

**Dottorato di Ricerca in Terapia Pediatrica e  
Farmacologia dello Sviluppo**

**Ciclo XX**

**Valutazione dell'efficienza, efficacia e sicurezza di vettori lentivirali  
nel trasferimento del gene CFTR in sistemi modello di epitelio  
respiratorio in fibrosi cistica**

Tesi di dottorato di :  
**Stefano Castellani**

Relatore:  
**Prof.ssa Carla Colombo**

Correlatore:  
**Prof. Massimo Conese**

**Tesi svolta presso “ Istituto per il trattamento sperimentale della Fibrosi Cistica”,  
Ospedale S.Raffale del Monte Tabor , Milano**

<b>Indice :</b> .....	<b>3</b>
<b>1. Introduzione</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1 La fibrosi cistica</b> .....	<b>6</b>
1.1.2 Basi genetiche della Fibrosi Cistica.....	6
1.1.3 Struttura e funzione della proteina CFTR.....	7
1.1.4 Mutazioni del gene FC.....	8
1.1.5 Siti di espressione del CFTR.....	9
1.1.6 Le funzioni del canale CFTR e interazione con ENaC.....	9
1.1.7 Diagnosi della FC.....	11
1.1.8 Trattamento della FC.....	13
<b>1.2 Terapia Genica</b> .....	<b>16</b>
1.2.1 I vettori non virali.....	16
1.2.2 I vettori virali derivati da adenovirus.....	18
1.2.3 I vettori adeno-associati.....	19
1.2.4 I vettori lentivirali e le loro applicazioni alla terapia genica per la fibrosi cistica.....	20
1.2.3 Target cellulari nella terapia genica della fibrosi cistica.....	24
1.2.4 Barriere extra- e intracellulari al trasferimento genico nei polmoni.....	25
1.2.5 Approcci alternativi di terapia genica: L'ENaC come nuovo target.....	26
1.2.6 La tecnica dell'RNA interference per silenziare specificamente l'ENaC.....	27
<b>2. Scopo della Tesi</b> .....	<b>30</b>
<b>3. Materiali e metodi</b> .....	<b>32</b>
3.1 Procedure di clonaggio.....	33
3.3 Linee cellulari utilizzate nello studio.....	43
3.4 Produzione dei vettori lentivirali.....	46
3.5 Transfezioni transienti per valutare l'espressione del transgene.....	51
3.6 Protocolli di Immunofluorescenza indiretta utilizzati nello studio.....	51
3.7 FLIPR Membrane potential assay kit (Molecular Devices).....	52
3.8 Real Time PCR.....	53

<b>4.</b>	<b>Risultati.....</b>	<b>57</b>
4.1	Clonaggio del cDNA del gene CFTR fuso con il tag C-MYC nel vettore di espressione lentivirale.....	58
4.2	Down-regolazione dell'ENaC.....	62
<b>5.</b>	<b>Discussione.....</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografia.....</b>	<b>82</b>

# ***1. INTRODUZIONE***

## 1.1 La Fibrosi cistica

La fibrosi cistica (FC) è la patologia genetica autosomica recessiva più frequente nella popolazione caucasica, con una incidenza pari ad un caso ogni 2500-2700 nascite (Ratjen and Doring, 2003). Questa patologia si caratterizza per una anomalia nel trasporto del cloro nella membrana delle cellule delle ghiandole a secrezione esocrina, colpendo essenzialmente l'epitelio delle vie respiratorie caratterizzato da secrezioni mucose spesse e viscosi, con conseguente ridotta clearance mucociliare, aumento della risposta infiammatoria e successive infezioni batteriche croniche con *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Burkholderia cepacia* tra i principali patogeni. Il processo infiammatorio cronico porta alla distruzione della matrice extracellulare a livello bronchiolare con formazione di bronchiectasie che aumentano il ristagno di muco. Infine, insorge insufficienza polmonare, la maggiore causa di morbilità e mortalità di questi pazienti. Il pancreas è colpito nell' 85% dei casi con un ristagno dei succhi pancreatici nei dotti. La carenza di succhi pancreatici nel canale intestinale porta a malassorbimento di grassi, e di conseguenza delle vitamine liposolubili, delle proteine e, in minima parte, degli zuccheri. Con il passare del tempo il pancreas, sempre più colpito, secerne in minor quantità insulina portando a una forma di diabete di solito insulino-dipendente. Il 98% dei soggetti di sesso maschile è sterile per azoospermia; le donne possono avere figli ma la fertilità è comunque ridotta.

### 1.1.2 Basi genetiche della fibrosi cistica

Il gene FC, identificato e clonato nel 1989, è situato sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q31) e si estende per circa 250 kb. E' costituito da 27 esoni per un totale di circa 6,1 Kb. Studi mediante RT-PCR ed ibridizzazione *in situ* hanno dimostrato che il gene FC è espresso nei tessuti epiteliali di vari organi come polmone, pancreas, fegato, ghiandole sudoripare, ghiandole parotidi, nonché a livello della placenta. Lo stesso tipo di studi condotti su feti umani, ha mostrato che il gene è espresso anche durante lo sviluppo fetale, specialmente nelle vie aeree e nei polmoni (Pilewsky et al. , 1999).

Nessuna espressione è stata rilevata nel cervello, nelle ghiandole surrenali, linee cellulari linfoblastiche e fibroblasti cutanei.

### 1.1.3 Struttura e funzione della proteina CFTR

Il gene FC codifica per una proteina di 1480 amminoacidi denominata “Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator” (CFTR) (Riordan et al., 1989), appartenente alla famiglia dei trasportatori con cassette che legano l’ATP (ATP binding cassette, ABC), e che ha la funzione di veicolare il cloro attraverso la membrana delle cellule epiteliali. La proteina presenta due domini transmembrana ognuno costituito da 6  $\alpha$  eliche, connessi ognuno a un dominio citoplasmatico, il nucleotide binding domain (NBD) (Figura 1). Il dominio centrale, detto dominio R, ha funzione regolatoria e include siti di fosforilazione multipli da parte di differenti chinasi, fra cui la proteina chinasi AMP-ciclico dipendente (PKA) e la proteina chinasi C (PKC). L’attivazione del canale richiede sia la fosforilazione del dominio R che dei due domini NBD. Durante il processo di maturazione il CFTR viene N-glicosilato sul quarto loop extracellulare. In questo modo il peso del CFTR passa da 130 kDa a 150 kDa. La porzione C-terminale della proteina è ancorata al citoscheletro tramite un’ interazione con un dominio PDZ (Short et al., 1998).

L’attivazione del canale CFTR inizia con la fosforilazione del dominio R tramite la PKA. Questa fosforilazione parziale rende possibile il legame dell’ATP al dominio NBD1 e la sua successiva idrolisi consente l’apertura breve del canale. Solo quando il dominio R è completamente fosforilato, l’ATP viene legato anche dal dominio NBD2, stabilizzando l’apertura del canale. Quando in uno step successivo l’ATP viene idrolizzato anche dal dominio NBD2 il canale viene chiuso. (Carson et al., 1995)

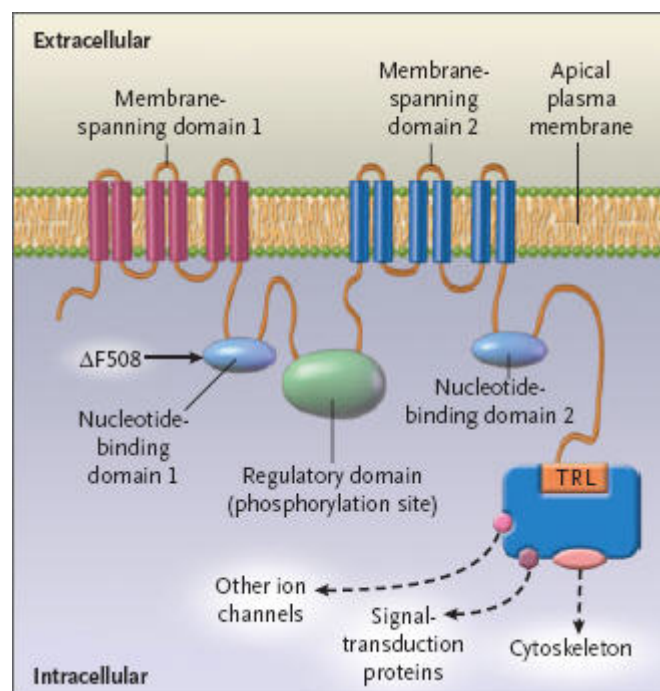


Figura 1. Schema della struttura del CFTR

#### 1.1.4 Mutazioni del gene FC

A tutt'oggi sono note più di un migliaio di mutazioni riguardanti il gene FC, alcune rare, suddivise in differenti gruppi in base al loro effetto diretto sul processamento e la funzionalità della proteina CFTR (Vankeerberghen et al., 2002).

La classe I comprende mutazioni non senso, di splicing e di frameshift, con conseguente produzione di trascritti instabili e proteine aberranti che vengono rapidamente degradate o non sono funzionanti.

Le mutazioni di classe II, che risultano essere le più numerose e comprendono anche la mutazione più comune, la  $\Delta F508$ , sono associate ad una maturazione impropria della proteina. Queste proteine non assumono il corretto ripiegamento ("folding") e vengono ubiquinate e degradate prima di raggiungere la membrana plasmatica. Un difetto nella maturazione si osserva principalmente quando sono alterati amminoacidi nel dominio NBD1.

Le mutazioni di classe III riguardano difetti di binding con l'ATP a livello dei domini NBD, nonché difetti di fosforilazione a livello del dominio R, risultando in un'attività ridotta del canale.

Le mutazioni di classe IV riguardano amminoacidi localizzati nel poro del canale, e dunque proteine CFTR con ridotta attività di corrente. Queste mutazioni sono spesso associate con un quadro clinico più moderato.

Le mutazioni di classe V riguardano i siti di splicing; in questo caso una ridotta porzione dei trascritti può andare incontro a splicing corretto, producendo così una minore quantità di CFTR, sufficiente però a rendere il quadro clinico più lieve.

Le mutazioni di classe VI alterano invece l'attività regolatoria del CFTR nei confronti di altri canali ionici quali ENaC e ORCC.

In generale le mutazioni delle classi I, II e III sono le più comuni e, a differenza delle altre classi, sono associate a insufficienza pancreatica. Il 70% dei pazienti con fibrosi cistica presenta una mutazione appartenente alla seconda classe che porta alla delezione di tre nucleotidi codificanti per la fenilalanina in posizione 508 ( $\Delta F508$ ) della catena aminoacidica.



Attualmente si stima che una riduzione del contenuto di mRNA totale di CFTR uguale o inferiore al 10% risulti in uno stato patologico. Per le mutazioni appartenenti alle prime tre classi, il livello di CFTR funzionale è generalmente inferiore al 1%.

Poiché livelli bassi di espressione del CFTR sono sufficienti affinché si abbia un fenotipo normale le mutazioni delle classi IV,V e VI determinano un fenotipo di severità ridotta (Pilewski and Frizzell, 1999).

### **1.1.5 Siti di espressione del CFTR**

Dopo l'identificazione del gene codificante per il CFTR è stato possibile determinare la sua espressione a livello tissutale. L'espressione del CFTR a livello dell'epitelio pseudostratificato delle vie aeree di conduzione presenta una distribuzione non omogenea. Le cellule sierose delle ghiandole submucosali e la sottopopolazione di cellule non ciliate esprimono livelli estremamente alti di CFTR sia in termini di mRNA che di proteina al contrario delle cellule ciliate, che esprimono bassi livelli di CFTR (Pilewski and Frizzell, 1999).

A livello della porzione distale una ridotta popolazione di cellule epiteliali non ciliate bronchiolari e alveolari mostra un' elevata espressione di CFTR.

Differenti studi hanno portato alla conclusione che il malfunzionamento delle cellule sierose delle ghiandole submucosali possa essere la causa principale della patologia a livello polmonare. Queste cellule, infatti, secernono molti dei fattori che compongono il liquido periciliare che riveste la superficie delle cellule della mucosa (ASL, *Airway Surface Liquid*) e che rappresenta un'importante barriera di difesa da microrganismi esogeni. Uno dei primi cambiamenti morfologici osservati nei pazienti con fibrosi cistica interessa proprio queste ghiandole che si dilatano riempiendosi di muco e diventando iperplastiche in condizioni di infiammazione.

### **1.1.6 Le funzioni del canale CFTR e interazione con ENaC**

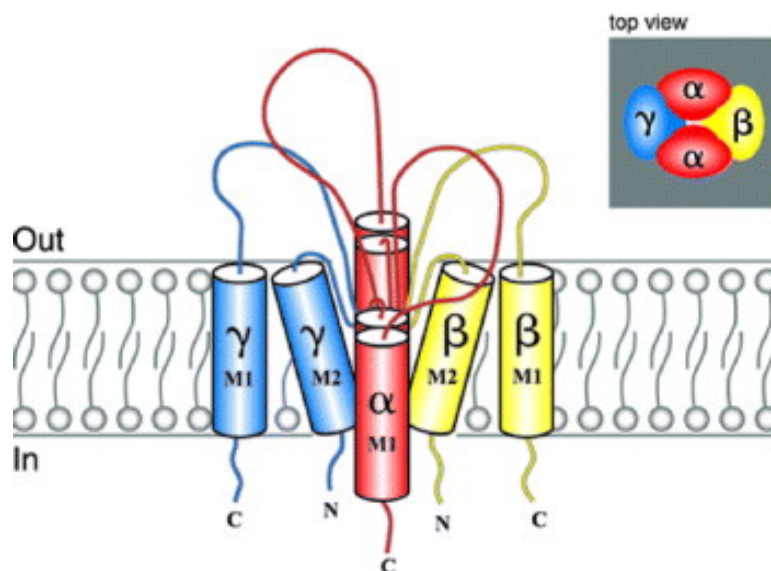
Le funzioni (e quindi le mutazioni) del CFTR sono tessuto-specifiche. Il CFTR regola numerosi trasportatori e canali ionici (tra cui ENaC, altri canali del cloro, la pompa di scambio  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  e il canale del potassio KirK1) e processi cellulari fondamentali coinvolti nel trasporto dell' ATP e nella secrezione di muco. Non è ancora chiaro se queste funzioni regolatorie risultino

dall'interazione diretta del CFTR con gli altri canali e trasportatori oppure da interazioni indirette mediate da altre proteine.

Particolare importanza riveste l'interazione di CFTR con il canale epiteliale del sodio (ENaC).

L'ENaC (*Amiloride-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> Channel*) è un canale di trasporto espresso nei tessuti epiteliali dei reni, del colon e dei polmoni. È essenziale per l'assorbimento degli elettroliti e di conseguenza partecipa alla regolazione della pressione sanguigna, alle funzioni intestinali e alla clearance mucociliare dell'epitelio delle vie aeree (Kunzelmann et al., 2001).

E' costituito da due subunità  $\alpha$ , una subunità  $\beta$  e una subunità  $\gamma$ , codificate da tre geni della famiglia *Scnn1* (A, B e C). Ogni subunità ha due domini trans-membrana, un loop extracellulare mentre le estremità N e C terminali della proteina sono citoplasmatiche (Figura 2).

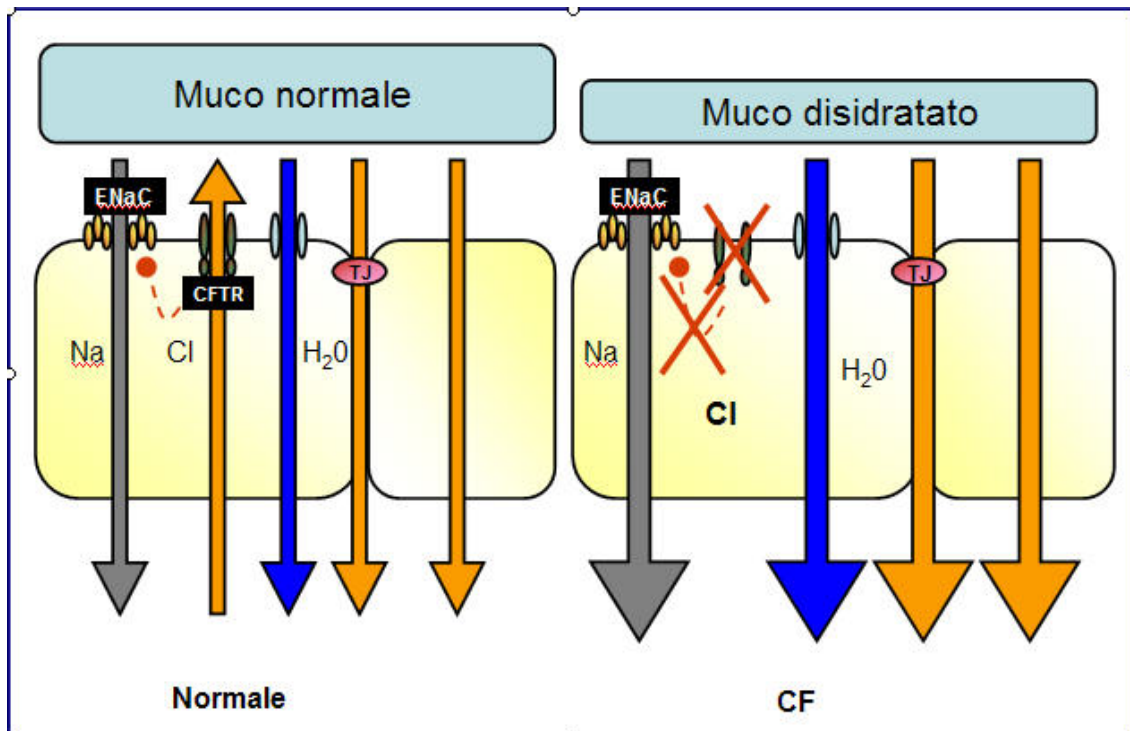


**Figura 2.** Struttura del Canale epiteliale del Sodio.

Le due subunità  $\alpha$  costituiscono il poro del canale, mentre le altre due subunità sembrano avere più una funzione regolatoria.

Il CFTR normale svolge un ruolo di regolazione negativa sul ENaC a livello polmonare e gastrointestinale (Wine, 1999). In condizioni CF, si verifica quindi un'iperattività dell'ENaC in questi organi, dove il CFTR ha la funzione di escrezione di  $\text{Cl}^-$  con un conseguente marcato incremento del trasporto del sodio intracellulare, attraverso le membrane apicali; a livello delle ghiandole sudoripare, invece, dove il CFTR ha la funzione di riassorbimento di  $\text{Cl}^-$  dal lume dei

dotti, si verifica una riduzione dell'attività dell'ENaC con conseguente produzione di secrezioni ipertoniche ad alto contenuto di cloruro di sodio.



**Figura 3 .** In condizioni CF vi è una mancata inibizione dell'ENaC da parte del CFTR nelle vie aeree.

A livello dell'epitelio respiratorio e intestinale i canali CFTR sono responsabili della secrezione attiva del cloro all'interno del lume. In tali sedi, una mutazione del CFTR determina una netta riduzione del cloro escreto nel lume a cui consegue un incremento dell'assorbimento attivo del sodio intraluminare (dovuto alla perdita della regolazione dell'ENaC). Il riassorbimento passivo dell'acqua dal lume causa la disidratazione del liquido periciliare che riveste la superficie delle cellule della mucosa (ASL), portando all'accumulo di secrezioni iperconcentrate e viscosi (Figura. 3) che ostruiscono il passaggio dell'aria e predispongono a infezioni (Ratjen and Doring, 2003) e infiammazioni polmonari ricorrenti con massicce infiltrazioni di granulociti polimorfonucleati (in particolare di neutrofili) (Chmiel et al., 2002).

### 1.1.7 Diagnosi della FC

Nella maggior parte dei casi la diagnosi di fibrosi cistica viene suggerita sulla base di uno o più segni clinici e confermata dalla misurazione della concentrazione di cloro nel sudore. A livello

respiratorio i pazienti presentano una tosse persistente con espettorato viscoso e purulento; i pazienti possono presentare polipi nasali. Inoltre una minoranza dei pazienti presenta nelle prime ore di vita un'ostruzione intestinale detta ileo da meconio. In un paziente che presenta uno o più elementi clinici indicativi di fibrosi cistica o ha un fratello affetto dalla malattia, la diagnosi può anche essere confermata dalla identificazione di due mutazioni note della fibrosi cistica (Stern, 1997); nei neonati con fibrosi cistica la rilevazione della presenza nel sangue del tripsinogeno immunoreattivo (indice di danno pancreatico), effettuato generalmente al quarto giorno di vita, associata al test del sudore e all'analisi della mutazione, costituisce la base dei programmi di screening neonatale per la FC in molte parti del mondo.

In particolare, come già detto in precedenza, la diagnosi è confermata da un valore elevato della concentrazione di  $\text{Cl}^-$  nel sudore. L'unico test del sudore attendibile è il test quantitativo ottenuto mediante ionoforesi pilocarpinica: si stimola farmacologicamente la parte prescelta, si misura la quantità di sudore e la sua concentrazione di  $\text{Cl}^-$ . Nei pazienti con quadro clinico sospetto o con anamnesi familiare positiva, una concentrazione di  $\text{Cl}^- > 60 \text{ mmol/l}$  conferma la diagnosi; è verosimile che meno di 1:1000 pazienti con FC presenta una concentrazione di  $\text{Cl}^-$  nel sudore  $< 50 \text{ mmol/l}$ . Risultati falsamente negativi sono rari ma si possono avere in presenza di edemi o per la raccolta di una quantità di sudore inadeguata mentre risultati falsamente positivi sono da attribuire in genere a errori tecnici o all'uso di metodi non adeguati. Sebbene i risultati siano già attendibili dopo le prime 24 ore di vita, può essere difficile ottenere un'adeguata quantità di sudore prima di 3-4 settimane di vita. Benché la concentrazione di  $\text{Cl}^-$  nel sudore di regola aumenti lievemente con l'età, il test è ancora valido negli adulti.

I pazienti affetti da FC presentano un aumento delle differenze di potenziale transepiteliale nasale. Tale osservazione può essere utile dal punto di vista diagnostico quando i valori di  $\text{Cl}^-$  nel sudore sono al limite o normali e le due mutazioni della FC non sono identificate.

Ai fini diagnostici può essere inoltre presa in considerazione l'evidenza che oltre l'85% dei pazienti affetti da fibrosi cistica mostra insufficienza pancreatica ed una ridotta concentrazione fecale di chimotripsina, elastasi e lattasi pancreatica.

Lo screening prenatale può essere effettuato tra la decima e la dodicesima settimana di gravidanza prelevando con una biopsia un piccolo frammento dei villi coriali e verificando la presenza di eventuali mutazioni a carico del gene FC.

### 1.1.8 Trattamento della FC

Il trattamento attualmente più diffuso della FC è sintomatico. La maggior parte dei pazienti è inizialmente colonizzata da *S.aureus* e *H. influenzae*. Con l'età il tasso di infezione di *S.aureus* cala mentre incrementa quello di *P.aeruginosa*. Dopo un'iniziale periodo di colonizzazione transiente con un fenotipo non mucoide, si passa ad un'infezione cronica con fenotipo mucoide. I pazienti pertanto vengono trattati con antibiotici al fine di eradicare questi batteri. Nonostante l'intenso regime antibiotico, *P.aeruginosa* difficilmente viene eradicato, probabilmente a causa della scarsa penetrazione dell'antibiotico nel muco molto viscoso e del rapido sviluppo di ceppi mutanti che manifestano un'elevata resistenza agli antibiotici (Oliver et al., 2000). L'obiettivo della terapia delle infezioni polmonari deve essere quello di migliorare la situazione clinica in modo tale da non rendere necessaria la somministrazione continuativa di antibiotici. Tuttavia, per alcuni pazienti ambulatoriali con frequenti riacutizzazioni respiratorie, può essere indicata la loro somministrazione per un lungo periodo. In pazienti selezionati può essere utile una terapia cronica con tobramicina e colistina per aerosol.

La fibrosi cistica è inoltre caratterizzata da un'elevata infiammazione delle vie aeree dominata dalla presenza di neutrofili. L'infiammazione può essere trattata con composti che abbiano un effetto pleiotropico sui neutrofili, che blocchino le citochine proinfiammatorie o con composti indirizzati verso specifici componenti dei neutrofili. I primi composti utilizzati sono stati i corticosteroidi come il Prednisolone somministrato per via orale, che presenta buona attività antinfiammatoria ma notevoli effetti collaterali. Ad oggi i trattamenti anti-infiammatori impiegano composti non steroidei come l'ibuprofene e altri composti come l'interleuchina 10 ricombinante, l'anti-interleuchina 8 o l'antagonista del recettore del leucotriene B4 (Ren, 2002).

Attualmente il trapianto di polmone o di cuore-polmone rappresenta l'unica terapia in grado di ripristinare la funzionalità polmonare in un paziente FC all'ultimo stadio, associato però ad una percentuale di sopravvivenza di tre anni e gravato da conseguenti reazioni di rigetto acuto e cronico.

Vi è poi un campo di ricerca per il trattamento della FC mirato al ripristino delle corrette funzioni del CFTR (Farmaci correttori e farmaci potenziatori). Questo approccio presuppone la completa comprensione del difetto cellulare associato a ogni specifica mutazione, in modo da tentare di correggerlo con farmaci ad hoc.

Ad esempio, a causa delle mutazioni di classe I si ha una riduzione della produzione di mRNA per la presenza di mutazioni di stop. Le mutazioni G542X e R553X possono essere sopresse mediante trattamento con piccole dosi degli aminoglicosidi G418 e gentamicina (Howard et al., 1996). Tali composti sono stati usati nel trattamento di pazienti FC in alcuni studi pilota (Wilschanski et al., 2003).

Le mutazioni di classe II impediscono al CFTR di assumere il corretto folding e quindi di superare il “controllo di qualità” nel reticolo endoplasmatico con successiva degradazione della proteina. In questo senso possono essere utili i cosiddetti farmaci “correttori”, che possono permettere una adeguata interazione della proteina nascente con le proteine chaperons del reticolo endoplasmatico e influenzare così le funzioni del “controllo di qualità” al fine di facilitare il trasporto in membrana del CFTR. I farmaci “potenziatori” invece aumentano la funzionalità della proteina una volta che questa ha raggiunto la membrana plasmatica. Nel caso della  $\Delta F508$  sono probabilmente necessarie molecole con entrambe le attività, visto che questa forma mutata presenta entrambi i difetti.

