, C. de la Fouchardiere, J. Bennouna, J.B. Bachet, F. Khemissa-Akouz, D. Pere-Verge, C. Delbaldo, E. Assenat, B. Chauffert, P. Michel, C. Montoto-Grillot, M. Ducreux, U. Groupe Tumeurs Digestives of Unicancer; PRODIGE Intergroup, FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer, N. Engl. J. Med. 364 (2011) (1817–1825).
[26] W.W. Ma, M. Hidalgo, The winning formulation: the development of paclitaxel in pancreatic cancer, Clin. Cancer Res. 19 (2013) 5572–5579.
[27] C. Jin, D. Yu, M. Cancer, B. Nilsson, J. Leja, M. Essand, Tat-PTD-modified oncolytic adenovirus driven by the SCG3 promoter and ASH1 enhancer for neuroblastoma therapy, Hum. Gene Ther. 24 (2013) 766–775.
[28] J.N. Glasgow, M. Everts, D.T. Curiel, Transductional targeting of adenovirus vectors for gene therapy, Cancer Gene Ther. 13 (2006) 830–844.
[29] T. Jiang, E.S. Olson, Q.T. Nguyen, M. Roy, P.A. Jennings, R.Y. Tsien, Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101 (2004) 17867–17872.
[30] G. Neumann, T.W. Geisbert, H. Ebihara, J.B. Geisbert, K.M. Daddario-DiCaprio, H. Feldmann, Y. Kawaoka, Proteolytic processing of the Ebola virus glycoprotein is not critical for Ebola virus replication in nonhuman primates, J. Virol. 81 (2007) 2995–2998.
[31] J. Szecsi, R. Drury, V. Josserand, M.P. Grange, B. Boson, I. Hartl, R. Schneider, C.J. Buchholz, J.L. Coll, S.J. Russell, F.L. Cosset, E. Verhoeyen, Targeted retroviral vectors displaying a cleavage site-engineered hemagglutinin (HA) through HA-protease interactions, Mol. Ther. 14 (2006) 735–744.
[32] K. Gardian, S. Janczewska, M. Durlik, Microenvironment elements involved in the development of pancreatic cancer tumor, Gastroenterol. Res. Pract. 2012 (2012) 585674.
[33] I. Hartl, R.M. Schneider, Y. Sun, J. Medvedovska, M.P. Chadwick, S.J. Russell, K. Cichutek, C.J. Buchholz, Library-based selection of retroviruses selectively spreading through matrix metalloprotease-positive cells, Gene Ther. 12 (2005) 918–926.

[34] J. Tod, V. Jenei, G. Thomas, D. Fine, Tumor-stromal interactions in pancreatic cancer, Pancreatology 13 (2013) 1–7.
[35] A. Ostman, The tumor microenvironment controls drug sensitivity, Nat. Med. 18 (2012) 1332–1334.
[36] S.W. Tyan, W.H. Kuo, C.K. Huang, C.C. Pan, J.Y. Shew, K.J. Chang, E.Y. Lee, W.H. Lee, Breast cancer cells induce cancer-associated fibroblasts to secrete hepatocyte growth factor to enhance breast tumorigenesis, PLoS One 6 (2011) e15313.
[37] S.N. Waddington, J.H. McVey, D. Bhella, A.L. Parker, K. Barker, H. Atoda, R. Pink, S.M. Buckley, J.A. Greig, L. Denby, J. Custers, T. Morita, I.M. Francischetti, R.Q. Monteiro, D. H. Barouch, N. van Rooijen, C. Napoli, M.J. Havenga, S.A. Nicklin, A.H. Baker, Adenovirus serotype 5 hexon mediates liver gene transfer, Cell 132 (2008) 397–409.
[38] R. Khare, V.S. Reddy, G.R. Nemerow, M.A. Barry, Identification of adenovirus serotype 5 hexon regions that interact with scavenger receptors, J. Virol. 86 (2012) 2293–2301.
[39] E.V. Shashkova, S.M. May, K. Doronin, M.A. Barry, Expanded anticancer therapeutic window of hexon-modified oncolytic adenovirus, Mol. Ther. 17 (2009) 2121–2130.
[40] H.J. Haisma, J.A. Kamps, G.K. Kamps, J.A. Plantinga, M.G. Rots, A.R. Bellu, Polyinosinic acid enhances delivery of adenovirus vectors in vivo by preventing sequestration in liver macrophages, J. Gen. Virol. 89 (2008) 1097–1105.

nature COMMUNICATIONS

ARTICLE

Received 21 Oct 2015 | Accepted 2 Feb 2017 | Published 16 Mar 2017

DOI: 10.1038/ncomms14833 OPEN

Translational reprogramming in tumour cells can generate oncoselectivity in viral therapies

Eneko Villanueva[1], Pilar Navarro[2], Maria Rovira-Rigau[1,3], Annarita Sibilio[4], Raúl Méndez[4,5] & Cristina Fillat[1,3]

Systemic treatment of cancer requires tumour-selective therapies that eliminate cancer cells yet preserve healthy tissues from undesired damage. Tumoral transformation is associated with profound effects in translational reprogramming of gene expression, such that tumour-specific translational regulation presents an attractive possibility for generating oncoselective therapies. We recently discovered that mRNA translational control by cytoplasmic polyadenylation element-binding proteins (CPEBs) is reactivated in cancer. Here we present a novel approach to restrict genetic-engineered therapies to malignant tissues based on CPEB translational regulation of target mRNAs. We demonstrate that tumour reprogramming of CPEB-mediated mRNA stability and translational regulation modulates tumour-specific expression of viral proteins. For oncolytic adenoviruses, insertion of CPE regulatory sequences in the 3′-untranslated region of the *E1A* gene provides oncoselectivity, with full potency in cancer cells but attenuated in normal tissues. Our results demonstrate the potential of this strategy to improve oncolytic virus design and provide a framework for exploiting CPE-regulated transgenes for therapy.

[1] Gene Therapy and Cancer, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Rosselló 149-153, 08036 Barcelona, Spain. [2] Cancer Research Program, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Dr Aiguader 88, 08003 Barcelona, Spain. [3] Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), 08036 Barcelona, Spain. [4] Institute for Research in Biomedicine (IRB Barcelona), The Barcelona Institute of Science and Technology, Baldiri Reixac, 10, 08028 Barcelona, Spain. [5] Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), 08010 Barcelona, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to C.F. (email: cfillat@clinic.ub.es) or to R.M. (email: raul.mendez@irbbarcelona.org).

Regulation of transgene and viral protein expression is required to increase the safety and efficacy of gene and viral therapies. Delivery and expression of transgenes with anticancer activity, or the use of conditionally replicating viruses for cancer therapy, must be specific for tumours to avoid side effects to healthy tissues. Most efforts to achieve such selective control have been based on the use of tumour-specific promoters[1] and, more recently, by the engineering of target site-recognizing, tissue-specific microRNA (miRNA)[2–6]. Although both strategies contribute highly to tumour selectivity, it has become evident that the post-transcriptional regulation of specific mRNA subpopulations contributes substantially to the broad expression changes of genes responsible for the cancer phenotype[7]. Thus, the translational reprogramming of tumour cells has been proposed as a potential target for tumour-specific drugs[8]. These tumour-specific translational profiles could therefore be used to generate tumour specificity to transgene and viral protein expression.

One of the mechanisms to regulate the translation of specific subpopulations of mRNAs is through the presence of *cis*-acting elements in the 3′-untranslated region (3′-UTRs) of mRNAs, such as the cytoplasmic polyadenylation element (CPE; 5′-UUUUA$_{1-2}$U-3′). The CPE is bound by CPE-binding proteins (CPEBs), a family of four members conserved in their RNA-recognition domain but distinct in their regulatory motifs (reviewed in refs 9,10). All four CPEBs recognize RNA via tandem RNA recognition motifs located in their C-terminal halves that are followed by ZZ domains[11]. The RNA recognition motifs define two CPEB subfamilies (CPEB1 and CPEB2–4). Both CPEB subfamilies regulate overlapping populations of mRNAs and recognize similar *cis*-acting elements, albeit with different affinities[12–15]. The N-terminal domain is highly variable in both length and composition across various CPEB orthologues and paralogues[16] and contains all the identified regulatory motifs, including phosphorylations[17,18], monoubiquitination[15] and sumoylation[19]. These post-translational modifications dictate whether CPEBs act as translational repressors or promote cytoplasmic polyadenylation and subsequent translational activation (reviewed in refs 9,10). In turn, the specific arrangement of CPEs, in number and in their relative position to other CPEs and the polyadenylation signal[20], together with the presence of additional *cis*-acting elements such as AU-rich elements (AREs)[21], quantitatively determine whether a particular mRNA is repressed or activated in a combinatorial code that responds to the activation of specific CPEBs[12]. Although CPEBs have been mainly characterized as regulators of maternal mRNAs during the transcriptionally silent germ cells, they also regulate cytoplasmic polyadenylation in somatic and tumoral cells[13,22–25]. In fact, CPEBs are extremely conserved within vertebrates (96% for CPEB1 and 99% for CPEB4), the CPEs and the CPE-combinatorial code are conserved and functionally replaceable from frogs to mammals and promote translational repression and activation in rodents and humans[13,21,26,27]. CPEB levels and activities are differentially regulated in tumours[9,28]. CPEB1 levels are decreased in several human cancers[29,30], and reduced levels of this protein have been associated with increased malignancy both in human[29] and mouse[23]. In contrast, high CPEB4 expression levels in pancreatic ductal adenocarcinoma and glioblastoma tumours correlated with stimulation of tumour growth, angiogenesis and decreased survival[14]. Furthermore, CPEB4 has been identified as one of the seven genes with an expression profile that is associated with colorectal cancer[31].

Here we show the feasibility of using the tumoral reprogramming of CPE-mediated translational regulation to provide tumour selectivity to transgene expression. We have engineered a particular CPE arrangement that activates translation in tumour cells while promoting translational repression in non-transformed cells. We then generated a modified adenovirus in which the E1A protein expression is regulated by CPEBs, to obtain oncoselectivity and attenuated toxicity in non-transformed tissues. This novel targeting modality increases the therapeutic index of an oncolytic adenovirus and provides a new paradigm for its applicability to gene transfer-based therapeutic approaches.

Results

CPEs provide oncoselectivity to replicative adenoviruses. To identify the optimal sequences required for CPEB-dependent tumour selectivity, we tested chimeric mRNAs with three combinations of 3′-UTRs fused to the d2EGFP open reading frame. These mRNAs were expressed in a battery of normal (HPDE) and tumour (RWP-1, PANC-1 and MIA PaCa-2) pancreatic cells expressing variable levels of CPEB1 and CPEB4 (Fig. 1a). The first UTR was derived from *Xenopus* cyclin B1 (cB1) 3′-UTR mRNA and contained two consensus CPEs and one nonconsensus CPE. This CPE arrangement promotes both translational repression by unphosphorylated CPEB1 and translational activation by CPEB4[12,13,20]. The second UTR was synthetized by combining cB1 CPEs with an ARE sequence that opposes CPE-mediated polyadenylation and translational activation from the tumour-necrosis factor-α (TNF-α) 3′-UTR mRNA (TNF-α-cB1). The third UTR was generated from a fragment of the tissue plasminogen activator (tPA) 3′-UTR mRNA that contains two CPEs and two ARE sequences[14]. (Fig. 1b and Supplementary Table 1).

Lentiviruses expressing the d2EGFP with the indicated 3′-UTRs or a control wild-type (WT)-3′-UTR (without CPEs) and a lentivirus with a destabilized dRFP bearing a control 3′-UTR (WT) were used to coinfect the non-tumour HPDE cells and the pancreatic cancer cell lines (Supplementary Fig. 1a). For each combination of UTR and cell line, the resulting d2EGFP-to-dRFP expression ratio indicated that cB1 was the only 3′-UTR promoting a differential translational control in normal cells compared to cancer cells. Thus, cB1-3′-UTR repressed the expression of d2EGFP in HPDE cells as compared to the dRFP control 3′-UTR, whereas it promoted activation in the cancer cells, with a stronger effect in PANC-1 (Fig. 1c). Interestingly, for the four cell lines, the d2EGFP/dRFP ratio was proportional to the CPEB4/CPEB1 ratio (Fig. 1a). As expected from the role that the poly(A) tail has on mRNA stability, reduced mRNA levels of d2EGFP-cB1-3′-UTR were detected in HPDE cells as compared to tumour cells (Supplementary Fig. 1b). On the other hand, the two 3′-UTRs with ARE sequences led to reduced d2EGFP expression in all the cell lines, indicating that the destabilization effect of the ARE dominates over the effects of CPE regulation (Fig. 1c).

