

Relazione anno 2010 del progetto di ricerca:

Uso di vettori lentivirali per trasdurre linee cellulari di adenocarcinoma colorettales con shRNAs silenzianti il gene *herg1* e loro applicazione in studi pre-clinici.

Prof.ssa Annarosa Arcangeli, Dipartimento di Patologia e Oncologia Sperimentali, Viale GB. Morgagni, 50, Università di Firenze.

Riassunto

I lentivirus rappresentano il vettore molto efficace per il trasferimento genico in linee cellulari di mammifero. Durante lo svolgimento del progetto nel 2010 abbiamo ottimizzato i protocolli di produzione e trasduzione lentivirale focalizzando la nostra attenzione soprattutto sul canale ionico hERG1. Abbiamo potuto verificare che la sua inibizione tramite interferenza dell'RNA mediata da vettori lentivirali è in grado di ridurre la capacità proliferativa delle cellule di adenocarcinoma colorettales (HCT116) *in vitro*. Inoltre abbiamo osservato che le linee cellulari silenziate cioè con una ridotta espressione del canale HERG1, hanno una maggiore sensibilità al chemioterapico cisplatino rispetto alle cellule HCT116 trasdotte con virus di controllo non-silenzianti.

Sulla base dei risultati ottenuti proponiamo di proseguire questa ricerca nell'anno 2011 con un progetto dal titolo: caratterizzazione delle linee cellulari trasdotte con lentivirus silenzianti i canali ionici della famiglia hERG e SK4 e loro ruolo nella farmacoresistenza. Con questo progetto ci proponiamo di approfondire il ruolo dei canali ionici nella progressione tumorale ed il loro coinvolgimento in meccanismi di farmacoresistenza.

Inoltre vorremmo produrre dei lentivirus in grado di trasferire in modo stabile il gene della luciferasi in linee cellulari tumorali da impiantare in modelli animali pre-clinici. Con questa tecnica sarà possibile monitorare la progressione tumorale e valutare l'attività farmacologica di inibitori ed attivatori dei canali ionici tramite misurazione della luminescenza *in vivo*.

Introduzione

I lentivirus rappresentano un vettore virale molto efficace per trasferire sequenze geniche in cellule target poiché sono capaci di infettare numerosi tipi cellulari, sia proliferanti che quiescenti, integrandosi stabilmente nel loro genoma. Il trasferimento genico è una tecnica che ha importanti applicazioni biologiche e cliniche, ad esempio per il ripristino della corretta espressione di un gene mutato, la sua iper-espressione oppure il suo silenziamento, tramite una degradazione post-transcrizionale degli mRNA messaggeri del gene target.

I canali ionici svolgono un ruolo critico nella progressione tumorale di diversi tipi di tumore. Analisi preliminari hanno messo in evidenza un'espressione deregolata di due canali ionici del potassio hERG1 e SK4 in tumori primari di adenocarcinoma coloretale. Quindi, nello svolgimento di questo progetto abbiamo sviluppato delle tecniche basate sull'utilizzo dei lentivirus per trasferire, nel genoma di cellule tumorali, sia sequenze di *short hairpin* RNA, in grado riconoscere i trascritti di questi geni e silenziarli (RNAi) che per produrre plasmidi lentivirali in grado di iperesprimerli.

Durante lo svolgimento di questo programma di ricerca nel 2010 abbiamo svolto i seguenti punti:

- 1) Ottimizzazione dei protocolli per la produzione del virus e la loro titolazione.
- 2) Produzione lentivirus in grado di silenziare il gene hERG1 con cui abbiamo trasdotto la linea cellulare HCT116 (derivata da un adenocarcinoma del colon-retto) *in vitro*.
- 3) Comparazione diverse linee cellulari di adenocarcinoma del colon-retto (HT29, H630, HCT116, HCT8) con le linee silenziate per il gene hERG1.
- 4) Caratterizzare funzionale delle nuove linee cellulari silenziate e valutazione delle eventuali differenze nella farmacoresistenza rispetto alla linee cellulari non-silenziate.
- 5) Costruzione di un plasmide lentivirale in cui abbiamo clonato l'intero gene hERG1 per ottenere una sua iper-espressione nelle cellule infettate.
- 6) Caratterizzazione di linee cellulari di adenocarcinoma pancreatico.

Analisi dell'espressione genica

Una volta prodotto e quantificato i lentivirus silenzianti il gene hERG1 abbiamo trasdotto una linea cellulare di adenocarcinoma del colon-retto HCT116 con una concentrazione virali MOI=3 (cioè con 3 particelle virali per cellula). Abbiamo verificato che oltre l'80% delle

cellule sono state efficacemente trasdotte. Così facendo abbiamo ottenuto delle nuove linee cellulari derivate dalla linea HCT116 stabilmente silenziate per il gene hERG1.

Per verificare il livello dell'espressione di hERG1 e di altri geni abbiamo estratto l'RNA da queste linee cellulari cresciute in vitro e dopo averne verificato l'integrità tramite il Bioanalyzer, abbiamo retrotrascritto 1 µg di RNA in modo da ottenere il cDNA.

Successivamente i campioni sono stati analizzati tramite Real-Time PCR. L'efficienza delle differenti coppie di primers utilizzati è stata precedentemente testata tramite una serie di diluizioni seriali del cDNA precedentemente retrotrascritto. L'analisi della curva standard ottenuta dall'analisi delle diluizioni seriali ha mostrato valori di $R^2 > 0,9$ e *slope* comprese tra -3,1 e -3,6, dimostrando un'appropriata efficienza dei primers compresa fra 90% e 110%.

Complessivamente sono stati analizzati i cDNA ottenuti da 4 linee cellulari stabilizzate di carcinoma del colon (HT29, H630, HCT116, HCT8) e i cDNA delle tre linee cellulari trasdotte con lentivirus (sh4, pLKO.1 e sh7) derivanti dalla linea HCT116, per i geni hERG1, SK4 e GAPDH.

Dall'analisi di questi dati effettuata mediante il metodo di Pfaffl, sono stati calcolati i livelli di espressione di hERG1 e SK4, riportati come fold rispetto all'espressione della linea HT29 e normalizzati per il gene GAPDH (figura 1 e 2).