Tra i “potenziatori”, i butirrati aumentano l’espressione del gene e quindi la sintesi della proteina e la quota funzionante a livello della membrana cellulare. Tra i “correttori” sono state identificate diverse sostanze (polioli, amine, alcuni solventi), denominati “chemical chaperons”, che aumentano il ripiegamento e la stabilità della  $\Delta F508$ -CFTR. L’impiego dei butirrati è limitato da potenziali effetti collaterali gravi, legati all’inibizione dei sistemi di trasporto ionico, come pure non può essere utilizzata la doxorubicina, agente antitumorale che, a fronte del suo effetto peraltro transitorio sul ripiegamento e la stabilità della CFTR, ha una notevole tossicità. Sono in corso studi di screening che, mediante metodiche robotizzate, valutano l’efficienza e la tossicità di migliaia di composti contemporaneamente (Pedemonte et al., 2005). Da questi studi emergeranno “potenziatori” e “correttori” di nuova generazione, auspicabilmente con maggiore specificità di azione e minori effetti collaterali.

A seguito delle mutazioni di classe III e IV il CFTR raggiunge la membrana plasmatica, tuttavia la conduzione ionica è notevolmente ridotta. Alcune xantine prolungano lo stato fosforilato del CFTR e di conseguenza aumentano l’apertura del canale, mentre gli inibitori di fosfodiesterasi quali la genisteina, inibendo la degradazione del cAMP, incrementano il tempo di apertura del canale. Questi composti hanno tuttavia un’emivita molto breve.

Vi è una mutua regolazione tra CFTR e ENaC; in particolare il CFTR ha effetti inibitori sul canale epiteliale del sodio. Nella FC, la mancata inibizione dell’ENaC risulta in un’iperattività di questo canale, con conseguente iperassorbimento di sodio e dunque di acqua, con la formazione di un

muco denso e viscoso. Per questo sono state sperimentate e sono in fase di studio terapie farmacologiche intese ad inibire il riassorbimento di sodio e acqua inibendo in maniera specifica l'ENaC. Studi clinici in cui è stata impiegata l'amiloride, una molecola bloccante il canale del sodio, dimostrano che la stimolazione acuta migliora la clearance mucociliare in pazienti FC (Kohler et al., 1986). A causa della rapida emivita dell'amiloride ed effetti collaterali, non è tuttavia possibile usarla a scopi terapeutici.

## 1.2 Terapia genica

La terapia genica consiste nel trattamento di patologie ereditarie mediante il trasferimento di informazione genetica nelle cellule o tessuti affetti. Pertanto, nel caso della fibrosi cistica, fornendo una copia normale del gene CFTR all'epitelio delle vie respiratorie si va a correggere il difetto primario. Nell'ambito della terapia genica non vi è un tipo di vettore universalmente valido per tutte le applicazioni. Al contrario l'agente di trasferimento genico deve essere accuratamente selezionato in relazione al tipo di cellule bersaglio, al numero di somministrazioni richieste e in base alla grandezza e alla natura del gene che si vuole veicolare.

Come detto in precedenza, l'espressione del CFTR a livello dell'epitelio polmonare non è omogenea ed è stato suggerito che per revertire il difetto del canale sia sufficiente il 10% della sua normale funzione, benché non sia ancora chiaro se questa percentuale debba essere raggiunta nella maggior parte delle cellule epiteliali interessate alla funzione del canale o sia sufficiente un minor numero di cellule che esprimano, però, alti livelli di proteina (Lee et al., 2005).

A tutt'oggi sono disponibili vari tipi di vettori che appartengono a due grandi categorie: quella dei vettori virali e quella dei vettori non virali.

### 1.2.1 Vettori non virali

I vettori non virali rappresentano una classe di agenti di trasferimento genico. La base di questi vettori è costituita da DNA plasmidico, contenente il transgene e generalmente una serie di elementi regolatori quali promotori tessuto-specifici e enhancer per regolarne l'espressione. Il DNA "nudo" può essere considerato un agente di trasferimento genico, tuttavia è molto suscettibile a rapida degradazione da parte di nucleasi *in vivo*, e mostra l'incapacità di raggiungere il nucleo delle cellule a basso indice mitotico (Lukacs et al., 2000).

A tutt'oggi i più comuni vettori non virali utilizzati sono complessi di lipidi cationici e acidi nucleici, chiamati *lipoplexes*, e complessi di poli-elettroliti cationici e acidi nucleici, chiamati *polyplexes*. Le cariche positive dei lipidi e dei polielettroliti favoriscono il legame alle cariche negative dell'acido nucleico. Questo porta alla formazione di vettori piccoli (spesso meno di 100 nm) e di dimensioni uniformi che proteggono gli acidi nucleici dalla degradazione ad opera delle nucleasi. Inoltre la carica netta positiva dei complessi determina la formazione di interazioni elettrostatiche tra i complessi e le cariche negative dei proteoglicani di superficie mediando così l'uptake cellulare (Ziady et al., 2003).



I lipoplexes sono molto efficienti nel transfettare cellule in rapida divisione, meno nel transfettare cellule differenziate (Jiang et al., 1998).

È generalmente accettato che l'endocitosi sia il maggior meccanismo cellulare coinvolto nell'uptake dei lipoplexes, anche se in alcuni casi, a seconda delle proprietà biofisiche di queste particelle, si può verificare anche la fusione diretta con la plasmamembrana (Hyde et al., 2000).

Il rilascio dell'acido nucleico dall'endosoma formulato come lipoplex sembra essere mediato da reazioni di scambio dei lipidi tra la membrana endosomale e il lipoplex (effetto "flip-flop"): i lipidi anionici della membrana endosomale competono con gli acidi nucleici per il legame ai lipidi cationici, determinando il rilascio dell'acido nucleico nel citoplasma per destabilizzazione della membrana endosomale (Xu and Szoka, 1996).

Per superare le barriere al trasferimento genico *in vivo* sono state utilizzate dosi di lipoplexes che hanno poi provocato una forte risposta infiammatoria nell'animale e nell'uomo (Li and Huang, 1997); (Alton et al., 2000).

Una possibile causa dell'infiammazione è data dalle sequenze CpG non metilate presenti nel plasmide; diminuendo il numero di tali sequenze si è assistito di pari passo ad un abbassamento del fenomeno infiammatorio (Yew et al., 1999).

Differenti policationi sono stati utilizzati per realizzare i cosiddetti polyplexes. Quando il DNA è complessato con questi carrier tra i quali la polietilenimina (PEI) o la poly-L-Lisina, si formano complessi con un diametro  $\geq 25$  nm.

Anche l'internalizzazione dei polyplexes avviene per endocitosi, mediata sia da caveole che da clatrina (Sawa et al., 1996). La presenza del policatione PEI, polietilenimina, sulla superficie dei complessi determina il così detto effetto "proton sponge": a pH fisiologici PEI possiede una forte capacità tamponante in virtù delle sue amine secondarie e terziarie e tampona i processi di acidificazione all'interno dell'endosoma. Si verifica di conseguenza l'aumento dell'ingresso di protoni ad opera della pompa endosomale  $H^+/ATPasi$ , allo scopo di riportare il pH a valori fisiologici di circa 5.5-6.5. A causa dell'accoppiamento  $H^+/Cl^-$  aumenta anche l'ingresso di  $Cl^-$  con conseguente rigonfiamento e lisi endosomale e rilascio dell'acido nucleico nel citoplasma (Boussif et al., 1995).

PEI è il policatione più utilizzato per la formulazione dei poliplexes, poiché, a differenza di molti altri polimeri cationici, non necessita della presenza di ulteriori agenti endosomolitici.

Un recente trial clinico di fase I con un vettore non virale è stato completato nel 2004 (Konstan et al., 2004): in particolare un plasmide veicolante il CFTR sotto il controllo di un promotore CMV è stato compattato con poli-etilene-glicol con una coda di polilisina (30aa) ed è stato perfuso

nell'epitelio nasale. Lo studio è stato condotto su 12 soggetti e non si sono verificati effetti collaterali. Misurando la differenza di potenziale nasale, si è potuto notare che il trasporto di Cloro è stato ripristinato parzialmente o completamente in 8 soggetti su 12. In particolare la durata dell'effetto è stata di massimo 6 giorni (in solo 1 soggetto l'effetto ha mostrato una durata di 28 giorni) dopo il trasferimento genico.

### **1.2.2 Vettori derivati da adenovirus**

I vettori che derivano da Adenovirus sono stati ampiamente studiati come agenti di trasferimento genico per il polmone (Graham and Prevec, 1995). Gli adenovirus hanno un genoma di 36 Kb e sono in grado di infettare cellule quiescenti delle vie respiratorie (Kovesdi et al., 1997). Tuttavia il loro genoma rimane in forma episomale una volta nella cellula, per cui per ottenere un'espressione persistente nel tempo del transgene, sono necessarie continue somministrazioni ripetute, tuttavia associata alla somministrazione del vettore adenovirale vi è una forte risposta immunitaria e infiammatoria. Diverse generazioni di vettori adenovirali sono stati realizzati per ridurre la risposta immunitaria e infiammatoria: la prima generazione di vettori adenovirali è stata ampiamente studiata, ma il *delivery* si è dimostrato inefficiente sia negli animali che nell'uomo (Grubb et al., 1994), (Zuckerman et al., 1999). E' stato infatti scoperto che i recettori cellulari per gli Adenovirus sono localizzati sulla superficie basolaterale delle cellule epiteliali delle vie aeree, e pertanto il legame virus-recettore sarebbe impedito dalle Tight Junctions (Pickles et al., 2000). Inoltre, associato alla somministrazione di tali vettori, vi è un effetto infiammatorio dose-dipendente, che compare 3-5 giorni dopo la prima somministrazione (Joseph et al., 2001). Nei vettori di terza generazione i geni virali sono stati completamente rimossi e la produzione dei virioni è dipendente da un virus helper (Zhou et al., 2002).

Un vettore adenovirale helper dipendente veicolante il CFTR umano sotto controllo del promotore K18, è stato somministrato per via intranasale nei topi knock-out per il CFTR in seguito a trattamento con EGTA, per rompere temporaneamente le Tight Junctions. La proteina e l' mRNA sono stati rilevati nel polmone murino fino a 28 giorni dopo la somministrazione e i topi sono risultati maggiormente resistenti alle infezioni polmonari acute ( Koehler et al. 2003).

Tuttavia , a dispetto degli incoraggianti risultati nei topi, è opportuno considerare come il trattamento con l'EGTA nei pazienti possa essere problematico dal punto di vista della sicurezza, e come la somministrazione ripetuta del vettore possa causare una risposta immunitaria diretta contro il capsido del virus.

### 1.2.3 Vettori adeno-associati

I virus adenoassociati sono virus con un genoma a DNA a singolo filamento di 4,7 Kb. In natura non sono associati a nessuna patologia umana nota. Nella forma selvatica sono difettivi nella replicazione e richiedono la co-infezione con un virus helper come un adenovirus o un herpes virus per portare a termine il ciclo di infezione. Il genoma di un AAV selvatico è costituito da due famiglie di geni, Rep (che codificano per proteine regolatorie) e Cap (che codificano per proteine del capsido). Due ripetizioni terminali invertite (inverted terminal repeats, ITR) di 145 basi sono necessarie per la replicazione virale e per la generazione di vettori adeno associati funzionanti (Samulski et al., 1989).

Una caratteristica importante dei vettori adenoassociati consiste nel fatto che mancando di tutti i geni virali, non evocano una risposta citotossica mediata da linfociti T. Tuttavia una risposta umorale alle proteine del capsido rimane un ostacolo alla somministrazione ripetuta di questo tipo di vettore. La risomministrazione nel topo è possibile solamente mediante immunosoppressione (Halbert et al., 1998) o mediante l'uso di differenti sierotipi (Halbert et al., 1997).

Gli adeno-associati di sierotipo 2 (AAV-2) sono stati i primi sviluppati per il trasferimento genico a livello polmonare. Dopo la dimostrazione di una correzione funzionale con vettori AAV2-CFTR *in vitro* si è passati allo studio *in vivo* su conigli e primati, nei quali l'mRNA del CFTR è stato rilevato fino a 6 mesi senza effetti collaterali (Afione et al., 1996)

Basandosi su questi studi, trials clinici di fase I e II sono stati condotti in pazienti FC (Flotte et al., 1996) (Wagner et al., 1998). Questi studi, che hanno coinvolto circa 200 individui, hanno confermato l'abilità del AAV2-CFTR nel mediare il trasferimento genico nelle vie aeree, d'altra parte vi sono stati risultati che hanno impedito a questo vettore di essere considerato un buon agente di trasferimento genico per la fibrosi cistica: 1) AAV2 si è dimostrato inefficiente nel transdurre le vie aeree dal lato apicale; 2) La somministrazione ripetuta nel polmone non è possibile a causa della risposta immunitaria.

Sforzi successivi sono stati rivolti alla ricerca di nuovi capsidi per gli AAV, nel tentativo di aumentare l'efficienza di trasferimento e diminuire l'immunogenicità. In particolare AAV5 si è dimostrato più efficiente del sierotipo 2 nel trasdurre le vie aeree *in vivo* (Virella-Lowell et al., 2005).

#### 1.2.4 I vettori lentivirali e le loro applicazione alla terapia genica per la fibrosi cistica

I vettori di trasferimento genico derivati dalla famiglia dei retrovirus, sia onco-retrovirali che lentivirali, rappresentano dei potenziali strumenti applicabili alla terapia genica per il trattamento di malattie ereditarie e acquisite data la loro capacità di infettare differenti compartimenti tissutali e integrare stabilmente il materiale genetico veicolato nel genoma cellulare. Tuttavia i vettori retrovirali hanno delle limitazioni: necessitano dell'attiva replicazione cellulare per l'infezione, il materiale genetico che può essere impacchettato nei virioni nascenti è di dimensioni ridotte (6 Kb), inoltre i trascritti primari mostrano una relativa instabilità. I vettori derivati da lentivirus mostrano significativi vantaggi rispetto agli onco-retrovirus. Sono in grado di trasdurre cellule scarsamente proliferanti, e questa capacità, considerando anche il basso indice mitotico delle cellule epiteliali delle vie aeree fa dei lentivirus un vettore ideale per la terapia genica a livello polmonare. Inoltre, i vettori lentivirali hanno una capacità di oltre 10 Kb, caratteristica che li rende in grado di trasportare le sequenze codificanti del CFTR e le sequenze regolatrici necessarie per l'espressione nelle cellule eucariotiche.

Benché siano disponibili vettori lentivirali derivanti da molte specie diverse, quelli maggiormente impiegati nelle applicazioni CF si basano su HIV-1, sul virus dell'immunodeficienza felina (FIV) e il virus dell'anemia infettiva equina (EIAV) (Delenda, 2004).

I lentivirus appartengono alla famiglia dei retrovirus, e pur condividendone alcune caratteristiche, possiedono un genoma molto più complesso.

Il genoma virale è costituito da due molecole di acido ribonucleico (RNA) a singolo filamento, ha una dimensione di circa 10 kb, e codifica per geni essenziali quali *Gag* (che codifica per le proteine del nucleocapside), *Pro* (che codifica per una proteasi), *Pol* (che codifica per la trascrittasi inversa, l'integrasi e l'RNasi H) ed *Env* (che codifica per le proteine dell'envelope), oltre ad una regione  $\psi$  (*psi*), la cui funzione è quella di segnale per l'impacchettamento del genoma nelle particelle virali.

Nel provirus a ciascuna estremità del genoma lentivirale vi sono le LTR (*Long Terminal Repeats*) che contengono le regioni U5, R e U3. La regione LTR al 5' regola la trascrizione virale tramite la polimerasi cellulare II, mentre l'LTR al 3' ha funzione di poliadenilazione. Nel genoma sono compresi anche due regolatori essenziali (*Tat*, ovvero proteina transattivatrice e *Rev*) e molti geni accessori (*Nef*, *Vpu*, *Vif* e *Vpr*) coinvolti nella modulazione dell'espressione genica virale, nell'assemblaggio delle particelle virali e nelle alterazioni strutturali e funzionali delle cellule infettate (Follenzi and Naldini, 2002).

Il ciclo virale può essere essenzialmente diviso in due fasi: infezione e replicazione. L'infezione consiste nell'introduzione dell'RNA virale nella cellula, nella sua retrotrascrizione in DNA a doppio filamento e nella sua integrazione nel genoma cellulare. Successivamente, la trascrizione del virus e la traduzione delle diverse proteine virali permettono la creazione di nuove particelle virali che, dotate di envelope, vengono rilasciate dalle cellule.

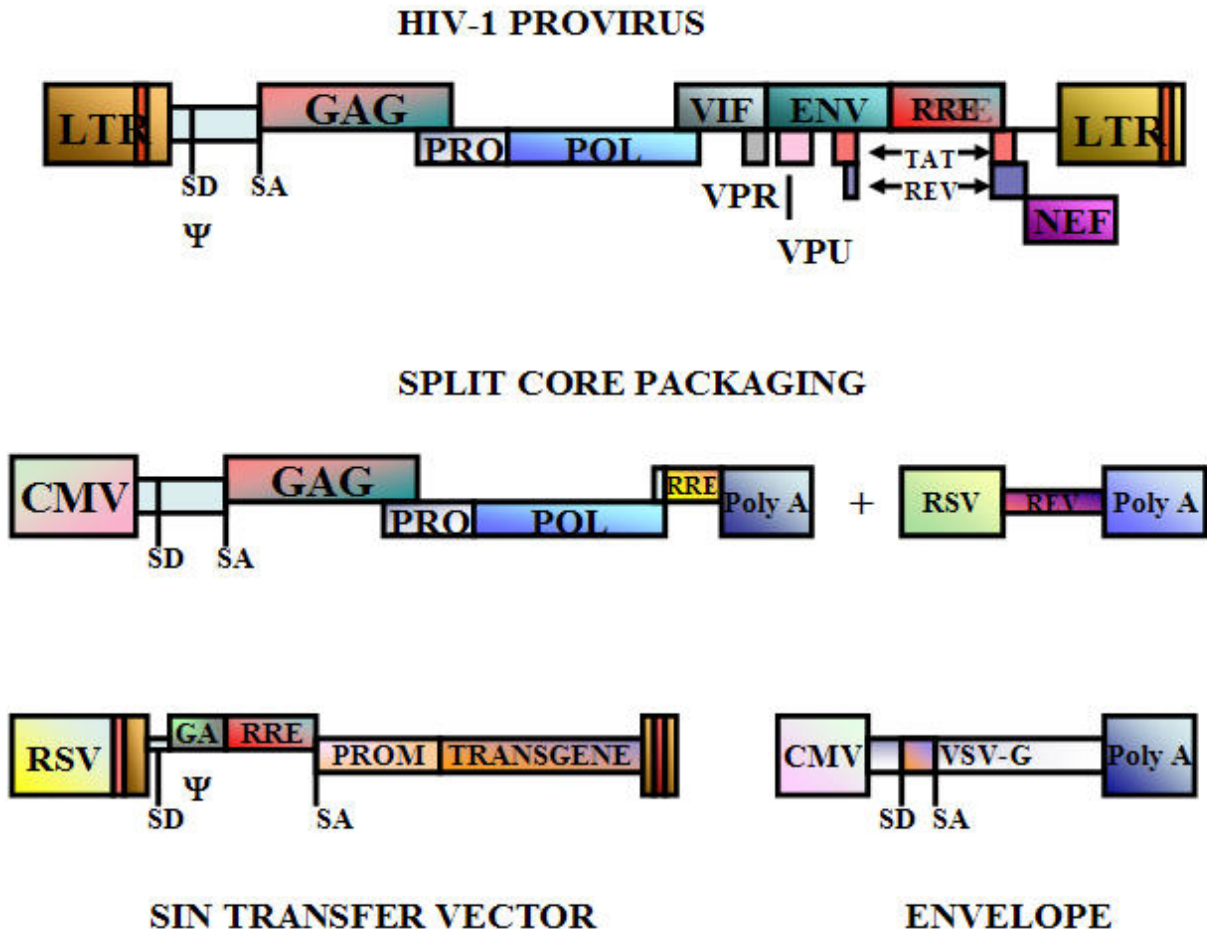
L'integrazione del virus nel genoma cellulare è una proprietà fondamentale ai fini dell'ottenimento di un'espressione stabile e prolungata del gene terapeutico.

Lo sviluppo del vettore lentivirale quale agente di trasferimento genico si basa su modifiche mirate al genoma del lentivirus nativo. Al momento il sistema è costituito da quattro componenti fondamentali: 1) gli elementi di packaging, (derivati dal gene *Gag-Pol*) ovvero proteine strutturali e enzimi responsabili della formazione delle particelle virali; 2) il gene *Rev*, regolatore post-trascrizionale dell'espressione di *Gag* e *Pol* nonché responsabile dell'uscita dal nucleo degli RNA virali; 3) il vettore contenente il transgene; 4) il vettore esprime proteine eterologhe dell'envelope (per esempio VSV-G) che conferiscono un ampio tropismo al vettore e consentono l'ottenimento di alti titoli del vettore ( $>10^8$  TU/ml) in seguito ad ultracentrifugazione. La Figura 4 mostra schematicamente il provirus wild-type di HIV-1 ed i quattro costrutti plasmidici usati per il trasferimento genico mediato da vettori HIV-1-derivati di terza generazione.

L'assemblaggio di particelle virali avviene tramite transfezione transiente delle 293T, una linea cellulare cosiddetta di packaging. Varie modifiche sono state portate al virus nativo per aumentare sia l'efficienza ma soprattutto la biosicurezza del vettore. I geni virali patogeni *in vivo* (*vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*) sono stati rimossi senza effetto negativo sul sistema (Zufferey et al., 1997).

L'attività trascrizionale dell'LTR al 5' è stata annullata sostituendo la regione U3 con un promotore forte (per esempio il promotore derivato da CMV), dando luogo al cosiddetto ***Self inactivating vector*** (SIN vector) (Zufferey et al., 1998).

La biosicurezza è stata ulteriormente aumentata separando *Rev* su un altro plasmide (sistema lentivirale di terza generazione). *Rev* interagisce con la regione RRE e consente l'uscita dal nucleo degli mRNA codificanti per *Gag* e *Pol* e del transfer vector (Gasmi et al., 1999).



**Figura 4.** Rappresentazione schematizzata del genoma virale e dei quattro plasmidi necessari per la costruzione del vettore di terza generazione.

Alcune sequenze agenti *in cis* sono state aggiunte per aumentare l'efficienza di questi vettori lentivirali. Per esempio, l'inserzione di un elemento di regolazione post-trascrizionale dal genoma del virus dell'epatite di marmotta (WPRE) o umano (HPRE) al 3' del vettore transfer agisce a livello post-trascrizionale promuovendo l'uscita dal nucleo dei trascritti ed incrementando l'efficienza di poliadenilazione del trascritto nascente (Zufferey et al., 1999).

È stato inoltre dimostrato che l'introduzione della sequenza di polipurine localizzata in posizione centrale (cPPT) facilita la traslocazione nucleare del complesso di pre-integrazione e porta all'aumento della percentuale di cellule tradotte (Follenzi et al., 2000).

L'introduzione di un elemento di controllo post-trascrizionale (PCE) che facilita la traduzione degli mRNA nonché l'introduzione di un enhancer derivato da CMV (CMV IE), aumentano ulteriormente l'espressione del transgene (Yilmaz et al., 2006).

La maggior parte degli studi sul trasferimento genico nelle vie aeree sono stati condotti utilizzando vettori lentivirali pseudotipizzati con la proteina G del virus della stomatite vescicolare (VSV-G). Vettori lentivirali di prima generazione pseudotipizzati con VSV-G ed esprimenti il CFTR wild-type sono stati in grado di trasdurre efficientemente xenotrapianti bronchiali scarsamente differenziati ottenendo un'elevata espressione del transgene, in grado di correggere il difetto CF (Goldman et al., 1997). Tuttavia il trasferimento genico è risultato meno efficiente nel trasdurre un epitelio maggiormente differenziato.

In modelli di xenotrapianti tracheali fetali umani l'espressione di un transgene reporter (LacZ) è stata osservata nel 99% delle cellule epiteliali e delle ghiandole submucosali, e a oltre 9 mesi dalla somministrazione suggerendo la trasduzione di un compartimento di cellule progenitrici (Lim et al., 2003).

Un importante ostacolo all'efficienza di trasferimento genico dell'epitelio respiratorio mediata da vettori lentivirali è la scarsità di recettori e co-recettori a livello apicale per i lentivirus.

Per questo sono stati creati modelli di danno tessutale *in vivo*, basandosi sul rationale che danneggiando l'epitelio si possono creare degli accessi alla superficie baso-laterale dell'epitelio, nonché alle cellule delle ghiandole sottomucose ed alle cellule staminali respiratorie.

A questo proposito, uno studio di trasduzione di cellule epiteliali delle vie aeree, sia *in vitro* su un modello polarizzato, sia *in vivo* a livello dell'epitelio nasale e della tracheae di topo, mediante un vettore VSV-G HIV, ha dimostrato come *in vitro*, i livelli di espressione del transgene siano risultati minimi quando il vettore veniva applicato a livello apicale, aumentando invece di circa 30 volte se applicato a livello basolaterale. *In vivo*, invece, il trasferimento genico è risultato efficiente solo se preceduto dal danneggiamento dell'epitelio nasale e tracheale in seguito a inalazione di anidride solforosa (SO<sub>2</sub>) (Johnson et al., 2000).

Mediante previa somministrazione del detergente lisofosfatidilcolina (LPC) nelle vie aeree murine, uno studio ha dimostrato che la trasduzione con un vettore VSV-G HIV recante il gene CFTR determina un parziale recupero della funzione elettrofisiologia dell'epitelio nasale di topi CF per almeno 110 giorni (Limberis et al., 2002).