Next, we took advantage of the specific regulation promoted by the cB1-3′-UTR to generate an oncoselective replication-competent adenovirus Ad5. For this, we targeted viral replication by designing a virus in which the translation of E1A mRNA was regulated by CPEBs. The adenoviral immediate-early *E1A* gene was selected because it is the first gene transcribed after an adenoviral infection and thus acts as a master transcriptional regulator of further early viral genes and modifies several cell host functions required for viral DNA replication. We then replaced the WT-3′-UTR of the viral E1A coding sequence with the cB1-3′-UTR to give us AdCPE (Fig. 2a). Substitution of *E1A* WT-3′-UTR by cB1-3′-UTR had no effect on the transcription of this gene, as shown by the equal levels of pre-mRNA for both 3′-UTRs in normal and cancer cell lines (Fig. 2b). However, when the steady-state levels of mature transcripts were compared, we found E1A-cB1-3′-UTR mRNA to be significantly lower in

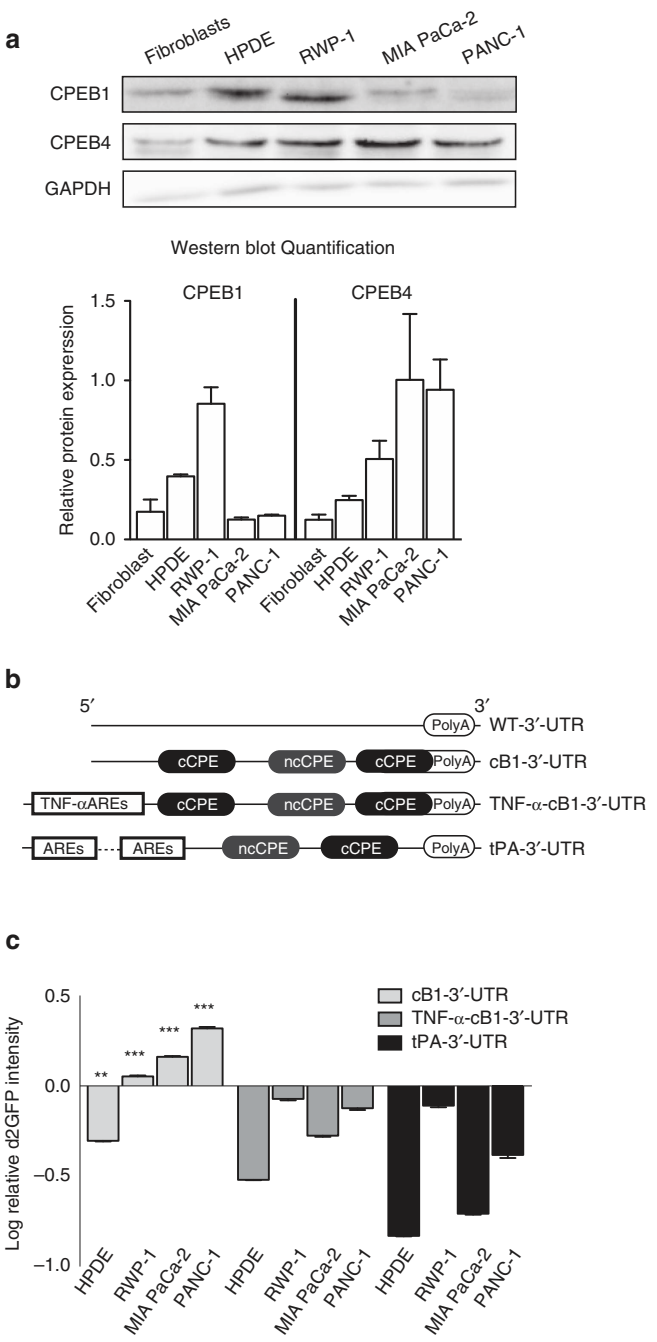


Figure 1 | CPEs containing 3′-UTR confer *in vitro* oncoselectivity to engineered transgenes. (**a**) The upper panel shows representative western blots showing CPEB1 and CPEB4 expression in pancreatic primary fibroblasts, normal cells (HPDE) and tumour cells (RWP-1, MIA PaCa-2 and PANC-1). The lower panel shows quantification of CPEB1 and CPEB4 signals normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). (**b**) Schematic representation of the assessed 3′-UTR. Regulatory sequences are indicated. (**c**) Quantification of relative d2EGFP/dRFP fluorescence intensity levels in cell lines transduced with the indicated lentiviruses and relative to the mean intensity/content of the d2EGFP/dRFP from cells transduced with Lv-WT 3′-UTR. Data are shown as mean ± s.e.m. from three independent biological replicates and were analysed by a linear mixed model fit by REML and a Tukey's contrast test to assess the significance of the differences. $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$. cCPE, consensus CPE; ncPCE, nonconsensus CPE.

HPDE cells as compared to E1A-WT-3′-UTR mRNA as well as reduced with respect to E1A- cB1-3′-UTR mRNA in tumour cells (Fig. 2b). This suggests a specific destabilization of the mRNA-containing CPEs in the non-tumour cells. Because the destabilization of the CPE-containing c-myc mRNA in non-transformed cells has been directly associated with its cytoplasmic deadenylation[25], we measured the polyA tail length of the different E1A transcripts in the four cell lines by RNA ligation-coupled PCR with reverse transcription (RT–PCR) analysis (Fig. 2c). We found that the CPE-mediated destabilization of the E1A-cB1 mRNA in HPDE cells was associated with a shorter polyA tail (Fig. 2d), which resulted in reduced E1A protein expression from the cB1-3′-UTR mRNA as compared with the WT-3′-UTR (Fig. 2e). Accordingly, AdCPE-infected non-transformed cells (HPDE) showed a strong reduction in viral genome copy numbers (Fig. 2f) and decreased cytotoxicity (increased half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}); Fig. 2g) as compared to the control virus Adwt. The lowest performance of AdCPE was also observed in human primary fibroblasts and the non-tumoral human kidney epithelial HK-2 cells (Fig. 2e,f and Supplementary Fig. 2). However, in the tumour cells, cB1-3′-UTR was as efficient as the WT-3′-UTR in supporting optimum levels of viral-driven E1A expression (Fig. 2e), which in turn resulted in equal viral genome copy numbers and IC_{50} from both 3′-UTRs (Fig. 2f,g). CPEB-mediated control of E1A expression and viral release was also observed in AdCPE-infected colorectal and glioblastoma cells as well as in the patient-derived pancreatic tumour CP15 (Supplementary Fig. 2). The similar effects of Adwt and AdCPE in cancer cells also highlight that the small size of the cB1-3′-UTR did not compromise virus fitness and packaging efficiency.

CPE-mediated oncoselectivity is provided by CPEB4. To determine whether the higher CPEB4 levels in tumour cells caused the specificity of cB1-3′-UTR regulation of mRNA translation, we first confirmed the specificity of CPEB4 binding to the CPEs in cB1-3′-UTR. As shown by RIP, CPEB4 bound cB1-3′-UTR WT in a CPE-dependent manner. In contrast, HuR, an ARE-binding protein that promotes mRNA stabilization, displayed almost negligible binding to cB1-3′-UTR WT that was not affected by the mutations that inactivate the CPE (Supplementary Fig. 3). Then, we knocked down CPEB4 in tumoral RWP-1 cells (RWP-1-sh4) and compared it with a control non-target shRNA (RWP-1-shNT) (Fig. 3a). Depletion of CPEB4 (RWP-1-sh4) caused a significant reduction of E1A protein levels expressed from AdCPE (Fig. 3b), with the subsequent reduction of viral replication (Fig. 3c) and increased IC_{50} values (Fig. 3d). On the other hand, Adwt was unaffected by a CPEB4 knockdown (Fig. 3b–d). Similar results were observed in HCT-116 colorectal and T98 glioblastoma cells (Supplementary Fig. 4). A reverse approach, of overexpressing CPEB4 in non-tumour cells (HPDE), partially rescued the expression of E1A from AdCPE (Fig. 3e) and viral replication (Fig. 3f), as compared to Adwt. Therefore, high levels of CPEB4 seem to be required for the oncoselective behaviour of the engineered virus and to prevent the CPE-mediated translational repression observed in non-tumour cells.

Oncoselectivity of AdCPE *in vivo*. To investigate whether AdCPE provides oncolytic specificity *in vivo*, nude mice carrying subcutaneous tumours were intravenously injected with Adwt or AdCPE viral particles, and tumour growth was monitored. In consonance with the results obtained in cell culture models, we found that AdCPE produced a significant inhibition of

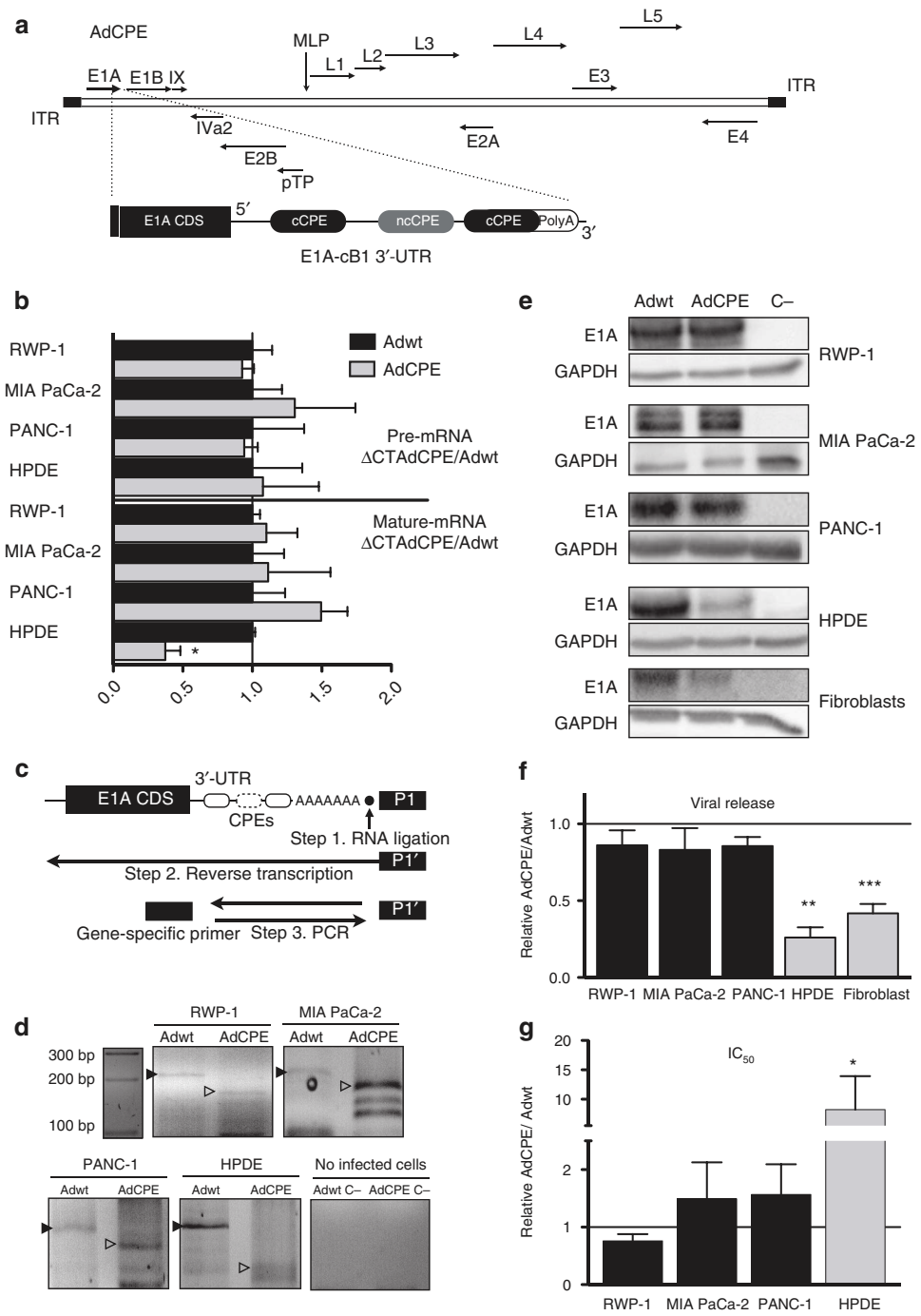


Figure 2 | CPEs in the 3′-UTR of E1A confers *in vitro* oncoselectivity to adenoviruses. (**a**) Schematic representation of the whole adenoviral genome with the CPE-engineered sites in the *E1A* viral gene. (**b**) Quantification of E1A pre-mRNA and mature mRNA 4 h postinfection in the indicated cell lines. qPCR data are shown as the mean ± s.e.m. of five independent biological replicates. $^{*}P<0.05$ (two-tailed Mann–Whitney test). (**c**) Schematic representation of the RNA ligation-coupled RT–PCR technique used to assess poly(A) tail lengths. (**d**) Polyadenylation of E1A mRNA 4 h postinfection in tumour RWP-1, PANC-1 and MIA PaCa-2 cells or in non-tumour HPDE. Retarded migration indicates longer polyadenylation. Adwt C− and AdCPE C− correspond to an RNA mix from non-infected cells amplified with specific primers for Adwt and AdCPE, respectively. (**e**) Representative E1A western blots of pancreatic tumour cells (RWP-1, MIA PaCa-2 and PANC-1) and non-tumour cells (HPDE and fibroblasts) infected with Adwt and AdCPE at 72 h postinfection. (**f**) Quantification of viral production in supernatant 72 h postinfection in tumour (RWP-1, MIA PaCa-2 and PANC-1) and non-tumour cells (HPDE and pancreatic fibroblasts) infected with Adwt and AdCPE 72 h postinfection. qPCR data are shown as mean ± s.e.m. of five independent biological replicates. $^{**}P<0.01$ and $^{***}P<0.001$ (two-tailed Mann–Whitney test). (**g**) Cytotoxicity assay in the indicated cell lines. Half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) was calculated for each cell line from dose–response curves. Data are shown as mean ± s.e.m. from five independent biological replicates. $^{*}P<0.05$ (two-tailed Mann–Whitney test).

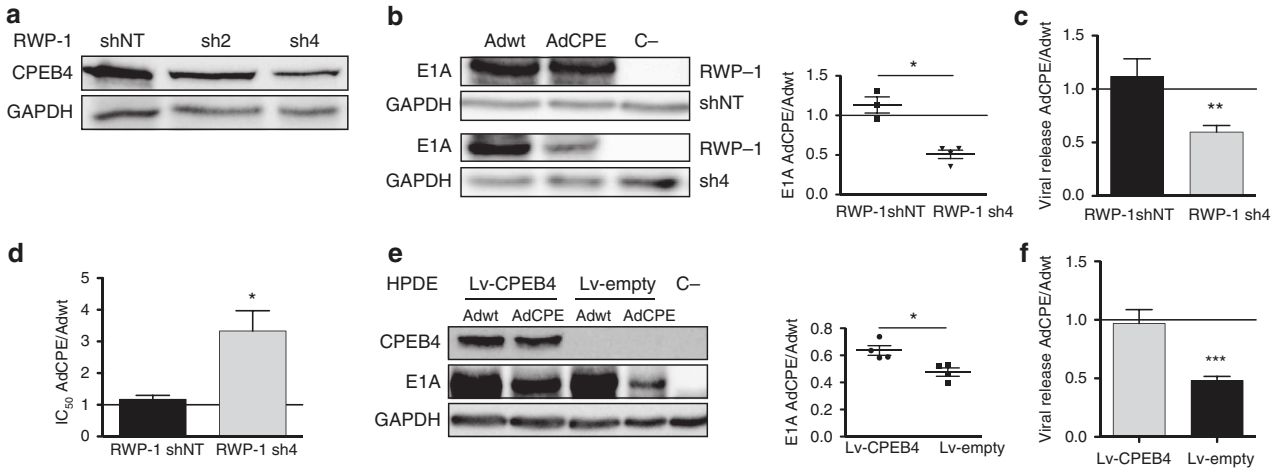


Figure 3 | CPEB4 regulates AdCPE E1A expression and viral fitness. (**a**) Representative western blot of CPEB4 protein downregulation in RWP-1 tumour cells. shNT, non-targeted; sh2 and sh4, two different sh sequences against CPEB-4. (**b**) Representative western blot of E1A expression in RWP-1 shNT and RWP-1 sh4, infected with Adwt and AdCPE 72 h postinfection. Quantification of the E1A signal was normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and expressed as relative values of AdCPE/Adwt ($n=4$). *$P<0.05$. (**c**) Quantification of relative viral production (AdCPE/Adwt) in the supernatant of sh4 and shNT RWP-1-infected cells 72 h postinfection. Data are shown as mean ± s.e.m. from five independent biological replicates. **$P<0.01$ (two-tailed Mann–Whitney test). (**d**) Cytotoxicity assay in sh4 and shNT RWP-1 cells infected with Adwt or AdCPE for 72 h. IC_{50} was calculated for each cell line from dose-response curves. Data are shown as mean ± s.e.m. from six independent biological replicates. *$P<0.05$ (two-tailed Mann–Whitney test). (**e**) The left panel shows a representative western blot of the E1A protein in non-tumour HPDE cells transduced with a lentivirus-expressing CPEB4 (Lv-CPEB4) or a control lentivirus (Lv-empty) and infected with Adwt or AdCPE. E1A content was evaluated 72 h postinfection. The right panel shows quantification of the E1A signal that was normalized to GAPDH and expressed as relative values of AdCPE/Adwt ($n=5$). *$P<0.05$. (**f**) Quantification of relative viral genome release in HPDE supernatants from cells transduced with Lv-CPEB4 or Lv-empty and infected with Ad-WT or AdCPE for 72 h. Data are shown as mean ± s.e.m. of five independent biological replicates. ***$P<0.001$ (two-tailed Mann–Whitney test).