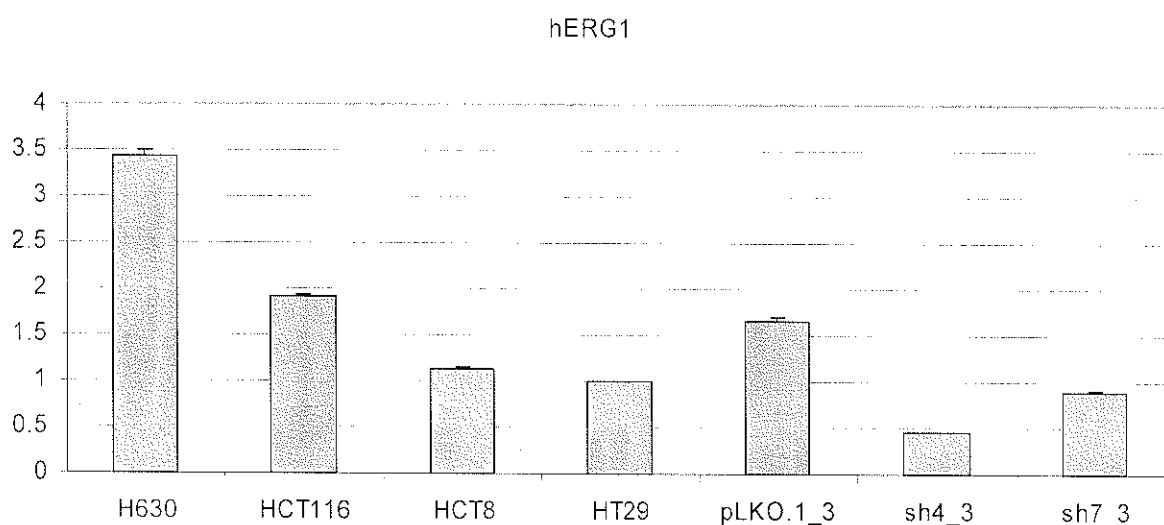


Figura 1: istogramma dei livelli di espressione del gene hERG1 nelle linee di adeno carcinoma colorettaie H630, HCT116, HCT8, HT29 e le linee silenziate pLKO.1 (controllo), sh4, sh7 derivate dalla linea HCT116.

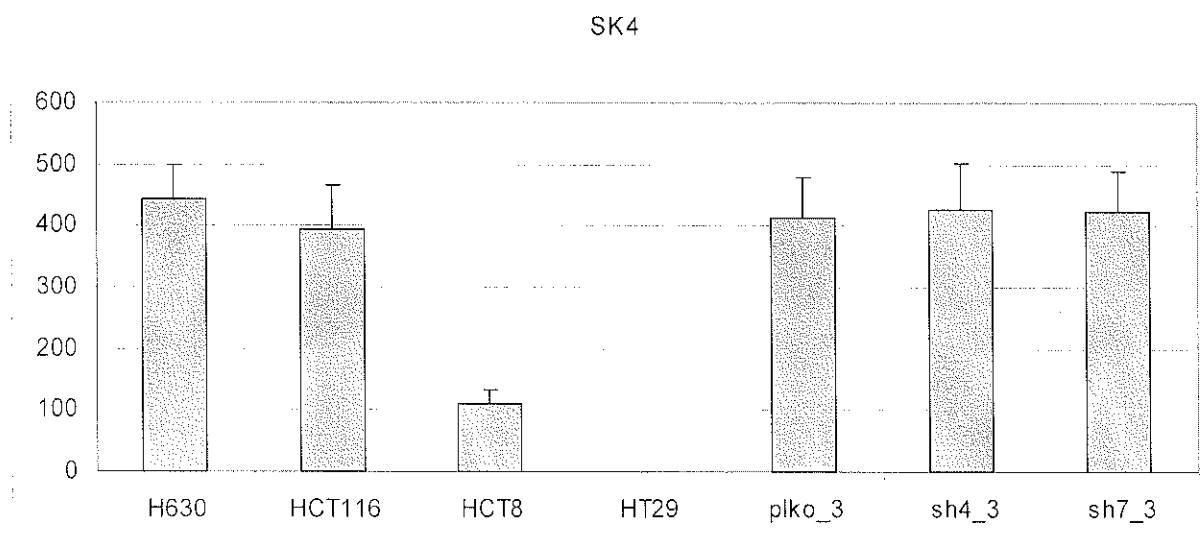


Figura 2: istogramma dei livelli di espressione del gene hERG1 nelle linee di adeno carcinoma colorettaie H630, HCT116, HCT8, HT29 e le linee silenziate pLKO.1 (controllo), sh4, sh7 derivate dalla linea HCT116.

Analizzando questi dati è possibile osservare che l'espressione dei due geni presi in esame varia nelle varie linee cellulari studiate. Per quanto riguarda le linee di tumore del colon HCT8 e HT29 hanno un basso livello d'espressione del gene hERG1 rispetto alle altre linee mentre le linee HCT630 e HCT116 mostrano un livello di espressione del gene molto elevato. Esaminando invece le linee trasdotte è possibile osservare che le linee silenziate presentano una forte riduzione dell'espressione del gene hERG1, in particolare la sh4 segno evidente che la trasduzione con il lentivirus è stata efficace portando al silenziamento del gene. Invece, la linea pLKO.1 presenta un'espressione paragonabile a quella delle HCT116, in quanto le cellule pLKO.1 sono state trasdotte con un vettore vuoto e rappresentano quindi la linea di controllo non-silenziata.

Prendendo in esame invece il gene SK4 si può evidenziare come i suoi livelli di espressione siano simili all'espressione di hERG1 nelle cellule tumorali di colon stabilizzate, al contrario nelle linee trasdotte l'espressione di SK4 è simile a quella misurata nelle HCT116 e pLKO.1

mostrando che il silenziamento di hERG1 è specifico e non il frutto di una diminuzione generalizzata dell'espressione genica.

Analisi proliferazione cellulare e ciclo cellulare

Le linee cellulari tradotte presentano una riduzione nella proliferazione cellulare misurata mediante un esperimento di crescita delle cellule in soft-agar e successiva misurazione dei diametri delle colonie ottenute. Le dimensioni dei diametri mostrano una riduzione della crescita delle colonie prodotte a partire da cellule delle linee cellulari silenziate (Kruskal-wallis test, $P < 0.0001$) (Figura 3).