Un vettore derivato da FIV pseudotipizzato con VSV-G è stato testato in una formulazione con chelanti del calcio per favorire l'accesso ai recettori basolaterali e quindi aumentare l'efficienza del *delivery* in cellule epiteliali polarizzate di coniglio. In cellule CF, i ricercatori hanno osservato la correzione del difetto del canale del Cl<sup>-</sup> per tutta l'intera durata della cultura di cellule respiratorie umane polarizzate (12 mesi). Inoltre, in seguito a somministrazione nelle vie aeree di coniglio,

l'espressione persisteva per almeno 6 settimane, suggerendo anche in questo studio la trasduzione delle cellule progenitrici (Wang et al., 1999).

Una valida alternativa al danno tissutale è la ricerca di molecole alternative per pseudotipizzare i vettori lentivirali e renderli così in grado di trasdurre le cellule epiteliali respiratori dal lato basolaterale.. Tra le possibili alternative valutate, una delle più promettenti sembra essere la proteina dell'envelope del virus Ebola (appartenente alla famiglia dei Filovirus) (Kobinger et al., 2001). Vettori del tipo HIV-EboZ si sono dimostrati capaci di trasdurre con elevata efficienza, *in vivo*, le cellule delle ghiandole sottomucose e dell'epitelio che riveste le vie aeree di conduzione (Medina et al., 2003).

Studi recenti hanno inoltre esplorato la capacità dei vettori lentivirali di trasdurre l'epitelio respiratorio fetale direttamente in utero. L'iniezione di lentivirus pseudotipizzato con VSV-G nel parenchima polmonare fetale di scimmia rhesus ha portato all'espressione del transgene reporter nel polmone, sia nei feti che nei cuccioli a tre mesi d'età (Tarantal et al., 2005).

### **1.2.5 Target cellulari nella terapia genica della fibrosi cistica**

L'epitelio respiratorio rappresenta il target principale della terapia genica della fibrosi cistica. Per ottenere i migliori risultati occorrerebbe essere in grado di trasferire il CFTR solo alle cellule che normalmente lo esprimono. L'espressione del CFTR è infatti altamente regolata nel polmone. Le cellule ciliate esprimono bassi livelli di CFTR mentre ghiandole submucosali e una sottopopolazione di cellule non ciliate con funzioni ancora sconosciute esprimono alti livelli di proteina ed mRNA (Engelhardt et al., 1992) risultando così essere importanti bersagli per la terapia genica. Tuttavia tale popolazione cellulare risulta poco accessibile tramite approcci di *delivery* dal lume delle vie aeree.

Il target ideale per la terapia genica è rappresentato comunque dalle cellule staminali, che una volta corrette stabilmente garantirebbero in maniera persistente l'effetto terapeutico. Gli approcci per il "gene targeting" delle cellule staminali respiratorie sono essenzialmente due. Il primo consiste nel targeting delle cellule staminali respiratorie in utero che permette la



correzione del difetto in quelle regioni del polmone non accessibili dal lume delle vie respiratorie adulte (ad esempio le ghiandole sottomucose) (Boyle et al., 2001).

Il secondo consiste nel trasferimento genico nelle cellule staminali del polmone adulto. Nelle vie respiratorie murine, il tipo cellulare predominante sono le cellule di Clara e le cellule ciliate, con minore abbondanza di cellule basali nelle vie respiratorie prossimali. Solo recentemente, è stato dimostrato che le cellule staminali delle vie respiratorie murine sono rappresentate da una sotto popolazione delle cellule di Clara (Bishop, 2004).

Nell'uomo, i tipi cellulari predominanti nelle vie respiratorie prossimali comprendono cellule basali, cellule colonnari e cellule ciliate mentre le vie respiratorie distali hanno una composizione cellulare simile a quella murina con una predominanza di cellule ciliate e di Clara. Numerosi studi hanno permesso di identificare cellule progenitrici con capacità limitate o pluripotenti in grado di dare origine a cellule con fenotipo epiteliale. Una popolazione di cellule progenitrici è rappresentata da cellule con fenotipo simile a cellule basali. Queste ultime sono in grado di differenziarsi in cellule epitaliali e ghiandole sottomucose (Filali et al., 2002). E' stato inoltre dimostrato che le cellule staminali e progenitrici delle vie respiratorie prossimali risiedono in nicchie selettive protette dall'ambiente esterno (Filali et al., 2002).

Poiché le nicchie in cui sono presenti le cellule staminali/progenitrici del polmone adulto sono ancora oggi poco comprese, ad oggi una terapia genica mirata ad esse non è fattibile. Si sta indagando se un apporto di cellule staminali pluripotenti, quali quelle derivate da midollo osseo, possa contribuire a revertire il difetto genico della FC trasferendo il gene selvaggio CFTR ed indovandosi nella nicchia staminale adulta (Bruscia et al., 2006); (Loi et al., 2006).

### **1.2.6 Barriere extra- e intracellulari al trasferimento genico nei polmoni**

L'epitelio respiratorio presenta una particolare sfida per i vettori di trasferimento genico, dal momento che una delle funzioni principali delle vie aeree superiori è quella di eliminare particelle estranee. L'agente di trasferimento genico si trova quindi a dover superare una complessa serie di barriere, sia fisiche che immunologiche, evolute dal sistema respiratorio, prima di raggiungere il bersaglio (Ferrari et al., 2002). Tra le barriere fisiche lo strato di muco che copre l'epitelio respiratorio ha la capacità di intrappolare particelle estranee e rimuoverle tramite meccanismi di clearance, risultando così un ostacolo per il vettore terapeutico. L'intensa infiammazione e il denso strato di muco del polmone CF rappresentano inoltre dei grossi ostacoli che riducono l'efficienza (in termini di tempo e concentrazione del vettore sulle cellule target) con cui i vettori virali raggiungono l'epitelio e che possono amplificare la risposta immunitaria conseguente alla

somministrazione del vettore. Le vie aeree dei pazienti CF sono caratterizzate infatti dalla presenza di secrezioni purulente contenenti actina, DNA dei neutrofili, proteine del siero e prodotti infiammatori. È stato dimostrato, *in vitro*, che lo sputo di pazienti CF, a differenza di quello proveniente da paziente sano, è in grado di bloccare e/o inattivare vettori adenovirali ricombinanti, vettori adeno-associati e vettori non virali (complessi liposoma/DNA) (Driskell and Engelhardt, 2003). Infine il muco degli individui FC contiene elevati livelli di una classe di proteine, le defensine (human defensin proteins, HNP), secrete dai neutrofili presenti in gran quantità nelle vie respiratorie. E' stato dimostrato che le HNP inibiscono in vitro l'infezione di linee cellulari sia da parte di adenovirus che da parte di vettori adeno-associati (Bastian and Schafer, 2001).

Il pre-trattamento con mucolitici o con anticolinergici quali il glicopirrolato può in parte aiutare a superare l'ostacolo. Una ulteriore barriera al trasferimento genico è costituita dal glicocalice, costituito da glicoproteine, glicolipidi e proteoglicani; è stato dimostrato che il trattamento con neuramminidasi aumenta la disponibilità delle cellule polarizzate alla trasduzione tramite adenovirus o adenoassociati.

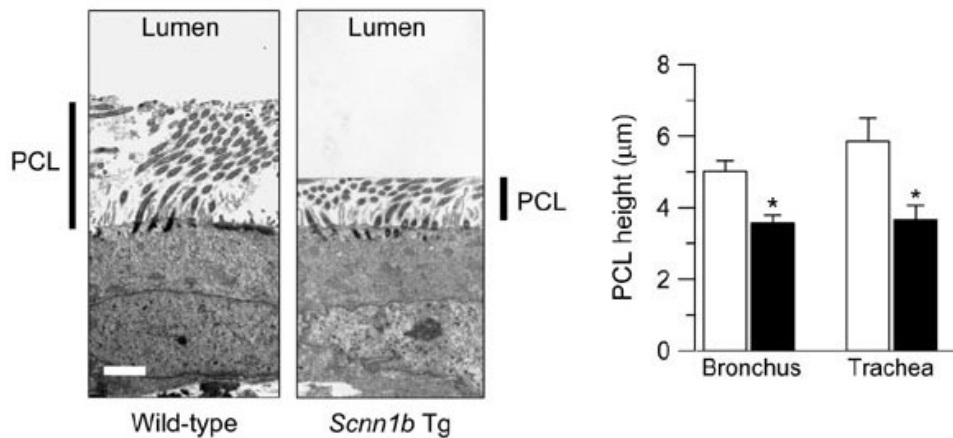
L'organizzazione altamente polarizzata dell'epitelio delle vie aeree rappresenta un ulteriore barriera per molti vettori impiegati in terapia genica. La porzione apicale dell'epitelio delle vie aeree è, infatti, poco suscettibile all'infezione virale, essendo poco ricca di recettori e co-recettori, necessari per l'attacco del virus e presenti invece a livello baso-laterale. L'uso di detergenti salini ipotonici o agenti chelanti cationici come l'EGTA per rompere transientemente le *tight junctions* rappresentano alcune delle strategie sviluppate per rendere maggiormente accessibili i recettori a livello baso-laterale e quindi aumentare l'efficienza di trasduzione delle cellule epiteliali (Driskell and Engelhardt, 2003).

### **1.2.6 Approcci alternativi di terapia genica : L'ENaC come nuovo target**

Negli ultimi anni molta attenzione è stata rivolta al ruolo del canale ENaC nella patologia della fibrosi cistica.

La perdita dell'inibizione del canale ad opera di CFTR risulta nell'aumento dell'assorbimento di sodio e acqua, contribuendo alla disidratazione del muco. Un'importante evidenza del ruolo dell'ENaC nella patogenesi della fibrosi cistica è stata ottenuta dimostrando che topi transgenici che sovraesprimono il canale mostrano un fenotipo CF a livello respiratorio, con un assottigliamento del liquido periciliare sia a livello tracheale che bronchiale, una aumentata concentrazione di muco, e rallentato trasporto del muco stesso. Questo aspetto causa un'importante patologia a livello

polmonare, con ridotta clearance mucociliare e infiammazione mediata da neutrofili (Mall et al., 2004).



**Figura 5.** Effetto dell'overespressione del gene Scnn1B nei topi sull'altezza del liquido periciliare (PCL) (Mall et al. 2004) .

Diverse osservazioni suggeriscono che la down-regolazione dell'espressione dell'ENaC determini la ricostituzione dello strato di liquido periciliare, come risultato della ri-idratazione del muco e dell'incremento della clearance ciliare nel polmone. L'impiego dell'amiloride (un diuretico bloccante il canale del sodio) in studi clinici ha dimostrato che la somministrazione acuta di questa molecola aerosolizzata stimola la clearance mucociliare in pazienti CF (Kohler et al., 1986) , ma, a causa della sua breve emivita e degli effetti collaterali associati, non si sono riscontrati effetti benefici significativi (Pons et al., 2000).

### 1.2.7 La tecnica dell'RNA interferenza per silenziare specificamente l'ENaC

Una strategia alternativa può essere quella di utilizzare molecole di "RNA interferenza" per silenziare specificamente l'espressione del canale. In particolare, questo meccanismo, originariamente scoperto nelle piante e in organismi inferiori, è un ancestrale meccanismo di difesa contro virus e trasposoni. Il sistema si basa su piccole molecole di RNA che possono esistere nella forma a doppio filamento o nella forma a forcina ("hairpin"). In entrambi i casi queste molecole vengono processate da un enzima specifico detto DICER, che produce frammenti di 19-25 nucleotidi di RNA a doppio filamento. Dopodichè il complesso RISC associa i due filamenti, li

separa e veicola il filamento antisenso sul gene target. Il silenziamento genico può avvenire per degradazione dell'mRNA target o per blocco della traduzione (Figura 6).

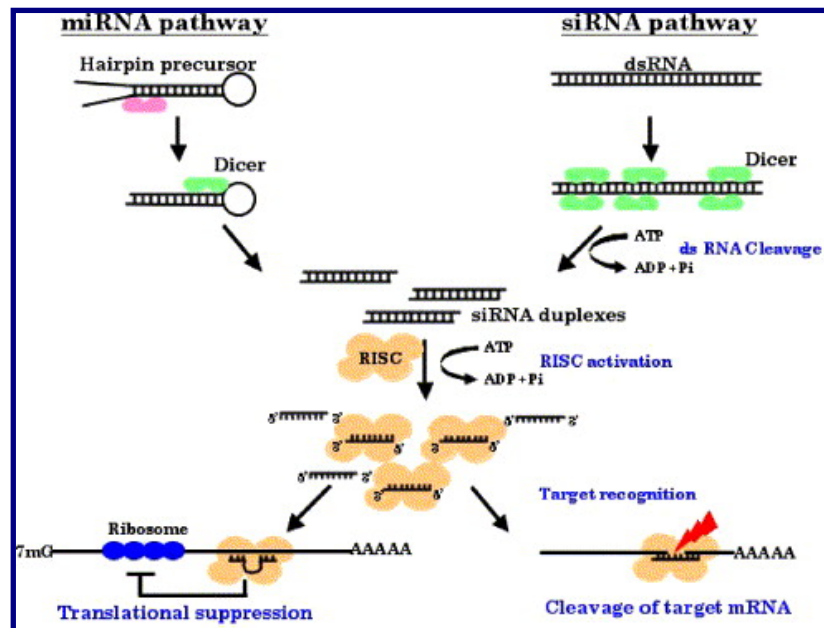


Fig. 6 Meccanismo dell'RNA interference

Recenti studi descrivono l'uso di vettori virali per veicolare cassette di RNA interferenza nelle cellule di mammifero nonché in topi transgenici e silenziare geni in maniera specifica (149- 151 art libro).

Combinando l'elevata specificità delle cassette nel silenziare i geni con la capacità della persistenza dell'informazione genica veicolata dai lentivirus, si è ottenuto un ottimo agente terapeutico per varie patologie neurodegenerative (Raoul et al., 2006), tra cui la sclerosi laterale amiotrofica, nonché per i tumori; molti dei geni coinvolti nella progressione tumorale possono essere silenziati specificamente da cassette di RNA interferenza veicolate da lentivirus (Ryther et al., 2005; Scherr et al., 2005).

Inoltre tale tecnica è in grado di silenziare l'espressione di geni importanti per le infezioni virali sia acute che croniche, incluse le infezioni da HIV-1 (Ketzinel-Gilad et al., 2006). In particolare, nel caso di HIV-1, sono stati silenziati sia geni necessari alla sua replicazione, sia geni codificanti per proteine che mediano l'entrata del virus nella cellula (Coburn and Cullen, 2002) (Qin et al., 2003).

Recentemente una cassetta di RNA interferenza diretta contro la subunità  $\alpha$ ENaC di ratto veicolata da un plasmide e iniettata con lipofectamina utilizzando l'instillazione tracheale è stata in grado di ridurre l'assorbimento del fluido polmonare del 30% (Li and Folkesson, 2006).

Utilizzare i lentivirus come agenti di trasferimento genico per silenziare in maniera specifica il canale del sodio ENaC, potrebbe essere una valida strategia per ottenere effetti benefici a lungo termine nei polmoni FC.

## ***2. SCOPO DELLA TESI***

## **2. SCOPO DELLA TESI**

Una delle possibili strategie terapeutiche della FC si basa sulla terapia genica: quest'ultima ha come fine quello di fornire una copia normale del gene CFTR ai tessuti interessati dalla patologia tramite utilizzo di differenti vettori di trasferimento genico. I vettori utilizzati appartengono alla categoria dei vettori non virali e a quella dei vettori virali. Nei pazienti FC sono stati condotti protocolli di fase I e II per valutare l'efficacia degli adenovirus e dei virus adenoassociati come agenti di trasferimento genico, e tali studi hanno dimostrato la possibilità di trasferire il CFTR wild type nell'epitelio respiratorio, ma con bassa efficienza e per un limitato periodo di tempo. Inoltre la risposta immunitaria limita l'efficacia delle somministrazioni successive. L'utilizzo dei lentivirus come vettori di trasferimento genico consente di ovviare al problema della persistenza dell'espressione nel tempo. Questi vettori, derivati dall'HIV-1, integrano il loro materiale genetico nel genoma della cellula ospite, consentendo un'espressione prolungata del gene terapeutico, inoltre sono in grado di infettare cellule quiescenti o a basso indice mitotico come quelle dell'epitelio respiratorio.

Lo scopo primario del progetto ha riguardato la realizzazione di un lentivirus che funzioni come agente di trasferimento genico, veicolando o il transgene codificante per la proteina CFTR wild type o degli RNA interferenti per silenziare ENaC, all'interno di cellule difettive, in modo da ristabilirne il corretto funzionamento.

L'analisi del CFTR e dell'ENaC a livello cellulare richiede apparecchi sofisticati di elettrofisiologia non alla portata di tutti i laboratori. Un altro scopo del progetto è stato quello di mettere a punto ed ottimizzare dei metodi facilmente eseguibili ed opportunamente sensibili e specifici che permettessero la valutazione della funzione del CFTR e dell'ENaC in modelli cellulari in vitro.

A tal proposito è stata utilizzata la linea H441, che fornisce un valido modello cellulare per lo studio dell'ENaC; su tali cellule, cresciute in particolari condizioni, è possibile monitorare l'attività del canale con specifici saggi funzionali.

### ***3. MATERIALI E METODI***



### 3.1 PROCEDURE DI CLONAGGIO

#### 3.1.1 Clonaggio della porzione N-Terminale (1-633aa) del CFTR-MYC in un vettore lentivirale.

Il clonaggio della porzione N-Terminale del CFTR, con aggiunta di un tag all'estremità C-Terminale in un plasmide lentivirale ha comportato diversi sub-clonaggi. In particolare i plasmidi di partenza utilizzati nel clonaggio sono riportati nella tabella seguente :

Nome plasmide	Lunghezza	Antibiotico Resistenza	Caratteristiche
pBSCmyc2	3074 bp	Ampicillina	Contiene la sequenza del C-Myc
pBQ6.2	9160 bp	Ampicillina	Contiene la sequenza completa del CFTR
pRRL.CMV.MCS.MM	6730 bp	Ampicillina	SIN Transfer vector Lentivirale

Il primo passo è stato quello di ottenere una fusione tra il CFTR e il c-Myc. Questo passaggio ha comportato l'amplificazione tramite PCR delle 630 paia di basi C-terminali del CFTR utilizzando dei primer contenenti i siti di restrizione per gli enzimi NheI e ClaI , in modo poi da inserire il frammento di PCR ottenuto nel plasmide pBSCmyc2 tagliato con gli stessi due enzimi di restrizione. Il sito NheI è stato aggiunto esternamente alla sequenza del CFTR, ovvero è in una porzione del primer che non si appaia alla sequenza originale, mentre il sito ClaI è presente sulla sequenza del CFTR.

Primer utilizzati : (Forward & Reverse)	Temperatura di Melting
5' GAATCCAGATCGATGGTGT 3'	58°C
5' GTGGCTAGCAAGCCTTGTATCTT 3'	72°C

Per la reazione di PCR ho utilizzato le seguenti quantità di reagenti:

	Quantità di partenza / Concentrazione iniziale	µl utilizzati
DNA stampo (PBQ 6.2)	100 ng	3
dNTPs	10mM	0,5
primer forward	20 µM	0,5
primer reverse	20 µM	0,5
Taq Polymerase	5U / µl	0,2
Buffer Polymerase	10 X	2,5
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1
H <sub>2</sub> O		16,8

Gli steps utilizzati per la PCR sono i seguenti:

- 1) 94° C 2'
- 2) 94° C 15''
- 3) 58° C 30''
- 4) 72° C 1'
- 5) 4° C ∞

Gli steps dal 2 al 4 vengono ripetuti 25 volte.

2,5 µl del prodotto di PCR sono stati poi caricati su gel di agarosio al 2% per valutare la corretta amplificazione del frammento. La banda ottenuta è stata delle dimensioni di quella attesa, ovvero 670 bp. A questo punto l'intero prodotto di PCR è stato caricato su gel di agarosio e la banda di amplificazione è stata purificata tramite kit (v. *QIAquick® Gel extraction kit*, Qiagen).

Il prodotto di PCR è stato successivamente digerito con gli enzimi di restrizione NheI e ClaI seguendo il seguente protocollo:

Prodotto di PCR	30 µl
ClaI (Promega, 10u/µl)	1 µl
NheI (Promega 10u/µl)	1 µl
Buffer Multi-Core (Promega)	10 µl
BSA 1mg/ml (Promega)	10 µl
H <sub>2</sub> O	48 µl

La miscela è stata incubata a 37°C overnight. Successivamente si è proceduto ad inattivare gli enzimi di restrizione incubando a 65°C per 20 minuti. Dopodichè il DNA è stato precipitato aggiungendo 1/10 di volume di Sodio Acetato e 2 volumi di Etanolo, incubando a -80°C per 30 minuti, centrifugando a 13,000 rpm per 15 minuti a 4°C , lavando il pellet con Etanolo 70% e infine risospendendo il pellet in 20 µl di H<sub>2</sub>O.

Il plasmide pBSMYC2 è stato invece digerito con gli stessi enzimi di restrizione:

PBSMYC2 (0,6 µg/µl)	50 µl
NheI	1 µl
ClaI	1 µl
Buffer MC	1 µl
BSA	1 µl
H <sub>2</sub> O	46 µl

La miscela è stata incubata a 37°C per 3 ore. Il DNA è stato poi interamente caricato su gel e la banda di interesse è stata purificata col kit QIAquick<sup>®</sup> Gel extraction kit, Qiagen, ottenendo infine il DNA purificato in 60 µl di H<sub>2</sub>O ad una concentrazione di 10 ng/ µl.

### **Ligation vettore-inserito**

Dopodichè si è proceduto alla ligation tra vettore e inserto in un rapporto di 1:3. Per calcolare la quantità di inserto da utilizzare rispetto alla quantità di vettore è stata utilizzata la seguente formula:

$$\frac{\text{ng vettore} \times \text{Kb inserto} \times 3}{\text{Kb vettore}} = \text{ng inserto da utilizzare}$$

e dunque, partendo da 50 ng vettore ho utilizzato 35 ng di inserto:

	<i>Ligation</i>	<i>Controllo negativo</i>
<i>Vettore NheI / ClaI</i>	5 µl pari a 50 ng	5 µl pari a 50 ng
<i>Inserito NheI / ClaI</i>	3,5 µl pari a 35 ng	-
<i>Buffer ligasi Neb</i>	1 µl	1 µl
<i>T4 Ligasi</i>	0,5 µl	0,5 µl
<i>H<sub>2</sub>O</i>	-	3,5 µl

La miscela di reazione viene incubata a 16°C overnight.

Il giorno successivo le miscele di ligation vengono utilizzate per trasformare i batteri competenti, in accordo col protocollo indicato dal kit ( v. *One shot<sup>®</sup> TOP 10 competent cells (Invitrogen)*).

I batteri trasformati vengono successivamente piastrati su piastre di LB agar con 50 µg /µl di Ampicillina e tali piastre vengono incubate overnight a 37°C.

### Screening delle colonie positive

Lo screening delle colonie positive viene effettuato dopo aver prelevato le singole colonie cresciute overnight su piastra e fatte crescere in 3-4 ml di LB contenente 50 µg /µl di Ampicillina per 6-8 ore circa estraendo il DNA plasmidico con uno specifico kit (GenElute<sup>™</sup> Five-Minute Plasmid Miniprep Kit, Sigma v. *Estrazione DNA plasmidico su piccola scala*) . Il DNA recuperato è stato successivamente digerito con gli enzimi di restrizione NheI / ClaI e caricato su gel di agarosio per selezionare le colonie contenenti il plasmide in cui è presente l'inserto. Tale plasmide è stato denominato pBS.CFTRcTerm.MYC2 ed è stato successivamente sottoposto a sequenziamento per verificare che l'inserto avesse la sequenza corretta e fosse in frame col MYC.

Il secondo passo è stato quello di inserire la porzione C-Term del CFTR-MYC nel vettore virale pRRL.CMV.MCS.MM. Per tale clonaggio il vettore è stato digerito con gli enzimi di restrizione SalI / NheI , mentre l'inserto è stato ottenuto digerendo il vettore pBS.CFTRcTerm.MYC2 con gli enzimi SalI / XbaI. La ligation vettore-inserto è possibile poiché i tagli con gli enzimi di restrizione NheI e XbaI generano estremità compatibili.

pRRL.CMV.MCS.MM (1 µg/µl)	10 µl
SalI (Promega, 10u/µl)	1 µl
NheI (Promega 10u/µl)	1 µl
Buffer B (Promega)	10 µl
BSA 1mg/ml (Promega)	10 µl
H <sub>2</sub> O	48 µl

pBS.CFTRcTerm.MYC2 (1 µg/µl)	10 µl
SalI (Promega, 10u/µl)	1 µl
XbaI (Promega 10u/µl)	1 µl
Buffer D (Promega)	10 µl
BSA 1mg/ml (Promega)	10 µl
H <sub>2</sub> O	48 µl

Le miscele sono state incubate a 37°C per 3 ore e successivamente caricate su gel e le bande di interesse (6730 bp per il vettore, 819 bp per l'inserto) sono state purificate col kit QIAquick® Gel extraction kit, Qiagen. Anche in questo caso si è poi proceduto analogamente al clonaggio precedente con: 1) la successiva ligation del vettore e dell'inserto in accordo con la formula e il protocollo precedentemente descritti; 2) la trasformazione dei batteri competenti con il prodotto di ligation; 3) lo screening delle colonie positive. Infine il nuovo plasmide ottenuto è stato denominato pRRL.CFTRcTerm.MYC2.

Il terzo passo è stato quello di excidere la regione di fusione fra il CFTR e il C-MYC dal plasmide pRRL.CFTRcTerm.MYC2 e sostituirla alla regione C-terminale del CFTR presente sul plasmide pBQ6.2. Per far questo vettore e inserto sono stati ottenuti tagliando rispettivamente il plasmide pBQ6.2 e il plasmide pRRL.CFTRcTerm.MYC2, entrambi con gli enzimi di restrizione NcoI e XhoI. Le bande (in bp) che si ottengono tagliando con tali enzimi sono :

pRRL.CFTRcTerm.MYC2	pBQ6.2
<b>5500</b>	<b>7000</b>
<b>1342</b>	1300
<b>597</b>	800

Le bande da recuperare tramite QIAquick® Gel extraction kit sono quelle a 7000 bp per il vettore e a 597 per l'inserto. Per la procedura di clonaggio si è proceduto seguendo i passaggi come nei clonaggi precedenti. Il nuovo plasmide ottenuto è stato denominato **pBQ.CFTR.MYC**. Tale plasmide contiene l'intera open reading frame del CFTR fuso con un tag MYC all'estremità C-Terminale.

