

Relazione progetto dal titolo “Uso di vettori lentivirali per il silenziamento genico del complesso CXCR4/hERG1: una nuova strategia terapeutica nei tumori pediatrici chemio resistenti”

Personale coinvolto: Prof. A. Arcangeli, Dr. A Fortunato, Dr. A Gurriero, Dr. M. Ristori.

Riassunto

L’inserimento di materiale genetico all’interno delle cellule è un processo importante per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici basati sulla terapia genica. Sino ad oggi sono stati sviluppati differenti metodi di trasferimento: fisici, come l’elettroporazione; meccanici, come la microiniezione; chimici, come l’impiego di liposomi o di calcio-fosfato. Questi sistemi consentono la veicolazione di DNA nudo nella cellula senza limiti di dimensioni: tali metodi sono risultati però difficilmente applicabili *in vivo*. I metodi biologici basati sull’impiego di virus geneticamente modificati forniscono la prospettiva futura di un’applicazione *in vivo* per la terapia genica, grazie all’alta efficienza di trasduzione e al targeting verso specifiche cellule bersaglio. Sono stati sviluppati diversi vettori virali ed ognuno di essi presenta le caratteristiche peculiari del virus da cui è derivato. Fino ad ora sono stati ingegnerizzati vettori basati su virus a DNA come Adenovirus, Virus Adeno- Associati e Virus dell’Herpes Simplex di tipo 1 e su virus a RNA quali Poliovirus, Alphavirus e Retrovirus.

Fra i possibili vettori virali, i lentivirus rappresentano uno dei sistemi più efficaci poiché non solo sono in grado di infettare e quindi trasferire il loro contenuto genetico su un largo spettro di tipi cellulari, ma anche di infettare cellule sia in divisione che quiescenti oltre ad integrarsi stabilmente nel genoma. Il nostro progetto di ricerca ha previsto l’utilizzo dei lentivirus sia per overesprimere sia per silenziare particolari geni coinvolti nei processi neoplastici in linee cellulari tumorali stabilizzate. In particolare lo scopo principale del progetto è stato quello di produrre e testare lentivirus contenenti sequenze silenzianti sia hERG1 sia CXCR4, entrambe coinvolte nei meccanismi di chemio resistenza in tumori pediatrici. Tali virus sono stati utilizzati per trasdurre sia linee tumorali (colon carcinoma, carcinoma mammario, leucemie pediatriche) nonché cellule ottenute da culture a breve termine provenienti da tumori cerebrali e sarcomi pediatrici raccolti in collaborazione con Ospedale Meyer e AOU CTO Careggi.

Inoltre sono stati utilizzati vettori lentivirali per trasdurre linee cellulari tumorali per iperespressione del gene *herg1* al fine di valutare il ruolo di tale gene nei processi di chemio resistenza.

Relazione

L'inserimento di materiale genetico all'interno delle cellule è un processo importante per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici basati sulla terapia genica. Sino ad oggi sono stati sviluppati differenti metodi di trasferimento: fisici, come l'elettroporazione; meccanici, come la microiniezione; chimici, come l'impiego di liposomi o di calcio-fosfato. Questi sistemi consentono la veicolazione di DNA nudo nella cellula senza limiti di dimensioni: tali metodi sono risultati però difficilmente applicabili *in vivo*. I metodi biologici basati sull'impiego di virus geneticamente modificati forniscono la prospettiva futura di un'applicazione *in vivo* per la terapia genica, grazie all'alta efficienza di trasduzione e al targeting verso specifiche cellule bersaglio. Sono stati sviluppati diversi vettori virali ed ognuno di essi presenta le caratteristiche peculiari del virus da cui è derivato. Fino ad ora sono stati ingegnerizzati vettori basati su virus a DNA come Adenovirus, Virus Adeno- Associati e Virus dell'Herpes Simplex di tipo 1 e su virus a RNA quali Poliovirus, Alphavirus e Retrovirus.

