



Ministero dell'Istruzione,
dell'Università e della Ricerca



Università degli Studi
di Palermo

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PALERMO FACOLTA' DI SCIENZE MM.FF.NN.

Dipartimento di Biologia Cellulare e dello Sviluppo

Dottorato di ricerca in Biologia Cellulare
(Biologia Cellulare e dello Sviluppo)

XXI ciclo: 2007-2009

Settore Scientifico Disciplinare Bio/06

Studio funzionale di vettori lentivirali ricombinanti, contenenti l'isolatore cromatinico di riccio di mare *sns5*

Dottoranda
Valentina Motta

Tutor
Prof. Giovanni Spinelli

Co-Tutor
Dott.ssa Santina Acuto

Coordinatore
Prof.ssa Gabriella Sconzo

Abstract

β -Thalassemia major is a severe congenital anemia for which there is presently no curative therapy other than allogenic hematopoietic stem cell transplantation. This therapeutic option, however, applies only to the minority of thalassemia patients who have an HLA-matched bone marrow donor. Gene therapy by the delivery of a regulated globin gene to autologous hematopoietic stem cells is an attractive alternative approach as it is in principle applicable to all thalassemic subjects. The success of this strategy requires that the delivered globin gene should transduce hematopoietic stem cells (HSC) with high efficiency, be expressed at high levels, only in erythroid cells, in the appropriate stage of differentiation, not to be affected by the site of chromosomal integration and be sustained over time. All these goals are approached but not fully met with current globin lentiviral vectors (LVs).

In this work I developed strategies for optimizing the efficiency of LV mediated gene transfer.

Although LVs are able to transduce non-proliferating cells, HSCs display low permissiveness and require specific culture conditions and cytokine prestimulation for high transduction efficiency.

In a context of preclinical studies, preliminary to the upcoming phase I gene therapy trial, I investigated the effects of different *in vitro* transduction conditions in primary cultures of HSCs isolated from thalassemia patients.

Results from the first part of this thesis allowed to develop the following protocol: 24hs culture of HSCs in a prestimulating cytokines cocktail (100ng/ul SCF, TPO and Flt-3; 20ng/ul IL-3) and transduction with 2 viral doses at MOI 30, administrated within 8-12hs.

These conditions were used to efficiently transduce CD34+ cells from a patient with the β -globin recombinant/LV TNS9.3, recently approved for the phase I gene therapy trial in the USA. Performing these studies I was able to

show first preliminary data of β -globin transgene expression and adult hemoglobin production in primary erythroid cultures from β^0/β^0 thalassemia patients).

Lentiviral driven expression of a transgene is variable and may be subjected to silencing. Chromatin insulators are genomic elements able to protect a transgene from chromosomal position effects and silencing when located in the long terminal repeats (LTR) of retro and lentiviruses.

In the second part of this thesis I investigated on the ability of sea urchin *sns5* chromatin insulator to prevent PE of integrated LVs and on the mechanism by which it accomplishes its function. In particular I focus the role of GATA1 transcription factor binding to *sns5*. The expression analysis of insulated and uninsulated LVs in a panel of single copy transduced mouse erythro-leukemia (Mel) clones revealed that *sns5*, in flanking position to the vector: (i) Increases the likelihood of expression; (ii) imparts a copy number dependent level; (iii) increases the expression level of the erythroid transcription cassette (β -globin/LCR) in particular.

GATA1 binding, whether seems do not affect the boundary activity displayed by the insulator in preventing PE, plays a role in ameliorating the performance of the β -globin expression, perhaps by cooperating with other regulative elements (LCR) within the vector.

Indice

Introduzione	Pagina
1. Le β -talassemie	1
2. La terapia genica per la cura della β -talassemia	3
3. Lentivirus e vettori lentivirali	4
4. Retrovirus e terapia genica	12
4.a Terapia genica per la cura della X-SCID1	12
4.b Terapia genica per la cura della X-CGD	14
4.c Effetti posizione	14
5. Gli isolatori cromatinici	16
6. L'isolatore genomico <i>sns5</i> di riccio di mare	22
6.a <i>sns5</i> e il vettore lentivirale ricombinante per la β -globina umana TNS9.3	26
7. Terapia genica per la β -talassemia: studi <i>in vivo</i> su modelli murini	29
8. Terapia genica con vettori isolati: il primo trial per la β -talassemia sull'uomo	33
Scopo del progetto	35
Risultati e discussione	38
Materiali e metodi	62
Bibliografia	84

Introduzione

1) Le β -talassemie

Le β -talassemie sono malattie ereditarie a trasmissione autosomica recessiva causate da mutazioni del gene β -globinico che codifica per la catena β dell'emoglobina, tetramero composto da 2 catene β e 2 catene α (HbA, $\beta_2-\alpha_2$).

Si conoscono numerose mutazioni a carico del gene beta che alterano il livello di trascrizione, il processamento del messaggero e/o la sua traduzione (figura 1). La gravità della malattia dipende dalla natura della mutazioni che possono causare o la totale assenza di catene β -globiniche (mutazioni β^0) o una loro ridotta formazione (mutazioni β^+). In entrambi i casi si genera uno squilibrio del normale rapporto alfa/beta con precipitazione degli aggregati di catene alfa in eccesso, modificazioni della membrana citoplasmatica dei globuli rossi (anisopoichilocitosi) che vengono prematuramente distrutti dagli organi emocateretici con conseguente anemia ipocromica e microcitica.

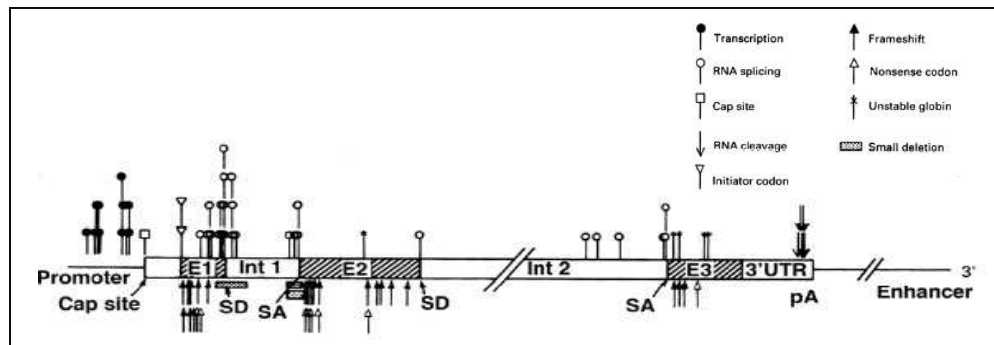


Fig. 1: *Rappresentazione schematica delle più comuni mutazioni osservate a carico del gene β -globinico.* Nella figura è rappresentato il gene β -globinico con le più comuni mutazioni osservate nelle β -talassemie. Il gene beta possiede tre introni (E1, 2, 3) e due introni (Int1, 2) e la sua espressione è regolata dall'enhancer globinico LCR (Locus Control Region).

L'unica terapia (palliativa) disponibile per i pazienti talassemici è l'adozione di un regolare regime trasfusionale al quale va associata necessariamente una terapia ferro-chelante, in quanto l'accumulo di ferro derivante dalle trasfusioni è la maggiore causa dei problemi clinici, a carico soprattutto del sistema endocrino, del fegato e del cuore (Maggio A, 2007).

L'unica cura è rappresentata dal trapianto allogenico di midollo osseo ma è limitato alla possibilità di trovare un donatore HLA compatibile ed è quindi applicabile ad un numero ridotto di pazienti (20-30%). Inoltre il trapianto è associato ad un alto tasso di mortalità (superiore al 10%) dovuto a complicanze immunologiche (insorgenza di *Graft Versus Host Disease*-GVHD) oltre che ad infezioni conseguenti all'aplasia midollare e alle complicanze derivate dal trattamento farmacologico immunosoppressore post-trapianto.

2) La terapia genica per la cura della β -talassemia

La generazione di vettori lentivirali in grado di trasportare al loro interno grossi frammenti genomici e lo sviluppo di protocolli di terapia genica ha aperto una nuova strada alla cura delle beta-talassemie (Naldini et al., 1996).

La terapia genica, che nelle β -talassemie ha lo scopo di eliminare il fabbisogno trasfusionale attraverso la sintesi di catene β -globiniche prodotte dall'espressione del gene β -esogeno, rappresenta un approccio alternativo attraente per la cura di questa malattia, perché applicabile in teoria a tutti i pazienti in quanto consiste nel trapianto di cellule staminali ematopoietiche autologhe geneticamente modificate da vettori virali ricombinanti per il gene β -globinico. I vettori di elezione per la trans-infezione delle cellule staminali ematopoietiche sono i vettori lentivirali che si integrano stabilmente nel genoma della cellula ospite cellulare e che contengono le sequenze minime virali necessarie al trasporto citoplasma-nucleo, all'integrazione del gene β -globinico, assicurando una terapia a lungo termine; oltre che elementi regolatori aggiunti che assicurano un livello di espressione del gene adeguatamente elevato e specificatamente eritroide (*Sadelain et al., 2007*). Il successo di questa dipende da un efficiente trasferimento genico e da un'efficace trascrizione tessuto-, stadio-specifica e copie-dipendente del transgene. Al fine quindi di sviluppare protocolli applicabili in trial clinici di terapia genica sono state, e sono ad oggi, oggetto di studio e sperimentazione sia le condizioni di trasduzione in vitro delle cellule HSC che l'ingegnerizzazione di vettori ricombinanti al fine di avere strumenti efficaci e sicuri. I risultati di questa tesi contribuiscono ad acquisire conoscenze utili in questo contesto.

3) Lentivirus e vettori lentivirali

3.a) I lentivirus

I vettori lentivirali sono stati principalmente sviluppati dal Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 (HIV-1), dal Virus dell'Immunodeficienza della Scimmia (SIV) e dal Virus dell'Immunodeficienza Felina (FIV).

Nella terapia genica per la β -talassemia, come per le malattie del sistema ematopoietico, in cui le cellule bersaglio sono costituite dalle cellule staminali ematopoietiche (HSC) che, dividendosi e differenziandosi, danno origine a tutti gli elementi figurati del sangue, vengono utilizzati vettori lentivirali derivati dal virus dell'HIV1, per la loro specifica capacità di trasdurre cellule non in divisione quali le hHSC in fase di quiescenza.

Il lentivirus HIV-1, agente eziologico della Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS), possiede una particella di forma sferica di circa 110 nm di diametro, costituita da un *envelope* fosfolipidico esterno da cui protrudono le glicoproteine di membrana e da una doppia componente capsidica, composta da una matrice proteica e da un nucleocapside (figura 2). Quest'ultimo contiene il genoma virale, costituito da due molecole identiche di RNA a singolo filamento a polarità positiva di circa 10 Kb, e le proteine necessarie alla maturazione e alla replicazione dei virioni, quali la proteasi, la trascrittasi inversa e l'integrasi.

Entrambi i filamenti del genoma virale contengono una struttura 7-metilguanosa (m⁷G(5')ppp(5')G) detta CAP all'estremità 5' e una coda di poliadenine all'estremità 3'. L'estremità di tutti i genomi a RNA dei retrovirus consistono delle sequenze R e U5 (estremità 5') e U3 e R (estremità 3').

Da queste due regioni, grazie al meccanismo di retrotrascrizione dell'RNA virale a DNA provirale, si formano le LTR (*Long Terminal Repeat*), costituite dalla sequenza U3-R-U5 e presenti ad entrambe le estremità del genoma: la LTR al 5' funge da promotore per la presenza di una sequenza *TATA box*, mentre la LTR al 3' serve come terminatore della trascrizione.

Nel genoma di HIV-1 sono presenti i geni *gag*, *pol* ed *env* orientati nella stessa direzione (5'*gag-pol-env*-3'), comuni a tutti i retrovirus (Freed ,2001, figura 2).

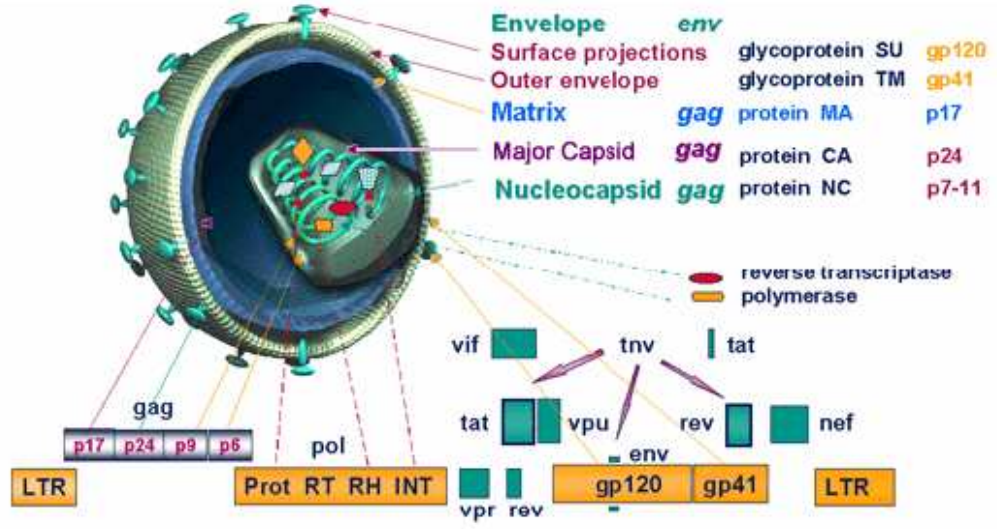


Figura 2: Rappresentazione schematica della particella virale e del genoma di HIV-1

Il gene gag codifica la poliproteina Pr55Gag che viene processata dalla proteasi virale al momento della gemmazione per formare le proteine strutturali della matrice (MA), del capsid (CA), del nucleocapsid (NC) e il peptide p6. Il gene pol viene sintetizzato come precursore Pr160GagPol, in seguito ad un raro frameshift ribosomale durante la traduzione di Gag, e viene processato, per autocatalisi dalla proteasi contenuta al suo interno, negli enzimi virali proteasi, trascrittasi inversa, responsabile del processo di retrotrascrizione, e integrasi, che catalizza l'integrazione del DNA provirale nel genoma cellulare. Il gene env codifica la glicoproteina gp160, processata da una proteasi cellulare durante la maturazione del virione in due proteine, gp120 e gp41. Inizialmente gp120 lega il recettore CD4, con cui forma un complesso molto stabile, per poi legare i co-recettori (CXCR4, CCR5). Successivamente l'esposizione del peptide di fusione presente in gp41 catalizza la fusione dell'envelope virale con la membrana plasmatica e il rilascio del nucleocapsid nel citoplasma della cellula bersaglio. Sono presenti anche due geni (tat, rev) codificanti due proteine regolatrici attive in trans, e quattro geni con funzione accessoria (nef, vif, vpr, vpu) responsabili in vivo della progressione della malattia. Il gene tat codifica la proteina Tat che funge da potente transattivatore dell'espressione genica virale grazie al riconoscimento della sequenza TAR (Transactivation Response Region), presente all'estremità 5' del DNA provirale. Il gene rev codifica la proteina Rev

che regola l'esporto dal nucleo dei trascritti virali mediante il legame alla sequenza RRE (Rev Responsive Element) localizzata nel gene env (Freed, 2001).

Il DNA ottenuto dalla trascrittasi inversa si complessa con proteine virali, formando un complesso, detto di pre-iniziazione, che permette il passaggio attraverso la membrana nucleare. Questo meccanismo, comunque, non è l'unico esistente in quanto è stata individuata una sequenza regolatrice polipurinica centrale (cPPT, central polypurinic tract), situata nel gene della polimerasi, che favorisce la traslocazione nel nucleo cellulare (Zennou, et al., 2001; Zennou et al., 2000; Follenzi, et al., 2000). Recentemente, inoltre, è stato indicato un residuo di valina situato in posizione 165 del gene dell'integrasi quale fattore in grado di favorire l'ingresso nel nucleo in maniera maggiore del cPPT (Dvorin, et al., 2002).

Il tropismo del virus, è determinato dall'espressione di specifici recettori per il virus, presenti sulla membrana delle cellule che l'HIV infetta. Il virus contatta le cellule attraverso un complesso di due proteine associate: gp120 e gp41. La porzione gp120 lega con alta affinità le molecole di superficie CD4 che caratterizzano la membrana plasmatica di cellule T, cellule dendritiche e macrofagi. Prima della fusione, e dell'entrata del virus, la gp120 lega dei co-recettori, che fanno parte della famiglia dei recettori per le chemochine. I principali co-recettori per il legame dell'HIV sono CCR5, presente in maggior misura sulla membrana delle cellule dendritiche, dei macrofagi e dei linfociti T CD4; e CXCR4 che è presente nelle cellule T attivate. Dopo il legame della gp120 al recettore e al co-recettore, la gp41 causa la fusione dell'envelope virale con la membrana plasmatica, permettendo al genoma virale e alle proteine associate di entrare nel citoplasma, formando il complesso di preintegrazione (Chan et al., 1998; Moore et al., 1997; Unutmaz et al., 1997; Wyatt et al., 1998). Questo, diversamente dal complesso degli oncoretrovirus, contiene segnali di localizzazione nucleare che mediano il suo trasporto attivo attraverso i nucleopori durante l'interfase. Le proprietà nucleofile sono state ritrovate in almeno tre componenti del complesso di preintegrazione: Gag, Vpr e l'integrasi (Naldini, 1998).

3.b) Dal lentivirus al vettore lentivirale

Il genoma di un lentivirus modificato al fine di ottenere particelle difettive per la replicazione e privato di tutti i geni accessori responsabili dell'eziologia costituisce il genoma di un vettore lentivirale HIV-derivato.

I vettori lentivirali conservano ancora la capacità di integrazione nel DNA genomico, pertanto vengono mantenuti in forma integrata all'interno della cellula e quindi trasferiti alla progenie. Inoltre nello spazio recuperato mediante la rimozione dei geni virali e dei geni accessori possono essere clonati all'interno di questi vettori segmenti di DNA di dimensioni maggiori di 8Kb senza inficiare il processo di impacchettamento che è garantito dal sito di impacchettamento Ψ . Come il virus wild type, il vettore mantiene la capacità di infettare anche cellule che non sono in mitosi perché vengono mantenute al suo interno le sequenze responsabili della formazione del complesso di pre-integrazione (PIC) che permette di attraversare la membrana nucleare. L'infezione mediata da vettori lentivirali, così come quella mediata dal virus HIV1, non necessita della distruzione della membrana nucleare, quindi può avvenire nelle cellule non in divisione, sebbene sia necessario che queste si trovino in uno stadio di transizione $G^0 \rightarrow G^1$ (Naldini et al., 1998). (Figura 3).

	transduction by:	
	lentivirus (HIV)	γ -retrovirus (MLV)
a proliferating cell	yes	yes
b partially stimulated cell T cell in G_1	yes	no
c quiescent cell T cell in G_0	no	no

Fig.3 Condizioni cellulari necessarie per la trasduzione mediata da vettori lentivirali e γ -oncoretrovirali.

Questi vettori quindi superano i limiti riscontrati con l'uso di γ -retrovirus, permettendo ad esempio l'efficiente trasduzione di cellule staminali del tessuto ematopoietico (in maggior parte cellule quiescenti) e l'espressione di transgeni che necessitavano della presenza di estese sequenze regolative (i.e. il gene della β -globina umana).

La capacità dei lentivirus di infettare cellule non in divisione probabilmente risiede nella capacità del complesso di pre-integrazione di attraversare membrane nucleari integre grazie alle proprietà di alcuni suoi costituenti, la proteina p17Gag e la proteina accessoria Vpr (Heinzinger et al., 1994, Stevenson et al., 1995), tale proprietà non è condivisa dagli oncoretrovirus.

Il complesso di pre-integrazione, inoltre, protegge il genoma virale ad RNA dal processamento all'interno del nucleo (che avverrebbe per gli eventuali siti di splicing o di poliadenilazione introdotti con il transgene) e rende quindi i vettori ricombinanti geneticamente più stabili. Questo è il motivo che ha spinto a sviluppare vettori lentivirali per la terapia genica. Per la prima funzione essi permettono un trasferimento genico efficace e stabile in cellule staminali che si dividono raramente o in cellule che si trovano nella fase post-mitotica quali le cellule ematopoietiche o nervose. Per la seconda, essi possono accomodare sequenze geniche e di regolazione non solo ampie, ma anche con eventuali siti di processamento.

Due sono stati i problemi principali in cui la comunità scientifica si è imbattuta nel tentativo di sviluppare vettori lentivirali: (i) i primi titoli virali erano estremamente bassi (10^1 - 10^3 ip/ml), ed in questo senso un importante contributo è stato dato dal gruppo coordinato dal Prof. Naldini (Naldini et al., 1996); (ii) è stato difficile creare linee cellulari impacchettanti per questi vettori che contengono molti più geni e possiedono un meccanismo di regolazione genica molto più complesso dei semplici retrovirus. Carroll et al., 1994 sono stati i primi a ottenere linee cellulari impacchettanti derivate dal virus dell'HIV-1.

Dato che i vettori basati su HIV-1 (figura 4) sono stati deleti delle sequenze codificanti le proteine necessarie per la formazione delle particelle virali, per produrre particelle di vettore queste vengono fornite *in trans* co-trasfettando le linee cellulari impacchettanti con diversi costrutti *helper* (costrutti "packaging"). In questo modo si producono particelle virali complete, infettive, ma difettive per

la replicazione. La divisione delle tre funzioni gag, pol, env, in plasmidi diversi limita la produzione di Retrovirus Replicazione-Competenti (RCR) conseguente ad eventi di ricombinazione (Kay et al., 2001).

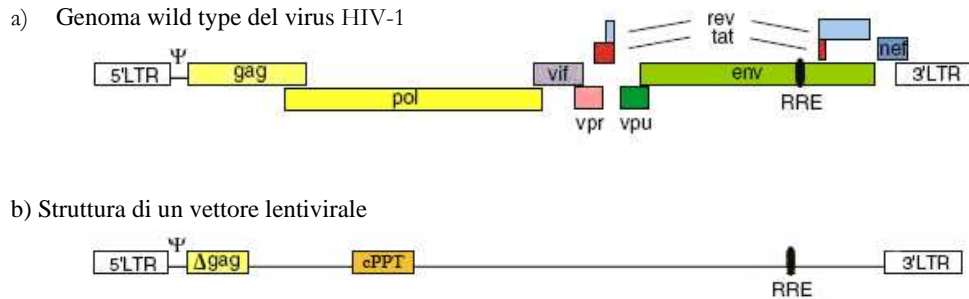


Fig.4 Rappresentazione schematica del genoma del virus HIV1(a) e di un vettore lentivirale (b).

Per soddisfare sempre di più i criteri di sicurezza nella produzione di vettori, i costrutti di *packaging* si sono evoluti nel tempo. Il sistema vettoriale di prima generazione era costituito da (i) un costrutto di *packaging* contenente tutte le sequenze virali (*gag*, *pol*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) eccetto il gene *env* ed il segnale di incapsidazione Ψ per impedire l'incapsidazione di questo RNA; (ii) il costrutto contenente il gene *envelope*, codificante le glicoproteine dell'*envelope* virale HIV o di altri virus; in entrambi questi costrutti le LTR al 5' e al 3' sono state sostituite rispettivamente con un promotore ed un segnale di poliadenilazione eterologhi; (iii) il costrutto che viene definito "vettore ricombinante", contenente le LTR alle estremità 5' e 3', il segnale di incapsidazione ed una piccola parte del gene *gag*, responsabile dell'aumento dell'efficienza di trasferimento genico (Parolin et al., 2001), le sequenze del transgene complete delle sequenze di *cis*-regolazione e la sequenza RRE (Rev Responsive Element), necessaria per regolare l'esporto dal nucleo dei trascritti virali localizzata nel gene *env* (Freed et al., 2001)..

Per aumentare ulteriormente la sicurezza di questi i sistemi vettoriali di seconda e terza generazione hanno eliminato dal costrutto di *packaging* le proteine virali accessorie (Zufferey et al., 1998) e la proteina Rev viene fornita separatamente da un quarto costrutto (rte costrutti impacchettanti ed un costrutto vettore) e non è richiesta la proteina Tat, poiché il costrutto vettore è dotato di un promotore chimerico al 5' in cui la regione U3 della LTR è stata

sostituita con il promotore del Virus del Sarcoma di Rous (RSV) o del Citomegalovirus Umano (hCMV) (Dull et al., 1998). Un ulteriore progresso è stato raggiunto mediante la delezione degli elementi di attivazione della trascrizione dalla regione U3 presente all'estremità 3' (enhancer virale) rendendo il vettore Self-Inactivating (SIN); in seguito all'evento di retrotrascrizione infatti questa delezione viene retrocopiata nella 5'LTR (Zufferey et al., 1998). La presenza di entrambe le LTR inattive impedisce l'attivazione di possibili oncogeni presenti vicino al sito di integrazione del vettore.

