

Università degli Studi di Napoli “Federico II”

**DOTTORATO IN
BIOCHIMICA E BIOLOGIA CELLULARE E MOLECOLARE**



Dipartimento di Biochimica e biotecnologie mediche

Tesi di dottorato

***APPROCCI SPERIMENTALI PER L'INTRODUZIONE DI
MECCANISMI DI LIMITAZIONE DELLA REPLICAZIONE DEL
DNA IN VETTORI EPISOMICI DERIVATI DA SV40.***

RELATORE
PROF. Vincenzo De Simone

CANDIDATO
Maria Romano

COORDINATORE
PROF. Giuseppe D'Alessio

SOMMARIO

L'attività svolta è stata prevalentemente indirizzata allo studio della possibilità di utilizzare per scopi di terapia genica repliconi, contenenti l'origine di replicazione di SV40, capaci di permanere in cellule umane (vettori episomici).

I due principali ostacoli sperimentali da noi affrontati sono i seguenti:

a. Il vettore, per potersi replicare in modo autonomo, necessita della proteina virale Large-T antigen (L-T), la quale però possiede attività trasformante, in quanto è capace di legare i due oncosoppressori p53 e pRB, inattivandoli.

b. Una eccessiva replicazione del vettore all'interno delle cellule bersaglio potrebbe essere nociva per la cellula stessa. E' pertanto necessario che la replicazione del vettore possa essere limitata o, meglio ancora, regolata.

Il primo problema è stato risolto mutagenizzando le regioni della proteina L-T, impegnate nel legame con le proteine pRB e p53, in modo da abolire le suddette interazioni, e quindi l'effetto trasformante, conservando però la capacità di promuovere la replicazione del DNA di SV40.

Per affrontare il secondo problema, abbiamo cercato, in primo luogo, di realizzare vettori ricombinanti nei quali le sequenze di origine virale fossero le minime indispensabili a garantire la replicazione del vettore. In particolare, il nostro obiettivo iniziale è stato quello di utilizzare un'origine di replicazione "a bassa efficienza" (la sequenza *core*), da complementare eventualmente con altri elementi di regolazione. Di conseguenza, abbiamo realizzato vettori contenenti delezioni progressive della regione ORI/ses di SV40, e di ciascuno è stata saggiata la capacità replicativa in diverse linee cellulari eucariotiche.

I risultati di questi studi hanno dimostrato che, a differenza di quanto finora descritto in letteratura, la sola presenza della sequenza *core* di SV40 è già di per se sufficiente per un'attiva replicazione episomica. D'altra parte, la rimozione di ulteriori sequenze dall'elemento *core* porta alla perdita completa della capacità replicativa.

Abbiamo quindi deciso di realizzare repliconi dotati di un sistema di auto-regolazione tale da mantenere il numero di copie del vettore a livelli molto bassi e quindi meglio compatibili con il funzionamento della cellula ospite. Pertanto, agendo sulla quantità e disponibilità della proteina virale L-T, abbiamo cercato di creare un meccanismo artificiale di controllo del numero di copie, basato su un meccanismo a feedback negativo, in analogia con i meccanismi di "*copy-control*" dei plasmidi di tipo ColE1. Questo sistema è stato realizzato mediante l'utilizzo di cassette di espressione per RNA interference capaci di inibire la trascrizione del gene L-T e, di conseguenza, la replicazione di vettori contenenti la regione ORI/ses di SV40.

L'efficacia di queste cassette di espressione è stata verificata:

- Selezionando linee cellulari stabilmente trasformate con vettori che esprimono shRNA "anti L-T" in modo costitutivo. In queste cellule, la replicazione di SV40 e dei vettori da esso derivati risulta notevolmente ridotta.

- Costruendo dei "prototipi" di vettore (repliconi) in cui abbiamo inserito la cassetta di espressione shRNA "anti L-T", a monte o nell'introne dell'unità trascrizionale "*early*" di SV40. L'analisi di questi repliconi è attualmente in corso.

SUMMARY

Our work was mostly addressed to study the replicative abilities in recombinant episomic vectors derived to SV40 virus.

The two most important obstacles to use replicons with the SV40 replication origin, able to be in human cells (episomic vectors) for gene therapy, are:

a. The vector needs a viral protein, Large-T antigen (L-T), to replicate itself independently, but L-T has got transforming activity, because it is able to join two oncosuppressors, p53 and pRB, inactivating them;

b. An excessive replication of our vector in the target cells could be toxic for them. Then is necessary that the vectorial replication could be limited or regulated.

The first problem is been resolved inducing a mutation in L-T to delete its ability to interact with p53 and pRB and consequently its transforming capacity, but conserving its ability to promote the DNA “target” replication.

For the second problem, we tried to realize recombinant vectors in which the viral origin sequences were the minimal indispensable to guarantee vectorial replication. In particular, our starting target was to use a replication origin with a low efficiency (*core* sequence) to eventually combine with regulation elements. Consequently we realized vectors with SV40 ORI/ses region progressive deletions and tested the replicative ability in various eucariotic cell lines for everyone.

The studies' results have shown that, to difference of as up to now described in literature, the only presence of the SV40 *core* sequence is already enough for an active episomic replication. On the other hand, if we remove another sequences of *core* element, it loses its replicative capacity.

Therefore, we have decided to realize some replicons with an auto-regulator system that holds the vectorial copies number in levels compatible with the host cell work. Then, we worked on the L-T amount and availability and we tried to create an artificial mechanism to control the copies number, based on a negative feedback cycle, according to ColE1-like plasmids “*copy-control*” mechanism. This system was realized with some expression cassette for RNA interference able to inhibit L-T genic transcription and, consequently, the replication of the SV40 vectorial region ORI/ses.

Their effectiveness has been verified:

- Selecting cellular lines firmly transformed in which SV40 and vectors come from it replication is strongly reduced.

- Inserting an “anti L-T” expression cassette up to the SV40 “*early*” transcriptional unit or in its intronic region.

I. INTRODUZIONE

I-A Vettori virali per terapia genica.

Nonostante gli indubbi progressi raggiunti, sono ancora pochissimi i tentativi di terapia genica per i quali si possa parlare, dal punto di vista clinico, di un successo, vero e proprio. Le numerose sperimentazioni in corso in tutto il mondo hanno soprattutto lo scopo di migliorare le conoscenze biologiche di base e le metodiche di terapia genica perché essa possa finalmente diventare uno strumento efficace [1,2].

L'efficienza di trasduzione di un gene esogeno in una cellula bersaglio dipende fortemente dal vettore scelto per veicolare il DNA all'interno della cellula. Lo studio e la ricerca di vettori utilizzabili in terapia genica con caratteristiche adatte al tipo di patologia su cui si vuole intervenire, alla lunghezza del gene che si vuole inserire, al tipo di tessuto bersaglio della terapia, alla quantità ed alla durata dell'espressione del prodotto genico, rimane quindi di primaria importanza [3].

Attualmente, la metodica di trasferimento di DNA in cellule eucariotiche che meglio si presta ad applicazioni di terapia genica, è quella che si avvale dell'uso di vettori virali. I **vettori virali** possono: recare DNA esogeno inserito all'interno del proprio genoma e replicarsi (eventualmente con l'aiuto di un virus "helper" o di una linea cellulare che esprima geni virali), infettare con efficienza le cellule ospiti e assemblarsi in particelle mature pronte a infettare nuove cellule. Il vantaggio legato all'uso di questi vettori risiede nella disponibilità di un sistema naturale ed efficiente per l'inserimento del DNA nelle cellule. Gli svantaggi, invece, consistono nell'inibizione dell'azione virale indotta dalle sintesi cellulari e nell'uccisione della cellula infettata.

Affinchè i virus possano essere adoperati come vettori per terapia genica, essi devono essere opportunamente modificati al fine di eliminare quanto più è possibile del genoma virale, spesso codificante per proteine patogene per la cellula ospite, allo scopo di fare "spazio" per accomodare il gene eterologo da trasdurre. Ciò, in genere, comporta la rimozione di geni codificanti per proteine strutturali (del capsido) o per fattori di regolazione richiesti per la replicazione del genoma virale. I prodotti dei geni "rimossi" possono essere forniti *in trans* durante la fase di produzione del virus ricombinante in cellule "packaging" appositamente ingegnerizzate, oppure da virus

“helper” incapaci di impacchettarsi. Alcune sequenze di DNA virale debbono, invece, essere sempre presenti nei vettori (sequenze *cis-acting*) perchè necessarie per la replicazione del genoma virale (ORI) e per l’incapsidazione (Ψ). Con queste procedure, si generano particelle virali incapaci di propagazione autonoma, ma in grado di trasdurre specificamente la nuova informazione genetica nelle cellule bersaglio [4].

I virus attualmente utilizzati come vettori di trasferimento genico sono suddivisi in due classi a seconda delle strategie impiegate per la loro sopravvivenza e replicazione: i virus non-litici (quali i retrovirus e i lentivirus) che producono virioni dalle membrane cellulari delle cellule infettate, lasciando le cellule ospiti intatte, e quelli litici (quali gli adenovirus e gli herpes simplex virus) che, dopo la loro replicazione e la formazione di virioni maturi, distruggono la cellula infettata.

Vettori retrovirali.

I retrovirus possono essere modificati per agire da vettori virali e utilizzati per introdurre il DNA estraneo in cellule di mammifero. I vantaggi legati all’utilizzo dei vettori retrovirali consistono, essenzialmente, in un’elevata efficienza nel trasformare stabilmente le cellule, e soprattutto, nell’integrazione sito-specifica del DNA esogeno all’interno del genoma delle cellule ospiti.

Un tipico vettore retrovirale consiste delle LTR e delle sequenze ad esso adiacenti mentre tutte, o la maggior parte, delle regioni che codificano per le funzioni virali sono sostituite da uno o più geni esogeni (transgeni). In effetti, le proteine virali necessarie alla formazione del virione maturo sono fornite in *trans*, mediante l’impiego di costrutti virali ausiliari che mancano dei segnali di incapsidazione, in modo tale da impedire il loro “packaging”.

Il vettore retrovirale può replicare come un virus se trasfettato in linee cellulari ingegnerizzate che esprimono i geni virali mancanti (linee cellulari “packaging”). In queste cellule, il DNA ricombinante viene trascritto e l’RNA viene incapsidato. Le particelle virali che ne risultano contengono perciò l’RNA virale ricombinante e gli enzimi virali *trascrittasi inversa* e *integrasi*, funzionando così, come vettori capaci di introdurre materiale genetico in cellule bersaglio, nel cui genoma, il DNA ricombinante si integra stabilmente, viene replicato ad ogni divisione cellulare, ed è trascritto come un qualsiasi gene endogeno.

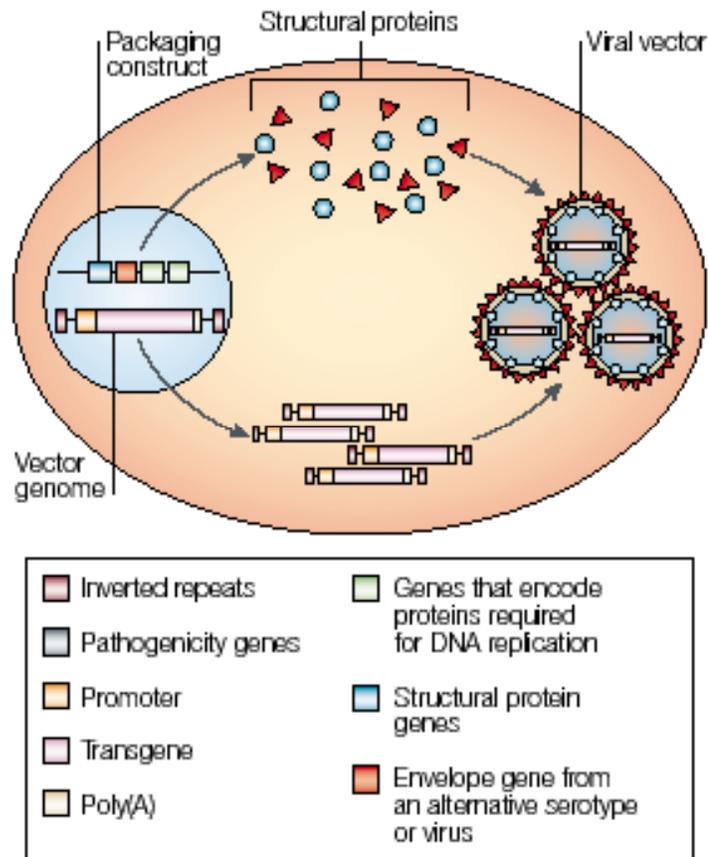


Figura 1: Vettori di origine virale.

Si ottengono inserendo il gene di interesse nel genoma di diversi tipi di virus, sotto il controllo di un promotore forte. I vettori virali sono **virus difettivi** perchè possono essere prodotti solo grazie a particolari linee cellulari (cellule *packaging*) capaci di complementare i difetti del virus. La loro preparazione deve seguire queste fasi obbligate: costruzione del genoma ricombinante, trasfezione del DNA nella linea cellulare capace di produrre le particelle virali, raccolta e analisi del virus ricombinante.

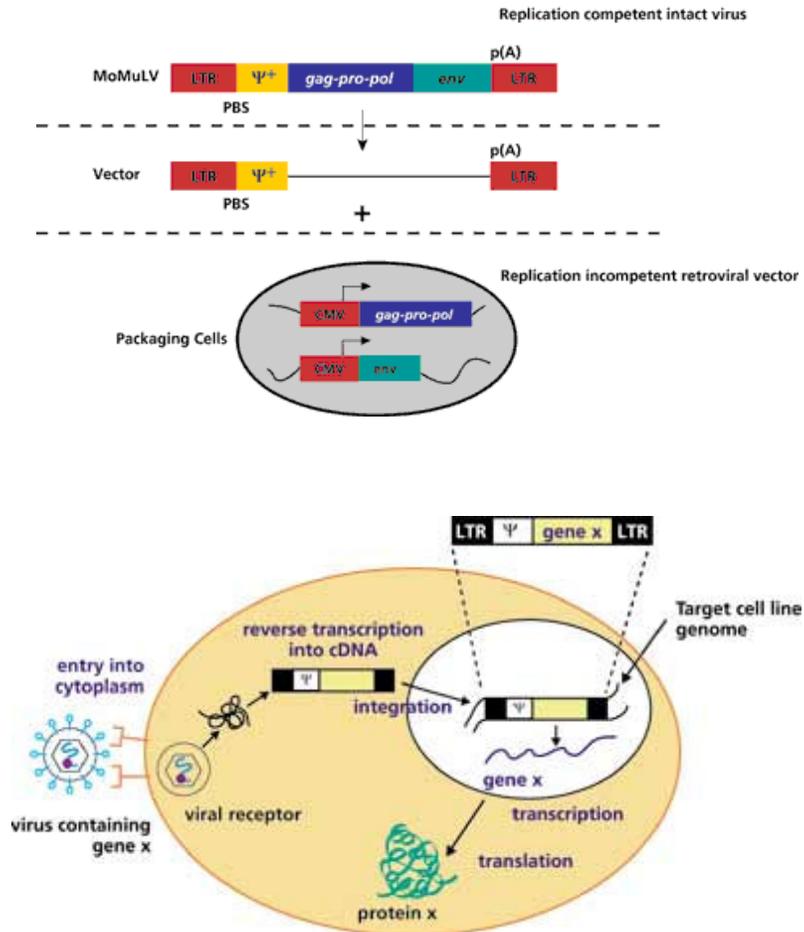


Figura 2: Vettori retrovirali.

I retrovirus sono particelle virali il cui genoma (7-11 Kb), può essere usato come “contenitore” per sequenze di DNA esogeno lunghe fino a 8 Kb, che possono essere inserite ed espresse al posto di alcuni geni virali. In particolare, un tipico vettore retrovirale contiene: le sequenze di DNA, importanti per la replicazione del virus (ORI), le sequenze codificanti esogene poste sotto il controllo di un promotore scelto, un marcatore selezionabile sotto il controllo del promotore virale, la sequenza di incapsidazione (Ψ), ma manca di tutti gli altri geni virali. Affinchè un vettore di questo tipo possa replicare come un virus, è necessario fornire in *trans* i geni mancanti. Si utilizzano perciò linee cellulari geneticamente ingegnerizzate che esprimono i geni virali a partire da promotori eterologhi (linee cellulari “packaging” o “helper”), in questo modo, l’RNA trascritto dal provirus endogeno produce tutte le proteine virali, ma è incapace di incapsidarsi, mentre l’RNA trascritto dal vettore virale viene incapsidato e rilasciato dalla cellula sotto forma di virione. Il virus ricombinante può essere utilizzato per infettare una coltura cellulare “bersaglio”, dove viene copiato in DNA a doppia elica dalla trascrittasi inversa e integrato nel genoma, rendendo la cellula ospite portatrice stabile del gene di interesse [5].

I-B Simian virus 40.

SV40, un *Polyomavirus* della famiglia Papovaviridae, fu scoperto nel 1960 come contaminante del vaccino anti-polio, distribuito a milioni di persone dal 1955 al 1963. SV40 trasforma molti tipi di cellule in coltura, comprese quelle di origine umana [6].

Il genoma di SV40 consiste di una molecola di DNA circolare a doppio filamento lunga 5243 coppie di basi (bp), contenente due unità trascrizionali chiamate regione precoce "early" e regione tardiva "late", in riferimento all'espressione temporale delle proteine codificate dalle due regioni durante il ciclo litico del virus [7]. SV40, utilizza al massimo la sua piccola quantità di informazione genetica mediante l'impiego di una singola regione regolativa, denominata **regione ORI/ses** dove sono presenti diversi elementi di regolazione dell'attività trascrizionale, e siti di legame per la proteina virale L-T antigen, che controlla sia la replicazione che l'espressione del genoma virale.

