

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

Il trasferimento genico è una tecnologia molecolare che permette l'introduzione di sequenze di DNA nelle cellule. L'utilizzo di questa tecnica rende possibile il ripristino della corretta espressione di un gene mutato, oppure la sua iper-espressione. Recentemente, è divenuto possibile inserire nel genoma cellulare anche sequenze nucleotidiche capaci di silenziare un gene tramite la degradazione dei trascritti: corrispondenti la cosiddetta interferenza dell'RNA.

Il trasferimento genico può essere implementato con diverse tecniche fra cui l'impiego di vettori virali. Fra i possibili vettori virali, i lentivirus rappresentano uno dei sistemi più efficaci, poiché non solo sono in grado di infettare un largo spettro di tipi cellulari, sia proliferanti che quiescenti, nelle quali possono trasferire, ed integrare stabilmente nel genoma cellulare.

Come prima applicazione di questa tecnologia abbiamo utilizzato i lentivirus per trasferire, nel genoma di cellule tumorali di adenocarcinoma coloretale, sequenze di *short hairpin* (sh)RNA, in grado riconoscere il gene *herg1*, attivare il *pathway* dell'interferenza dell'RNA (RNAi) e pertanto portare al silenziamento del gene suddetto. A questo scopo abbiamo utilizzato shRNA prodotti dal consorzio TRC e distribuiti da OpenBiosystems. Questi shRNA sono stati disegnati in modo da includere un "*hairpin*" di 21 paia di basi senso e antisense 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 (fig. 1). Le due sequenze LTR sono modificate in modo da rendere il virus incapace di replicarsi autonomamente.

In una prima fase di questo progetto abbiamo ottimizzato i protocolli per la transfezione dei plasmidi lentivirali, la produzione del virus e la loro titolazione. Quindi abbiamo prodotto dei lentivirus silenzianti il gene *herg1*. Successivamente abbiamo utilizzato questi vettori per trasdurre le cellule HCT116 (derivate da un adenocarcinoma del colon-retto) *in vitro* e per effettuare esperimenti *in vivo*.

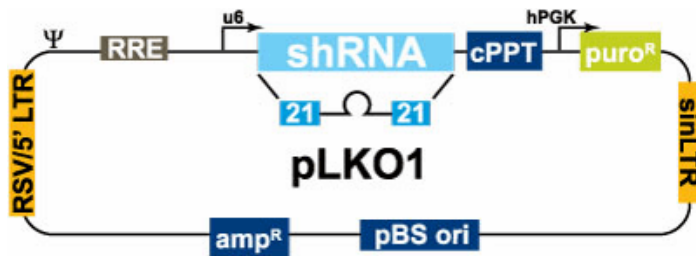


Fig.1. Rappresentazione schematica del plasmidi pLKO.1.

Identificazione degli shRNA silenzianti il gene *herg1*.

Gli shRNA contenuti nella libreria RNAi TRC sono stati selezionati con metodi bioinformatici ed è quindi necessario verificare la loro effettiva efficacia nel riconoscere e silenziare i geni di interesse. Per il gene *herg1* erano disponibili 5 shRNA clonati nel plasmidi pLKO.1. Inizialmente abbiamo verificato tramite digestione enzimatica che i plasmidi pLKO.1 contenenti i differenti shRNA non avessero subito eventi di ricombinazione (fig.1). Quindi, allo scopo di identificare quali fra i 5 differenti shRNA più efficaci, abbiamo trasfettato cellule in coltura con i differenti plasmidi e quantificato la riduzione degli mRNA tramite Real-Time PCR. Due costrutti sh4 e sh7 hanno prodotto un significativo *knockdown* dell'espressione di *herg1* e quindi sono stati selezionati per essere utilizzati nella costruzione dei lentivirus.

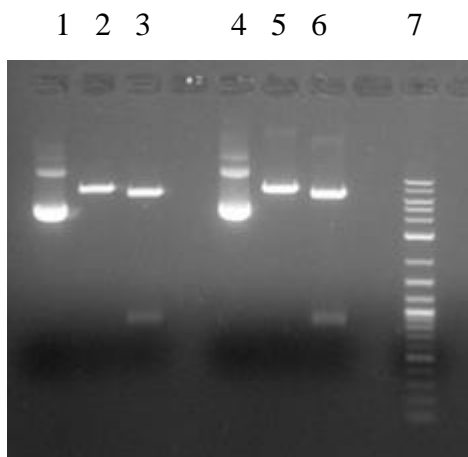


Fig. 2 Digestione del plasmide pLKO.1. Pozzetti 1,4: plasmide non digerito, pozzetti 2,5: plasmide digerito con BamHI, 3,6: plasmide digerito con BamHI e NdeI, 7: standard. La digestione enzimatica dei plasmidi ha il pattern di bande di restrizione corretto.