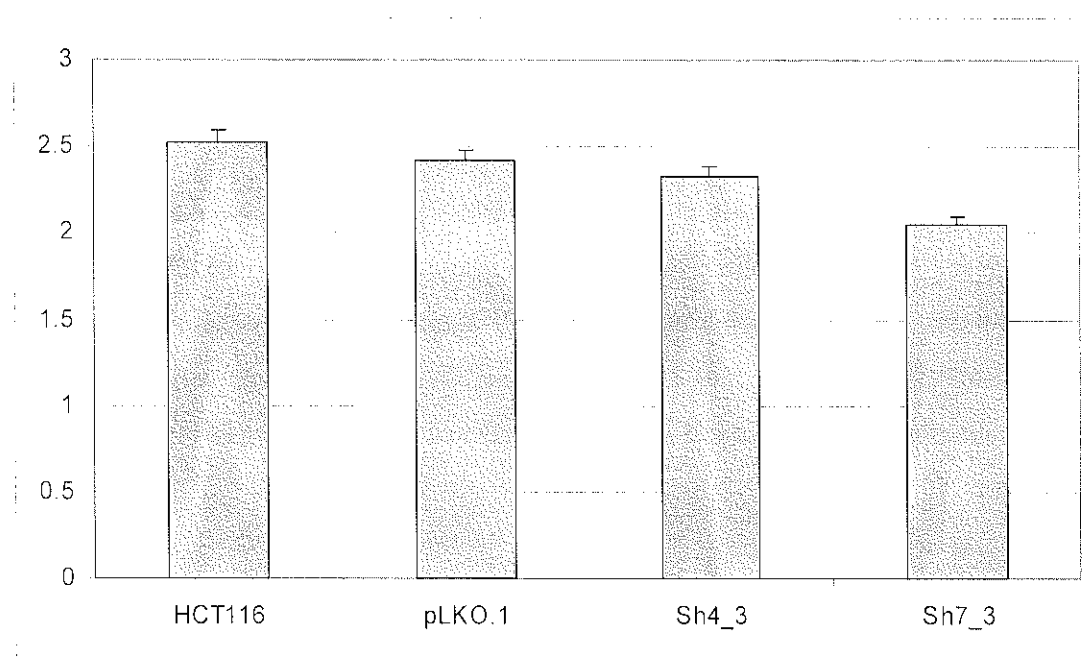


Figura 3: crescita delle colonie in soft-agar. I diagrammi rappresentano le misure dei diametri delle colonie ottenute, Kruskal-wallis test, $P < 0.0001$; Dunn's multiple comparison test HCT116 vs. Sh7_3 $P < 0.001$ pLKO.1 vs. Sh7_3 $P < 0.001$ Sh4_3 vs. Sh7_3 $P < 0.001$.

Lo studio del ciclo cellulare mediante citofluorimetria ha inoltre messo in evidenza un ritardo nell'entrata in fase S delle cellule silenziate in particolare nella linea cellulare silenziata sh7 da cui presumibilmente deriva il rallentamento della proliferazione cellulare descritto nell'esperimento di crescita in soft-agar.

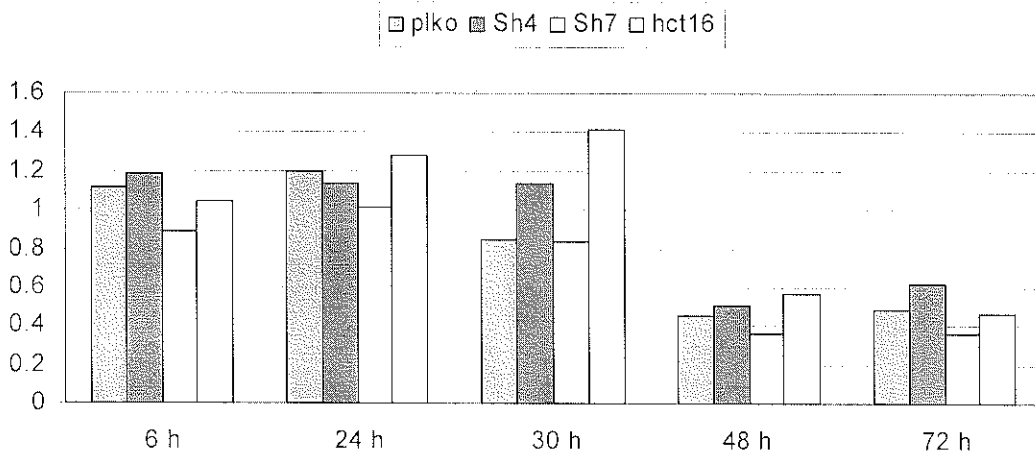


Figura 4: analisi al citofluorimetrica delle linee cellulari silenziate e controlli. La linea sh7 mostra un ritardo nell'entrata in fase S rispetto alle altre linee (paired t-test: $p=0.0310$, two-tailed).

Elettrofisiologia

L'analisi elettrofisiologica delle correnti cellulari prodotte dal canale ionico HERG1 hanno mostrato una riduzione dei canali funzionalmente attivi nelle cellule silenziate. Confermando un effetto funzionale del silenziamento di hERG1 nella linea cellulare trasdotta.