In particolare, la regione ORI/ ses comprende:

- L'origine di replicazione virale (Ori), presente all'interno di una regione regolativa, lunga circa 400 bp, localizzata tra l'inizio dell'unità trascrizionale "early" (nucleotide 5091) e quella "late" (nucleotide 252).
- Il promotore dell'unità trascrizionale "early".
- Il promotore dell'unità trascrizionale "late".
- Un *enhancer* trascrizionale, costituito da due ripetizioni di una sequenza di 72 bp con i siti di legame per più di 10 fattori trascrizionali, tra i quali AP1 e OCT-1.
- Una seconda regione di regolazione della trascrizione, costituita da tre ripetizioni di una sequenza di 21 bp, ciascuna contenente due siti di legame per il fattore trascrizionale SP1.
- Le sequenze di incapsidazione (ses), sovrapposte ed intersperse rispetto a quelle dell'origine della replicazione [8].

La regione ORI è stata ben studiata e caratterizzata nei suoi diversi elementi [9,10]. Essa è costituita da una regione centrale, detta *core* e da due regioni fiancheggianti dette *auxI* e *auxII*, che possono anche essere sostituite da regioni *enhancer*. La regione *core* è essenziale per la replicazione virale, mentre le due regioni fiancheggianti aumentano il livello di replicazione in maniera diversa a seconda del sistema e delle condizioni sperimentali adottati.

La regione *core* dell'origine di replicazione di SV40 comprende due regioni palindromiche di 15 e 27 coppie di basi (bp) ricche in adenina e timina (A+T rich). All'interno della palindroma da 27 bp è presente un sito di legame ad alta affinità per la proteina L-T (sito II). Il legame di L-T in tale sito rappresenta un'evento obbligatorio per l'inizio della replicazione del DNA virale.

La regione *auxI* è situata dal lato dell'unità trascrizionale "*early*" ed è costituita da due palindromi di 15 e 17 coppie di basi rispettivamente. La regione *auxII*, costituita da due delle tre ripetizioni da 21 coppie di basi, si trova invece verso l'unità trascrizionale "*late*". La proteina L-T regola la replicazione del DNA virale legandosi con affinità via via decrescente a tre siti presenti, rispettivamente, nelle regioni *auxI* (sito I), *core* (sito II), *auxII* (sito III).

Dopo 10-12 ore dall'infezione di cellule permissive inizia la trascrizione, ad opera della *RNA polimerasi II* della cellula ospite, dei geni codificanti la fase "*early*", con la produzione di un trascritto primario che, attraverso uno splicing alternativo, produce due mRNA che saranno tradotti poi nelle due proteine Large-T (L-T) e small-T (s-T) antigen.

La trascrizione della regione "*early*" è autoregolata mediante il legame dell'antigene L-T alla regione regolativa del genoma virale. Non appena aumenta nel nucleo la concentrazione di tale antigene, è repressa la trascrizione dei geni "*early*", mediante un legame diretto della proteina stessa all'origine di replicazione di SV40, ciò determina l'innesco della fase "*late*" dell'infezione virale.

Il promotore "*late*" è piuttosto forte ed è attivato dal legame di L-T alle ripetizioni di 21 bp presenti a monte del sito d'inizio della trascrizione. La trascrizione dei geni tardivi, che procede in direzione opposta a quella dei geni "*early*" determina la sintesi di tre proteine strutturali, responsabili della formazione del capsido virale: VP1, VP2 e VP3.

La proteina **small-T antigen** (s-T) non è essenziale per la replicazione del virus, ma indirettamente, tramite interazioni con proteine cellulari, incrementa la trascrizione a partire dal promotore della regione "*late*". Sembra, inoltre, che altre regioni di s-T siano implicate nell'incremento delle capacità trasformanti di Large-T antigen.

Large-T antigen (L-T) è una proteina multifunzionale, lunga 708 residui amminoacidici, essenziale per la replicazione. Oltre ad essere necessaria per iniziare la sintesi del DNA virale, stimola le cellule ospiti ad entrare nella fase S del ciclo

cellulare. Il genoma di SV40, essendo piuttosto piccolo, non codifica tutte le informazioni necessarie alla replicazione del DNA, perciò è necessario che la cellula ospite entri in fase S, dove il DNA cellulare e quello virale replicano insieme. Proprio grazie alla sua capacità di controllare il ciclo cellulare, L-T rappresenta la maggiore proteina ad attività trasformante di SV40. Infatti, il legame di questa molecola a proteine oncosoppressori tumorali (p53, pRb, p107 e p130/pRb2) determina l'ingresso del ciclo cellulare in fase G1, promuovendo contemporaneamente la replicazione del DNA. Inoltre, L-T si lega a p53, impedendo il riconoscimento di geni bersaglio da parte di quest'ultima e bloccando gli eventi cellulari che portano all'apoptosi.

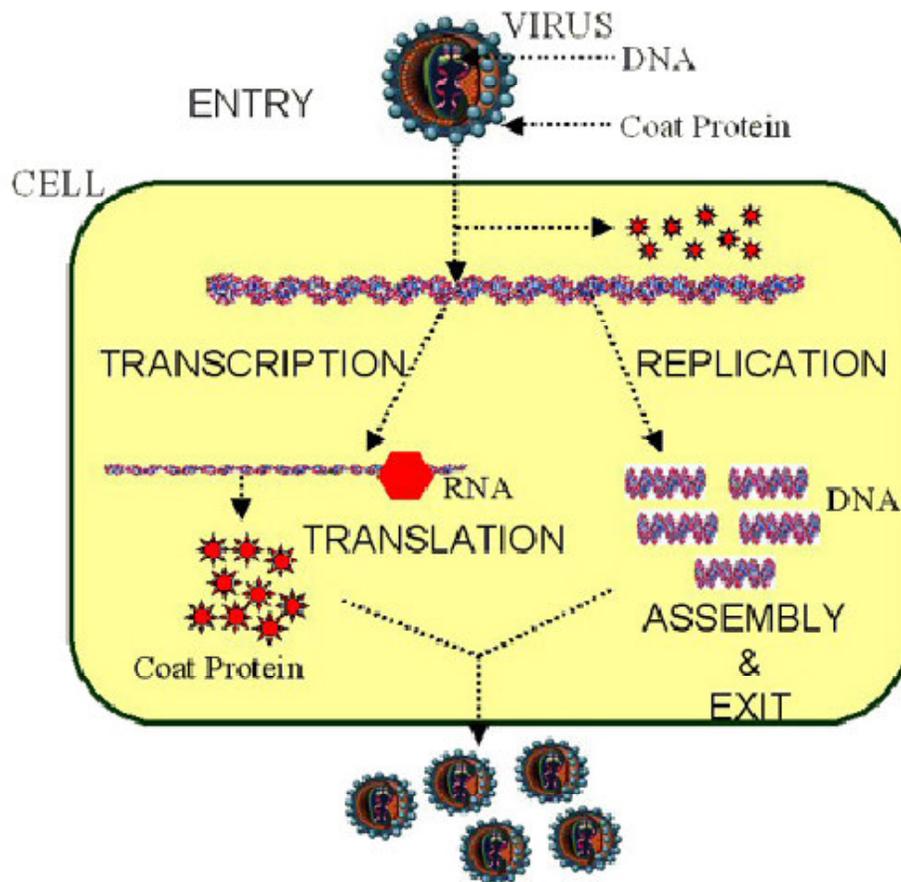


Figura 3: Simian virus 40.

L'attacco del virus alla superficie cellulare è mediato dall'interazione con le molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (MHCI), e il trasferimento all'interno della cellula avviene per endocitosi mediata dal sistema delle caveole. Attraverso un meccanismo di trasporto mediato dai microtubuli, il virus arriva nel citoplasma e da qui è indirizzato verso il nucleo. Si ipotizza che alterazioni conformazionali esponano i segnali di localizzazione nucleare (NLS) di una o più proteine capsidiche. Il trasporto all'interno del nucleo avverrebbe attraverso il complesso dei pori nucleari (NCP). Le proteine capsidiche durante il trasporto restano associate al DNA virale, ma la struttura del virione dev'essere, in qualche modo, alterata per permettere il passaggio attraverso i pori nucleari. Una volta all'interno del nucleo il capsido si disassembla ed il DNA virale è espresso.

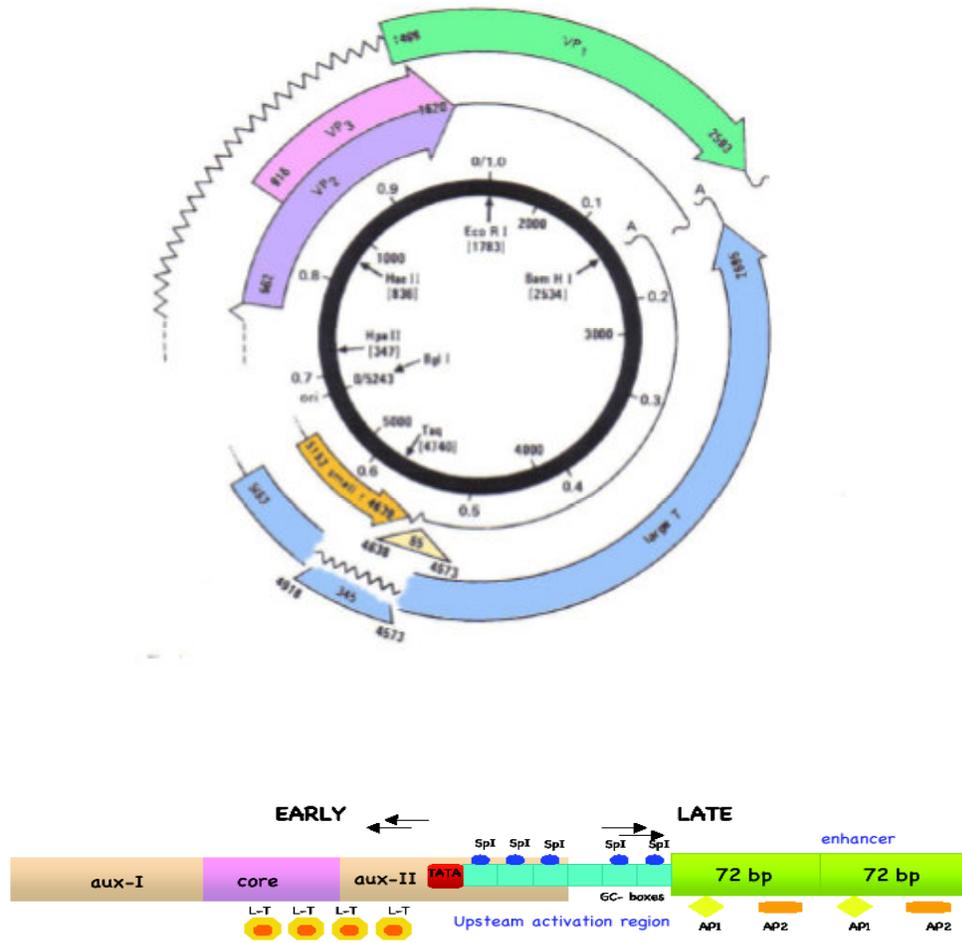


Figura 4: Rappresentazione schematica dell'organizzazione genomica di SV40.

A. Mappa genica.

B. Regione regolativa.

Le varie fasi del ciclo di SV40 sono governate da una regione regolativa che comprende l'*origine di replicazione virale* (ORI), rappresentata, secondo i dati presenti in letteratura, da una sequenza *core* necessaria ma non sufficiente per la replicazione del DNA, e due sequenze ausiliarie (*auxI* e *II*), che possono anche essere sostituite da regioni *enhancer*. Sono inoltre, presenti i promotori "early" e "late", i segnali di inizio della trascrizione e quelli necessari per il bilanciamento tra la trascrizione "early" e quella "late", nonché un elemento *enhancer*, comprendente i siti di legame per i fattori AP1 e AP2.

I-C SV40 come vettore per la terapia genica.

Un agente virale idoneo al trasferimento di materiale genico deve possedere alcune caratteristiche fondamentali:

- deve poter essere concentrato ad un alto titolo per poter permettere il trattamento di organi o di popolazioni cellulari, specialmente *in vivo*;
- deve poter infettare ed esprimere i suoi geni in un'ampia varietà di cellule, per rendere flessibile la sua applicazione;
- deve essere biologicamente “sicuro”, nel senso di non indurre fenomeni patologici nella cellula ospite, nell'organo bersaglio, o nell'intero organismo.
- deve essere maneggevole, e di facile incapsidazione.

Virioni ricombinanti derivati da SV40 possono essere efficientemente utilizzati per il trasferimento di geni esogeni [11].

Un primo vantaggio nell'utilizzo di vettori derivati da SV40 è rappresentato dalla facilità di manipolazione del DNA provirale, che consente di inserire, togliere e modificare i geni esogeni con le stesse metodiche usate per i plasmidi procariotici. Altro vantaggio è la bassa immunogenicità, che associata all'assenza di tossicità intrinseca, qualifica SV40 come un'alternativa ai vettori derivati da Adenovirus.

Nel nostro laboratorio, abbiamo messo a punto tre tipi di vettori derivati da SV40:

- Nei vettori di I generazione è stata deleta la regione “*early*” del genoma virale codificante per l'L-T; tale delezione, da un lato, lascia spazio utilizzabile per l'inserimento di frammenti di DNA esogeno e, dall'altro, elimina l'effetto trasformante del virus. La delezione dell'L-T, inoltre, rende il vettore incapace di replicazione autonoma, e per questo motivo esso si può propagare come virus solo in linee cellulari che forniscono *in trans* la proteina L-T. La prima linea cellulare (COS-7) che consente il “packaging” dei vettori fu realizzata trasferendo la linea cellulare CV1 (fibroblasti di rene di scimmia), permissiva per SV40, con un plasmide contenente un genoma difettivo per la replicazione di SV40 (Y. Gluzman, 1981). Nel nostro laboratorio, abbiamo sviluppato delle linee cellulari per l'incapsidazione di questi vettori in condizioni tali da prevenire fenomeni di ricombinazione intramolecolare, come invece avviene nelle COS-7.

- Nei vettori di II generazione o “gut-less”, invece, è stato deletato tutto il genoma di SV40, lasciando solo la regione regolativa di circa 300 bp, nella quale

sono compresi i siti necessari per la replicazione del genoma virale e quelli per l'incapsidazione dei virioni ricombinanti. Ciò offre il vantaggio di poter clonare segmenti di DNA esogeno di grandezza maggiore rispetto a quelli di I generazione. Per l'incapsidazione di tali vettori è, però, necessario fornire *in trans* sia la proteina L-T, sia le proteine capsidiche. Ciò è stato affrontato costruendo una nuova linea cellulare "packaging" che fornisca *in trans*, sia le proteine "early" che "late".

- Nei vettori episomici, invece, è stata tolta la regione codificante per le proteine del capsido virale per lasciare spazio all'inserimento di DNA esogeno, mutagenizzando la proteina L-T in modo tale da eliminare le sue proprietà trasformanti. Questi vettori, una volta entrati all'interno delle cellule, possono replicarsi in modo autonomo avendo sia l'ORI di SV40 sia la regione che codifica per la proteina L-T.

I-D Costruzione di vettori episomici derivati da SV40.

Diverse applicazioni di terapia genica hanno messo in evidenza che il livello di espressione del gene esogeno, inserito o meno in maniera stabile nel genoma della cellula, tende a calare, più o meno velocemente, a seconda del vettore usato e del tessuto bersaglio. Una delle possibili soluzioni a questo problema è quella di creare costrutti che possano rimanere in forma episomica all'interno delle cellule. SV40 si presta bene a questo tipo di approccio, dal momento che una sola proteina (L-T) è sufficiente per promuovere la replicazione del DNA virale e di qualsiasi DNA circolare contenente l'ORI di SV40. Sfortunatamente, L-T risulta trasformante. Tale capacità di trasformare le cellule è correlata alla sua capacità di interagire con le proteine p53, pRb e p107, innescando l'avvio del ciclo cellulare in cellule quiescenti.

Per ovviare a questo problema, nel nostro laboratorio, la proteina L-T è stata mutagenizzata in modo da impedire l'interazione con questi oncosoppressori eliminando quindi l'effetto trasformante, senza però farle perdere la capacità di agire da innesco per la replicazione del DNA virale. Sono state descritte in letteratura, due mutazioni che portano all'abolizione del legame con le suddette proteine, (MarK J., Cooper et al.): la mutazione in posizione amminoacidica (a.a.) 107, che sostituisce una lisina con un residuo di glutammato, elimina l'interazione con pRb e p107, mentre la mutazione in posizione a.a. 402, che sostituisce il glutammato con

aspartato, elimina la capacità di interazione con la proteina p53. Queste due mutazioni puntiformi sono state introdotte in un plasmide contenente la regione codificante per L-T e l'origine di replicazione di SV40 (PUC-SVE), ottenendo il costrutto PUC-SVEm₂ [12]. La capacità replicativa di L-T mutagenizzato è stata confermata mediante test di replicazione in cellule CV1 (fibroblasti di rene di scimmia africana, permissive ad SV40). Il test ha dimostrato che il costrutto PUC-SVEm₂ si replica in modo indistinguibile dal costrutto di controllo PUC-SVE.

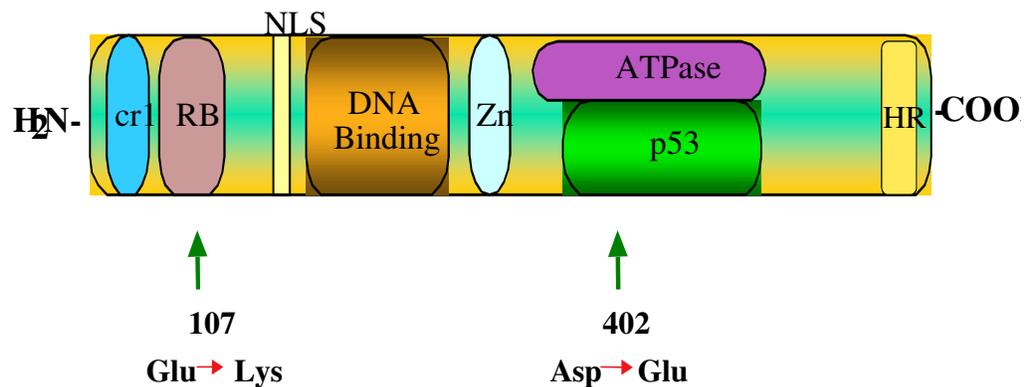


Figura 5: Rappresentazione grafica dei differenti domini di legame e funzionali del large T-antigen di SV40.