Parallelamente si è proceduto a realizzare un vettore virale che contenesse la sequenza corrispondente alla porzione N-terminale del CFTR, basandosi sull'evidenza che il frammento del CFTR 1-633 è in grado di transcomplementare la  $\Delta F508$ . Tale frammento, associandosi alla proteina mutata, fornirebbe *in trans* quei segnali necessari a evitare la degradazione a livello del reticolo endoplasmatico con la formazione di una proteina matura, in grado di raggiungere la membrana cellulare e correttamente funzionante. Per ottenere questo plasmide è stato necessario prima tagliare il pBQ6.2 con gli enzimi di restrizione SmaI/BamHI, recuperare la banda da 1430 bp come indicato nella strategia, e clonarla nel plasmide pRRL.CFTRcTerm.MYC2, ottenendo un intermedio di clonaggio; tale intermedio è stato poi successivamente tagliato con gli enzimi di restrizione BamHI / NheI ed è stato inserito un prodotto di PCR corrispondente alle basi del CFTR che vanno da 1430 a 1960 contenente i siti BamHI / NheI, ottenendo così il plasmide virale contenente la sequenza N-terminale del CFTR (basi dalla 1 alla 1899) fusa al C-terminale con il tag C-MYC. Tale plasmide è stato denominato **pRRL.CFTR1-633C-MYC**. Per la PCR sono stati utilizzati i seguenti primer:

Primer utilizzati : (Forward & Reverse)	Temperatura di Melting
5'GATAGAAAGAGGACAGTTGTTG 3'	62°C
5'GTGGCTAGCGAGTTCTGAAAATGT 3'	70°C

Per la reazione di PCR ho utilizzato le seguenti quantità di reagenti:

	<i>Quantità di partenza / Concentrazione iniziale</i>	<i>µl utilizzati</i>
<i>DNA stampo (PBQ 6.2)</i>	100 ng	3
<i>dNTPs</i>	10mM	0,5
<i>primer forward</i>	20 µM	0,5
<i>primer reverse</i>	20 µM	0,5
<i>Taq Polymerase</i>	5U / µl	0,2
<i>Buffer Polymerase</i>	10 X	2,5
<i>MgCl<sub>2</sub></i>	50 mM	1
<i>H<sub>2</sub>O</i>		16,8

Gli steps utilizzati per la PCR sono i seguenti:

- 1) 94° C 2'
- 2) 94° C 15''
- 3) 60° C 30''
- 4) 72° C 1'
- 5) 72° C 7'
- 5) 4° C ∞

Gli steps dal 2 al 4 vengono ripetuti 25 volte.

2,5 µl del prodotto di PCR sono stati poi caricati su gel di agarosio al 2% per valutare la corretta amplificazione del frammento. La banda ottenuta è stata delle dimensioni di quella attesa, ovvero 530 bp. A questo punto l'intero prodotto di PCR è stato caricato su gel di agarosio e la banda di amplificazione è stata purificata tramite kit (v. *QIAquick® Gel extraction kit, Qiagen*).

Il prodotto di PCR è stato successivamente digerito con gli enzimi di restrizione NheI e BamHI seguendo il seguente protocollo:

Prodotto di PCR	30 µl
BamHI (Promega, 10u/µl)	1 µl
NheI (Promega 10u/µl)	1 µl
Buffer Multi-Core (Promega)	10 µl
BSA 1mg/ml (Promega)	10 µl
H <sub>2</sub> O	48 µl

La miscela è stata incubata a 37°C overnight. Successivamente si è proceduto ad inattivare gli enzimi di restrizione incubando a 65°C per 20 minuti. Dopodichè il DNA è stato precipitato aggiungendo 1/10 di volume di Sodio Acetato e 2 volumi di Etanolo, incubando a -80°C per 30 minuti, centrifugando a 13,000 rpm per 15 minuti a 4°C , lavando il pellet con Etanolo 70% e infine risospesando il pellet in 20 µl di H<sub>2</sub>O.

Il plasmide è stato digerito con gli stessi enzimi di restrizione, la banda di interesse è stata purificata con il kit precedentemente descritto, e il clonaggio è stato completato con i passaggi di ligation, trasformazione della ligation, screening delle colonie batteriche positive e sequenziamento della regione amplificata tramite pcr replicando i passi già elencati in precedenza.

### 3.1.2 Clonaggio della cassetta U1 shRNA α2 in un vettore lentivirale

La cassetta è originariamente contenuta nel plasmide psiUx (gentilmente fornito dal Prof.ssa Fiorentina Ascenzioni, Università La Sapienza, Roma) sotto il promotore U1, un promotore per la polimerasi III, attivo in tutti i tipi cellulari (Michienzi et al., 1998).

La procedura di clonaggio per tale cassetta nel plasmide lentivirale pCCL.PPT.hPGK.ΔNGFR.Wpre gentilmente fornito dal Dott. Luigi Naldini (Tiget, Milano ) prevede che la cassetta (di circa 600 bp) venga inserita sostituendo la cassetta mU6GFPi antisense che è contenuta nel plasmide originale utilizzando i siti di restrizione XbaI / PstI. Per far sì che la cassetta possa essere inserita sfruttando tali siti, è stato necessario un sub-clonaggio della cassetta nel vettore pRRL.CMV.MCS tagliando il plasmide con gli enzimi di restrizione XbaI / SalI e inserendo la cassetta tagliata con XbaI / XhoI (SalI e XhoI hanno estremità compatibili) .

Primo clonaggio:

Reagente	µl
pRRL (3 µg/µl)	5
Buffer D(Promega)	10
BSA(10X)	10
SalI (Promega)	1
XbaI (Promega)	1
H <sub>2</sub> O	73

Reagente	µl
psiUx (1 µg/µl)	15
Buffer D (Promega)	10
BSA (10X)	10
SalI (Promega)	1
XbaI (Promega)	1
H <sub>2</sub> O	63



Le bande corrispondenti al vettore (pRRL ) e inserto (600 bp, dal psiUx) sono state recuperate con la procedura precedentemente descritta, si è quindi proceduto ai passaggi standard di ligation, trasformazione, screening delle colonie positive. Il nuovo plasmide ottenuto è un intermedio di clonaggio ed è stato denominato pRRL $\alpha$ ENaC. Da tale plasmide è possibile estrarre la cassetta tagliando con gli enzimi di restrizione XbaI – PstI .

Secondo clonaggio:

Reagente	$\mu$ l
pRRL $\alpha$ ENaC (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	40
Buffer D(Promega)	10
BSA(10X)	10
PstI (Promega)	3
XbaI (Promega)	1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>36</b>

Reagente	$\mu$ l
pCCL.PPT.hPGK. $\Delta$ NGFR.Wpre (1 $\mu$ g/ $\mu$ l)	15
Buffer D (Promega)	10
BSA (10X)	10
PstI (Promega)	3
XbaI (Promega)	1
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>60</b>

Le bande corrispondenti al vettore sono state recuperate con la procedura precedentemente descritta, si è quindi proceduto ai passaggi standard di ligation, trasformazione, screening delle colonie positive.

Dal plasmide pRRL $\alpha$ ENaC è stata estratta la cassetta anti  $\alpha$ -ENaC ed è stata clonata nel vettore pCCL.PPT.hPGK. $\Delta$ NGFR.Wpre , ottenendo così il plasmide pCCL.U1 $\alpha$ ENaCshRNA.hPGK. $\Delta$ NGFR.Wpre che è stato utilizzato per produrre il relativo lentivirus.

## **3.2 Protocolli dei KIT utilizzati per le procedure di clonaggio**

### **3.2.1 One shot<sup>®</sup> TOP 10 competent cells (Invitrogen).**

Per le procedure di clonaggio e crescita plasmidica è stato utilizzato un ceppo di E. Coli reso già chimicamente competente e commercializzato dalla Invitrogen, denominato One Shot<sup>®</sup> TOP 10. L'efficienza di trasformazione indicata dalla ditta è  $> 10^9$  CFU/ $\mu$ g plasmide superavvolto.

### **3.2.2 Protocollo di Trasformazione**

La trasformazione dei batteri chimicamente competenti forniti dal kit prevede:

- 1) Scongellamento dei batteri in ghiaccio;
- 2) Aggiunta del prodotto di ligation (da 1 a 5  $\mu$ l) (o del DNA plasmidico) ai batteri;
- 3) Incubazione 30 minuti in ghiaccio;
- 4) Shock termico a 42°C per 30 secondi;
- 5) Aggiunta di 250  $\mu$ l di S.O.C. medium pre-riscaldato;
- 6) Crescita batterica in agitazione a 37°C per 1 ora;
- 7) Piastramento (dai 20 ai 200  $\mu$ l) su piastre di LB agar contenenti l'antibiotico relativo;
- 8) Incubazione delle piastre a 37°C overnight;

### **3.2.3 Kit di estrazione da gel (QIAquick<sup>®</sup> Gel extraction kit, Qiagen)**

Il kit è in grado di estrarre e purificare DNA da gel di agarosio in un range che va da 70 bp a 10 kb, prevedendo un primo passaggio di adsorbimento del DNA alla membrana di una colonna in presenza di alte concentrazioni di sali ed un'eluizione dell'acido nucleico tramite acqua o TE. In dettaglio il protocollo prevede:

- 1) Recupero delle bande di interesse dal gel di agarosio tramite bisturi (le bande vengono poste in eppendorf da 1,5 ml)

- 2) Aggiunta di 3 volumi del buffer QG per 1 volume di gel (es. 300 µl di buffer per 100 mg di gel)
- 3) Incubazione a 50°C per 10 minuti affinché il gel venga disciolto nel buffer
- 4) Aggiunta di 1 volume di isopropanolo e agitazione
- 5) Aggiunta del campione in colonna e centrifugazione per 1 minuto a 13000 rpm , eliminazione dell'eluato
- 6) Lavaggio 5 ml di buffer PE e centrifugazione per 1 minuto a 13000 rpm , eliminazione dell'eluato
- 7) Eluizione 50 µl buffer TE o H<sub>2</sub>O centrifugando per 1 minuto.

### **3.2.4 Estrazione DNA Plasmidico su piccola scala (Miniprep)**

La procedura di estrazione di DNA plasmidico su piccola scala (Miniprep) ai fini di localizzare le colonie contenenti il plasmide di interesse derivato dalla ligation, è stata effettuata con un kit (GenElute™ Five-Minute Plasmid Miniprep Kit, Sigma), il quale prevede fondamentalmente tre passaggi:

- 1) Lisi dei batteri : 400 µl di coltura batterica derivata da singola colonia vengono lisati con 40 µl di Lysis buffer (Sigma) per circa 2 minuti.
- 2) Il DNA viene poi caricato su colonna dopo essere stato trattato con 400µl di soluzione di legame
- 3) La colonna viene lavata con tampone di lavaggio per rimuovere le impurità
- 4) Il DNA viene eluito in 30µl di acqua o TE.

## **3.3 LINEE CELLULARI UTILIZZATE NELLO STUDIO**

### **3.3.1 Linea cellulare 293T**

Le 293T (cellule renali embrionali umane) sono state utilizzate principalmente per la produzione dei vettori lentivirali.

Terreno di coltura: IMDM (supplementato con 10% FBS (Fetal Bovine Serum) scomplementato (ovvero in cui il complemento è stato inattivato tramite incubazione per 30 minuti ad una temperatura di 56°C), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina.

Tampone di lavaggio: PBS (Phosphate Buffered Saline)

Soluzione per il distacco delle cellule: 0,05% Tripsina, 0,02% EDTA in PBS.

Soluzione crioprotettiva per il congelamento: 10% DMSO (dimetilsolfossido) in FBS.

Il terreno di coltura deve essere sostituito una volta ogni due-tre giorni e i passaggi vengono effettuati due-tre volte la settimana, prima del raggiungimento della confluenza. Le cellule vanno utilizzate a passaggi precoci di coltura (p10-p12).

### **3.3.2 Linea cellulare HeLa**

Le HeLa (cellule di carcinoma della cervice uterina umane trasformate) vengono utilizzate per la titolazione del vettore lentivirale prodotto.

Terreno di coltura: IMDM con 10% FBS scomplementato, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicillina e 100 µg/ml streptomicina.

Tampone di lavaggio: PBS

Soluzione per il distacco delle cellule: 0,05% tripsina, 0,02% EDTA in PBS.

Soluzione crioprotettiva per il congelamento: 10% DMSO in FBS.

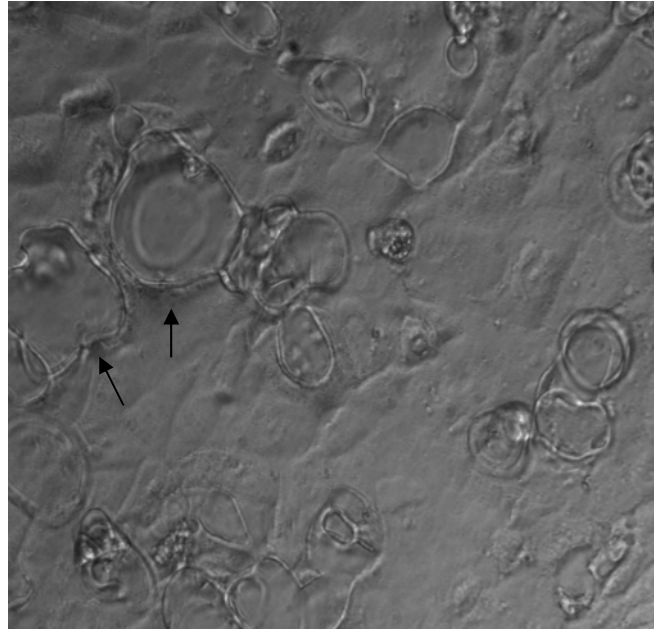
Richiedono la sostituzione del terreno di coltura una volta ogni due-tre giorni. Al fine di evitare il raggiungimento della confluenza sono necessari due-tre passaggi settimanali.

### **3.3.3 Linea cellulare H441**

Questa linea è stata ricavata nel 1982 dal fluido pericardiale di un paziente con adenocarcinoma papillare del polmone. Le cellule crescono in aderenza su plastica e presentano una morfologia epiteliale simile alle cellule di Clara (epitelio bronchiale non ciliato). In condizioni di coltura normali, queste cellule esprimono bassi livelli di ENaC.

L'esposizione a 50nM di dexametasone (ormone glucocorticosteroide) determina l'overespressione del canale e quindi l'aumento della conduttanza apicale al sodio, ricreando il fenotipo CF in cui l'ENaC è iper-funzionante.

In particolare, l'aggiunta di dexametasone al medium dopo due giorni dalla semina determina in un lasso di tempo variabile, la formazione di particolari strutture, dette *domes*, emicisti ripiene di fluido (Figura 7).



**Figura 7.** I *domes*, indicati dalle frecce, formati dalle H441 dopo stimolazione con dexametasone. Ingrandimento 32X.

Le cellule che formano i *domes* sono polarizzate, esprimono marker di differenziazione epiteliale, tra cui le proteine delle *tight junctions* e *gap junctions*, la proteina 10-kDa delle cellule di Clara e le proteine surfattanti A, B e D e sono positive allo staining per le citocheratine (Shlyonsky et al., 2005).

Probabilmente, l'incremento del trasporto di fluidi dalla porzione apicale a quella basolaterale aumenta il volume di liquido al di sotto del monostrato cellulare, causando la formazione di queste strutture. Le cellule al di fuori dei *domes* che rimangono in contatto con la superficie del pozzetto esprimono bassi livelli di marker delle cellule di Clara e vie di assorbimento del sodio amiloride-insensibili, ma esprimono le proteine delle *tight junction*.

Terreno di coltura: RPMI 1640 medium supplementato con 10% FBS scomplementato, 50 nM di dexametasone, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina.

Terreno per la formazione dei *domes*: RPMI 1640 medium supplementato con 5% FBS scomplementato, 4,5 g/L di glucosio, 100 U/ml penicillina, 100 µg/ml streptomicina, 50 nM dexametasone.

Tampone di lavaggio: PBS.

Soluzione per il distacco delle cellule: 0,05% tripsina, 0,02% EDTA, in PBS.

Soluzione crioprotettiva per il congelamento: 5% DMSO nel medium di coltura completo.

Il mantenimento in coltura richiede il cambio del terreno una volta ogni due-tre giorni ed il passaggio una-due volte la settimana.

### 3.4 PRODUZIONE DEI VETTORI LENTIVIRALI

La produzione dei differenti vettori lentivirali prevede fundamentalmente tre passaggi :

1. la purificazione dei plasmidi per l'assemblaggio delle particelle lentivirali,
2. la transfezione transiente delle cellule packaging 293T,
3. la titolazione delle unità trasducenti (TU, Transducing Units) su cellule HeLa, mediante citofluorimetria a flusso.

I plasmidi per l'assemblaggio dei vari vettori lentivirali prodotti sono 4 per ogni preparazione; il plasmide codificante per le proteine strutturali (pMDL) , il plasmide codificante per Rev (pRSV-REV), e il plasmide codificante per le proteine dell'envelope (pVSV-G) ,sono stati gentilmente concessi dal dott. Luigi Naldini e dalla dott.sa Antonia Follenzi (TIGET-HSR, H.S. Raffaele, Milano) e sono costanti per ogni produzione, mentre cambia il plasmide contenente il transgene.

<i>PLASMIDE</i>	<i>DIMENSIONI</i>	<i>CEPPO BATTERICO</i>	<i>RESISTENZA BATTERICA</i>	<i>TERRENO di COLTURA</i>
Di trasferimento: A seconda del transgene che si vuole esprimere		Top 10	Ampicillina, Carbenicillina	LB o Terrific Broth
Di packaging: pMDL (pMDLg/p RRE)	8895 bp	Top 10	Ampicillina, Carbenicillina	LB o Terrific Broth
REV (pRSV-REV)	4174 bp	Top 10	Ampicillina, Carbenicillina	LB o Terrific Broth
VSV-G (pMD2.G)	5824 bp	Top 10	Ampicillina, Carbenicillina	LB o Terrific Broth

### 3.4.1 Trasformazione di batteri competenti e amplificazione su larga scala dei plasmidi

Il ceppo batterico utilizzato per l'amplificazione dei plasmidi è *E. coli Top10 OneShot* (Invitrogen) fornito già chimicamente competente. Per la trasformazione è stato seguito il protocollo indicato in precedenza.

Per l'amplificazione su larga scala del plasmide è stato utilizzato il kit *Endofree Plasmid Giga* (Qiagen), seguendo le istruzioni fornite dalla ditta produttrice:

Si preleva una piccola quantità di materiale dallo stock in glicerolo corrispondente, e la si striscia sterilmente su una piastra selettiva (LB-agar con antibiotico di selezione), in modo da potere ottenere colonie singole. Si incuba la piastra overnight a 37°C.

Si preleva una singola colonia dalla piastra, la si inocula sterilmente in 5 ml di LB contenente antibiotico e si incuba per 8 ore a 37°C in agitazione a 300 rpm.

Si diluisce quindi tale pre-inoculo in 2,5 l di medium LB selettivo e si incuba overnight a 37°C in agitazione a 300 rpm.

I batteri vengono raccolti mediante centrifugazione a 6000 Xg (centrifuga Beckman, rotore JA10) per 15 minuti a 4°C e rimozione del surnatante. Si risospendono i pellet batterici in 125 ml di Buffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA), si aggiungono 125 ml di Buffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS), si mescola delicatamente invertendo la bottiglia e si incuba a temperatura ambiente per 5 minuti.

Si aggiungono 125 ml di Buffer P3 a 4°C (3.0 M Potassio acetato, pH 5,5) e si mescola delicatamente, dopodichè si versa il lisato così ottenuto sul filtro della "QIAfilter Mega-Giga Cartridge", si incuba a temperatura ambiente per 10 minuti e si applica il vuoto. Una volta filtrato tutto il lisato, si lava il filtro aggiungendo 50 ml di Buffer FWB2 (1,0 M Potassio acetato, pH 5,0) e applicando nuovamente il vuoto.

Si aggiungono 30 ml di Buffer ER al filtrato, si mescola accuratamente e si incuba in ghiaccio per 30 minuti.

Si versa il filtrato nella colonna "QIAGEN-tip", precedentemente equilibrata con 75 ml di Buffer QBT (750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% isopropanolo; 0,15% Triton), e la si lascia svuotare per gravità.

Si lava la colonna con 600 ml di Buffer QC (1,0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanolo), quindi si eluisce il DNA con 75 ml di Buffer QN (1,6 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanolo).

Si precipita il DNA eluito aggiungendo 52,5 ml (0,7 volumi) di isopropanolo a temperatura ambiente, mescolando e centrifugando per 30 minuti a 15000 Xg (centrifuga Beckman, rotore JA25.50) a 4°C.

Si lava il pellet di DNA con 10 ml di etanolo 70% privo di endotossine e si centrifuga a 15000 Xg per 10 minuti a 4°C. Si elimina il surnatante e si asciuga sterilmente il pellet all'aria per 20 minuti.

Si sospende il DNA in 400 ml di Buffer TE (10mM Tris, pH 8; 1 mM EDTA) filtrato (filtro Millipore 0,22 mm).

La resa viene determinata valutando la concentrazione e la purezza del DNA con uno spettrofotometro (per la purezza viene considerato il rapporto di assorbanza a 260 nm contro 280 nm) ; inoltre 0,5 µg DNA vengono digeriti con un appropriato enzima di restrizione che linearizza il plasmide (sito unico di restrizione) e vengono caricati su gel di agarosio allo 0,8% in TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3;) contenente bromuro di etidio alla concentrazione finale di 0,6 µg/ml.

### 3.4.2 Transfezione transiente di cellule 293T per la produzione di vettori lentivirali

Vanno seminate  $10 \times 10^6$  cellule della linea 293T in piastre da 15 cm di diametro (Corning) approssimativamente 24 ore prima della transfezione, in un volume finale di 20 ml di IMDM completo. Due ore prima della transfezione il terreno deve essere sostituito con terreno fresco. In tubi Falcon da 15 ml vengono preparate le miscele di DNA plasmidico per ciascuna piastra secondo il seguente schema:

<b>PLASMIDE</b>	<b>QUANTITA'</b>
ENV (VSV.G)	7 µg
pMDL/RRE	12,5 µg
REV	6,25 µg
Transfer vector	25-32 µg

La soluzione plasmidica viene portata ad un volume finale di 1125 µl con TE:dH<sub>2</sub>O (2:1) (TE: 1mM Tris, pH 8; 0,1mM EDTA, pH 8,0 in dH<sub>2</sub>O) e viene aggiunto 125 µl di CaCl<sub>2</sub> 2,5 M. Segue un'incubazione di 5 minuti a temperatura ambiente.



Per formare il precipitato, 1250 µl di HBS (281 mM NaCl, 100 mM HEPES (Sigma), 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma); pH 7,10-7,16) vengono aggiunti goccia a goccia facendo gorgogliare la soluzione con l'ausilio di un vortex; il precipitato viene infine aggiunto immediatamente alle cellule.

E' importante sottolineare come prima di eseguire questo protocollo per la produzione su larga scala del vettore, sia bene allestire ogni volta alcune prove per determinare i valori ideali di pH del tampone HBS. Infatti, variazioni anche minime di tale valore nel range indicato (pH tra 7,10 e 7,16) possono fortemente influenzare l'efficienza della transfezione. Una volta individuato il valore ideale di pH, si può procedere alla produzione su larga scala del vettore, transfettando dalle venti alle trenta piastre e raccogliendo da ciascuna il sovrnatante.

In seguito a transfezione le piastre vengono incubate a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> per 14-16 ore ; il terreno viene quindi sostituito con 16 ml di medium fresco. Segue un' incubazione a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> per ulteriori 24 ore.

Dopo 48 e 72 ore dalla transfezione il surnatante viene raccolto una prima volta e sostituito con 16 ml di terreno fresco. Tale surnatante contiene i virioni esprimenti il transgene di interesse. La raccolta viene ripetuta il giorno seguente. Il sovrnatante viene filtrato e successivamente ultracentrifugato per concentrare il vettore lentivirale prodotto in un volume ridotto di PBS.

### **3.4.3 Concentrazione dei vettori lentivirali**

Il surnatante raccolto a 48 e 72 ore dalla transfezione viene dapprima centrifugato a 1300 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente, e filtrato con filtro 0,22 µm.

Quindi viene dispensato in tubi in poliallometere sterili e ultracentrifugato per 140 minuti a 19500 rpm a temperatura ambiente (ultracentrifuga Beckman, rotore SW28 o SW32Ti); viene eliminato il surnatante, e il pellet viene risospeso in un volume di PBS sterile pari a circa 1/500 del sovrnatante centrifugato, e posto in agitazione a temperatura ambiente per 60 minuti. La sospensione virale così ottenuta viene quindi aliquotata in volumi da 30 µl e successivamente conservata a -80°C.

### **3.4.4 Titolazione dei vettori lentivirali**

Sono piastrate 5x10<sup>4</sup> cellule della linea HeLa per pozzetto in piastre da 6 (Costar), in modo da avere il giorno successivo circa 10<sup>5</sup> cellule per pozzetto in terreno IMDM.

Il giorno successivo vengono preparate delle diluizioni scalari degli stock virali (da  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  per titolazione dei sovranatanti non concentrati ; da  $10^{-3}$  a  $10^{-8}$  per titolazione di uno stock virale concentrato): in una piastra da 24 pozzetti (Costar) vengono dispensati 1,8 ml di IMDM completo in ciascun pozzetto e 200  $\mu$ l di stock virale non concentrato (se si sta titolando il vettore già concentrato, si dispensano 2 ml di medium nel primo pozzetto e si aggiungono 2  $\mu$ l di vettore concentrato). Vengono prelevati 200  $\mu$ l della diluizione nel primo pozzetto e aggiunti al pozzetto successivo, continuando fino alle diluizioni  $10^{-3}$  per il vettore non concentrato o di  $10^{-8}$  per quello concentrato.