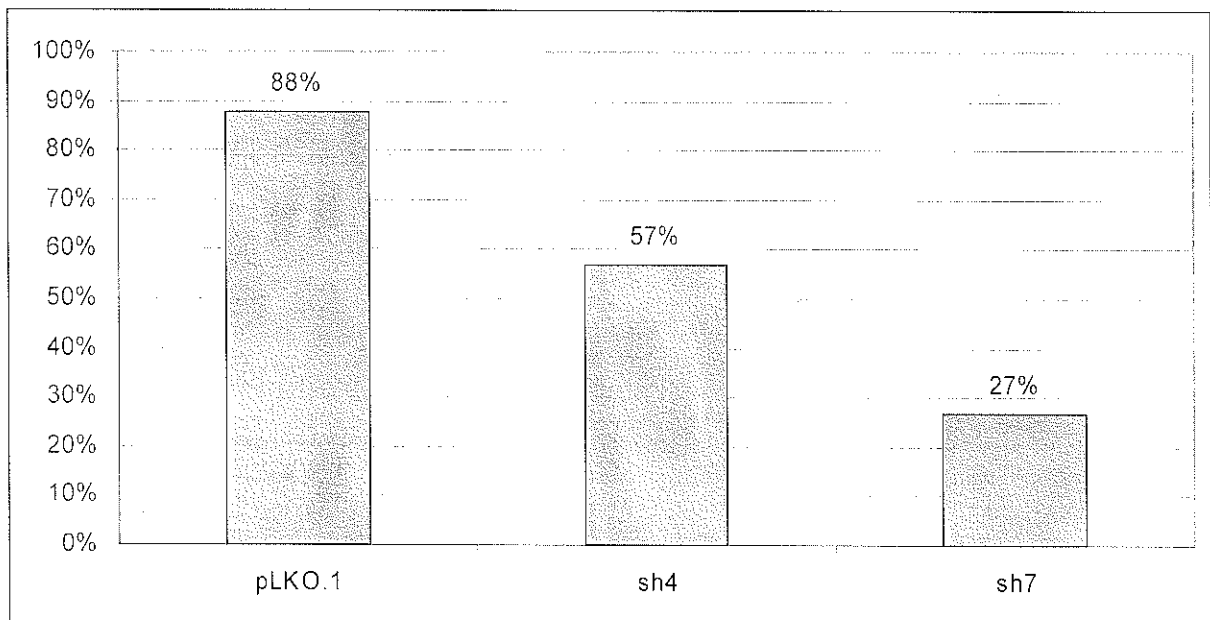


Figura 5: L'analisi funzionale dell'attività fisiologica del canale HERG1 ha mostrato una forte riduzione nelle cellule silenziate (sh4 e sh7) rispetto ai controlli (pLKO.1) ($\chi^2 = 0.033$)

Farmacoresistenza: valutazione dell'effetto del cisplatino sulle linee di adenocarcinoma colorettales

Determinazione della dose di cisplatino da utilizzare negli esperimenti

Una volta caratterizzate le linee cellulari di adenocarcinoma colorettales e le loro derivate silenziata abbiamo valutato se queste linee cellulari avevano una differente risposta ad un chemioterapico: il cisplatino.

In un primo esperimento le cellule provenienti dalle linee cellulari HT29, HCT8, H630 e HCT116 sono state trattate con dosi crescenti di farmaco (7,5 -15 - 22,5 $\mu\text{g/ml}$) per 36 ore. L'analisi al citofluorimetro sono stati ottenuti i risultati riportati in figura 6:

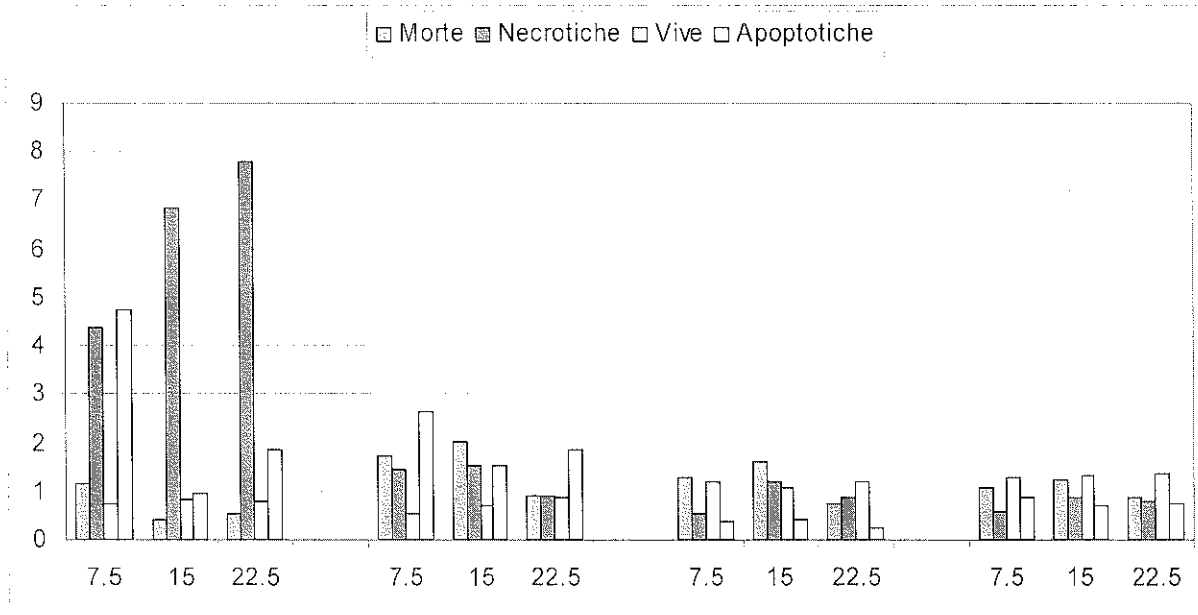


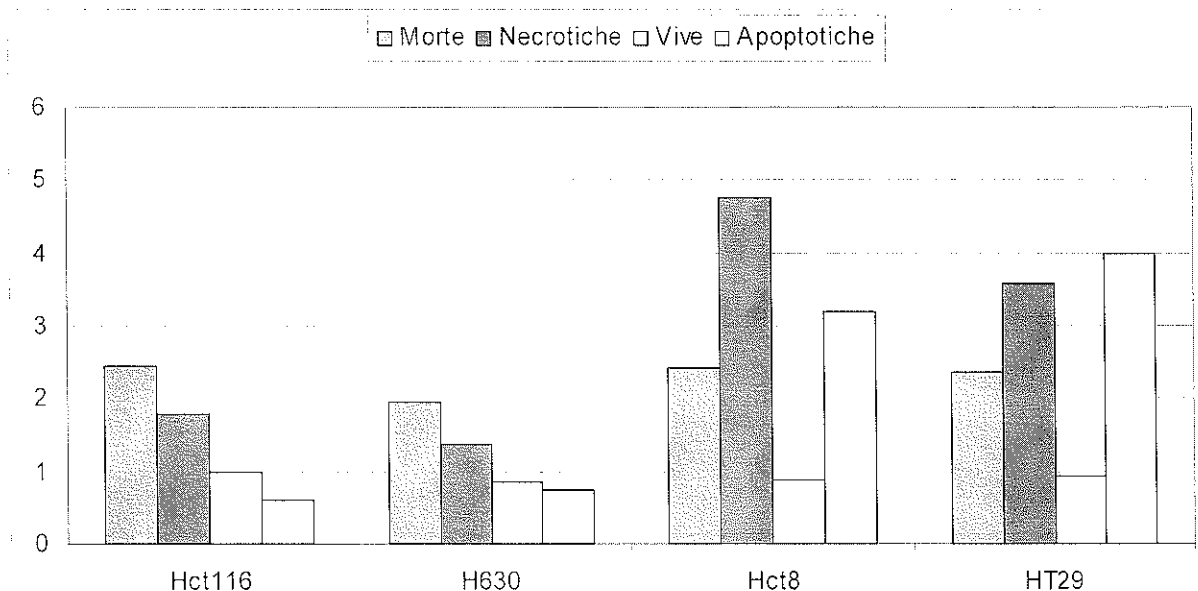
Figura 6: Istogramma relativo alla quantità di cellule vive, morte, apoptotiche e necrotiche dopo trattamento con differenti concentrazioni di cisplatino: 7,5 $\mu\text{g/ml}$; 15 $\mu\text{g/ml}$; 22,5 $\mu\text{g/ml}$ dopo 36 ore nelle linee HCT8, HT29, HCT116 e H630.