La proteina L-T rappresenta il prodotto proteico più importante del genoma di SV40, in quanto regola il ciclo vitale del virus, è necessaria per la replicazione virale, funziona come regolatore della trascrizione, e consente la replicazione di qualsiasi DNA circolare contenente l'ORI di SV40.

Il gene L-T è stato mutagenizzato, negli a.a. 107 e 402, in modo da eliminare le capacità di interazione con le proteine p53 e pRB, e quindi la sua capacità trasformante, senza però farle perdere la capacità di promuovere la replicazione del DNA virale.

I-E RNA interference.

L'RNA interference (RNAi) è un meccanismo di silenziamento genico sequenza-specifico naturale, mediato da RNA a doppio filamento (dsRNA), ubiquitario negli animali e nelle piante, che è stato oggetto di intensi studi negli ultimi 5 anni [13,14].

Il meccanismo dell'RNAi può essere suddiviso idealmente in due tappe principali: la *fase iniziatrice* e la *fase effettrice*. Nella prima tappa, si ha la formazione di siRNA (*small interfering RNA*), derivati da dsRNA più lunghi di origine endogena o esogena. I dsRNA sono tagliati da Dicer, un enzima, appartenente alla famiglia dell'RNasi III, che comprende due domini catalitici ad attività endonucleasica, un dominio ad attività elicasica e un dominio PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille). Dicer taglia, attraverso una reazione ATP-dipendente, le molecole di dsRNA o le strutture a stem loop dell'RNA precursore in piccoli RNA (microRNA e siRNA, 21-25 nt), caratterizzati entrambi da due nucleotidi sporgenti all'estremità 3', importanti non solo per il riconoscimento da parte del dominio PAZ, (sembra, infatti che la lunghezza degli siRNA dipenda dalla distanza fra il dominio PAZ e il sito attivo dell'RNasi III), ma anche per il successivo assemblaggio nel complesso molecolare RISC [15].

Nella fase effettrice, i duplex di siRNA si legano ad un complesso nucleasico e formano quello che viene chiamato "*RNA-induced silencing complex*": RISC. Dopo tale legame, gli siRNA vanno incontro ad una denaturazione a singolo filamento (reazione ATP dipendente), necessaria per l'attivazione del complesso RISC [16,17]. Inoltre, è necessaria una fosforilazione al 5' del siRNA duplex perché esso possa incorporarsi in RISC (Nykanen *et al.*, 2001); questa modificazione viene svolta da una chinasi endogena (Schwarz *et al.*, 2002). Il complesso così attivato, usando come stampo il singolo filamento incorporato, taglia filamenti di mRNA complementari. Il taglio avviene a circa 12 nucleotidi dal 3' del siRNA antisense.

Il complesso multiproteico RISC risulta, in tal modo, fondamentale per la degradazione nucleotidica dell'mRNA bersaglio, perchè riconosce e taglia l'mRNA target complementare ad uno dei due filamenti dello siRNA. Analisi biochimiche (Hutvagner *et al.*, 2002) indicano che l'RNasi presente nel complesso RISC è diversa da Dicer. L'elemento centrale di tale complesso è l'enzima RNasi H Argonaute, un membro della famiglia genica Argonaute, la cui attività nucleasica è responsabile del

taglio dell'mRNA (Slicer). In alternativa, RISC può sopprimere la traduzione dell'mRNA, anzicchè promuoverne il taglio (silenziamento genico mediato dai microRNA) [18]. Specificamente, i prodotti di Slicer presentano un'estremità 5' fosfato e un'estremità 3'OH libera.

La notevole efficienza dell'RNAi, riscontrata in tutti gli esperimenti, è stata attribuita ad un processo di amplificazione, proprio del meccanismo di interferenza. Questa amplificazione può avere come bersaglio i dsRNA, al fine di produrre più siRNA, o gli siRNA stessi. In questo modo, i complessi RISC hanno la possibilità di effettuare un maggior numero di reazioni ribonucleasiche sequenza-specifiche ("tagli"). Infatti, indagini hanno dimostrato che gli siRNA complementari all'mRNA bersaglio funzionano da primer per un RNA polimerasi-RNA dipendente (RdRP) che trasforma l'mRNA in dsRNA, il quale a sua volta sarà il substrato di Dicer. Questo passaggio amplifica così la risposta dell'RNAi, la quale può autoalimentarsi fino a quando tutto l'mRNA bersaglio non è degradato. Il silenziamento genico mediato da RNAi diventa così uno dei più eleganti ed efficienti meccanismi in natura [19,20].

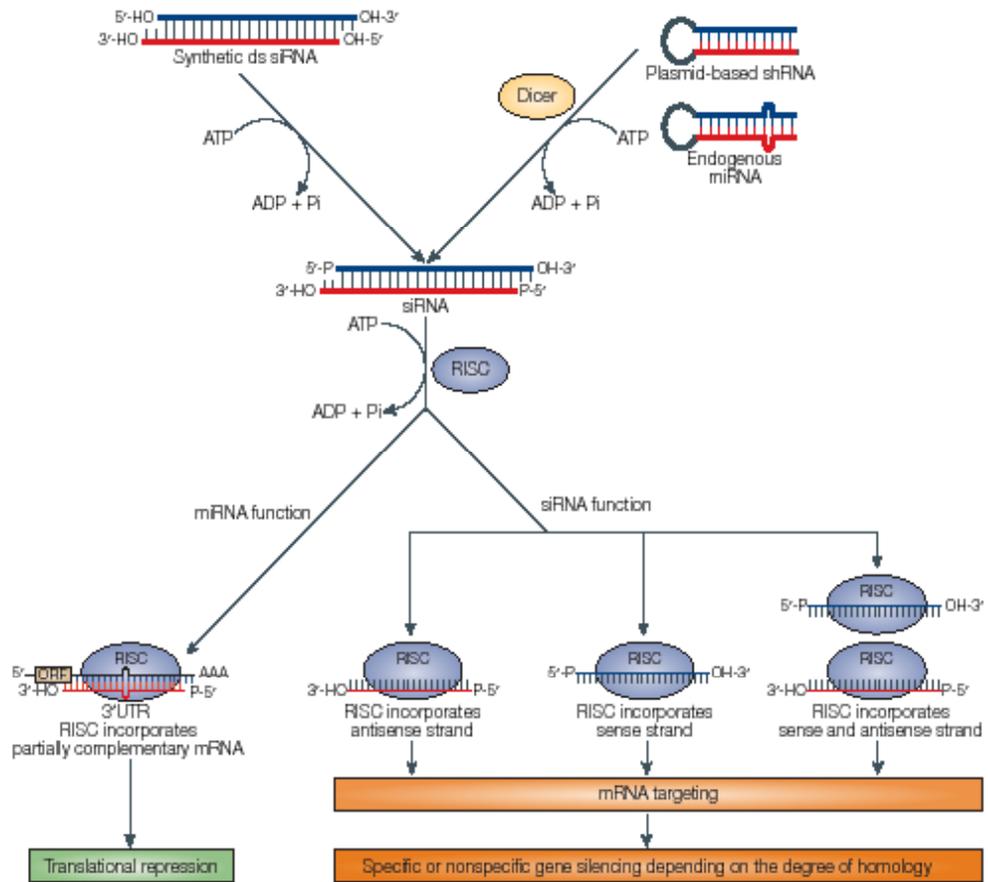


Figura 6: RNA interference.

L'RNA interference (RNAi) determina la degradazione post-trascrizionale di mRNA omologhi, attraverso un meccanismo multi-step che coinvolge piccole molecole di RNA interferente a doppio filamento (siRNA). Attualmente il silenziamento genico sequenza-specifico è ottenuto mediante la trasfezione di siRNA, o mediante l'utilizzo di cassette esprimenti shRNA (RNA con struttura a forcina o stem-loop, *short hairpin RNA*) per mezzo dei promotori Pol III, U6 e H1 [21,22].

II. ATTIVITA' SPERIMENTALE

I due principali ostacoli alla possibilità di utilizzare per terapia genica vettori episomici derivati da SV40 capaci di permanere in cellule umane senza danneggiarle, sono i seguenti:

a) Il vettore, per potersi replicare in modo autonomo, necessita della proteina virale L-T, la quale però possiede attività trasformante in quanto è capace di legare i due oncosoppressori p53 e pRB, inattivandoli. Come già detto nella parte introduttiva, questo problema è stato risolto introducendo nella proteina L-T due sostituzioni amminoacidiche tali da eliminare le capacità di interazione con le proteine suddette, e quindi la sua attività trasformante, senza però farle perdere la capacità di promuovere la replicazione del DNA di SV40.

b) Una replicazione eccessiva del vettore all'interno delle cellule bersaglio, sottraendo risorse metaboliche alla cellula, potrebbe essere tossica per la cellula stessa. E' pertanto necessario che la replicazione del vettore possa essere controllata e, soprattutto mantenuta ai livelli minimi compatibili con un'efficace espressione del gene esogeno.

Pertanto gran parte dell'attività da me svolta nel periodo di dottorato è stata impegnata nell'affrontare le molteplici problematiche connesse alla realizzazione di vettori episomici derivati da SV40 con capacità replicativa "attenuata" o modulabile.

Il primo approccio seguito è stato quello di dissezionare la regione dell'origine della replicazione di SV40, in modo da realizzare vettori contenenti delezioni progressive della regione ORI/ses di SV40.

Lo scopo di questi esperimenti era duplice:

1. Identificare una forma "attenuata" ma ancora funzionale dell'origine di replicazione di SV40.

2. Esplorare la possibilità di complementare una eventuale origine "attenuata" con elementi di controllo tessuto-specifici, in modo da ottenere repliconi capaci di replicazione selettiva in determinati tessuti.

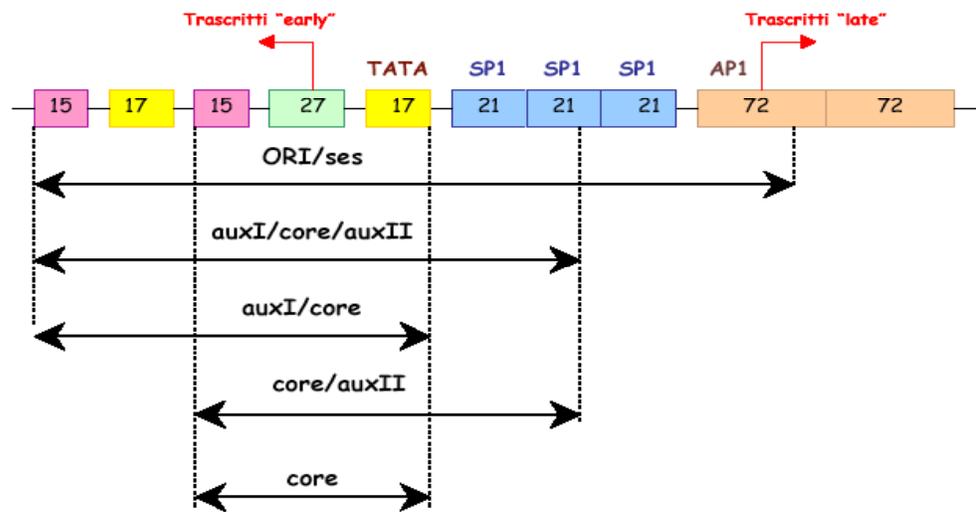


Figura 7: Delezioni della regione ORI/ses di SV40.

II-A Costruzione di “repliconi” derivati da SV40 con delezioni progressive della regione ORI/ses.

<i>Oligonucleotidi</i>	<i>Posizione</i>	<i>Dimensioni</i>	<i>Sigla</i>	<i>Identificativo</i>
auxI/ses 3'	5160/135	218	ORI/ses	O/S
auxI/auxII	5160/78	161	al/c/aII	O/S Δ1
auxI/core 3'	5160/34	117	al/c	O/S Δ2
core 5'/auxII	5205/78	116	c/aII	O/S Δ3
core 5'/core 3'	5205/34	72	core	O/S Δ4

Tabella 1: Sintesi delle possibili delezioni della regione ORI/ses di SV40.

A1 Costruzione dei repliconi O/S Δ

La prima tappa è stata la costruzione dei plasmidi della serie O/S Δ (1-4). Segmenti differenti della regione regolativa di SV40 sono stati amplificati mediante PCR con coppie di oligonucleotidi specifici, e clonati nel vettore *pBluescript* (pBSC). I plasmidi ricombinanti ottenuti sono stati analizzati mediante sequenziamento automatizzato. Con questi esperimenti abbiamo ottenuto la serie O/S, comprendente tutte le combinazioni di elementi dell'origine di SV40 indicate in tabella.

A2 Costruzione dei repliconi SVE Δ

I repliconi della serie SVE Δ (SVE Δ1 e SVE Δ2), e della serie SVEm₂ Δ (SVEm₂ Δ1 e SVEm₂ Δ2) sono stati ottenuti sostituendo il frammento KpnI/NcoI dei vettori PUC-SVE e PUC-SVEm₂ con i relativi frammenti KpnI/NcoI derivati dai plasmidi O/S Δ1 ed O/S Δ2.

A3 Costruzione dei repliconi AFP -SVE Δ

Al fine di verificare l'effetto di elementi di regolazione trascrizionale tessuto-specifici sulle capacità di replicazione dei nostri vettori, abbiamo costruito repliconi

in cui, a monte dell'origine di replicazione di SV40 sono state inserite sequenze di controllo derivate dal promotore dell'alpha-fetoproteina umana (AFP) [23].

In particolare, la regione regolativa dell'AFP inserita comprende tre ripetizioni, ciascuna delle quali contiene:

- un sito di legame per il fattore trascrizionale HNF1 (fegato-specifico);
- un sito di legame per il fattore trascrizionale AP1 (regolatore positivo della trascrizione dell'AFP);
- un sito di legame per il recettore nucleare GR (specifico per gli ormoni glucocorticoidi);
- siti unici di restrizione per gli enzimi Sac I e Hind III.

Esperimenti svolti precedentemente nel laboratorio del Prof. De Simone hanno dimostrato che questi elementi conferiscono ad un gene "reporter" la capacità di esprimersi in modo selettivo in cellule di epatoma, e non in altre linee cellulari. D'altro canto, se inserito in un vettore derivato da SV40, l'insieme AFP-gene "reporter", perde la capacità di essere espresso in modo selettivo ed il gene è trascritto anche in cellule non epatiche (COS-7, CV1, HeLa).

II-B Saggio di replicazione di "repliconi" derivati da SV40 con delezioni progressive della regione ORI/ses.

I DNA dei repliconi della serie SVE Δ e AFP-SVE Δ sono stati amplificati in batteri, ed impiegati per effettuare saggi di replicazione in diverse linee cellulari eucariotiche.

Negli esperimenti riportati in figura i diversi campioni di DNA sono stati trasfettati in cellule CV1 e Hep 3B con la metodica del calcio-fosfato.

Dopo 3 e 6 giorni dalla trasfezione, le cellule sono state lisate per estrarre il DNA a basso peso molecolare (metodo di Hirt) [24]. Il DNA estratto è stato digerito con l'enzima di restrizione Dpn II. Questo enzima è incapace di idrolizzare il DNA quando l'adenina presente nella sua sequenza di riconoscimento è metilata. In tal modo, è possibile distinguere per elettroforesi su un gel di agarosio il DNA plasmidico "parentale", originariamente introdotto nelle cellule mediante trasfezione, da quello "figlio" che è stato prodotto dalla replicazione all'interno della cellula. Infatti, il DNA parentale amplificato in batteri è metilato sulla sequenza di riconoscimento dell'enzima Dpn II dalle metilasi batteriche e non può essere digerito

dall'enzima. Viceversa, le eventuali molecole "figlie" generate dalla replicazione all'interno della cellula non sono metilate, e saranno quindi digerite da Dpn II.