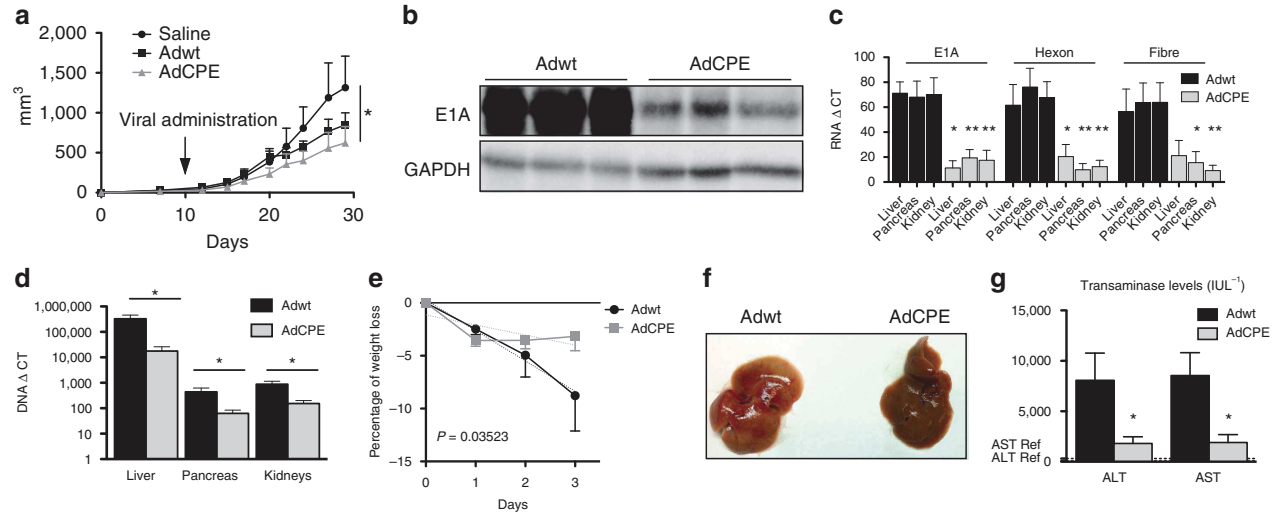


Figure 4 | AdCPE replication is attenuated in mouse tissue, displays reduced toxicity and triggers strong antitumour activity. (**a**) Follow-up of tumour volumes in mice bearing RWP-1 xenografts intravenously treated with saline ($n=8$) or with a single injection of 2×10^{10} vp per mouse Adwt ($n=8$) or of 2×10^{10} vp per mouse AdCPE ($n=8$). (**b**–**g**) Adwt and AdCPE were intravenously delivered to WT C57BL/6 mice at 2×10^{10} vp per mouse ($n=6$ per group). Three days later, animals were killed and organs were isolated. (**b**) Representative E1A western blot from livers of infected mice. (**c**) Quantification of early (E1A) and late (hexon and fibre) viral mRNA content in the liver, pancreas and kidneys of infected mice by qPCR ($n=6$). *$P<0.05$; **$P<0.01$. (**d**) Viral DNA quantification by qPCR in the indicated mice tissues. Data are shown as mean ± s.e.m. ($n=6$). *$P<0.05$. (**e**) Body weight variation of infected mice. Differences between slopes were significant ($P=0.036$). (**f**) Representative macroscopic images of livers from infected mice. (**g**) Serum transaminases AST and ALT levels ($n=6$). Normal aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in C57BL/6 mice are indicated in dashed lines and correspond to 313.5 and 69.5 IU L^{-1}, respectively.

tumour growth that was similar or greater than that of Adwt (Fig. 4a and Supplementary Fig. 5). Interestingly, at high viral doses at which Adwt compromises mice survival[32], the antitumour effect of AdCPE was very strong (Supplementary Fig. 6). While the efficiency of an equal dose of AdCPE and Adwt in targeting tumour cells was similar or even increased in AdCPE, the *in vitro* results with HPDE cells indicate that AdCPE should have a much reduced adenovirus-associated

toxicity. To test the AdCPE effects on healthy tissues *in vivo*, we intravenously injected immunocompetent mice with Adwt and AdCPE, at the same viral dose used in the xenograft experiments. Three days later, we quantified viral proteins and viral genomes in the liver, pancreas and kidney. E1A protein levels were significantly reduced in the liver of AdCPE-treated mice, as compared to Adwt (Fig. 4b). Quantification of mRNA of E1A, hexon and fibre in the liver, pancreas and kidney revealed significantly reduced levels of the three mRNAs in AdCPE-injected mice as compared to Adwt (Fig. 4c). Consistent with *in vitro* data, E1A pre-mRNA levels in liver extracts from AdCPE and Adwt were similar, whereas the mature mRNA was reduced in AdCPE mice (Supplementary Fig. 7a). These results indicate that the CPE-dependent destabilization of viral mRNA is recapitulated *in vivo*. Despite the impairment of human Ad5 to productively replicate in mice, a low level of replication has been proposed to occur[33], which is sufficient to detect differences between AdCPE and Adwt. Analysing viral genomes in the liver, pancreas and kidney showed, as expected, that most of the virus was retained in the liver, but that viral genomes were also present in the other organs. Interestingly, animals injected with AdCPE had a reduced viral content (of 18-fold in the liver, 7-fold in the pancreas and 6-fold in the kidney) as compared to Adwt (Fig. 4d). This effect was not associated with differences in viral titres, since the number of viral genomes that reached the liver at 4 h after injection, previous to any replication event, was similar between AdCPE- and Adwt-injected mice (Supplementary Fig. 7b). The attenuated activity of AdCPE in murine healthy tissues was further confirmed in human primary hepatocytes, a model fully permissive for adenoviral replication (Supplementary Fig. 8). Thus, AdCPE activity is highly impaired in normal tissues when compared to Adwt.

Finally, to study liver damage-associated toxicity, which is one of the major side effects of Ad-expressing E1A, we analysed body weight, macroscopic liver appearance and serum parameters in mice after intravenous delivery of Adwt or AdCPE. Adwt caused a progressive loss of weight, whereas AdCPE led to a decrease in body weight by day 1, which then remained stable for the following days (Fig. 4e). Livers injected with Adwt showed a steatotic appearance that was not observed in AdCPE livers (Fig. 4f). Aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase enzyme activities showed a remarkable increase in Adwt-injected animals with respect to the saline group, whereas a 4-fold lower induction was detected in AdCPE-injected mice (Fig. 4g). Altogether, these results indicate a reduced toxic profile of the AdCPE virus as compared to Adwt, while maintaining its oncolytic potential.

Discussion

Oncolytic viruses are advancing to clinical trials and are being envisioned as breakthrough agents in oncology in the near future. Accordingly, optimized engineered viruses are under development to maximize their anticancer effects[34]. However, as their potency increases, so do potentially associated toxicities, pointing to the need to develop highly tumour-specific viruses. We show that engineering adenoviruses with CPE regulatory elements, to control E1A expression post-transcriptionally, resulted in attenuated viral activity in normal cells while maintaining, or even increasing, potency in cancer cells. The specificity of the antitumour response is directly derived from the ectopic expression of CPEB4 in tumours[14]. Thus, depletion of CPEB4 attenuates viral activity in tumour cells, while its overexpression in non-transformed cells increases viral replication. In turn, the levels of CPE-mediated expression may be further increased by reduced levels of CPEB1. These results are consistent with a scenario in which CPEB1 in non-transformed cells (in which its levels are high) represses CPE-containing mRNAs[22]. In tumour cells, on the other hand, CPEB1 levels are reduced[9,28], while CPEB4 levels are increased[14], which promotes cytoplasmic polyadenylation and thereby increases mRNA stability and translation of CPE-regulated transcripts. Importantly, viral genome replication is dependent on CPEB4 activity and can only occur in tumour cells. This leads to the production of fully competent viruses in tumour cells but attenuated ones in healthy tissues. Accordingly, the CPE-regulated virus maintains its oncolytic capacity in tumour cells while significantly reducing its damage to non-tumour tissues, which is mainly in the liver as this is the target organ of adenovirus sequestration on intravascular delivery. This increased selectivity allows for an enhanced therapeutic index, since increased antitumour capacity was obtained after AdCPE treatment at viral doses that, with Adwt injection, compromised mice survival.

We demonstrate here a novel approach to fine-tuning protein expression in a tumour-selective manner by exploiting the post-transcriptional reprogramming of gene expression in tumour cells to control selectivity of an oncolytic virus. Our results have been validated in pancreatic cancer models. However, since CPEB4 is overexpressed in several tumours, such as gliomas and colorectal cancers[14,31], this oncoselective strategy may be valid for many solid tumours. This approach may overcome some of the limitations associated with other commonly used postentry viral targeting approaches. Taking advantage of a tumour-selective control by tumour-specific promoters is confronted with the fact that most of the genome is constantly transcribed at low levels, and is a strategy restricted to viruses that rely on the cellular transcription machinery but not for viruses that use virally encoded polymerases for replication in the cytoplasm, such as the measles virus and vaccinia virus[34]. The alternative postentry strategy to regulate viral replication is a negative targeting approach based on the miRNA expression in normal tissues to restrict viral replication of miRNA-target site-engineered viruses. Indeed, this is a very versatile approach for many different viruses and is highly efficient. However, the evolution of escape mutants in miRNA-targeted viruses, or the potential off-target effects on the host miRNA machinery, have been proposed as potential caveats[6]. Interestingly, no mutations were found in the CPE-regulated adenovirus under evolutionary pressure (Supplementary Fig. 9). To achieve a tight restriction of replication to tumour cells, it should be possible to combine different targeting strategies such as regulation by more than one viral gene[3] or the introduction of transcriptional and post-transcriptional control in the same viral gene[35]. In this line, a double E1A-engineered virus, with the uPAR promoter and the CPE post-transcriptional control, displayed additivity in a non-tumoral context (Supplementary Fig. 10).

This novel tropism-modified strategy presented here provides a framework for exploiting CPE-regulated transgenes to achieve cancer cell-specific expression in therapeutic gene-transfer-based strategies, or to attenuate viruses for vaccine purposes. This technology could also extend to other viruses of interest in virotherapy that require attenuation in particular tissues, such as reoviruses in heart[36] or coxsackievirus A21 in the muscle[5].

Altogether, our data provide a novel paradigm for the development of tumour-specific viruses and provide the proof of principle that CPEB-dependent regulation can be exploited to attenuate viral toxicity, by preventing the spread of the virus in normal tissues, without perturbation of the antitumour efficacy.

Methods

Cells lines. Pancreatic cell lines PANC-1 and MIA PaCa-2, glioblastoma cell lines T98 and U87, colorectal carcinoma cells HCT-116 and DLD-1 and embryonic

kidney cell lines HEK293, 293T and RPE (retinal pigment epithelial) cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). RWP-1 and CP15 cells were derived from human pancreatic adenocarcinoma biopsies perpetuated as xenograft in nude mice[37,38]. Non-tumour fibroblasts were kindly provided by Dr Eva Vaquero (Institut d'investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona, Spain). RWP-1, CP15, PANC-1, MIA PaCa-2, T98, U87, fibroblasts and RPE cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, Carlsbad, CA, USA). DLD-1 and HCT-116 cells were maintained in RPMI-1640 (Gibco-BRL) or McCoy's 5A (Gibco-BRL) medium, respectively, supplemented with 10% fetal bovine serum. Immortal human pancreatic duct epithelial HPDE cells, kindly provided by Dr F.X. Real (CNIO, Madrid, Spain), were cultured and maintained as reported[39]. Human hepatocytes were obtained from Biopredic International (St Gregoire, France) and maintained according to the manufacturer's instructions. RWP-1 shNT, sh2 and sh4 were described previously[14]. HCT-116 and T98 shNT and sh4 cells were generated by transducing parental cells with shNT- and sh4-expressing lentiviruses[14]. HPDE-CPEB4-expressing cells were established by transducing parental cells with CPEB4 recombinant lentivirus. Mycoplasma contamination was tested by PCR routinely.

Lentiviral constructs with a modified 3′-UTR. The polyadenylation sequences (4,193–4,199 and 4,423–4,429) from the pLS-CG lentiviral vector (Addgene; no. 12161) were mutagenized with the help of the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Wilmington, NC, USA) according to the manufacturer's instructions (see Supplementary Table 1 for primers). Mutagenized sequences were verified by DNA sequencing.

d2EGFP and *d2RFP* genes were cloned by PCR with specific primers incorporating the *Age*I and *Xho*I restriction sites. The 3′-UTR of tPA was PCR amplified using specific primers with sequences for the *Xho*I restriction enzyme at both ends. The 3′-UTR of cB1 was designed in the reverse primer of *d2EGFP* gene with a sequence for the *Xho*I restriction enzyme. The 3′-UTR with the TNF-α ARE sequences was generated by amplifying the previously generated cB1 3′-UTR with a primer containing the TNF-α main ARE sequence upstream of the CPE sites.

All primer sequences are listed in Supplementary Table 1. The indicated sequences were cloned into the pLS-CG lentiviral vector. The newly generated vectors were sequenced to confirm the DNA sequence.