Infine, il tropismo di virioni ricombinanti HIV-1 può essere ampliato mediante il processo di pseudotipizzazione (Srinivasakumar et al., 2001), infatti la proteina Env lentivirale è stata sostituita, in molti vettori, da quella del Virus della Stomatite Vescicolare (VSVg), anch'essa fornita in trans tramite un plasmide. I virus ricombinanti pseudotipizzati con la glicoproteina VSVg presentano numerose proprietà ampiamente vantaggiose per l'utilizzo in terapia genica. Questa proteina rende il virus sia anfotropico, ossia in grado di riconoscere recettori di cellule murine ed umane, che pantropico, ossia in grado di infettare una grande varietà di citotipi umani (Abe, et al., 1998). VSVg utilizza come recettori minimi fosfolipidi di membrana ubiquitari sulle membrane cellulari come la fosfatidilserina, il fosfatidil-inositolo e il Gm3 ganglioside e ciò amplia lo spettro di tipi cellulari infettabili (Chen, et al., 1996). Essa determina inoltre una maggiore efficienza di infezione perché contiene un dominio fusogeno (a.a. 123-127) che determina la fusione tra l'envelope virale e la membrana plasmatica della cellula bersaglio. La proteina VSVg non è immunogenica e non viene disattivata dal complemento umano (Ory, et al., 1996). I vettori virali così pseudotipizzati risultano inoltre più resistenti alla manipolazione *in vitro* in quanto possono essere concentrati per ultracentrifugazione e criopreservati senza effetti sul potenziale infettivo del vettore (Burns, et al., 1993). Inoltre, mediante ultracentrifugazione, il vettore può essere concentrato circa 1000 volte, aumentando considerevolmente il titolo virale (fino a 10^8 - 10^9 ip/ml).

Quindi i diversi vantaggi correlati all'uso dei vettori lentivirali sono: la possibilità di inserire nel loro genoma fino a 10kb di sequenze di DNA, la loro stabilità genomica (bassa propensione a riarrangiare), e la relativa facilità con la quale possono venire prodotti (Kumar et al., 2001).

4) Retrovirus e terapia genica

Uno dei maggiori problemi che concerne l'uso dei vettori che si integrano stabilmente nel genoma di una cellula ospite è relativo alla genotossicità; infatti le sequenze virali residue del vettore e/o le sequenze di regolazione contenute nel transgene (LCR, enhancer, etc.) possono transattivare geni adiacenti al sito di integrazione e de-regolare il programma di crescita cellulare generando oncogenesi.

Questo rischio era stato inizialmente sottostimato per via dell'errata nozione che i retrovirus si integrano in maniera random nel genoma cellulare, e che, di conseguenza, c'è una scarsa probabilità che l'integrazione avvenga in vicinanza di sequenze codificanti, le quali rappresentano circa l'1% del genoma umano. In realtà oncoretrovirus e lentivirus hanno una propensione a localizzarsi rispettivamente in vicinanza delle sequenze del promotore o nel corpo del gene (Schroeder et al., 2002; Wu et al., 2003, von kalle et al., 2004).

Con i vettori oncoretrovirali di prima generazione si è assistito a fenomeni di oncogenesi proprio in trial clinici, quali quello per la cura della X-SCID1 (X-linked Severe Combined Immuno Deficiency-1) e della X-CGD (X-linked Chronic Granulomatous Disease). (Hacein Bey Abina et al., 2003, Ott et al., 2006).

4.a) Terapia genica per la cura della X-SCID1

Il trial clinico di terapia genica per la X-SCID condotto in Francia è stato il primo trial di terapia genica di successo. La patologia è caratterizzata dalla totale assenza di cellule T e natural Killer, mentre le cellule B sono presenti anche se possiedono una grave disfunzione (Leonard et al., 2001; Noguchi et al., 1993). I pazienti sono chiamati "Bubble Babies" proprio perché vivono isolati in ambiente sterile e sono soggetti a morte precoce (in seguito alla prima infezione che contraggono) se non sottoposti a trapianti di cellule staminali.

Il difetto consiste in mutazioni a carico della subunità γ del recettore delle citochine (cy), codificata dal gene IL2RG, componente funzionale critico dei recettori delle interleuchine IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21.

Il trapianto eterologo di midollo osseo rappresenta l'unica speranza di sopravvivenza per questi pazienti, anche se l'applicabilità e l'efficacia della

terapia sono limitate, sia per la difficoltà di trovare un donatore HLA-compatibile (preferibilmente con aplotipo identico), sia perché la ricostituzione della funzionalità delle cellule T risulta ritardata nei casi di trapianto con cellule HLA-non identiche; inoltre esiste il concreto rischio di morte o infezioni severe in conseguenza al trattamento immuno-soppressore cui vengono sottoposti i pazienti in seguito al trapianto per ridurre il rischio di reazioni Graft vs Host, GVHD). (Cavazzana Calvo et al., 2007; Sarzotti et al., 2009).

Nel trial è stato utilizzato un vettore oncoretrovirale, ricombinante per il gene della subunità *cy*, per trasdurre le cellule staminali ematopoietiche prelevate dal midollo osseo dei pazienti, ove sono state successivamente re-infuse dopo mieloablazione. 10 degli 11 pazienti trattati presentarono sin da subito un considerevole incremento del numero di cellule T e NK circolanti, e di cellule B con funzione ripristinata. (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Fischer et al., 2001; Hacein-Bey-Abina et al., 2002). In un solo caso non si è registrato un recupero delle condizioni cliniche né la ricostituzione del comparto di cellule T a causa di una persistente splenomegalia.

Risultati simili sono stati ottenuti in un analogo trial di terapia genica per la X-SCID1 condotto successivamente a Londra (Gaspar et al., 2004).

Questi trial, se da un lato hanno dimostrato gli incredibili successi che si possono realizzare con questa terapia innovativa, hanno anche mostrato il “rovescio della medaglia”, infatti 5 pazienti sul totale dei 20 pazienti trattati nei due trial hanno sviluppato forme leucemiche (leucemia linfoblastica acuta delle cellule T) per espansione clonale di cellule tumorali che over-esprimono l'oncogene LMO-2, a causa dell'inserzione del vettore in vicinanza o all'interno di esso (Hacein-Bey-Abina et al., 2008; Howe et al., 2008, Hacein Bey-Abina, 2003; Ott, 2006; Dunbar, 2007).

Alla luce di questi risultati sono stati disegnati per questo trial vettori di seconda generazione privi dell'enhancer virale contenuta nella 3'LTR (SIN Vector) e nuovi trial con questi vettori sono stati appena autorizzati.

4.b) Terapia genica per la cura della sindrome da granulomatosi cronica X-linked (X-CGD)

Due pazienti sono stati trattati nel 2004 con terapia genica mediata da vettori onco-retrovirali ricombinanti ed in entrambi i casi la terapia ha avuto un iniziale successo in quanto i due pazienti hanno recuperato il difetto genetico e sono tornati asintomatici. Tuttavia, anche in questi casi, é stata registrata un'espansione clonale dovuta all'attivazione inserzionale degli oncogeni MDS1-EVI1, PRDM16 o SETBP1 causando instabilità genomica e mielodisplasia con monosomia del cromosoma 7. Inoltre gli effetti non sono stati duraturi; il vettore si é inattivato nel tempo per via della metilazione delle isole CpG contenute nel promotore SFFV (Spleen Focus-Forming Virus) usato per l'espressione del transgene (Ott et al.,2006). Ulteriori studi hanno poi dimostrato che questo promotore é prone al silenziamento via CpG metilazione in particolare nelle cellule ematopoietiche umane (cellule target in questo trial). (Stein et al., 2010).

4.c) Effetti posizione

I risultati di questi due trial denunciano da un lato una probabilità di oncogenesi inserzionale di molto superiore a quella che ci si aspettava, anche se in questi casi la patologia stessa contribuisce a questo incremento. Infatti in entrambe le malattie é coinvolto il sistema immunitario, il quale di per se opera attraverso una espansione clonale (agente infettivo→antigene→riconoscimento da parte di cellule del sistema immunitario→espansione clonale→risposta immunitaria). Dall'altro lato, l'espressione del transgene é soggetta al silenziamento e alla variabilità d'espressione dovuta al sito d'integrazione nella cromatina della cellula ospite. Entrambi i fenomeni sono definiti effetti posizione (PE). Una rilevante proporzione di vettori, infatti, si integra in regioni di eterocromatina che può avanzare rendendo trascrizionalmente silente il transgene. Inoltre, anche cellule figlie contenenti un solo evento di integrazione, possono generare una progenie con espressione variegata per effetto di eventi di eterocromatizzazione epigeneticamente determinati. Questo fenomeno é noto come variegazione per effetto posizione, PEV. Questi effetti posizione epigenetici spesso portano a variegazione dell'espressione e al silenziamento (Karpen et al., 1994; Gaszner and Felsenfel, 2006; Pannell and Ellis, 2001)

Quando un vettore si integra nella cromatina può subire uno dei seguenti eventi (figura 5):

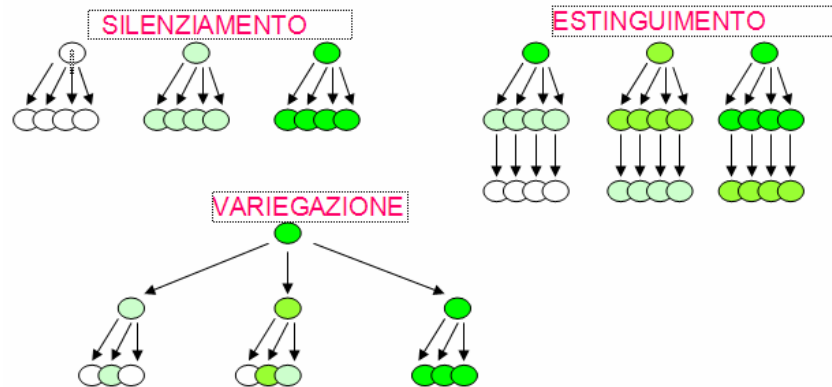


Figura 5. Rappresentazione del Position Effect Variegation (PEV). Figura riprodotta da Emery DW and Stamatoyannopoulos G., 1999

- (i) Il processo di silenziamento (PE) nel quale in una significativa frazione di cellule il trasgene è trascrizionalmente silente sin dall'inizio;
- (ii) La variegazione dell'espressione (PEV) che determina eterogeneità nella progenie cellulare (questo fenomeno è frequentemente associato con l'integrazione del transgene ai confini tra euromatina e eterocromatina);
- (iii) L'estinguimento, infine, determina un decadimento del livello di espressione del transgene nel tempo (Karpen et al.,1994, Yao et al.,2004, Ramunas et al.,2007).

5) Gli isolatori cromatinici

Tra gli elementi che potenzialmente sono in grado di rendere i vettori più sicuri ed efficaci figurano gli isolatori cromatinici, una classe di elementi che in natura separano domini funzionali adiacenti. Questi elementi, inizialmente descritti in *Drosophila* e successivamente trovati in diversi organismi, possono influenzare l'espressione genica per due proprietà definite sperimentalmente: la proprietà di blocco dell'enhancer e quella di elementi di confine, o barriera.

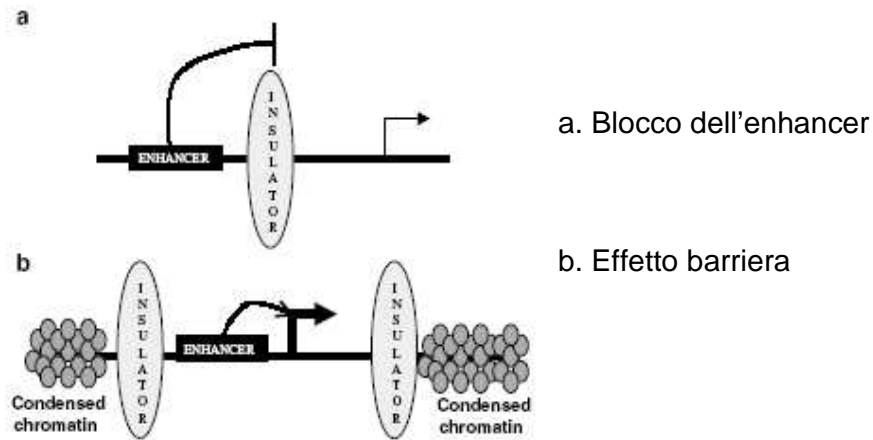


Figura 6: Rappresentazione delle attività di un isolatore: a) Attività di blocco dell'enhancer b) Attività di barriera.

1) Gli isolatori possono bloccare l'azione di elementi regolativi quali gli enhancer su un promotore (Geyer and Corges, 1992; Kellum and Schedl, 1992). Questa attività di blocco dell'azione dell'enhancer ("enhancer blocking") è dipendente dalla posizione, cioè si realizza solo se l'isolatore è situato tra enhancer e promotore. La capacità dello stesso enhancer di stimolare l'espressione di altri geni posizionati dall'altro lato non viene invece compromessa (figura 6.a).

2) Gli isolatori possono agire "barriere" fisiche (Sun ed Elgin, 1999) che impediscono l'avanzamento alla cromatina condensata circostante, la quale potrebbe altrimenti silenziare l'espressione del gene che viene inglobato (figura 6.b).

Alcuni isolatori cromatinici, come il retrotrasposone *gypsy* di *D. melanogaster* e l'isolatore globinico di pollo *cHS4* (figura 7) hanno entrambe le funzioni, che possono essere situate anche in sequenze diverse all'interno dell'elemento isolatore, come nel caso di *cHS4* (figura 8) (West et al., 2002, Pimpinelli S. et al., 1995); in altri casi, invece, gli isolatori presentano solo l'attività di barriera come nel caso dell'isolatore di lievito *S. cerevisiae*, *HMR tRNA^{thr}* (Donze e Kamakaka, 2001). Pertanto la differenza tra isolatori ed elementi di confine è molto sottile, e talvolta i due termini vengono utilizzati indifferentemente.

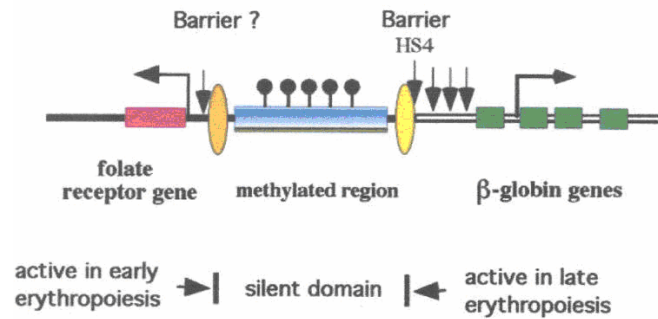
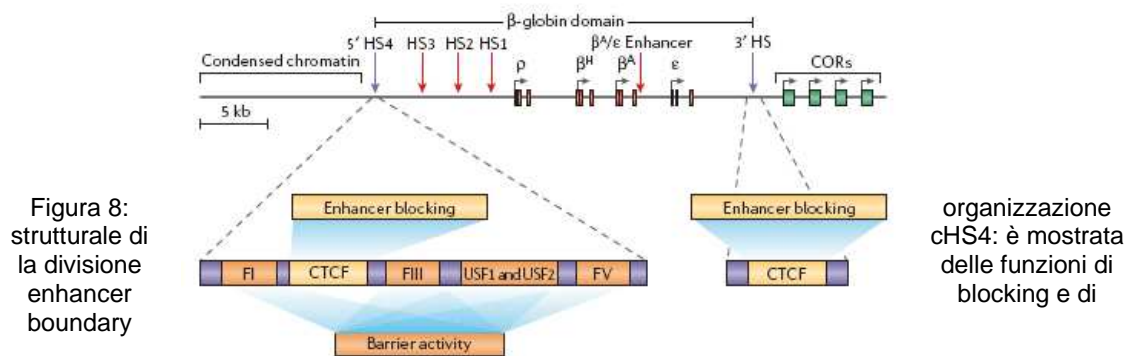


Figura 7: localizzazione dell'isolatore cromatinico cHS4 nel suo contesto cromatinico



Entrambe le funzioni possono essere sfruttate per rendere più efficaci e sicuri i vettori virali usati in terapia genica. Infatti, se presenti in posizione fiancheggiante il vettore, per l'attività di blocco dell'enhancer impedirebbero ad elementi di regolazione interni al vettore di transattivare oncogeni cellulari vicini, diminuendo quindi il potenziale genotossico dei vettori. Per la seconda funzione, contrastando gli effetti posizione, renderebbero l'espressione del trasngene costante, sostenuta nel tempo e numero di copie-dipendente, e sarebbe quindi necessario un minor numero di vettori per ottenere l'effetto terapeutico, riducendone ulteriormente il rischio di oncogenesi inserzionale (Recillas Targa, 2004). Anche la funzione di barriera pertanto giova a ridurre il rischio di oncogenesi inserzionale.

In aggiunta alla loro abilità di contrastare gli effetti posizione, gli isolatori sembrano avere altre proprietà favorevoli per l'applicazione in terapia genica.

Un altro aspetto evidenziato in uno studio su animali transgenici da O'Malley e collaboratori è che gli isolatori potrebbero contribuire agli eventi d'integrazione

per rendere questi processi più efficienti, inoltre potrebbero stabilizzare il transgene, evitando delezioni e ricombinazioni.

5.a) Modelli proposti per il funzionamento degli isolatori

Per spiegare il funzionamento degli isolatori genomici sono stati proposti diversi modelli (figura 9), in particolare da studi funzionali dell'isolatore gypsy di *Drosophila*. Essi coinvolgono sia le interazioni funzionali tra l'isolator e l'enhancer sia interazioni fisiche tra gli elementi insulators.

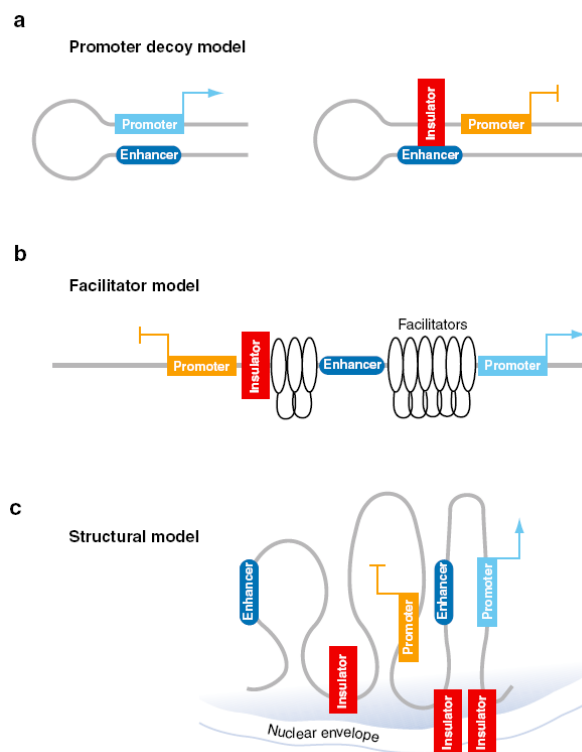


Figura 9. Rappresentazione dei possibili modelli di funzionamento di gypsy. Figura riprodotta da Lourdes Valenzuela and Rohinton T. Kamakaka, 2007

Nel modello decoy, il complesso di proteine dell'isolator interagisce con le proteine dell'enhancer intercettando il segnale attivatore dell'enhancer, bloccandone o riducendone l'effetto (Majumder et al., 2003, Parnell et al., 2000, Geyer et al., 1997). Nel modello facilitatore, l'isolator può anche interferire con la funzione di proteine facilitatrici, prevenendo la comunicazione tra l'enhancer e

il promotore (Wey et al., 2001, Gause et al., 2001). Il modello strutturale suggerisce l'attacco dell'insulator alla lamina nucleare, dividendo la fibra cromatinica in domini separati, che isolano i segnali generati in ciascun dominio. In accordo con questo modello, si pensa che il maggior ruolo degli insulators sia quello di organizzare topologicamente e strutturalmente la fibra cromatinica, e che gli effetti isolatori siano una conseguenza di quest'organizzazione (Gerasimova et al., 2001). L'osservazione che i complessi proteici presenti su gypsy formino un cluster nei nuclei, supporta il modello che prevede che gypsy abbia effetto sull'organizzazione nucleare e sulla regolazione genica (Capelson et al., 2005), interferendo con la trasmissione del segnale generato dall'enhancer.

Secondo uno dei modelli suggeriti per il funzionamento dell'enhancer (tracking model) questa scorre fino al promotore per trans-attivarlo; un elemento isolatore interposto tra le due sequenze potrebbe fisicamente impedire il tracking. Questa ipotesi risulta suffragata dall'osservazione che gli isolatori genomici sono siti di legame per diversi fattori trascrizionali; primo fra tutti il fattore CTCF, definito fattore degli isolatori dei vertebrati.

E' stato ipotizzato che gli isolatori possono essersi evoluti da sequenze promotore che hanno perso la loro funzione principale e che hanno mantenuto siti di legame per i fattori di trascrizione. Gli isolatori quindi potrebbero esercitare la loro azione di blocco dell'enhancer, quando interposti tra questo elemento ed il promotore, secondo la regola "il primo che incontro il primo che servo", venendo scambiati per promotori (West et al., 2002).

Questa ipotesi risulta suffragata da esperimenti condotti con l'isolatore cHS4 che lega il fattore CTCF; infatti, attraverso studi effettuati su minicromosomi contenenti l'isolatore, si è rilevato un accumulo di RNA Pol II a ridosso di questo elemento. Ulteriori studi hanno permesso di identificare CTCF come il fattore cardine nell'azione di blocco dell'enhancer di cHS4, in quanto questo fattore subisce modifiche quali poli-ADP-ribosilazione, necessarie per la funzione di blocco (Gaszner and Felsenfeld 2006).

Modelli sono stati proposti anche per spiegare come un isolatore può proteggere un trasgene dal silenziamento. Uno di questi si basa sulla capacità di questo elemento di reclutare le istone Acetil-Trasferasi (HATs), che acetilando

gli istoni mantengono all'interno del dominio isolato una conformazione cromatinica aperta. La cromatina che si trova in questo stato risulta più accessibile al legame dei fattori di trascrizione e al reclutamento della RNA polimerasi e il promotore, così, viene protetto dalla metilazione ad opera delle DNA metiltrasferasi (Mutskov et al., 2002) (Figura 10).

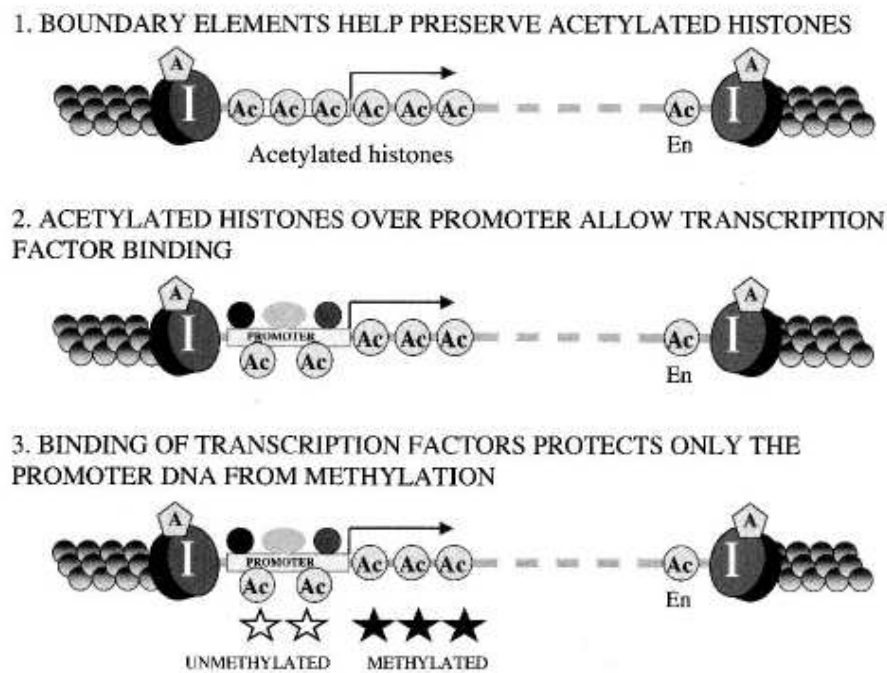


Fig.10: Rappresentazione schematica di un meccanismo proposto per spiegare la capacità di un isolatore a proteggere un transgene dal silenziamento

Ciò é evidente in *cHS4*, che nel locus é marcato dalla presenza di siti ipersensibili alle nucleasi e picchi di euromatina. Tale condizione è dovuta al fatto che questo isolatore cromatinico possiede siti di legame per i fattori trascrizionali USF1 ed USF2, fattori che a loro volta reclutano le HATs responsabili dell'acetilazione degli istoni e dunque del mantenimento dell'euromatina; mutazioni di *cHS4* a carico delle sequenze di legame di USF1 e USF2 aboliscono l'attività di boundary dell'isolatore stesso (Gaszner e Felsenfeld, 2006).

6) L'isolatore genomico *sns5* di riccio di mare

Il prof. G. Spinelli ed i suoi collaboratori dell'Università degli Studi di Palermo hanno identificato, nel DNA di riccio di mare *P. lividus*, un elemento genetico che possiede le caratteristiche di isolatore (Palla et al., 1997). Inizialmente è stato caratterizzato un elemento di 265 bp, denominato "silencing nucleoprotein structure" (*sns*), localizzato all'estremità 3' del gene H2A, nel cluster genico degli istoni precoci del riccio di mare (Figura 11) dove funziona da isolatore cromatinico. Questo elemento, come altri isolatori ben caratterizzati, è capace di bloccare la trascrizione attivata da un enhancer in modo polare e direzionale, cioè l'attività di enhancer blocking si osserva solo quando *sns* è localizzato tra enhancer e promotore, ed inoltre questa azione è indipendente dall'orientamento (Palla et al., 1997), infatti l'enhancer "bloccato" è ancora funzionale su un promotore divergente (Palla et al., 1997). È stato dimostrato che *sns* mantiene la sua funzione di isolatore anche in cellule umane (Di Simone et al., 2001) ed ha un ruolo neutrale sulla trascrizione (Melfi et al., 2000).