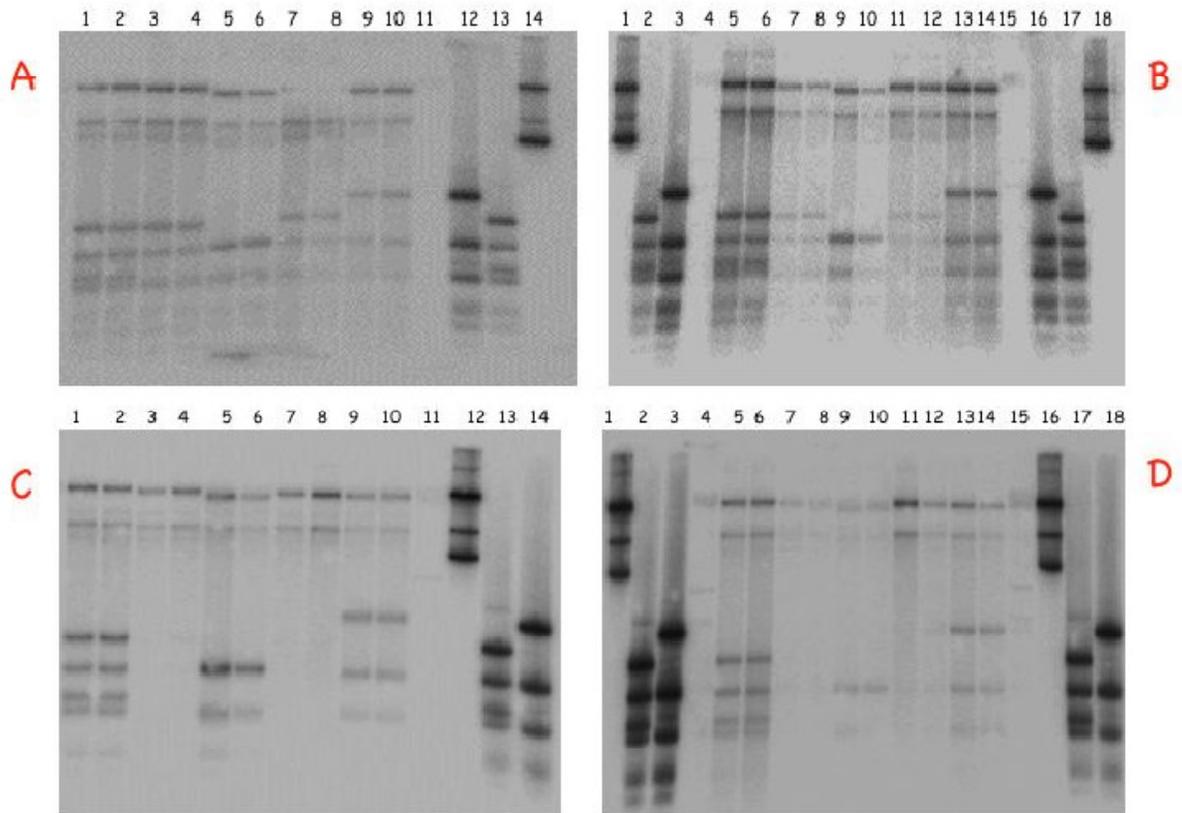
Il DNA estratto a vari tempi dalla trasfezione è stato quindi digerito con Dpn II ed i frammenti di DNA così ottenuti, sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio, sono stati trasferiti su un filtro di nylon mediante Southern blotting ed ibridati con una sonda (corrispondente a parte del plasmide PUC-SVE) marcata con ^{32}P . In tutti gli esperimenti effettuati ciascun campione di DNA è stato trasfettato in duplicato, mentre un singolo precipitato per ciascun campione è stato ripartito tra le piastre delle diverse linee cellulari, in modo da minimizzare la variabilità dell'esperimento. Inoltre, ciascun esperimento è stato effettuato sia con i repliconi wt che con quelli mutati.

I risultati di alcuni di questi esperimenti sono riportati in figura 8. Dall'analisi dei dati riportati si può assumere che:

1) Non si nota un'apprezzabile differenza tra i repliconi portatori dell'intera regione ORI/ses e quelli portatori delle delezioni $\Delta 1$ e $\Delta 2$. Ciò è in parziale contrasto con quanto riportato in letteratura per altri sistemi di replicazione di SV40, nei quali l'efficienza di replicazione è direttamente proporzionale al numero di siti di legame del fattore trascrizionale SP1: 6 in SVE, 3 in SVE $\Delta 1$, nessuno in SVE $\Delta 2$.

2) La presenza delle sequenze di regolazione del promotore AFP non influenza l'efficienza di replicazione in cellule CV1, mentre in cellule di epatocarcinoma le stesse sequenze causano una drastica riduzione della capacità di replicazione sia in presenza ($\Delta 1$) che in assenza ($\Delta 2$) di SP1. Questo risultato, paradossale ed inatteso, potrebbe essere interpretato come un effetto di competizione "strutturale" tra la regione ORI ed il complesso trascrizionale epatoma-specifico che si forma nelle Hep 3B a livello delle sequenze AFP.

3) Nei duplicati dello stesso campione, e negli esperimenti effettuati in parallelo con la serie L-T mutato, i risultati sono assolutamente sovrapponibili, confermando l'attendibilità dei dati ottenuti.



Lane 1-2: AFP-SVE DpnII
 Lane 3-4: AFP-SVE $\Delta 1$ DpnII
 Lane 5-6: SVE $\Delta 2$ DpnII
 Lane 7-8: AFP-SVE $\Delta 2$ DpnII
 Lane 9-10: pUC-SVE DpnII
 Lane 11: controllo negativo di ibridazione
 Lane 12: AFP-SVE Dpn II
 Lane 13: AFP-SVE Sau3AI
 Lane 14: pUC-SVE Sau3AI

Lane 1-16: AFP-SVE Dpn II
 Lane 2-17: AFP-SVE Sau3AI
 Lane 3- 18: pUC-SVE Sau3AI
 Lane 4-15: controllo negativo di ibridazione
 Lane 5-6: AFP-SVEm₂ DpnII
 Lane 7-8: AFP-SVEm₂ $\Delta 1$ DpnII
 Lane 9-10: SVEm₂ $\Delta 2$ DpnII
 Lane 11-12: AFP-SVEm₂ $\Delta 2$ DpnII
 Lane 13-14: pUC-SVEm₂ DpnII

Figura 8: Efficienza di replicazione di vettori episomici derivati da SV40 contenenti delezioni progressive della regione ORI/ses.

A-B: Test di replicazione in cellule CV1.

C-D: Test di replicazione in cellule Hep 3B.

A-C: Vettori contenenti il gene codificante per la proteina L-T normali.

B-D: Vettori contenenti il gene codificante per la proteina L-T mutata.

II-C Introduzione di meccanismi del tipo “*copy-control*” in vettori episomici derivati da SV40.

Il secondo approccio sperimentale, di seguito descritto, mira alla messa a punto di un sistema di controllo della replicazione dei vettori episomici derivati da SV40. In particolare, l’obiettivo è quello di realizzare un meccanismo artificiale di controllo del numero di copie, basato su un ciclo a feedback negativo, in analogia con i meccanismi di “*copy-control*” dei plasmidi di tipo ColE1.

Nel caso dei plasmidi il sistema è basato sulla presenza di un RNA “inibitore” la cui concentrazione aumenta con l’aumentare del numero di copie del plasmide. Quando l’RNA inibitore raggiunge una certa “soglia”, la replicazione del plasmide si blocca, determinando l’instaurarsi di un equilibrio attestato su un basso numero di copie (10-20) di plasmidi per cellula. Abbiamo quindi pensato di realizzare un sistema analogo mediante l’utilizzo di cassette di espressione per RNA interference capaci di inibire la trascrizione della proteina Large-T antigen di SV40, e di conseguenza la replicazione dei nostri vettori.

Sono stati disegnati, pertanto, oligonucleotidi capaci di dirigere la sintesi di piccoli RNA a doppia elica (shRNA), tali da interferire con la trascrizione di L-T e, di conseguenza, con la replicazione di vettori contenenti la regione ORI/ses di SV40.

L’efficacia di queste cassette di espressione nell’inibire la replicazione di siffatti vettori SV40-derivati è stata verificata:

- selezionando linee cellulari stabilmente trasformate in cui la replicazione di SV40 e dei vettori da esso derivati risulta notevolmente ridotta;
- inserendo la cassetta di espressione “anti L-T” a monte o nell’introne dell’unità trascrizionale “*early*” di SV40.

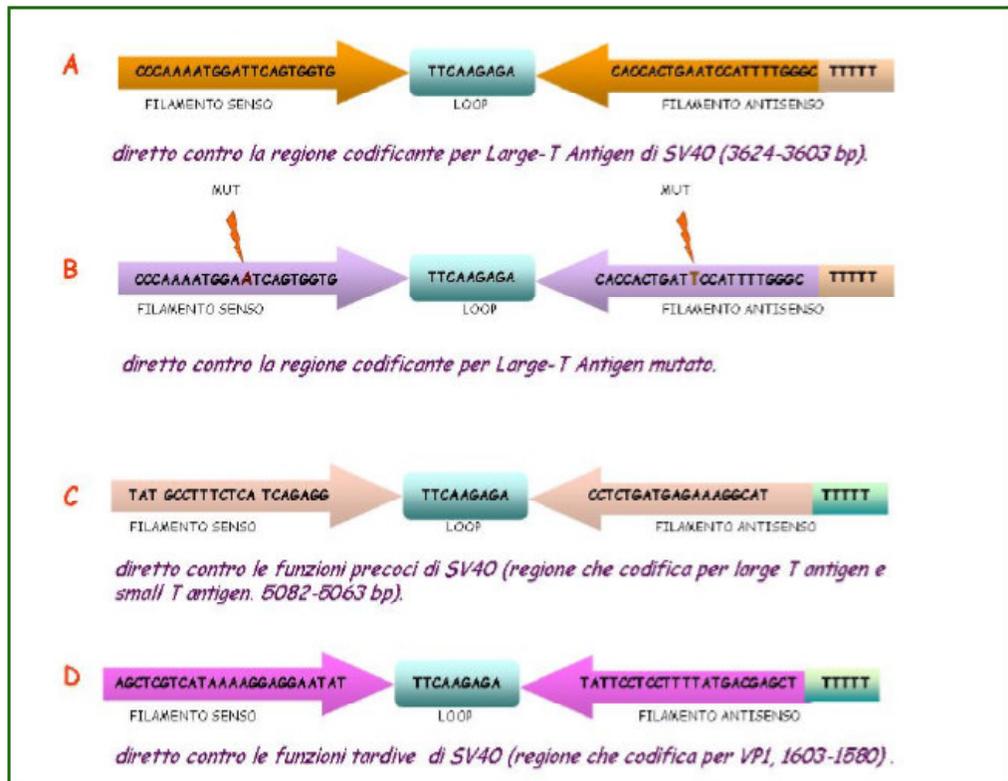


Figura 9: Oligonucleotidi progettati e sintetizzati in maniera tale da riconoscere specifiche regioni del genoma di SV40.

Oligo A: diretto contro la regione codificante per **Large-T antigen** di SV40, progettato per essere clonato nel sito di restrizione Eco RI.

Oligo B: diretto contro la regione codificante per **Large-T antigen mutato** di SV40, progettato per essere clonato nel sito di restrizione Eco RI.

Oligo C: diretto contro **le funzioni precoci** di SV40, regione che codifica per Large-T antigen e small-T antigen, progettato per essere clonato entro i siti Bgl II e Hind III.

Oligo D: diretto contro **le funzioni tardive** di SV40, regione che codifica per VP1, progettato per essere clonato entro i siti Bgl II e Hind III.

II-D Efficacia delle cassette di espressione in cloni stabili.

Questo esperimento prevede la selezione di cloni di cellule CV1 trasformate stabilmente da vettori che esprimono in modo costitutivo shRNA “anti L-T” di SV40. A tale scopo, abbiamo clonato gli oligonucleotidi descritti nella sezione precedente in quattro plasmidi capaci di generare, se inseriti in cellule “packaging” eucariotiche, dei vettori retrovirali.

Le successive fasi dell’esperimento sono le seguenti:

- Trasfezione in cellule packaging (Φ nx) e purificazione dei virioni.
- Infezione delle cellule bersaglio (CV1, permissive per SV40).
- Selezione con puromicina delle cellule in cui è avvenuta l’integrazione del vettore nel genoma della cellula ospite.
- Infezione con SV40 per valutare l’effetto inibitorio degli shRNA prodotti.

D1 Preparazione dei costrutti pBSC-A e pBSC-B.

Gli oligonucleotidi A e B, descritti in figura 9, sono complementari ad una regione dell’mRNA L-T di SV40 che è presente in laboratorio in due versioni: SV40 wt ed SV40 mut-E. La versione mutata generata per inattivare il sito di legame di L-T con pRB, in questo esperimento, viene utilizzata come controllo di specificità dell’effetto inibitorio dell’siRNA.

In particolare gli oligonucleotidi di ciascuna coppia sono complementari tra di loro, ma ciascuno di essi è anche portatore di una regione palindromica interrotta da un’ansa (loop). Una volta associati (annealing), i due oligonucleotidi formano un frammento di DNA a doppia elica con estremità a singola elica compatibili con quelle generate dall’enzima Eco RI.

Successivamente all’annealing, gli oligonucleotidi A e B (a doppio filamento) con entrambe le estremità coesive per il clonaggio nel sito di restrizione Eco RI, sono stati clonati nel vettore *pBluescript* (pBSC), in corrispondenza del suddetto sito di restrizione. I cloni positivi contenenti le molecole pBSC-A e pBSC-B rispettivamente, sono stati individuati mediante test di α -complementazione (materiali e metodi). Poiché gli oligonucleotidi A e B contengono entrambe le estremità 5’ e 3’ compatibili per l’enzima di restrizione Eco RI, è necessario verificare che essi siano stati inseriti in pBSC nel corretto orientamento, e cioè con la sequenza di cinque timine in fila (sito terminatore), situata dal lato del sito di taglio

dell'enzima Hind III. Solo così il clonaggio nel vettore finale potrà generare la struttura corretta, con il terminatore in posizione distale rispetto al sito d'inizio della trascrizione. A tal fine, è stato eseguito il sequenziamento delle mini preparazioni plasmidiche risultate positive; di queste, quelle nell'orientamento giusto, sono state ulteriormente amplificate (maxi preparazione plasmidiche). Alla fine di questa procedura, abbiamo ottenuto i plasmidi ricombinanti: pBSC-A e pBSC-B, contenenti i due inserti nel corretto orientamento.

D2 Preparazione dei costrutti pSUPER A e pSUPER B.

Per il clonaggio in *pSUPER.retro.puro* degli inserti A e B, i vettori pBSC-A e pBSC-B sono stati digeriti con gli enzimi Bam HI e Hind III, cioè perché gli enzimi Bgl II e Bam HI generano estremità compatibili tra loro, utili per il clonaggio nel vettore retrovirale d'interesse. Dopo elettroforesi su gel di agarosio, i frammenti a più basso peso, oligo A (BamHI/HindIII) e oligo B (BamHI/HindIII), sono stati purificati e clonati in *pSUPER.retro.puro*, precedentemente digerito con gli enzimi Bgl II e Hind III, in modo tale da ottenere i vettori retrovirali desiderati: pSUPER A e pSUPER B. La presenza dell'inserto e la correttezza dell'organizzazione strutturale della fusione tra le sequenze degli oligonucleotidi A e B ed il promotore H1 presente in *pSUPER.retro.puro* sono state verificate mediante sequenziamento utilizzando i primers P1 e P2, opportunamente disegnati e sintetizzati in modo da essere complementari alle due estremità del sito di clonaggio:

P1: 5' GGAAGCCTTGGCTTTTG 3'

diretto contro la regione posta a monte dell'sito di restrizione Hind III;

P2: 5' CGAACGCTGACGTCATC 3'

diretto contro la regione posta a monte dell'sito di restrizione Bgl II.

Tutti i campioni sono risultati corretti. Due di questi vettori ricombinanti sono stati scelti per una successiva estrazione di DNA su larga scala, al fine di poter disporre di una quantità di plasmide sufficiente per le tappe successive di propagazione in cellule "packaging" e di infezione delle cellule bersaglio.

D3 Preparazione dei costrutti pSUPER C e pSUPER D.

Nella figura 9 sono riportati gli oligonucleotidi utilizzati per assemblare il frammento di DNA da clonare nel vettore retrovirale di interesse. L'oligonucleotide C esprime shRNA diretti contro la regione del genoma di SV40 che codifica per le funzioni precoci di SV40 (Large-T e small-t antigen), mentre quello D è complementare alla sequenza genomica che codifica per le funzioni tardive di SV40.

In particolare, gli oligonucleotidi C e D sono stati ottenuti mediante reazione di annealing dei filamenti C1 e C2, e D1 e D2 rispettivamente e clonati nel vettore *pSUPER.retro.puro* precedentemente digerito con Bgl II e Hind III, in modo tale da ottenere i vettori retrovirali: pSUPER C e pSUPER D. Dopo la reazione di ligasi e l'opportuna trasformazione batterica, la presenza di ricombinanti positivi per

l'inserto è stata inizialmente verificata mediante PCR. Oltre ai campioni, sono stati sottoposti ad analisi mediante PCR anche i seguenti controlli:

- *pSUPER.retro.puro*, controllo negativo di reazione;
- pSUPER A, controllo positivo di reazione.

La presenza dell'inserto e la correttezza dell'organizzazione strutturale della fusione tra le sequenze degli oligonucleotidi C e D ed il promotore H1 presente nel vettore retrovirale d'interesse, sono state verificate mediante sequenziamento utilizzando i primers P1 e P2. Tutti i campioni sono risultati corretti. Due di questi vettori ricombinanti sono stati scelti per una successiva estrazione di DNA su larga scala, al fine di poter disporre di una quantità di plasmide sufficiente per le tappe successive di propagazione in cellule "packaging" e di infezione delle cellule bersaglio.

D4 Test di sensibilità delle CV1 alla puromicina.

La selezione delle cellule in cui è avvenuta l'integrazione delle molecole ricombinanti derivate da *pSUPER.retro.puro* è stata effettuata mediante l'utilizzo di una opportuna concentrazione di puromicina, un antibiotico amminonucleosidico prodotto da *Streptomyces alboniger*, che inibisce il trasferimento di unità peptidiche nei ribosomi sia di cellule eucariotiche che procariotiche.

Il vettore retrovirale utilizzato esprime il gene *pac* che codifica l'enzima puromycin N-acetyl-tranferase (PAC), il quale conferisce la resistenza alla puromicina, permettendo, dunque, la selezione dei transfettanti stabili, ovvero delle linee cellulari che hanno integrato stabilmente nel proprio genoma parte di suddetto vettore, e in particolare le cassette di espressione di nostro interesse.

È stata valutata, pertanto, la sensibilità delle CV1 a diverse concentrazioni di puromicina, in modo da individuare l'esatta concentrazione di antibiotico da utilizzare negli esperimenti successivi. A tal fine, le cellule in esame sono state trattate con concentrazioni crescenti di puromicina (PUROMYCIN DIHYDROCHLORIDE, MP Biomedicals, Inc), opportunamente diluita nel terreno di coltura completo. Per un periodo pari a 10 giorni, è stata monitorata costantemente la confluenza cellulare mediante conteggio con camera di Burkner. In questo modo, è stata stimata come varia la curva di crescita delle cellule in funzione del tempo, a concentrazione di puromicina crescenti (da 2 a 5 µg/ml). Dai risultati ottenuti, si evince che la concentrazione ottimale di puromicina, tale da permettere la giusta selezione dei cloni di interesse, è pari a 3 µg/ml.