Produzione dei lentivirus

Per la produzione delle particelle virali, è stato utilizzato un sistema di 2^a generazione 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 è stato effettuato in cellule HEK 293T (*packaging cells*). Le particelle virali prodotte sono state raccolte direttamente dal supernatante delle colture cellulari delle cellule HEK 293T transfettate.

Quantificazione del titolo virale

Sono stati prodotti 3 differenti lentivirus contenenti i due costrutti denominati sh4 e sh7 e un lentivirus di controllo contenente solo il vettore pLKO.1 vuoto.

Prima di infettare le cellule abbiamo quantificato la concentrazione delle particelle virali infettanti nel supernatante raccolto. Quindi abbiamo titolato il virus infettando cellule HCT116 in coltura con 3 diluizioni (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) del supernatante virale. Dopo 24h le cellule sono state trattate con puromicina e mantenute in coltura per 15 giorni dopodichè abbiamo fissato e colorato le colonie di cellule che si erano formate. Ogni colonia deriva da una cellula infettata quindi, contando le colonie ottenute a partire da un dato numero di cellule si è ottenuto un valore di CFU (colony-forming units) che ci consente di stimare la concentrazione di virus infettanti presenti nel supernatante (fig. 3).

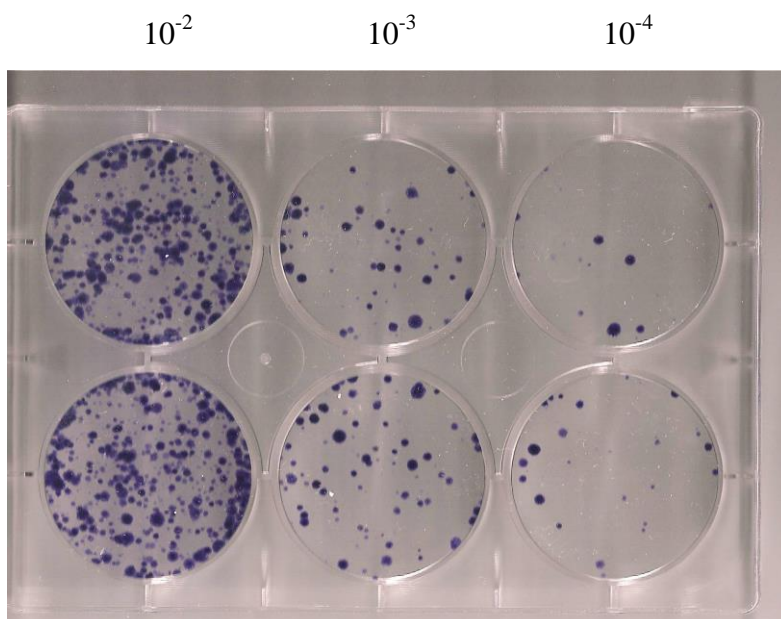


Fig. 3. Determinazione del titolo virale. Dal conteggio delle colonie ottenute (CFU) si stima la concentrazione del numero di particelle virali infettanti nel supernatante virale. 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} : differenti concentrazioni del supernatante virale testate in duplicato.

Produzione di linee cellulari di tumori del colon-retto stabilmente trasdotte con lentivirus.

Una volta quantificato il titolo virale abbiamo trasdotto una linea cellulare di adenocarcinoma del colon-retto HCT116 con due differenti concentrazioni virali MOI=3 e MOI= 5 (cioè rispettivamente con 3 e 5 particelle virali per cellula); dopo 24h dall'infezione le cellule sono state selezionate con puromicina. Oltre l'80% delle cellule è risultato resistente alla puromicina, cioè sono state efficacemente trasdotte, in entrambe le concentrazioni. Così facendo abbiamo ottenuto delle linee stabilmente trasdotte che abbiamo crioconservato e in parte espanso per effettuare i successivi esperimenti.

L'analisi dell'espressione genica delle cellule HCT116 trasdotte con i vettori lentivirali silenzianti, per mezzo della Real-Time PCR ha dimostrato che abbiamo ottenuto un silenziamento dell'mRNA del gene di interesse di circa il 70% rispetto alle linee di controllo (linee tradotte con il vettore vuoto) (fig. 4). Inoltre abbiamo verificato un corrispondente riduzione della proteina HERG1 tramite analisi western blot.