Quindi il terreno dalle cellule viene sostituito con 1 ml di terreno completo addizionato con Polibrene (Sigma) 16  $\mu$ g/ml e viene poi aggiunto 1 ml delle varie diluizioni di lentivirus ottenute nei rispettivi pozzetti incubando a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> per 72 ore.

Dopo 72 ore il terreno di coltura viene eliminato, le cellule vengono lavate con 2 ml di PBS e successivamente staccate con 200  $\mu$ l di tripsina in ciascun pozzetto. Quando le cellule si sono staccate vengono aggiunti 2 ml di PBS e il tutto viene centrifugato a 1300 rpm per 10 minuti a temperatura ambiente.

Le cellule vengono poi analizzate tramite FACS per il marker presente nel transfer vector.

Il titolo virale è calcolato con la seguente formula:

$$TU/ml = \% \text{ Gated di cellule positive} \times \text{Fattore di diluizione} \times 10^5 \text{ (numero di cellule utilizzate per la titolazione)}$$

### 3.4.5 Titolazione della proteina p24

Dopo la titolazione lentivirale, la preparazione è stata sottoposta al dosaggio della proteina capsidica p24. Questo parametro indica la concentrazione delle particelle virali totali, ovvero sia delle unità trasducenti aventi al loro interno il transgene, sia delle particelle vuote, prive di genoma, nella sospensione testata. Il rapporto tra titolo virale e concentrazione della proteina è indice della qualità della preparazione virale e deve essere compresa tra  $10^4$  e  $10^5$  TU/mg di proteina. Valori inferiori al range indicato implicano la presenza nella sospensione virale di una quantità eccessiva di particelle non infettanti (rispetto a quelle infettanti) che competono per il legame ai recettori cellulari riducendo l'efficienza del trasferimento genico.

Il test è stato gentilmente eseguito dalla dottoressa Mariangela Cavarelli (AIDS Immunopathogenesis Unit, Dibit, Milano).

### **3.5 Transfezioni transienti per valutare l'espressione del transgene**

Per effettuare transfezioni transienti del plasmide PRRLCFTR1-633MYC in cellule 293T è stato utilizzato il PEI 25K come agente transfettante:

i complessi PEI/DNA/albumina sono preparati miscelando ed incubando per 15 minuti a temperatura ambiente le seguenti soluzioni:

Soluzione **A**: 50 µl di soluzione fisiologica

0,3 µl (equivalenti a 10 N/P) di PEI 25K 100 mM

Soluzione **B**: 50 µl di soluzione fisiologica

1 µg di DNA

Le quantità di entrambe le soluzioni sono calcolate per un pozzetto di una piastra da 24. Dopodiché la soluzione risultante viene aggiunta alle cellule ( $5 \times 10^4$  293T piastrate il giorno prima) nel terreno di coltura.

### **3.6 Protocolli di ImmunoFluorescenza indiretta utilizzati nello studio**

Le cellule sono state piastrate su vetrini posti in piastre da 24 pozzetti e successivamente transfettate come indicato nel paragrafo precedente; a 48 ore dalla transfezione sono state fissate con una soluzione di paraformaldeide al 3% e saccarosio al 2% per 10 minuti a temperatura ambiente, lavate tre volte con PBS e permeabilizzate con un tampone costituito da: Hapes (Invitrogen) 20 mM, Saccarosio (Flucka) 300 mM, NaCl (Flucka) 50 mM, MgCl<sub>2</sub> (Flucka) 3mM, Triton X100 (Sigma) 0,5%, per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo la permeabilizzazione le cellule vengono lavate per tre volte con PBS/BSA 0,2% e i siti aspecifici di legame per l'anticorpo sono bloccati con una soluzione di BSA 2%, FCS 2% in PBS per 15 minuti a 37°C. A questo punto viene aggiunto l'anticorpo primario:

Per l'immunofluorescenza diretta contro il C-MYC viene utilizzato l' anti-MYC9E10 (Santa Cruz) diretto contro l'epitopo 9E10 del c-MYC , coniugato all'isotiocianato di fluoresceina (FITC) , alla diluizione di 1:250 di uno stock concentrato 0,2 mg/ml in PBS/BSA 2% per 30 minuti a 37°C.

Per l'immunofluorescenza diretta contro il CFTR, viene utilizzato l'anti corpo primario (Alexis) diretto contro il primo loop extracellulare della proteina CFTR, alla diluizione di 1:250 di uno stock concentrato 0,2 mg/ml in PBS/BSA 2% per 30 minuti a 37°C. Successivamente le cellule sono lavate tre volte con PBS/BSA 0,2% e trattate con l'anticorpo secondario (diluito 1:1000 da uno stock 2 mg/ml) Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) coniugato ad un fluorocromo che emette nella lunghezza d'onda del rosso (594 nm) per 30 minuti a 37°C. Nel secondo caso i nuclei sono colorati con DAPI 1:3000 in PBS 3'RT. Si lava 3 volte con PBS/BSA 0,2%. Il lato del vetrino su cui sono adese le cellule viene poggiate su un vetrino porta oggetto su cui è presente una goccia di Mowiol. I vetrini sono poi stati esaminati con il microscopio Axiovert 100TV2 della Zeiss con sistema di acquisizione immagini Hamamatsu.

### **3.7 FLIPR<sup>®</sup> Membrane potential assay kit (Molecular Devices)**

Questo saggio è un metodo alternativo al Patch Clamp per misurare dei cambiamenti del potenziale di membrana dovuti ai canali ionici ed è basato sulla misura della fluorescenza emessa da una sonda lipofila e anionica: tale sonda può ripartirsi attraverso la membrana citoplasmatica delle cellule, in maniera dipendente dal potenziale attraverso la membrana. Quando le cellule sono depolarizzate una maggiore quantità di sonda entra nelle cellule e legano i lipidi e le proteine e causano un aumento nel segnale di fluorescenza. Quando le cellule sono iperpolarizzate, la sonda esce dalle cellule, e la fluorescenza cala.

Tale kit è stato utilizzato per misurare i cambiamenti del potenziale di membrana associati all'overespressione di ENaC nelle cellule H441 sotto stimolazione continua di dexametasone, e dunque formanti i domes. Nel dettaglio il protocollo prevede:

- 1) Semina delle cellule H441 in apposite piastre da 96 well con fondo piatto a pareti schermate (che consentono la lettura fluorimetrica) ad una concentrazione di 30.000 cells/well in 200 µl medium: RPMI, 5% FBS, 1% P/S, 4,5 g/L glucosio.
- 2) a 48 ore dalla semina si aggiunge terreno fresco contenente 50 nM dexametasone
- 3) Il terreno fresco con 50 nm dexametasone viene cambiato ogni giorno e a circa 4-5 giorni dalla prima aggiunta di dexametasone compaiono i "domes".
- 4) 7 giorni dopo la prima aggiunta di dexametasone si esegue il membrane potential assay:

Membrane potential assay:

- A) Le cellule vengono lavate due volte con HBSS
- B) 100 µl della sonda (1 vial di Membran potential dye viene precedentemente dissolto in 11 ml di assay buffer) vengono aggiunti alle cellule
- C) Si incuba a 37°C per 1 ora
- D) Si procede alla lettura della piastra al fluorimetro (Victor-3 , Perkin Elmer) utilizzando un filtro di eccitazione a 530 nm ed uno di emissione a 560 nm. La fluorescenza di ogni pozzetto è misurata per 1 secondo e le letture vengono ripetute nel tempo
- E) Dopo un certo numero di misure vengono aggiunti 100 µl Amiloride (concentrazione finale 30 µM o 100 µM, la soluzione madre viene preparata ad una concentrazione 2X in HBSS) per inattivare il canale del Sodio, o 100 µl HBSS (controllo) e la misura di fluorescenza viene ripetuta.

### **3.8 REAL TIME PCR**

#### **3.8.1 Estrazione dell' RNA cellulare**

Per l'estrazione dell'RNA cellulare è stato utilizzato TRIzol<sup>®</sup> un reagente commercializzato dalla ditta Invitrogen che è una soluzione mono-fasica di fenolo e guanidinio isotiocianato in grado di lisare e solubilizzare i componenti cellulari, mantenendo l'integrità dell'RNA. L'aggiunta di cloroformio separa la soluzione in due fasi, una acquosa contenente l'RNA e una organica. In seguito a recupero della fase acquosa, l'RNA viene recuperato tramite precipitazione con isopropanolo. Il protocollo dettagliato fornito dalla ditta riguardante la lisi di cellule cresciute su plastica prevede l'aggiunta di 1ml di TRIzol per una piastra di 3,5 cm di diametro, quindi il TRIzol è stato utilizzato in misura proporzionale all'area del pozzetto e non al numero di cellule piastrate. Dopo 5 minuti di incubazione per completare la dissociazione dei complessi nucleo-proteici, si aggiungono 0,2 ml di cloroformio per 1 ml di TRIzol utilizzato, si mischiano le due fasi e si incuba per 2-3 minuti a RT. Dopodichè si procede alla centrifugazione dei campioni a 9500 rpm a 4°C per 15 minuti. La fase acquosa sovrastante contenente l'RNA viene recuperata e si aggiungono 0,5 ml di Isopropanolo per 1 ml di TRIzol utilizzato per precipitare gli acidi nucleici. Dopo aver mischiato i campioni vengono incubati a RT per 10 minuti, dopodiché si procede alla loro centrifugazione a 9500 rpm per 10 minuti a 4°C. Il pellet risultante viene lavato con Etanolo 75%, successivamente viene fatto asciugare all'aria e risospeso in 20 µl H<sub>2</sub>O RNase free.

I campioni subiscono un successivo trattamento con DNase I ricombinante (Roche). Si utilizzano 1-2 U di enzima per  $\mu\text{g}$  di acido nucleico e si incuba a  $37^\circ\text{C}$  per 1 ora.

### 3.8.2 Ulteriore purificazione dell'RNA (KIT qiagen)

Per purificare ulteriormente l'RNA estratto, si utilizza un kit di purificazione specifico. (RNeasy<sup>®</sup> system, Qiagen). Questo sistema sfrutta l'affinità di legame dell'RNA, in presenza di alte concentrazioni di sali, verso una apposita membrana. I contaminanti e le impurità vengono eliminate con una procedura di lavaggio, mentre l'RNA viene eluito in  $30\ \mu\text{l}$  di  $\text{H}_2\text{O}$  RNAsi free.

### 3.8.3 Verifica della qualità dell'RNA

Per verificare la purezza e la quantità dell'RNA recuperato, si procede ad analisi spettrofotometrica misurando l'assorbanza a  $260\text{nm}$  e  $280\ \text{nm}$  ( il rapporto ottimale di purezza  $260/280$  è compreso tra 1,8 a 2) e caricando il campione su gel di agarosio: l'RNA migra con un classico pattern di due bande: una più alta, corrispondente all'RNA ribosomale 28S, l'altra più in basso corrispondente all'RNA ribosomale 18S. Come regola generale, se la preparazione è buona, la banda più superiore ha un'intensità doppia rispetto alla banda inferiore.

### 3.8.4 Retrotrascrizione

Il passo successivo consiste nel retro-trascrivere l'RNA a DNA. Abbiamo utilizzato a tal scopo il kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit della ditta Applied Biosystems. La miscela di reazione per un campione è la seguente:

<i>Reagente</i>	<i><math>\mu\text{l}</math></i>
<i>10X RT buffer</i>	2
<i>25X dNTP Mix (100mM)</i>	0,8
<i>10X RT Random Primers</i>	2
<i>Multiscribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase</i>	1
<i>Inibitore dell'RNAsi (AB systems)</i>	1
<i>H<sub>2</sub>O RNAsi free</i>	3,2

A tale miscela di reazione viene aggiunto 1 µg di RNA pari a 10 µl.

La reazione di retrotrascrizione è la seguente:

Temperatura	Tempo
25°C	10 min
37°C	2 ore
85°C	5 sec
4°C	∞

### 3.8.5 Reazione di amplificazione PCR per Real Time

La reazione utilizzata è la seguente:

<i>Reagente</i>	<i>µl</i>
<i>cDNA (10ng) in H<sub>2</sub>O RNAsi free</i>	9
<i>20X Taqman Gene expression assay</i>	1
<i>2X Taqman Universal PCR master mix</i>	10

Nel controllo negativo viene messa solo H<sub>2</sub>O anziché cDNA.

Il Taqman gene expression assay contiene le Taqman probes specifiche per il gene di interesse (αENaC o β-Actina). Ogni reazione viene fatta in triplicato per ogni campione. I 20 µl della reazione vengono aliquotati in una “Optical Fast 96 plate” specifica per l’apparecchio Abi Prism 7900 col quale vengono analizzate le reazioni. La piastra viene centrifugata a 1000 rpm per 50 secondi prima di venire inserita nello strumento.

La reazione di amplificazione è la seguente :

- 1) 50°C 1 minuto
- 2) 95°C 10 secondi
- 3) 95°C 0,5 secondi
- 4) 60°C 1 minuto

Lo step 3 e 4 vengono ripetuti per 40 volte.

La reazione dura circa 2 ore in tutto.

Il programma specifico restituisce i cicli soglia (Ct) con i quali è possibile calcolare la quantità relativa di mRNA, rispetto all'mRNA del gene di riferimento.



## ***4. RISULTATI***

#### 4. REALIZZAZIONE DI UN LENTIVIRUS VEICOLANTE IL GENE CFTR INTERO O PARZIALE

Dapprima si è proceduto al clonaggio dell'intera sequenza del CFTR nel vettore lentivirale di terza generazione pRRL.CMV.MCS.MMM; tuttavia tale procedura è risultata difficoltosa e probabilmente attribuibile all'elevata instabilità segregazionale del plasmide durante la crescita di *E.Coli*, già documentata in precedenti lavori (Boyd et al., 1999).

In precedenza sono state documentate difficoltà nel clonare il full-length del cDNA del CFTR umano in un vettore ad alto numero di copie, attribuibili all'attività di un promotore batterico criptico presente nell'esone 6b, che veicola l'espressione di una proteina tossica per *E.Coli*.

A tal proposito è stato evidenziato che mutando una base in posizione 936, da T a C, l'attività criptica di tale promotore si attenua sufficientemente da permettere il clonaggio della sequenza (Cheng et al., 1990).

Tuttavia la mutazione non basterebbe ad annullare le difficoltà di clonaggio: un plasmide contenente la sequenza del CFTR, con la base mutata, ha mostrato instabilità segregazionale in differenti ceppi di *E.Coli*, provocando di fatto un profilo di crescita aberrante nei batteri trasformati (Boyd et al., 1999).

Questo fenomeno può spiegare le difficoltà incontrate nell'inserimento dell'intera sequenza nel plasmide lentivirale.

D'altra parte, basandosi sull'evidenza che il frammento del CFTR 1-633 è in grado di associarsi alla proteina mutata e a transcomplementare la  $\Delta F508$  (Cormet-Boyaka et al., 2004), fornendo *in trans* quei segnali necessari a evitare la degradazione a livello del reticolo endoplasmatico e portando alla formazione di una proteina matura in grado di raggiungere la membrana cellulare e correttamente funzionante, si è quindi proceduto al clonaggio della sequenza codificante per i primi 633 amminoacidi del CFTR, nel vettore pRRL.CMV.MCS.MM che è il vettore di espressione del lentivirus. Inoltre, all'estremità C-terminale di tale sequenza è stato aggiunto un "tag", in questo caso una porzione del gene C-MYC, in modo da permettere la distinzione della proteina veicolata dal lentivirus, e dunque esogena, da quella endogena semplicemente utilizzando un anticorpo diretto contro l'epitopo 9E10 del C-MYC stesso.

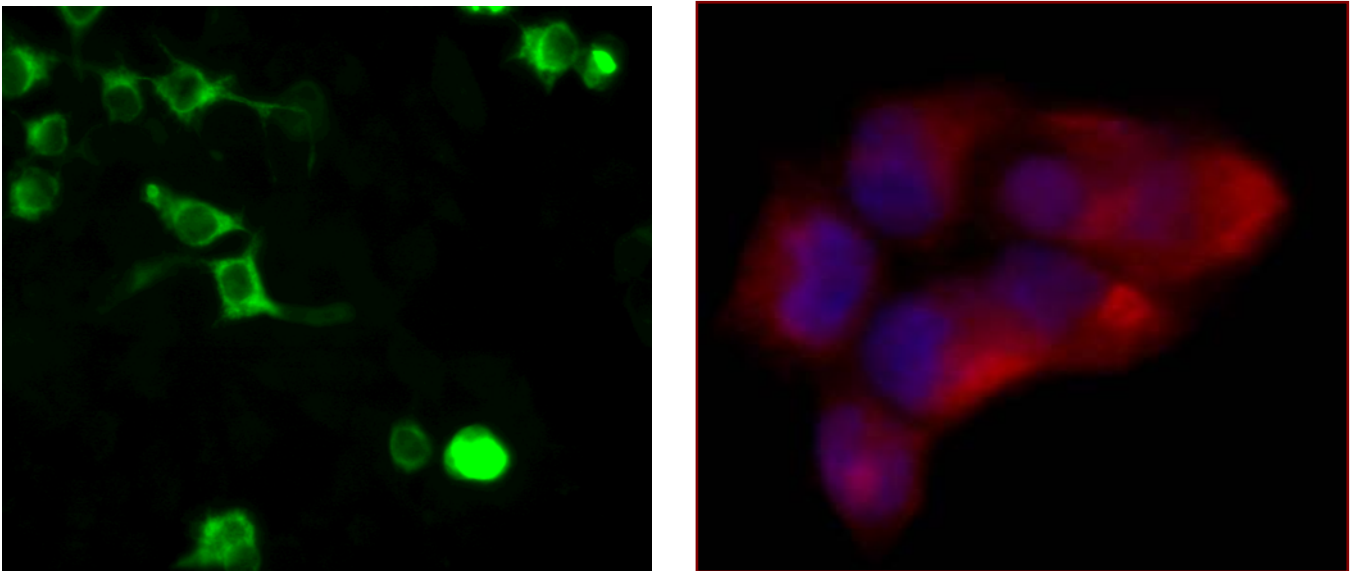
#### **4.1 CLONAGGIO DEL cDNA DEL GENE CFTR FUSO CON IL TAG C-MYC NEL VETTORE DI ESPRESSIONE LENTIVIRALE**

Il primo passo è stato l'inserimento del tag all'interno del vettore suddetto, ricavando la sequenza corrispondente dal plasmide pBSMYC2. Le prime 1420 paia di basi del CFTR sono state dunque ricavate dal plasmide pBQ 6.2 contenente il full-length del CFTR, utilizzando i siti di restrizione SmaI - BamHI, e inserite nel vettore virale pRRL CMV MCS MM in cui in precedenza era stato inserito il tag; le basi da 1420 a 1899 sono state amplificate tramite PCR utilizzando come stampo il plasmide pBQ 6.2, un forward primer contenente il sito BamHI, e un reverse primer contenente il sito NheI non presente sul CFTR, e inserite nello stesso vettore virale, in frame con il tag. Tale frammento è stato successivamente sequenziato per verificare la corrispondenza di ogni singola base. In questo modo si è ottenuto il vettore virale contenente la porzione N-terminale del CFTR (amminoacidi 1-633) fuso con il tag C-MYC. L'intera strategia di clonaggio è rappresentata nella Figura 8.



Figura 8 Strategia di clonaggio del CFTR1-633MYC in vettore virale

Per quanto riguarda il plasmide contenente la porzione amminoacidica 1-633 del CFTR, prima di procedere alla realizzazione del relativo lentivirus, si è valutato il corretto funzionamento di tale costrutto tramite immunofluorescenza indiretta utilizzando sia l'anticorpo anti-myc, sia l'anticorpo anti CFTR N-terminale: si è proceduto quindi ad effettuare una transfezione transiente di 293T, una linea cellulare che non esprime costitutivamente il CFTR tramite PEI 25K. Ventiquattro ore dopo la transfezione le cellule sono state fissate, e permeabilizzate, quindi un primo gruppo di cellule è stato trattato con anticorpo anti-C-myc (marcato con FITC), un secondo gruppo con anti-CFTR diretto verso il primo loop intracellulare e successivamente con anticorpo secondario (marcato con Texas Red). Le cellule sono risultate positive per l'espressione della proteina, che è chiaramente perinucleare (Fig. 9A e 9B).



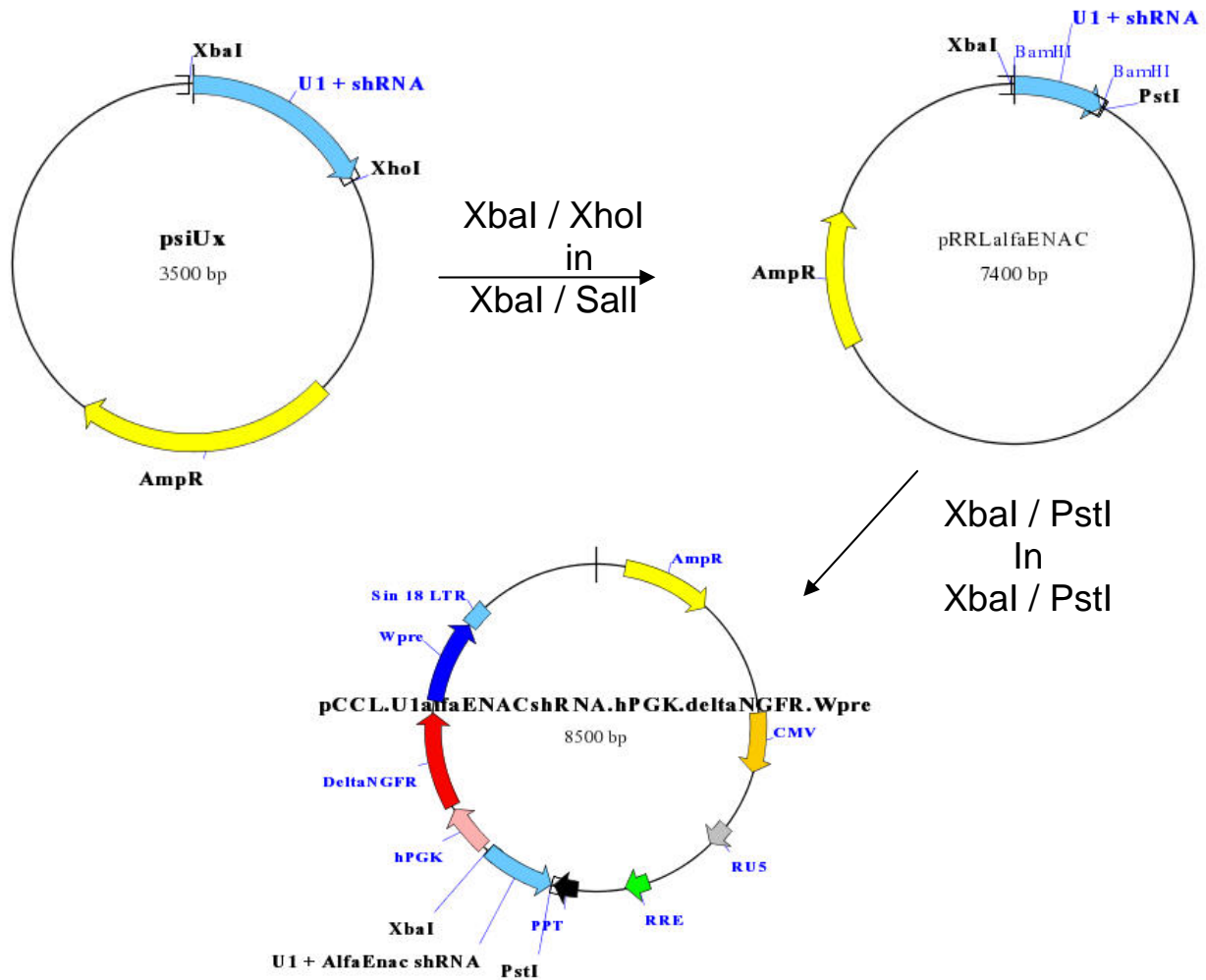
**Figura 9. Espressione del costrutto CFTR 1-633 in cellule 293T.** A. Cellule transfettate e, 24 ore dopo, trattate con Ab –anti-myc coniugato con FITC. B. Cellule transfettate e trattate con Ab anti CFTR e successivamente con Ab secondario (coniugato con Texas Red). I nuclei sono colorati con DAPI ed appaiono in blu; il CFTR appare in rosso.

Il passo successivo è stato dunque quello di produrre il relativo LV. Sono stati condotti differenti tentativi di produzione del LV, ottenendo però sempre produzioni con titolo virale bassissimo, e dunque non utilizzabili per effettuare esperimenti *in vivo* o *in vitro*.

## **4.2 REALIZZAZIONE DI UN LENTIVIRUS VEICOLANTE SEQUENZE INTERFERENTI CON ENaC**

Parallelamente, basandosi su evidenze sperimentali che conferiscono un ruolo al canale epiteliale del sodio (ENaC), il quale nella fibrosi cistica risulta iperattivo a causa della mancata regolazione da parte del CFTR, si è proceduto a realizzare un lentivirus veicolante la cassetta di *short hairpin RNA* per silenziare in maniera specifica tale canale e testare la sua efficienza e efficacia in modelli funzionali *in vitro*.

La cassetta  $\alpha 2$  (gentilmente fornita dalla Prof.ssa Fiorentina Ascenzioni, Università “La Sapienza”, Roma) già dimostratasi efficace nel ridurre i livelli di mRNA della subunità  $\alpha$ ENaC mediante vettori non virali, è stata clonata in un vettore lentivirale, con la procedura precedentemente descritta (vedi Materiali e Metodi e Figura 10). Il plasmide originale (gentilmente fornito dal Dott. Luigi Naldini, DIBIT, HSR, Milano) contiene come gene reporter la subunità delta dell'NGFR espressa sulla superficie cellulare ma incapace di trasduzione del segnale, per cui è possibile, tramite analisi citofluorimetrica, quantificare le cellule che contengono il plasmide utilizzando un anticorpo diretto contro tale subunità. Il relativo lentivirus è stato prodotto e testato per verificarne l'efficacia di infezione della linea cellulare H441.