D5 Trasfezione di cellule “packaging” eucariotiche.

I vettori retrovirali ricombinanti ottenuti (pSUPER A, pSUPER B, pSUPER C, pSUPER D), sono stati utilizzati per la trasfezione di cellule “packaging” eucariotiche, le Φ NX (phoenix viral packaging cells lines), in modo tale da produrre particelle virali specifiche, utili per infettare cellule eucariotiche permissive a SV40.

Le Φ NX sono una linea cellulare di “packaging” che viene utilizzata per la produzione delle proteine necessarie alla formazione del capsido retrovirale. Nei cromosomi di tali cellule sono inserite due porzioni del genoma retrovirale, una contenente il gene *gag*, l'altra i geni *pol* ed *env*. Per minimizzare la probabilità di ricombinazione intergenica, i geni *gag* e *pol* sono sotto il controllo di un promotore, mentre il gene *env* sotto il controllo di un altro. Gli mRNA prodotti da queste due regioni virali sono quindi in grado di codificare le proteine che costituiscono il capsido ma, mancando della sequenza di impacchettamento (Ψ), non vengono inserite nelle particelle virali.

Per consentire l'ingresso dei plasmidi all'interno delle Φ NX è stata utilizzata la tecnica della trasfezione con calcio-fosfato, che determina la precipitazione del DNA e nello stesso tempo altera la permeabilità delle membrane. A seguito della trasfezione, il DNA del vettore si comporta nella cellula come un provirus e va ad integrarsi nel genoma delle Φ NX. L'RNA trascritto a partire dalle LTR si associa ai prodotti dei geni *env* e *gag* presenti nelle cellule, formando virioni maturi che vengono rilasciati nel mezzo di coltura. Dopo 36 ore dalla trasfezione, è stata effettuata la raccolta delle particelle retrovirali prodotte dalle cellule “packaging” per esocitosi (“sopranatante retrovirale”), da utilizzare per l'infezione delle CV1, permissive a SV40. Infatti, la trascrizione inversa e l'integrazione hanno luogo circa 24-36 ore dopo la trasfezione, mentre l'espressione si può osservare entro le 48 ore successive alla trasfezione.

D6 Infezione della linea cellulare CV1 e selezione con puromicina di linee cellulari trasformate.

I campioni retrovirali ottenuti, sono stati utilizzati per infettare cellule CV1. A questo scopo, piastre semiconfluenti sono infettate con 2 ml di “sopranatante retrovirale” prodotto dopo trasfezione delle linee cellulari “packaging”. Dopo un periodo di incubazione per 2h a 37°C e in continua agitazione, è stato aggiunto il mezzo di coltura completo, e le piastre incubate a 37°C per 48 h.

Per selezionare le cellule in cui il DNA prodotto dal retrovirus si è integrato stabilmente nel genoma cellulare, queste sono state cresciute aggiungendo al terreno di coltura completo, 3 µg/ml di puromicina.

– Dopo 3 giorni dalla infezione nelle piastre “controllo” si osserva una diminuita confluenza, unita a parecchie cellule in sospensione, indice di una precoce morte cellulare dovuta ad una maggiore sensibilità alla puromicina, a differenza di quanto si evince nelle piastre “campione”.

– Dopo 6 giorni dalla infezione, le cellule contenute nelle piastre di controllo non resistono all’azione della puromicina, risultando tutte morte, mentre, nelle altre piastre, solo le cellule che hanno integrato il vettore ricombinante pSUPER nel proprio genoma sopravvivono, si osserva una confluenza del 10 %.

– Dopo 10 giorni, nelle piastre “campione” sono state individuate diverse zone di crescita di cellule resistenti all’azione della puromicina, queste aree corrispondono a *cloni cellulari*, vale a dire, progenie di cellule in cui è avvenuta l’integrazione del provirus nel genoma; questi, una volta individuati al microscopio ottico, sono stati staccati singolarmente dal substrato utilizzando una soluzione contenente tripsina, cresciuti separatamente in piastre a 24 pozzetti e successivamente trasferite in piastre da 60 mm. Il 60-70% di questi cloni darà vita a popolazioni contenenti stabilmente il nostro inserto, che verranno poi congelate per essere utilizzate per le fasi successive dell’esperimento.

L’intera procedura sperimentale è stata applicata alle 4 linee di CV1 transfettate stabilmente con i 4 costrutti retrovirali, ottenendo così per ogni campione una linea cellulare mista (PM) e diverse linee cellulari omogenee (PO), derivate dall’espansione dei singoli cloni cellulari.

TRASFORMANTI STABILI

A (1PO, 1PM):

esprimono siRNA diretti contro la regione codificante per *L-T wild type* di SV40.

B (2PO, 2PM):

esprimono siRNA diretti contro la regione codificante per *L-T mutato* di SV40.

C (3PO, 3PM):

esprimono siRNA diretti contro le *entrambe funzioni precoci* di SV40 (*L-T* e *s-T* antigen).

D (4PO, 4PM):

esprimono siRNA diretti contro le *funzioni tardive* di SV40.

PO: linee cellulari geneticamente omogenee

PM: amplificazione di più cloni simili

Figura 11: Rappresentazione schematica dei cloni ricombinanti ottenuti.

D7 Infezione dei cloni cellulari produttori shRNA anti-SV40.

Una volta selezionati i cloni cellulari contenenti all'interno del genoma le cassette di espressione per RNA interference, abbiamo valutato la capacità, di quest'ultime, di inibire l'infezione del virus SV40.

I trasformanti stabili sono stati, pertanto infettati con SV40 (wild type, $1 \cdot 10^9$ molecole di DNA virale/ml di lisato) a molteplicità di infezione crescenti (MOI: 0, 1, 10, 100, 1000). Dopo 7 giorni dall' infezione, le cellule sono state sottoposte a colorazione con Rosso neutro/Trypan Blue per evidenziare nelle cellule la comparsa dell'effetto citopatico dovuto all'infezione virale. Questa procedura è stata ripetuta a 8, 10 e 12 giorni dall'infezione.

A 7 giorni dall'infezione, abbiamo osservato i primi segni di lisi cellulare per azione del virus (formazione di vacuoli, arrotondamento e distacco delle cellule) nelle CV1 infettate ad alta MOI (100 e 1000), ma non nelle linee PO o PM. Dai risultati, riportati in tabella 2, si osserva che tutte le linee cellulari stabilizzate sono resistenti all'infezione virale rispetto alla linea cellulare utilizzata come controllo. Tra le diverse linee cellulari si osserva comunque una variabilità nella durata dell'effetto delle cassette di espressione, dovuta al sito di integrazione del vettore retrovirale il quale, essendo casuale, può influenzare la resistenza al virus. Inoltre, la durata dell'effetto di resistenza all'infezione dipende anche dal numero di copie di vettore presenti all'interno di ogni linea cellulare.

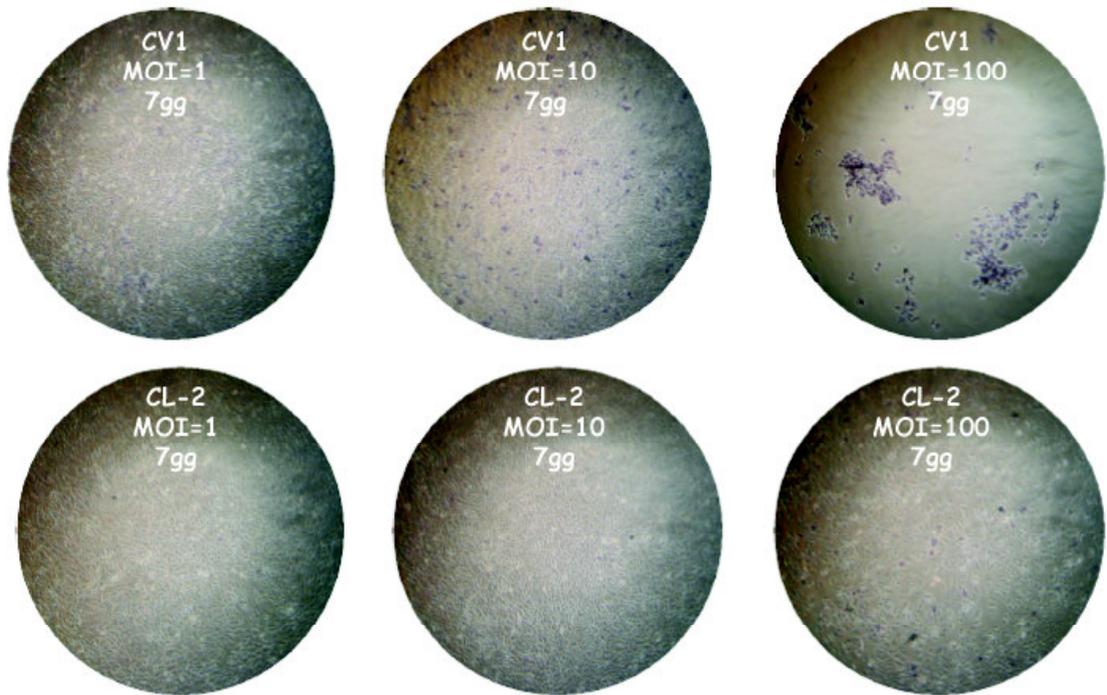


Figura 12: Fotografie di un campione di piastre a 7 giorni dall'infezione.

Le piastre identificate con CL-2 (nella seconda fila) corrispondono ad uno dei cloni derivati dalla trasduzione con pSUPER B. Sono riportate le foto delle piastre infettate a MOI=1, 10 e 100 dopo 7 giorni dall'infezione con SV40. Nella prima fila sono invece riportate le foto delle cellule CV1 (cellule permissive di controllo) sottoposte ad infezione nelle medesime condizioni.

- A MOI=1 nelle CV1 si riscontra la morte di circa il 5% delle cellule, mentre nelle CL-2 le cellule colorate sono praticamente assenti.
- A MOI=10 nelle CV1 aumentano le aree blu ($\approx 20\%$), mentre nelle CL-2 sono ancora del tutto assenti.
- A MOI=100, quando quasi tutte le CV1 sono morte, nel clone CL-2 cominciano ad essere visibili alcune aree blu; quest'ultima condizione è sovrapponibile al campione CV1 a MOI=1.

Da questi risultati è possibile concludere che i cloni produttori shRNA anti SV40 sono circa **100 volte più resistenti** all'infezione rispetto alle cellule normali.

A	LINEE CELLULARI	MOI 0	MOI 100	MOI 1000
	CV1	-	+	++
	1 PO	-	-	+
	1PM	-	-	-
	2PO	-	-	-
	2PM	-	-	-
	3PO	-	-	-
	3PM	-	-	+
	4PO	-	-	-
	4PM	-	-	-

B	LINEE CELLULARI	MOI 0	MOI 100	MOI 1000
	CV1	-	+	++
	1 PO	-	-	++
	1PM	-	-	-
	2PO	-	-	-
	2PM	-	-	+
	3PO	-	-	-
	3PM	-	-	++
	4PO	-	-	-
	4PM	-	-	+

C	LINEE CELLULARI	MOI 0	MOI 100	MOI 1000
	CV1	-	++	++
	1 PO	-	+	++
	1PM	-	-	+
	2PO	-	-	-
	2PM	-	-	++
	3PO	-	-	+
	3PM	-	-	++
	4PO	-	-	+
	4PM	-	+	++

D	LINEE CELLULARI	MOI 0	MOI 100	MOI 1000
	CV1	-	++	++
	1 PO	-	++	++
	1PM	-	-	++
	2PO	-	-	-
	2PM	-	+	++
	3PO	-	-	++
	3PM	-	-	++
	4PO	-	-	++
	4PM	-	++	++

Tabella 2: Sintesi dei risultati ottenuti in seguito all'infezione dei cloni ricombinanti con SV40.

(1PO, 1PM): esprimono siRNA diretti contro la regione codificante per *L-T wild type* di SV40.

(2PO, 2PM): esprimono siRNA diretti contro la regione codificante per *L-T mutato* di SV40.

(3PO, 3PM): esprimono siRNA diretti contro le *entrambe funzioni precoci* di SV40 (L-T e s-T antigen).

(4PO, 4PM): esprimono siRNA diretti contro le *funzioni tardive* di SV40.

PO: linee cellulari geneticamente omogenee

PM: amplificazione di più cloni simili

A: situazione riscontrata dopo 7 gg dall'infezione.

B: situazione riscontrata dopo 8 gg dall'infezione.

C: situazione riscontrata dopo 10 gg dall'infezione.

D: situazione riscontrata dopo 12 gg dall'infezione.

MOI: molteplicità di infezione.

- cellule resistenti all'infezione.

+ lisi parziale.

++ lisi totale.

D8 Test di replicazione dei vettori episomici derivati da SV40 nelle linee cellulari miste e omogenee.

Plasmidi contenenti la regione ORI/ses e quella codificante per il L-T di SV40 sono capaci di replicazione autonoma, se inseriti in cellule permissive per SV40 (CV1). Abbiamo pertanto valutato la replicazione di vettori episomici derivati da SV40 nei trasformanti stabili ottenuti, ovvero nelle linee cellulari che hanno integrato stabilmente nel genoma le cassette di espressione per shRNA di nostro interesse.

A tal fine, sono stati utilizzati due costrutti derivati da SV40, capaci di replicazione autonoma: SVE $\Delta 2$, contenente quale elemento regolativo la regione *auxI/core* di SV40, sufficiente a garantire un'adeguata replicazione; e SVEm₂ $\Delta 2$, identico al primo e caratterizzato dalle mutazioni puntiformi che determinano la perdita dell'attività trasformante di L-T. Il test prevede le seguenti fasi:

- 1) Transfezione dei plasmidi nei cloni ricombinanti.
- 2) Estrazione del DNA a basso peso molecolare a 4 e 6 giorni dalla trasfezione.
- 3) Digestione con Dpn I, specifico per il DNA metilato e non replicato all'interno delle cellule ospiti.
- 4) Digestione con Dpn II, che riconosce le basi non metilate del DNA, e quindi il DNA plasmidico replicatosi nelle cellule eucariotiche bersaglio.
- 5) Southern Blotting.
- 6) Analisi dei risultati mediante ibridazione con sonda radioattiva, corrispondente al vettore PUC-SVE.

Dai risultati si evince che i vettori contenenti le cassette di espressione per gli siRNA conferiscono alle cellule ospiti la capacità di ostacolare la replicazione di episomi contenenti la regione codificante per L-T di SV40.

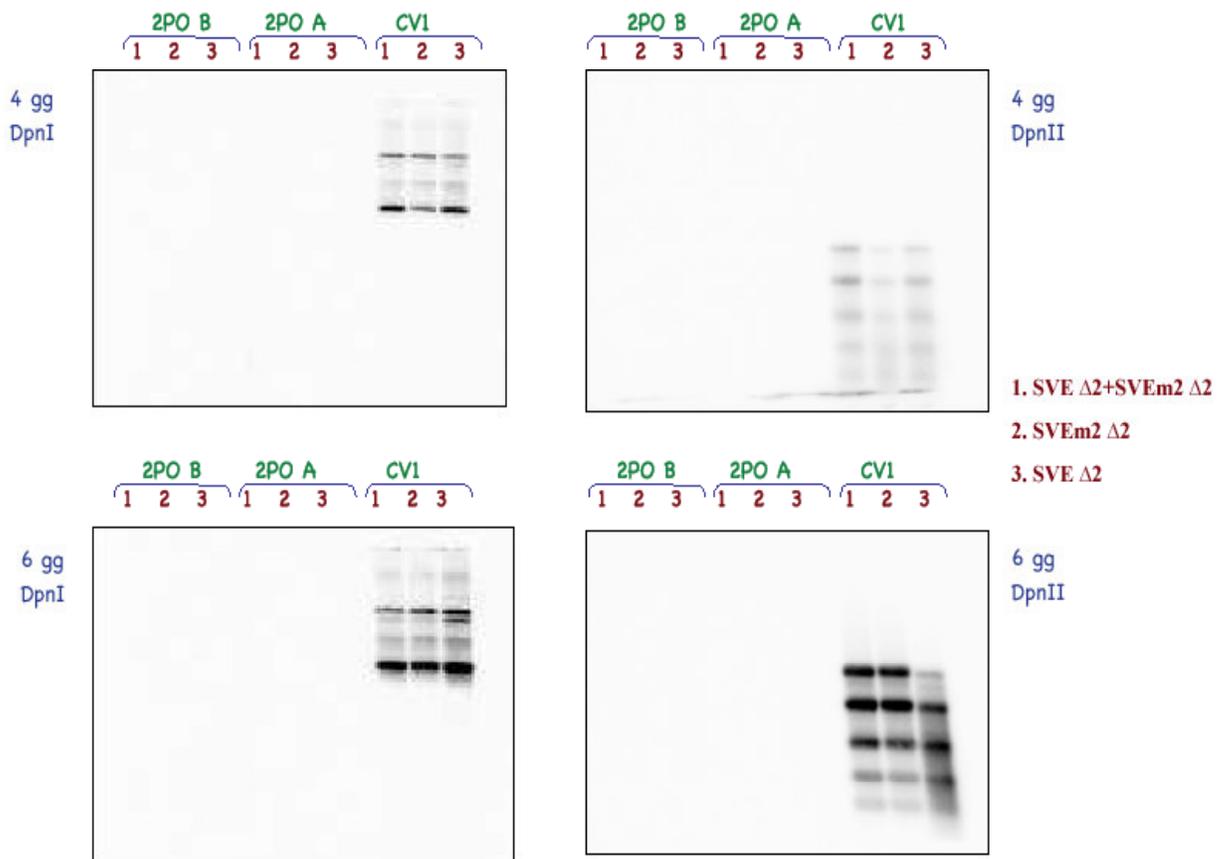


Figura 13: Efficienza replicativa di vettori episomici derivati da SV40 nelle linee cellulari “anti L-T”.