Il confronto del fenotipo cellulare fra le cellule silenziate con le linee non silenziate di controllo ha permesso di mettere in evidenza un cambiamento nella morfologia delle cellule (fig. 5) e probabilmente un rallentamento della proliferazione cellulare (fig. 6).

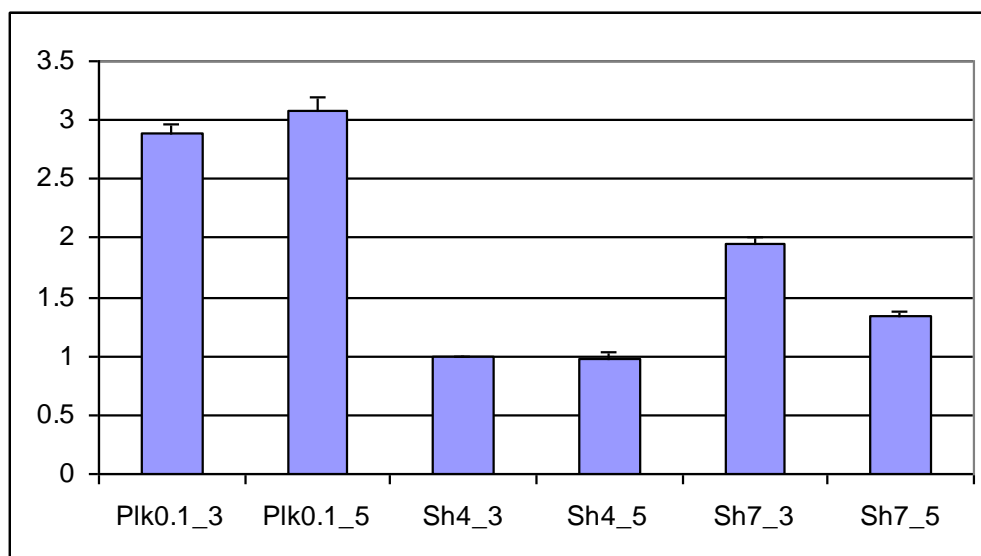


Fig. 4. Real-Time PCR. Quantità espressa in *folds*. Il costrutto sh4 silenzia il gene *herg1* di circa il 70% ad entrambe le concentrazioni MOI 3 e 5.