Lentiviral production. Lentiviral particles were generated by cotransfection of plasmids pCMVAR8.91, pVSV-G and the pLS-CG-derived constructs, or a lenitiviral plasmid expressing CPEB4, in 293T cells by the calcium/phosphate DNA precipitation method (Clontech, Mountain View, CA, USA). Supernatants from 293T-transfected cells were collected at 24 and 48 h, filtered and processed for purification by ultracentrifugation for 2 h at 12 °C at 20,200 r.p.m. After ultracentrifugation, the pellet was resuspended in PBS for 16 h at 4 °C under constant agitation, aliquoted and frozen at −80 °C for later use.

Viral titration was performed by quantitative PCR (qPCR) with specific primers against the PBC-Psi region of the pLS-CG vector (listed in Supplementary Table 1). A standard curve was generated using serial dilutions of pLS-CG-d2EGFP-3′-UTR_tPA construct mixed with genomic DNA. The number of molecules was calculated using the formula: $M = (C \cdot 6.02 \times 10^{23})/(660 \cdot \text{bp})$, where C is the concentration of the plasmid, bp the number of base pairs and M the number of vector molecules.

Flow cytometry assay. Flow cytometry assays were performed in HPDE, RWP-1, PANC-1 and MIA PaCa-2 cells. Forty thousand cells were plated per well in 12-multiwell plates and, 24 h postseeding, cells were transduced with the indicated lentiviruses at 12 multiplicity of infection per virus. Transduction was facilitated by spinning for 2 h at 12,000 r.p.m. Two days post-transduction, d2EGFP and dRFP levels were analysed by flow cytometry using BD LSR II (Becton Dickinson). Flow cytometry results were analysed using FlowJo 8.7 for Macintosh.

Adenovirus generation. The AdCPE genome was generated by the following steps: first, the E1A polyA sequence of the pEND-K plasmid was mutated from 5′-AATAAA-3′ to 5′-ACTCGA-3′, generating a new *Xho*I restriction site with the primer 5′-GCTGAATGAGATTGATGTAAGTTTACTCGAGGGTGAGATA ATGTTTAACTTGC-3′ using the QuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Wilmington, NC, USA). Second, the construct containing E1A and the 3′-UTR of cB1 with the three CPE sequences was generated directly by PCR, by amplifying Adwt E1A with the primers 5′-CCTTGGGTCCGGTTTCTA TGCC-3′ and 5′-CGTCTCGAGGCTTTATTAAAACCAGTAAAACATTAA AAACACAATACACTATTTACAGAAGCACATGGTGCAACACTTAT GGCCTGGGGCGTTTACAGC-3′. Third, the E1A from the pEND-K with the mutated polyA sequence was replaced by the PCR product, using *Age*I and *Xho*I restriction sites, to generate pEND-K-E1A-cB1. Finally, AdCPE was generated by homologous recombination of pEND-K-E1A-cB1 with the genome of the serotype 5 wild-type adenovirus in *E. coli* BJ5183 cells as described[40].

Adwt was obtained from ATCC. AduPAR was described previously[40]. AdDUC genome was generated by incorporating the CPE containing 3′-UTR of E1A into the *Box*I and *Afl*II restriction sites of the pSH-DM-UPAR-E1A plasmid followed by recombination of the resulting plasmid with the Adwt genome in BJ5183 cells as described previously[40].

Adwt, AdCPE, AduPAR and AdDUC were propagated in A549 cells and purified by cesium chloride banding. The concentration of viral particles (vp ml^{-1}) was determined by means of optical density, and infectious particles (pfu ml^{-1}) were determined by hexon immunostaining in HEK293 cells[41]. Both viruses presented equal vp per pfu ratio.

Western blot analysis. Protein extracts were obtained with lysis buffer (50 mM Tris-HCl at pH 6.8, 2% SDS) containing 1% Complete Mini Protease Inhibitor (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland). BCA Protein Assay Kit (Pierce-Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) was used to determine the protein concentration, and total proteins (35 μg) were resolved by electrophoresis on 7.5% gels and transferred to nitrocellulose membranes by standard methods. Membranes were immunoblotted with rabbit anti-adenovirus-2/5 E1A polyclonal antibody (1:200; clone 13S-5; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) or anti-CPEB4 antibody (1:200; Abcam, Cambridge, UK) or anti-CPEB1 (1:200; 13274-1-AP; ProteinTech, IL, USA) 1 h at room temperature. Blots were rinsed with TBS-T and incubated for 45 min at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin G (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Antibody labelling was detected by the enhanced chemiluminescent method (Amersham Biosciences, Amersham, UK). Western blot expression data for E1A, CPEB1 and CPEB4 were normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Uncropped scans of western blots presented in the main figures are provided in Supplementary Fig. 11.

cDNA synthesis and real-time qPCR. RNA was obtained and isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, The Netherlands). A total of 1 μg was reverse transcribed using Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase and random decamers (Ambion, Carlsbad, CA, USA). One microlitre of the reaction was used as a template for the qPCR amplification reaction (LightCycler 480SYBER Green I Master Mix; Roche Diagnostics) in a thermocycler (ViiA 7 Real-Time PCR System; Applied Biosystems), using the following set of primers: E1A Fw, 5′-CGGCCATTTCTTCGGTAATA-3′ and E1A Rev, 5′-CCTCCGGTGATAA TGACAAG-3′; Hexon Fw, 5′- GTCTACTTCGTCTTCGTTGTC-3′ and Hexon Rev, 5′-TGGCTTCCACGTACTTTG-3′; and Fibre Fw, 5′-CTCCA ACTGTGCCTTTTC-3′ and Fibre Rv, 5′-GGCTCACAGTGGTTACATT-3′. Quantitative expression data were normalized to Gdx Fw, 5′-GGCAGCTGAT CTCCAAAGTCCTGG-3′ and Gdx Rev, 5′-AACGTTCGATGTCATCCAG TGTTA-3′. d2EGFP and dRFP were detected with the primers: d2EGFP Fw, 5′-CAACAGCCACAACGTCTATATCAT-3′ and d2EGFP Rv, 5′-ATGTTGTG GCGGATCTTGAAG-3′; and dRFP Fw, 5′-GCCCTTCGCCTGGGACAT-3′ and dRFP Rv, 5′-GGTGCTTCACGTACACCTTGGA-3′. Quantitative expression data were normalized using the primers ACTB Fw, 5′-CTGGAACGGTGA AGGTGACA-3′ and ACTB Rv, 5′-GGGAGAGGACTGGGCCATT-3′.

RNA-immunoprecipitation and RT–qPCR. RPE cells were transfected at 80% confluence with 25 μg of pCMV-lucRenilla plasmid (cB1-3′-UTR WT or cB1-3′-UTR Mut)[27] using Lipofectamine LTX and PLUS Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 48 h. After transfection, cells were crosslinked with 0.5% formaldehyde in free DMEM for 5 min at room temperature. Then, cells were lysed with RIPA buffer supplemented with EDTA-free protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) and 200 U ml^{-1} RiboLock RNAse Inhibitor (Thermo Fisher Scientific). Cell lysates were sonicated for 5 min at low intensity and centrifuged for 30 min at 13,200 r.p.m. and at 4 °C. Eight hundred micrograms of lysates were precleared with 20 ml of Dynabeads protein A (Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 4 °C. Finally, they were incubated with 5 mg of anti-CPEB4 antibody (Abcam; ab83009) or anti-HuR antibody (Santa Cruz Biotechnology, sc-5261) or anti-immunoglobulin G antibody (Sigma-Aldrich) coupled to 50 μl of Dynabeads protein A overnight at 4 °C. One-fourth of the immunoprecipitates were eluted with Laemmli sample buffer by heating at 65 °C for 20 min, resolved in SDS–polyacrylamide gel electrophoresis and analysed by western blotting. Three-fourth of remaining immunoprecipitates were digested with proteinase K during 1 h at 65 °C, and the RNA was isolated by phenol extraction. All the RNAs were treated with DNAse (Thermo Fisher Scientific) and retrotranscribed with random hexamers and Oligo d(T)20, using SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) and subjected to qPCR. The resulting cDNAs were used for gene-specific qPCR, using the following primers: pLucORF Fw, 5′-ACTGGGACGAAGACGAACAC-3′; pLucORF Rv, 5′-GGCGACGTAATCCACGATCT-3′; Renilla S, 5′-GATAACTGGTCCGC AGTGGT-3′; Renilla AS, 5′-ACCAGATTTGCCTGATTTGC-3′. Fold enrichment of luciferase mRNA in the immunoprecipitated fraction was calculated after normalization with the gene expression from the inputs.

Viral genome quantification. Viral DNA was obtained from supernatants, cellular extracts or frozen tissues using the UltraClean BloodSpin DNA Isolation Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. Viral genomes were determined by real-time qPCR using the

SYBER Green I Master plus mix (Roche Diagnostics) and the primers Hexon Fw, 5′-GCCGCAGTGGTCTTACATGCACATC-3′ and Hexon Rv, 5′-CAGCAC GCCGCGGATGTCAAAG-3′. Adenoviral copy number was relativized to the cellular DNA content using the albumin intron 12 primers of Fw, 5′-CTGTC ATCTCTTGTGGGCTGT-3′ and Rv, 5′-GGCTATCCAAACTCATGGGAG-3′.

***In vitro* cell survival studies.** Dose–response curves were constructed for all assessed cells transduced with doses ranging from 0.001 vp per cell to 10,000 vp per cell of Adwt or AdCPE. Cell viability was measured 3 days postinfection by a colorimetric assay following the manufacturer's instructions (MTT Ultrapure; USB, Cleveland, OH, USA).

Polyadenylation assays. Polyadenylation patterns were evaluated using a modified version of the RNA ligation-coupled RT–PCR presented previously[42]. One microgram of total RNA was ligated to 0.1 μg of P1 anchor primer (5′-P-GGTCACCTTGATCTCAAGC-NH2-3′) in 10 μl reaction using T4 RNA ligase I (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Half of the reaction product was used in a 50 μl reverse transcription reaction with PrimeScript RT–PCR (Takara Bio, Mountain View, CA, USA) according to the manufacturer's instructions, using 0.1 μg of P1′ as a reverse primer (5′-GCTTCAGATCAAGGTGACCTTTTT-3′). An aliquot (2.5 μl) of this cDNA preparation was used for a first pre-PCR step with Fw-E1A-polyA primer (5′-GGTGTAAACCTGTGATTGCG-3′). One microlitre of this reaction was later used in each 25 μl PCR with the primers Fw-E1A-polyA and P1′.

Toxicity analysis. PBS or 2×10^{10} vp of Adwt or AdCPE were injected intravenously into the tail vein of 6- to 8-week-old male immunocompetent C57BL/6 mice. Animals were weighed and examined daily for any clinical signs of toxicity. Three days later, mice were killed, organs were isolated and blood samples were collected by intracardiac puncture. Serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were determined on an Olympus AU400 Analyser (Olympus, Tokyo, Japan) at the Clinical Biochemistry Service, School of Veterinary Medicine, Autonomous University of Barcelona. All animal procedures met the guidelines of European Community Directive 86/609/EEC and were approved by the ethical committee (CEEA-University of Barcelona) and by the local authorities of the Generalitat de Catalunya.

Mouse xenografts. RWP-1, MIA PaCa-2 and PANC-1 cells (2.5×10^6), embedded in Matrigel 1:1 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), were subcutaneously injected into each flank of male, 7- to 8-week-old, athymic nu/nu mice (Harlan, Sant Feliu de Codines, Spain). Tumours were measured at least three times weekly, and their volumes were calculated using the formula V = larger diameter × (smaller diameter)^2 × pi÷6. Mice were randomly assigned to either group for treatment. Virus was administered once tumours achieved a median volume of 100 mm^3. The experimenter was blinded until the conclusion of the study.

Statistical analyses. The descriptive statistical analysis was performed on GraphPad Prism v5.0a (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Statistical differences were evaluated using nonparametric two-tailed Mann–Whitney test. $P < 0.05$ was taken as the level of significance.

Statistical analyses for the d2EGFP/dRFP quantification were performed using R (version 2.10.0) and the ARM package, to perform the mixed model by REML and multcomp package for multiple comparison analysis of means by the Tukey–Kramer test.

Sample size calculation for animal studies took into consideration to have more than five mice in each group.

The *in vivo* tumour growth statistical analysis was evaluated using R v2.14.1 software (R: a language and environment for statistical computing; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) with a linear mixed-effect model using the lme4 package. We associated a random-effects term with the day of measurement[43]. Statistical differences were evaluated using a multiple comparison of means by Tukey's contrasts.

Data availability. All relevant data are available from the authors on reasonable request.