È illustrato il risultato del test di replicazione in due sub-cloni relativi alla popolazione cellulare 2PO che esprime shRNA diretti contro la versione mutata della regione codificante la proteina L-T di SV40. Dopo estrazione del DNA plasmidico a 4 e 6 giorni dalla trasfezione i campioni sono stati digeriti con l’enzima Dpn I (a sinistra) specifico per il DNA metilato e non replicato, e con l’enzima Dpn II (a destra), relativo al DNA non metilato e quindi replicato nelle cellule eucariotiche ospiti. I risultati mostrano chiaramente l’assenza di replicazione episomica all’interno dei cloni d’interesse. Analoghi riscontri sono stati evidenziati per tutte le popolazioni cellulari di nostro interesse (risultati non mostrati).

II-E Clonaggio delle cassette di espressione per RNAi in “repliconi” derivati da SV40.

Al fine di mettere a punto il sistema di “*copy control*” di vettori episomici derivati da SV40, sono stati realizzati plasmidi capaci di auto-inibire la propria replicazione nella linea cellulare CV1.

Pertanto, le cassette di espressione per RNAi, precedentemente descritte, costituite dal promotore H1, dagli oligonucleotidi diretti contro una specifica funzione di SV40, e da un terminatore della trascrizione, sono state inserite nel vettore SVE Δ2, contenente quale elemento di regolazione della replicazione la sequenza *auxI/core* di SV40, a monte o nell'introne della regione che codifica la proteina L-T. A seguito della transfezione dei plasmidi ricombinanti nelle CV1, a partire dal promotore H1, si generano shRNA capaci di inibire l'espressione della regione codificante la proteina L-T, contenuta all'interno degli stessi plasmidi. Il risultato finale sarà una replicazione autonoma, ma controllata dei vettori episomici secondo un meccanismo a feedback negativo.

L'efficacia di questo meccanismo è strettamente dipendente dal numero di copie di plasmide presenti all'interno della cellula; infatti all'aumentare del numero di copie, aumenta il numero di cassette di espressione e di conseguenza la concentrazione degli shRNA.

E1 Preparazione dei costrutti contenenti le cassette di espressione per RNAi a monte della regione codificante L-T.

Le cassette di espressione di shRNA sono state ottenute mediante digestione enzimatica dei vettori retrovirali pSUPER A, pSUPER B, pSUPER C, pSUPER D, precedentemente descritti. I due enzimi di restrizione scelti per l'escissione delle cassette dai vettori retrovirali sono Xho I, il cui sito di taglio è localizzato a monte del promotore H1, ed Eco RI, il cui sito di taglio si trova, invece, a valle del terminatore. Inoltre, tali enzimi presentano in corrispondenza del vettore SVE Δ2 siti di taglio a monte della regione che codifica L-T.

Il DNA digerito è stato sottoposto ad elettroforesi su gel d'agarosio e le bande, corrispondenti alle cassette di nostro interesse, purificate. Queste sono state poi clonate sia all'interno del vettore SVE Δ2 precedentemente digerito con gli stessi enzimi e nelle medesime condizioni, sia in PUC-SVE, codigerito prima con Kpn I ed Eco RI, e poi ligato ai frammenti d'interesse per mezzo dell'adapter KpnI/XhoI (5'

TCGAGTACC 3'). Il DNA digerito è stato sottoposto ad elettroforesi e le bande a più alto peso molecolare purificate. Metà della reazione di ligazione è stata utilizzata per trasformare batteri del ceppo *DH5 α* di *E. Coli*. Dalla coltura batteriche risultanti è stato estratto il DNA plasmidico e testata la sua identità mediante digestione con enzimi di restrizione e sequenziamento automatico.

In tal modo sono stati ottenuti i seguenti costrutti: SVE Δ 2 A, SVE Δ 2 B, SVE Δ 2 C, SVE Δ 2 D.

E2 Preparazione dei costrutti contenenti le cassette di espressione per RNAi nell'introne della regione codificante L-T.

Il plasmide SVE Δ 2 è stato digerito con l'enzima di restrizione Bst XI, presente nell'introne del gene codificante la proteina L-T di SV40. Il vettore linearizzato è stato sottoposto a reazione di defosforilazione utilizzando l'enzima CIP (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase) e ad elettroforesi su gel d'agarosio. Le bande a più alto peso molecolare sono state infine purificate. In tale vettore sono state clonate, poi, le cassette di espressione per RNAi precedentemente digerite con Eco RI e Xho I e purificate, utilizzando i seguenti adapters: AdI (BstXI/EcoRI, 5' AATTTTGT 3') e AdII (BstXI/XhoI, 5' TCGAACAA 3'), opportunamente fosforilati. Metà della reazione di ligazione è stata utilizzata per trasformare batteri del ceppo *DH5 α* di *E. Coli*. Dalla coltura batterica è stato estratto il DNA plasmidico e testata la sua identità mediante digestione con enzimi di restrizione e sequenziamento automatico.

In tal modo sono stati ottenuti i seguenti costrutti: SVE Δ 2 B_{INT}, SVE Δ 2 C_{INT}, SVE Δ 2 D_{INT}.

E3 Replicazione di vettori episomici contenenti le cassette di espressione per RNAi a monte o nell'introne della regione che codifica la proteina L-T.

Per valutare la funzionalità dei repliconi, contenenti le cassette di espressione per RNAi a monte o nell'introne del gene codificante la proteina Large T-antigen, è stato eseguito un test di replicazione in cellule CV1, permissive a SV40.

Pertanto, a 4 e 6 giorni dalla trasfezione, è stato estratto e purificato il DNA a basso peso molecolare corrispondente ai plasmidi: SVE Δ 2, SVE Δ 2 A, SVE Δ 2 B, SVE Δ 2 C, SVE Δ 2 D, SVE Δ 2 B_{INT}, SVE Δ 2/C_{INT}, SVE Δ 2/D_{INT}. Ciascun campione è stato poi digerito con l'enzima di restrizione Dpn II, in modo tale da identificare il DNA plasmidico replicatosi all'interno delle cellule ospiti. I frammenti di DNA

ottenuti, sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio, trasferiti su filtro di nylon mediante Southern blotting ed ibridati con una sonda di DNA (corrispondente a parte del plasmide PUC-SVE) marcata con ³²P.

Dai risultati ottenuti (figura 14), si evince che tutti i costrutti esaminati riescono a replicarsi all'interno di cellule eucariotiche ospiti. Inoltre, il replicone contenente l'oligo di tipo C, diretto contro le funzioni precoci di SV40 mostra, se confrontato con il costrutto di controllo (corrispondente al replicone contenente l'oligo D, diretto contro le funzioni tardive del virus), la capacità di auto-inibizione della replicazione. È senza dubbio questo un esempio di **episoma a efficienza controllata**, in quanto è capace di mantenere bassi i propri livelli di replicazione.

Al contrario, i saggi di replicazione eseguiti considerando vettori episomici derivati da SV40 contenenti le cassette di espressione per RNAi nell'introne della regione codificante per L-T (figura 15), mostrano per tutti i costrutti considerati una bassa efficienza di replicazione, rispetto al campione SVE Δ2 utilizzato quale controllo positivo, indice che il meccanismo realizzato disturba, in qualche modo, l'intera trascrizione del gene codificante la proteina L-T (effetto aspecifico).

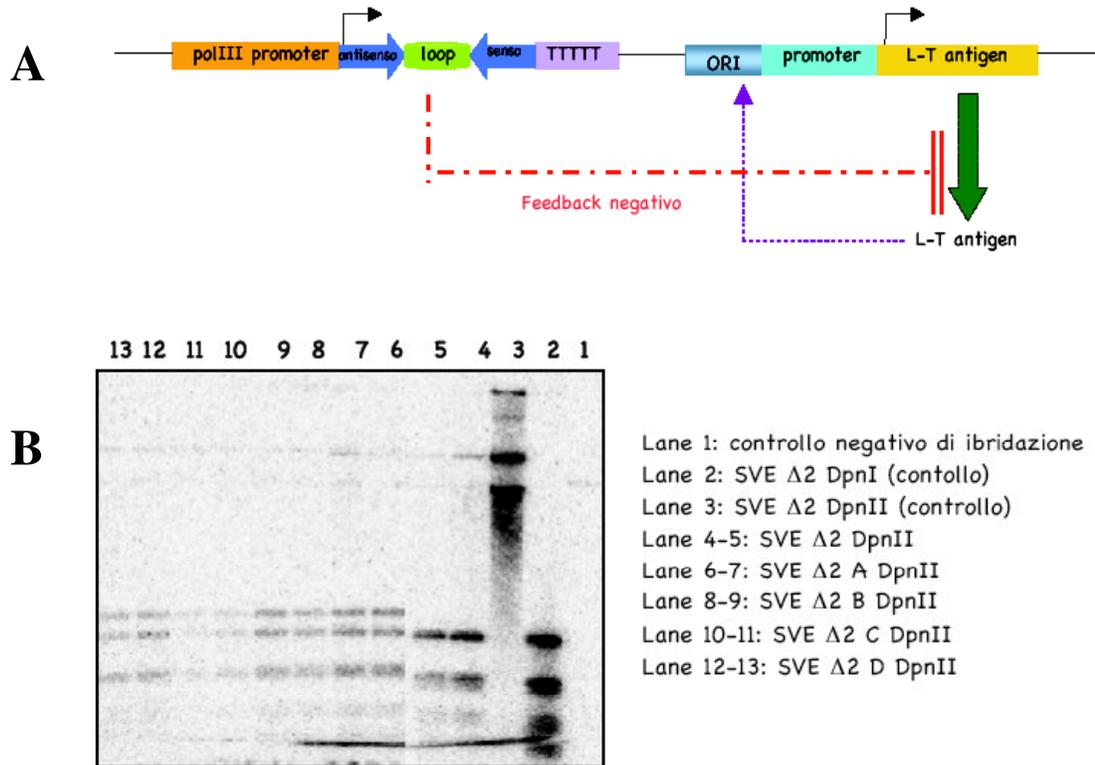


Figura 14: Vettori episomici derivati da SV40 contenenti le cassette di espressione per RNAi a monte della regione codificante per L-T.

- A. Rappresentazione schematica del meccanismo a feedback negativo proposto, i costrutti presentano le cassette di espressione d'interesse a monte della regione codificante la proteina L-T di SV40.
- B. Risultato di uno dei test di replicazione. I costrutti analizzati sono: SVE Δ2 (controllo positivo di replicazione, *lane* 4-5), SVE Δ2 A (contenente l'oligo di tipo A, *lane* 6-7), SVE Δ2 B (contenente l'oligo di tipo B, *lane* 8-9), SVE Δ2 C (contenente l'oligo di tipo C, *lane* 10-11), SVE Δ2 D (contenente l'oligo di tipo D, *lane* 12-13). Dopo estrazione del DNA plasmidico a 4 giorni dalla trasfezione i campioni sono stati digeriti con l'enzima Dpn II. Ciascun campione è stato preparato in duplicato, di conseguenza ogni *lane* corrisponde ad una trasfezione indipendente. Si evince che tutti i costrutti analizzati presentano capacità di replicazione all'interno di cellule bersaglio. Inoltre, considerando il replicone contenente l'oligo D quale controllo dell'efficienza del sistema realizzato (questi infatti, non presenta capacità di auto-inibizione della replicazione in quanto esprime shRNA diretti contro le funzioni tardive di SV40), e ponendolo a confronto con il replicone contenente l'oligo C, che esprime shRNA diretti contro le funzioni precoci di SV40, si osserva che l'intensità di replicazione è maggiore nel campione controllo (*lane* 12-13) rispetto a quella relativa al replicone d'interesse (*lane* 10-11) indice del corretto funzionamento del meccanismo da noi realizzato.

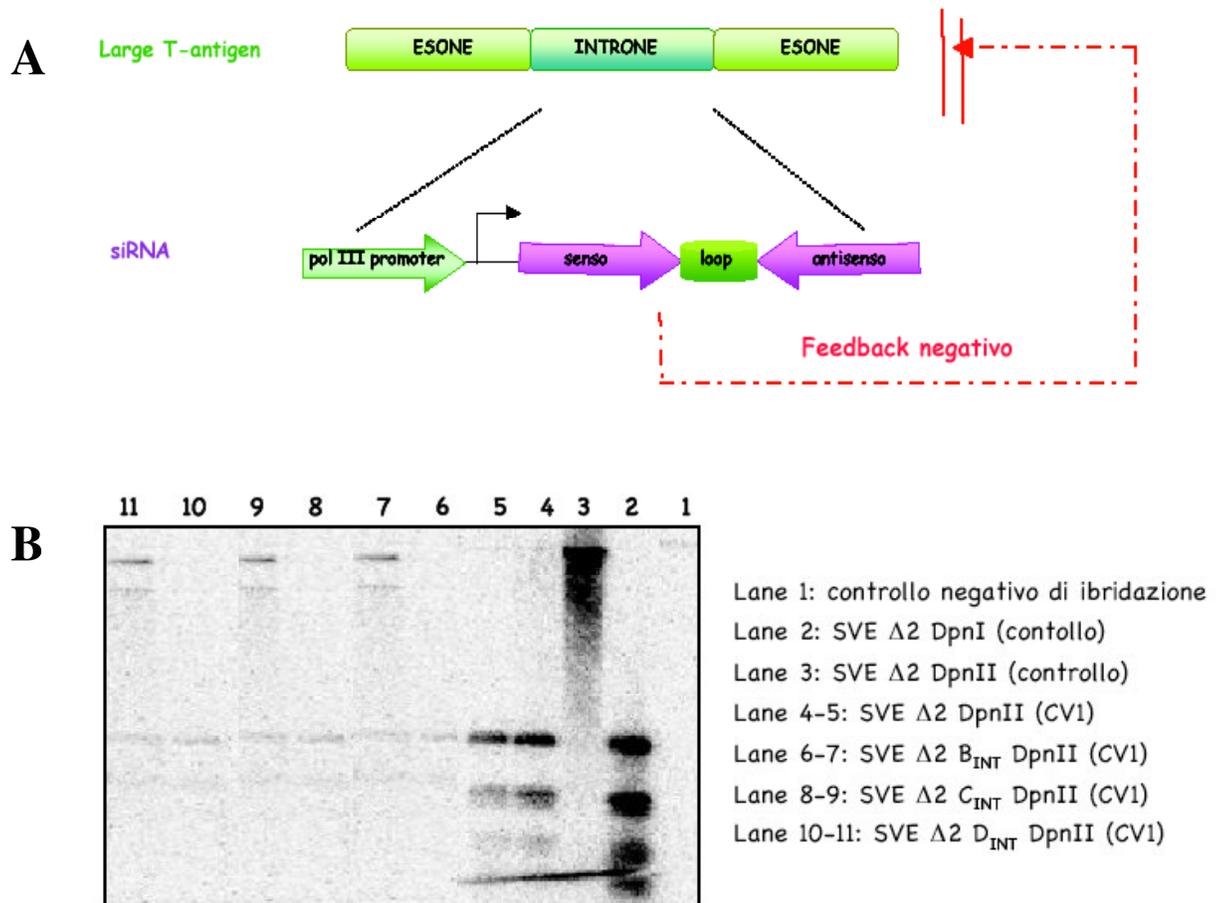


Figura 15: Vettori episomici derivati da SV40 contenenti le cassette di espressione per RNAi nell'introne della regione codificante per L-T.

- A. Rappresentazione schematica del meccanismo a feedback negativo realizzato, i costrutti SVE $\Delta 2$ B_{INT} (contenente l'oligo di tipo B, *lane 6-7*), SVE $\Delta 2$ C_{INT} (contenente l'oligo di tipo C, *lane 8-9*), SVE $\Delta 2$ D_{INT} (contenente l'oligo di tipo D, *lane 10-11*). presentano le cassette di espressione d'interesse nell'introne della regione codificante la proteina L-T di SV40.
- B. Risultato di uno dei test di replicazione. Dopo trasfezione con calcio-fosfato ed estrazione del DNA plasmidico a 4 giorni, i campioni sono stati digeriti con l'enzima Dpn II (specifico per il DNA replicato in cellule eucariotiche ospiti). Ciascun campione è stato preparato in duplicato, di conseguenza ogni lane corrisponde ad una trasfezione indipendente. Si evince che tutti i costrutti analizzati presentano capacità di replicazione all'interno di cellule bersaglio, inferiore rispetto al controllo di replicazione SVE $\Delta 2$ (*lane 4-5*). I repliconi di interesse contenenti l'oligo C (diretto contro le funzioni precoci di SV40, *lane 8-9*) o l'oligo B (diretti contro la versione mutata del gene codificante la proteina L-T) non mostrano capacità di autoregolazione della replicazione.

CONCLUSIONI

Gli esperimenti descritti hanno avuto come obiettivo la realizzazione di vettori episomici derivati da SV40 capaci di permanere per un certo periodo di tempo in cellule bersaglio. I due principali ostacoli alla possibilità di “creare” repliconi, contenenti l’origine di replicazione di SV40, capaci di permanere in cellule umane, sono i seguenti:

a. Il vettore, per potersi replicare in modo autonomo, necessita della proteina virale L-T, la quale però possiede attività trasformante, in quanto è capace di legare i due oncosoppressori p53 e pRB, inattivandoli.

b. Una eccessiva replicazione del vettore all’interno delle cellule bersaglio potrebbe essere tossica per la cellula stessa. E’ pertanto necessario che la replicazione del vettore possa essere limitata o, meglio ancora, regolata.

Il primo problema è stato risolto mutagenizzando il gene che codifica la proteina L-T, in modo da eliminare le capacità di interazione con le proteine suddette, e quindi la sua capacità trasformante, senza però farle perdere la capacità di promuovere la replicazione del DNA “target”.