**Figura 10:** Strategia di Clonaggio della cassetta di RNA interferenza anti αENaC

#### 4.2.1 Valutazione della capacità di infezione delle H441 da parte del LV

Per valutare la capacità infettante del LV anti-αENaC, sono state piastrate  $10^5$  cellule in piastre da 24 pozzetti e il giorno dopo infettate con tre differenti MOI (500, 1000, 2000). In particolare i MOI (Multiplicity of Infection) indicano il numero di particelle virali infettanti per cellula. Settantadue ore dopo le cellule sono state processate per l'analisi al citofluorimetro utilizzando l'anticorpo anti-NGFR. La tabella seguente riporta i valori percentuali di positività in base alla dose di LV utilizzata.

<i>MOI utilizzati</i>	<i>500</i>	<i>1000</i>	<i>2000</i>
<i>Percentuale cellule positive</i>	<b>64 %</b>	<b>79,2 %</b>	<b>91,2 %</b>

#### 4.2.2 Messa a punto della reazione di Real Time PCR

Per prima cosa abbiamo dovuto stabilire le quantità di cDNA di partenza da utilizzare per la Real Time PCR. Abbiamo quindi provato diverse quantità di DNA nella mix di reazione per valutare quale avrebbe dato il profilo di espressione migliore, analizzando sia l'espressione di  $\beta$ -Actina, sia l'espressione di  $\alpha$ ENaC. Abbiamo utilizzato le seguenti quantità : 0,1 ng, 0,5 ng, 1 ng, 5 ng, 10 ng e 50 ng, e, valutando i cicli soglia corrispondenti a ciascuna quantità, abbiamo rilevato che 10 ng è la quantità ideale di cDNA di partenza per le nostre condizioni.

#### 4.2.3 Valutazione dell'efficacia del LV nel ridurre i livelli di mRNA di $\alpha$ ENaC

Per valutare l'efficacia del LV $\alpha$ ENaC nel ridurre i livelli di mRNA della relativa subunità, le cellule H441 sono state infettate a MOI 2000 e 72 ore dopo dall'aggiunta del virus in metà dei pozzetti è stato aggiunto Dexametasone (50 nM) per 6 ore prima dell'estrazione dell'RNA. Alcuni pozzetti sono stati utilizzati per l'analisi citofluorimetrica per valutare l'efficienza di infezione, gli altri pozzetti sono stati utilizzati per l'estrazione dell'RNA. Riassumendo le condizioni utilizzate sono state le seguenti:

<i>Estrazione RNA</i>	<i>Citofluorimetria</i>
<i>No trattamento LV + Dexametasone</i>	
<i>No trattamento LV - Dexametasone</i>	
<i>Trattamento con LV + Dexametasone</i>	
<i>Trattamento con LV - Dexametasone</i>	

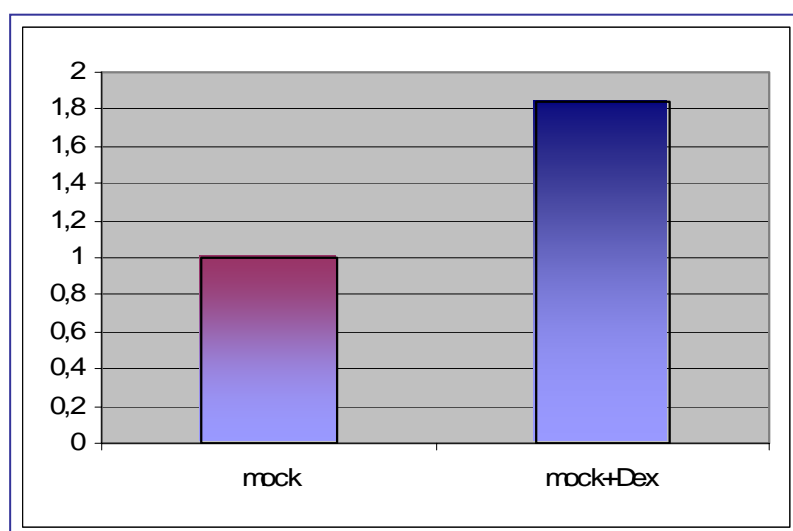
L'analisi citofluorimetrica ha rivelato una percentuale di cellule positive per il reporter NGFR pari al 95,2% della popolazione in seguito ad infezione con LV sia in presenza che in assenza di trattamento con Dexametasone.



L'RNA è stato estratto con il metodo del TRIzol precedentemente descritto, purificato e quantificato sia su gel che all'analisi spettrofotometrica; Il rapporto di assorbanza 260/280 è risultato pari a 2 per tutte le condizioni, e l'RNA caricato su gel ha mostrato le caratteristiche bande delle forme 28S e 18S, per cui, verificata la buona qualità e quantità dell'RNA recuperato, si è proceduto con la reazione di retro-trascrizione e successiva PCR quantitativa.

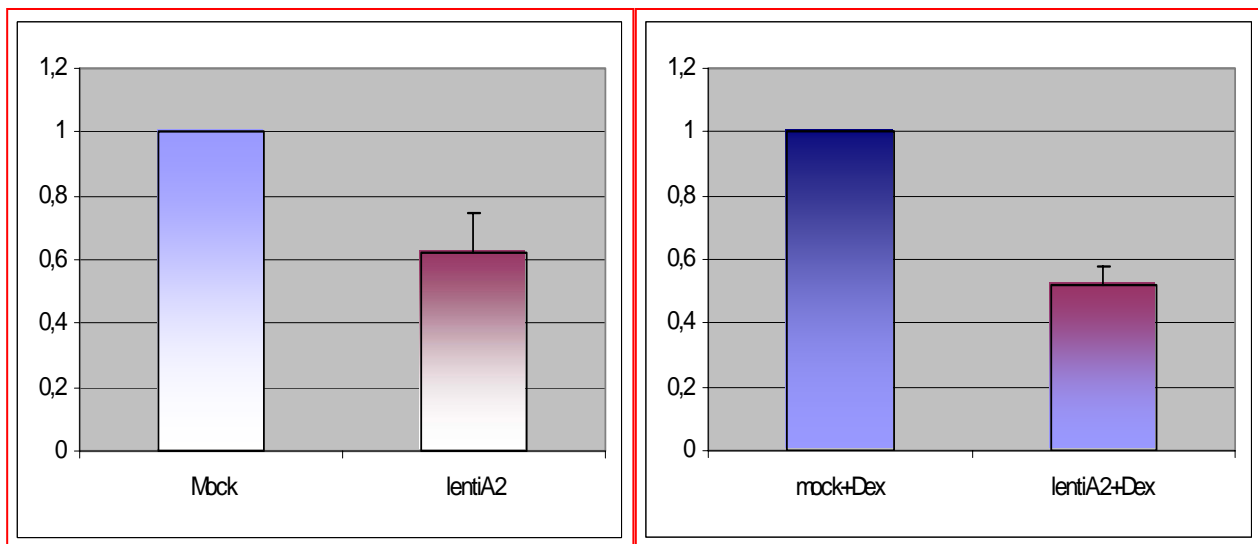
Tramite Real Time PCR si è dunque proceduto alla quantificazione relativa dei livelli di mRNA della subunità  $\alpha$  normalizzando per i livelli di espressione della  $\beta$ -Actina (Housekeeping gene).

Come si può vedere dalla Figura 11, 6 ore di trattamento con Dexametasone sono in grado di aumentare la produzione di mRNA della subunità  $\alpha$  dell'ENaC di circa 1,8 volte.



**Figura 11.** Effetto del Dexametasone sull'espressione di  $\alpha$ ENaC

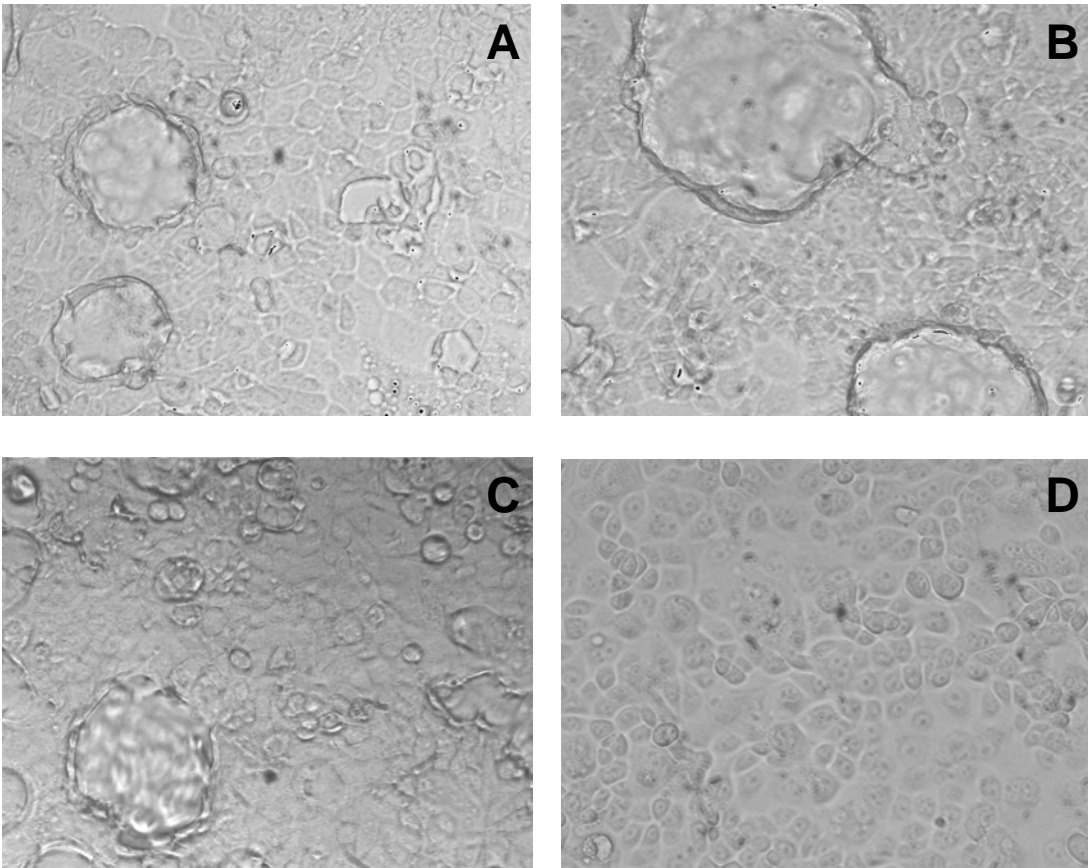
Il Trattamento con LV $\alpha$ ENaC è in grado di sottoregolare i livelli di espressione dell'mRNA di  $\alpha$ ENaC del 40-50% sia in presenza che in assenza di trattamento con Dexametasone (Figura 12).



**Figura 12.** Effetto di sottoregolazione sull'espressione di  $\alpha$ ENaC da parte di LV $\alpha$ ENaC sia in presenza che in assenza di Dexametasone

#### 4.2.4 Il modello cellulare dei Domes: Membrane potential assay

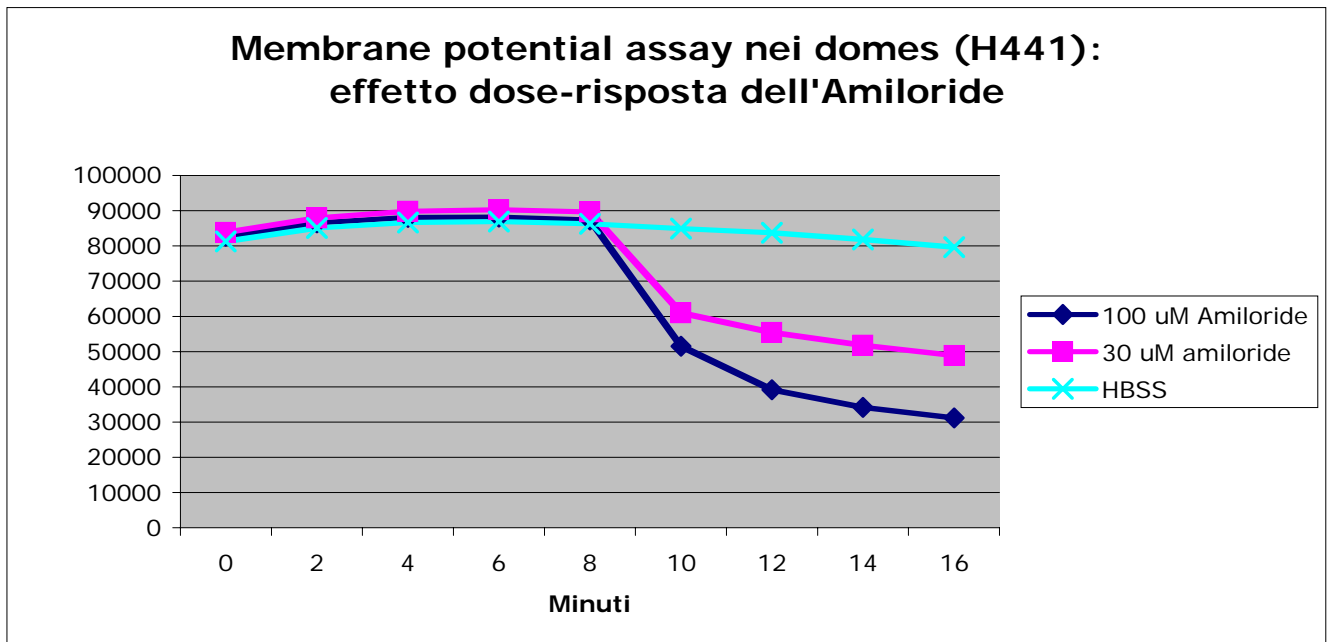
Un valido modello cellulare per studiare l'ENaC è dato dalle cellule H441, che, in seguito a stimolazione continua con Dexametasone, formano particolari emicisti ripiene di fluido dette “**domes**”. Le cellule nei domes rispetto alle cellule fuori dai domes o ai monostrati non esposti alla stimolazione differiscono per un'elevata produzione di surfattante, un'aumentata espressione di citocheratine e per la localizzazione della proteina Claudina-4, una proteina delle *Tight Junctions*, a livello della membrana plasmatica. In studi di patch-clamp le correnti di sodio dipendenti dall'amiloride, sono state rilevate solo nelle cellule presenti nei domes (Shlyonsky et al., 2005). Quindi, la formazione di queste strutture è indice di localizzazione dell'ENaC sulla membrana plasmatica. Nelle nostre condizioni sperimentali, le cellule H441, in seguito a stimolazione giornaliera con 50 nM di Dexametasone (ogni giorno il terreno è stato rimosso e terreno fresco con Dexametasone è stato aggiunto) formano queste strutture nell'arco temporale di una settimana circa.



**Figura 13.** Formazione dei domes nelle cellule H441. **A, B, C** : H441 stimulate giornalmente con dexametasone per una settimana. E' possibile apprezzare i domes, che nei pozzetti non trattati con dexametasone (**D**) non compaiono.

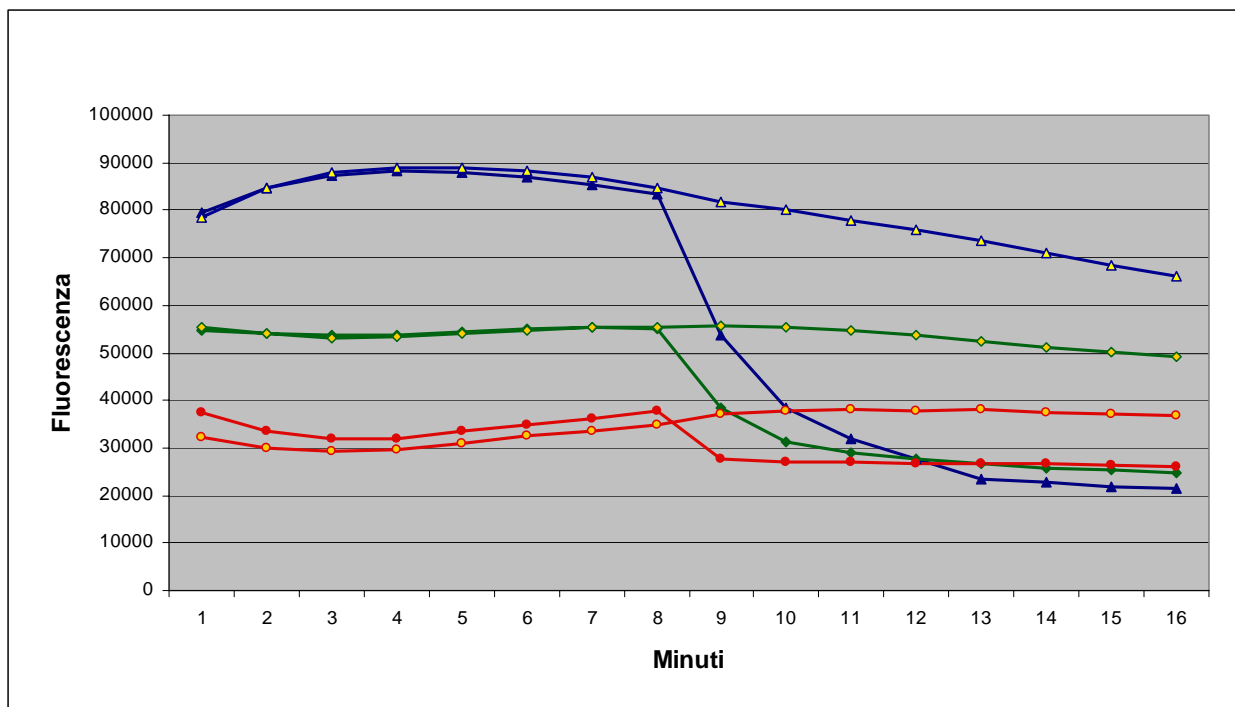
Come detto in precedenza, il Membrane potential assay si basa sulle proprietà di una sonda fluorescente e lipofilica di ripartirsi internamente o esternamente alla cellula a seconda della polarizzazione dell'epitelio. Nel caso della stimolazione continua con dexametasone, ENaC è overespresso e la depolarizzazione che ne consegue fa sì che una maggiore quantità di sonda entri nelle cellule legando i lipidi e causando così un aumento della fluorescenza. D'altra parte il trattamento con Amiloride, un bloccante del canale epiteliale del Sodio, causa un decremento della fluorescenza.

Per mettere a punto tale tecnica, le cellule sono state cresciute in modo da formare i domes, e il saggio è stato eseguito seguendo il protocollo precedentemente descritto (vedi Materiali e metodi). Dopo aver misurato la fluorescenza per 8 minuti, è stata aggiunta Amiloride a due diverse concentrazioni, 100  $\mu\text{M}$  e 30  $\mu\text{M}$  e la fluorescenza è stata misurata per altri 8 minuti. Nei pozzetti di controllo anziché Amiloride è stato aggiunto HBSS. Come si può vedere dal grafico seguente (Figura 14), vi è un effetto dose-risposta dell'Amiloride.

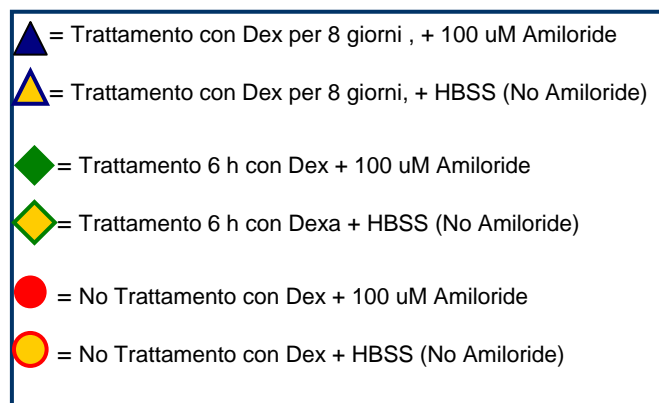


**Figura 14.** Membrane potential assay sui domes: Effetto dose risposta dell'Amiloride.

Per gli esperimenti successivi abbiamo dunque utilizzato la dose più alta di amiloride. Per correlare il livello di fluorescenza alla sovraespressione di ENaC abbiamo ripetuto l'esperimento inserendo ulteriori condizioni, ovvero oltre alle cellule trattate giornalmente con il Dexametasone, abbiamo misurato la fluorescenza anche di cellule trattate solo 6 ore con Dexametasone e cellule non trattate. Come si può vedere dal grafico seguente (Figura 15), la fluorescenza aumenta significativamente con l'utilizzo di Dexametasone; già 6 ore di stimolazione con tale ormone sono sufficienti ad ottenere un aumento della fluorescenza, senza tuttavia osservare la formazione di domes. Tale fluorescenza viene poi drasticamente diminuita dal trattamento con amiloride che la porta allo stesso livello per tutte e tre le condizioni. Ciò fa presupporre che la maggior parte della fluorescenza misurata con tale saggio, sia direttamente collegata con l'espressione di ENaC. Quindi possiamo considerare il delta tra la condizione con amiloride e quella senza come un indice dell'attività dell'ENaC.

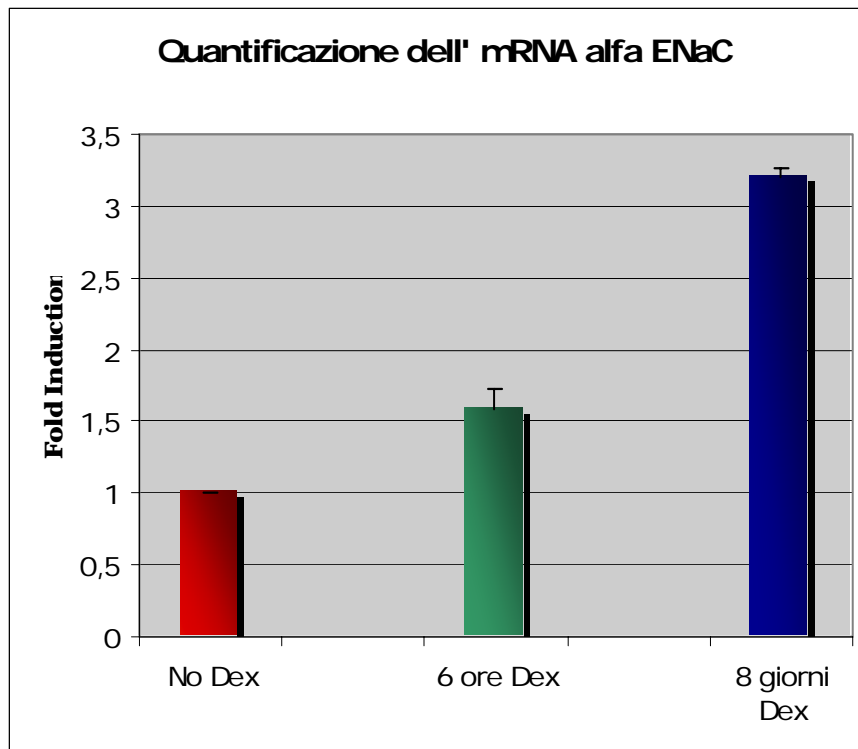


Legenda:



**Figura 15.** Membrane potential assay in differenti condizioni di trattamento con Dexametasone

Ripetendo le stesse 3 condizioni delle cellule trattate per il Membrane Potential Assay, analogamente un altro gruppo di cellule è stato processato per effettuare una PCR quantitativa per valutare i livelli di espressione di  $\alpha$ ENaC rispetto al trattamento con Dexametasone. I dati ottenuti sono stati normalizzati sul gene house-keeping  $\beta$ -Actina (Figura 16).



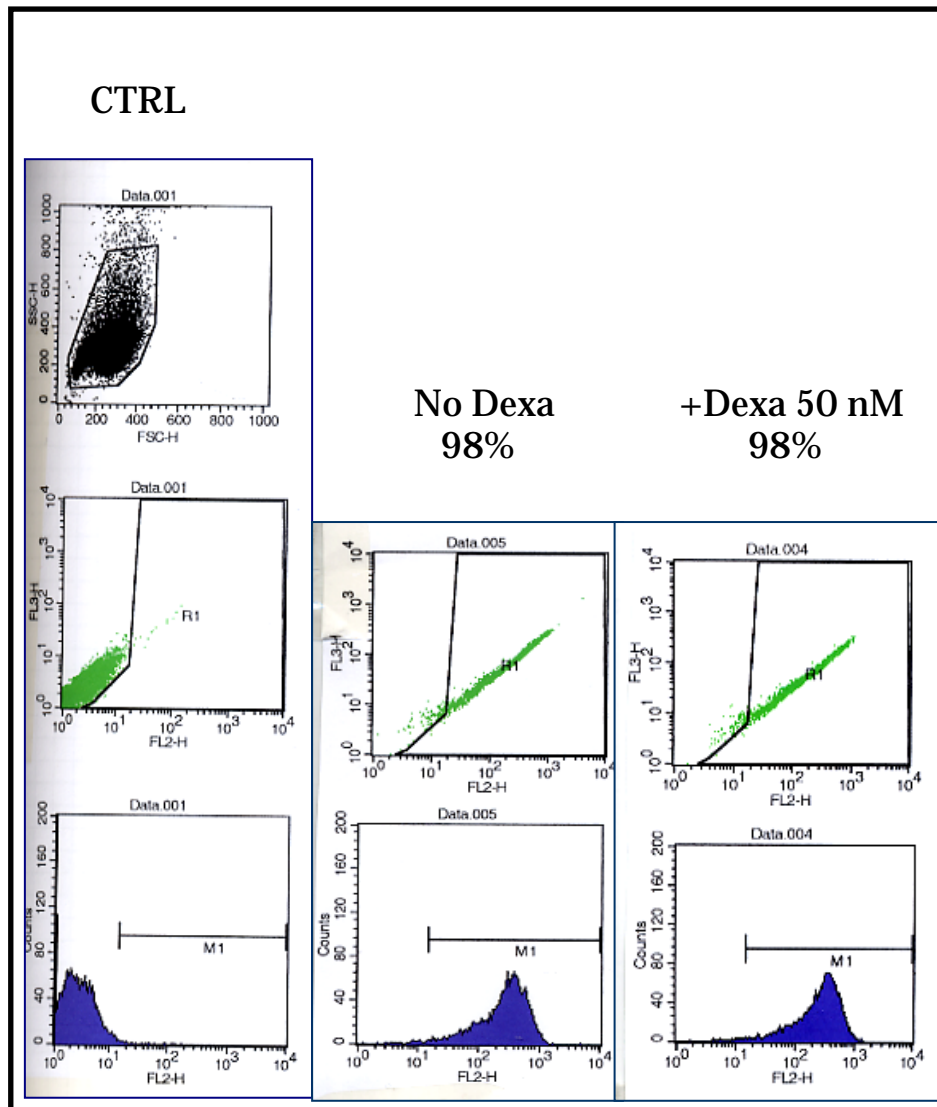
**Figura 16.** Il Dexametasone stimola in maniera dipendente dal tempo di esposizione l'espressione di  $\alpha$ ENaC

Come si può apprezzare dal grafico, il trattamento col Dexametasone per 6 ore aumenta di circa 1,5 volte il livello di espressione dell'mRNA della subunità  $\alpha$ , mentre il trattamento continuo aumenta il livello di oltre 3 volte. Questo dato è correlabile con l'aumento di fluorescenza rilevabile col membrane potential assay.