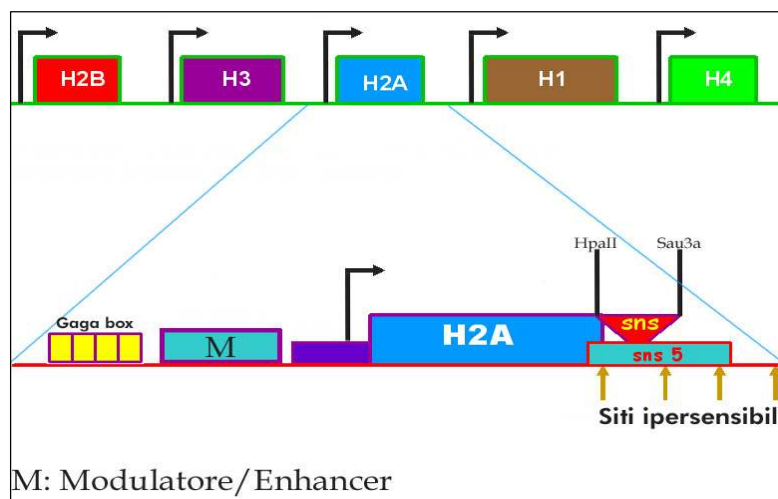


Figura 11: Localizzazione di *sns* nel suo contesto cromatinico all'interno del cluster degli istoni precoci di *P. lividus* ed unità trascrizionale del gene H2A. M: Modulatore/Enhancer

È stato inoltre dimostrato che *sns* esplica la sua azione di blocco dell'enhancer anche in cellule altamente specializzate come quelle eritroidi (umane e di topo), infatti questo elemento interferisce con l'interazione tra la LCR della β -globina

umana (potente enhancer eritroide) e il promotore β -globinico in un contesto eritroide. Sns inoltre lega fattori di trascrizione eritroidi ed ubiquitari (GATA1, Oct1 ed Sp1) (Acuto et al., 2005).

Sono stati identificati, in *sns*, tre elementi responsabili della sua attività di isolatore in riccio di mare, mediante analisi di Dnasi I "footprinting", EMSA, e saggi funzionali in vivo in embrioni transgenici. Questi tre elementi: la palindrome della Box A, la ripetizione diretta della Box B, e la Box C+T, sono coinvolti nel riconoscimento e nel legame con proteine nucleari (Figura 12).

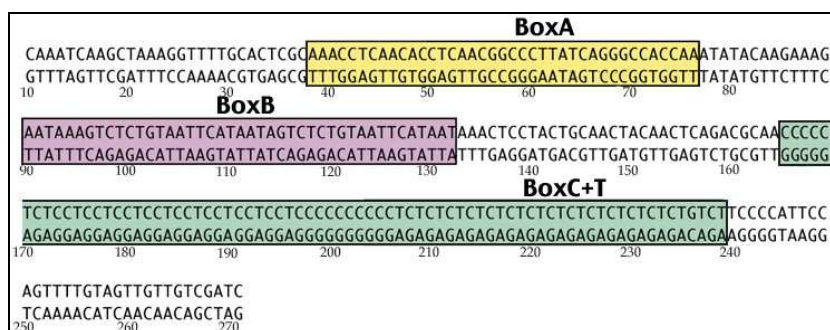


Figura 12 : Sequenza nucleotidica dell'elemento SNS

Spostandosi in direzione 5'-3' si evidenziano:

La box A che contiene una breve sequenza ripetuta e diretta, ricca in C+A, immediatamente seguita da una sequenza palindromica estremamente conservata nel corso dell'evoluzione nei loci dei geni per gli istoni e che sembra coinvolta nel processamento al 3' degli mRNA (Birnstiel et al., 1985);

La box B che contiene una sequenza ripetuta diretta di 20 paia di basi, ricca in A+T;

La box C+T: una regione di circa 70bp ricca in pirimidine (C+T). La box C+T contiene unità ripetute CT/AG che corrispondono a sette motivi GAGA su una delle due eliche. A questo proposito è interessante riportare che in *D. melanogaster* la sequenza GAGA e il corrispondente fattore proteico (la proteina Trl) giocano un ruolo importante nel rimodellamento della cromatina, partecipando alla formazione di domini funzionali (Strut et al., 1997). Da saggi EMSA con estratti nucleari di cellule di embrioni di riccio di mare si è dimostrato

che le sequenze GAGA sono legate da uno o più fattori nucleari, e ciò fa pensare ad un fattore tipo GAGA che potrebbe contribuire alla funzione di “enhancer blocking” di *sns* (Melfi et al., 2000).

E' interessante notare la presenza di quattro ripetizioni GAGA nel promotore del gene H2A, queste due sequenze ripetute GAGA sembrano giocare un ruolo importante nella regolazione dell'espressione dei geni degli istoni precoci lungo lo sviluppo.

Successivamente, mediante analisi funzionale su embrioni transgenici di riccio di mare, è stato dimostrato che l'elemento *sns* non è sufficiente a regolare temporalmente la trascrizione del gene dell'istone H2A durante lo sviluppo del riccio di mare e che una sequenza più lunga di 445 bp, denominata *sns5* e comprendente la sequenza *sns*, è necessaria per il silenziamento del gene H2A allo stadio di gastrula, suggerendo che la funzione di confine potrebbe essere contenuta nel frammento più grande (Di Caro D, 2004). Inoltre, è stata messa in evidenza la stretta correlazione esistente tra la struttura cromatinica (specifiche modificazioni istoniche) e la competenza trascrizionale nel sistema autologo. Gli stessi esperimenti evidenziano un ruolo dinamico dell'isolatore genomico *sns5* nella regolazione dell'espressione del gene per l'istone precoce H2A.

Questo elemento contiene un ulteriore sito di legame per fattori proteici: la box D. Il Prof Spinelli ed i suoi collaboratori ritengono che l'attività di barriera della regione al 3' del gene H2A risieda nel frammento *sns5*.

Questa ipotesi è stata confermata isolando dei vettori oncoretrovirali con entrambi i frammenti *sns* ed *sns5* oltre che con isolatori conosciuti (cHS4 o sequenza junk); è stata valutata la capacità di questi elementi di contrastare gli effetti PE cui è soggetto un vettore γ -retrovirale. A questo scopo è stato generato un ampio pannello di cellule eritroleucemiche di topo (MEL) contenenti vettori integrati fiancheggiati da isolatori ed è stata analizzata l'espressione del gene reporter GFP in esso contenuto. E' stato dimostrato che *sns5* possiede proprietà di elemento di confine, contrastando gli effetti posizione quando posizionato ai lati del vettore. Nello stesso studio sono stati caratterizzati i fattori di trascrizione e le modifiche epigenetiche che co-localizzano sull'isolatore: *sns5* esplica la sua azione conferendo alla cromatina una struttura eucromatina con la

presenza di modificazioni istoniche (marcatori di cromatina attiva) e legando in vivo i fattori di trascrizione GATA1 ed OCT1 (D'Apolito et al., 2009).

6.a) *sns5* e il vettore lentivirale ricombinante per la β -globina umana TNS9.3

Per le caratteristiche esibite da *sns5* che agisce da blocco dell'enhancer, presenta attività di confine anche in cellule eritroidi, nonché per la sua capacità di non alterare il titolo virale quando posizionato ai lati di un vettore oncoretrovirale, questo elemento è stato da tempo pensato per essere utilizzato in vettori lentivirali ricombinanti per la β -globina umana. In particolare il vettore utilizzato in questi studi è il vettore TNS9.3 che, come descritto precedentemente, è stato in grado di curare il fenotipo talassemico in modelli murini di talassemia e che è candidato per un trial clinico di terapia genica che si svolgerà in collaborazione tra il Memorial Sloan Kettering Cancer Center di NY (Dr M. Sadelain) e l'Azienda Ospedaliera V. Cervello di Palermo (Prof. A. Maggio); con entrambi i gruppi ho collaborato per lo svolgimento di questo progetto.

Il vettore TNS9.3

Il vettore TNS9.3 utilizzato è schematizzato in figura 13, esso deriva dal vettore TNS9 che è risultato, tra i 10 vettori lentivirali ricombinanti per il gene della β -globina studiati, il più efficace nel curare la β -talassemia nel modello murino (May et al., 2000).

Il vettore TNS9.3 contiene la stessa cassetta di sequenze eritroidi (gene β -globinico/LCR) con una modifica per "marcare" la trascrizione del gene β -globinico del vettore e distinguerla dalla trascrizione del gene endogeno ed una serie di modifiche necessarie per rendere più sicuro il vettore.

✓ La prima modifica consiste nell'introduzione di 4 nucleotidi, che formano il sito di riconoscimento per l'enzima di restrizione Xba1, nel promotore del gene globinico, più precisamente tra sito di CAP ed AUG (tripletta di inizio lettura); in questa posizione il sito Xba1 farà parte della regione non tradotta del messaggero, non altera la sequenza amminoacidica della β -globina che verrà

prodotta, ma genera un mRNA più lungo di 4 nucleotidi che sarà tecnicamente distinguibile dall' mRNA endogeno quando questo vettore espresso nelle cellule dei pazienti talassemici a scopo terapeutico. Altre modifiche sono:

- ✓ È stato rimosso l'enhancer/promotore virale localizzato nella regione U3 della 3' LTR; per effetto del processo di retrocopiazione tale delezione viene copiata nella 5' LTR per cui il vettore che si integra sarà privo di enhancers virali e per questo definito SIN (self inactivating vector) e quindi meno propenso a causare oncogenesi inserzionale;

- ✓ Sono state create 4 mutazioni nella regione virale del frammento del gene GAG per evitare la formazione di lunghi peptidi con potenziale oncogeno.

Il vettore TNS9.3 presenta una delezione nella regione U3 ($\Delta U3$) della 3'LTR, è quindi un vettore SIN (self inactivating). Questa delezione rimuove i nucleotidi da 418 a 18 della giunzione U3-R e rende trascrizionalmente inattiva la LTR. Il vettore contiene le seguenti sequenze dei siti ipersensibili HS della LCR (Locus Control Region) del cluster β -globinico umano: HS2 (840bp), HS3 (1308bp), ed HS4 (1069bp); contiene le sequenze del gene β -globinico (con una delezione di 770 bp nel secondo introne, IVS2) sotto il controllo di 618bp di sequenze promotore (con una inserzione di 4 nt nella regione 5'UTR) e della sequenza enhancer presente al 3' del gene dopo il sito di poliadenilazione.

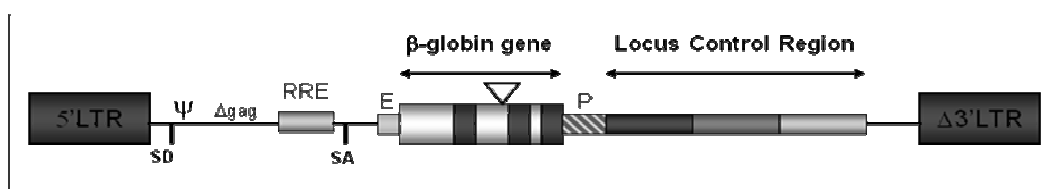


Figura 13: Rappresentazione schematica del vettore lentivirale ricombinante per la β -globina (TNS9.3). Il vettore contiene 5' e $\Delta 3'$ LTR; RRE = REV responsive element; E = enhancer3' del gene β ; β -globin gene= frammento di 2,7 Kb del gene β -globinico umano contenente una delezione di 350 bp nella IVS-2 e una inserzione di 4 nt nella regione 5'UTR; P = frammento di 660 bp del promotore del gene β ; LCR = locus control region del cluster β -globinico umano che comprende le regioni contenenti i siti ipersensibili HS2, 3 e 4.

I vettori isolati sono stati generati clonando l'isolatore cromatinico *sns5* (450 bp) o l'isolatore c-HS4 di pollo (1.2 Kb) o una regione spaziatrice (Junk di 500 bp)

proveniente dal cDNA del gene G6PDH, nel sito unico di restrizione NheI localizzato nella 3' LTR.

Da questa posizione i frammenti vengono retrocopiati nella 5' LTR durante il processo di retrotrascrizione e generano provirus fiancheggiati da isolatori cromatinici a entrambe le estremità. L'elemento *sns5* è stato clonato in orientamento senso e reverse.

Dall'analisi di espressione dei vettori isolati nella linea cellulare eritroleucemica murina (Mel) ed *in vivo* su topi talassemici è stato dimostrato che il vettore isolato con *sns5* ha una migliore performance di espressione rispetto allo stesso vettore non isolato o isolato con l'elemento cHS4 e per questo riteniamo costituisca un farmaco più efficace e più sicuro rispetto ad altri vettori analoghi.

I risultati del lavoro, comunicazioni personali Dott.ssa Leda Ferro, possono essere così riassunti:

1) A differenza dell'isolatore cHS4, *sns5* non influenza il titolo virale del vettore tns9.3mt quando inserito nella 3' LTR

2) *Sns5* aumenta il livello di espressione del gene β -globinico sia in cloni di cellule eritreo-leucemiche di topo (Mel) che *in vivo* nel modello del topo con β -talassemia e questa espressione è evidente a lungo termine, in particolare fino a 40 settimane dopo il trapianto

3) L'isolatore cromatinico *sns5*, infine, riduce la variabilità di espressione in colonie di milza di topi trapiantati

7) Terapia genica per la β -talassemia: studi in vivo sui modelli murini di talassemia major e talassemia intermedia

Il successo della terapia genica per la cura della β -talassemia dipende da un efficiente trasferimento genico, alti livelli di espressione tessuto e stadio specifica del transgene, un'espressione indipendente dal sito di integrazione e vettori sicuri sotto il profilo della genotossicità'.

Livelli di espressione adeguati sono stati ottenuti introducendo nei vettori il gene β -globinico umano oltre che elementi enhancer eritroide specifici, appartenenti alla Locus Control Region (LCR) β -globinica (Sadelain et al., 1995; Bender et al., 1988; Pawliuk et al., 2009; Raftopoulos et al., 1997; Novak et al., 1990; Leboulch et al., 1994). Nel 2000 il Dr M. Sadelain e collaboratori per primi dimostrarono che un vettore lentivirale derivato dall'HIV1 può veicolare sia il gene β -globinico umano che grandi porzioni della LCR, trasmetterli in maniera stabile nel genoma umano e produrre livelli terapeutici di β -globina umana capaci di correggere il fenotipo talassemico nel topo (May C., 2000). Da allora sono stati costruiti diversi vettori lentivirali contenenti geni globinici e regioni di controllo (LCR, Locus Control Region) che con successo sono stati espressi sia in vitro (colture eritroidi umane derivate da HSC di pazienti talassemici) che nel modello murino di β -talassemia, figura 14 (Pawliuk R., 2001; Imren S., 2002; May C., 2002; Persons D.A., 2003; Levasseur D.N., 2003; Rivella S., 2003; Hanawa, 2004).

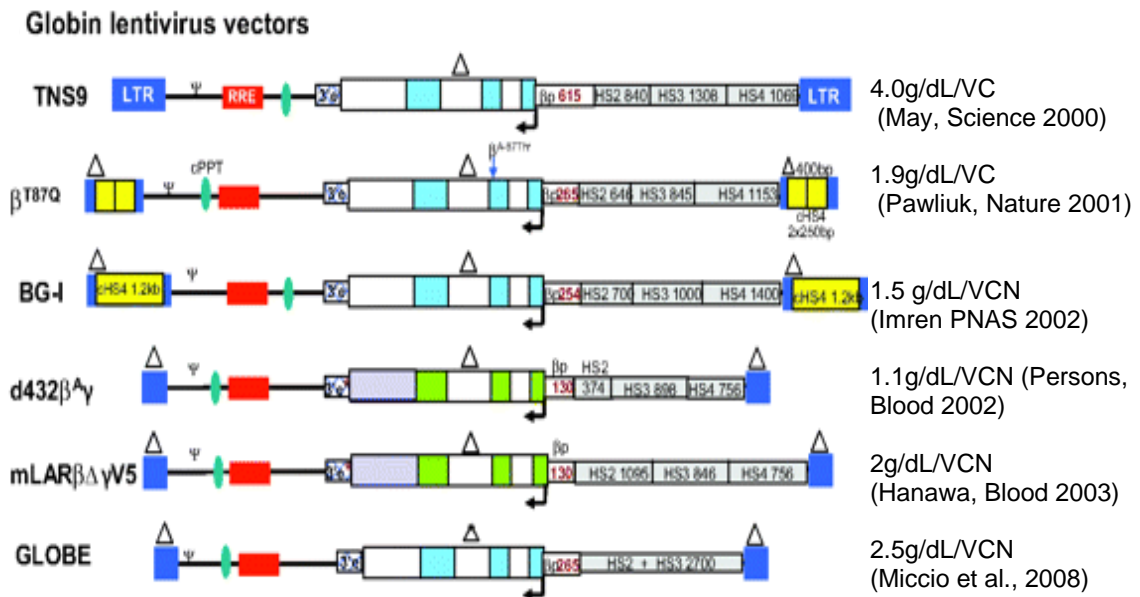


Figura 14: Rappresentazione schematica dei vettori lentivirali ricombinanti per il gene β/γ -globinico con i rispettivi livelli di espressione del gene terapeutico nel sistema murino. I geni β o γ globinici sono presenti in orientamento reverse rispetto alla trascrizione virale, gli esoni β -globinici in blu, quelli γ -globinici in verde, gli introni β -globinici in bianco. I triangoli rappresentano delezioni della sequenza di 372 bp ricca in purine, contenuta nella IVS2 β -globinica; il triangolo nella 3'LTR rappresenta la delezione di 400bp dell'enhancer della 3'LTR effettuata allo scopo di generare self-inactivating vectors (SIN vectors). RRE, rev response element; HS2, HS3, and HS4, frammenti core dei siti ipersensibili alla DNasi I presenti nella LCR β -globinica; la lunghezza dei rispettivi siti è indicata sopra di questi; cPPT, central polypurine tract; LTR, long terminal repeat; 3'e, enhancer β -globinica al 3'BP, Promotore del gene β -globinico; Ψ , segnale di packaging; Ψ^+ , segnale esteso di packaging

Il vettore TNS9.3 (May et al., 2000) codifica per il gene β -globinico umano ed è stato precedentemente descritto.

Il vettore β^{A87Q} (Pawliuk, et al., 2001) codifica per una forma del gene β -globinico mutata nel 87simo codone, con proprietà antifalcizzante e contiene due copie del core al 5' di 250bp di cHS4. Questo vettore è stato usato per il

primo ed unico caso di terapia genica sull'uomo in Francia condotto dal Dr. P. Leboulch.

Il vettore BG-I (Imren et al., 2002) esprime il gene β -globinico a partire dal promotore di 254-bp, contiene ampi elementi LCR, ed è fiancheggiato dall'isolatore full-length di 1.2kb cHS4 nelle LTR.

Il vettore d432 β - Δ T (Persons et al., 2002) contiene invece regioni 3'UTR (in viola) ed elementi enhancer del gene γ -globinico a valle della sequenza codificante il gene γ (3'e*).

Il vettore mLAR β Δ T5 (Hanawa et al., 2003) consiste di regioni estese della LCR β -globinica.

Il vettore GLOBE (Miccio et al., 2008) contiene una porzione più estesa del promotore β -globinico, e presenta solo porzioni dei siti HS2 e HS3 della LCR, inoltre la delezione nella IVS2 β -globinica è maggiore rispetto agli altri vettori (562-bp); questa delezione elimina siti alternativi di splicing che in passato avevano determinato problemi di stabilità ai vettori γ -retrovirali ricombinanti.

L'espressione del gene globinico trasportato dai vettori lentivirali è però soggetta al silenziamento e alla variabilità d'espressione dovuta al sito d'integrazione nella cromatina della cellula ospite (PEV). La correzione genetica della β -talassemia, infatti, è stata ottenuta solo quando la maggior parte delle cellule staminali ematopoietiche era geneticamente modificata con 2-3 copie di transgene per cellula. In contrasto, usando gli stessi modelli animali in studi di trapianto eterologo di midollo osseo, si è dimostrato che livelli di chimerismo pari a 30 a 40% tra cellule normali di donatore e cellule talassemiche di ricevente determina la completa correzione dei parametri ematologici (Kean L. S., 2003; Persons D. A., 2001). Questa discrepanza può essere spiegata considerando che un certo numero di vettori che si integrano in siti della cromatina non permissivi per l'espressione genica (eterocromatina) vengono silenziati (Ellis J., 2005).

L'isolatore cHS4, per la sua duplice capacità di funzionare da elemento di confine e da blocco dell'enhancer, è stato incluso in vettori lentivirali ricombinanti

per la β -globina umana al fine di migliorarne sia il profilo di espressione che quello di sicurezza in funzione dei trial clinici per la cura della β -talassemia (Rivella S, 2003; Emery D, 2000; Yannaki E, 2002; Arumugam P, 2007). Più recentemente sequenze core di tale elemento sono stati inclusi in un vettore che è stato usato nel primo trial clinico di terapia genica per la cura della β -talassemia (Cavazzana-Calvo et al., 2010).

Sebbene l'inclusione di cHS4 abbia incrementato la probabilità d'espressione di questi vettori, è stato riportato che questo elemento da solo non sembra sufficiente, ma la sua azione è complimentata dalla presenza di una sequenza SAR (scaffold attachment region) per ridurre significativamente l'effetto PE dei vettori (Ramezani, 2003). Walters et al. (1999) inoltre osservano che l'attività di cHS4 non è dominante in tutti i siti di integrazione del genoma, ed infine è anche controversa la capacità di cHS4 di influenzare il livello d'espressione del transgene (Arumugam, 2007; Ramezani, 2003; Rivella, 2000; Yannaki, 2002). Inoltre l'inserzione dell'elemento completo (1.2 Kb) all'interno della LTR del vettore abbassa notevolmente il titolo virale; in generale si osserva sempre una riduzione dei titoli virali che correla con la dimensione degli elementi di DNA inseriti (Emery, 2000; Ramezani, 2003); dato che vettori a titolo virale troppo basso non sono utilizzabili per trans-infettare cellule staminali ematopoietiche, più recentemente è stata utilizzata una parte di cHS4 di 0.4 Kb (400-cHS4), che però non ha dato risultati soddisfacenti in termini di effetto barriera, mentre due core di 250 bp ripetuti in tandem causano instabilità genomica.

Alla luce di questi risultati emerge la necessità di cercare nuovi isolatori che possano essere utilizzati con efficacia nei protocolli di terapia genica.

8) Terapia genica con vettori isolati: il primo trial di terapia genica per la β -talassemia sull'uomo

È stato appena pubblicato il risultato del primo trial per la terapia genica della β -talassemia sull'uomo (Cavazzana-Calvo et al., 2010).

Un paziente con una forma severa di talassemia (genotipo β^E/β^0), molto diffusa nel sud-est asiatico, è stato sottoposto a terapia genica mediante il vettore lentivirale ricombinante β^{A-T87Q}/β^A , precedentemente descritto in figura 14). Il

vettore é un SIN vector ed é isolato con due copie del core di 250bp di cHS4 (Chung et al.,1993). L'efficienza di trasduzione (percentuale di cellule contenenti almeno una copia di vettore integrata) é stata del 10-20%, con una media di 0,6 copie di vettore per cellula. Dal dodicesimo mese dopo il trasferimento genico ad oggi il paziente é trasfusione-indipendente passando da 4,5 a 9-10 gr/dL di emoglobina e tale aumento è da attribuirsi all'espressione del trasngene. Tuttavia il 45% di questa espressione è determinata da un clone mieloide in cui si è registrata una parziale espansione. In questo clone l'integrazione del vettore all'interno del gene HMGA2 ha causato la sua attivazione trascrizionale con alti livelli di espressione di una forma troncata del mRNA di HMGA2, la quale é resistente alla degradazione tramite microRNA let-7, il quale regola il livello di espressione di questo gene.

Il lentivirus ricombinante era in questo caso isolato con 2 elementi core di 250bp ciascuno, ed in questo clone il vettore, integrato all'interno del terzo introne del gene HMGA2 (figura 15), risultava deleto di uno dei due elementi core in ciascuna LTR.

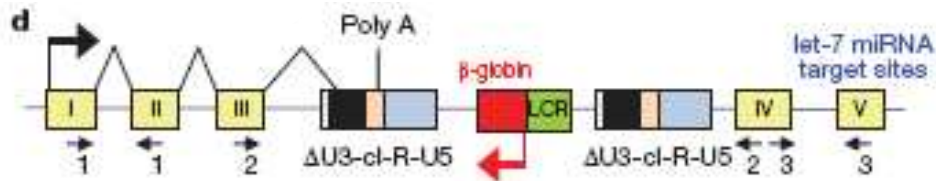


Figura 15: ricostruzione del vettore integrato all'interno del gene HMGA2: é indicato lo splicing anomalo e il taglio/poliadenilazione del trascritto troncato all'interno del provirus

Il gene HMGA2 era espresso solo negli eritroblasti, suggerendo che l'attivazione trascrizionale é avvenuta per un'azione eritroide specifica della LCR β -globinica.