Per affrontare il secondo problema sono stati realizzati vettori episomici derivati da SV40 con capacità replicativa “attenuata” o modulabile, da complementare eventualmente con elementi di controllo tessuto-specifici, in modo da ottenere repliconi capaci di replicazione selettiva in determinati tessuti.

Il primo approccio seguito è stato quello di identificare il più piccolo elemento presente nella regione ORI/ses di SV40, capace di replicazione autonoma. Pertanto sono realizzati vettori contenenti delezioni progressive della regione ORI/ses di SV40. Dall’analisi dei dati riportati si può assumere che la regione $\Delta 2$ (*auxI/core*), è **sufficiente** a garantire la replicazione virale.

Successivamente è stato introdotto in vettori episomici derivati da SV40 un sistema di limitazione della replicazione, basato sull’utilizzo di cassette di espressione in grado di generare shRNA, tali da interferire con la trascrizione di L-T e, di conseguenza, con la replicazione di vettori derivati da SV40. Dai risultati si evince che la presenza di siffatte cassette all’interno di repliconi fornisce la capacità di auto-inibizione della replicazione.

È senza dubbio questo un esempio di episoma a efficienza controllata, in quanto capace di mantenere bassi i propri livelli di replicazione.

III. METODOLOGIE SPERIMENTALI IMPIEGATE

Clonaggio del DNA.

Il clonaggio consiste nella moltiplicazione di un segmento di DNA appartenente ad un dato genoma. Ciò si ottiene unendo tale frammento a una piccola molecola di DNA che serve da trasportatore (vettore di clonaggio). Successivamente si avrà la replicazione di questo DNA modificato (clone) migliaia o milioni di volte fornendo un gran numero di copie del clone stesso. Il risultato è l'amplificazione selettiva di quel determinato frammento di DNA. Il clonaggio utilizza diverse metodologie:

1. un metodo per tagliare il DNA in punti precisi: digestione con endonucleasi di restrizione;
2. un metodo per unire covalentemente due frammenti di DNA: reazione di ligasi;
3. una piccola molecola di DNA capace di autoreplicarsi: vettore di clonaggio (plasmidi, cosmidi, fagi, Bac, Yac ecc). Quando queste molecole contengono DNA di differente origine vengono dette ricombinanti;
4. una cellula ospite che fornisce l'apparato enzimatico necessario per la replicazione del DNA ricombinante;
5. un metodo per la selezione delle cellule ospiti che contengano il DNA ricombinante.

1) Digestione con enzimi di restrizione.

Una miscela di digestione contiene: il DNA che deve essere digerito, gli enzimi di restrizione, la cui concentrazione si misura in Unità/μl (l'unità enzimatica è la quantità di enzima necessario per trasformare 1 mole di substrato in prodotto), facendo attenzione che il volume di enzima non ecceda il 10% del volume finale di reazione: in questo modo il glicerolo presente negli stock di enzimi non interferisce con l'attività enzimatica, il tampone specifico (che assicura le condizioni ottimali di forza ionica, specifica per l'enzima di interesse) e la BSA (100 mg/ml) se necessaria. Una volta allestita, la miscela deve essere incubata a 37°C per 2h (questi valori, relativi alla temperatura e al tempo di incubazione, variano a seconda dell'enzima di restrizione impiegato). La completezza della reazione è valutata sottoponendo un'aliquota della miscela di reazione a elettroforesi su gel d'agarosio all'1%, colorato con bromuro d'etidio e confrontando la banda risultante con quella generata da un'aliquota di corrispondente DNA non digerito: un plasmide linearizzato corre più lentamente del suo corrispondente non digerito, circolare, superavvolto.

2) "Annealing" di due oligo complementari.

30 μg di ciascun filamento sono risospesi in 100 μl di NaCl 5M e TE (10mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH7.5) o in alternativa H₂O mQ, e il tutto è incubato per 2 min in H₂O in ebollizione. Si aspetta, poi, che l'H₂O torni a temperatura ambiente, in modo da permettere l'appaiamento dei due oligo ed ottenere, così, il frammento di DNA a doppio filamento, utilizzato successivamente per il clonaggio in un vettore plasmidico opportunamente linearizzato.

3) Reazione di ligasi.

La miscela di reazione contiene: il vettore e l'insero da clonare, generalmente in rapporto 1:2 (vettore:insero) al fine di evitare che il vettore si richiuda su se stesso, e per

facilitare il clonaggio, aumentando la probabilità di formazione delle molecole ricombinanti; l'enzima DNA ligasi del fago T4 (2 U/ μ l) con il buffer relativo (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, MgCl₂ 10 mM, spermidina 1 mM, DTT 1 mM, ATP 1 mM), ed acqua fino a raggiungere il volume di 20 μ l. Una volta allestita, la miscela di reazione è incubata a 15°C over night. In queste condizioni, l'enzima lega covalentemente il fosfato in posizione 5' di una base e l'OH (gruppo ossidrilico) in posizione 3' della base successiva, a condizione che le due basi siano contigue. In realtà, per ciascuna clonazione è valutato di volta in volta il rapporto vettore/inserto in grado di spostare efficacemente la reazione verso la saldatura tra DNA lineare e DNA plasmidico; una miscela di reazione priva dell'inserto è inoltre utilizzata come controllo per valutare la capacità del vettore di richiudersi su se' stesso. Le miscele di reazione sono utilizzate per trasformare cellule *E.coli* DH5 α ; dal confronto delle piastre si ottiene una stima dell'efficienza di "ligation": generalmente, quando le piastre di controllo contengono una quantità, almeno 5 volte, inferiore di colonie rispetto alle altre, si assume che il vettore è scarsamente capace di richiudersi su se' stesso e che di conseguenza la maggior parte delle colonie sviluppatesi contiene la molecola ricombinante desiderata.

4) Preparazione cellule competenti.

Affinché una cellula possa essere trasformata, deve essere resa permeabile al DNA esogeno. A questo scopo, cellule di *E.coli* (ceppo DH5 α Top 10) sono state rese chimicamente competenti. Tale ceppo batterico è difettivo per la restrizione ed è caratterizzato da mutazioni nei geni *recA1* e *relA1*, atte a migliorare la stabilità e la qualità dei plasmidi ricombinanti preparati mediante le "mini-" e "maxi-preps". Contiene inoltre il marcatore α p80*lacZ*AM15 che permette la α -complementazione del gene della β -galattosidasi e la selezione dei ricombinanti durante il test blu-bianco. Pertanto, una singola colonia di DH5 α Top 10 è stata inoculata in 5 ml di mezzo di Luria-Bertani (LB 1%, NaCl 1%, Triptone 0.5%, estratto di lievito) e cresciuta con costante agitazione a 37°C per 16 h. Successivamente, 1 ml di questa coltura è stato utilizzato per inoculare 100 ml di LB. Le cellule sono state cresciute in un incubatore a 37°C con agitazione costante per 3 h, fino a raggiungere una densità cellulare pari a $4-7 \times 10^7$ cellule/ml, ossia una OD₅₅₀: 0.45-0.55. A questo punto, la coltura è stata posta in tubi sterili di polypropylene da 50 ml, e centrifugata a 4000 rivoluzioni per minuto (rpm) per 5 minuti a 4°C. La pasta batterica così ottenuta è stata risospesa in 50 ml di una soluzione 50 mM CaCl₂, precedentemente raffreddata, e le cellule incubate a 4°C per 30 minuti. Dopo centrifugazione, le cellule sono state risospese in 10 ml di una soluzione contenente 15% glicerolo e 50 mM CaCl₂, suddivise in aliquote da 0.2 ml e conservate a -80°C.

5) Trasformazione batterica.

Per trasformare le cellule batteriche con DNA plasmidico è sufficiente aggiungere, ad un'aliquota di 200 μ l di cellule competenti, 10 ng di plasmide superavvolto e incubare in ghiaccio per 20 min. Segue un "heat-shock" a 37°C, per 5 min, ed un'incubazione in ghiaccio per 15 min. Si aggiungono, successivamente, 800 μ l di LB, si incuba nell'agitatore a 37°C per 30-60 min, in modo tale da favorire l'entrata del plasmide nelle cellule ospiti e consentire l'espressione del gene plasmidico che codifica per la resistenza all'antibiotico selettivo. I batteri sono poi centrifugati a 13000 rpm per 5 min (Haeraeus Biofuge), risospesi in 100 μ l di LB, e piastrati su terreno solido selettivo (LB con agar 1.5% e antibiotico appropriato, e.s. ampicillina 100 μ g/ml). Dopo incubazione a 37°C per 16 ore, sulla piastra Petri compaiono le colonie: l'antibiotico fa sì che crescano solo le cellule che hanno assunto il plasmide poichè esso contiene il gene che conferisce resistenza a quell'antibiotico. Ogni volta che si effettua una trasformazione, bisogna aver cura di controllare l'efficacia dell'antibiotico piastrandolo, in parallelo, 200 μ l di cellule batteriche in assenza di DNA plasmidico.

6) Test dell' α -complementazione.

Alcuni vettori presentano un frammento di DNA di *E.coli* che contiene le sequenze per la sintesi dei primi 146 aminoacidi dell'enzima β -galattosidasi. In tale regione codificante è spesso presente un polylinker, contenente siti unici di restrizione. Vettori di questo tipo sono utilizzati in cellule ospiti che codificano per la regione carbossi-terminale della β -galattosidasi stessa. I frammenti prodotti dalle cellule ospiti e quelli prodotti dal plasmide possono associarsi a formare una proteina enzimaticamente attiva. I batteri Lac⁺, che risultano dall' α -complementazione vengono facilmente riconosciuti poiché formano colonie blue in presenza di un substrato cromogenico: X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galattosidasi). Tuttavia, l'inserzione di un frammento di DNA esogeno nel sito di policonaggio del plasmide, determina la formazione di un frammento amino-terminale che non è capace di α -complementazione. I batteri che posseggono plasmidi ricombinanti, formano, perciò, colonie bianche. Lo sviluppo di questo semplice test colorimetrico ha ampiamente facilitato l'identificazione delle colonie batteriche che portano costrutti ricombinanti. Pertanto, 40 μ l di una soluzione di X-gal 20 mg/ml in dimetilformamide e 40 μ l di una soluzione di isopropyltio- β -D-galattoside (IPTG) 20 mg/ml sono stati aggiunti ad una piastra contenente LB, agar 1.5% e ampicillina. La piastra è stata incubata a 37°C per 3-4 h, in modo tale da asciugare la soluzione fluida sovrastante. Successivamente, sono stati piastrati 100 μ l di sospensione batterica opportunamente trasformata, e la piastra stessa è stata incubata a 37°C per 16 h.

Estrazione di DNA plasmidico.

A. Mini preparazioni.

Le colonie cresciute su piastre di LB, agar all'1.5%, in presenza di un antibiotico selettivo (ampicillina 100 mg/ml), sono state prelevate e singolarmente inoculate in 5 ml di L.B. ed ampicillina ad una concentrazione finale di 100 μ g/ml. Gli inoculi sono stati posti a 37°C sotto continua agitazione (300 rpm) per 16 h. Per l'estrazione dei DNA plasmidici è stato utilizzato il kit Nucleospin della Macherey-Nagel secondo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

B. Maxi preparazioni plasmidiche.

Singole colonie dei ceppi batterici contenenti i plasmidi di interesse sono state cresciute per 8 h a 37°C in 5 ml di LB, in presenza di 100 μ g/ml di ampicillina. L'inoculo così preparato è stato introdotto in 400 ml di LB e la coltura batterica è stata cresciuta per 16 h in continua agitazione (300 rpm) a 37°C. Per l'estrazione dei DNA plasmidici è stato utilizzato il Kit: Nucleobond AX della Macherey-Nagel, seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Elettroforesi su gel di agarosio.

Tale metodologia rappresenta un valido strumento di analisi degli acidi nucleici perché permette di separare molecole di DNA o di RNA di diversa lunghezza e, quindi, di diverso peso molecolare. Il gel è preparato sciogliendo l'agarosio, un polimero lineare estratto dalle alghe, in TAE 1X (Tris acetato 0.04 M, 0.001 M EDTA), portato alla temperatura di ebollizione, fin quando non si ottiene una soluzione trasparente. Mediante raffreddamento, l'agarosio forma una matrice, la cui densità dipende dalla concentrazione

dell'agarosio stesso. Prima che il gel polimerizzi si aggiunge bromuro di etidio (EtBr 10 mg/ml) 1:10'000. Il gel viene colato, poi, in un lettino da elettroforesi e lasciato raffreddare. Una volta polimerizzato, il gel è posto nell'apparato ed immerso in un tampone di corsa, TAE 1X a pH 8.0. Ai due estremi di questa è applicata una differenza di potenziale. I campioni vengono diluiti in H₂O e "loading buffer" (0.25% blu di bromofenolo, 0.25% xilen-cianolo, e 15% Ficoll in H₂O), utile per seguire la corsa elettroforetica. I campioni sono applicati in opportune fenditure verticali, dette pozzetti, formate da uno stampo al momento della preparazione del gel. Si caricano, dunque i campioni e si applica una differenza di potenziale di 50/120 V per un tempo variabile a seconda delle dimensioni del DNA e della concentrazione del gel. Quando si applica un campo elettrico avente una certa intensità, il DNA che è carico negativamente a pH neutro, migra verso l'anodo (polo positivo) con una velocità che è funzione inversa del rapporto peso molecolare/carica. La velocità di migrazione dipende da diversi parametri: dimensioni dei diversi frammenti di DNA, concentrazione dell'agarosio, conformazione del DNA, intensità della corrente applicata, forza ionica del tampone. Si visualizzano infine le bande del DNA ponendo il gel sotto raggi UV; il bromuro di etidio che si è intercalato alle basi appare in queste condizioni luminescente. Le dimensioni dei frammenti sono stimate in presenza di marcatori con peso molecolare noto.

Per l'estrazione e la purificazione di DNA da gel d'agarosio è stato utilizzato il JET QUICK GEL EXTRACTION SPIN KIT 250 (Genomed Gm), seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

Southern blotting.

Tale tecnica viene utilizzata per analizzare prodotti di PCR e digestioni enzimatiche di DNA genomico e/o di plasmidi. Il DNA viene prima digerito con uno o più enzimi di restrizione, e i risultanti frammenti sono separati in base alle dimensioni mediante elettroforesi su gel d'agarosio. Dopodichè viene fatta una foto al gel, posizionando un righello fluorescente agli UV con lo "zero" in corrispondenza dei pozzetti. Ciò permette di confrontare e, quindi, determinare la banda, ottenuta con il "Southern", a quale frammento della digestione corrisponda. Per denaturare il DNA, il gel è immerso in una soluzione 0.5 M NaOH e 1.5 M NaCl e sottoposta a lenta e continua agitazione per 30 min. Dopo tale trattamento il gel è trattato in maniera analoga in una soluzione neutralizzante contenente NaCl 1.5 M e Tris-HCl 0.5 M. A questo punto il DNA viene trasferito su una membrana di nylon (Hybond-N+). Il gel è posto, quindi, su un foglio di carta Whatman 3 MM imbevuto della soluzione di trasferimento SSC 10X pH 7.0 (diluizione 1:2 della soluzione SSC 20X, formata da: 3 M NaCl e 0.3 M Na₃-citrato), le cui estremità sono immerse nella medesima. Sul gel è poggiato il filtro tagliato delle sue stesse dimensioni e precedentemente equilibrato in SSC 10X. Al di sopra sono posti 4 fogli di carta Whatman 3 MM imbevuti di SSC 10X e numerosi fogli di carta assorbente asciutti. Viene, infine messo un peso pari a 1 Kg e si lascia trasferire il DNA sulla membrana. I frammenti di DNA sono trasportati dal gel verso l'alto per capillarità e depositati sulla superficie del filtro. Il tempo per il trasferimento del DNA dipende dalla taglia dei frammenti di DNA e dalla concentrazione di agarosio nel gel. Il filtro è successivamente posto per 2 min in SSC 2X, per lavarlo da residui di NaOH e di gel, e lasciato asciugare all'aria su carta assorbente a temperatura ambiente. Infine, lo stesso è riscaldato per 2 ore a 80°C affinché il DNA a singolo filamento si leghi in modo stabile ad esso e possa essere conservato per una successiva ibridazione.

Analisi mediante ibridazione con sonda radioattiva:

1) Pre-ibridazione.

Il filtro, su cui è stato trasferito il DNA, viene posto nella soluzione di preibridazione per 2 ore a 65°C (il tempo dipende, in realtà, dalla complessità del DNA e la temperatura dal

livello di omologia con la sonda) in agitazione costante. La soluzione di preibridazione ha la seguente composizione:

- SSC 5X (0.9 M NaCl e 0.09 M Na₃-citrato)
- Denhardt's solution 5X (0.02% BSA, 0.02% Ficoll, 0.02% PVP)
- SDS 0.5%
- ssDNA 0.1 mg/ml denaturato a 95°C per 10 min ed immediatamente raffreddato in ghiaccio per bloccare la rinaturazione.

La soluzione di Denhardt e l'SSC determinano la stringenza ionica, mentre l'ssDNA serve ad evitare il fondo dato dalla sonda che ibridare aspecificamente il filtro.

2) Marchature delle sonde mediante "Nick Translation".