Analizzando questi dati è possibile osservare che le linee cellulari hanno una sensibilità variabile all'azione del farmaco. In particolare le linee HCT8 e HT29 risultano più sensibili mentre le linee più resistenti all'azione del farmaco sono risultate essere la HCT116 e le

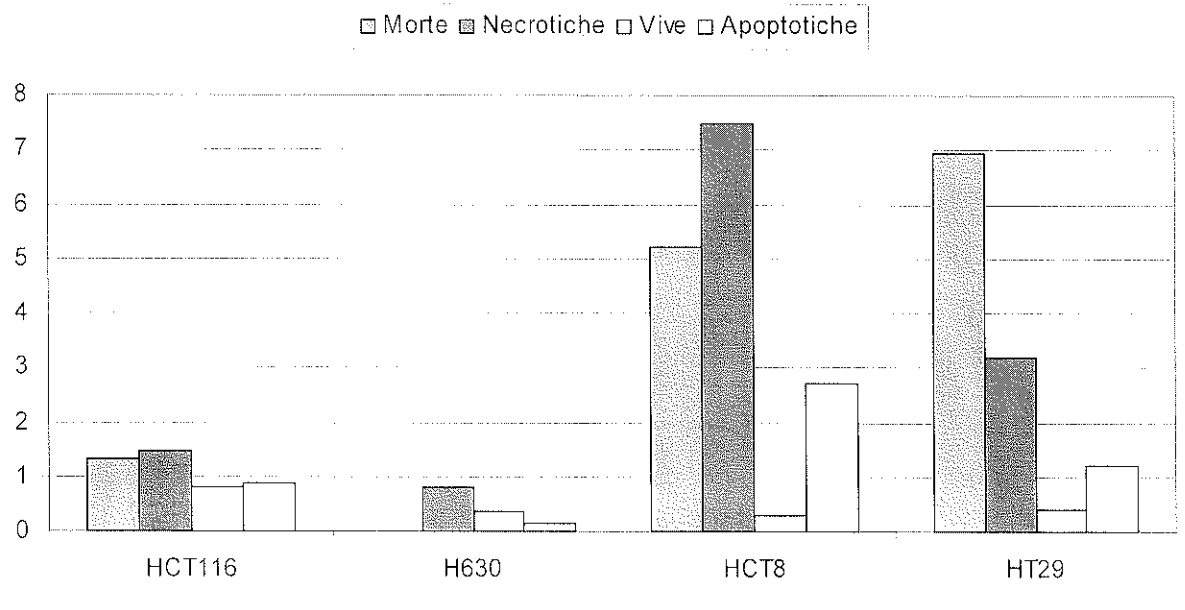
H630. La concentrazione 22,5 $\mu\text{g/ml}$ appare essere troppo aggressiva per le linee più sensibili mentre la concentrazione 15 $\mu\text{g/ml}$ sembra essere la più appropriata per poter studiare assieme queste linee cellulari.

Effetto del cisplatino sulle linee cellulari stabilizzate di carcinoma del colon

Per confermare questi risultati è stato condotto un secondo esperimento sulle stesse linee cellulari, utilizzando solo la concentrazione di 15 $\mu\text{g/ml}$ di Cisplatino per 24 ore condotta sia nelle cellule rimaste adese alla piastra sia su quelle presenti nel sovrinatante tramite analisi citofluorimetrica. I risultati ottenuti sono stati riportati figura 7 (A-B):



(A)



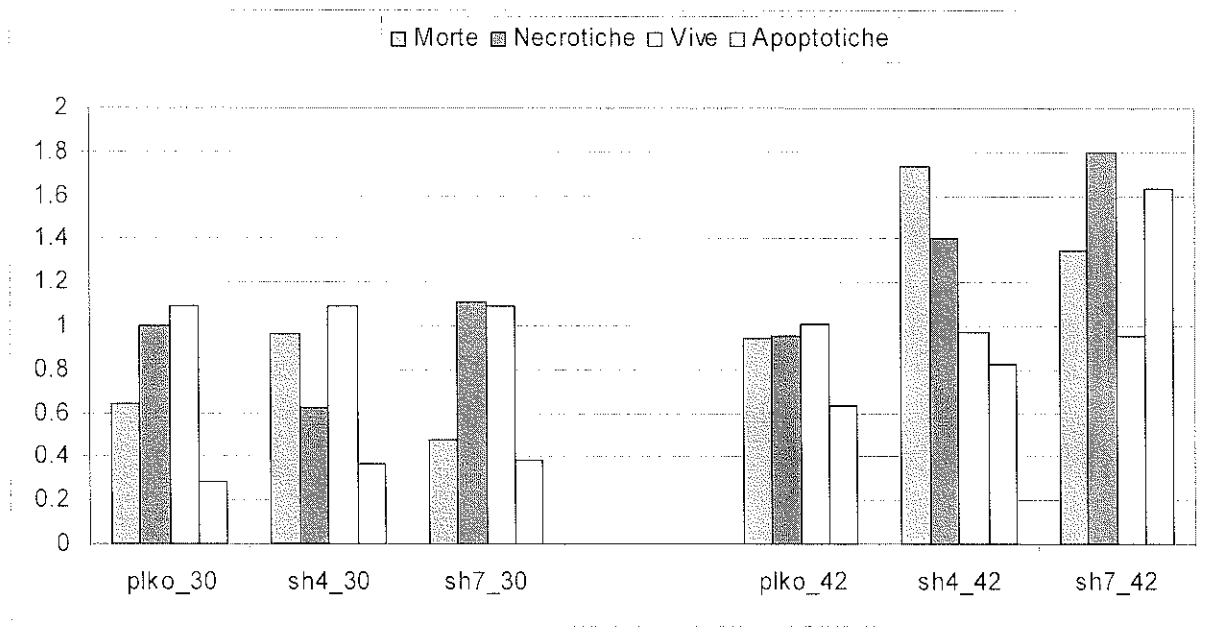
(B)

Figura 7: istogramma relativo alla quantità di cellule vive, morte, apoptotiche e necrotiche dopo trattamento con 15 µg/ml di cisplatino per 24 ore. (A) = cellule adese; (B) = cellule presenti nel sovrinatante.