In alcuni tumori benigni il gene HMGA2 é attivato da riarrangiamenti all'interno del terzo introne che portano alla delezione dei due introni distali (introni 4 e 5). Questo porta alla perdita di siti multipli di legame per il microRNA let-7, impedendo quindi la fisiologica degradazione del mRNA di HMGA2. Dall'analisi della sequenza della forma di mRNA predominante é emerso che questa é stata processata mediante splicing alterntivo del terzo introne, il quale conteneva un sito alternativo di splicing

al 3' localizzato all'interno dell'isolatore 250-cHS4 e un sito di poliadenilazione contenuto nell'adiacente regione R della LTR (figura 15).

I risultati di questo primo trial portano necessariamente ad effettuare alcune conclusioni. Da un lato sicuramente si è assistiti ad un successo; il paziente ha recuperato l'anemia e conduce una vita normale. Dall'altro lato però (i) la LCR, necessaria per ottenere livelli terapeutici di β -globina, ha agito da enhancer tessuto specifica; (ii) le copie in tandem dell'elemento 250-cHS4 hanno causato un riarrangiamento delle sequenze del vettore che ha portato alla perdita di una delle due copie di isolatore; (iii) l'isolatore in singola copia non è stato in grado di svolgere l'attività di blocco dell'enhancer; (iiii) sequenze di splicing contenute all'interno dell'isolatore hanno determinato lo splicing alternativo del gene attivato, causando la stabilizzazione del suo mRNA.

Il trial, in realtà, era stato effettuato precedentemente su un primo paziente; in questo caso però il numero di cellule geneticamente modificate era troppo basso per ricostruire il midollo con cellule corrette, per cui la terapia è fallita per scarsa efficienza di trans-infezione delle cellule staminali ed il paziente è ritornato ad essere talassemico.

Entrambi questi primi due casi mettono in evidenza la necessità di migliorare sia le condizioni di trans-infezione delle HSC *in vitro* che il disegno dei vettori ricombinanti. In questo contesto si inserisce il mio progetto di ricerca.

Scopo del progetto

In questo progetto di ricerca vengono affrontati due aspetti che riguardano la terapia genica per la cura della talassemia.

Parte I: Al fine di migliorare i protocolli di trans-infezione, con vettori lentivirali, delle cellule HSC ho condotto degli studi in collaborazione con il gruppo del Dott. M. Sadelain, presso i cui laboratori ho effettuato un anno di ricerca. In questo periodo ho effettuato studi di trans-infezione in vitro di cellule staminali ematopoietiche provenienti dal midollo osseo di pazienti con beta talassemia nel contesto degli studi preclinici necessari per l'approvazione del trial clinico da parte dell'FDA.

Ho valutato l'efficienza di trasferimento genico in condizioni di "clinical grade" valutando diversi parametri: (tempi, dosi virali e cocktail di citochine necessari per ottenere il maggior numero di cellule trasfettate con il minor numero di copie di vettore per cellula) ed ho messo a punto le metodologie per l'analisi di espressione in colture primarie eritroidi in fase liquida. Il risultato è stato l'elaborazione di un protocollo in cui sono descritte le condizioni ottimali di trans-infezione.

Parte II: come discusso nella sessione introduttiva, i vettori che si integrano nel genoma della cellula ospite sono soggetti a fenomeni PEV da un lato, dall'altro possono generare eventi di oncogenesi inserzionale.

I risultati dello studio del vettore TNS9.3 sia in cellule eritroidi di topo (cellule Mel) che in vivo (modello murino di talassemia), indicano che il vettore isolato con l'elemento *sns5* viene espresso a più alti livelli (2.3 volte maggiori) sia *in vitro* che *in vivo*. Tali risultati non rivelano però se l'aumento dell'espressione del transgene è dovuto ad un minor grado di variegazione dell'espressione determinata da *sns5* (azione di confine che contrasta gli effetti posizione) o piuttosto ad un aumentato livello di trascrizione per azione di enhancer. La seconda ipotesi è da tenere in conto in quanto questo elemento contiene al suo interno due siti di legame per il fattore eritroide specifico GATA-1, il quale in natura è espresso allo stadio adulto, si lega a tutti i geni eritroide-specifici finora identificati ed esplica quasi sempre un'azione potenziatrice, questo anche nel gene adulto nel locus β -globinico.

Al fine di studiare i meccanismi molecolari dell'azione di SNS5 nel contesto eritroide, ho condotto una serie di esperimenti nella linea eritro-leucemica murina Mel in cui ho studiato il profilo di espressione del vettore TNS9.3+GFP, contenente la cassetta globinica, ed il vettore LV-GFP contenente solo il gene marcatore della GFP sotto il controllo del promotore costitutivo PGK. Ho fiancheggiato entrambi i vettori con

l'elemento SNS5 o con lo stesso elemento nel quale sono stati aboliti per mutagenesi uno o entrambi i siti di legame per il fattore di trascrizione eritroide specifico GATA-1.

Risultati e discussione

Parte I : Trans-infezione di cellule HSC umane con un vettore lentivirale ricombinante per il gene delle β -globina umana

Durante la prima fase di questo progetto di ricerca, svolta presso il laboratorio del Dr Michel Sadelain del Memorial Sloan Kettering Cancer Center di New York, ho settato le condizioni ottimali di trans-infezione in vitro di cellule HSC di soggetti normali e di pazienti β -talassemici al fine di ottenere un discreto numero di cellule trasdotte con un esiguo numero di vettori per cellula. In quel periodo era stato da poco tempo approvato dal RAC (Recombinant DNA Advisory Committee) il vettore lentivirale, ricombinante per il gene della β -globina umana, TNS9.3 come possibile vettore per il trial clinico di terapia genica per la cura della β -talassemia. Il successivo passaggio, approvazione del protocollo clinico di fase I di terapia genica da parte della FDA (Food and Drug Administration), richiedeva una serie di studi preclinici intenti a valutare, in colture primarie di HSC umane, l'efficienza di trans-infezione (percentuale di cellule HSC trasdotte) e l'efficacia della terapia (livelli di trascrizione del transgene e correzione del fenotipo). Per questo motivo ho valutato diversi parametri che riguardano sia la fase di prestimolazione delle HSC, che la fase della trans-infezione. Durante questo periodo ho anche sviluppato le tecniche e le metodologie che sono state applicate poi all'intero studio preclinico.

Parametri che influenzano l'efficienza di trans-infezione

I lentivirus infettano anche cellule non in divisione come le staminali ematopoietiche, ma queste devono essere rese permissive, cioè indotte ad entrare in fase G1; questo si ottiene mediante prestimolazione con opportune citochine. Inoltre il titolo virale, il rapporto tra particelle virali e cellule (moi), i tempi di esposizione al virus etc. sono tutti parametri che incidono sulla efficienza di trans-infezione. Al fine di facilitare le analisi ho inserito nel vettore TNS9.3 un gene marcatore (l'unità trascrizionale hPGK-GFP) a monte della 3'LTR generando il vettore TNS9.3+GFP (figura 16).

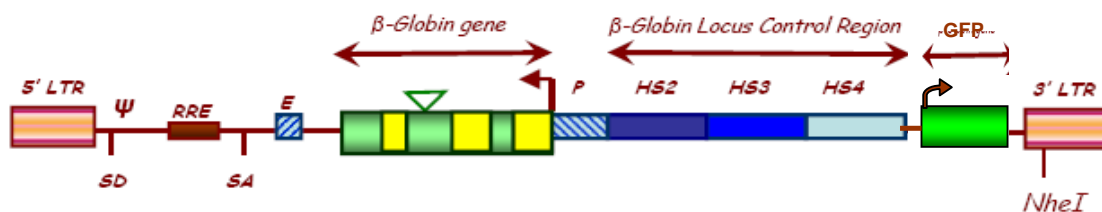


Figura 16: Rappresentazione schematica del vettore lentivirale ricombinante per la β -globina (TNS9+GFP). In figura è mostrata la posizione del sito unico di restrizione NheI, utilizzato per l'inserimento delle sequenze di isolatori o di junk all'interno del vettore. La cassetta hPGK-GFP è stata clonata a monte della 3' LTR.

In tabella 1 sono riportate le varie condizioni valutate nelle quali l'efficienza di trans-infezione è stata determinata misurando percentuale delle cellule fluorescenti. I risultati suggeriscono che:

- la citochina IL-3, in aggiunta alle citochine SCF, TPO, Flt-3, permette di ottenere un'efficienza di trans-infezione doppia rispetto allo stesso cocktail di citochine in assenza di IL-3 (35% vs 14%). La sola citochina IL-3 risulta efficace ma in misura minore.
- IL-6 da sola o in combinazione con altre citochine non migliora l'efficienza di trasferimento genico.
- La permanenza del supernatante virale a contatto con le cellule per 24h, piuttosto che per 12h, è influente ai fini dell'efficienza di trans-infezione (in entrambi i casi, a parità di protocollo, l'efficienza di trans-infezione è del 8%). Questo suggerisce che l'infezione avviene durante le prime ore e che pertanto sembra inutile prolungare ulteriormente i tempi di esposizione delle cellule al virus, con conseguente sofferenza cellulare.
- La somministrazione di due dosi virali a distanza di 12 ore ciascuna, piuttosto che di una sola dose virale per 12 ore determina un lieve incremento dell'efficienza di trans-infezione (11% di cellule fluorescenti vs 8%).

Cocktail di citochine	Durata Prestim (ore)	% cellule morte dopo prestim	MOI	dosi virali	durata somministrata ciascuna dose virale	% cellule GFP+		
						giorni dalla trasfezione		
						7	10	13
IL6 (60 ng/ul)	24	40%	30	1	24	11%	12%	11%
TPO(100ng/ul) SCF(100ng/ul), Flt-3(100ng/ul), IL6 (60 ng/ul)	24	27%	30	1	24	15%	15%	16%
TPO(100ng/ul) SCF (100ng/ul) Flt-3(100ng/ul) IL6 (60 ng/ul) IL3 60ng/ul	24	35%	30	1	24	27%	26%	27%
IL3 60ng/ul	24	40%	30	1	24	19%	21%	21%
TPO (100ng/ul) SCF(100ng/ul), Flt-3(100ng/ul), IL3 (60 ng/ul)	24	30%	30	1	24	35%	30%	30%
TPO (100ng/ul) SCF(100ng/ul), Flt-3(100ng/ul)	24	29%	30	1	12	8%	7%	7%
TPO (100ng/ul) SCF(100ng/ul), Flt-3(100ng/ul)	24	28%	30	1	24	9%	8%	7%
TPO (100ng/ul) SCF (100ng/ul) Flt-3(100ng/ul)	24	27%	30	2	12	11%	13%	13%
TPO (100ng/ul) SCF(100ng/ul), Flt-3(100ng/ul)	36	45%	30	1	24	6%	8%	6%
TPO (100ng/ul) SCF(100ng/ul), Flt-3(100ng/ul)	12	21%	30	1	24	11%	9%	12%

Tabella 1: condizioni di trans-infezione utilizzate per l'esperimento.

Ho condotto un secondo esperimento variando m.o.i., numero di dosi virali da somministrare, e tempi che intercorrono tra una dose virale e la successiva.

Questo esperimento é stato condotto usando le condizioni di prestimolazione precedentemente settate; per la trasfezione é stato utilizzato il vettore LV-GFP (che differisce dal TNS9.3+GFP perché manca della cassetta β -globina/LCR).

I risultati ottenuti sono schematizzati in tabella 2 e suggeriscono che:

- L'utilizzo di una MOI 60 vs MOI 30 non corrisponde ad un'efficienza di trasfezione doppia nelle cellule, anzi l'aumento di dose virale (e di conseguenza di volume di supernatante virale) risultava moderatamente tossico per le cellule (mortalità dopo trans-infezione del 40%).
- La somministrazione di due dosi virali a distanza di 12 ore ciascuna, piuttosto che di una sola dose virale somministrata per 12 ore, determina un incremento dell'efficienza di trasfezione (33% di cellule fluorescenti vs 25%).
- Utilizzare 2 dosi virali, ripetute a distanza di 8 ore, riproduce lo stesso risultato di due dosi a distanza di 12 ore (33% di cellule fluorescenti). Questo permette di accorciare i tempi di trans-infezione, a vantaggio della vitalità cellulare (33% vs 25%).

Virus usato	% cell morte dopo trasfez	moi	dosi virali	durata di somministr di ciascuna dose virale (ore)	% cellule GFP+		
					giorni dalla trasfezione		
					4	8	10
LV- GFP	30%	30	2	12	38%	39%	38%
TNS9+GFP	33%	30	2	12	33%	32%	32%
TNS9+GFP	20%	30	1	12	25%	24%	25%
TNS9+GFP	40%	60	1	12	28%	25%	25%
TNS9+GFP	25%	30	2	8	33%	34%	34%

Tabella 2: condizioni usate per la trasfezione di cellule CD34+ con il vettore TNS9+GFP.

I risultati hanno permesso di stabilire che le condizioni ottimali sono rappresentate da:

- Cocktail di citochine: SCF, TPO e Flt-3 (c.f. 100ng/ul), IL-3 (20 ng/ul)
- Durata prestimolazione: 24 ore

- c) Numero di dosi virali: 2
- d) m.o.i.: 30
- e) Tempo tra una dose virale e la successiva: indifferentemente 8 o 12 ore

Il processo di trans infezione non altera il grado di staminalità delle HSC né il decorso di differenziamento eritroide *in vitro*

La progressione del differenziamento eritroide, durante il corso della coltura, e' stata seguita mediante analisi citofluorimetrica utilizzando anticorpi per antigeni della membrana eritroide, specifici delle varie fasi della maturazione: il recettore della transferrina CD71 e l'antigene della glicoforina A (Amoyal et al., 2003). Il CD71 viene espresso gia' nelle cellule eritroidi piu' precoci e la sua espressione si mantiene alta fino alla fine della coltura (14 giorni). La glicoforina A è una glicoproteina che appare sulla superficie delle cellule quando si ha l'accumulo intracellulare di emoglobina, circa al quinto giorno di coltura (Wojda et al., 2002).

Un esempio dei profili di espressione di questi marcatori di membrana é riportato in figura 17. I risultati hanno mostrato che, in tutti i campioni analizzati, il profilo del differenziamento eritroide delle colture era paragonabile e sovrapponibile a quello delle cellule non trasdotte. Questo profilo d'espressione dei marcatori del differenziamento è in accordo con quanto già pubblicato (Wojda et al., 2002).

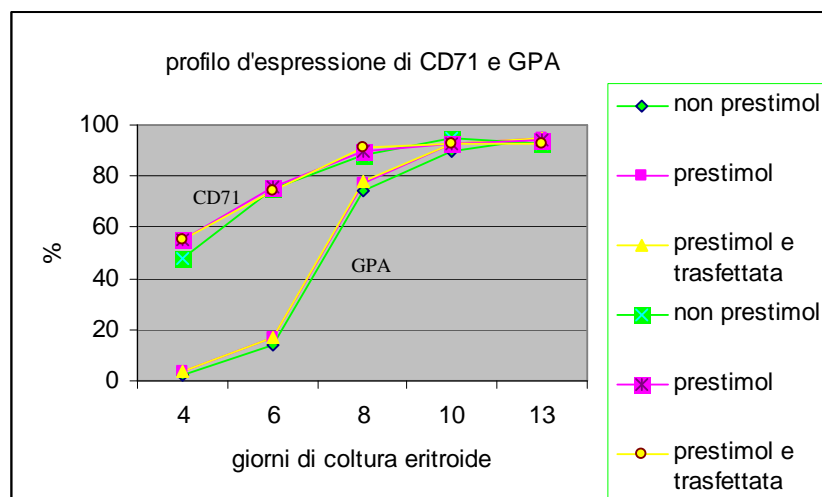


Figura 17: il grafico riporta l'andamento dell'espressione dei marcatori CD71 e GPA sulle membrane cellulari delle colture eritroidi a diversi giorni.

Un'aliquota di cellule da ogni reazione é stata piastrata su supporto semisolido di metilcellulosa, contenente le citochine necessarie sia per il differenziamento eritroide che mieloide. Si é potuto determinare che le diverse condizioni adoperate non alteravano la capacità clonale delle cellule CD34⁺ (il numero di colonie ottenute piastrando lo stesso numero di cellule CD34⁺ era uguale in tutti i campioni), né compromettono la loro capacità di differenziarsi verso la linea eritroide o mieloide (il rapporto tra numero di colonie eritroidi e mieloidi si manteneva costante in tutti i campioni).

Analisi di espressione dei vettori LV-GFP e TNS9.3+GFP

Ho condotto i primi esperimenti di trans-infezione di cellule HSC di paziente con β -talassemia (β^0/β^0) usando il vettore TNS9+GFP (titolo 7×10^7 ip/ml) e il vettore di controllo LV-GFP (titolo $7,5 \times 10^7$ ip/ml, schematizzato in figura 18) che, a differenza del TNS9+GFP, non contiene la cassetta gene β -globinico/LCR.

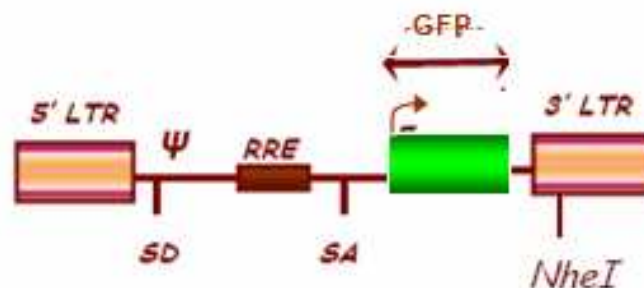


Figura 18: Ricostruzione del vettore LV-GFP. Il gene reporter GFP è sotto il controllo del promotore costitutivo per la fosfo-glicero kinasi umana hPGK

Ogni esperimento é stato effettuato in duplicato. Le cellule sono state trans-infettate 2 volte, a distanza di 8 ore, con m.o.i. 30. Dopo 24 ore le cellule sono state messe in coltura in terreno contenente le citochine per il differenziamento eritroide. La coltura eritroide é stata seguita mediante analisi citofluorimetrica per monitorarne il differenziamento eritroide e l'espressione del gene reporter GFP.

All'ottavo giorno di coltura eritoride è stato analizzato il numero di copie di vettore (VCN) medio per cellula. Per fare ciò ho messo a punto un sistema di PCR quantitativa per la quantizzazione assoluta del numero di copie di vettore (v. sessione Materiali e metodi).

Una prima osservazione emersa da questi esperimenti è che le stesse condizioni applicate determinavano efficienza di trans-infezione diversa per i due vettori; questo può essere dovuto alla diversa grandezza e diversa complessità dei due genomi virali (14kb del TNS9.3+GFP vs 7kb del LV-GFP) che potrebbe influenzare l'efficienza dei processi di retrotrascrizione ed integrazione. Tre diversi esperimenti hanno dato risultati simili ed in tabella 3 sono riportati i dati relativi ad uno di essi.

VETTORE	MOI	VCN	% cell GFP+ nel pool	% di colonie PCR+	% di colonie GFP+
TNS9.3+GFP	2X30	1.8	32%	85%	50%
GFP	2X30	2.5	37%	92%	62%

Tabella 3: viene riportato, per ciascun vettore, m.o.i. e numero di dosi virali con cui sono state trattate le cellule, i rispettivi valori di fluorescenza e VCN medio per cellula ottenuti nei pool cellulari, Viene riportata la percentuale di cellule trasdotte (% colonie positive al vettore per PCR) e la percentuale di colonie che esprimono il vettore (% di colonie fluorescenti alla GFP per citofluorimetria)

L'analisi citofluorimetrica dei marcatori di membrana CD71 e GPA ha dimostrato che nella coltura il differenziamento eritroide procedeva in modo regolare e paragonabile tra le colture trans-infettate e non. I profili di espressione relativi ai due marcatori sono riportati in figura 19.

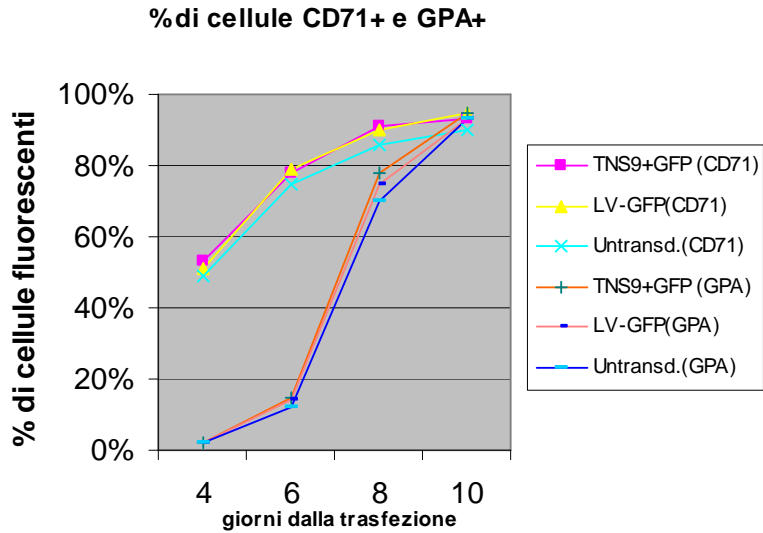


Figura 19: percentuale di cellule CD71+ e GPA+ al 4°, 6°, 8° e 10° giorno di coltura eritroide

Le percentuali di cellule GFP positive nelle colture eritroidi, a diversi giorni dalla trasfezione, sono riportate in figura 20.

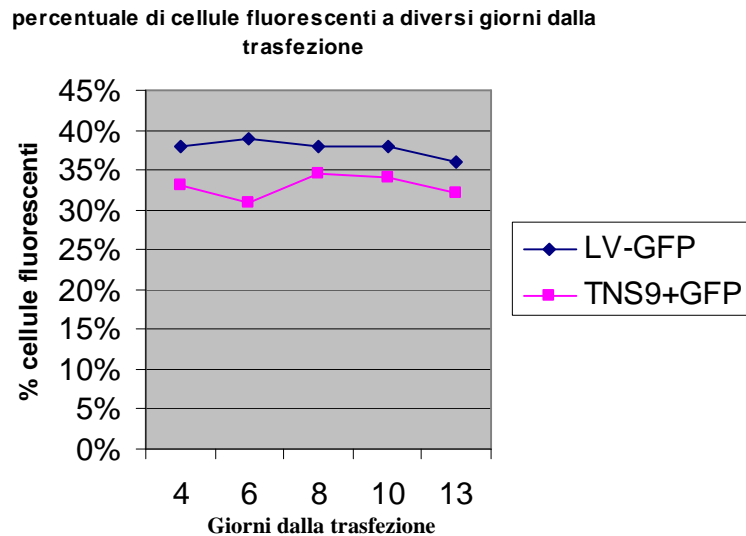


Figura 20: percentuale di cellule che esprimono la GFP nelle colture eritroidi trasdotte.

L'analisi citofluorimetrica eseguita sulle colonie di progenitori eritroidi sviluppate dopo 14 giorni in metilcellulosa rivela una percentuale di colonie fluorescenti doppia rispetto al pool e con progenie variegata. L'analisi di PCR per la rilevazione delle colonie contenenti il vettore rivela che la maggior parte delle cellule sono trans infettate anche se non in tutte il vettore è espresso.

I livelli di espressione del transgene sono stati valutati mediante primer extension, quantizzando, mediante densitometro, i segnali di ibridazione relativi al trascritto β -globinico veicolato dal vettore e normalizzandoli per il segnale del gene α -globina endogeno. L'istogramma in figura 21 schematizza i risultati ottenuti al 15° giorno di coltura nelle diverse colture non trasdotte o trasdotte con il vettore TNS9.3 o con il vettore controllo LV-GFP. Infine in parallelo sono stati analizzati i livelli di espressione del gene beta-globinico in colture eritroidi da HSC di donatori sani. Solo nelle cellule trasdotte con TNS9.3+GFP è rilevabile la trascrizione del gene beta globinico umano. Le cellule trasdotte con il vettore controllo LV-GFP o non trasdotte hanno livelli trascurabili di trascritto, come ci si aspetta nella β -zero talassemia omozigote a causa dell'instabilità del messaggero β -globinico mutato. Inoltre, 1,8 copie di vettore TNS9.3+GFP per cellula, nonostante la presenza delle sequenze enhancer della LCR, producono il 40% di trascritto β -globinico rispetto ai due geni α -globinici endogeni.