Attualmente i vettori virali di maggiore interesse sono quelli basati sui Retrovirus e, in particolare, sui virus appartenenti ai Lentivirus, per la loro capacità di infettare e mediare l'integrazione del materiale genetico sia in cellule mitotiche sia in cellule quiescenti. I vettori virali sono strumenti molto utilizzati nella ricerca biomedica per veicolare materiale genetico all'interno delle cellule, poiché sfruttano i meccanismi biologici evoluti dai virus per il trasferimento del proprio genoma nelle cellule bersaglio. Il materiale trasferito può consistere in un gene terapeutico, il quale complementa mutazioni responsabili di una produzione insufficiente di proteina, o in elementi regolativi, come gli small interfering RNA (siRNA), in grado di silenziare post-trascrizionalmente un'anormale espressione genica attraverso il meccanismo di RNA interference (RNAi) Gli siRNA sono piccole molecole di RNA a doppio filamento lunghe circa 19-22 nucleotidi che riconoscono in modo sequenza-specifico l'RNA messaggero bersaglio e ne mediano la degradazione.

Fra i possibili vettori virali, i lentivirus rappresentano uno dei sistemi più efficaci poiché non solo sono in grado di infettare e quindi trasferire il loro contenuto genetico su un largo spettro di tipi cellulari, ma anche di infettare cellule sia in divisione che quiescenti oltre ad integrarsi stabilmente nel genoma. Il nostro progetto di ricerca ha previsto l'utilizzo dei lentivirus sia per overesprimere sia per silenziare particolari geni coinvolti nei processi neoplastici in linee cellulari tumorali stabilizzati. In particolare lo scopo principale del progetto è stato quello di produrre e testare lentivirus contenenti sequenze

silenzianti sia hERG1 sia CXCR4, entrambe coinvolte nei meccanismi di chemio resistenza in tumori pediatrici. Tali virus sono stati utilizzati per trasdurre sia linee tumorali (colon carcinoma, carcinoma mammario, leucemie pediatriche) nonché cellule ottenute da culture a breve termine provenienti da tumori cerebrali e sarcomi pediatrici raccolti in collaborazione con Ospedale Meyer e AOU CTO Careggi.

Inoltre sono stati utilizzati vettori lentivirali per trasdurre linee cellulari tumorali per iperespressione del gene *herg1* al fine di valutare il ruolo di tale gene nei processi di chemio resistenza.

Il nostro progetto è suddiviso in quattro fasi differenti che hanno previsto l'utilizzo dei lentivirus o per il silenziamento o per l'iperespressione genica.

Fase 1. Produzione di vettori lentivirali contenenti sequenze silenzianti per il gene *cxcr4* (Lenti/sh-*cxcr4*).

Come applicazione di questa tecnologia sono stati utilizzati i lentivirus per trasferire nel genoma di cellule tumorali sequenze di shRNA in grado riconoscere il gene codificante per la proteina CXCR4 e attivare il *pathway* dell'interferenza dell'RNA silenziandolo. A tale scopo abbiamo utilizzato shRNA prodotti dal consorzio TRC e distribuiti da OpenBiosystems. Si è preliminarmente proceduto alla identificazione degli shRNA silenzianti il gene *cxcr4*. Gli shRNA contenuti nella libreria RNAi TRC sono stati selezionati con metodi bioinformatici ed è quindi stato necessario verificare la loro effettiva efficacia nel riconoscere e silenziare i geni di interesse. Per il gene *cxcr4* erano disponibili 5 shRNA. Questi shRNA sono stati disegnati in modo da includere un "hairpin" di 21 paia di basi senso e antisenso con un loop di 6 paia di basi in un plasmide (pLKO.1) contenente una cassetta di resistenza alla puromicina. pLKO.1 è caratterizzato dalla presenza di due sequenze LTR, che contengono le sequenze di integrazione nel genoma della cellula ospite, la sequenza ψ , necessaria per impacchettare il nuovo genoma virale ed un promotore, U6. Le due sequenze LTR sono modificate in modo da rendere il virus incapace di replicarsi autonomamente. In una prima fase abbiamo ottimizzato i protocolli per la transfezione dei plasmidi lentivirali, la produzione del virus e la loro titolazione.