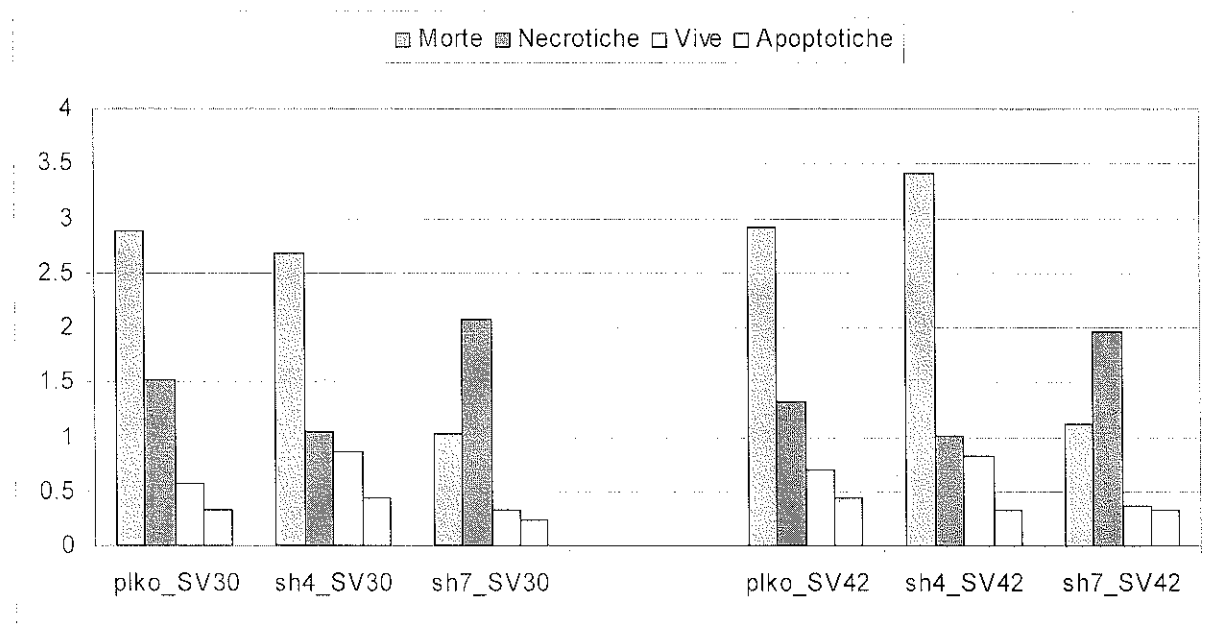
Il trattamento con 15 µg/ml di cisplatino per 24 ore ha confermato il primo esperimento. Infatti nel complesso i risultati ottenuti nel sovrinatante e nelle cellule rimaste adese alla piastra le HCT8 e le HT29 risultano essere le più sensibili mentre le HCT116 e le H630 sono le più resistenti all'effetto del cisplatino.

Effetto del cisplatino sulle linee cellulari silenziate

In un terzo esperimento sono state prese in esame le linee cellulari silenziate pLKO.1 (controllo non-silenziate), sh4 e sh7. In questo caso le cellule sono state trattate con dosi di farmaco sempre crescenti ma a concentrazioni più elevate (37,5 e 52,5 µg/ml). Dopo 24 ore è stata eseguita la lettura al citofluorimetro evidenziando i risultati riportati in figura 8 (A-B):



(A)



(B)

Figura 8: Istogramma relativo alla quantità di cellule vive, morte, apoptotiche e necrotiche dopo trattamento con $30 \mu\text{l} = 37,5 \mu\text{g/ml}$ e $42 \mu\text{l} = 52,5 \mu\text{g/ml}$ di cisplatino a 24 ore sulle linee cellulari pLKO.1, sh4 e sh7 adese (A) e nel sovrinatante (B).

Analizzando questi risultati è possibile notare come le linee cellulari sh4 e sh7 derivate dalla linea HCT116 siano più sensibili all'azione del farmaco rispetto al controllo pLKO.1. Si registra infatti indipendentemente dalla concentrazione utilizzata e un aumento, del numero di

cellule apoptotiche, necrotiche e morte nelle cellule silenziate. La linea che presenta una maggior sensibilità risulta essere l'sh7 mentre la linea cellulare pLKO.1, che rappresenta il controllo, risulta la più resistente delle tre.

Costruzione di un plasmidi lentivirali per l'espressione del canale ionico hERG1.

Per indurre l'iperespressione del canale HERG1 abbiamo clonato il gene hERG1 in un plasmide lentivirale (pCCLsin.PPT.Hpgk.GFP.pre) contenente il promotore Human Phosphoglicerato kinase (hPGK). Il gene hERG1 è stato precedentemente clonato nel plasmide pECFP-C1 (Clontech) contenente la Cian Fluorescent Protein (CFP) tra i siti di restrizione per gli enzimi AgeI e BamHI ottenendo il plasmide pECFP-C1-herg1. Per poter inserire il gene CFP-herg1 all'interno del pCCLsin.PPT.Hpgk.GFP.pre è stato aggiunto il sito di restrizione per l'enzima Sall a valle del sito di restrizione per BamHI.

Il clonaggio è stato eseguito nel seguente modo:

1) Formazione del sito di restrizione per Sall nel plasmide pECFP-C1

Allo scopo di inserire il sito di restrizione di Sall abbiamo utilizzato due coppie di primers. La prima, che amplifica una regione di 190 pb è formata dal primer forward denominato BamHI- UP (5' – ACATGGTCCTGCTGGAGTTC – 3') che si appaia a partire dalla base numero 1265 e il primer reverse denominato Sall – DOWN (3' – GCAAGTAAAACGTCGACAAATGTGG – 5'), che si appaia a partire dalla base 1454 e contiene due mutazioni puntiformi che permettono di ottenere il sito di restrizione per Sall. La seconda coppia che amplifica una regione di 198 pb è formata dal primer forward denominato Sall – UP (5' - CCACATTTGTCGACGTTTTACTTGC- 3') che si appaia a partire dalla base 1430 e contiene due mutazioni puntiformi che permettono di ottenere il sito di restrizione di Sall e dal primer reverse denominato MfeI – DOWN (3' - TGAGTTTGGACAAACCACAAC- 5') che si appaia a partire dalla base 1627.