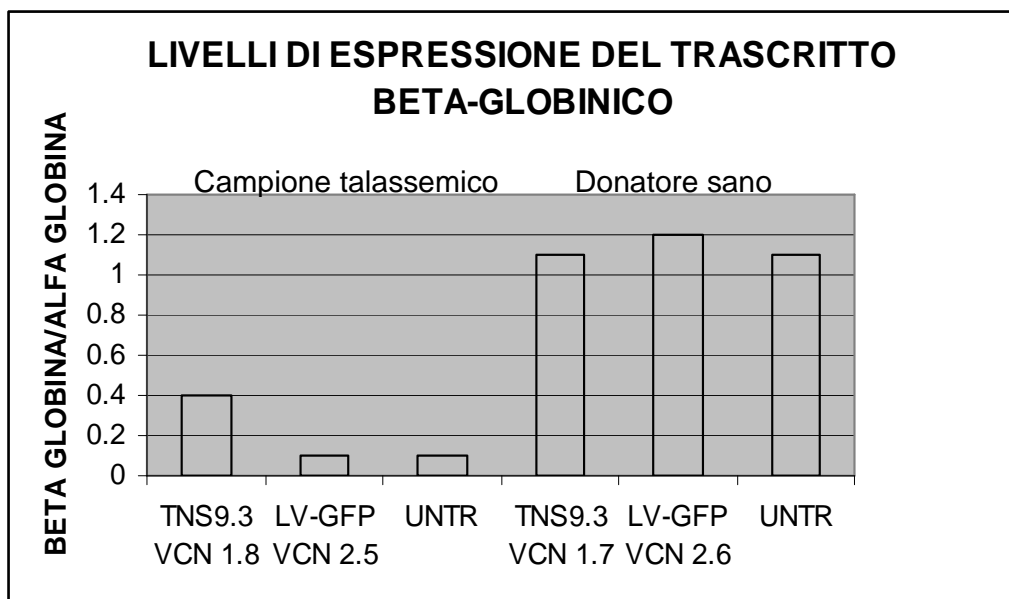


Figura 21: sono rappresentati i livelli di espressione del gene β -globinico normalizzati per i livelli di espressione del gene α -globinico

Le cellule di paziente che esprimono la β -globina esogena dovrebbero essere in grado di differenziare fino alla fase terminale come effetto della correzione genetica mentre le cellule non corrette dovrebbero arrestarsi a stadi precoci del differenziamento. Ho potuto rilevare il superamento del blocco dell'eritropoiesi inefficace mediante analisi dei vari tipi cellulari osservati a vari giorni di coltura. I campioni di cellule sono stati analizzati mediante colorazione May Grunwald-Giemsa dei vetrini. Dall'analisi cellulare delle diverse forme di differenziamento eritroide risultano i grafici in figura 22. Le differenze significative per i diversi campioni si evincono al giorno 15 (figura 22): le cellule da paziente talassemico trasdotte col vettore TNS9.3+GFP superano lo stadio di differenziamento da eritroblasto policromatico e si differenziano in eritroblasti ortocromatici in modo confrontabile col campione normale. Nel campione di talassemico trasdotto col vettore LV-GFP e' evidente il blocco del differenziamento. Questi risultati evidenziano una correzione fenotipica delle cellule talassemiche come conseguenza dell'espressione del transgene, come evidenziato negli esperimenti di primer extension.

Analisi cellulare delle forme di differenziamento eritroidi al 15° giorno di coltura

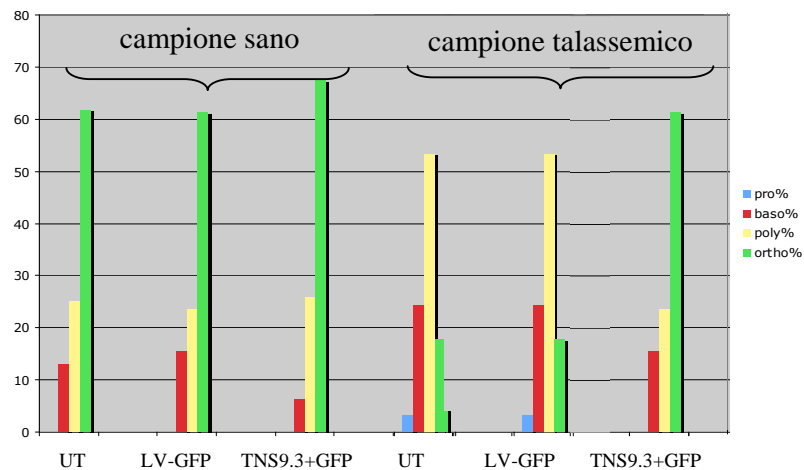


Figura 22: rappresentazione schematica della percentuale di cellule ai vari stadi di differenziamento eritroide, in ordine temporale: pro= proeritroblasto; baso= basofilo, poly= policromatico, ortho= ortocromatico) nel campione talassemico e nel campione da donatore sano, entrambi trattati con i vettori TNS9.3+GFP o LV-GFP o non trasdotti (UT). L'analisi é stata condotta nella fase finale della coltura (giorno 15 di coltura eritroide).

L'espressione della β -globina è stata rilevata mediante analisi di HPLC (High Performance Liquid Chromatography) che distingue le diverse forme di emoglobina prodotte dalle cellule eritroidi. Nell'esempio sotto riportato è evidente la presenza della emoglobina adulta HbA ($2\alpha/2\beta$) solo nel campione trans-infettato con il vettore TNS9.3+GFP dato che le cellule provenivano da un paziente con talassemia major il cui genotipo β^039/β^039 comporta l'assenza di β -globina e quindi anche di HbA (come evidente nel pannello relativo al campione non trans-infettato, figura 23). La presenza del vettore determina produzione di β -globina e quindi di emoglobina adulta.

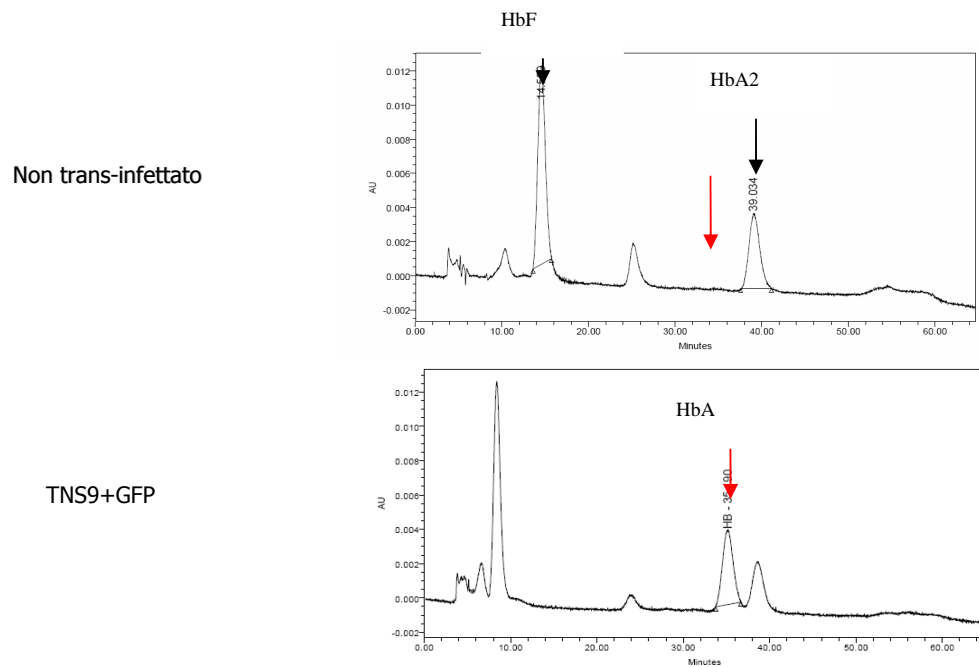


Figura 23: cromatogrammi HPLC relativi alla produzione di diverse emoglobine rilevate nelle cellule eritroidi derivate da HSC di pazienti con β^0 -talassemia in colture. HbF= emoglobina fetale gamma/alfa, HbA2= emoglobina adulta delta/alfa , HbA= emoglobina adulta beta/alfa

Da questo primo studio preclinico è stato concluso che, anche se l'espressione del vettore determina la produzione ex-novo di β -globina nelle cellule trasdote (analisi HPLC) e permette di superare il blocco dell'eritropoiesi inefficace *in vitro* (analisi morfologica del differenziamento eritroide) essa è soggetta agli effetti PE

dato che 1.8 copie di vettore per cellula esprimono meno della metà del gene globinico endogeno (analisi di primer extension).

L'effetto del silenziamento e della variegazione dell'espressione era evidente anche dall'analisi condotta sulle colonie di progenitori eritroidi generati in metilcellulosa da un'aliquota di cellule trans-infettate. Con entrambi i vettori circa il 35% delle cellule nel pool cellulare esprimevano il transgene GFP; di contro il 50% almeno di colonie era GFP+ ma con espressione variegata (ovvero in un numero esiguo di colonie si avevano il 100% di cellule esprimenti il vettore).

Il silenziamento del vettore era anche evidente dalla rilevazione che un buon numero di colonie che contenevano il vettore erano GFP- e che 1,8 e 2.5 copie di vettore per cellula (TNS9.3+GFP e LV-GFP rispettivamente) producevano circa 30% di cellule GFP+ nel pool.

Parte II: Studio funzionale dell'isolatore cromatinico *sns5*

Come discusso nella sessione introduttiva, i vettori che si integrano nel genoma della cellula ospite sono soggetti ad effetti posizione perché influenzati dalla struttura della cromatina. I risultati, riportati nella prima parte di questa tesi, confermano che anche il vettore TNS9.3, nonostante contenga sequenze di regolazione ed enhancer eritroidi specifici (porzioni di LCR β -globinica), è affetto da silenziamento (risultato derivato dall'analisi della percentuale di colonie di progenitori trasdotti ma che non esprimono il transgene GFP contenuto nello stesso vettore, tabella 3). L'introduzione in questo vettore di sequenze che contrastano gli effetti PE avrebbe potuto quindi migliorare l'espressione del transgene.

Era stato già dimostrato che *sns-5*, posizionato ai lati di un vettore onco-retrovirale, lo rendeva meno sensibile agli effetti posizione e determinava una trascrizione del gene marcatore GFP meno variegata (D'Apolito et al 2009). Per tutti questi motivi questo elemento è stato clonato in posizione fiancheggiante il vettore lentivirale globinico TNS9.3 e studiato in cellule eritroidi di topo (cellule Mel) e nel modello del topo talassemico; i risultati di questi studi, condotti in collaborazione con la dott.ssa Leda Ferro al MSKCC di NY, indicano che il gene globinico del vettore fiancheggiato da questo isolatore viene espresso a più alti livelli (2.3 volte maggiori) rispetto al vettore non isolato; questo dato è stato ottenuto sia *in vitro* che *in vivo*, nel sistema murino.

Tali risultati, ottenuti misurando il livello di trascritto β -globinico umano sia nei cloni cellulari di Mel, che nel sangue periferico e nelle colonie di milza dei topi talassemici dopo trapianto genico con il vettore TNS9.3, non rivelano però se l'aumento dell'espressione del transgene β -globinico umano veicolato è dovuto ad un minor grado di variegazione dell'espressione determinata da *sns5* (azione di confine che contrasta gli effetti posizione) o piuttosto ad un aumentato livello di trascrizione del gene, per azione di *sns5* come enhancer. La seconda ipotesi è pure da tenere in conto in quanto quest'elemento contiene al suo interno due siti di legame per il fattore eritroide specifico GATA-1, il quale in natura è espresso allo stadio eritroide adulto, si lega a tutti gli elementi di regolazione dei geni eritroide-specifici finora identificati (geni globinici, LCR beta globinica, gene

dell'eritropoietina, lo stesso gene per il fattore GATA1 etc...) ed esplica quasi sempre un'azione potenziatrice dell'espressione.

Il legame con GATA-1, d'altro canto, può anche essere coinvolto nell'azione di confine esplicata dall'elemento *sns5* in quanto è stato dimostrato che questo TF è richiesto per stabilire nel locus β -globinico endogeno un pattern di acetilazione tessuto-specifico interagendo con l'acetil-trasferasi CBP/p300 (Letting et al., 2003; Blobel, 2000). Analisi di ChIP su provirus di vettori oncoretrovirali isolati con *sns5* suggerivano la co-localizzazione su questo elemento sia del TF GATA-1 che di istoni iperacetilati, marcatori di cromatina attiva (D'Apolito et al., 2009).

Per questi motivi, nella seconda parte di questa tesi ho voluto valutare, mediante analisi funzionale di mutagenesi, se il legame di GATA-1 con *sns5* è coinvolto nella funzione di confine svolta da questo elemento.

Come schematizzato in figura 24 il fattore di trascrizione eritroide-specifico GATA-1 si lega sia alla Box A che alla Box E presenti in *sns5*, sia *in vitro* che *in vivo* (Acuto et al., 2005, D'Apolito et al., 2009).

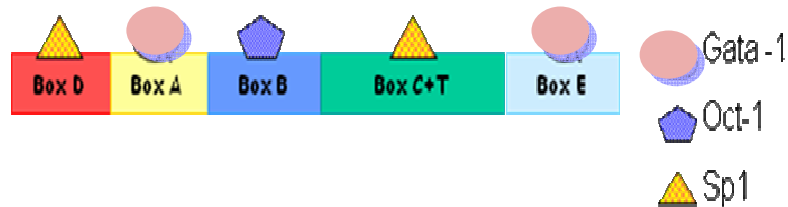


Figura 24 Schema dell'isolatore *sns5* in cui sono contrassegnate le sequenze denominate Box A, Box B, Box C+T, Box D e Box E, con i rispettivi fattori proteici che le riconoscono

Ho prodotto mediante mutagenesi due varianti dell'elemento *sns5*: una contenente una mutazione nel sito GATA-1 presente nella BoxA (denominando la nuova sequenza $SNS5^{mA}$), ed una contenente una mutazione in entrambi i siti GATA-1 ($SNS5^{mA+E}$). Infine ho clonato *sns5* e le sue varianti in posizione fiancheggiante il vettore TNS9.3+GFP, generando i vettori TNS9.3+GFP+*sns5*, TNS9.3+GFP+ $SNS5^{mA}$ e TNS9.3+GFP+ $SNS5^{mA+E}$ rispettivamente (figura 25).

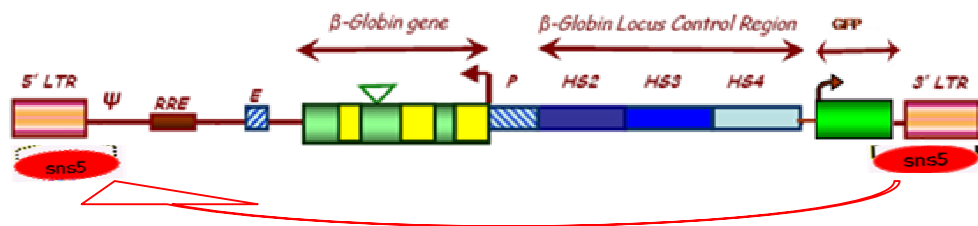


Figura 25: l'isolatore cromatinico *sns5* e le sue varianti sono state clonate all'interno della 3'LTR nel vettore TNS9.3+GFP. Durante il ciclo virale tali sequenze vengono reintrodotte nella 5'LTR, venendosi a trovare in posizione fiancheggiata il vettore.

Al fine di studiare l'azione di confine di *sns5* e delle varianti mutate, questi elementi sono state anche clonate nel vettore LV-GFP (figura 18) che contiene una sola unità trascrizionale (PGK-GFP) per un'estensiva analisi clonale. Sono stati generati i vettori LV-GFP+SNS5, LV-GFP+SNS5^{mA} e LV-GFP+SNS5^{mtA+E}.

Come prima analisi ho verificato, mediante analisi di immuno-precipitazione della cromatina (ChIP) in cellule contenenti provirus con l'isolatore mutato e non, che, come già riportato in letteratura (Young et al., 2008), queste mutazioni (4 nt mutati dei 6 costituenti la sequenza consensus) abolivano il legame con GATA-1.

Analisi di espressione del vettore LV-GFP

Cellule Mel sono state trans-infettate con il vettore LV-GFP, isolato e non, a MOI tali da generare cloni con un numero minimo di copie per cellula, con l'intento di studiare l'analisi di espressione in cloni contenenti una sola copia di vettore integrata. Sono state fatte diluizioni seriali ed i cloni cellulari sono stati espansi. Per ciascun vettore sono stati analizzati più di 200 cloni, per rilevare sia la presenza del vettore mediante PCR che l'espressione del gene marcatore

GFP mediante analisi citofluorimetrica. La percentuale dei cloni che non esprimono il vettore (cloni GFP-) sul totale dei cloni trasdotti (cloni PCR+) indica il grado di silenziamento (PE); la percentuale dei cloni con progenie ad espressione variegata (cioè cloni con percentuali di cellule fluorescenti inferiori al 90%) era considerata per determinare il grado di variegazione dell'espressione all'interno del clone (PEV), (tabella 4).

Vettore	PE	PEV	MFI± DS	N. CLONI
LV-GFP	60%	25%	4.8±3	58
LV-GFP+SNS5	8%	14%	7.7±1.3	57
LV-GFP +SNS5mA	4%	13%	6.3±1.9	60
LV-GFP +SNS5mA+E	4%	12%	5.2±1.6	52

Tabella 4: sono riportati la percentuale di cloni silenziati (PE) e variegati (PEV), i livelli medi di espressione del transgene GFP (MFI=Mean Fluorescence Intensity channel) ± deviazione standard (DS)

I risultati indicano che il vettore isolato è silenziato solo nel 8% dei casi, cioè il 92% dei vettori isolati sono espressi in siti di integrazione random contro solo il 40% dei vettori non isolati; anche il grado di variegazione all'interno della progenie cellulare, è contrastato dalla presenza dell'isolatore (14% vs 25%). I vettori contenenti entrambe le versioni mutate di *sns5* sono ugualmente protetti dagli effetti posizione suggerendo che il legame con GATA-1 non è coinvolto nell'azione di confine esibito da *sns5*.

L'analisi dei livelli di espressione del gene GFP misurati come valore della intensità di fluorescenza media (MFI) in cloni contenenti una copia di vettore rivela un livello di trascrizione medio che non differisce significativamente nei vari vettori, anche se il vettore non isolato presenta valori di deviazione standard maggiori (figura 26 e tabella 4).

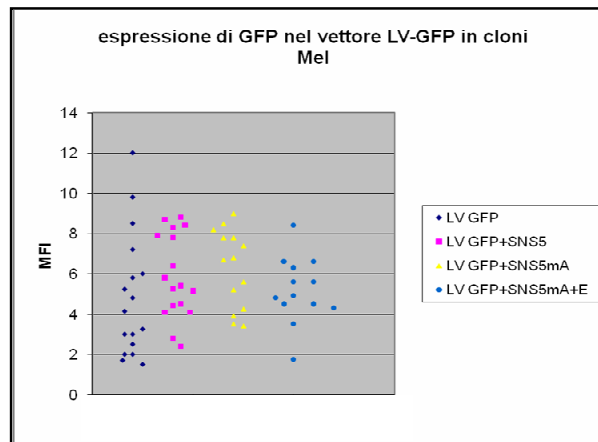


Figura 26: distribuzione dell'espressione del transgene GFP in cloni cellulari trans-infettati con i diversi costrutti lentivirali

Analisi di espressione del vettore TNS9.3+GFP

Lo stesso studio è stato condotto con il vettore globinico TNS9.3+GFP isolato e non (rappresentazione schematica in figura 27) in cloni di cellule Mel contenenti una sola copia di vettore per cellula ed è stata valutata l'espressione di entrambe le unità trascrizionali: hPGK→GFP e gene β-globinico umano.

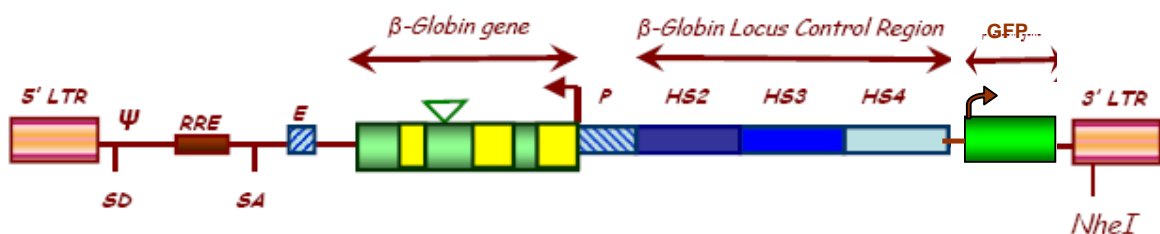


Figura 27: Rappresentazione del vettore TNS9.3+GFP. La cassetta hPGK→GFP è stata clonata a monte della 3'LTR

Analisi di espressione del transgene GFP: Anche con questo vettore i risultati confermano che l'inclusione dell'isolatore conferisce alla cassetta hPGK→GFP una maggiore probabilità di espressione (tabella 5): circa il 40% dei vettori non isolati è silenziato contro il 5% dei vettori isolati. Le mutazioni dei siti GATA-1 aumentano leggermente la percentuale dei vettori silenziati. Quando si valuta il livello di espressione del gene GFP (valori di MFI) sorprendentemente questo risulta più elevato (2,6 volte) nel vettore non isolato (MFI 22 vs 8.5); di contro i vettori isolati esibiscono livelli di espressione del transgene più omogenei come evidenziato da un valore minore di deviazione standard (DS in tabella 5).

Risulta variabile (alti valori di DS) anche l'espressione del gene GFP in entrambi i vettori isolati con le varianti di *sns5*. La cassetta hPGK-GFP risente dell'azione di confine esercitata da *sns5* e le mutazioni in questo tipo di vettore, diversamente dal vettore LV-GFP, influenzano negativamente questa capacità.

vettore	PE	PEV	MFI ± DS
TNS9+GFP	38%	43%	22±7.5
TNS9+GFP+SNS5	5%	27%	8.5±3.8
TNS9+GFP +SNS5^{mA}	10%	13%	11.5±7.8
TNS9+GFP + SNS5^{mA+E}	12%	21%	11±7.2

Tabella 5: sono riportati la probabilità di espressione del transgene nei cloni analizzati (PE, valutata come rapporto cloni GFP+/PCR+), la percentuale di cloni che mostravano fenomeni di variegazione (PEV, percentuale di cellule GFP+ <90%), l'intensità di fluorescenza media (MFI) e la relativa deviazione standard(DS).

Analisi di espressione del gene β-globinico: Negli stessi cloni a singola copia di vettore è stato misurato sia il grado di silenziamento di questo transgene che il livello di espressione del trasngene β-globinico umano con un'analisi quantitativa

(RT-PCR) relativa alla espressione di una copia di gene α -globinico endogeno ed i risultati sono riportati in figura 28.

L'analisi del grado di silenziamento effettuata valutando il rapporto tra cloni che contengono il vettore e che non esprimono il gene β -globinico rivela che:

Sns5 esibisce azione di confine perché impartisce al transgene una maggiore probabilità di essere espresso in diversi siti di integrazione, ed il legame con il fattore GATA1 è coinvolto in questa azione. Infatti, se si considerano silenziati i geni β -globinici che sono espressi meno del 5% rispetto al gene α di topo (valori inferiori a 0.05 nel grafico) si evidenzia che il 45% dei cloni (9/20) contenenti il vettore non isolato sono silenziati. L'inclusione di *sns5* nel vettore determina che nel 100% dei cloni il transgene è espresso; la mutazione del sito GATA-1 della boxA determina il 21% di transgeni silenziati (4/19) mentre entrambi i siti GATA-1 mutati determinano un incremento degli effetti PE, con il 62% dei cloni silenziati (13/21).

L'analisi dei livelli di espressione del transgene β -globinico, rappresentata in figura 28, rivela che:

1) I livelli di espressione del transgene risultano aumentati di 2,3 volte quando questo è fiancheggiato dall'isolatore (30% vs 13%). Questi valori riproducono il risultato dello studio di espressione dei vettori TNS9.3 e TNS9.3+sns5 precedentemente osservato in vivo nel topo (comunicazioni personali dott.ssa Leda Ferro).

2) L'abolizione del legame con il fattore GATA-1 della Box A aumenta la deviazione standard tra i punti, e quindi la variegazione dell'espressione del gene, mentre non diminuisce il valore medio di espressione (media del 34% rispetto al gene α -globinico). Questo risultato suggerisce ancora che il legame di GATA-1 è coinvolto nell'azione di confine di *sns5* piuttosto che in un potenziamento del livello di espressione del gene. Le due mutazioni GATA-1 determinano, come osservato prima, un maggior numero di transgeni β -globinici silenziati e un certo numero di geni espressi a valori medi (20%) di poco inferiori alla media del vettore isolato.