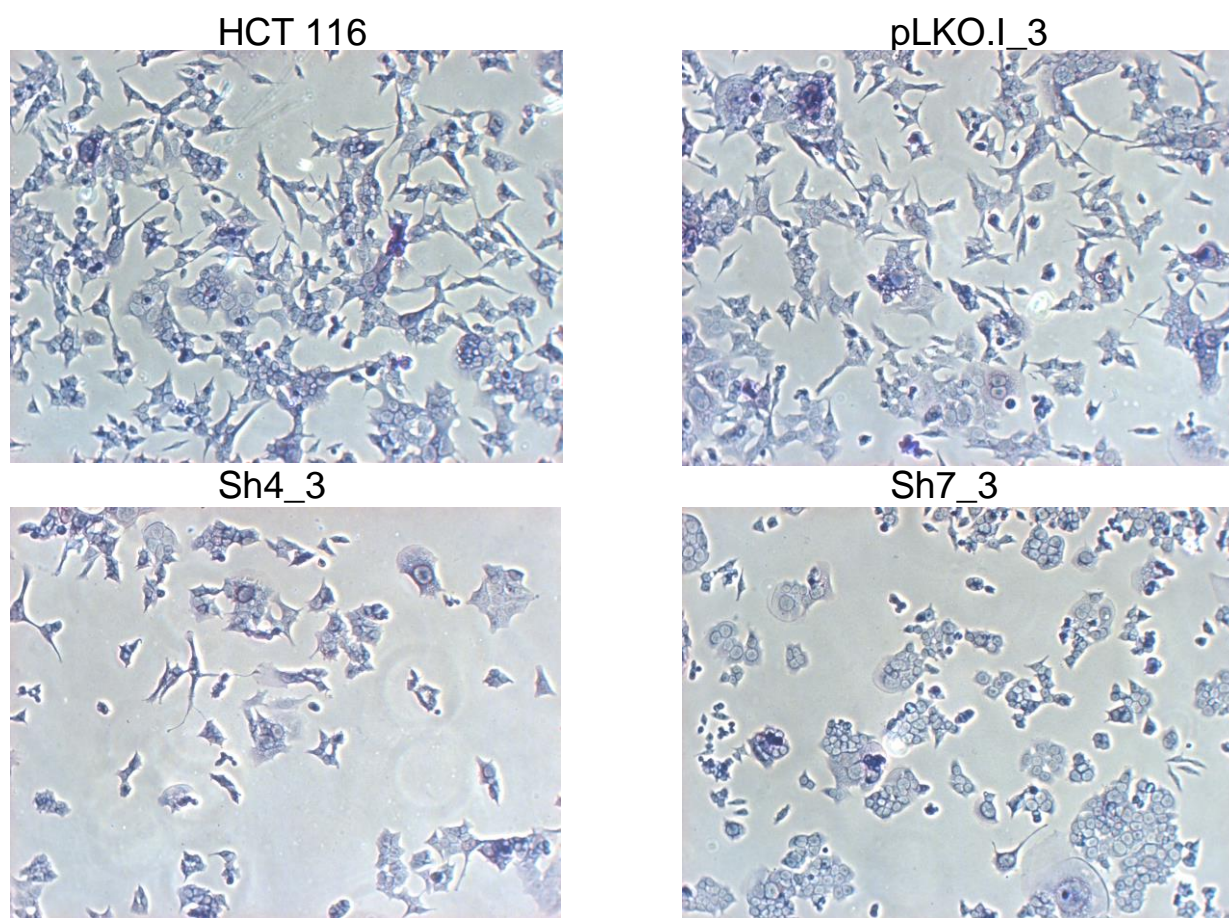


Fig. 5. Linee cellule coltura: HCT116, pLKO.1, Sh4 e Sh7. Le linee cellulari silenziate Sh4 e Sh7 mostrano un cambiamento nella morfologia rispetto alle linee di controllo HCT116, pLKO.1

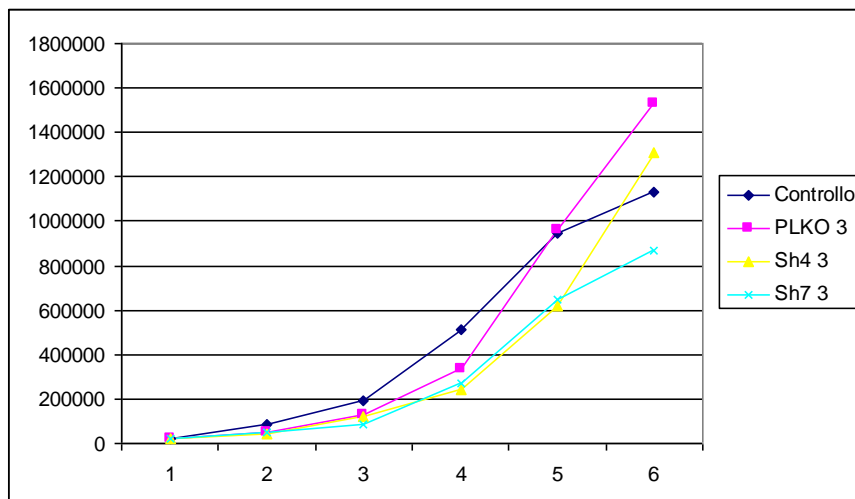


Fig. 6. Curva di crescita delle cellule in coltura (6 giorni). Le linee Sh4 e Sh7 hanno un andamento di crescita ridotto rispetto ai controlli.

Esperimenti *in vivo* su topi nu/nu

Allo scopo di verificare che il silenziamento di *hergl* avesse un effetto nel ridurre le capacità proliferative della linea tumorale HCT116 *in vivo*, abbiamo inoculato sottocute in topi nu/nu, 2×10^6 cellule HCT116 silenziate con sh7 e in parallelo lo stesso numero di cellule trasdotte solo con il vettore vuoto pLKO.1. I primi risultati hanno mostrato un netto decremento delle masse di crescita cellulare formatesi nei topi dopo circa 20 giorni dall'inoculo (fig. 7). Ulteriori esperimenti *in vivo* sono in corso per confermare i risultati ottenuti. Inoltre sono stati effettuati degli esperimenti, tuttora in corso, dove le cellule (silenziate e di controllo) sono state inoculate nella parete del cieco (inoculo ortotopico). Questo secondo esperimento ci consentirà di studiare l'eventuale effetto del silenziamento sulla formazione di metastasi e quindi l'effetto sulla sopravvivenza dei topi trattati. Questi nuovi esperimenti dovrebbero essere terminati entro Dicembre 2009 ed i dati analizzati entro Gennaio 2010.