References

1. Russell, S. J., Peng, K. W. & Bell, J. C. Oncolytic virotherapy. *Nat. Biotechnol.* **30,** 658–670 (2012).
2. Bofill-De Ros, X., Gironella, M. & Fillat, C. miR-148a- and miR-216a-regulated oncolytic adenoviruses targeting pancreatic tumors attenuate tissue damage without perturbation of miRNA activity. *Mol. Ther.* **22,** 1665–1677 (2014).
3. Bofill-De Ros, X., Villanueva, E. & Fillat, C. Late-phase miRNA-controlled oncolytic adenovirus for selective killing of cancer cells. *Oncotarget* **6,** 6179–6190 (2015).
4. Brown, B. D. *et al.* Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nat. Biotechnol.* **25,** 1457–1467 (2007).
5. Kelly, E. J., Hadac, E. M., Greiner, S. & Russell, S. J. Engineering microRNA responsiveness to decrease virus pathogenicity. *Nat. Med.* **14,** 1278–1283 (2008).
6. Ruiz, A. J. & Russell, S. J. MicroRNAs and oncolytic viruses. *Curr. Opin. Virol.* **13,** 40–48 (2015).
7. Silvera, D., Formenti, S. C. & Schneider, R. J. Translational control in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **10,** 254–266 (2010).
8. Bhat, M. *et al.* Targeting the translation machinery in cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14,** 261–278 (2015).
9. Fernandez-Miranda, G. & Mendez, R. The CPEB-family of proteins, translational control in senescence and cancer. *Ageing Res. Rev.* **11,** 460–472 (2012).
10. Ivshina, M., Lasko, P. & Richter, J. D. Cytoplasmic polyadenylation element binding proteins in development, health, and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **30,** 393–415 (2014).
11. Afroz, T. *et al.* A fly trap mechanism provides sequence-specific RNA recognition by CPEB proteins. *Genes Dev.* **28,** 1498–1514 (2014).
12. Igea, A. & Mendez, R. Meiosis requires a translational positive loop where CPEB1 ensues its replacement by CPEB4. *EMBO J.* **29,** 2182–2193 (2010).
13. Novoa, I., Gallego, J., Ferreira, P. G. & Mendez, R. Mitotic cell-cycle progression is regulated by CPEB1 and CPEB4-dependent translational control. *Nat. Cell Biol.* **12,** 447–456 (2010).
14. Ortiz-Zapater, E. *et al.* Key contribution of CPEB4-mediated translational control to cancer progression. *Nat. Med.* **18,** 83–90 (2012).
15. Pavlopoulos, E. *et al.* Neuralized1 activates CPEB3: a function for nonproteolytic ubiquitin in synaptic plasticity and memory storage. *Cell* **147,** 1369–1383 (2011).
16. Wang, X. P. & Cooper, N. G. Comparative *in silico* analyses of cpeb1-4 with functional predictions. *Bioinform. Biol. Insights* **4,** 61–83 (2010).
17. Mendez, R. *et al.* Phosphorylation of CPE binding factor by Eg2 regulates translation of c-mos mRNA. *Nature* **404,** 302–307 (2000).
18. Mendez, R., Barnard, D. & Richter, J. D. Differential mRNA translation and meiotic progression require Cdc2-mediated CPEB destruction. *EMBO J.* **21,** 1833–1844 (2002).
19. Drisaldi, B. *et al.* SUMOylation is an inhibitory constraint that regulates the prion-like aggregation and activity of CPEB3. *Cell Rep.* **11,** 1694–1702 (2015).
20. Belloc, E., Pique, M. & Mendez, R. Sequential waves of polyadenylation and deadenylation define a translation circuit that drives meiotic progression. *Biochem. Soc. Trans.* **36,** 665–670 (2008).
21. Belloc, E. & Mendez, R. A deadenylation negative feedback mechanism governs meiotic metaphase arrest. *Nature* **452,** 1017–1021 (2008).
22. Groisman, I. *et al.* Control of cellular senescence by CPEB. *Genes Dev.* **20,** 2701–2712 (2006).
23. Burns, D. M. & Richter, J. D. CPEB regulation of human cellular senescence, energy metabolism, and p53 mRNA translation. *Genes Dev.* **22,** 3449–3460 (2008).
24. Groppo, R. & Richter, J. D. CPEB control of NF-kappaB nuclear localization and interleukin-6 production mediates cellular senescence. *Mol. Cell. Biol.* **31,** 2707–2714 (2011).
25. Ogami, K., Hosoda, N., Funakoshi, Y. & Hoshino, S. Antiproliferative protein Tob directly regulates c-myc proto-oncogene expression through cytoplasmic polyadenylation element-binding protein CPEB. *Oncogene* **33,** 55–64 (2014).
26. Giangarra, V., Igea, A., Castellazzi, C. L., Bava, F. A. & Mendez, R. Global analysis of CPEBs reveals sequential and non-redundant functions in mitotic cell cycle. *PLoS ONE* **10,** e0138794 (2015).
27. Pique, M., Lopez, J. M., Foissac, S., Guigo, R. & Mendez, R. A combinatorial code for CPE-mediated translational control. *Cell* **132,** 434–448 (2008).
28. D'Ambrogio, A., Nagaoka, K. & Richter, J. D. Translational control of cell growth and malignancy by the CPEBs. *Nat. Rev. Cancer* **13,** 283–290 (2013).
29. Caldeira, J. *et al.* CPEB1, a novel gene silenced in gastric cancer: a *Drosophila* approach. *Gut* **61,** 1115–1123 (2012).
30. Hansen, C. N. *et al.* Expression of CPEB, GAPDH and U6snRNA in cervical and ovarian tissue during cancer development. *APMIS* **117,** 53–59 (2009).
31. Chang, Y. T. *et al.* Verification of gene expression profiles for colorectal cancer using 12 internet public microarray datasets. *World J. Gastroenterol.* **20,** 17476–17482 (2014).
32. Hu, Z. *et al.* Oncolytic adenovirus expressing soluble TGFbeta receptor II-Fc-mediated inhibition of established bone metastases: a safe and effective systemic therapeutic approach for breast cancer. *Mol. Ther.* **19,** 1609–1618 (2011).

33. Cawood, R. *et al.* Use of tissue-specific microRNA to control pathology of wild-type adenovirus without attenuation of its ability to kill cancer cells. *PLoS Pathog.* **5,** e1000440 (2009).
34. Miest, T. S. & Cattaneo, R. New viruses for cancer therapy: meeting clinical needs. *Nat. Rev. Microbiol.* **12,** 23–34 (2014).
35. Sugio, K. *et al.* Enhanced safety profiles of the telomerase-specific replication-competent adenovirus by incorporation of normal cell-specific microRNA-targeted sequences. *Clin. Cancer Res.* **17,** 2807–2818 (2011).
36. Qiao, J. *et al.* Cyclophosphamide facilitates antitumor efficacy against subcutaneous tumors following intravenous delivery of reovirus. *Clin. Cancer Res.* **14,** 259–269 (2008).
37. Dexter, D. L. *et al.* Establishment and characterization of two human pancreatic cancer cell lines tumorigenic in athymic mice. *Cancer Res.* **42,** 2705–2714 (1982).
38. Pérez-Torras, S. *et al.* Characterization of human pancreatic orthotopic tumor xenografts suitable for drug screening. *Cell Oncol.* **34,** 511–521 (2011).
39. Ouyang, H. *et al.* Immortal human pancreatic duct epithelial cell lines with near normal genotype and phenotype. *Am. J. Pathol.* **157,** 1623–1631 (2000).
40. Huch, M. *et al.* Urokinase-type plasminogen activator receptor transcriptionally controlled adenoviruses eradicate pancreatic tumors and liver metastasis in mouse models. *Neoplasia* **11,** 518–528 514pp following 528 (2009).
41. Cascante, A. *et al.* GCV modulates the antitumoural efficacy of a replicative adenovirus expressing the Tat8-TK as a late gene in a pancreatic tumour model. *Gene Ther.* **14,** 1471–1480 (2007).
42. Rassa, J. C., Wilson, G. M., Brewer, G. A. & Parks, G. D. Spacing constraints on reinitiation of paramyxovirus transcription: the gene end U tract acts as a spacer to separate gene end from gene start sites. *Virology* **274,** 438–449 (2000).
43. Heitjan, D. F., Manni, A. & Santen, R. J. Statistical analysis of *in vivo* tumor growth experiments. *Cancer Res.* **53,** 6042–6050 (1993).

Acknowledgements

We thank Ana Boullosa for technical support. This work was supported by grants to C.F. from the Spanish Ministry of Economia y Competitividad BIO2011-30299-C02-01/02 and BIO2014-57716-C2-2-R, and receives partial support from the Generalitat de Catalunya SGR14/248. CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. The C.F. group is partially financed by the Instituto de Salud Carlos III (IIS10/00014) and cofinanced by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and also acknowledges the support of COST Action BM1204 EUPancreas and the Spanish Adenovirus Network (AdenoNet, BIO2015-68990-REDT). R.M. received support for this work from the Fundación Botín and the Banco Santander, through its Santander Universities Global Division, from the Asociación Española Contra el Cancer (AECC) from the Worldwide Cancer Research Foundation and from the Spanish Ministerio de Economia y Competitividad (BFU2011-30121, BFU2014-54122-P and Consolider RNAREG CSD2009-00080). This work was also supported by grants to P.N. from the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad/ISCIII-FEDER (PI14/00125), RETIC Cancer RD12/0036/0051/FEDER and the 'Generalitat de Catalunya' (2014/SGR/143). We also acknowledge the support of CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. E.V. received a fellowship from the Gobierno Vasco, Spain. This work was developed at the Centro Esther Koplowitz, Barcelona, Spain.

Author contributions

E.V. designed and performed the experiments, P.N. contributed with some reagents, and to the manuscript writing, M.R.-R. and A.S. contributed with some experiments and R.M. and C.F. coordinated the study and wrote the manuscript.

Additional information

Supplementary Information accompanies this paper at http://www.nature.com/naturecommunications

Competing interests: The authors declare no competing financial interests.

Reprints and permission information is available online at http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/

How to cite this article: Villanueva, E *et al.* Translational reprogramming in tumour cells can generate oncoselectivity in viral therapies. *Nat. Commun.* **8,** 14833 doi: 10.1038/ncomms14833 (2017).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

© The Author(s) 2017

Implications of microRNAs in oncolytic virotherapy

Xavier Bofill-De Ros[1, 2], Maria Rovira-Rigau[1, 2], Cristina Fillat[1, 2*]

[1]Consorci Institut D'Investigacions Biomediques August Pi I Sunyer, Spain, [2]CIBERER, Spain

Submitted to Journal:
Frontiers in Oncology

Specialty Section:
Cancer Immunity and Immunotherapy

Article type:
Mini Review Article

Manuscript ID:
270470

Received on:
30 Mar 2017

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

In review

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

CF coordinated the study and wrote some parts.
XB-DR wrote part of the manuscript
M R-R wrote part of the manuscript

Keywords

Oncolytic Viruses, miRNA, gene regulation, Detargeting, host-virus interaction

Abstract

Word count: 236

MicroRNAs (miRNAs) are modulators of tissue-specific gene expression. Deregulation of certain miRNAs is widely recognized as a robust biomarker in many neoplasms as well as an important player in tumorigenesis and tumoral microenvironment establishment. In this line, down-regulation of specific miRNAs in tumors has been exploited as a mechanism to provide selectivity to oncolytic viruses or gene-based therapies. The introduction of miRNA response elements or engineered target sites into the 3'UTR of viral genes promotes the degradation of these mRNAs in healthy tissues while keeping the therapeutic activity in tumor cells. While viruses are engineered to be regulated by cellular miRNAs, viral infections per se are able to modulate the miRNome of the host cell. As a consequence, miRNA changes under infection impact viral normal life cycle. On the other hand, viral infections induce cellular processes that lead to alterations in the cellular miRNA profile. Thus, there is a miRNA-mediated interplay between virus and host cell affecting both viral and cellular activity. Moreover, the outcome of such interactions may be cell-type or condition specific, suggesting that the impact in normal and tumoral cells might be different.
Here, we provide some insights on the latest developments of miRNA-based viral engineering in cancer therapeutics according to the recent discoveries on miRNA biology. Furthermore, we report on the relevance of miRNAs in virus-host cell interactions and how this knowledge can be exploited in controlling viral activity in tumor cells.

Funding statement

Research in the author's laboratory was supported by grants from the Spanish Ministry of Economia y Competitividad (MINECO) BIO2011-30299-C02-01/02 and BIO2014-57716-C2-2-R, and receives partial support from the Generalitat de Catalunya SGR14/248. CIBER de Enfermedades Raras is an initiative of the ISCIII. The C.F. group is partially financed by the Instituto de Salud Carlos III (IIS10/00014) and co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and also acknowledges the support of COST Action BM1204 EUPancreas and the Spanish Adenovirus Network (AdenoNet, BIO2015-68990-REDT) and the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. X. Bofill-De Ros was recipient of a FPU fellowship (Ministry of Education) and M. Rovira-Rigau of a FPI fellowship (MINECO), Spain. Authors develop their research at the Centro Esther Koplowitz, Barcelona, Spain.

Review

Implications of microRNAs in oncolytic virotherapy

Xavier Bofill-De Ros[1,2,*], Maria Rovira-Rigau[1,2], Cristina Fillat[1,2]#

[1]Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), [2]Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER).

Running title: miRNAs in oncolytic viruses

In review

*Present address: RNA Biology Laboratory, Center For Cancer Research, National Cancer Institute, Frederick, MD

#Correspondence should be addressed to: Cristina Fillat, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer-IDIBAPS, Rosselló 149-153, 08036-Barcelona, Spain; phone: +34-932275400/Ext.4579; e-mail: cfillat@clinic.ub.es

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are modulators of tissue-specific gene expression. Deregulation of certain miRNAs is widely recognized as a robust biomarker in many neoplasms as well as an important player in tumorigenesis and tumoral microenvironment establishment. In this line, down-regulation of specific miRNAs in tumors has been exploited as a mechanism to provide selectivity to oncolytic viruses or gene-based therapies. The introduction of miRNA response elements or engineered target sites into the 3'UTR of viral genes promotes the degradation of these mRNAs in healthy tissues while keeping the therapeutic activity in tumor cells. While viruses are engineered to be regulated by cellular miRNAs, viral infections per se are able to modulate the miRNome of the host cell. As a consequence, miRNA changes under infection impact viral normal life cycle. On the other hand, viral infections induce cellular processes that lead to alterations in the cellular miRNA profile. Thus, there is a miRNA-mediated interplay between virus and host cell affecting both viral and cellular activity. Moreover, the outcome of such interactions may be cell-type or condition specific, suggesting that the impact in normal and tumoral cells might be different.

Here, we provide some insights on the latest developments of miRNA-based viral engineering in cancer therapeutics according to the recent discoveries on miRNA biology. Furthermore, we report on the relevance of miRNAs in virus-host cell interactions and how this knowledge can be exploited in controlling viral activity in tumor cells.

In review

Keywords: oncolytic viruses, miRNA, gene regulation, detargeting, host-virus interaction

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules (~22nt) that can negatively regulate the expression of large networks of genes(1). Not surprisingly, miRNA dysregulations impact virtually all cancer related processes (proliferation, cell death, migration and cell cycle among many others). These dysregulations provide clear hallmark miRNA signatures that can distinguish between normal and tumor cells from a large number of malignancies.

In this regard, therapeutic strategies relay either on the reintroduction of individual miRNAs involved in tumor suppression functions such as miR-34(2) or reducing oncogenic miRNAs with antisense oligonucleotides - "antagomirs"(3). Interestingly, based on the miRNA expression differences between tissues, Brown et al.(4) proposed in 2006 a novel mechanism to control transgene expression based on the differential expression of miR-142 among lineages of hematopoietic cells. This selectivity was achieved by the introduction of engineered target sites or miRNA response elements (MREs). Later, oncolytic virotherapy also incorporated MREs to control the expression of viral or suicide genes. MREs can attenuate oncolytic viruses in non-tumoral tissues and therefore avoid undesired toxicities associated to the viral tropism when administered systemically or locoregionally(5–8). Post-transcriptional targeting with MREs could be complemented with transcriptional or transductional targeting to enhance selectivity of oncolytic viruses.
The study of viral miRNAs and host responses has also shown the relevance of miRNA in the regulation of viral replication.