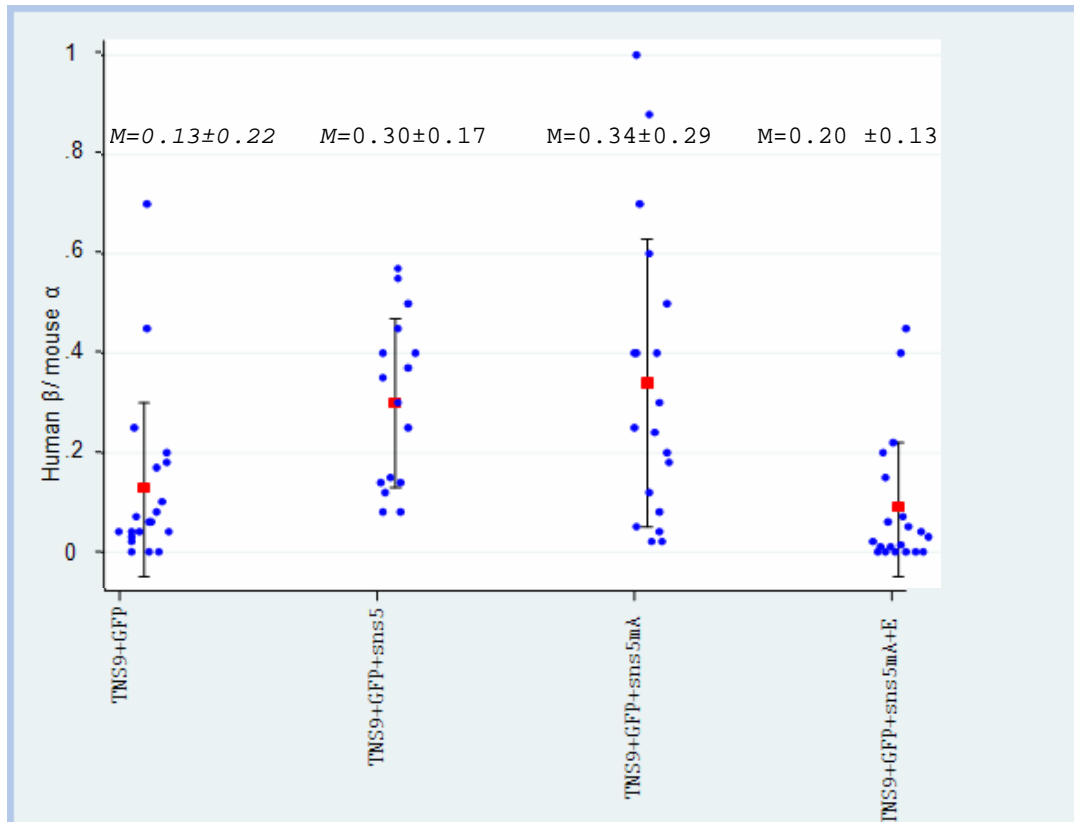


Figura 28: rappresentazione grafica dei livelli di espressione del gene beta globinico in cloni a singola copia di vettore per cellula. Ogni punto rappresenta il valore relativo ad un clone. In ordinata sono riportati i livelli dell'mRNA del gene esogeno (β -globinico umano) relativamente all'espressione di un gene α -globinico di topo. M=valore medio di espressione \pm il valore di deviazione standard

In conclusione l'elemento *sns5* funziona da elemento di confine isolando entrambi i tipi di vettori (LV-GFP e TNS9.3+GFP) contrastando i fenomeni di PE rispetto ai diversi siti di integrazione ma, mentre nel vettore LV-GFP il ruolo del legame di GATA-1 con l'isolatore non sembra cruciale per questa funzione, quando l'isolatore fiancheggia il vettore contenente sequenze eritroidi (gene β -globinico e sequenze della LCR β -globinica) esso sembra coinvolto nel migliorare la performance (PE e PEV) in particolare del transgene β -globinico. L'isolatore cromatinico potrebbe interagire con altri elementi eritroide-specifici presenti nel vettore e cooperare alla migliore espressione del gene β -globinico in particolare. Questa considerazione è stata avvalorata dall'analisi del livello di espressione delle due unità trascrizionali (il gene GFP ed il gene β -globinico) all'interno dello stesso vettore.

Da questa analisi è evidente una correlazione inversamente proporzionale tra i livelli di espressione dei due geni; infatti, nei vettori in cui si hanno livelli di mRNA β -globinico elevati (in presenza dell'isolatore) corrispondono bassi valori di espressione del gene GFP adiacente; viceversa nei vettori non isolati o isolati con le varianti contenenti le mutazioni, il gene GFP è espresso a livelli più alti nei cloni dove il gene β -globinico è espresso in misura minore (dati non rappresentati graficamente). E' come se in presenza di *sns5* l'azione potenziatrice dell'enhancer LCR fosse concentrata sul transgene eritroide (β -globinico) a discapito dell'altro (GFP).

Questo potrebbe essere determinato da strutture secondarie che si creerebbero nel provirus isolato in cui i siti di interazione con il fattore GATA-1 (presenti nel promotore β -globinico, nell'enhancer 3' del gene β , nella LCR e nell'isolatore) potrebbero giocare un ruolo determinante.

Materiali e metodi

LINEA CELLULARE MEL: cellule eritroleucemiche di topo allo stadio adulto. Le cellule sono state fatte crescere a 37°C in presenza di 5% CO₂ in terreno RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Euroclone) addizionato di: 10% FBS (siero fetale bovino, Hyclone) inattivato al calore, 2mM L-glutammina (Seromed, Biochrom), 1% sodio piruvato, 10% Antibiotici/Antimicotici.

LINEA CELLULARE 293T e HeLa: linea cellulare derivante da tessuto embrionale umano. Le cellule sono state fatte crescere a 37°C in presenza di 5% CO₂ in terreno DMEM (Dulbecco's modified eagles medium, Euroclone), addizionato di: 10% FBS (siero fetale bovino, Hyclone) inattivato al calore, 2mM L-glutammina (Seromed, Biochrom), 1% sodio piruvato, 10% Antibiotici/Antimicotici.

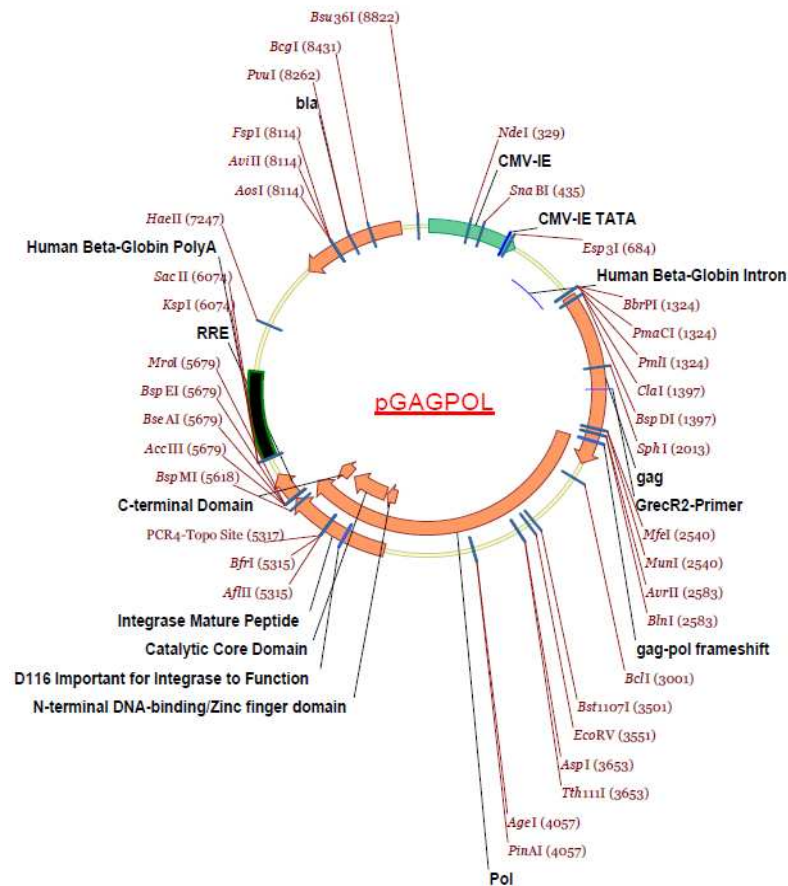
MAXIPREP E PURIFICAZIONE PLASMIDICA: I batteri competenti sono stati trasformati con 10 ng di plasmide, incubandoli per 10 minuti in ghiaccio e poi per due minuti a 42°C. Dopo aggiunta di 1ml di brodo LB sono stati incubati per un'ora a 37°C con agitazione. 10-100 microlitri sono piastrati su agar più ampicillina (30 µg/ml c.f.) ed incubati a 37°C per 12 ore. Infine, dopo aver digerito con l'enzima di restrizione SAC II per verificare eventuali riarrangiamenti, 1ml di batteri ricombinanti viene fatto crescere 12 ore in 250ml di brodo con ampicillina.

Per la purificazione plasmidica è stato utilizzato il kit Invitrogen Purelink™ seguendo le istruzioni fornite dal produttore stesso. Il kit è composto da colonnine con una resina a scambio anionico ed una serie di soluzioni per lisi, risospensione, lavaggio ed eluzione. Il DNA plasmidico isolato ha un'elevata purezza, privo di endotossine che sarebbero dannose per la crescita delle cellule da transfettare. Il DNA plasmidico viene valutato quantitativamente mediante analisi spettrofotometrica effettuando una lettura a U.V. a 260nm e a 280nm, e qualitativamente per elettroforesi su gel d'agarosio. Viene valutato infine il DNA plasmidico estratto mediante analisi di restrizione.

PREPARAZIONE DEI VETTORI TNS9.3+GFP E LV-GFP

Lo stock virale viene ottenuto mediante co-trasfezione della linea cellulare 293T con tre plasmidi ricombinanti di cui uno contiene il vettore lentivirale TNS9.3+GFP o GFP, gli altri forniscono in trans le proteine necessarie alla produzione delle particelle virali (Dull et al.,1998).

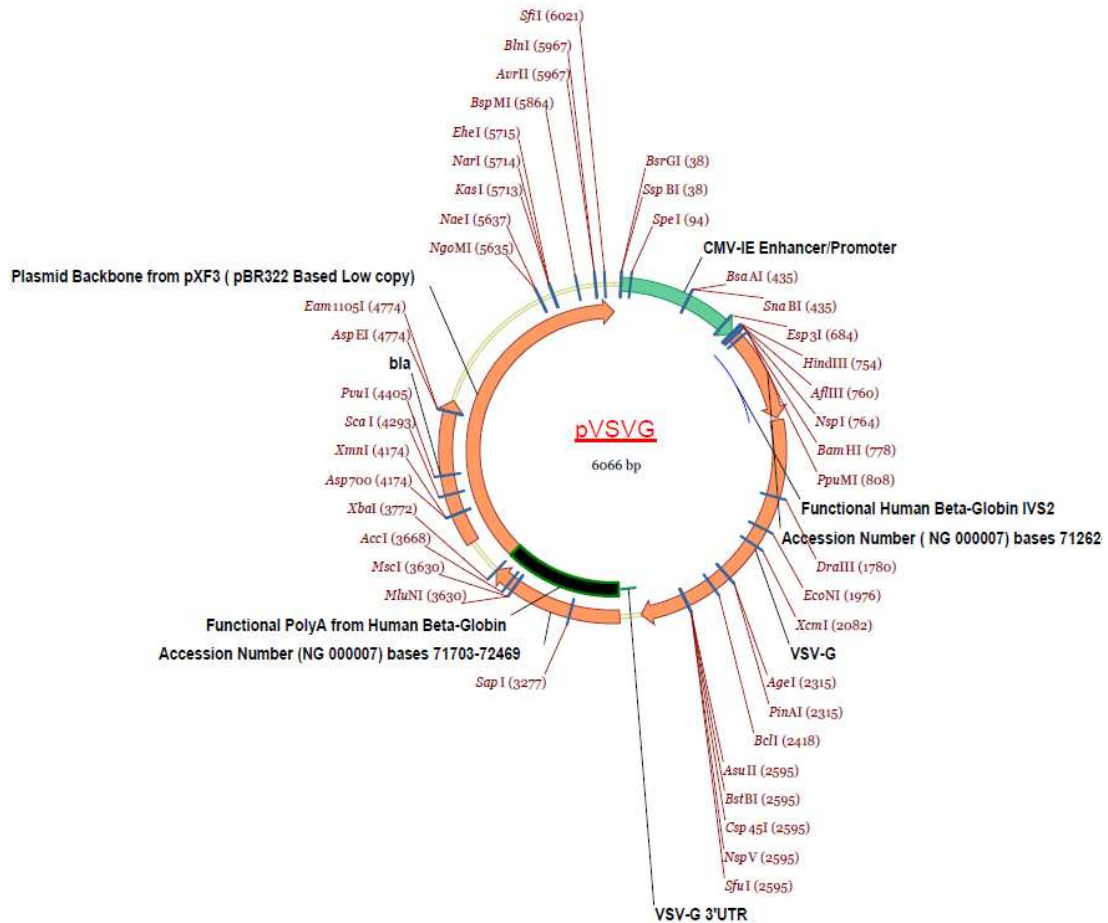
Plasmide pGAGPOL



Il plasmide pGAGPOL è uno dei plasmidi utilizzati per la produzione (impacchettamento) dei vettori ricombinanti nella linea cellulare 293T. Esso contiene:

- Un'origine di replicazione per *E. coli*.
- Il gene lentivirale *gag*, che codifica per le proteine del core e della matrice.
- Il gene virale *pol*, che codifica per la trascrittasi inversa, la proteasi e l'integrasi

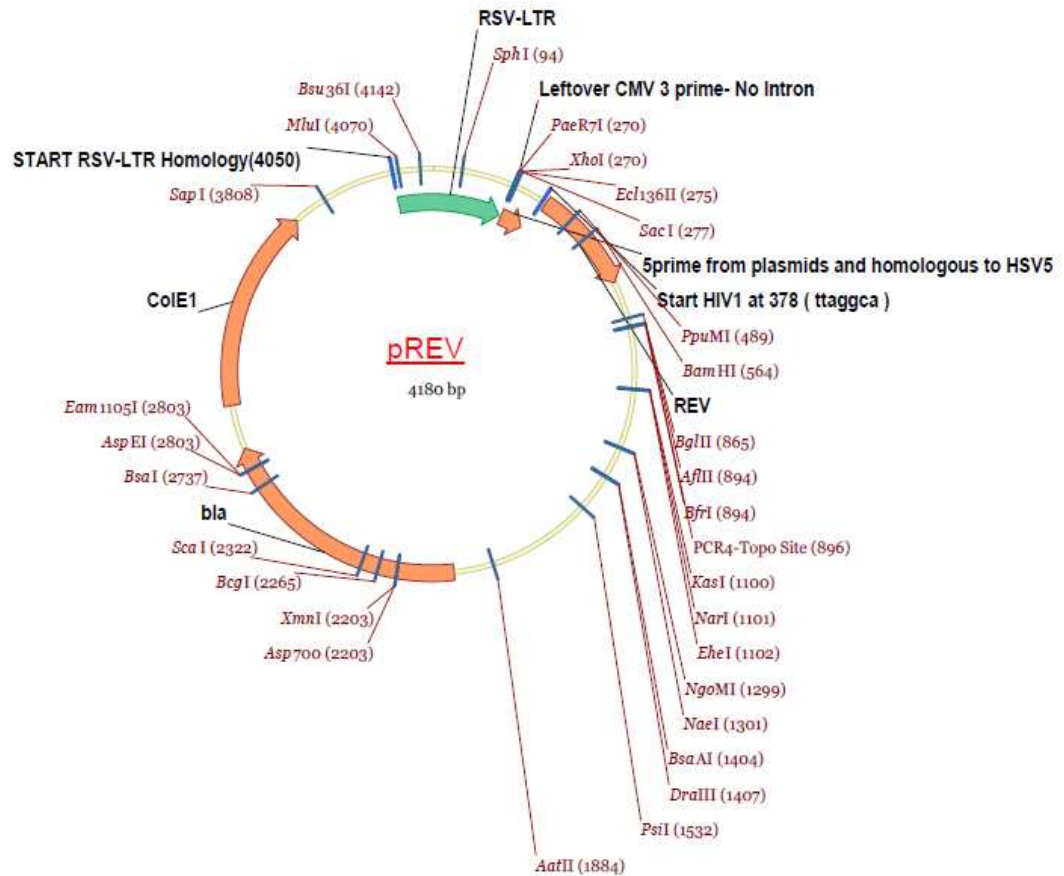
Plasmide pVSVG



Il plasmide pVSVG codifica per la glicoproteina di membrana VSVG. I virioni così pseudotipizzati acquistano caratteristiche (vd dettagli in sessione introduzione cap. dal virus al vettore) utili per la terapia genica. Esso contiene:

- Origine di replicazione per E. coli
- Il gene virale vsv-g, gene del virus della stomatite vescicolare)

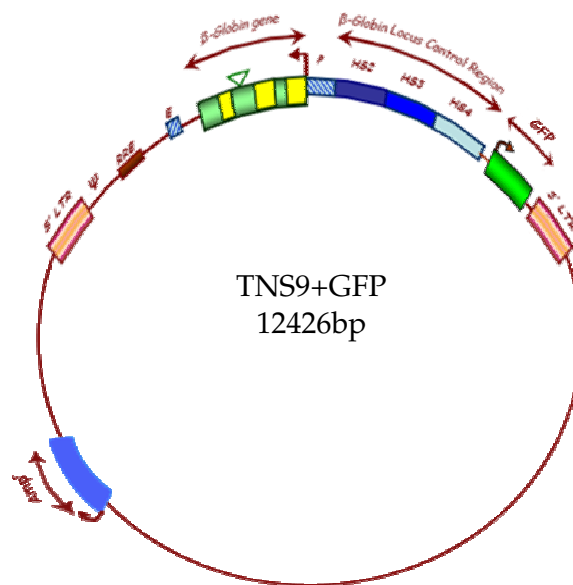
pREV



Il plasmide pREV è un altro plasmide necessario per l'impacchettamento dei vettori. La proteina *rev* è necessaria per la stabilizzazione degli mRNA virali e quindi per il conseguimento di una produzione virale con un alto titolo. Esso contiene:

- Origine di replicazione per *E. coli*
- Gene virale *rev*, che permette l'export dei trascritti non maturi e parzialmente maturi dal nucleo al citoplasma.

Vettore plasmidico TNS9+GFP



TNS9.3+GFP è il plasmide che contiene il vettore lentivirale. Esso contiene per la parte plasmidica di origine batterica:

- Origine di replicazione per E. coli
- Gene di resistenza all'ampicillina

Per le sequenze del transgene:

- Promotore del gene β - globinico umano, 660bp dal 5' del gene globinico umano.
- bp contenente il corpo (esoni ed introni) del gene b globinico, con una delezione di 375 bp (RSAI) di parte dell'introne II e la regione 3' UTR.
- la regione di 250bp localizzata al 3' del il sito di poliadenilazione e contenente un enhancer eritroide specifico(Kollias et al, 1987).
- Gli elementi core HS2(872bp), HS3(1300bp), HS4 (1061bp) della LCR del locus globinico umano

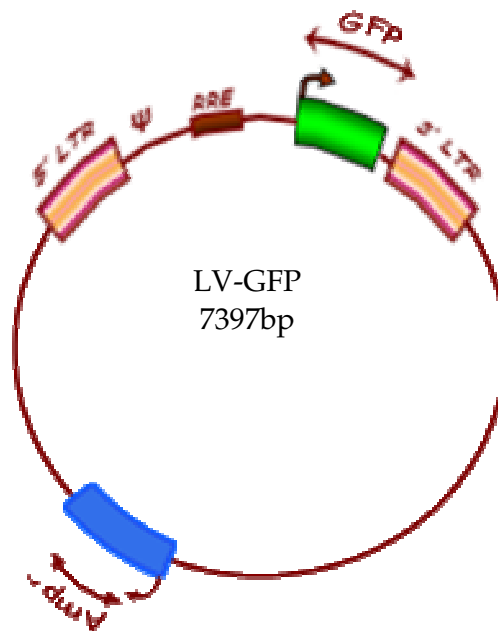
Per le sequenze virali:

- La sequenza RRE(857bp)per aumentare il titolo virale della produzione, in quanto è il sito di legame per la proteina Rev che facilita il trasporto degli mRNA, non andati incontro a splicing o parzialmente processati verso il citoplasma rendendo i trascritti più stabili.

- Le LTR(Long Terminal Repeat) del virus HIV1 con la 3' LTR mutata al fine di renderlo un vettore "self inactivated" (SIN vector) per delezione dell'enhancer virale della regione U3.

Il vettore plasmidico TNS9+GFP è stato costruito tramite l'inserzione della cassetta pgf-GFP(1200bp) all'interno del vettore TNS9 per poter condurre l'analisi clonale mediante citofluorimetria. Nella cassetta inserita il gene eGFP è sotto il controllo del promotore del gene che codifica la fosfoglicerato chinasi umana(hPGK).

Vettore plasmidico LV-GFP



Il vettore LV-GFP (denominazione completa del plasmide: **pRRL SIN CPPT PGK GFP WPRE LTR**), è stato utilizzato nel corso dell'analisi clonale delle cellule trasdotte per testare gli effetti della mancanza della LCR globinica umana sull'espressione del transgene eGFP. Esso contiene le stesse sequenze del vettore TNS9+GFP tranne la cassetta gene β globinico-LCR: è presente il gene reporter (GFP) sotto il controllo del promotore della PGK umana, le sequenze 3' e 5' Long Terminal Repeat (LTR) e alcune sequenze virali come pRRL (Rev responding element), CPPT (polypurine tract) e WPRE (Woodchuck Hepatitis post-transcriptional regulatory element).

Le cellule 293T. Vengono trans-infettate quando raggiungono una confluenza del 90%, in presenza di CaCl₂, HBS, e di 10ug/piastra di plasmide TNS9.3 o GFP; 7,5ug/piastra di vettore 8.91; 2,5 ug/piastra di vettore VSVG.

Dopo 16 ore si blocca la reazione effettuando il cambio terreno. 24 e 48 ore dopo il cambio terreno il supernatante contenente i virioni prodotti viene prelevato, filtrato (filtri millipore, diametro 0,45um) e concentrato per ultracentrifugazione a 20.000rpm per 90 min a 4° C. Infine il pellet virale ottenuto viene risospeso in 400 ul di x-vivo 15, aliquotato e criopreservato a -80° C.

Viene successivamente valutato il titolo virale in cellule HeLa mediante analisi citofluorimetrica e/o mediante Q-PCR.

MUTAZIONE DELL'ELEMENTO SNS5

L'elemento *sns5* e le sue varianti state clonate nel sito NheI della 3'LTR dei vettori descritti.

Le mutazioni consistono in:

- *sns5* mutato nel sito di legame di GATA-1 della box A (*sns5* mA);
- *sns5* mutato nel sito di legame di GATA-1 della box A e della box E. (*sns5* mA+E);

Di seguito è riportata la sequenza di *sns5* con le box indicate e le mutazioni introdotte per creare le due versioni dell'elemento.

```
5'GCTTCTTGGAGGTGTGACCATCGCTCAAGGTGGTGTACTGCCCAACATC
CAGGCTGTGCTGCTTCCCAAGAAGACCGGCAAATCAAGCTAAAGGTTTTGC
ACTCGCAAACCTCAACACCTCAACGGCCCTTATC(→TTGT)AGGGCCACCAA
ATATACAAGAAAGAATAAAGTCTCTGTAATTCATAATAGTCTCTGTAATTCAT
AATAAACTCCTACTGCAACTACAACCTCAGACGCAACCCCTCTCCTCCTCCT
CCTCCTCCTCCTCCTCCCCCCCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
GTCTTCCCATTCCAGTTTTGTATGTTGTTGTGCGATCATCCGATCTAATATGC
CTATGCGAATACAATCACAAATGTTATTATTATAAACATTCTGTTCTGTTCTGT
TATTGCTTATTGCTTACACGGGTGAATAAAAGATA(→GTGA)CTCTGTGTGCGC
ACAGT 3'
```

Box D
Box E
Box C+T
Box B

VALUTAZIONE DEL TITOLO VIRALE SU LINEE CELLULARI HeLa o MeI

Le cellule vengono contate e piastrate ad una concentrazione di 80.000 cellule per pozzetto (6 well) il giorno prima dell'infezione.

L'indomani si contano le cellule, si effettua il cambio terreno e 1-2 ore dopo si effettua la reazione di infezione usando 10 ul di preparato virale e 10ul di polibrene (c.f. 80 ug/ml). Si fanno delle diluizioni seriali 1:10 in 6 pozzetti e si incuba a 37°C al 5% di CO₂.

Dopo 12 ore si effettua il cambio terreno e dopo 5 giorni le cellule vengono lavate in PBS e lette al citofluorimetro per valutare la percentuale di cellule GFP+.

Il calcolo del titolo virale viene effettuato nel seguente modo:

$\text{ip/ml} = \text{numero di cellule al momento della trasfezione} \times \text{fattore di diluizione del virus} \times \% \text{ cellule fluorescenti}$

IMMUNOSELEZIONE DI CELLULE STAMINALI EMATOPOIETICHE CD34+

Le sacche di midollo osseo vengono rapidamente scongelate in bagnetto a 37° C, diluite 1:4 con 0,6 % ACD in PBS e stratificati su un gradiente di Ficoll-Hypaque (densità 1077g/ml). A seguito di centrifugazione a 1800 rpm per 15' si raccoglie l'interfase delle cellule mononucleate. Vengono effettuati due lavaggi con PBS-ACD. Il pellet cellulare viene risospeso in 10 ml di tampone di lisi 1X (NH₄Cl 0,155 M; KHCO₃ 10mM) e incubato per 5' a temperatura ambiente al fine di lisare gli eventuali eritrociti contaminanti. Dopo centrifugazione a 1500 rpm per 10' il pellet viene risospeso in 10 ml di tampone di selezione (PBS -ACD 0,6% -BSA 0,5%) e fatto passare attraverso un filtro di preselezione di poliammide al fine di eliminare eventuali agglomerati cellulari che potrebbero interferire con la selezione. Si centrifuga a 1500 rpm per 10'. A questo punto viene effettuata l'immunoselezione secondo il kit di separazione MACS® (Miltenyi). Le cellule eluite vengono valutate mediante analisi citofluorimetrica per determinarne il recupero e la purezza e criopreservate in terreno di congelamento (α -medium, FBS (20%), L-glutammina (0,293 mg/ml), penicillina (100U/ml), streptomina (100 μ gr/ml), DMSO (10%)).