#### 4.2.5 Infezione con il LV delle H441 (modello dei domes)

Il passo successivo è stato quello di valutare l'efficacia del LV $\alpha$ ENaC nel sottoregolare i livelli di mRNA delle subunità di  $\alpha$ ENaC nel modello funzionale dei domes, andando ad esaminare sia l'effetto che il LV avrebbe potuto avere sui domes stessi, sia valutando l'effetto con il membrane potential assay, sia andando a quantificare i livelli di mRNA in seguito ad infezione. Dopo la comparsa dei domes, a circa 5 giorni dalla prima aggiunta di dexametasone, le H441 sono state infettate a MOI 2000 con il vettore lentivirale, e processate al citofluorimetro per valutare l'efficienza di infezione. Sorprendentemente solo lo 0,6 % delle cellule è risultato positivo. Per spiegare tale fenomeno sono state formulate fondamentalmente due ipotesi, ovvero un ruolo negativo da parte del dexametasone sulla capacità infettante del lentivirus; o d'altra parte una maggiore

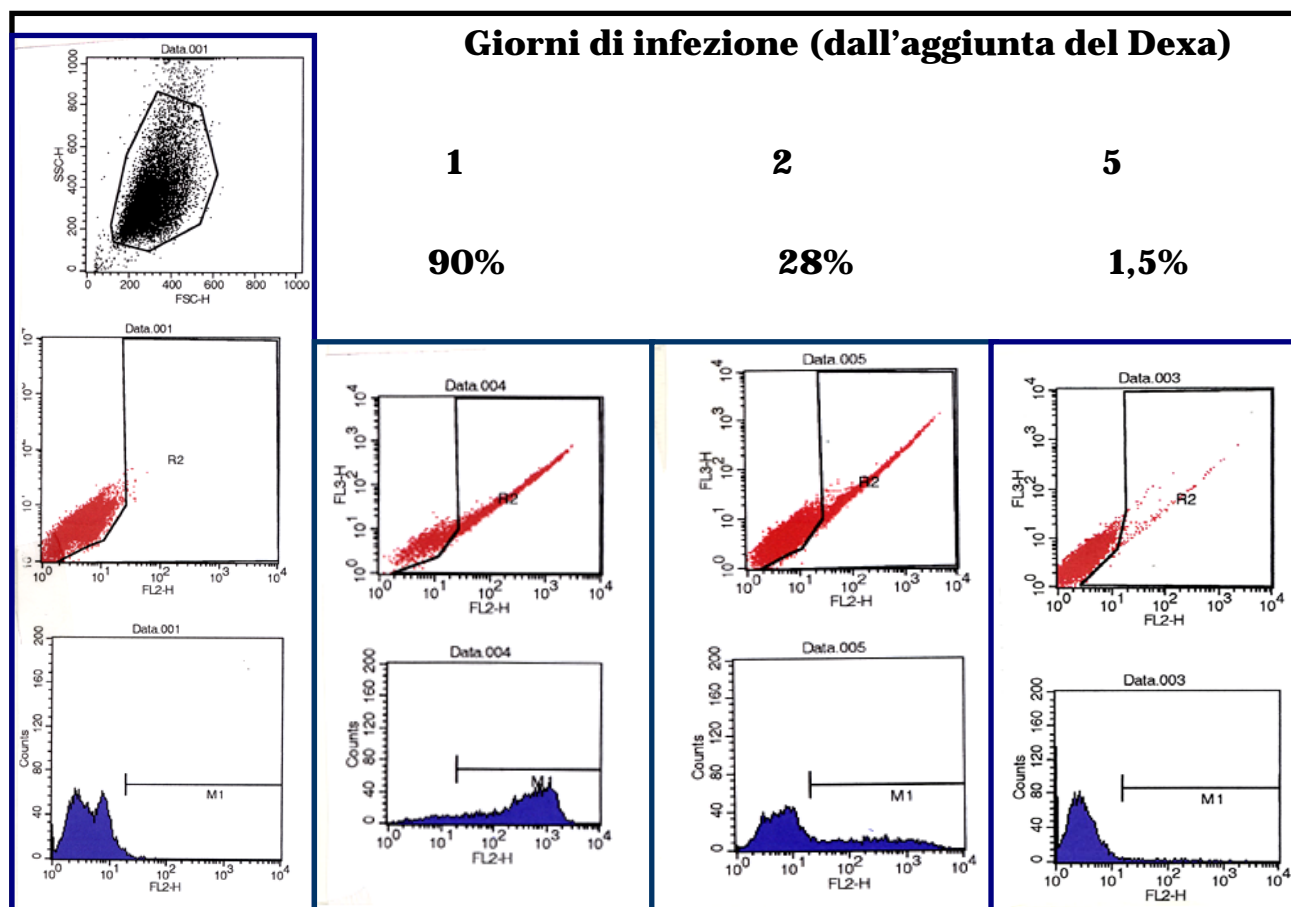
resistenza all'infezione da parte delle cellule quando organizzate in domes. Per verificare la prima ipotesi, cellule H441 non organizzate in domes sono state infettate a MOI 2000 in presenza di Dexametasone 50 nM, dopodiché sono state processate per analizzare la percentuale di cellule positive per l'epitopo delta- NGFR al citofluorimetro. La percentuale di cellule positive è risultata essere del 98% sia in assenza che in presenza di Dexametasone (Figura 17), dimostrando che quest'ultimo non ha alcun ruolo negativo nella capacità di infettare da parte del lentivirus.



**Figura 17** . Il Dexametasone non inficia l'infezione delle H441 da parte del LV

La seconda ipotesi è stata confermata infettando le cellule con il Lentivirus a MOI 2000 a giorni differenti; in particolare il LV è stato aggiunto in alcuni pozzetti il primo giorno dell'aggiunta del dexametasone (a 48 ore dalla semina), in altri è stato aggiunto il giorno successivo e così via.

Quello che si è potuto osservare con chiarezza è che le cellule diventano man mano più resistenti all'infezione dopo ogni giorno di trattamento con dexametasone, nel loro organizzarsi in domes.



**Figura 18** . Le cellule H441 diventano resistenti all'infezione dopo ogni giorno di trattamento con Dexametasone

Giorno di infezione (dall'aggiunta di Dexametasone)	Percentuale cellule positive
1	90,2 %
2	28,1 %
5	1,5 %
7	0,6%

Dunque per gli esperimenti di efficacia del LV abbiamo deciso di infettare le cellule lo stesso giorno dell'aggiunta del Dexametasone, in modo da ottenere la massima efficienza di infezione.



#### 4.2.6 Valutazione dell'efficacia del LV $\alpha$ ENaC

Dopodichè si è proceduto all'infezione dei domes e alla valutazione dell'effetto del lentivirus sull'espressione della subunità  $\alpha$ ENaC sia tramite membrane potential assay, sia tramite real time PCR, nelle condizioni di stimolazione continua con dexametasone, stimolazione per 6 ore e senza stimolazione.

Come descritto in precedenza, le cellule, piastrate nella piastra da 96 pozzetti, sono state infettate lo stesso giorno della prima aggiunta del dexametasone e lasciate crescere per 8 giorni. Come controllo negativo le cellule sono state infettate con un secondo lentivirus che non contiene la cassetta di RNAinterference specifica per l' $\alpha$ ENaC, ma per il gene della GFP.

L'ottavo giorno è stato aggiunto dexametasone in un gruppo di cellule fino ad allora non stimolate, e 6 ore dopo si è proceduto nel seguente modo:

Un primo gruppo di cellule è stato analizzato per l'efficienza di infezione tramite citofluorimetria; un secondo gruppo è stato lisato e l'RNA è stato recuperato per l'analisi tramite Real Time; un terzo gruppo è stato utilizzato per il membrane potential assay.

I dati di citofluorimetria hanno indicato una percentuale di cellule positive per l'epitopo NGFR di circa l'80%.

Il membrane potential assay dimostra ancora una volta che, in condizioni basali, vi è un aumento della fluorescenza in seguito alla stimolazione con dexametasone e che l'amiloride riporta la fluorescenza ottenuta in presenza di dexametasone a valori di quella ottenuta in sua assenza (Figura 19). D'altro canto, i risultati dimostrano che in condizioni di stimolazione continua con dexametasone, il delta tra la condizione con LV di controllo senza amiloride e con amiloride è uguale a quello tra la condizione con LV $\alpha$ ENaC senza amiloride e con amiloride nella misurazione calcolata a 8 minuti, un tempo al quale l'amiloride ha già ridotto il segnale di fluorescenza di circa il 50% (Figura 20). Il delta calcolato allo stesso tempo per le condizioni di stimolazione per 6 ore e in assenza di stimolazione è diverso, ovvero l'attività dell'ENaC appare ridotta del 30%.

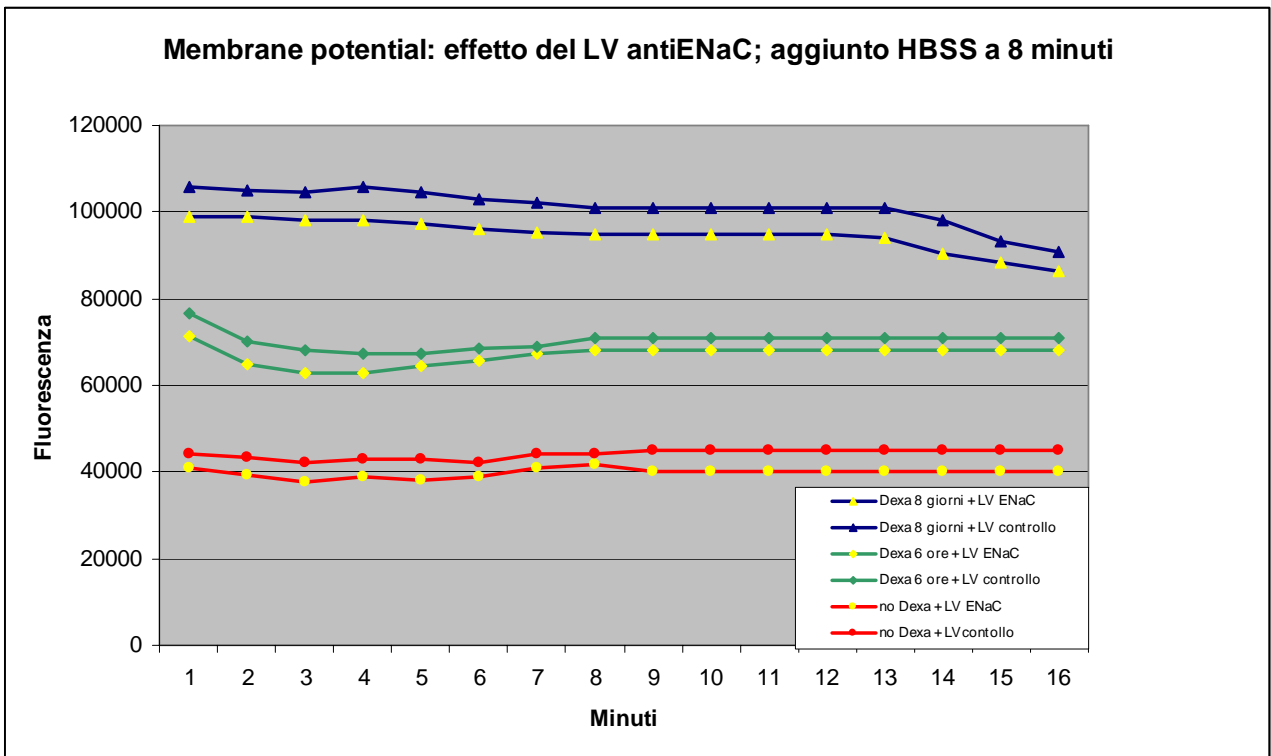
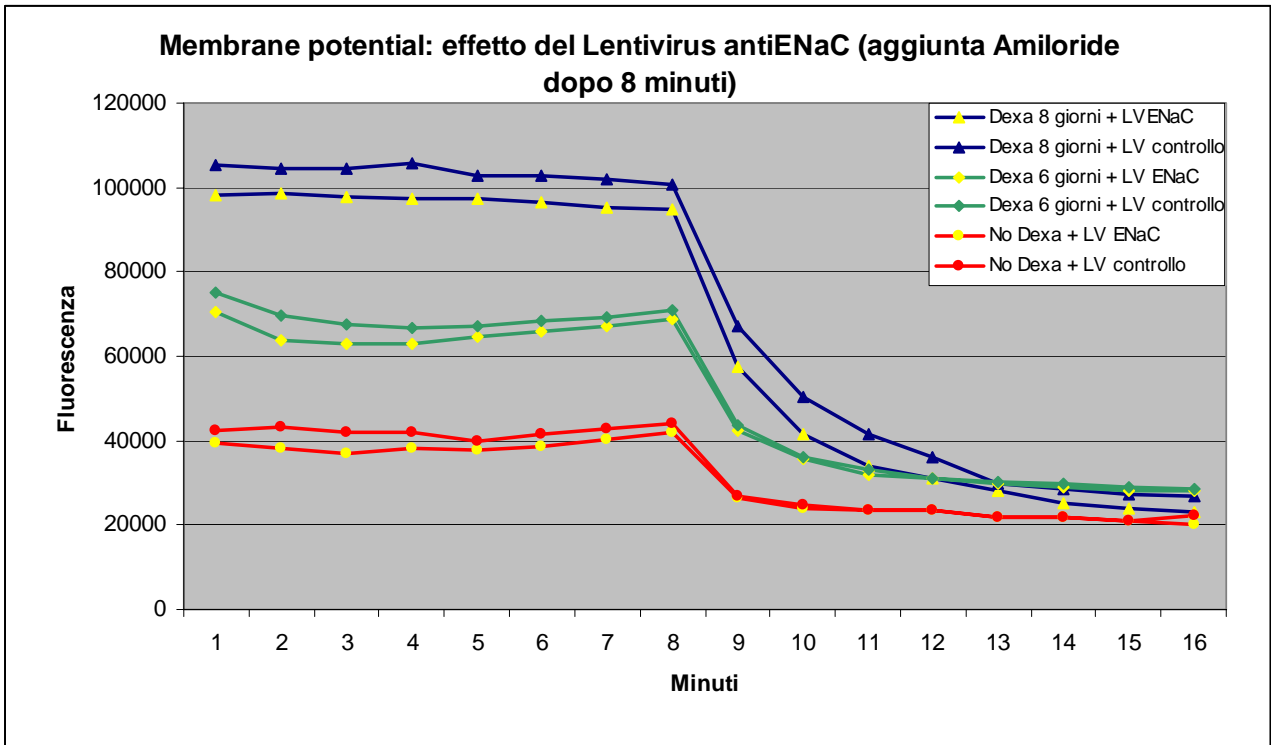
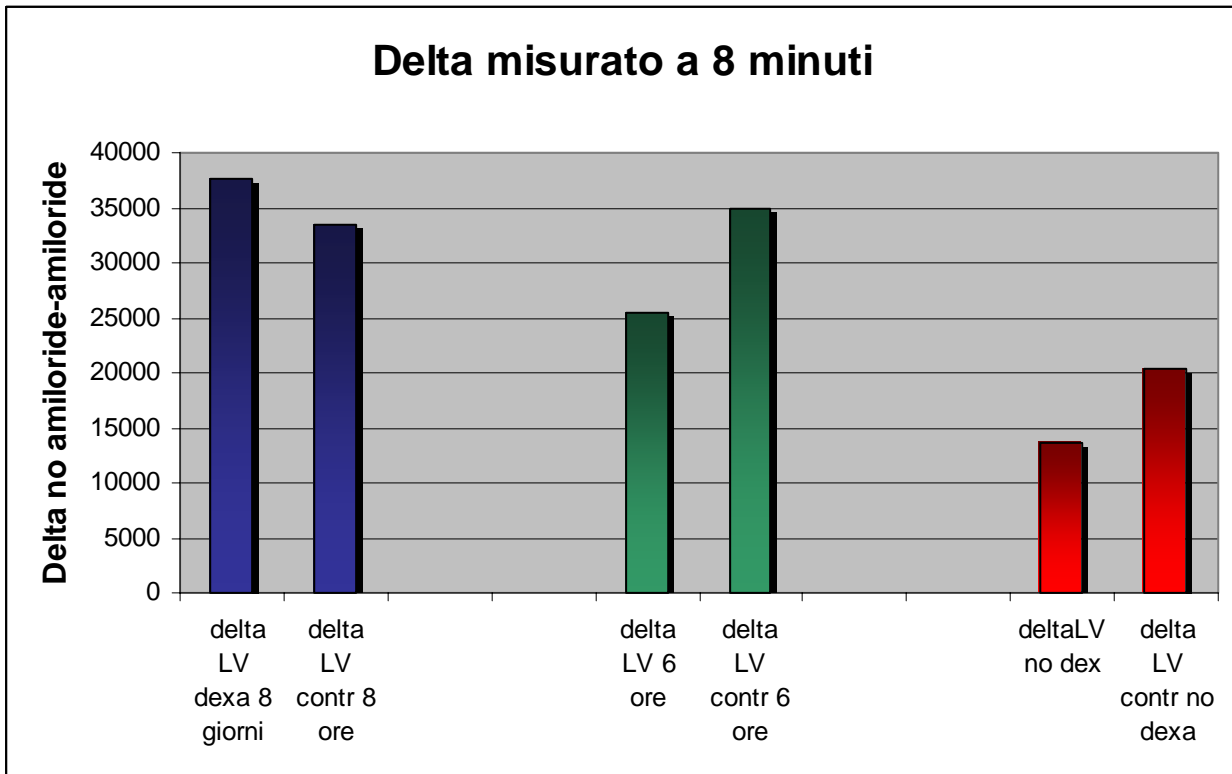
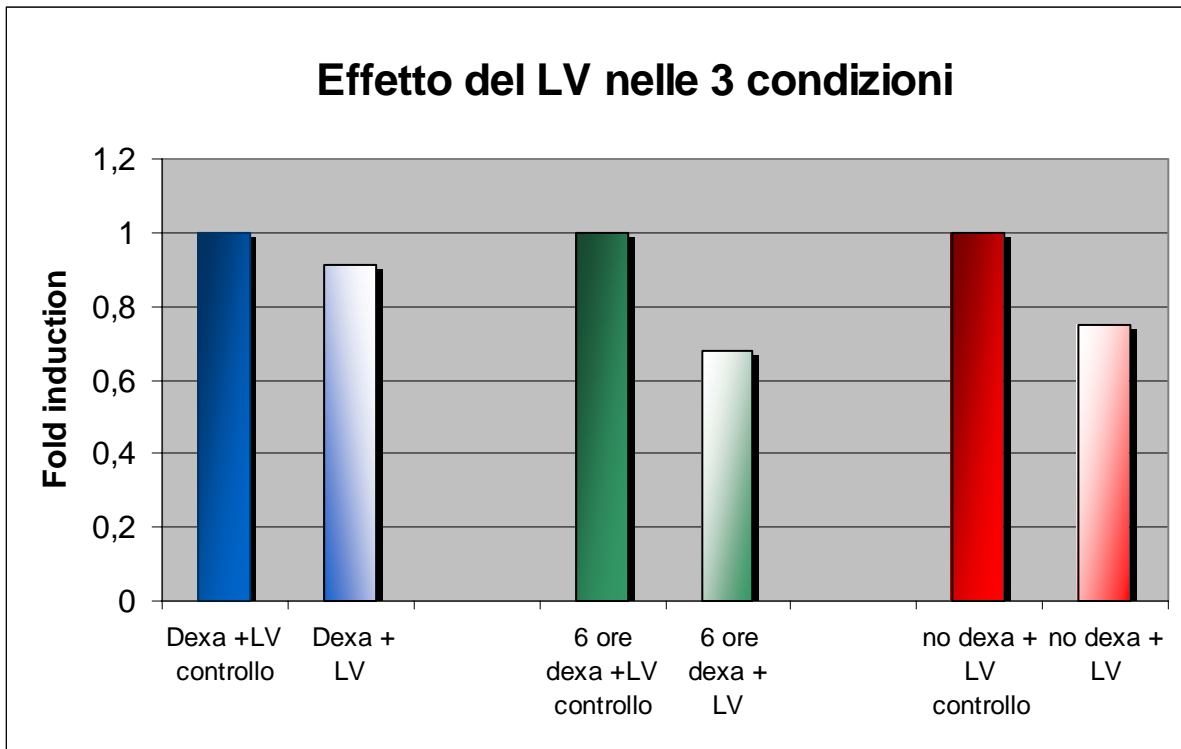


Fig 19. Membrane potential assay dopo infezione con LV $\alpha$ ENaC



**Figura 20** . Delta tra LV $\alpha$ ENaC e LV controllo senza amiloride-amiloride calcolato al minuto 8 nelle tre condizioni

L'analisi tramite Real Time PCR ha dimostrato un effetto di riduzione dell'mRNA della subunità  $\alpha$  ENaC da parte del LV $\alpha$ ENaC rispetto al LV di controllo. In particolare la riduzione dell'mRNA della subunità  $\alpha$ , è del 30% in condizioni di assenza di stimolazione e in condizione di stimolazione per 6 ore con dexametasona, mentre è del 10% in condizioni di stimolazione continuata con dexametasona. (figura 21).



**Figura 21.** Effetto del LV $\alpha$ ENaC sui livelli di mRNA della subunit $\alpha$  nelle tre condizioni

## ***5. DISCUSSIONE***

Lo scopo della terapia genica è quella di veicolare il gene corretto andando a ripristinare le funzionalità di un gene mutato; nella fibrosi cistica le diverse mutazioni interessano il gene codificante per il CFTR dando luogo a quadri clinici più o meno gravi. La strategia classica di terapia genica per tale patologia prevede dunque l'introduzione del gene wild-type codificante per il CFTR. Recentemente, è stata sviluppata una nuova strategia che si basa sulla scoperta del meccanismo di RNA interferenza, che, opportunamente modificato, può essere utilizzato per silenziare quei geni la cui sovraespressione è coinvolta nella patogenesi della malattia. Parallelamente al trasferimento di un gene CFTR wild-type, questo progetto si è anche occupato di silenziare l'ENaC mediante questa tecnica in cellule modello per la fibrosi cistica.

Differenti vettori di trasferimento genico sono stati sviluppati nel corso degli anni; in particolare i vettori derivati dai lentivirus mostrano una serie di vantaggi: sono in grado di veicolare materiale genetico in cellule quiescenti, e questa caratteristica, considerando il basso indice mitotico delle cellule epiteliali delle vie aeree, fa sì che possano essere considerati dei candidati ideali per la terapia genica a livello polmonare. Inoltre questi vettori sono in grado di integrare stabilmente il gene di interesse nelle cellule target, garantendo la persistenza dell'effetto terapeutico.

Dati non ancora pubblicati, prodotti nel nostro laboratorio, hanno dimostrato che l'espressione di un gene reporter (Firefly Luciferasi) veicolato da lentivirus sotto controllo di un promotore CMV somministrato per via intratracheale in topi C57Bl/6, è rilevabile nel polmone anche a 6 mesi dalla somministrazione intratracheale.

Inoltre uno studio *in vitro*, condotto sempre nel nostro laboratorio, che ha analizzato il profilo di espressione delle citochine e chemochine infiammatorie, nonché di fattori quali NF-KB e ICAM-1, ha dimostrato il basso profilo infiammatorio del LV rispetto ad un Adenovirus di controllo, il quale è altamente infiammatorio (dati non pubblicati).

Lo scopo principale della tesi è stato quello di realizzare un vettore lentivirale di terza generazione veicolante la sequenza del CFTR wild-type; per poter distinguere poi il CFTR esogeno dal CFTR endogeno, la strategia ha previsto l'inserimento di un tag (C-MYC nel nostro caso) all'estremità della sequenza codificante per il CFTR, in modo da ottenere una proteina di fusione, distinguibile dalla proteina endogena.

L'efficienza di impacchettamento dei lentivirus dipende dalle dimensioni del gene che si vuole veicolare; per cui ridurre le dimensioni del gene stesso può essere utile ai fini dell'efficienza di produzione del lentivirus stesso.

A tal proposito è stata presa in considerazione l'evidenza che la porzione N-terminale del CFTR, (in particolare i primi 633 amminoacidi) è in grado, associandosi alle proteine con la mutazione  $\Delta F508$ ,

di fornire in trans quei segnali necessari affinché le proteine mutate riescano a superare il controllo di qualità del reticolo endoplasmatico, e raggiungano la membrana plasmatica (Cornet-Boyaka et al., 2004).

Il clonaggio dell'intera sequenza del CFTR nel vettore lentivirale è risultato difficoltoso data l'elevata instabilità segregazionale del plasmide durante la crescita di *E.Coli*. (Boyd et al., 1999). Inoltre, la sequenza stessa del CFTR presenta un sito criptico che viene riconosciuto da promotore procariotico in *E.Coli*, dando luogo a una serie di trascritti che risultano essere tossici per il batterio stesso.