In review

Controlling viral replication through miRNA response elements (MREs)

The selectivity of oncolytic viruses can be achieved through the introduction of miRNA response elements (MREs) preferentially in the 3'UTR of viral genes(9). Noticeably, MREs can be inserted in virtually any viral mRNA. Comparable efficiencies have been observed with MREs targeting early phase transcription factors or late phase capsid structural proteins. Examples of the elements targeted are ICP4, ICP27 and glycoprotein H in Herpes simplex virus(10–12), E1A and L5 (fiber) in Adenovirus(12,13) or M and L in Vesicular stomatitis virus(14,15). Interestingly, targeting early phase proteins reduce toxicity derived from its own expression and downstream genes, which represents a safety advantage compared to targeting late phase proteins(13). However, the use of MREs to target both the genome and mRNA in single stranded RNA viruses showed that miRNAs can recognize efficiently mRNAs but its efficacy on genomic RNAs is reduced due to secondary structures and scaffold proteins that protected the viral genome(5,16,17).

The base pairing between the miRNA and target genes usually exhibits a partial complementarity restricted to the nucleotides 2-7 of the miRNA known as the "seed" sequence(18,19). However, partial complementarity can only mediate translational repression and mRNA decay(20–23). In order to achieve a fast and robust effect on the control of viral replication, MREs must be designed to trigger a direct cleavage on the viral mRNA. Although all human Argonaute proteins (Ago1-4) can promote the translational repression pathway, only Ago2 has the endonucleolytic activity(24,25). In

order to trigger an Ago2-mediated direct cleavage, the base-paring miRNA:MRE between nucleotides 10 and 11 must be complete(20). This mechanism of action exploits the same mechanisms of the RNAi silencing (shRNA and siRNA)(26). Some aspects that can influence on the efficacy of the MRE are the expression levels and profiles of Ago proteins between tissues(27) and the modulation of their activity by covalent modifications(28,29).

Some elements of the design of MRE that contribute their efficacy are the number of target sites, the distance between target sites, the sequence composition and local RNA structure surrounding their location in the 3'UTR (Figure 1). An optimal design for MRE should include a range of target sites, usually from 2 to 8, allowing to respond lineally with miRNA concentration(30) and a seed separation between 13 and 35 nucleotides to avoid the steric hindrance(31). Accessibility to the target sites can usually be estimated through the secondary structure with the minimum free energy (mfe) and the AU-richness surrounding the site(32–34), however predicted or described sites for RNA-binding proteins should be avoided since they could also mask MREs and hamper their recognition. In this line, MRE engineering might benefit from a computed selection of the spacers to promote an optimal separation and secondary structure.

MicroRNAs used in MREs are selected from those that present an abundant expression in normal tissue whereas a robust decrease in tumors. Some MREs have used miRNAs ubiquitously expressed but down-regulated in tumors such as let-7 family(15,35,36). Other studies have exploited tissue-specific miRNAs. Some examples of tissue-specific MREs are miR-122 for liver(6,7), miR-7 for brain(37), miR-148a for pancreas(37,38) and miR-192 for heart(39). In this regard, miRNA belonging to the same family can be used to increase the efficacy of MRE, the extensive homology presented by miRNA of the same family allow sub-optimal recognition of the MRE (Figure 1). An increased level of complexity to select miRNA candidates arises in the design of MREs for multiple organ detargeting, usually non-tumoral cells surrounding the tumor and tissues with native viral tropism(40). This can be achieved by using miRNAs present in both organs or combining multiple miRNAs(38). In this line, the extensive miRNome data in The Cancer Genome Atlas (TCGA) for 33 types of cancer and normal tissues constitutes an invaluable resource for the selection of candidate miRNAs(41). Of special consideration to fine-tune oncolytic virus activity is the diversity of cell-types in tissues, specially in approaches using loco-regional administration. Here, MREs could also provide this level of selectivity, for example miR-375 has been described almost exclusively in the beta and alpha cells present in pancreatic islets(42,43).

Some aspects of the MRE design, aside from selectivity, that haven't been tested yet for oncolytic viruses is the incorporation of MREs as miRNA sponges or decoys. In other areas of gene therapy, sponge MREs have been used to reduce the effective amount of miRNA content(44–46). These particular designs of MREs are characterized by a bulge that impairs the slicing activity of Ago2, while promoting the miRNA degradation by trimming and tailoring(47). Sponge MREs could be incorporated to oncolytic viruses to down-regulate miRNAs involved in the tumoral progression(48), increase the viral replication or attenuate the host antiviral response(49).

In review

173 **Host miRNAs response to viral infectious**
174
175 When a virus infects a cell, a host-virus relationship is established, creating an intricate
176 network of interactions characterized by a massive reprogramming of cellular gene
177 expression. The expression profile of cellular mRNAs(50,51) and miRNAs are affected
178 during viral infections. Changes in host microRNA profile have been reported after
179 infection with adenoviruses(52–54), influenza viruses(55,56), HIV-1(57), Epstein-Barr
180 virus (EBV)(58,59), human cytomegalovirus (hCMV)(60), human herpes virus 1 (HSV-
181 1)(61) and respiratory syncytial virus (RSV)(62).

182 By the sole observation of microRNA profile changes, it is difficult to discern whether
183 miRNA deregulation is the consequence of host-immune response to the infection or if
184 it is triggered by the virus to favor its replication. Comparative studies of the expression
185 profiles from different viral infections and the analysis of miRNA targets can help to
186 hypothesize about the significance of the deregulation.

187 The microRNA profile after adenoviral infections has been studied for adenovirus type
188 3 in human laryngeal epithelial cells(54), adenovirus type 2 in human primary cells(52)
189 and more recently for adenovirus type 5 in prostate cancer cells(53). Adenovirus type 2
190 infection studies showed that a correlation between the progression of the infectious
191 cycle and the level of miRNA deregulation could be established. Changes in the profile
192 extend from more up-regulated miRNAs at the early steps of infection to more down-
193 regulated at late phases(52). This dual behavior could result from the expression of the
194 VA RNAs codified by the virus at late steps of the infection, competing with
195 endogenous miRNA biogenesis(53) (Figure 2A). This effect of massive microRNA
196 down-regulation at late phases was also observed in the adenovirus type 5 infection(53).
197 In the two studies miR-155 was found to be up-regulated, an effect also observed after
198 VSV(63) and EBV infections(59), suggesting that miR-155 could act as a host anti-viral
199 microRNA. In this line, it is known that miR-155 is induced in macrophages in response
200 to interferon pathway activation(64). In contrast, miR-132, also overexpressed after
201 adenovirus(52,53), HSV, KSHV and HCMV infections displays a negative effect on the
202 expression of interferon-stimulated genes facilitating viral replication(65) (Figure 2B).

203 It is probable that viruses have evolved to induce the down-regulation of interference
204 microRNAs and favor the up-regulation of microRNAs that can facilitate viral
205 replication (Figure 2B). Several examples illustrate this view. HSV-1, causes a series of
206 changes in the microRNA profile and antagonizes the host defense by inducing miR-
207 23a and miR-649 expression. These microRNAs respectively target *IRF1* and *MALT1*
208 genes, which are involved in the antiviral signaling pathway(66,67). In turn, the HSV-1
209 ICP4 protein induces the expression of miR-101, which limits the virus replication to
210 ensure the survival of host cells and therefore to support a persistent HSV-1
211 infection(68). In cells infected with Reolysin, a reovirus currently being tested for the
212 treatment of several cancers(69), Nuovo et al observed a modulation of certain
213 microRNAs, with a clear down-regulation of let-7d that facilitates a productive viral
214 infection and apoptosis related death of the cancer cells(70). Hepatitis C virus (HCV)
215 inhibits type I IFN production by up-regulating the expression of miR-21(71), influenza
216 virus activates the expression of miR-485, which targets the cytosolic sensor of viral
217 RNA RIG-1(55); and HIV-1 actively suppresses the expression of two microRNAs that
218 act against the virus: miR-17 and miR-20a(72).

219 Independently of the miRNA changes triggered by viral infections, most cells are
220 already equipped with miRNAs that will interact with viral genes. Anti-viral

In review

microRNAs, such as miR-24 and miR-93 have been described to inhibit viral replication by directly targeting viral genes. Otsuka et al described that these microRNA targeted VSV L and P protein genes, therefore inhibiting VSV replication(73). This is also the case for the cellular miR-32, which targets a sequence in the genome of the primate foamy virus type 1 (PFV-1)(74), or for the host miR-214, which is capable of inhibiting adenovirus replication by targeting the 3'UTR of the E1A mRNA(75). In contrast, there are pro-viral microRNAs, such as miR-122, highly expressed in the liver, which interacts with the hepatitis C virus (HCV) genome to positively regulate its RNA accumulation(76).

As the amounts of experimental data regarding virus-host interactions increase, it appears the need to develop novel bioinformatic strategies that help with the complex analysis. Li et al have generated an approach that defines potential regulatory networks between host targets of viral proteins, human miRNAs and putative microRNA transcription factors(77).

Deregulation of miRNAs in cancer with implications in viral activity

MicroRNA signatures can distinguish between normal and cancer cells, between cancer subtypes and even between the cell types conforming the tumor. Studies have shown that lower expression or even loss of miRNAs is commonly found in tumor cells(78,79), most of them being recognized as tumor-supressors. On the other hand, fewer miRNAs are overexpressed in cancer cells and are considered oncomiRs as they tend to be involved in tumorigenic processes. Both oncomiRs and tumor-supressor miRNAs are contributors to different steps in carcinogenesis(80). On this basis, attempts to modulate miRNA expression is an area of therapeutic development(81). Since many miRNAs are involved in tumorigenesis, the action of expressing or interfering with a single miRNA may have limited anti-cancer effects. The combination of multiple miRNAs with complementary mechanisms can impact in several signal transduction pathways with improved outcome. In this line, multiple long non-coding RNAs (lncRNA) have been designed in an adenovirus to bind oncomiRs with the goal to compete with their binding to endogenous targets, achieving the interference of multiple miRNAs(82).

Cancer cells are coupled with abnormal signalling pathways and this has consequences on viral replication. For example, adenoviruses utilize interferon signalling to inhibit lytic virus replication in normal cells, however they fail to inhibit its replication in cancer cells(83). The loss of interferon defenses in tumor cells is one of the mechanisms involved in the cancer selectivity of reovirus(84). Exploiting interferon deregulation in cancer has also been a strategy to provide oncoselectivity to complex viruses(85,86). Alterations in a variety of other pathways in cancer have constituted the principle to confer cancer selectivity to virus for cancer treatment(87,88). Thus, although very little is known, one could speculate that the dysregulation of miRNAs in cancer may impact viral activity in tumor cells. Although the simplest rationale would claim that the more deregulated ones could be the first candidates to influence viral replication, recent observations illustrate that this might not be always the case and in fact functional interrogation would be always required. This point was raised from the studies of Hodzic et al. in which they showed that miR-26b, an abundant miRNA in prostate cancer cells, promoted adenovirus propagation and spread, leading to increased cell death(53). Further studies in this direction will provide a more clear view of the

In review

relevance that miRNA dysregulation in tumor cells may have modulating viral activity. All this knowledge could constitute a novel platform to optimize oncolytic virotherapy.

Concluding remarks

The study of miRNAs has strongly impacted the field of oncolytic virotherapy. A large number of studies have shown their potential to precisely detarget viral protein expression or engineer transgenes in a cell-specific manner. This has been key to improve the safety profile and the therapeutic index of oncolytic virotherapies. Fine-tuning the design of the MRE improved the efficacy of the cleavage and detargeting effects.

On the other hand, the importance of miRNAs in viral infections is increasing. Virus-host cell interaction impacts cellular miRNAs and alters their miRNome. Viruses take advantage of host cell miRNAs to promote virus replication, but cells react to viral infections by up-regulating anti-viral miRNAs. Interestingly, the biological responses to viral infection in cancer cells with abnormal signaling pathways are not equivalent to that of normal cells, and miRNAs also seem to play a role in this differential response. As the understanding of the relation between host miRNAs and viral replication increases, the potential to exploit this knowledge to provide enhanced selectivity or increased potency to oncolytic viruses expands.

In review

Funding

Research in the author's laboratory was supported by grants from the Spanish Ministry of *Economia y Competitividad* (MINECO) BIO2011-30299-C02-01/02 and BIO2014-57716-C2-2-R, and receives partial support from the *Generalitat de Catalunya* SGR14/248. CIBER de *Enfermedades Raras* is an initiative of the ISCIII. The C.F. group is partially financed by the Instituto de Salud Carlos III (IIS10/00014) and co-financed by Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) and also acknowledges the support of COST Action BM1204 EUPancreas and the Spanish Adenovirus Network (AdenoNet, BIO2015-68990-REDT) and the CERCA Programme/Generalitat de Catalunya. X. Bofill-De Ros was recipient of a FPU fellowship (Ministry of Education) and M. Rovira-Rigau of a FPI fellowship (MINECO), Spain. Authors develop their research at the Centro Esther Koplowitz, Barcelona, Spain.

315 **References**

316

317 1. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are
318 conserved targets of microRNAs. *Genome Res* (2009) **19**:92–105.

319 2. Daige CL, Wiggins JF, Priddy L, Nelligan-Davis T, Zhao J, Brown D. Systemic
320 delivery of a miR34a mimic as a potential therapeutic for liver cancer. *Mol*
321 *Cancer Ther* (2014) **13**:2352–60.

322 3. Broderick JA, Zamore PD. MicroRNA therapeutics. *Gene Ther* (2011) **18**:1104–
323 10.

324 4. Brown BD, Venneri MA, Zingale A, Sergi Sergi L, Naldini L. Endogenous
325 microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages
326 and enables stable gene transfer. *Nat Med* (2006) **12**:585–91.

327 5. José A, Sobrevals L, Miguel Camacho-Sánchez J, Huch M, Andreu N, Ayuso E,
328 Navarro P, Alemany R, Fillat C. Intraductal delivery of adenoviruses targets
329 pancreatic tumors in transgenic Ela-myc mice and orthotopic xenografts.
330 *Oncotarget* (2013) **4**:94–105.

331 6. Cawood R, Chen HH, Carroll F, Bazan-Peregrino M, van Rooijen N, Seymour
332 LW. Use of tissue-specific microRNA to control pathology of wild-type
333 adenovirus without attenuation of its ability to kill cancer cells. *PLoS Pathog*
334 (2009) **5**:e1000440. doi:10.1371/journal.ppat.1000440

335 7. Ylösmäki E, Hakkarainen T, Hemminki A, Visakorpi T, Andino R, Saksela K.
336 Generation of a conditionally replicating adenovirus based on targeted
337 destruction of E1A mRNA by a cell type-specific MicroRNA. *J Virol* (2008)
338 **82**:11009–15.