PROTOCOLLO DI TRANS-INFEZIONE DELLE HSC

Le cellule immuno-selezionate vengono contate alla camera di Burker e risospese in terreno di prestimolazione (ex vivo media, L-glutammina (0,293 mg/ml), penicillina (100U/ml), SCF (0.1ug/ul); Flt3 (0.1ug/ul); TPO (0.1ug/ul); IL-3 (20ng/ul) ad una concentrazione di 2×10^5 /ml e incubate a 37°C al 5% di CO₂.

Dopo 24 ore viene effettuata la prima trasduzione in piastre ricoperte di retronectina: le cellule vengono nuovamente contate, e risospese in 100 ul di terreno di prestimolazione fresco. Le piastre a 24 pozzetti (non trattate per tessuti cellulari) sono state precedentemente trattate con 15ug/cm² di retronectina (Takara). Dopo 2 ore di incubazione a temperatura ambiente si aspira la soluzione a base di retronectina e si lava con una soluzione di PBS-BSA (0,5%), incubando per 30'. Infine la soluzione viene aspirata, e le piastre vengono lavate 3 volte in PBS. Una volta contate le cellule si rimuove il PBS dalle piastre e si aggiunge nell'ordine: terreno, sospensione cellulare, preparato virale (la quantità varia a seconda dell'MOI che si applica). Il volume finale della reazione di trasfezione è di 450 ul. Si incuba per 8 ore, e si ripete il procedimento usando una dose di preparato virale fresco. Dopo 8 ore si interrompe la reazione di trasfezione effettuando il cambio terreno. Le cellule vengono contate e risospese in terreno eritroide o in metilcellulosa.

TRANS-INFEZIONE DELLE CELLULE MEL ED ANALISI CLONALE

1×10^5 cellule sono state trasdotte in 400 µl di terreno RPMI completo con addizionato il vettore in un rapporto di 1cellula: 2-4virioni (MOI 1:2 o 1:4). Alle cellule Mel è stato aggiunto polibrene (4µgr/ml) per facilitare l'adesione virus-cellula. Dopo 12 ore le cellule sono state passate in terreno fresco e piastrate in condizioni di diluizioni tali da avere una cellula per pozzetto. I cloni, visibili ad occhio nudo a 9-10 giorni sono stati espansi per le analisi successive.

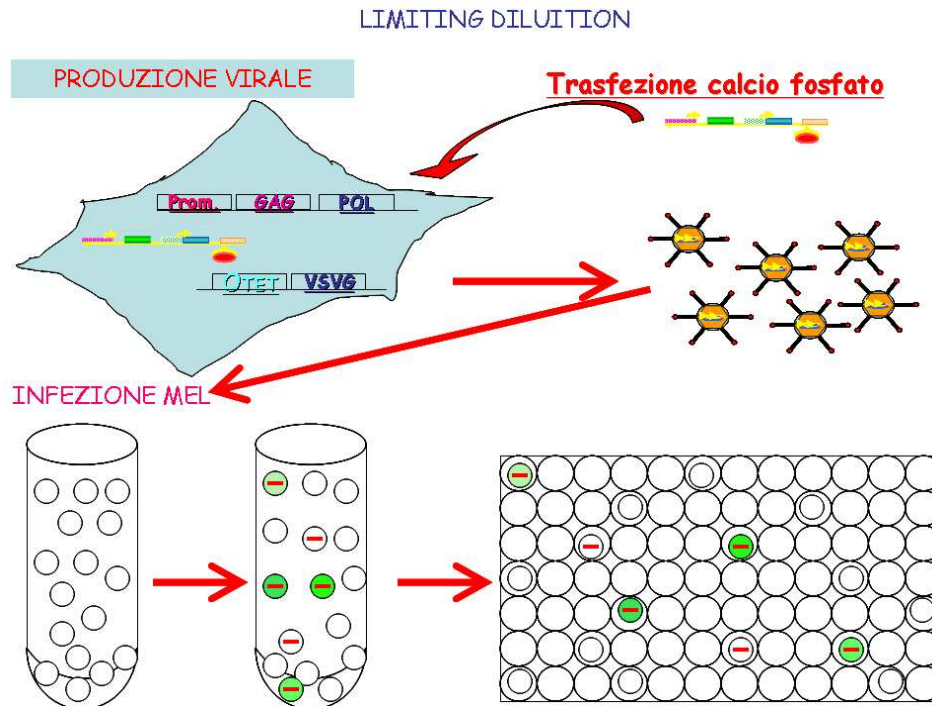


Fig. 29 Rappresentazione schematica dell'esperimento per la generazione di cloni cellulari contenenti il vettore integrato.

COLTURE PRIMARIE ERITROIDI IN FASE LIQUIDA

Le cellule CD34⁺ vengono risospese, ad una concentrazione di 1×10^6 /ml, in un terreno di coltura contenente: α -medium; 1% di BSA deionizzata; 1U/ml di eritropoietina ricombinante umana; 10^{-5} M di 2-mercaptoetanololo; 10^{-6} M di dexametasone; 0.3 mg/ml di holo-transferrina umana; 10 ng/ml di stem cell factor. Viene effettuato il cambio terreno ogni 5 giorni. Nell'arco di 14 giorni si possono seguire *in vitro* le varie fasi del differenziamento eritroide che avvengono normalmente *in vivo*.

PRIMER EXTENSION

Al giorno 8, 12 e 15 di coltura eritroide sono state prelevate 500.000 per l'estrazione dell' RNA. Il pellet cellulare è stato lisato in 1 ml di trizol, l'RNA è stato purificato con cloroformio e precipitato con alcol isopropilico. Per la reazione di primer extension sono stati usati 20pmol di probe (marcato con

gamma P32 ATP) specifici per la beta o alfa globina umana, la reazione di annealing prevede un'incubazione a 58 C per 20 min e a 25 C per 10 min.

La reazione di estensione, in presenza di trascrittasi inversa avviene a 42 C per 30' seguita da denaturazione (90 C per 10 min).

I campioni ottenuti vengono fatti correre in un gel denaturante di acrilamide al 6%, a 1200volt per 90 min circa

COLTURE ERITROIDI IN METILCELLULOSA DI CELLULE CD34+

Al fine di valutare l'espressione a livello clonale in cellule eritroidi umane e per rilevare se le cellule staminali CD34⁺ trattate con il vettore sono in grado di generare cellule sia della linea eritroide che mieloide (mantenimento della staminalità) è stato utilizzato un sistema di coltura su un supporto semisolido (metilcellulosa) contenente citochine ricombinanti necessarie sia per il differenziamento eritroide che mieloide.

Le cellule CD34+ estratte da campioni di aferesi di soggetti sani sono state risospese ad una concentrazione di 8x10³ cell/mL in terreno IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) addizionato con 2% FCS. La miscela contenente le cellule è poi stata aggiunta ad un terreno completo composto da metilcellulosa (MethoCult GF+ H4535, Stem Cell technologies), contenente diversi fattori di crescita emopoietici (circa 2000 cellule/ml). Le cellule sono state piastrate in piastre da 35mm; successivamente le piastre sono state messe all'interno di un incubatore in atmosfera umidificata (5% CO₂, 37°C). Dopo 14 giorni circa, le colonie (>50 cellule) e i cluster (<50 cellule) cresciuti, sono stati osservati al microscopio ottico invertito e valutati morfologicamente secondo il metodo descritto da Nissen-Druey (Nissen-Druey et al., 2005), per distinguere tra colonie eritroidi mieloidi o per procedere con l'analisi di espressione a livello clonale.

ANALISI D'ESPRESSIONE SU COLONIE ERITROIDI DA METILCELLULOSA:

Al 15° giorno di coltura venivano prelevate, in modo casuale, circa 200 colonie eritroidi, venivano risospese in 1ml e suddivise in modo che 2/3 della colonia veniva usata per l'estrazione del DNA e successiva reazione di PCR per determinare la presenza del vettore e il restante 1/3 di colonia veniva letto mediante analisi citofluorimetrica (vedasi tecniche descritte successivamente).

PREPARAZIONE DI VETRINI E COLORAZIONE MAY-GRUNWALD GIEMSA

Le cellule in coltura vengono concentrate ad 1 milione/ml. Circa 15µl di sospensione cellulare vengono piastrati su un vetrino, distribuendo la goccia in maniera uniforme in 1 cm circa di diametro e si lascia essiccare. Il vetrino viene immerso in una vaschetta contenente una soluzione di May-Grunwald che permette la fissazione delle cellule grazie all'alcool metilico associato al colorante. Successivamente il vetrino viene immerso in acqua distillata e dopo in soluzione Giemsa. Infine si lava con acqua abbondante e si lascia asciugare a temperatura ambiente. A questo punto le cellule così colorate possono essere visualizzate al microscopio ottico. Mediante questa colorazione, che discrimina i nuclei (rosso-violaceo) e i citoplasmi basofili (azzurro) da quelli contenenti emoglobina (rosa chiaro), è possibile riconoscere le cellule ai vari stadi del differenziamento eritroide.

CONTA CELLULARE E VALUTAZIONE DELLA VITALITÀ' CELLULARE

10 µl di sospensione cellulare omogenea vengono diluiti in 10 µl di colorante Trypan Blue e 30µl di soluzione fisiologica o PBS (fattore di diluizione = 5). Una goccia di tale preparato viene posta nella camera di Burkner e si procede con la conta al microscopio: vengono letti almeno quattro diversi riquadri, si calcola la media delle cellule in ogni riquadro e tale valore, moltiplicato per il fattore di diluizione e per 10.000 dà il numero di cellule per ml di terreno.

La percentuale di cellule vitali veniva così calcolata: n° di cellule vive x 100 / n° di cellule totali (vive + morte)

ANALISI CITOMETRICA

Per valutare la presenza di cellule CD34⁺ è stato utilizzato lo Stem-Kit™ (Beckman-Coulter). Vengono prelevati 50 µl del campione da analizzare e vengono aggiunti 10 µl di anticorpi anti CD34/45. Si miscela il campione e si incuba la reazione per 15' al buio. Vengono successivamente aggiunti 2 ml di soluzione di lisi 1x per eliminare gli eritrociti presenti, si miscela la reazione e si lascia procedere la reazione per 10' al buio. Infine si aggiungono 50 µl di fluorosfere "Stem Count" che permettono la conta assoluta delle cellule CD34⁺. La marcatura con tali anticorpi va accoppiata alla marcatura con 7AAD per distinguere le cellule già morte.

La valutazione del differenziamento eritroide viene effettuata mediante marcatura con anticorpi anti-glicoforina A. Tale marcatore di superficie e' infatti eritroide-specifico e inizia ad essere espresso sulla superficie cellulare in concomitanza con la produzione di emoglobina A.

Per effettuare la marcatura vengono prelevate 70-100.000 cellule, che vengono lavate e risospese in PBS-FBS 5%. La marcatura avviene con 4ul di anticorpo anti-GPA o di controllo isotipico (controllo negativo), per 15' al buio.

Viene effettuato un lavaggio e le cellule vengono risospese in 400ul di PBS-FBS e analizzate al citofluorimetro.

Per determinazione la percentuale delle cellule fluorescenti per la GFP, le cellule sono state lavate in soluzione fisiologica, risospese in PBS e lette al citofluorimetro (canale FITC), (Citomics FC 500, Beckman&Coulter).

ESTRAZIONE DI DNA

Un'aliquota di cellule (minimo 2-300,000 cellule) viene prelevata per estrarne il DNA. Per ogni esperimento le cellule vengono di volta in volta pellettate e congelate a -20°C. L'estrazione di DNA viene poi effettuata contemporaneamente per tutti i campioni di un esperimento. Il pellet cellulare viene risospeso in 400ul di soluzione A (10mM tris-HCl pH8, 400mM NaCl, 2mM EDTA) e incubato o.n. in una PK solution (30ul SDS10%, 30 ul proteinasi K 10 mg/ml). Vengono aggiunti 400ul di soluzione di estrazione (fenolo-cloroformio-alcol isoamilico) e i campioni, vortexati, vengono centrifugati a 14.000rpm per 5'. Il DNA presente nella fase superiore viene fatto precipitare con l'aggiunta di 1ml di etanolo 100%. Si effettua poi un lavaggio con etanolo al 75% e, dopo aver fatto ben asciugare il pellet di DNA questo viene risospeso in un volume di circa 50ul, quantizzato allo spettrofotometro (A_{260}) e analizzato su gel di agarosio all'1%.

REAL TIME qPCR

Questa tecnica è stata utilizzata sia per poter determinare il VCN dei cloni e dei pool analizzati, che per valutare l'arricchimento della cromatina

immunoprecipitata con anticorpo anti-GATA-1. Per la Real time PCR vengono usati dei primer specifici per il gene GAG, in modo da amplificare solo il genoma provirale, e dei primer specifici per l'albumina umana che permettono di normalizzare i valori ottenuti e di quantizzare quindi il DNA virale:

Per risalire al VCN delle cellule trans-infettate si sono usati i seguenti primer e probe:

mALB fw: 5'-GGAAAAGTGCTGCGCTGAAG-3'	}	Specifici per mALB (gene endogeno di topo)
mALB prb: 5'-AATCCTCCCGCATGCTACGGCA-3'		
mALB rev: 5'-TTGGCTCATGGAAACCTACCA-3'		
GAG fw: 5'-GGAGCTAGAACGATTCGCAGTTA-3'	}	Specifici per GAG (transgene)
GAG prb: 5'-ACAGCCTTCTGATGTTTCTAACAGGCCAGG-3'		
GAG rev: 5'-GGTTGTAGCTGTCCCAGTATTTGTC-3'		
Halb F TGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTT	}	Specifici per hALB (gene endogeno umano)
hALB R CTCTCCTTCTCAGAAAGTGTGCATAT		
Halb prb FAM TGCTAAACATTACCTTCCATGCAGA TAMRA		

Per la reazione di amplificazione vengono usate le seguenti condizioni:

2x Master Mix (taqman) 12,5ul

25uM primer 0,8 ul

2,5 uM probe 2,5ul

Dna 100ng (1-2ul)

H2O a 25ul

Per effettuare una quantizzazione assoluta e' stato necessario mettere a punto una curva standard.

Per ottimizzare la tecnica, riducendo al minimo alterazioni dei risultati dovute ad errori di pipettata e di quantizzazione ho creato dei plasmidi bi-valenti contenenti sia il gene gag che il gene dell'albumina umana o il gene dell'albumina murina per analisi quantitative assolute del VCN su cellule Mel. Tali plasmidi sono stati

quantizzati su tre spettrofotometri diversi e su un fluorimetro ad alta sensibilità (Qbit, invitrogen). Sulla quantizzazione determinata sono state costruite curve standard di plasmidi ad una concentrazione di 10^7 copie di plasmidi/ul e diluizioni successive di un fattore 10 ($10^7, 10^6, 10^5, 10^4, 10^3, 10^2$ copie di plasmidi/ul). Sono stati effettuati esperimenti per la validità della curva e del sistema di amplificazione, testati confrontando i risultati ottenuti dall'amplificazione della curva standard e dall'amplificazione di DNA proveniente da cloni HeLa (umane) e Mel (murine) a numero conosciuto di vettori per cellula, precedentemente calcolati per Southern Blot.

Tale sistema é stato quindi utilizzato per calcolare il VCN dei campioni di DNA di cellule trasdotte.

Il VCN viene calcolato nel seguente modo:

$$\text{VCN} = \frac{\text{(GAG mean quantity)}}{\text{(Alb mean quantity)} \cdot \text{(valore di ploidia delle cellule)}}$$

Il valore di ploidia delle cellule equivale a 2 per cellule CD34+, 3.9 per Hela.

PCR

Per rilevare la presenza di DNA provirale sono state effettuate analisi di PCR usando oligonucleotidi specificamente in grado di rilevare il genoma virale retrocopiato (la 3'LTR viene copiata al posto della 5'LTR): nello specifico il primer forward (3'LTRfc fw) cade all'interno della 3' LTR e il primer reverse (G2rev) a valle della 5'LTR. Gli ampliconi si ottengono solo su DNA retrocopiato. Come controllo, in contemporanea lo stesso campione è stato amplificato con una coppia di primer complementare ad una sequenza relativa ad un gene endogeno scelto come controllo. Per le cellule Mel è stata scelta una regione di 200bp della sequenza HS2 della LCR globinica murina, usando i primer UP4 fw e D3 rev, nel caso di cellule umane é stata scelta una porzione dell'esone 2 del gene del recettore della transferrina (primer TFR4E2fw e rev).

Sequenze degli ologonucleotidi usati:

5'LTR fw 5'-GGGCTAATTCCTCCCAACG-3'

GAG rev 5'-ATACTGACGCTCTCGCACC-3'

UP4 fw 5'-TGACTCAGCAAACCCTAGGC-3'

D3 rev 5'-CTTTGTCCTACTGCTCTCATG-3'

Condizioni:

DNA 100ngr o ½ colonia di metilcellulosa

Bf10x 2,5ul

MgCl₂ 50Mm 2ul

Nt 40Mm 1ul

5'LTRfcw 10uM 1,25ul

G2Rev 10uM 1,25ul

TFR2E4fw 10uM 1,5ul

TFR2E4rev 10uM 0,7ul

H₂O a 25ul

Programma di amplificazione:

96°C 5'

96°C 30''

62°C 30''

72°C 45''

72°C 5'

X 35 Cicli

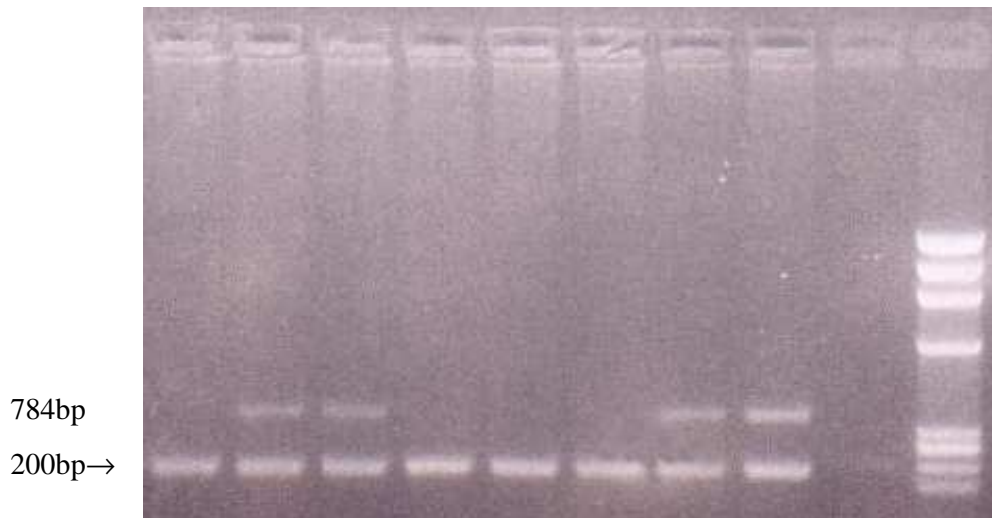


Fig.30 Analisi elettroforetica dei prodotti dell'analisi PCR multiplex dei cloni delle cellule trasdotte. Sono mostrate le bande relative agli ampliconi ottenuti dalla PCR multiplex. La banda di 200bp è relativa all'amplificazione di una regione interna alla sequenza HS2 mentre la banda 784bp deriva dall'amplificazione di una regione a valle della 5'LTR virale. "M" indica il marcatore di peso molecolare fi-X

Chromatin Immuno-Precipitation (ChIP)

Il protocollo usato in questi esperimenti deriva da materiale bibliografico (Orlando V. et al 1997, Orlando V. 2000), a cui si sono state apportate modifiche.

Preparazione della cromatina:

$3 \cdot 10^7$ cellule eritroleucemiche di topo (MEL) sono state incubate per 10 minuti con formaldeide 0,75 % (crosslinking). La reazione è stata bloccata aggiungendo glicina 125mM per 5 minuti a T.A. Le cellule, centrifugate a 2000 rpm per 5 minuti, sono state risospese in una soluzione di PBS 1X freddo, a cui sono stati precedentemente aggiunti gli inibitori delle proteasi: Leupeptina 1 γ /ml, pepstatina 1 γ /ml, PMSF 100mM e ricentrifugate.

Il pellet cellulare è stato risospeso in 10ml di Ni(MgCl₂) freddo e 10ml di NiP40(MgCl₂), ed incubato in ghiaccio per 10 minuti. I nuclei ottenuti sono stati centrifugati a 3000 rpm per 5 minuti a 4°C e risospesi in 1ml di Ni(CaCl₂).

Un aliquota (50 μ l), che rappresenta il controllo di cromatina non digerita, è stata rimossa ed aggiunta a 400 μ l di lysis solution, mentre i 950 μ l rimasti sono stati incubati con la nucleasi micrococcale (1,5u/ml) per 7 minuti a 37°C. Trascorso il tempo di incubazione, è stato aggiunto EDTA 0,5M per fermare la digestione. Le condizioni di digestione (unita' di enzima e tempo di incubazione), sono state determinate sperimentalmente al fine di ottenere frammenti di cromatina di

grandezza compresa tra 200 e 600 bp. 25 μ l della cromatina digerita sono stati aggiunti a 200 μ l di lysis solution per la successiva deproteinizzazione (reverse-crosslink).

La rimanente cromatina frammentata (925 μ l), è stata centrifugata a 13000 rpm per 30 secondi , risospesa in 1ml di PBS 1X freddo, e dopo centrifugazione, risospesa in 600 μ l di Chip Lysis Buffer (con inibitori delle proteasi alle condizioni descritte sopra) e conservata a -80 $^{\circ}$ C.

I campioni di cromatina digerita (225 μ l) e non digerita (450 μ l) sono stati incubati, per la deproteinizzazione (reverse-crosslink), con 5 μ l di proteinasi K per 2 ore a 65 $^{\circ}$ C e successivamente, dopo l'estrazione fenolo/cloroformio, precipitati con due volumi di etanolo assoluto e 1/10 di volume di Sodio Acetato.

I campioni, infine sono stati risospesi in TE 1X, quantizzati mediante lettura spettrofotometrica e sottoposti a corsa elettroforetica in gel d'agarosio al 2% , per valutare la grandezza di frammenti ottenuti.

Preparazione della proteina A(ptA) :

250 mg di biglie di Sephadex ptA, sono state reidratate, ruotando per tre ore a 4 $^{\circ}$ C, in presenza di 10 ml di buffer Fosfato di Sodio 0,1M. Dopo centrifugazione (2000 rpm per 2 minuti), le biglie sono state risospese in TE, ed infine in 1 ml di una soluzione contenente: TE/BSA/Sodio-Azide (BSA 1,25mg, Sodio-Azide 10% 6,25 μ l, TE 1,18ml), e 26 μ l di DNA di sperma di salmone sonicato (10 μ g/ μ l). Le biglie, risospese in tale soluzione, sono state incubate per 45 minuti a 4 $^{\circ}$ C. Infine sono state conservate a 4 $^{\circ}$ C ed utilizzate entro 4-5 giorni dalla preparazione.

Immunoprecipitazione:

A 25 μ g di cromatina digerita, precedentemente diluita (1:5) con Dilution buffer , sono stati aggiunti 100 μ l di biglie (ptA). La cromatina è stata incubata per 2 ore a 4 $^{\circ}$ C e, dopo centrifugazione (2 minuti a 2000 rpm), il 20 % del supernatante è stato conservato come controllo di DNA digerito, non incubato con gli anticorpi (input). La cromatina rimanente è stata incubata con 5 μ g di anticorpo specifico ruotando a 4 $^{\circ}$ C per tutta la notte.

Sono stati aggiunti quindi 60 μ l di biglie (ptA), e la cromatina è stata quindi nuovamente incubata per 2 ore a 4 $^{\circ}$ C. Dopo centrifugazione (2 minuti a 2000 rpm) le biglie, legate alla cromatina, sono state risospese sequenzialmente con 1ml delle seguenti soluzioni: Low salt wash buffer , High salt wash buffer, LiCl wash buffer, TE 1X buffer.

Infine la cromatina è stata eluita risospesando le biglie in 450µl di elution buffer e ruotando per 15 minuti a t.a. I campioni quindi sono stati processati per la deproteinizzazione (reverse-crosslink) come descritto precedentemente, risospesi in 30 µl di TE 1X e conservati a -20°C. Infine sono stati quantizzati con il fluorimetro (QUBIT Invitrogen) ed analizzati mediante RT-PCR.

SOLUZIONI:

NI(MgCl₂): 15mM TRIS-HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂, 15mM NaCl, 60mM KCl, 0,5mM DTT, 300mM Saccarosio

NI-NP-40 (MgCl₂): 15mM TRIS-HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂, 60mM KC 0.5mM DTT, 5mM NaCl, 300mM Saccarosio, 1% NP40

NiCaCl₂: 15mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM CaCl₂, 60mM KCl, 0.5mM DTT, 15mM NaCl, 300mM Saccarosio

Lysis solution: 50mM TRIS-HCl pH8, 20mM EDTA ; 1% SDS

ChIP Lysis: 1% SDS, 10mM EDTA, 50mM TRIS-HCl pH8

Dilution Buffer: 1% Triton X, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH8

Low Salt Buffer: 0.1 % SDS, 1% Triton X, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 20mM Tris-Cl pH8

High salt buffer: 0.1 % SDS, 1% Triton X, 2mM EDTA, 500mM NaCl, 20mM Tris-HCl pH8

LiCl salt buffer: 0.25M LiCl, 1% NP40, 1% Sodio Deossicolato, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH8

Elution buffer: 0.5 % SDS, 0.1M NaHCO₃

Analisi delle emoglobine per mezzo della *High Performance Liquid Chromatography (HPLC)*

L' HPLC è uno strumento analitico che per la sua versatilità e ampia applicabilità è attualmente una delle tecniche di separazione più ampiamente usate a scopi qualitativi e quantitativi.