Quindi, allo scopo di identificare quali fra i 5 differenti shRNA risulterà più efficace, stiamo trasfettando le cellule in coltura con i differenti plasmidi e infine quantificare la

riduzione degli mRNA tramite Real-Time PCR. I costrutti che risulteranno aver prodotto un significativo *knockdown* dell'espressione di *cxcr4* saranno selezionati per essere utilizzati nella costruzione dei lentivirus. Per la produzione delle particelle virali, verrà utilizzato un sistema in cui i geni virali sono ripartiti in tre differenti plasmidi lentivirali. Questo sistema riduce sensibilmente la possibilità che i virus prodotti possano ricombinarsi riacquisendo la capacità di replicarsi. I plasmidi utilizzati sono: pCMV-VSV-G che contiene il gene "env" che codifica le proteine dell'envelope e transmembrana; pCMV-dR8.74 che contiene i geni *gag*, *pol* e *rev*. Il gene *gag* codifica per le proteine capsidiche, *pol* codifica per l'integrasi virale necessaria per l'integrazione del provirus, il gene *rev* codifica per la trascrittasi inversa che permette la retrotrascrizione del genoma virale; pLKO1 contenente il gene d'interesse. L'assemblaggio e la produzione dei virus verrà infine effettuato in cellule HEK 293T (*packaging cells*). Le particelle virali prodotte verranno raccolte direttamente dal supernatante delle colture cellulari delle cellule HEK 293T transfettate.

Fase 2. Infezione di cellule leucemiche (REH, 697), provenienti da leucemie linfoblastiche acute pediatriche, con il costrutto Lenti/sh-herg1-cxcr4.

A tale scopo è stato utilizzato lo stesso protocollo applicato nel progetto finanziato nel 2009/2010, e dettagliato nella relativa relazione del lavoro svolto, presentata a fine 2010.

Fase 3. Messa in cultura di tumori pediatrici (a) tumori cerebrali e b) sarcomi) per la successiva infezione con il costrutto Lenti/sh-herg1-cxcr4.

a) E' stata raccolta una casistica di tumori cerebrali prevalentemente pediatrici, provenienti dall'Ospedale Meyer di Firenze (ottenuti dal Dr. Genitori). Ciascun campione primario raccolto è stato suddiviso in tre parti (compatibilmente alle dimensioni del pezzo operatorio): una parte è stata utilizzata per l'allestimento di colture cellulari primarie, una parte processata per l'estrazione del DNA e una parte è stata invece processata per l'estrazione dell'RNA. Le colture sono state eseguite secondo il protocollo da noi messo a punto su campioni primari di tumori cerebrali dell'adulto e descritti in dettaglio in Masi A. et al Br. J. Cancer, 93: 781-792, 2005. Abbiamo quindi proceduto a caratterizzare i campioni per l'espressione delle proteine hERG1 e CXCR4. Sono in corso test preliminari di infezione con il costrutto Lenti/sh-herg1.

b) Per il raggiungimento di tale obiettivo sono stati raccolti 10 campioni primari di bambini affetti da sarcomi delle parti molli (ottenuti dal Dr. Capanna (CTO, AOUC Careggi)). Per ognuno dei campioni raccolti il prelievo biotico è stato suddiviso in porzioni di dimensioni equiparabili a $0.5 - 0.7 \text{ cm}^3$. Una parte è stata processata in Trizol per estrazione RNA e conservata a -80°C . Un'altra parte è stata tritata meccanicamente in PBS e poi trattata con collagenasi tipo II (casi 1 - 4) o con Liver Digest Medium (dal caso 5 in poi) per 15-30' in un bagnetto riscaldato a 37°C . La sospensione cellulare è stata centrifugata per togliere la collagenasi e risospesa in terreno di coltura (DMEM F12, 10% FBS defined, antibiotici). Quando possibile, in base alle dimensioni del campione, sono stati conservati a -80°C dei pezzi di tessuto non lavorato immerso in RNA later.

La metodica da noi definita per la messa in coltura di campioni pediatrici primari delle parti molli si è dimostrata essere efficace e nella maggior parte dei casi analizzati stabile. E' stato possibile quindi caratterizzare i campioni di sarcoma per l'espressione delle proteine hERG1 e CXCR4. Sono in corso anche per questi campioni test preliminari di infezione con il costrutto Lenti/sh-herg1.