339 8. Kelly EJ, Hadac EM, Greiner S, Russell SJ. Engineering microRNA
340 responsiveness to decrease virus pathogenicity. *Nat Med* (2008) **14**:1278–83.

341 9. Gu S, Jin L, Zhang F, Sarnow P, Kay MA. Biological basis for restriction of
342 microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs. *Nat*
343 *Struct Mol Biol* (2009) **16**:144–50.

344 10. Fu X, Rivera A, Tao L, De Geest B, Zhang X. Construction of an oncolytic
345 herpes simplex virus that precisely targets hepatocellular carcinoma cells. *Mol*
346 *Ther* (2012) **20**:339–46.

347 11. Li J-M, Kao K-C, Li L-F, Yang T-M, Wu C-P, Horng Y-M, Jia WW, Yang C-T.
348 MicroRNA-145 regulates oncolytic herpes simplex virus-1 for selective killing of
349 human non-small cell lung cancer cells. *Virol J* (2013) **10**:241.

350 12. Lee CYF, Rennie PS, Jia WWG. MicroRNA regulation of oncolytic herpes
351 simplex virus-1 for selective killing of prostate cancer cells. *Clin Cancer Res*
352 (2009) **15**:5126–35. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0051

353 13. Bofill-De Ros X, Villanueva E, Fillat C. Late-phase miRNA-controlled oncolytic
354 adenovirus for selective killing of cancer cells. *Oncotarget* (2015) **6**:6179–90.

355 14. Kelly EJ, Nace R, Barber GN, Russell SJ. Attenuation of vesicular stomatitis
356 virus encephalitis through microRNA targeting. *J Virol* (2010) **84**:1550–62.

In review

357 15. Edge RE, Falls TJ, Brown CW, Lichty BD, Atkins H, Bell JC. A let-7
358 MicroRNA-sensitive vesicular stomatitis virus demonstrates tumor-specific
359 replication. *Mol Ther* (2008) **16**:1437–43.

360 16. Kelly EJ, Hadac EM, Cullen BR, Russell SJ. MicroRNA antagonism of the
361 picornaviral life cycle: alternative mechanisms of interference. *PLoS Pathog*
362 (2010) **6**:e1000820. doi:10.1371/journal.ppat.1000820

363 17. Kamrud KI, Coffield VM, Owens G, Goodman C, Alterson K, Custer M,
364 Murphy MA, Lewis W, Timberlake S, Wansley EK, et al. In vitro and in vivo
365 characterization of microRNA-targeted alphavirus replicon and helper RNAs. *J*
366 *Virol* (2010) **84**:7713–25.

367 18. Lewis BP, Shih I, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of
368 mammalian microRNA targets. *Cell* (2003) **115**:787–98.

369 19. Saito T, Sætrom P. MicroRNAs – targeting and target prediction. *N Biotechnol*
370 (2010) **27**:243–249.

371 20. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of
372 translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* (2011) **12**:99–110.

373 21. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA.
374 *Proc Natl Acad Sci U S A* (2006) **103**:4034–9.

375 22. Eichhorn SW, Guo H, McGeary SE, Rodriguez-Mias RA, Shin C, Baek D, Hsu
376 S-H, Ghoshal K, Villén J, Bartel DP. mRNA destabilization is the dominant
377 effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol*
378 *Cell* (2014) **56**:104–15.

379 23. Béthune J, Artus-Revel CG, Filipowicz W. Kinetic analysis reveals successive
380 steps leading to miRNA-mediated silencing in mammalian cells. *EMBO Rep*
381 (2012) **13**:716–23.

382 24. Su H, Trombly MI, Chen J, Wang X. Essential and overlapping functions for
383 mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev* (2009) **23**:304–17.

384 25. Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human
385 Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*
386 (2004) **15**:185–97.

387 26. Bofill-De Ros X, Gu S. Guidelines for the optimal design of miRNA-based
388 shRNAs. *Methods* (2016) **103**:157–66.

389 27. Valdmanis PN, Gu S, Schüermann N, Sethupathy P, Grimm D, Kay MA.
390 Expression determinants of mammalian argonaute proteins in mediating gene
391 silencing. *Nucleic Acids Res* (2012) **40**:3704–13.

392 28. Golden RJ, Chen B, Li T, Braun J, Manjunath H, Chen X, Wu J, Schmid V,
393 Chang T-C, Kopp F, et al. An Argonaute phosphorylation cycle promotes
394 microRNA-mediated silencing. *Nature* (2017) **542**:197–202.

395 29. Pasquinelli AE. MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an
396 emerging reciprocal relationship. *Nat Rev Genet* (2012) **13**:271–82.

397 30. Doench JG, Petersen CP, Sharp PA. siRNAs can function as miRNAs. *Genes*
398 *Dev* (2003) **17**:438–42.

In review

399 31. Saetrom P, Heale BSE, Snøve O, Aagaard L, Alluin J, Rossi JJ. Distance
400 constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity.
401 *Nucleic Acids Res* (2007) **35**:2333–42.

402 32. Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E. The role of site accessibility
403 in microRNA target recognition. *Nat Genet* (2007) **39**:1278–84.

404 33. Long D, Lee R, Williams P, Chan CY, Ambros V, Ding Y. Potent effect of target
405 structure on microRNA function. *Nat Struct Mol Biol* (2007) **14**:287–94.

406 34. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by
407 Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets.
408 *Cell* (2005) **120**:15–20.

409 35. Barnes D, Kunitomi M, Vignuzzi M, Saksela K, Andino R. Harnessing
410 endogenous miRNAs to control virus tissue tropism as a strategy for developing
411 attenuated virus vaccines. *Cell Host Microbe* (2008) **4**:239–48.

412 36. Hikichi M, Kidokoro M, Haraguchi T, Iba H, Shida H, Tahara H, Nakamura T.
413 MicroRNA regulation of glycoprotein B5R in oncolytic vaccinia virus reduces
414 viral pathogenicity without impairing its antitumor efficacy. *Mol Ther* (2011)
415 **19**:1107–15.

416 37. Baertsch MA, Leber MF, Bossow S, Singh M, Engeland CE, Albert J, Grossardt
417 C, Jäger D, von Kalle C, Ungerechts G. MicroRNA-mediated multi-tissue
418 detargeting of oncolytic measles virus. *Cancer Gene Ther* (2014) **21**:373–80.

419 38. Bofill-De Ros X, Gironella M, Fillat C. miR-148a- and miR-216a-regulated
420 oncolytic adenoviruses targeting pancreatic tumors attenuate tissue damage
421 without perturbation of miRNA activity. *Mol Ther* (2014) **22**:1665–77.

422 39. Geisler A, Jungmann A, Kurreck J, Poller W, Katus HA, Vetter R, Fechner H,
423 Müller OJ. microRNA122-regulated transgene expression increases specificity of
424 cardiac gene transfer upon intravenous delivery of AAV9 vectors. *Gene Ther*
425 (2011) **18**:199–209.

426 40. Ruiz AJ, Hadac EM, Nace RA, Russell SJ. MicroRNA-Detargeted Mengovirus
427 for Oncolytic Virotherapy. *J Virol* (2016) **90**:4078–92.

428 41. The future of cancer genomics. *Nat Med* (2015) **21**:99.

429 42. Klein D, Misawa R, Bravo-Egana V, Vargas N, Rosero S, Piroso J, Ichii H,
430 Umland O, Zhijie J, Tsinoremas N, et al. MicroRNA expression in alpha and beta
431 cells of human pancreatic islets. *PLoS One* (2013) **8**:e55064.
432 doi:10.1371/journal.pone.0055064

433 43. van de Bunt M, Gaulton KJ, Parts L, Moran I, Johnson PR, Lindgren CM, Ferrer
434 J, Gloyn AL, McCarthy MI. The miRNA profile of human pancreatic islets and
435 beta-cells and relationship to type 2 diabetes pathogenesis. *PLoS One* (2013)
436 **8**:e55272. doi:10.1371/journal.pone.0055272

437 44. Malmevik J, Petri R, Knauff P, Brattås PL, Åkerblom M, Jakobsson J. Distinct
438 cognitive effects and underlying transcriptome changes upon inhibition of
439 individual miRNAs in hippocampal neurons. *Sci Rep* (2016) **6**:19879.
440 doi:10.1038/srep19879

In review

441 45. Bofill-De Ros X, Santos M, Vila-Casadesús M, Villanueva E, Andreu N,
442 Dierssen M, Fillat C. Genome-wide miR-155 and miR-802 target gene
443 identification in the hippocampus of Ts65Dn Down syndrome mouse model by
444 miRNA sponges. *BMC Genomics* (2015) **16**:907. doi:10.1186/s12864-015-2160-
445 6

446 46. Malmevik J, Petri R, Klussendorf T, Knauff P, Åkerblom M, Johansson J, Soneji
447 S, Jakobsson J. Identification of the miRNA targetome in hippocampal neurons
448 using RIP-seq. *Sci Rep* (2015) **5**:12609. doi:10.1038/srep12609

449 47. Ameres SL, Horwich MD, Hung J-H, Xu J, Ghildiyal M, Weng Z, Zamore PD.
450 Target RNA-directed trimming and tailing of small silencing RNAs. *Science*
451 (2010) **328**:1534–9.

452 48. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and
453 therapy. *Trends Mol Med* (2014) **20**:460–9.

454 49. Skalsky RL, Cullen BR. Viruses, microRNAs, and host interactions. *Annu Rev*
455 *Microbiol* (2010) **64**:123–41.

456 50. Zhao H, Dahlö M, Isaksson A, Syvänen AC, Pettersson U. The transcriptome of
457 the adenovirus infected cell. *Virology* (2012) **424**:115–128.

458 51. Hu B, Li X, Huo Y, Yu Y, Zhang Q, Chen G, Zhang Y, Fraser NW, Wu D, Zhou
459 J. Cellular responses to HSV-1 infection are linked to specific types of alterations
460 in the host transcriptome. *Sci Rep* (2016) **6**:28075. doi:10.1038/srep28075

461 52. Zhao H, Chen M, Tellgren-Roth C, Pettersson U. Fluctuating expression of
462 microRNAs in adenovirus infected cells. *Virology* (2015) **478**:99–111.

463 53. Hodzic J, Sie D, Vermeulen A, van Beusechem VW. Functional Screening
464 Identifies Human miRNAs that Modulate Adenovirus Propagation in Prostate
465 Cancer Cells. *Hum Gene Ther* (2017)hum.2016.143. doi:10.1089/hum.2016.143

466 54. Qi Y, Tu J, Cui L, Guo X, Shi Z, Li S, Shi W, Shan Y, Ge Y, Shan J, et al. High-
467 Throughput Sequencing of MicroRNAs in Adenovirus Type 3 Infected Human
468 Laryngeal Epithelial Cells. *J Biomed Biotechnol* (2010) **2010**:1–8.

469 55. Ingle H, Kumar S, Raut AA, Mishra A, Kulkarni DD, Kameyama T, Takaoka A,
470 Akira S, Kumar H. The microRNA miR-485 targets host and influenza virus
471 transcripts to regulate antiviral immunity and restrict viral replication. *Sci Signal*
472 (2015) **8**:ra126. doi:10.1126/scisignal.aab3183

473 56. Makkoch J, Poomipak W, Saengchoowong S, Khongnomnan K,
474 Praianantathavorn K, Jinato T, Poovorawan Y, Payungporn S. Human
475 microRNAs profiling in response to influenza A viruses (subtypes pH1N1,
476 H3N2, and H5N1). *Exp Biol Med* (2016) **241**:409–420.

477 57. Chang ST, Thomas MJ, Sova P, Green RR, Palermo RE, Katze MG. Next-
478 Generation Sequencing of Small RNAs from HIV-Infected Cells Identifies
479 Phased microRNA Expression Patterns and Candidate Novel microRNAs
480 Differentially Expressed upon Infection. *MBio* (2013) **4**:e00549-12-e00549-12.
481 doi:10.1128/mBio.00549-12

482 58. Imig J, Motsch N, Zhu JY, Barth S, Okoniewski M, Reineke T, Tinguely M,
483 Faggioni A, Trivedi P, Meister G, et al. microRNA profiling in Epstein-Barr

In review

484 virus-associated B-cell lymphoma. *Nucleic Acids Res* (2011) **39**:1880–1893.

485 59. Gatto G, Rossi A, Rossi D, Kroening S, Bonatti S, Mallardo M. Epstein-Barr
486 virus latent membrane protein 1 trans-activates miR-155 transcription through the
487 NF- B pathway. *Nucleic Acids Res* (2008) **36**:6608–6619.

488 60. Wang F-Z, Weber F, Croce C, Liu C-G, Liao X, Pellett PE. Human
489 Cytomegalovirus Infection Alters the Expression of Cellular MicroRNA Species
490 That Affect Its Replication. *J Virol* (2008) **82**:9065–9074.

491 61. Zhang Y, Dai J, Tang J, Zhou L, Zhou M. MicroRNA-649 promotes HSV-1
492 replication by directly targeting MALT1. *J Med Virol* (2016)

493 62. Thornburg NJ, Hayward SL, Crowe JE. Respiratory Syncytial Virus Regulates
494 Human MicroRNAs by Using Mechanisms Involving Beta Interferon and NF- B.
495 *MBio* (2012) **3**:e00220-12-e00220-12. doi:10.1128/mBio.00220-12

496 63. Elton TS, Selemon H, Elton SM, Parinandi NL. Regulation of the MIR155 host
497 gene in physiological and pathological processes. *Gene* (2013) **532**:1–12.

498 64. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-
499 155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad*
500 *Sci U S A* (2007) **104**:1604–9.

501 65. Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratrix F, Fabani M, Milne RSB, Gotch F,
502 Boshoff C. miR - 132 regulates antiviral innate immunity through suppression of
503 the p300 transcriptional co-activator. *Nat Publ Gr* (2010) **12**:513–519.