Il DNA amplificato e purificato è stato utilizzato per una reazione di PCR che prevedeva la presenza di entrambe le bande ed utilizzava il primer BamHI-UP come primer forward e il primer MfeI – DOWN come primer reverse. Abbiamo sfruttato il fatto che le due bande si possono appaiare a livello della sequenza contenente la mutazione che genera il sito di Sall come è possibile osservare dalla successive sequenze:

5' - CCACATTTGTCGACGTTTTACTTGC. - 3'
3' - GGTGTA AACAGCTGC AAAATGAACG - 5'

La reazione di PCR amplifica un DNA di 385 pb. La banda è stata estratta da gel e purificata.

2) Clonaggio della banda amplificata contenente il sito di restrizione per Sall all'interno del plasmide pECFP-C1-herg1.

La banda purificata e il plasmide pECFP - C1 - herg1 sono stati digeriti con gli enzimi di restrizione BamHI ed MfeI. I campioni di DNA digeriti sono stati analizzati mediante elettroforesi, estratti da gel e purificati. La digestione enzimatica è stata analizzata mediante elettroforesi. In questo modo il sito di restrizione per l'enzima Sall è stato inserito nel plasmide pECFP-C1 -herg1. Le due bande sono state sottoposte al processo di ligazione mediante l'utilizzo della T4 ligasi. Dopo la ligazione il DNA è stato utilizzato per l'elettroporazione di batteri Top 10FI, che successivamente sono stati seminati in apposite piastre contenenti terreno (Luria Broth e Agar) addizionato a kanamicina, antibiotico per il quale il plasmide pECFP-herg1 è resistente. Una volta ottenute le colonie i batteri sono stati cresciuti in coltura liquida ON a 37°C ed il DNA plasmidico è stato estratto ed analizzato.

Per testare la reale presenza del sito per Sall il plasmide pECFP-C1-herg1 è stato sottoposto a digestione enzimatica con l'enzima Sall. E' stata inoltre effettuata un'ulteriore verifica per escludere la possibilità che il plasmide pECFP-C1 si fosse chiuso su se stesso, sottoponendo il vettore ad una doppia digestione con gli enzimi HindIII e BamHI, siti unici all'interno dei quali è clonato herg1.

I campioni digeriti sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica. I risultati delle digestioni sono mostrati nella figura 9. Questi dati confermano che la mutazione è stata inserita correttamente all'interno del plasmide pECFP-C1-herg1 e quindi che è stato creato il sito di restrizione per Sall.

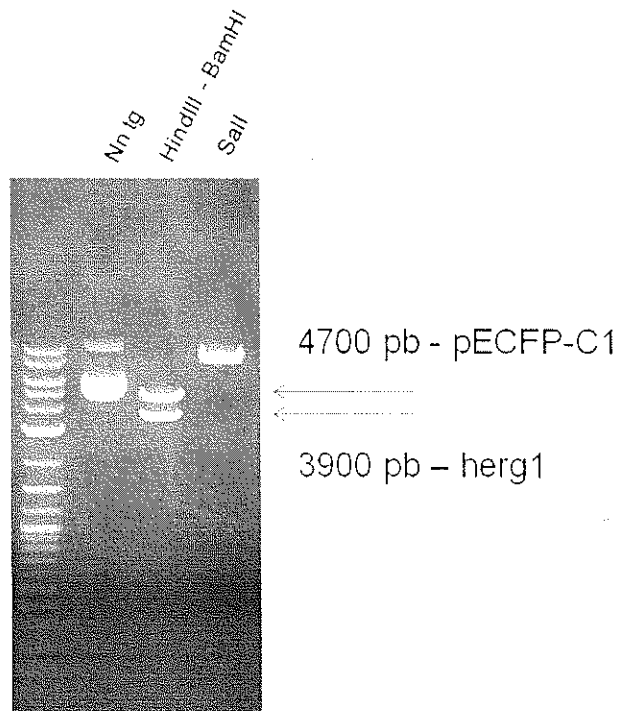


Figura 9: l'immagine mostra la corsa elettroforetica del campione pECFP-C1-herg1. Alla destra dello standard è possibile osservare il plasmide circolare, seguito dal plasmide sottoposto a digestione enzimatica con gli enzimi HindIII e BamHI, seguito dal plasmide digerito con l'enzima Sall.

3) Inserimento di CFP-herg1 all'interno del plasmide per l'iperespressione di hERG1

Il plasmide pECFP-C1-herg1 e il plasmide pCCLsin.PPT.Hpgk.GFP.pre sono stati sottoposti a digestione enzimatica con gli enzimi AgeI e Sall. Il DNA digerito è stato analizzato mediante elettroforesi. L'immagine che segue mostra il risultato ottenuto.

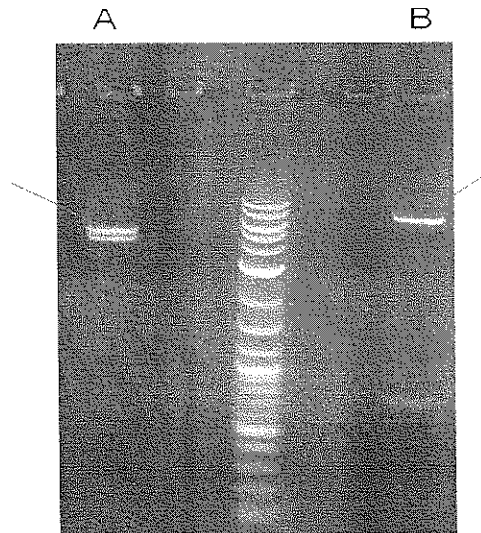


Figura 10: l'immagine rappresenta la corsa elettroforetica del plasmide pECFP-C1-herg1 + Sall (A) e del plasmide pCCLsin.PPT.Hpgk.GFP.pre (B) sottoposti a taglio enzimatico con gli enzimi Age I e Sall.

Le bande indicate in fig. 5 dalle frecce rosse, e precisamente la banda di circa 5000 pb del plasmide pECFP-C1-herg1 + Sall e la banda di circa 11.000 pb del plasmide pCCLsin.PPT.Hpgk.GFP.pre sono state estratte e purificate da gel e successivamente sottoposte a ligazione.

Alla ligazione è seguita: l'elettroporazione del vettore pCCLsin.PPT.Hpgk.GFP.pre contenente CFP-herg1 in batteri Top10FI, la crescita delle colonie ampicillina - resistenti, la replicazione dei batteri e l'estrazione del DNA plasmidico. Il DNA è stato testato con diverse digestioni enzimatiche (dati non riportati).