Per cui, la nostra attenzione si è focalizzata maggiormente sul clonaggio della sequenza N terminale del CFTR. Una volta ottenuto il plasmide lentivirale contenente tale sequenza si è proceduto alla realizzazione del relativo vettore lentivirale: il plasmide esprime correttamente il CFTR fuso al tag C-MYC, tuttavia l'efficienza di impacchettamento di tale vettore è risultata molto bassa, con titoli virali inferiori a quelli attesi, e inutilizzabili per esperimenti *in vitro*.

Studi successivi saranno volti al tentativo di ottenere un titolo virale significativamente più alto, introducendo delle modifiche al protocollo di produzione del LV; a tal proposito, la somministrazione di Sodio Butirrato in seguito alla transfezione, potrebbe essere d'aiuto, dal momento che tale composto attiva l'espressione genica diretta dalle LTR del virus e aumenta l'attività dell'enhancer CMV (Sakoda et al., 1999).

Parallelamente al tentativo di realizzazione di un lentivirus veicolante la sequenza del CFTR, lo studio si è focalizzato sull'ENaC, a causa della crescente importanza che è stata attribuita a tale canale nella patogenesi della fibrosi cistica. Il canale è iperattivo nella fibrosi cistica e un importante contributo a tale teoria è stato fornito dal lavoro del gruppo di Richard Boucher a Chapel Hill (Mall et al., 2004), in cui si è dimostrato che topi che sovraesprimono tale canale, mostrano un fenotipo FC, a differenza ad esempio delle linee murine che presentano difetti nel CFTR e che non presentano un fenotipo FC e che dunque rappresentano un modello murino relativamente adatto allo studio della malattia. D'altra parte, è stato dimostrato come la sottoregolazione di tale canale, possa risultare in un effetto benefico; per esempio, la stimolazione acuta di amiloride, un bloccante specifico del canale epiteliale del sodio, stimola la clearance mucociliare nei pazienti.

A tal proposito lo scopo del lavoro è stato quello di combinare la tecnica dell'RNA interferenza con l'utilizzo dei vettori lentivirali per le loro peculiari caratteristiche già elencate.

E' stato dunque realizzato un vettore lentivirale di terza generazione veicolante una cassetta di RNA interferenza diretto contro la subunità  $\alpha$  dell'ENaC.

L'effetto di tale vettore è stato valutato a due livelli:

- 1) sull'espressione del gene tramite quantificazione dell'mRNA (Real-Time PCR)
- 2) sull'attività dell'ENaC (Membrane Potential assay)

Come si evince dai dati di Real-Time PCR, l'espressione della subunità  $\alpha$  di ENaC nella linea cellulare H441 aumenta sensibilmente con il trattamento al dexametasone; già 6 ore di stimolazione con questo glucorticoide, sono sufficienti ad aumentare il livello di espressione di 1,6 volte.

La stimolazione continua e giornaliera con dexametasone aumenta sensibilmente il livello di espressione di  $\alpha$ ENaC (più di 3 volte) e fa sì che le H441 si organizzino in strutture polarizzate (dette domes), nelle quali l'ENaC, è localizzato in membrana, ottenendo così un valido modello di studio funzionale *in vitro* in condizioni di sovraespressione del canale stesso.

Le stesse cellule organizzate in domes presentano delle peculiarità, mostrando marker di differenziamento epiteliale (Shlyonsky et al., 2005).

Una prima evidenza sperimentale che si è ottenuta è che queste cellule sono resistenti all'infezione virale e ciò è probabilmente dovuta all'organizzazione polarizzata che presentano queste cellule in seguito a stimolazione con dexametasone. La bassa efficienza di trasduzione di cellule epiteliali respiratorie polarizzate è stato già precedentemente descritto in lavori precedenti (Johnson et al., 2000).

Per poter valutare l'efficacia del LV il problema tecnico è stato dunque superato, infettando tali cellule prima della comparsa dei domes. Dopodiché si è valutato l'effetto del LV sia sull'espressione genica dell' $\alpha$ ENaC, sia sull'attività dell'ENaC tramite saggio funzionale (membrane potential assay).

L'attività dell'ENaC è stata valutata tramite il saggio del membrane potential assay. Come detto in precedenza, questo saggio è un metodo alternativo al Patch Clamp per misurare dei cambiamenti del potenziale di membrana dovuti ai canali ionici ed è basato sulla misura della fluorescenza emessa da una sonda lipofilica e anionica.

Il saggio è stato condotto nelle 3 condizioni:

- 1) stimolazione continua con dexametasone per 8 giorni
- 2) 6 ore di stimolazione con dexametasone
- 3) Assenza di stimolazione



Si è potuto evidenziare nettamente un aumento della fluorescenza in risposta alla stimolazione col dexametasone.

In questo saggio, è il delta tra la condizione senza amiloride e quella con amiloride che valuta la funzionalità di ENaC sulla membrana. In condizioni di sottoregolazione di ENaC si dovrebbe attendere una minore risposta all'amiloride. Nel nostro caso, così non è stato per la condizione di stimolazione continua con dexametasone, ovvero in presenza dei domes. Il delta ottenuto nelle cellule trattate con LV  $\alpha$ ENaC non cambia, suggerendo che il LV silenziante non è stato efficace in queste condizioni, mentre i dati di Real-Time indicherebbero comunque un effetto leggermente silenziante da parte del LV. Comunque, è stata trovata una correlazione nella diminuzione dell'attività (valutata come delta nel Membrane Potential Assay) e della quantità di mRNA dell' $\alpha$ ENaC nelle due altre condizioni, ovvero in assenza di stimolazione e con stimolazione per sole 6 ore. Pertanto, è possibile che la stimolazione continua porti a livelli di  $\alpha$ ENaC non più sottoregolabili dal LV $\alpha$ ENaC, ipotesi confortata dai dati di Real-Time che dimostrano un aumento di più di 3 volte di  $\alpha$ ENaC in queste condizioni sperimentali.

Va sottolineato che la condizione di stimolazione continua con dexametasone nella linea H441, che è comunque una linea tumorale, è stata presa in considerazione per ottenere un valido modello *in vitro* di studio dell'ENaC, in condizioni di sovraespressione del canale e che possa quindi mimare una condizione simile a quella CF.

D'altra parte è stata dimostrata una correlazione tra i livelli di mRNA della subunità  $\alpha$  dell'ENaC, (ma non delle subunità  $\beta$  e  $\gamma$ ) e la differenza di potenziale nasale in soggetti sani (Otulakowski et al., 1998).

Una espressione maggiore di tutte e tre le subunità è stata invece rilevata tramite Real Time PCR, nelle cellule epiteliali nasali di pazienti CF, rispetto a controlli non CF. In particolare i livelli di espressione di  $\alpha$ ENaC rispetto al controllo, vanno da 1,2 volte fino a 2,5 volte, e dunque l'aumento dell'espressione della subunità  $\alpha$  nei pazienti CF è paragonabile a quello ottenuto *in vitro* con stimolazione breve (6 ore) di Dexametasone (Bangel et al., 2007).

L'inibizione di  $\alpha$ ENaC non riesce da sola a determinare un effetto significativo sul potenziale di membrana valutato da questo saggio nelle condizioni di stimolazione continua con Dexametasone, quando cioè, i livelli di mRNA della subunità  $\alpha$  sono aumentati di circa 3 volte. A questo proposito, probabilmente un effetto sinergico di più cassette, dirette anche contro le altre subunità, potrebbe essere utile allo scopo di sottoregolare l'attività del canale anche in queste condizioni. In futuro verranno prodotti lentivirus veicolanti contemporaneamente cassette di RNA interferenza contro tutte e tre le subunità di ENaC nel tentativo di silenziare maggiormente il canale.

## ***6. BIBLIOGRAFIA***

- Afione, S. A., Conrad, C. K., Kearns, W. G., Chunduru, S., Adams, R., Reynolds, T. C., Guggino, W. B., Cutting, G. R., Carter, B. J., and Flotte, T. R. (1996). In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *J Virol* 70, 3235-3241.
- Alton, E., Geddes, D., Gill, D., Greening, A., Higgins, C., Hyde, S., Innes, J. A., Porteous, D., and Stern, M. (2000). Measure and interpretation of CF gene therapy trial results. *Mol Ther* 2, 3-4.
- Bangel, N., Dahlhoff, C., Sobczak, K., Weber, W. M., and Kusche-Vihrog, K. (2007). Upregulated expression of ENaC in human CF nasal epithelium. *J Cyst Fibros*.
- Bastian, A., and Schafer, H. (2001). Human alpha-defensin 1 (HNP-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul Pept* 101, 157-161.
- Bishop, A. E. (2004). Pulmonary epithelial stem cells. *Cell Prolif* 37, 89-96.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B., and Behr, J. P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7297-7301.
- Boyd, A. C., Popp, F., Michaelis, U., Davidson, H., Davidson-Smith, H., Doherty, A., McLachlan, G., Porteous, D. J., and Seeber, S. (1999). Insertion of natural intron 6a-6b into a human cDNA-derived gene therapy vector for cystic fibrosis improves plasmid stability and permits facile RNA/DNA discrimination. *J Gene Med* 1, 312-321.
- Boyle, M. P., Enke, R. A., Adams, R. J., Guggino, W. B., and Zeitlin, P. L. (2001). In utero AAV-mediated gene transfer to rabbit pulmonary epithelium. *Mol Ther* 4, 115-121.
- Bruscia, E. M., Price, J. E., Cheng, E. C., Weiner, S., Caputo, C., Ferreira, E. C., Egan, M. E., and Krause, D. S. (2006). Assessment of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) activity in CFTR-null mice after bone marrow transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 2965-2970.
- Carson, M. R., Travis, S. M., and Welsh, M. J. (1995). The two nucleotide-binding domains of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) have distinct functions in controlling channel activity. *J Biol Chem* 270, 1711-1717.

- Cheng, S. H., Gregory, R. J., Marshall, J., Paul, S., Souza, D. W., White, G. A., O'Riordan, C. R., and Smith, A. E. (1990). Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63, 827-834.
- Chmiel, J. F., Berger, M., and Konstan, M. W. (2002). The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 23, 5-27.
- Coburn, G. A., and Cullen, B. R. (2002). Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol* 76, 9225-9231.
- Cormet-Boyaka, E., Jablonsky, M., Naren, A. P., Jackson, P. L., Muccio, D. D., and Kirk, K. L. (2004). Rescuing cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-processing mutants by transcomplementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 8221-8226.
- Delenda, C. (2004). Lentiviral vectors: optimization of packaging, transduction and gene expression. *J Gene Med* 6 *Suppl 1*, S125-138.
- Driskell, R. A., and Engelhardt, J. F. (2003). Current status of gene therapy for inherited lung diseases. *Annu Rev Physiol* 65, 585-612.
- Ferrari, S., Geddes, D. M., and Alton, E. W. (2002). Barriers to and new approaches for gene therapy and gene delivery in cystic fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 1373-1393.
- Filali, M., Liu, X., Cheng, N., Abbott, D., Leontiev, V., and Engelhardt, J. F. (2002). Mechanisms of submucosal gland morphogenesis in the airway. *Novartis Found Symp* 248, 38-45; discussion 45-50, 277-282.
- Flotte, T., Carter, B., Conrad, C., Guggino, W., Reynolds, T., Rosenstein, B., Taylor, G., Walden, S., and Wetzel, R. (1996). A phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 7, 1145-1159.
- Follenzi, A., Ailles, L. E., Bakovic, S., Geuna, M., and Naldini, L. (2000). Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences. *Nat Genet* 25, 217-222.

- Follenzi, A., and Naldini, L. (2002). Generation of HIV-1 derived lentiviral vectors. *Methods Enzymol* 346, 454-465.
- Gasmi, M., Glynn, J., Jin, M. J., Jolly, D. J., Yee, J. K., and Chen, S. T. (1999). Requirements for efficient production and transduction of human immunodeficiency virus type 1-based vectors. *J Virol* 73, 1828-1834.
- Goldman, M. J., Lee, P. S., Yang, J. S., and Wilson, J. M. (1997). Lentiviral vectors for gene therapy of cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 8, 2261-2268.
- Graham, F. L., and Prevec, L. (1995). Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* 3, 207-220.
- Grubb, B. R., Pickles, R. J., Ye, H., Yankaskas, J. R., Vick, R. N., Engelhardt, J. F., Wilson, J. M., Johnson, L. G., and Boucher, R. C. (1994). Inefficient gene transfer by adenovirus vector to cystic fibrosis airway epithelia of mice and humans. *Nature* 371, 802-806.
- Halbert, C. L., Standaert, T. A., Aitken, M. L., Alexander, I. E., Russell, D. W., and Miller, A. D. (1997). Transduction by adeno-associated virus vectors in the rabbit airway: efficiency, persistence, and readministration. *J Virol* 71, 5932-5941.
- Halbert, C. L., Standaert, T. A., Wilson, C. B., and Miller, A. D. (1998). Successful readministration of adeno-associated virus vectors to the mouse lung requires transient immunosuppression during the initial exposure. *J Virol* 72, 9795-9805.
- Howard, M., Frizzell, R. A., and Bedwell, D. M. (1996). Aminoglycoside antibiotics restore CFTR function by overcoming premature stop mutations. *Nat Med* 2, 467-469.
- Hyde, S. C., Southern, K. W., Gileadi, U., Fitzjohn, E. M., Mofford, K. A., Waddell, B. E., Gooi, H. C., Goddard, C. A., Hannavy, K., Smyth, S. E., *et al.* (2000). Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther* 7, 1156-1165.
- Jiang, C., O'Connor, S. P., Fang, S. L., Wang, K. X., Marshall, J., Williams, J. L., Wilburn, B., Echelard, Y., and Cheng, S. H. (1998). Efficiency of cationic lipid-mediated transfection of polarized and differentiated airway epithelial cells in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 9, 1531-1542.

- Johnson, L. G., Olsen, J. C., Naldini, L., and Boucher, R. C. (2000). Pseudotyped human lentiviral vector-mediated gene transfer to airway epithelia in vivo. *Gene Ther* 7, 568-574.
- Joseph, P. M., O'Sullivan, B. P., Lapey, A., Dorkin, H., Oren, J., Balfour, R., Perricone, M. A., Rosenberg, M., Wadsworth, S. C., Smith, A. E., *et al.* (2001). Aerosol and lobar administration of a recombinant adenovirus to individuals with cystic fibrosis. I. Methods, safety, and clinical implications. *Hum Gene Ther* 12, 1369-1382.
- Ketzinel-Gilad, M., Shaul, Y., and Galun, E. (2006). RNA interference for antiviral therapy. *J Gene Med* 8, 933-950.
- Kobinger, G. P., Weiner, D. J., Yu, Q. C., and Wilson, J. M. (2001). Filovirus-pseudotyped lentiviral vector can efficiently and stably transduce airway epithelia in vivo. *Nat Biotechnol* 19, 225-230.
- Kohler, D., App, E., Schmitz-Schumann, M., Wurtemberger, G., and Matthys, H. (1986). Inhalation of amiloride improves the mucociliary and the cough clearance in patients with cystic fibrosis. *Eur J Respir Dis Suppl* 146, 319-326.
- Konstan, M. W., Davis, P. B., Wagener, J. S., Hilliard, K. A., Stern, R. C., Milgram, L. J., Kowalczyk, T. H., Hyatt, S. L., Fink, T. L., Gedeon, C. R., *et al.* (2004). Compacted DNA nanoparticles administered to the nasal mucosa of cystic fibrosis subjects are safe and demonstrate partial to complete cystic fibrosis transmembrane regulator reconstitution. *Hum Gene Ther* 15, 1255-1269.
- Kovesdi, I., Brough, D. E., Bruder, J. T., and Wickham, T. J. (1997). Adenoviral vectors for gene transfer. *Curr Opin Biotechnol* 8, 583-589.
- Kunzelmann, K., Schreiber, R., and Boucherot, A. (2001). Mechanisms of the inhibition of epithelial Na<sup>(+)</sup> channels by CFTR and purinergic stimulation. *Kidney Int* 60, 455-461.
- Lee, T. W., Matthews, D. A., and Blair, G. E. (2005). Novel molecular approaches to cystic fibrosis gene therapy. *Biochem J* 387, 1-15.
- Li, S., and Huang, L. (1997). In vivo gene transfer via intravenous administration of cationic lipid-protamine-DNA (LPD) complexes. *Gene Ther* 4, 891-900.

- Li, T., and Folkesson, H. G. (2006). RNA interference for alpha-ENaC inhibits rat lung fluid absorption in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290, L649-L660.
- Lim, F. Y., Kobinger, G. P., Weiner, D. J., Radu, A., Wilson, J. M., and Crombleholme, T. M. (2003). Human fetal trachea-SCID mouse xenografts: efficacy of vesicular stomatitis virus-G pseudotyped lentiviral-mediated gene transfer. *J Pediatr Surg* 38, 834-839.
- Limberis, M., Anson, D. S., Fuller, M., and Parsons, D. W. (2002). Recovery of airway cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function in mice with cystic fibrosis after single-dose lentivirus-mediated gene transfer. *Hum Gene Ther* 13, 1961-1970.
- Loi, R., Beckett, T., Goncz, K. K., Suratt, B. T., and Weiss, D. J. (2006). Limited restoration of cystic fibrosis lung epithelium in vivo with adult bone marrow-derived cells. *Am J Respir Crit Care Med* 173, 171-179.
- Lukacs, G. L., Haggie, P., Seksek, O., Lechardeur, D., Freedman, N., and Verkman, A. S. (2000). Size-dependent DNA mobility in cytoplasm and nucleus. *J Biol Chem* 275, 1625-1629.
- Mall, M., Grubb, B. R., Harkema, J. R., O'Neal, W. K., and Boucher, R. C. (2004). Increased airway epithelial Na<sup>+</sup> absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice. *Nat Med* 10, 487-493.
- Medina, M. F., Kobinger, G. P., Rux, J., Gasmi, M., Looney, D. J., Bates, P., and Wilson, J. M. (2003). Lentiviral vectors pseudotyped with minimal filovirus envelopes increased gene transfer in murine lung. *Mol Ther* 8, 777-789.
- Michienzi, A., Conti, L., Varano, B., Prislei, S., Gessani, S., and Bozzoni, I. (1998). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by nuclear chimeric anti-HIV ribozymes in a human T lymphoblastoid cell line. *Hum Gene Ther* 9, 621-628.
- Oliver, A., Canton, R., Campo, P., Baquero, F., and Blazquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288, 1251-1254.
- Otulakowski, G., Flueckiger-Staub, S., Ellis, L., Ramlall, K., Staub, O., Smith, D., Durie, P., and O'Brodovich, H. (1998). Relation between alpha, beta, and gamma human amiloride-sensitive

epithelial Na<sup>+</sup> channel mRNA levels and nasal epithelial potential difference in healthy men. *Am J Respir Crit Care Med* *158*, 1213-1220.

Pedemonte, N., Lukacs, G. L., Du, K., Caci, E., Zegarra-Moran, O., Galiotta, L. J., and Verkman, A. S. (2005). Small-molecule correctors of defective DeltaF508-CFTR cellular processing identified by high-throughput screening. *J Clin Invest* *115*, 2564-2571.

Pickles, R. J., Fahrner, J. A., Petrella, J. M., Boucher, R. C., and Bergelson, J. M. (2000). Retargeting the coxsackievirus and adenovirus receptor to the apical surface of polarized epithelial cells reveals the glycocalyx as a barrier to adenovirus-mediated gene transfer. *J Virol* *74*, 6050-6057.

Pilewski, J. M., and Frizzell, R. A. (1999). Role of CFTR in airway disease. *Physiol Rev* *79*, S215-255.

Pons, G., Marchand, M. C., d'Athis, P., Sauvage, E., Foucard, C., Chaumet-Riffaud, P., Sautegeau, A., Navarro, J., and Lenoir, G. (2000). French multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial on nebulized amiloride in cystic fibrosis patients. The Amiloride-AFLM Collaborative Study Group. *Pediatr Pulmonol* *30*, 25-31.

Qin, X. F., An, D. S., Chen, I. S., and Baltimore, D. (2003). Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 183-188.

Raoul, C., Barker, S. D., and Aebischer, P. (2006). Viral-based modelling and correction of neurodegenerative diseases by RNA interference. *Gene Ther* *13*, 487-495.

Ratjen, F., and Doring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet* *361*, 681-689.

Ren, C. L. (2002). Use of modulators of airways inflammation in patients with CF. *Clin Rev Allergy Immunol* *23*, 29-39.

Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J. L., and et al. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* *245*, 1066-1073.



- Ryther, R. C., Flynt, A. S., Phillips, J. A., 3rd, and Patton, J. G. (2005). siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther* 12, 5-11.
- Sakoda, T., Kasahara, N., Hamamori, Y., and Kedes, L. (1999). A high-titer lentiviral production system mediates efficient transduction of differentiated cells including beating cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31, 2037-2047.
- Samulski, R. J., Chang, L. S., and Shenk, T. (1989). Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63, 3822-3828.
- Sawa, T., Miyazaki, H., Pittet, J. F., Widdicombe, J. H., Gropper, M. A., Hashimoto, S., Conrad, D. J., Folkesson, H. G., Debs, R., Forsayeth, J. R., *et al.* (1996). Intraluminal water increases expression of plasmid DNA in rat lung. *Hum Gene Ther* 7, 933-941.
- Scherr, M., Battmer, K., Schultheis, B., Ganser, A., and Eder, M. (2005). Stable RNA interference (RNAi) as an option for anti-bcr-abl therapy. *Gene Ther* 12, 12-21.
- Shlyonsky, V., Goolaerts, A., Van Beneden, R., and Sariban-Sohraby, S. (2005). Differentiation of epithelial Na<sup>+</sup> channel function. An in vitro model. *J Biol Chem* 280, 24181-24187.
- Short, D. B., Trotter, K. W., Reczek, D., Kreda, S. M., Bretscher, A., Boucher, R. C., Stutts, M. J., and Milgram, S. L. (1998). An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 273, 19797-19801.
- Stern, R. C. (1997). The diagnosis of cystic fibrosis. *N Engl J Med* 336, 487-491.
- Tarantal, A. F., McDonald, R. J., Jimenez, D. F., Lee, C. C., O'Shea, C. E., Leapley, A. C., Won, R. H., Plopper, C. G., Lutzko, C., and Kohn, D. B. (2005). Intrapulmonary and intramyocardial gene transfer in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): safety and efficiency of HIV-1-derived lentiviral vectors for fetal gene delivery. *Mol Ther* 12, 87-98.
- Vankeerberghen, A., Cuppens, H., and Cassiman, J. J. (2002). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 1, 13-29.

- Virella-Lowell, I., Zusman, B., Foust, K., Loiler, S., Conlon, T., Song, S., Chesnut, K. A., Ferkol, T., and Flotte, T. R. (2005). Enhancing rAAV vector expression in the lung. *J Gene Med* 7, 842-850.
- Wagner, J. A., Moran, M. L., Messner, A. H., Daifuku, R., Conrad, C. K., Reynolds, T., Guggino, W. B., Moss, R. B., Carter, B. J., Wine, J. J., *et al.* (1998). A phase I/II study of tgAAV-CF for the treatment of chronic sinusitis in patients with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 9, 889-909.
- Wang, G., Slepushkin, V., Zabner, J., Keshavjee, S., Johnston, J. C., Sauter, S. L., Jolly, D. J., Dubensky, T. W., Jr., Davidson, B. L., and McCray, P. B., Jr. (1999). Feline immunodeficiency virus vectors persistently transduce nondividing airway epithelia and correct the cystic fibrosis defect. *J Clin Invest* 104, R55-62.
- Wilschanski, M., Yahav, Y., Yaacov, Y., Blau, H., Bentur, L., Rivlin, J., Aviram, M., Bdolah-Abram, T., Bebok, Z., Shushi, L., *et al.* (2003). Gentamicin-induced correction of CFTR function in patients with cystic fibrosis and CFTR stop mutations. *N Engl J Med* 349, 1433-1441.
- Wine, J. J. (1999). The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J Clin Invest* 103, 309-312.
- Xu, Y., and Szoka, F. C., Jr. (1996). Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection. *Biochemistry* 35, 5616-5623.
- Yew, N. S., Wang, K. X., Przybylska, M., Bagley, R. G., Stedman, M., Marshall, J., Scheule, R. K., and Cheng, S. H. (1999). Contribution of plasmid DNA to inflammation in the lung after administration of cationic lipid:pDNA complexes. *Hum Gene Ther* 10, 223-234.
- Yilmaz, A., Fernandez, S., Lairmore, M. D., and Boris-Lawrie, K. (2006). Coordinate enhancement of transgene transcription and translation in a lentiviral vector. *Retrovirology* 3, 13.
- Zhou, H., Pastore, L., and Beaudet, A. L. (2002). Helper-dependent adenoviral vectors. *Methods Enzymol* 346, 177-198.
- Ziady, A. G., Davis, P. B., and Konstan, M. W. (2003). Non-viral gene transfer therapy for cystic fibrosis. *Expert Opin Biol Ther* 3, 449-458.

Zuckerman, J. B., Robinson, C. B., McCoy, K. S., Shell, R., Sferra, T. J., Chirmule, N., Magosin, S. A., Propert, K. J., Brown-Parr, E. C., Hughes, J. V., *et al.* (1999). A phase I study of adenovirus-mediated transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene to a lung segment of individuals with cystic fibrosis. *Hum Gene Ther* 10, 2973-2985.

Zufferey, R., Donello, J. E., Trono, D., and Hope, T. J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J Virol* 73, 2886-2892.

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R. J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J Virol* 72, 9873-9880.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R. J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nat Biotechnol* 15, 871-875.

## **RINGRAZIAMENTI**

Desidero ringraziare vivamente il Prof. Massimo Conese per avermi dato l'opportunità di lavorare presso l'Istituto per la terapia sperimentale della fibrosi cistica e per essersi dimostrato sempre aperto al dialogo e prodigo di consigli.

I miei sentiti ringraziamenti vanno anche alla Prof.ssa Carla Colombo per la sua disponibilità.

Un grazie particolare a tutto il gruppo di lavoro: a Elena, Lucia e Clara con le quali è stato un piacere lavorare e anche a tutte le altre ragazze del laboratorio, in particolare a Sara e Joanna.