Fase 4. Valutazione dell'effettivo silenziamento dei geni herg1 e cxcr4.

Per valutare l'avvenuto silenziamento dei due geni in oggetto di studio si è utilizzata la tecnica di Real Time Quantitative PCR (come riportato in Pillozzi et al., Blood, 117,902-914, 2011) e in alcuni casi con la tecnica del microarray (come descritto in dettaglio in Masselli et al, 2012).

L'analisi di microarray ha evidenziato che nelle cellule trasfettate con il costrutto Lenti/sh-herg1 si evidenzia un pool di geni, esattamente 307 geni, che sono deregolati rispetto alle cellule non trasfettate. Tali geni sono principalmente coinvolti nei fenomeni di riarrangiamento del citoscheletro e nelle vie di trasduzione del segnale (in particolare sopravvivenza e apoptosi), evidenziando un ruolo importante della proteina hERG1 nei fenomeni neoplastici.

Infine il progetto ha previsto invece l'utilizzo dei lentivirus per la produzione di una linea di carcinoma mammario (la linea cellulare MDA-MB-231) iperesprimente hERG1. Nel nostro laboratorio è stato quindi sviluppato un lentivirus per poter avere una trasduzione stabile in tale linea cellulare e così poter studiare gli effetti del canale codificato dal gene *herg1* sulla linea tumorale MDA-MB-231.

A partire dal plasmide pCCLsin.PPT.Hpgk.GFP.pre, è stato creato il vettore con il gene per l'iperpressione del canale di interesse, da utilizzare insieme ad altri due costrutti per avere la formazione del virus che andrà poi ad infettare la linea MDA-MB-231.

All'interno del plasmide, contenente il promotore per la "Human Phosphoglicerato kinase" (hPGK), è stato inserito il costrutto pECFP-C1-hERG1. Questo deriva dal vettore pECFP-C1 (Clontech) dove è stato possibile inserire il gene hERG1 a seguito di una mutazione puntiforme che ha dato luogo ad un nuovo sito di restrizione per SalI. Grazie alla presenza del nuovo sito di clonaggio il gene CFP-hERG1 è stato inserito in pCCLsin.PPT.Hpgk.GFP.pre. Il vettore risultante dal clonaggio è stato inserito nei batteri Top10FI tramite elettroporazione. L'inserimento del gene nel plasmide lentivirale è coinciso con la eliminazione del tratto dove era presente la GFP: il nostro nuovo target molecolare è la Cian Fluorescent Protein (CFP). Al fine di verificare il corretto inserimento, la corretta trascrizione e traduzione del plasmide, in grado di conferire così alla linea infettata l'espressione del canale hERG1 funzionante, è stata fatta una trasfezione transiente del plasmide per l'iperpressione di hERG1 sulla linea di cellule embrionali renali HEK 293, utilizzando la metodica delle lipofectamine. Le cellule risultanti sono state sottoposte ad analisi elettrofisiologiche e biomolecolari; sono state estratte le proteine totali ed analizzate tramite Western Blot, utilizzando un anticorpo policlonale anti-hERG1: tali test hanno confermato l'espressione della proteina canale. Anche le analisi elettrofisiologiche ci hanno dato una ulteriore conferma mostrando che la proteina codificata dal gene CFP-hERG1 è funzionante: è stato possibile infatti registrare il tracciato della corrente di hERG1. Avendo avuto la conferma della corretta costruzione del plasmide lentivirale stiamo adesso proseguendo i nostri esperimenti per ottenere l'infezione stabile della linea MDA-MB-231. Abbiamo a disposizione i tre costrutti necessari alla trasduzione delle cellule: il plasmide andrà a formare il virus insieme ai due altri costrutti, necessari per il packaging (pCMV-8.74) e l'envelope (pCMV-VSVG) virale, grazie ad una pre-trasfezione della linea cellulare 293T (cellule modificate per avere una alta produzione del lentivirus). E' in queste settimane in corso questa coltura cellulare dalle quale preleveremo le particelle virali, presenti nel terreno, che useremo per infettare la linea MDA-MB-231.