4) Transfezione transiente del plasmide pCCLsin.PPT.Hpgk.GFP.pre contenente herg1 nella linea cellulare di cellule embrionali renali HEK293

Per valutare se il gene inserito all'interno del plasmide veniva trascritto e tradotto correttamente portando cioè all'espressione di un canale HERG1 funzionante, il plasmide pCCLsin.PPT.Hpgk.GFP.pre contenente il gene herg1 è stato transfettato sulla linea HEK 293, mediante l'utilizzo di lipofectamine.

Dopo 48 ore dalla transfezione le cellule sono state utilizzate in parte per l'estrazione delle proteine totali in parte sono state sottoposte ad analisi elettrofisiologiche.

Le proteine totali estratte sono state analizzate mediante Western Blot, utilizzando per la rivelazione un anticorpo policlonale anti-HERG1. In figura 6 sono mostrati i risultati ottenuti.

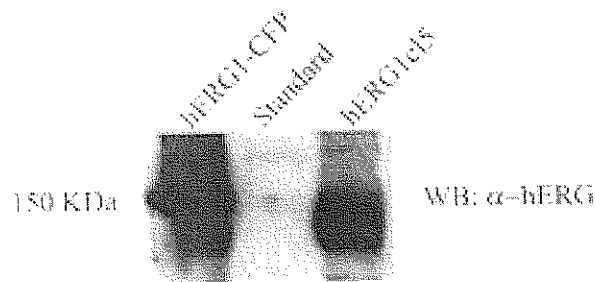


Figura 11: analisi delle proteine totali mediante Western Blot. Alla destra dello standard si osserva una banda a 155 KDa, che rappresenta la forma matura del canale HERG1, alla sinistra dello standard si osserva oltre alla presenza di un banda a 155 KDa, una banda di peso molecolare superiore, di circa 165 KDa, rappresentativa della proteina CFP.

Inoltre l'analisi delle registrazioni elettrofisiologiche, confermano che la proteina codificata dal gene CFP-herg1 è funzionante in quanto è presente la classica corrente I_{HERG1} .

Espressione del canale ionico HERG1 nell' adenocarcinoma pancreatico.

L'adenocarcinoma pancreatico è la forma più diffusa di tumore pancreatico che nel suo insieme rappresenta la seconda causa di morte tra le neoplasie, con un tasso di sopravvivenza a cinque anni minore del 6% (American Database 1975-2006) e una sopravvivenza media di 18 mesi dalla diagnosi per quei pazienti operati senza un'evidenza di malattia residua. L'aggressività di questo tumore è principalmente dovuta alla sua crescita aggressiva e al rapido sviluppo di metastasi a distanza, rendendo il trattamento estremamente difficile.

Abbiamo potuto dimostrare che il canale hERG1 è espresso in linee di adenocarcinoma pancreatico (Fig.1), in tumori primari (Fig.2) e in xenograft.

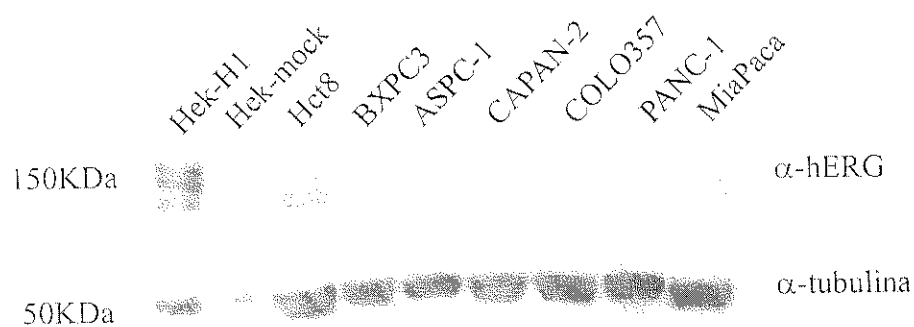


Figura 12: Western Blot su linee di adenocarcinoma pancreatico marcato con un anticorpo anti-hERG1 policlonale.

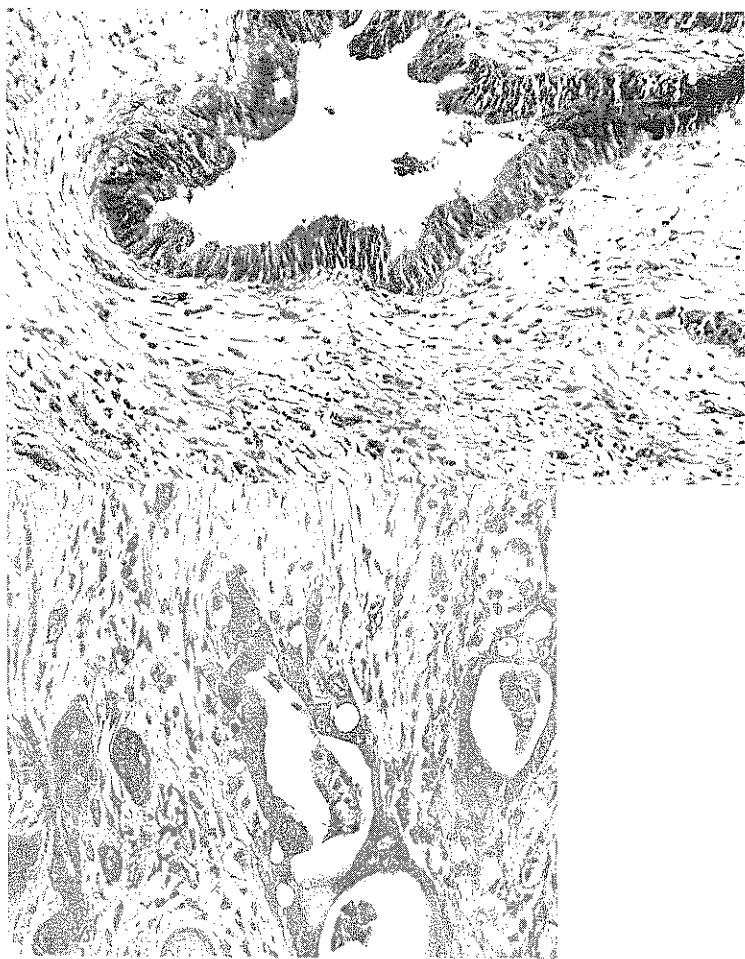


Figura 13: Immunoistochimica su campioni di tumore primario utilizzando l'anticorpo monoclonale anti-hERG1 di nostra produzione.