504 66. Ru J, Sun H, Fan H, Wang C, Li Y, Liu M, Tang H. MiR-23a facilitates the
505 replication of HSV-1 through the suppression of interferon regulatory factor 1.
506 *PLoS One* (2014) **9**:e114021. doi:10.1371/journal.pone.0114021

507 67. Zhang Y, Dai J, Tang J, Zhou L, Zhou M. MicroRNA-649 promotes HSV-1
508 replication by directly targeting MALT1. *J Med Virol* (2016)

509 68. Wang X, Diao C, Yang X, Yang Z, Liu M, Li X, Tang H. ICP4-induced miR-101
510 attenuates HSV-1 replication. *Sci Rep* (2016) **6**:23205. doi:10.1038/srep23205

511 69. Noonan AM, Farren MR, Geyer SM, Huang Y, Tahiri S, Ahn D, Mikhail S,
512 Ciombor KK, Pant S, Aparo S, et al. Randomized Phase 2 Trial of the Oncolytic
513 Virus Pelareorep (Reolysin) in Upfront Treatment of Metastatic Pancreatic
514 Adenocarcinoma. *Mol Ther* (2016) **24**:1150–8.

515 70. Nuovo GJ, Garofalo M, Valeri N, Roulstone V, Volinia S, Cohn DE, Phelps M,
516 Harrington KJ, Vile R, Melcher A, et al. Reovirus-associated reduction of
517 microRNA-let-7d is related to the increased apoptotic death of cancer cells in
518 clinical samples. *Mod Pathol* (2012) **25**:1333–44.

519 71. Chen Y, Chen J, Wang H, Shi J, Wu K, Liu S, Liu Y, Wu J. HCV-induced miR-
520 21 contributes to evasion of host immune system by targeting MyD88 and
521 IRAK1. *PLoS Pathog* (2013) **9**:e1003248. doi:10.1371/journal.ppat.1003248

522 72. Triboulet R, Mari B, Lin Y-L, Chable-Bessia C, Bennasser Y, Lebrigand K,
523 Cardinaud B, Maurin T, Barbry P, Baillat V, et al. Suppression of microRNA-
524 silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* (2007) **315**:1579–
525 82.

In review

526 73. Otsuka M, Jing Q, Georgel P, New L, Chen J, Mols J, Kang YJ, Jiang Z, Du X,
527 Cook R, et al. Hypersusceptibility to vesicular stomatitis virus infection in
528 Dicer1-deficient mice is due to impaired miR24 and miR93 expression. *Immunity*
529 (2007) **27**:123–34.

530 74. Lecellier C-H, Dunoyer P, Arar K, Lehmann-Che J, Eyquem S, Himber C, Saïb
531 A, Voinnet O. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells.
532 *Science* (2005) **308**:557–60.

533 75. Yanagawa-Matsuda A, Kitamura T, Higashino F, Yamano S, Totsuka Y,
534 Shindoh M. E1A expression might be controlled by miR-214 in cells with low
535 adenovirus productivity. *Virus Res* (2012) **170**:85–90.

536 76. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis
537 C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* (2005)
538 **309**:1577–81.

539 77. Li Z, Cui X, Li F, Li P, Ni M, Wang S, Bo X. Exploring the role of human
540 miRNAs in virus-host interactions using systematic overlap analysis.
541 *Bioinformatics* (2013) **29**:2375–9.

542 78. Chang T-C, Yu D, Lee Y-S, Wentzel EA, Arking DE, West KM, Dang C V,
543 Thomas-Tikhonenko A, Mendell JT. Widespread microRNA repression by Myc
544 contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* (2008) **40**:43–50.

545 79. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero
546 A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, et al. MicroRNA expression profiles
547 classify human cancers. *Nature* (2005) **435**:834–8.

548 80. Hata A, Lieberman J. Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing
549 in cancer. *Sci Signal* (2015) **8**:re3. doi:10.1126/scisignal.2005825

550 81. van Rooij E, Kauppinen S. Development of microRNA therapeutics is coming of
551 age. *EMBO Mol Med* (2014) **6**:851–64.

552 82. Li X, Su Y, Sun B, Ji W, Peng Z, Xu Y, Wu M, Su C. An Artificially Designed
553 Interfering lncRNA Expressed by Oncolytic Adenovirus Competitively
554 Consumes OncomiRs to Exert Antitumor Efficacy in Hepatocellular Carcinoma.
555 *Mol Cancer Ther* (2016) **15**:1436–51.

556 83. Zheng Y, Stamminger T, Hearing P. E2F/Rb Family Proteins Mediate Interferon
557 Induced Repression of Adenovirus Immediate Early Transcription to Promote
558 Persistent Viral Infection. *PLoS Pathog* (2016) **12**:e1005415.
559 doi:10.1371/journal.ppat.1005415

560 84. Gong J, Mita MM. Activated ras signaling pathways and reovirus oncolysis: an
561 update on the mechanism of preferential reovirus replication in cancer cells.
562 *Front Oncol* (2014) **4**:167. doi:10.3389/fonc.2014.00167

563 85. Kirn DH, Wang Y, Le Boeuf F, Bell J, Thorne SH. Targeting of interferon-beta
564 to produce a specific, multi-mechanistic oncolytic vaccinia virus. *PLoS Med*
565 (2007) **4**:e353. doi:10.1371/journal.pmed.0040353

566 86. Cascalló M, Capellà G, Mazo A, Alemany R. Ras-dependent oncolysis with an
567 adenovirus VAI mutant. *Cancer Res* (2003) **63**:5544–50.

In review

87. Seymour LW, Fisher KD. Oncolytic viruses: finally delivering. *Br J Cancer* (2016) **114**:357–61.

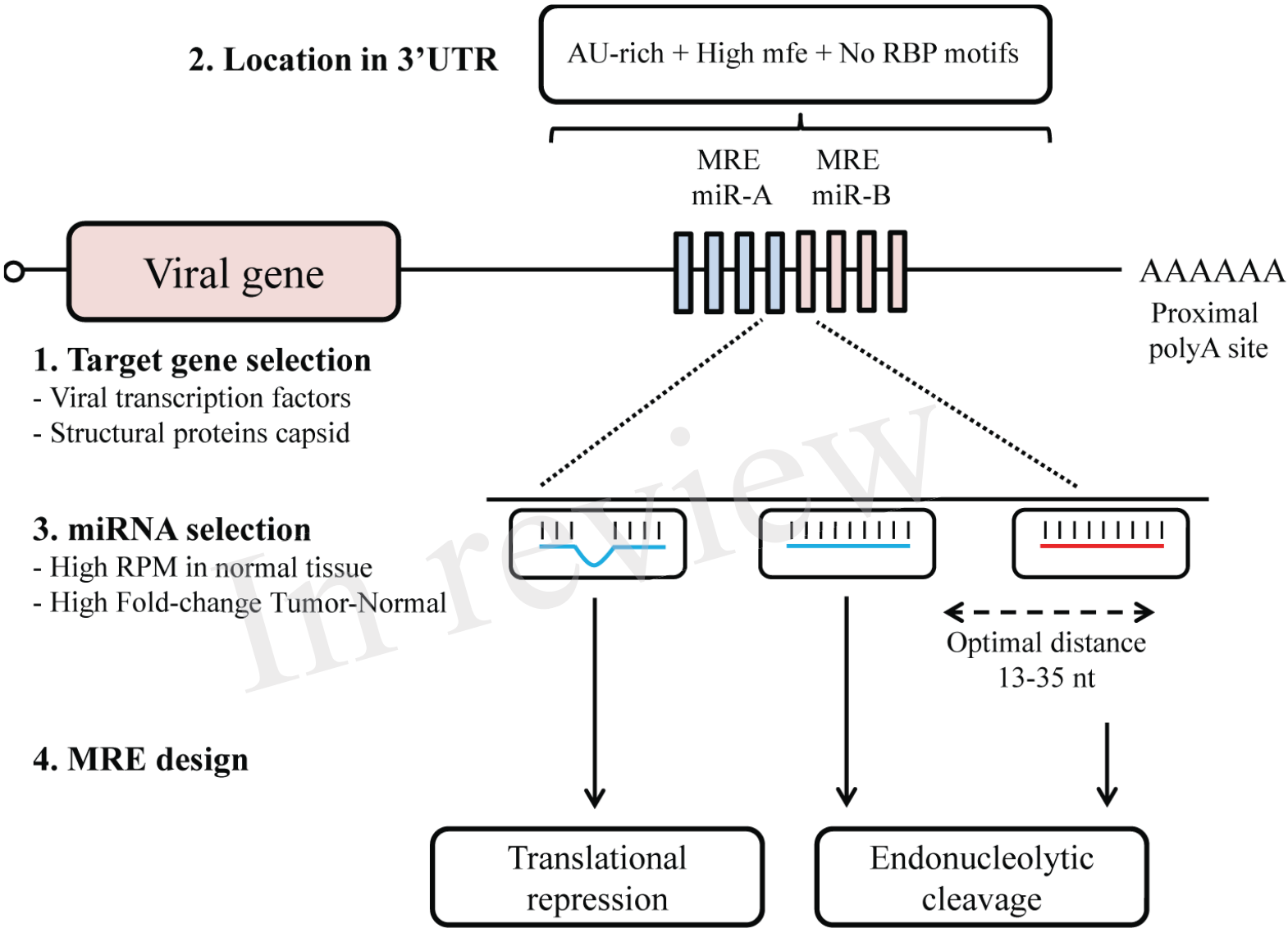
88. Fillat C, Jose A, Bofill-Deros X, Mato-Berciano A, Maliandi MV, Sobrevals L. Pancreatic cancer gene therapy: from molecular targets to delivery systems. *Cancers (Basel)* (2011) **3**:368–95.

In review

577
578 **Figure legends**
579
580 **Figure 1. MRE design for an optimal selectivity of oncolytic viruses.**
581 The design of MRE in oncolytic virotherapy has to take into account several elements
582 regarding the biology of the virus and the miRNA regulatory pathways. Although all
583 viral genes with 3'UTR are susceptible to be targeted though MRE (1), it is of notice the
584 toxicity of some viral proteins. An adequate location in the 3'UTR (2) together with a
585 sufficient miRNA expression (3) will contribute to the target recognition. Perfect
586 miRNA-MRE complementarity will trigger Ago2 slicing activity (4), however
587 imperfect base-paring with other miRNA family members will also contribute to the
588 regulation though translational repression.
589
590
591
592 **Figure 2. Host miRNA profile alterations in adenoviral infections.**
593 **A.** Changes in the miRNA profile during the course of an adenoviral infection. There
594 was a switch from more upregulated miRNAs at early steps to more down-regulated at
595 late phases, probably as a consequence of VA RNAs competition with host miRNA
596 biogenesis.
597 **B.** Adenoviral infections trigger the overexpression of specific miRNAs. Host miR-155
598 expression is induced as a consequence of the cell antiviral response. Viral infection
599 promotes the expression of miR-132 to counteract viral replication.
600

In review

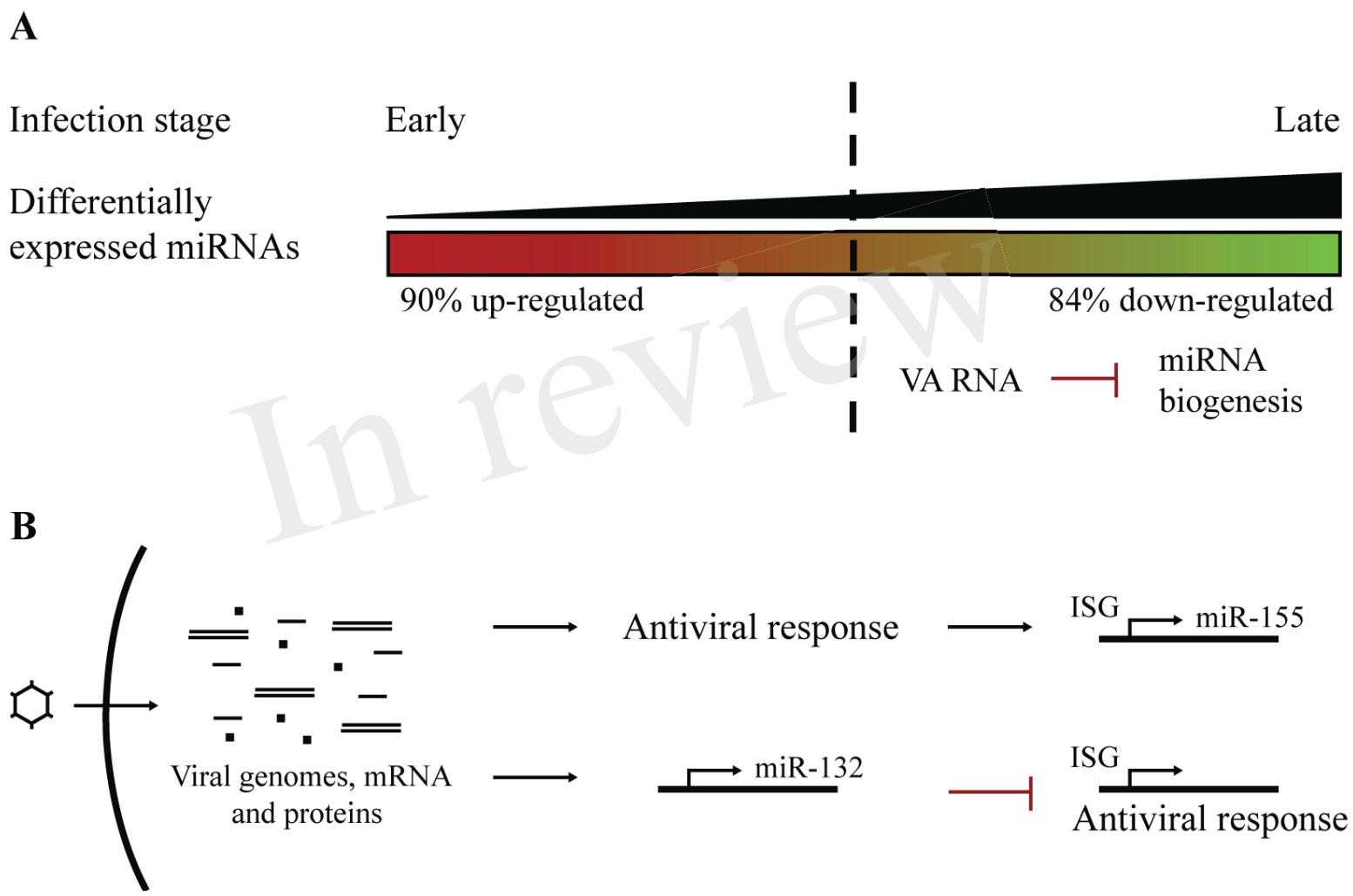
Figure 1.TIF



MRE Effect	Moderate repression	Strong repression
Mechanism	Argonaute-induced tranlational repression and mRNA decay	Argonaute-2 direct slicing
Candidates	Most miRNA families (e.g. miR-148)	Single miRNA or high homology families (e.g. let-7)

In review

Figure 2.TIF



In review