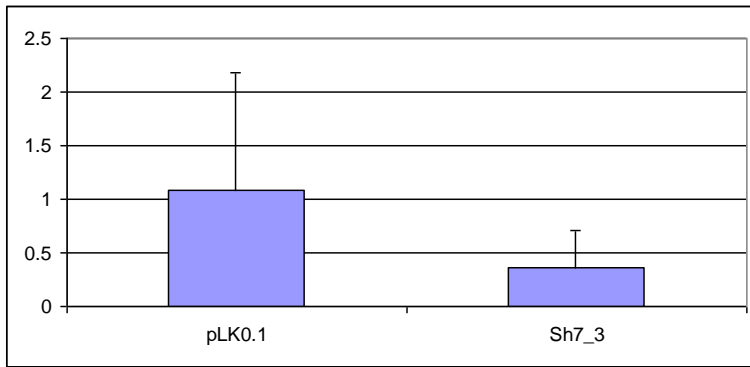


Fig. 7. Misurazione del peso delle masse ottenute da inoculi sottocute in topi nu/nu. La massa ottenuta a partire dalla di HCT116 silenziata per *herg1* mostra una crescita minore rispetto al controllo.

Conclusioni e prospettive future

Gli esperimenti condotti fino a questo momento suggeriscono una alta efficacia dei protocolli di trasduzione lentivirale sia *in vitro* sia negli esperimenti *in vivo* sul topo. L'utilizzo dei lentivirus come vettori per il trasferimento genico si è pertanto dimostrata una strategia molto efficace che ci ha consentito di acquisire molto velocemente informazioni sul ruolo del gene *herg1* nello sviluppo di tumori. Tali informazioni, che confermano quanto già proposto in precedenza dal nostro gruppo di ricerca (Arcangeli A et al., Targeting ion channels in cancer: a novel frontier in antineoplastic therapy. *Curr. Med. Chem.*, 16: 66-93, 2009), aprono inoltre importanti prospettive anche in campo terapeutico, suggerendo l'utilizzo di inibitori specifici di questo canale, comprendenti anche lentivirus contenenti shRNA, nel trattamento di carcinomi coloretali. Inoltre questi esperimenti ci hanno consentito di sviluppare e ottimizzare una tecnica che ora siamo in grado di applicare su un numero maggiore di linee cellulari tumorali coinvolgendo anche altri geni potenzialmente coinvolti con lo sviluppo di vari tumori. In particolare, poiché sta emergendo un ruolo sempre importante dei canali ionici nelle neoplasie (vedi il prossimo congresso internazionale che si terrà a Firenze dal 3 al 6 Marzo 2010 su "Ion channels and cancer"), prevediamo di produrre ulteriori lentivirus, portanti shRNA diretti verso altri membri della stessa, o di altre famiglie di canali ionici, applicabili a diversi tipi di tumore. Ancora una volta, la produzione e lo studio di tali vettori lentivirali contenenti sequenze shRNA, permetteranno alla comunità scientifica internazionale non solo di acquisire importanti indicazioni riguardanti il ruolo dei canali ionici nello sviluppo dei tumori, ma anche di sviluppare nuove strategie terapeutiche efficaci nella terapia antineoplastica.

Sulla base di quanto fin qui esposto si prospetta il proseguimento del progetto di ricerca in oggetto per un ulteriore anno allo scopo di:

- 1) Testare l'effetto del vettore lentivirale contenente sequenze shRNA in grado di silenziare il canale hERG1, già assemblato e studiato nel primo anno di progetto, su cellule provenienti da altri tipi di tumori umani, in particolare su cellule provenienti da tumori pancreatici. Su queste ultime cellule, si procederà a valutare gli effetti *in vitro* e *in vivo* del silenziamento genico del canale hERG1, utilizzando le procedure sperimentali già messe a punto nel primo anno di progetto.
- 2) Produrre nuovi vettori lentivirali contenenti a) sequenze shRNA in grado di silenziare gli altri geni della famiglia hERG (hERG2 e hERG3), la cui overespressione è stata dimostrata in cellule di retinoblastoma e tumore mammario, rispettivamente (Crociani o. et al., J. Biol.Chem., 278: 2947-55, 2003); b) sequenze shRNA in grado di silenziare geni codificanti altri canali di potassio (in particolare Kv1.3, KCa 3.1 e Kv 10.1) la cui iperespressione è stata dimostrata sia in cellule di tumore mammario che prostatico. Se i nuovi vettori lentivirali si dimostreranno in grado di produrre un significativo silenziamento dei geni in oggetto, essi verranno successivamente usati per infettare cellule tumorali e testarne l'efficiacia *in vitro* e *in vivo*, seguendo la procedura sperimentale messa a punto nel primo anno di progetto.