La percentuale di emoglobina adulta e fetale (rispetto all'emoglobina totale) presente in campioni di sangue o in lisati cellulari è stata determinata attraverso analisi HPLC, utilizzando uno strumento Waters 1525 Binary HPLC pump dotato di un rivelatore UV-Visibile (Photo Diode Array detector) e di fluorimetro (474 scanning fluorescence detector).

Le emoglobine sono state rivelate ad una lunghezza d'onda pari a 415 nm, eluendo i lisati cellulari di progenitori eritroidi, precedentemente preparati, in gradiente con buffers acquosi contenenti BisTris-KCN acetato. La colonna utilizzata per la separazione delle emoglobine è una colonna idrofilica SynChropak CM a scambio cationico (Syn CCM 103/25, EPROGEN) ed il loop per l'iniezione del campione è di 100 µl. L'HPLC consente di identificare contemporaneamente le varianti emoglobiniche presenti nei lisati e di risalire alla quantità presente nel campione. La quantizzazione dell'emoglobina è stata effettuata grazie all'utilizzo di un sofisticato software "empower 2". I vantaggi dell'HPLC sono: la riproducibilità delle condizioni sperimentali, brevi tempi di esecuzione, ed inoltre possono essere evidenziate piccolissime quantità di sostanze grazie all'alta sensibilità dei rivelatori utilizzati.

Bibliografia

- Abe A, Miyanochara A, Friedmann T Enhanced gene transfer with fusogenic liposomes containing vesicular stomatitis virus G glycoprotein.. J Virol. 1998 Jul;72(7):6159-63
- Acuto S, Di Marzo R, Calzolari R, Baiamonte E, Maggio A, Spinelli G. Functional characterization of the sea urchin sns chromatin insulator in erythroid cells. 2005. Blood Cells Mol Dis 35:339–344.
- Arumugam P.I., Scholes J., Perelman N., Xia P., Yee JK., Malik P. Improved human β -globin expression from self-inactivating lentiviral vesctors carrying the chicken Hypersensitive Site-4 (cHS-4) insulator element. Mol Ther. 2007. 15 (10): 1863-1871.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G. 1999. The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. 1999. Cell 98:387–396.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G. Insulators and boundaries: versatile regulatory elements in the eukaryotic. 2001. Science 291:447–450.
- Bender, MA, Miller, AD and Gelinas, RE. Expression of the human γ -globin gene after retroviral transfer into murine erythroleukemia cells and human BFU-E cells. 1988 . Mol Cell Biol 8: 1725–1735.
- Birnstiel M. L., Busslinger M., and Strub K.. Transcription termination and 3' processing: the end in in site . 1985 . Cell 41: 349-59
- Blobel, G.A., Nakajima, T., Eckner, R., Montminy, M., and Orkin, S.H. CREB-binding protein cooperates with transcription factor GATA-1 and is required for erythroid differentiation. 1998. Proc. Natl. Acad. Sci. 3:2061
- Bryan PN, Olah J, Birnstiel ML. Major changes in the 5' and 3' chromatin structure of sea urchin histone genes accompany their activation and inactivation in development. 1983. Cell 33:843–848.
- Burgess–Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas–Targa F, Simpson M, West A, Felsenfeld G. . The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. 2002. Proc Natl Acad Sci U S A 99 Suppl 4:16433–16437.
- Burns JC, Friedmann T, Driever W, Burrascano M, Yee JK. Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993. Sep 1;90(17):8033-7.
- Capelson M, Corces VG. . The ubiquitin ligase dTopors directs the nuclear organization of a chromatin insulator. 2005. Mol. Cell 20:105–16
- Carrol, R., Lin, J.-T., Dacquel, E. J., Mosca, J. D., Burke, D. S. & St. Louis, D. C. (1994) J. Virol. 68, 6047-6051.

Cavalieri V, Melfi R, Spinelli G. *Nucleic Acids Res.* ;37(22):7407-15. Promoter activity of the sea urchin (*Paracentrotus lividus*) nucleosomal H3 and H2A and linker H1 {alpha}-histone genes is modulated by enhancer and chromatin insulator. 2009 Dec.

Cavazzana-Calvo M, Carlier F, Le Deist F, et al. Long-term T-cell reconstitution after hematopoietic stem-cell transplantation in primary T-cell-immunodeficient patients is associated with myeloid chimerism and possibly the primary disease phenotype. 2007. *Blood*;109:4575–81.

Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O, Wang G, Hehir K, Fusil F, Down J, Denaro M, Brady T, Westerman K, Cavallesco R, Gillet-Legrand B, Caccavelli L, Sgarra R, Maouche-Chrétien L, Bernaudin F, Girot R, Dorazio R, Mulder GJ, Polack A, Bank A, Soulier J, Larghero J, Kabbara N, Dalle B, Gourmel B, Socie G, Chrétien S, Cartier N, Aubourg P, Fischer A, Cornetta K, Galacteros F, Beuzard Y, Gluckman E, Bushman F, Hacein-Bey-Abina S, Leboulch P. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β -thalassaemia. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):318-22.

Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. 2000. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. 2000. *Science*. 288:669-672

Chan, D.C. and P.S. Kim.. HIV entry and its inhibition. 1998. *Cell* 93:681-684.

Chen SS, Ferrante AA, Terwilliger EF.Characterization of an envelope mutant of HIV-1 that interferes with viral infectivity. *Virology*. 1996 Dec 15;226(2):260-8

Cho Y , S Song, J Lee, N Choi, C Kim, A Dean and A Kim. The role of transcriptional activator GATA-1 at human β -globin HS2 *Nucleic Acids Research*, 2008, Vol. 36, No. 14 4521-4528

Chung, J. H., Whiteley, M. & Felsenfeld, G. A 5' element of the chicken b-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in *Drosophila*. 1993. *Cell* 74, 505–514.

Chung JH, Bell AC, Felsenfeld G. Characterization of the chicken beta-globin insulator. 1997 . *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:575–580.

Cooley TB., Lee P.A., Series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans Am. Pediatr. Soc.*1925; 37:29

D'Apolito D., E. Baiamonte, M.Bagliesi, R.Di Marzo, R.Calzolari, L.Ferro, V.Franco, G.Spinelli, A.Maggio and S.Acuto. The Sea Urchin *sns5* Insulator Protects Retroviral Vectors From Chromosomal Position Effects by Maintaining Active Chromatin Structure. *Molecular Therapy* (2009) 17 8, 1434–1441

Di Caro V, Cavalieri V, Melfi R, Spinelli G.Constitutive promoter occupancy by the MBF-1 activator and chromatin modification of the developmental regulated sea urchin alpha-H2A histone gene.*J Mol Biol*. 2007 Feb 2;365(5):1285-97. Epub 2006 Nov 3

- Di Caro D., Melfi R, Alessandro C, Serio G, Di Caro V, Cavalieri V, Palla F, Spinelli G. Down-regulation of early sea urchin histone H2A gene relies on cis regulative sequences located in the 5' and 3' regions and including the enhancer blocker *sns*. *J Mol Biol.* 2004 Oct 1;342(5):1367-77.
- Di Simone P., Di Leonardo A, Costanzo G, Melfi R, Spinelli G. The sea urchin *sns* insulator blocks CMV enhancer following integration in human cells. 2001. *Biochem Biophys Res Commun* 284:987–992.
- Donze D., Kamakaka RT. RNA polymerase III and RNA polymerase II promoter complexes are heterochromatin barriers in *Saccharomyces cerevisiae*. 2001 *EMBO J.* 20:520–31
- Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third generation lentivirus vector with a conditional packaging system. 1998. *J Virol*, Vol 72, pp. 8463-8471.
- Dunbar CE. The yin and yang of stem cell gene therapy: insights into hematopoiesis, leukemogenesis, and gene therapy safety. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2007:460-5. Review.
- Dvorin, J. D. et al. Reassessment of the roles of integrase and the central DNA flap in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import. *J. Virol.* 76, 12087–12096 (2002).
- Ellis J, Yao S.. Retrovirus silencing and vector design: relevance to normal and cancer stem cells? 2005 *Curr Gene Ther.* 5(4):367-73
- Emery DW, Yannaky E, Tubb J, and Stamatoyannopoulos G. A chromatin insulator protects retrovirus vectors from position effects. 2000. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:9150–9155
- Emery DW, Stamatoyannopoulos G. Stem cell gene therapy for the beta-chain hemoglobinopathies. Problems and progress. 1999. *Ann N Y Acad Sci.* 30;872:94-107
- Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, de Saint BG, Cavazzana-Calvo M. Gene therapy for human severe combined immunodeficiencies. 2001. *Immunity.* 15:1-4.
- Follenzi A, Naldini L.: Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Meth Enzymol.* 2002. 346: 454-465.
- Follenzi, A., Ailles, L. E., Bakovic, S., Geuna, M. & Naldini, L Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. 2000. *Nature Genet.* 25, 217–222 .
- Freed EO HIV-1 replication.. *Somat Cell Mol Genet.* 2001 Nov;26 (1-6):13-33. Review
- Gaspar HB, Parsley KL, Howe S, et al. Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency by use of a pseudotyped gammaretroviral vector.

Lancet 2004;364:2181–7.

Gaszner M. and Felsenfeld G. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. 2006 Nat. Rev. Gen. Vol.7

Gause M, Morcillo P, Dorsett D. Insulation of enhancer-promoter communication by a gypsy transposon insert in the *Drosophila* cut gene: cooperation between suppressor of hairy-wing and modifier of mdg4 proteins. 2001. Mol. Cell Biol. 21:4807–17

Gerasimova TI, Corces VG. Chromatin insulators and boundaries: effects on transcription and nuclear organization. Annu. 2001. Rev. Genet. 35:193–208.

Gerd A. Blobel CREB-binding protein and p300: molecular integrators of hematopoietic transcription Blood, Vol. 95 No. 3 (February 1), 2000: pp. 745-755

Geyer P.K., and Corces V.G., DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. 1992. Genes & Dev.. 6: 1865-1873.

Geyer PK. The role of insulator elements in defining domains of gene expression. 1997. Curr. Opin. Genet. Dev. 7:242–48

Goff SP. Intracellular trafficking of retroviral genomes during the early phase of infection: viral exploitation of cellular pathways. J. Gene Med. 2001; 3:517-528.

Hacein Bey Abina S., Von Kalle C., Schmidt M., et al., LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science 2003. 302: 415-419.

Hacein-Bey-Abina S, J Hauer, A Lim, C Picard, GP. Wang, CC. Berry, C Martinache, F Rieux-Laucat, S Latour, BH. Belohradsky, L Leiva, R Sorensen, M Debré, JL Casanova, S Blanche, A Durandy, F D. Bushman, A Fischer, and M Cavazzana-Calvo N Engl J Med. 2010 July 22; 363(4): 355–364. Efficacy of Gene Therapy for X-Linked Severe Combined

Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M “A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency” 2003 . 1N. Engl. J. Med.; 348:255-256

Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay JP, Thrasher AJ, Wulffraat N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Davies EG, Kuis W, Leiva L, Cavazzana-Calvo M. 2002. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. N Engl J Med. 346:1185- 1193

Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J Clin Invest 2008;118:3132–42.

Hackett CS, Geurts AM and Hackett PB. Predicting preferential DNA vector insertion sites: implications for functional genomics and gene therapy. 2007 Genome Biology. 8 (Suppl 1):S12.

Hanawa H., Hargrove P.W., Kepes S., Srivastava D.K., Nienhuis A.W., Persons D.A. Extended β -globin locus control region elements promote consistent therapeutic expression of a gamma-globin lentiviral vector in murine β -thalassemia. 2004. *Blood* 104: 2281-2290

Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., Gendelman, H. E., Ratner, L., Stevenson, M. & Emerman, M.. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7311-7315.

Howe SJ, Mansour MR, Schwarzwaelder K, et al. Insertional mutagenesis combined with acquired somatic mutations causes leukemogenesis following gene therapy of SCID-X1 patients. *J Clin Invest* 2008;118:3143–50

Imren S., Pajen E., Westerman KA., Pawliuk R., Fabri ME., Eaves CJ., Cavilla B., Wadsworth Ld., Beuzad Y., Bouhassira EE., Russell R., London IM., Nagel RL., Leboulch P., Humphries R.K. Permanent and panerythroid correction of murine β -thalassemia by multiple lentiviral integration in hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 14380-14385.

Kay MA, Glorioso JC, Naldini L. Viral vector for gene therapy: the art of turning infectious agent into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, 2001, Vol 116, pp. 33-40

Karpen, G.H., Position-effect variegation and the new biology of heterochromatin. *Curr Opin Genet Dev.* 1994 Apr;4(2):281-91. Review.

Kean L S, Mancini E A, Perry J .“Chimerism and cure : hematologic and pathologic correction of murine sickle cell disease” 2003. *Blood* 102: 4582-4593

Kellum R., and Schedl P., A group of scs element function as domain boundaries in an enhancer- blocking assay. 1992. *Mol Cell Biol.* 12: 2424-2431.

Kumar M., Keller B., Makalou N., Sutton RE. Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vector. *Uman Gene Therapy.* 2001. 12:1893-1905.

Leboulch, P, Huang, GM, Humphries, RK, Oh, YH, Eaves, CJ, Tuan, DY et al. Mutagenesis of retroviral vectors transducing human γ -globin gene and beta-globin locus control region derivatives results in stable transmission of an active transcriptional structure. 1994. *EMBO J* 13: 3065–3076

Leonard WJ. Cytokines and immunodeficiency diseases. *Nat Rev Immunol* 2001;1:200–8.

Letting, D.L., Rakowski, C., Weiss, M.J., and Blobel, G.A. Formation of a tissue-specific histone acetylation pattern by the hematopoietic transcription factor GATA-1. 2003 *Mol. Cell. Biol.* 23, 1334–1340.

Levasseur D N, Ryan T M, Pawlik K M and Townes T M. “Correction of a mouse model of sickle cell disease: lentiviral/antisickling beta-globin gene transduction of unmobilized, purified hematopoietic stem cells”.2003. *Blood* 102: 4312-4319

Lewis PF., Emerman M. Passage through mitosis is required for oncoretroviruses but not for the human immunodeficiency virus. *J. Virol.* 1994. 68:510-516.

Lourdes Valenzuela and Rohinton T. Kamakaka. Chromatin Insulators. *Ann. 2007.Rev. Gen. Vol. 40.*

Maggio A. Light and shadows in the iron chelation treatment of haematological diseases. *Br J Haematol. 2007 Aug;138(4):407-21. Review.*

Mari Aker, Julie Tubb, Amy C Groth, Anatoly A Bukovsky, Adam C Bell, Gary Felsenfeld, Hans-Peter Kiem, George Stamatoyannopoulos, David W Emery, Extended Core Sequences from The cHS4 Insulator Are Necessary for Protecting Retroviral Vectors from Silencing Position Effects. *Hum Gene Ther. 2007 Apr 5; 17411365.*

Majumder P, Cai HN The functional analysis of insulator interactions in the *Drosophila* embryo P. Cai, *PNAS* April 29, 2003 vol. 100 no. 9, 5223–5228).

May C., Rivella S., Callegari J., Heller G., Gaensler K.M.L., Luzzatto L., and Sadelain M. Therapeutic haemoglobin synthesis in β - thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human β -globin. July 2000. *NATURE* vol 406, 6.

Melfi, R., Palla, F., Di Simone, P., Alessandro, C., Calì, L., Anello, L., and Spinelli, G, Functional characterization of the sea urchin early histone gene cluster reveals insulator properties and three essential cis-acting sequences. *J. 2000. Mol. Biol. 304,753-763.*

Miccio A, Cesari R, Lotti F, Rossi C, Sanvito F, Ponzoni M, Routledge SJ, Chow CM, Antoniou MN, Ferrari G. In vivo selection of genetically modified erythroblastic progenitors leads to long-term correction of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jul 29;105(30):10547-52.*

Mohamedali A, Moreau–Gaudry F, Richard E, Xia P, Nolta J, Malik P. Self–inactivating lentiviral vectors resist proviral methylation but do not confer position–independent expression in hematopoietic stem cells. 2004. *Mol Ther 10:249–259.*

Ott M G, Schmidt M, Schwarzwaelder K, Stein S, Siler U, Koehl U, Glimm H, Kuhlcke K, Schilz A, Kunkel H, Naundorf S, Brinkmann A, Deichmann A, Fischer M, Ball C, Pilz I, Dunbar C, Du Y, Jenkins NA, Copeland NG, Luthi U, Hassan M, Thrasher AJ, Hoelzer D, von Kalle C, Seger R, Grez M. Correction of X–linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1–EVI1, PRDM16 or SETBP1. 2006 *Nat Med 12:401–409.*

Palla, F., Melfi, R., Anello, L., Di Bernardo, M., and Spinelli, G. Enhancer blocking activity located near the 3' end of the sea urchin early H2A histone gene. 1997. *Proc Natl Acad Sci U S A 94, 2272-7.*

Pannell, D. and Ellis, J. (2001) Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors. 2001 *Rev. Med. Virol. 11:205–217*

Parnell TJ, Geyer PK. Differences in insulator properties revealed by enhancer blocking assays on episomes. 2000 *EMBO J. 19:5864–74*

Parolin C, Dorfman T, Palù G, Göttlinger H, Sodroski J. Analysis in human

immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. 1994. *J Virol*, Vol 68, pp. 3888-3895.

Pawliuk R, Westerman KA, Fabry ME, Payen E, Tighe R, Bouhassira EE, Acharya SA, Ellis J, London IM, Eaves CJ, Humphries RK, Beuzard Y, Nagel RL, Leboulch P. Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy. 2001 *Science* 294:2368–2371.

Pawliuk, R, Bachelot, T, Raftopoulos, H, Kalberer, C, Humphries, RK, Bank, A et al. Retroviral vectors aimed at the gene therapy of Human α -globin gene disorders. 1998. *Ann N Y Acad Sci* 850: 151–162.

Persons DA, Hargrove PW, Allay ER, Hanawa H, Nienhuis AW. The degree of phenotypic correction of murine beta α -thalassemia intermedia following lentiviral-mediated transfer of a human gamma-globin gene is influenced by chromosomal position effects and vector copy number. 2003 *Blood* 101:2175–2183.

Persons., Allay E.R., Sabatino DE., Kelly P., Bodine DM., Nienhuis AW., et al. Functional requirements for phenotypic correction of murine β -thalassemia: implications for human gene therapy. *Blood* 2001. 97:3275-3282.

Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri P, Bonaccorsi S, et al. 1995. Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. 1995. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:3804–8.

Puthenveetil G, Scholes J, Carbonell D, Qureshi N, Xia P, Zeng L, Li S, Yu Y, Hiti AL, Yee JK, Malik P. Blood Successful correction of the human beta-thalassemia major phenotype using a lentiviral vector. 2004. 0104:3445–3453.

Raftopoulos, H, Ward, M, Leboulch, P and Bank, A .Long-term transfer and expression of the human α -globin gene in a mouse transplant model. 1997. *Blood* 90: 3414–3422.

Ramezani A, Hawley TS, Hawley RG. Performance- and safety-enhanced lentiviral vectors containing the human interferon-beta scaffold attachment region and the chicken beta-globin insulator. 2003. *Blood* 101:4717–4724.

Ramunas J, Montgomery HJ, Kelly L, Sukonnik Tanya, Ellis J and Jervis EJ. Real-time Fluorescence Tracking of Dynamic Transgene Variegation in Stem Cells. 2007. *Mol. Ther.* 15(4):810-817

Recillas-Targa F. Gene transfer and expression in mammalian cell lines and transgenic animals. 2004 *Methods Mol Biol* 267:417–433.

Rivella S, May C, Chadburn A, Riviere I, Sadelain M. A novel murine model of Cooley anemia and its rescue by lentiviral-mediated human beta-globin gene transfer. 2003 *Blood* 101:2932–2939.

Rivella S., Sadelain M., genetic treatment of severe hemoglobinopathies: the combat against transgene variegation and transgene silencing. *Semin Hematol*, 1998. 35:112-125.

Roselli E A, R Mezzadra, M C Frittoli, G Maruggi, E Biral, F Mavilio, F Mastropietro, A Amato, G Tonon, C Refaldi, MD Cappellini, M Andreani, G Lucarelli, MG Roncarolo, S Markteli, G Ferrari. Correction of b-thalassemia major by gene transfer in haematopoietic progenitors of pediatric patients. 2010. *EMBO Mol Med* 2, 315–328

Sadelain M, Boulad F, Galanello R, Giardina P, Locatelli F, Maggio A, Rivella S, Riviere I, Tisdale J. Therapeutic options for patients with severe beta-thalassemia: the need for globin gene therapy. *Hum Gene Ther.* 2007;18:1-9. Review.

Sadelain, M, Wang, CH, Antoniou, M, Grosveld, F and Mulligan, RC. Generation of a high-titer retroviral vector capable of expressing high levels of the human - globin gene. 1995. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6728–6732

Sarzotti-Kelsoe M, Win CM, Parrott RE, et al. Thymic output, T-cell diversity, and T-cell function in long-term human SCID chimeras. *Blood* 2009;114:1445–53.

Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV–1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. 2002. *Cell* 110:521–529.

Spinelli G, Albanese I, Anello L, Ciaccio M, Di Liegro I. Chromatin structure of histone genes in sea urchin sperms and embryos. *Nucleic Acids* . 1982. *Res* 10:7977–7991.

Stein S, MG Ott, S Schultze-Strasser, A Jauch, B Burwinkel, A Kinner, Manfred Schmidt, A Krämer, J Schwäble, H Glimm, U Koehl, C Preiss, C Ball, H Martin, G Göhring, K Schwarzwaelder, W-K Hofmann, K Karakaya, S Tchatchou, R Yang, P Reinecke, K Kühlcke, B Schlegelberger, AJ Thrasher, D Hoelzer. Genomic instability and myelodysplasia with monosomy 7 consequent to EVI1 activation after gene therapy for chronic granulomatous disease 2010. *Nature Medicine* 16, 198–204

Stevenson, M., Brichacek, B., Heinzinger, N., Swindells, S., Pirruccello, S., Janoff, E. & Emerman, M. (1995) *Adv. Exp. Med. Biol.* 374, 33-45

Strutt H., Cavalli G., Paro R: Co-localization of polycomb protein and GAGA factor on regulatory elements responsible for the maintenance of homeotic gene expression. (1997) *EMBO J.* 16: 3621-3632.

Srinivasakumar N. HIV-1 vector systems. 2001. *Somat Cell Mol Gen*, Vol 26, pp. 51-81

Sun F. L., and Elgin S. C., Putting boundaries on silence. 1999. *Cell* 99: 459-462

Unutmaz, D, Littman, D R Expression pattern of HIV-1 coreceptors on T cells: implications for viral transmission and lymphocyte homing. 1997. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(5), 1615-8.

Von Kalle C., Baum C., Williams DA., Lenti in red: progress in gene therapy for human hemoglobinopathies. *J. Clin. Invest* 2004. 114: 889-891.

Walters MC, Fiering S, Bouhassira EE, Scalzo D, Goeke S, Magis W, Garrick D,

- Whitelaw E, Martin DI. The chicken beta-globin 5'HS4 boundary element blocks enhancer-mediated suppression of silencing. 1999. *Mol Cell Biol* 19:3714–3726.
- Wei W, Brennan MD. The gypsy insulator can act as a promoter-specific transcriptional stimulator. 2001. *Mol. Cell Biol.* 21:7714–20
- West AG, Gaszner M, Felsenfeld G. 2002. Insulators: many functions, many mechanisms. 2002. *Genes Dev* 16:271–288.
- Wojda U., P.Noel, and J.L.Miller. Fetal and adult haemoglobin production during adult erythropoiesis:coordinate expression correlates with cell proliferation. *Blood*, 15Apr 2002, vol99,n8.
- Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. 2003. *Science* 300:1749–1751.
- Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 Envelope Glycoproteins: Fusogens, Antigens, and Immunogens. *Science* 1998; 280(5371): 1884-1888
- X Wu, Y Li, B Crise, SM Burgess. Transcription start regions in the human genome are favored targets for MLV integration. X Wu, Y Li, B Crise, SM Burgess. 2003. *Science* 300: 1749-51.
- Yannaki, E, Tubb, J, Aker, M, Stamatoyannopoulos, G and Emery, DW . Topological constraints governing the use of the chicken HS4 chromatin insulator in oncoretrovirus vectors. 2002. *Mol Ther* 5: 589–598
- Yao S, Sukonnik T, Kean T, Bharadwaj RR, Pasceri P, Ellis J. Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. 2004. *Mol. Ther.* 10(1):27-36
- Zennou, V. et al. HIV-1 genome nuclear import is mediated by a central DNA flap. 2000. *Cell* 101, 173–185 .
- Zennou, V. et al. The HIV-1 DNA flap stimulates HIV vectormediated cell transduction in the brain. 2001. *Nature Biotechnol.* 19, 446–450.
- Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, 1998. Vol 72, pp. 9873-9880.