La tecnica si basa sull'introduzione di rotture a singolo filamento (*nicks*) nel DNA, prodotte dalla *DNasi I* pancreatica che lascia estremità 3'-OH e 5'-fosfato libere. I punti di rottura servono da innesco per l'attività polimerasi 5' -> 3' della *DNA polimerasi I* di *E. coli*. Si sfrutta poi il fatto che l'oloenzima possiede anche attività esonucleasica 5' -> 3' e quindi è in grado di rimuovere il DNA stampo e rimpiazzarlo con DNA di nuova sintesi. Tutti i materiali utilizzati provengono dal Nick Translation Kit N5500 della Amersham Biosciences. Il DNA da marcare (1 µg) è posto in un tubo eppendorf da 1.5 ml. Successivamente sono aggiunti 20 µl di una miscela così costituita da: 8 µl di dCTP, 8 µl di dTTP, 8 µl di dGTP. A questa sono aggiunti: 10 µl di {α-³²P} dATP, 10 µl di enzima e H₂O fino a raggiungere il volume finale di 100 µl. Il tubo con la miscela è lasciato 2 h a 16°C per favorire l'incorporazione dei nucleotidi. Infine, la reazione è stoppata mediante l'aggiunta di 10 µl di EDTA 0.2 M pH 8.0. I nucleotidi non incorporati nel DNA-sonda sono allontanati mediante la tecnica della gel-filtrazione, allo scopo di diminuire il rumore di fondo rilevabile al termine dell'esperimento. Vengono pertanto preparate colonnine cromatografiche ad esclusione molecolare Sephadex G-50 (Sigma). In particolare è impaccata una siringa da 1 ml con la resina Sephadex preventivamente equilibrata con il tampone TE (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5). Essa è poi centrifugata per 5 min a 2'000 rpm per un miglior impacchettamento della matrice Sephadex. Successivamente, si applica la miscela di reazione sulla colonnina e si centrifuga a 2'000 rpm per 5 min. I nucleotidi non incorporati al DNA sono trattenuti dalla colonnina, mentre la sonda radioattiva, di dimensioni maggiori, passa attraverso la matrice e si ritrova in un tubo da 1.5 ml posto alla base della colonnina. Al termine della reazione, 1 µl della miscela è misurato mediante scintillatore (Beckman LS-1801) per controllare l'efficienza di incorporazione del nucleotide radioattivo.

3) Ibridazione.

Alla soluzione di preibridazione è aggiunta la soluzione di DNA sonda marcata come descritto nel precedente paragrafo. Tale sonda è denaturata a 95°C per 5 min e poi aggiunta alla miscela di ibridazione. L'ibridazione è effettuata a 65°C per 18 h in agitazione costante.

Al termine di tale trattamento, la soluzione di ibridazione è rimossa ed il DNA sonda, non ibridato, allontanato lavando il filtro due volte con una soluzione di SSC 0.6 X e 0.4% SDS, a RT e per altre due volte a 65°C, in continua agitazione, per 20 min. I lavaggi sono necessari affinché la radioattività, misurata con un contatore Geiger, non risultata localizzata solo in determinate zone e non diffusa sull'intero filtro. Questo è poi lasciato asciugare all'aria. La localizzazione delle zone ibridate è rilevata dopo esposizione per 2 h in uno schermo GS250-HS BioRad e successiva acquisizione dell'immagine prodotta dallo schermo utilizzando un phosphorimager (BioRad GS-250), equipaggiato con l'applicativo Molecular Analyst (BioRad).

Colture cellulari.

Cellule eucariotiche in attiva crescita sono mantenute in coltura a 37°C in atmosfera umidificata, con il 5% di CO₂ in terreno DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco) con l'aggiunta di siero bovino, alla concentrazione del 10% (FBS, Gibco), di penicillina e streptomina, alla concentrazione finale dell'1%, e di L-glutamina all'1%. L'amplificazione delle cellule, al raggiungimento della confluenza, avviene tramite lavaggio con PBS (8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.15 g/l Na₂HPO₄, 20 mg/l KH₂PO₄, PBS tablets, ICB Biomedicals), importante per allontanare il terreno di coltura e le cellule morte in esso contenute, fonte probabile di contaminazione, ma in special modo il siero, che inibisce l'azione dell'enzima tripsina (Trypsin-EDTA, Gibco). Infatti, 1 ml di tale soluzione è versato su ogni piastra, in modo tale da rompere i legami peptidici tra le cellule aderenti al substrato e quest'ultimo. Dopo incubazione a 37°C e 5% CO₂ per 1 minuto, le cellule sono raccolte e diluite opportunamente in piastre nuove.

A. Trasfezione con Calcio-Fosfato.

Le cellule sono piastrate in modo tale che al momento della trasfezione si abbia una confluenza del 50-60%, e incubate a 37°C e al 5% di CO₂; tale operazione è eseguita circa 4 ore prima dell'esperimento. Le soluzioni impiegate per consentire la formazione del precipitato sono:

- HBS 2X (Hepes 10 g/l, NaCl₂ 16 g/l, pH 7.1), alla concentrazione finale 1X;
- CaCl₂ 2M alla concentrazione finale di 125 mM;
- PO₄ 100X (70 mM Na₂HPO₄ e 70 mM NaH₂PO₄), alla concentrazione finale 1X.

Le cellule sono transfettate con 5 µg di DNA plasmidico; il volume di precipitato è di 0,5 ml. Dopo 12 h le cellule sono lavate 2 volte con PBS contenente EGTA 3 mM, allo scopo di allontanare i residui di precipitato rimasti sul fondo delle piastre, e successivamente incubate, dopo l'aggiunta di terreno di coltura fresco, a 37°C e al 5% CO₂ per 48 h. Tutte le soluzioni utilizzate sono precedentemente sterilizzate mediante filtrazione con filtri da 0,22 µm della Nalgen e/o in autoclave, e le operazioni descritte sono eseguite sotto cappa aspirante a flusso laminare, per evitare contaminazioni.

B. Infezione delle cellule.

L'infezione con il virus SV40 è realizzata impiegando piastre semiconfluenti di cellule eucariotiche. Dopo eliminato il mezzo di coltura e lavato le cellule con 4 ml di PBS 1X, è aggiunto il virus, risospeso in mezzo senza siero (0.5 ml). L'infezione è fatta avvenire incubando le cellule stesse a 37°C per 2 h, avendo cura di agitare spesso la piastra in modo tale che il virus si distribuisce uniformemente. Infine è aggiunto il mezzo di coltura completo e le cellule incubate a 37°C. Dopo 6-7 gg è evidente l'effetto citopatico.

C. Valutazione vitalità cellulare con il test del trypan blue.

La colorazione delle cellule con *Rosso neutro* e *Trypan blue* consente di determinare il numero di cellule vive presente in una sospensione cellulare. Si basa sul principio che le cellule vive posseggono membrane intatte che escludono certi coloranti come il trypan, mentre le cellule morte non lo fanno. La sospensione cellulare si miscela con una soluzione di Trypan e si osserva al microscopio: le cellule vive avranno un citoplasma chiaro, mentre quelle morte si colorano di blu. Il protocollo della colorazione richiede la preparazione di due soluzioni, opportunamente filtrate con filtri da 0.2 µm:

- soluzione 1: PBS, MgCl₂, CaCl₂ e rosso neutro 0.03%
- soluzione 2: PBS, MgCl₂, CaCl₂ e formaldeide 3.7%.

Dopo aver aspirato il terreno di coltura, sono aggiunti ad ogni piastra 500 µl della soluzione 1. Trascorso un periodo di incubazione a RT di 10 minuti, sono aggiunti 100 µl di trypan blue. Dopo altri 30 minuti, è aspirato il colorante e sono aggiunti 500 µl della soluzione 2. Le piastre sono, infine, fotografate con fotocamera digitale.

D. Estrazione di DNA a basso peso molecolare da cellule eucariotiche (metodo di Hirt).

Le cellule sono lavate con 4 ml di PBS; e ad ogni piastra sono aggiunti 1 ml della soluzione di Hirt (0.6% SDS, 10 mM EDTA pH 7.5), fatta agire a RT per 30 minuti, agitando periodicamente i contenitori. Alla miscela di lisi sono poi aggiunti 250 µl di NaCl 5 M. Dopo aver incubato i campioni per 16 h a 4°C, allo scopo di far precipitare il DNA genomico, questi sono centrifugati a 4°C per 15 minuti a 13000 rpm (Hearaeus Biofuge). Il DNA a basso peso molecolare rimasto nella fase acquosa è poi purificato dalle impurità mediante estrazioni successive con fenolo-cloroformio a pH 8.0 e precipitato, con l'aggiunta di 20 µg di tRNA e di due volumi di etanolo assoluto, incubando i campioni a -80°C per 1 h circa. Il precipitato ottenuto, mediante centrifugazione a 13000 rpm a 4°C per 10 minuti è, infine, essiccato in un concentratore sotto vuoto (Savant) e risospeso in H₂O bidistillata o TE a pH 8.0 (Tris-HCl 10 mM, pH 8, EDTA 1 mM).

Sequenziamento automatico.

Al fine di determinare la corretta inserzione di ogni frammento, al termine di ogni clonaggio, è determinata la sequenza del vettore. A questo scopo è usata la tecnica di sequenziamento basata sul metodo di determinazione di Sanger. La tecnica prevede la sintesi di catene di DNA di diversa lunghezza complementari al DNA stampo presente nella miscela di reazione. La diversa lunghezza dei frammenti è dovuta all'utilizzo, nella reazione di sequenza, oltre che di deosinucleotiditri-fosfato (dNTPs), anche dei loro analoghi dideozinucleotiditri-fosfato (ddNTPs), che mancando del gruppo ossidrilico al 3', arrestano la catena quando vengono incorporati durante la polimerizzazione. Le sequenze sono determinate mediante sequenziatore capillare ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosistem), usando l'ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle sequencing Ready Reaction kit. In un'unica miscela di reazione si trovano i terminatori Big Dye (dideozinucleotidi trifosfati marcati con 4 diversi coloranti ad alta sensibilità nella cui struttura si trova un donatore di colore derivato dalla fluoresceina, ottimizzato per assorbire l'energia di eccitazione del laser a ioni di argon del sequenziatore, collegato ad un accettore derivato dalla rodamina, che determina lo spettro di emissione caratteristico di ogni colorante), l'enzima Ampli Taq DNA polimerasi, e tutti i componenti richiesti per la reazione di sequenziamento (dNTP, MgCl₂ e buffer Tris-HCl a pH 9.0). Ogni reazione di sequenza contiene: 5 µl della miscela di reazione citata, 4 µM di primers per l'innesco della reazione di polimerizzazione e 300 ng di DNA campione. I primers adoperati per le sequenze su entrambi i filamenti sono specifici e diversi per ogni plasmide da sequenziare. Le reazioni di sequenza sono state eseguite nel DNA Thermal Cycler (9700) con il seguente programma:

90°C	2 minuti	(1 ciclo)
50°C	10 secondi	
60°C	4 minuti	(35 cicli)
95°C	30 secondi	

Al termine del ciclo termico sono aggiunti, in ciascun tubicino, 20 µl di H₂O. Ogni reazione di sequenza è stata purificata mediante una colonnina cromatografia (Centri-Sep Spin Columns Perkin Elmer), per rimuovere l'eccesso dei terminatori non incorporati nel prodotto di reazione. Ad ogni colonnina sono stati aggiunti 800 µl di H₂O sterile. Successivamente, le stesse, sono state incubate a 4°C per 16 h affinché avvenisse l'idratazione del gel. Dopo centrifugazione a 3000 rpm per 2 minuti è eliminata l'H₂O sterile e ogni campione (40 µl) è caricato nella rispettiva colonnina. Mediante centrifugazione a 3000 rpm per 2 minuti, il campione purificato è eluito, seccato per 30 min in essiccatore (Savant OligoPrep OP 120), risospeso in 25 µl di formammide e trasferito al sequenziatore automatico, il quale determina la sequenza del campione sottoponendolo ad una elettroforesi capillare. L'interpretazione dei

dati di fluorescenza e la loro rappresentazione grafica è affidata al Software Sequenze Analysis.

BIBLIOGRAFIA

1. Gardlik R., Palffy R., Hodosy J., Lukacs J., Turna J., Celec P. “*Vectors and delivery systems in gene therapy*” Med Sci Monit, 11(4): RA110-121, Apr 2005.
2. Orkin S.H. “*Molecular genetics and potential gene therapy*” Clin Immunol Immunopathol, 40(1)151–156, Jul 1986.
3. Hauser H., Spitzer D., Verhoeyen E. et al “*New approaches towards ex vivo and in vivo gene therapy*” Cells Tissues Organs, 167(2-3):75–80, 2000.
4. Kay M.A., Glorioso J.C., Naldini L. “*Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics*”. 7(1), 33-39, Jan 2001
5. McTaggart S., Al-Rubeai M., “*Retroviral vectors for human gene delivery*” Biotechnology Advances 20, 1-31, 2002.
6. Butel J.S., Lednicky J.A. “*Cell and Molecular Biology of Simian Virus 40: Implications for Human Infections and Disease*” J Natl Cancer Inst, 91(2):119-134, Jan 20,1999.
7. Li J.J., Kelly T.J. “*Simian Virus 40 DNA Replication In Vitro: Specificity of Initiation and Evidence for Bidirectional Replication*”. Molecular and Cellular Biology 5(6): 1238-1246, June 1985.
8. Gordon-Shaag A., Ben-Nun-Shaul O., Roitman V. Yosef Y., Oppenheim A. “*Cellular Transcription Factor Sp1 Recruits Simian Virus 40 Capsid Proteins to the Viral Packaging Signal, ses*”. Journal of Virology 76(12): 5915-5924, June 2002.
9. Subramanian K.N., Shenk T. “*Definition of the boundaries of the origin of DNA replication in Simian virus 40*” Nucleic Acids Res. 5(10):3635-3642, Oct 1978.
10. Lee-Chen G.J., Woodworth-Gutai M. “*Simian virus 40 DNA replication functional organization of regulatory elements*” Mol. Cell. Biol. 6(2):3086-3093, Sep 1986.
11. Huylebroeck D, Maertens G, Verhoeyen M, Lopez C, Raeymakers A, Jou WM, Fiers W. “*High-level transient expression of influenza virus proteins from a series of SV40 late and early replacement vectors*”. Gene. 30;66(2):163-81 June 1988.
12. Turler H., Salomon C., “*Simian virus 40 as a vector: recombinant viruses expressing individual polyoma T antigens*” Virus Research 54(2), 133-145, Apr 1998.
13. Sharp P.A. “*RNA Interference-2001*”. Genes Dev 15(5): 485-490, Mar 1, 2001.

14. Hannon G.J. “*RNA interference*” *Nature*, 418(6894):244-251, Jul 11, 2002.
15. Hammond S.M. “*Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway*”. *FEBS Letters*, 579(26):5822-5829, Sep 27, 2005.
16. Zamore P.D., Tuschl T., Sharp P.A., Bartel D.P. “*RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*”. *Cell* 101(1):25-33, Mar 31, 2000.
17. Nykanen A., Haley B., Zamore P.D. “*ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway*”. *Cell*, 107(3):309-321, Nov 2, 2001.
18. Tang G. “*siRNA and miRNA: an insight into RISCs*”. *Trends Biochem Sci*, 30(2):106-114, Feb 2005.
19. Baulcombe D. “*RNA silencing*”. *Trends Biochem Sci.*, 30(6):290-293, Jun 2005.
20. Campbell T.N, Choy F.Y. “*RNA Interference: Past, Present and Future*”. *Curr. Issues Mol. Biol.* 7(1):1-6, Jan 2005.
21. Dykxhoorn D.M., Novina C.D., Sharp P.A. “*Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression*”. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4(6),457-467, Jun 2003.
22. Paddison P.J., Caudy A.A., Bernstein E., Hannon G.J., Conklin D.S. “*Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells*”. *Genes Dev*, 16(8):948–958, Apr 15, 2002.
23. Lazarevich N.L. “*Molecular Mechanisms of Alpha-Fetoprotein Gene Expression*”. *Biochemistry (Moscow)*, 65(1):117-133, Jan 2002.
24. Ziegler K., Bui T., Frisque R.J., Grandinetti A., Nerurkar V.R. “*A rapid in vitro polyomavirus DNA replication assay*”. *Journal of Virological Methods* 122:123-127, (2004).
25. Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. “*A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*”. *Science*, 296(5567):550–553, Apr 19, 2002.

ABBREVIAZIONI

AFP: α -fetoproteina
ATP: adenosina trifosfato
BSA: albumina di siero di bovino
bp: base pair (coppie di basi)
CV1: fibroblasti di rene di scimmia africana
dNTP: deossiribonucleotidi trifosfato
DNA: acido deossiribonucleico
dsRNA: RNA a doppio filamento
DTT: ditionitrito
E.coli: Escherichia coli
EDTA: etilendiamintetraacetato
EGTA: etilenglicol-bis (β aminoetil etere)-N,N,N,N,-acidotetraacetico
Hep 3B: cellule di epatocarcinoma umano
IPTG: isopropyltio- β -D-galattoside
Kb: Kilobasi
LB: mezzo di Luria-Bertani
L-T: Large-T antigen
LTR: Long terminal repeats
miRNA: micro-RNA
MOI: molteplicità di infezione
mRNA: RNA messaggero
o.n.: over night
ORI: origine della replicazione virale
ORI/ses: regione regolativa di SV40
pac: puromycin N-acetyl-transferase
pBSC: pBluescript
pBR: proteina del retinoblastoma
PO: linee cellulari geneticamente omogenee
PM: amplificazione di più cloni simili
Pol III: RNA polimerasi III
RdRP: RNA polimerasi-RNA dipendente
RISC: RNA-induced silencing complex
RNasi: ribonucleasi
RNAi: RNA interference
rpm : rivoluzioni per minuto
RT: temperatura ambiente
shRNA: short hairpin RNA
siRNA: small interfering RNA
s-T: small-T antigen
ses: sequenze di incapsidazione
SV40: Simian virus 40
TAE: Tris-HCl, acido acetico, EDTA
TE: Tris-HCl, EDTA
U: unità di attività enzimatica
UV: raggi ultravioletti
wt: wild type
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indol- β -D-galattosidasi

INDICE

	pagina
SOMMARIO	1
SUMMARY	2
I. INTRODUZIONE	3
I-A Vettori virali per terapia genica.	3
<u>Vettori retrovirali.</u>	4
I-B Simian virus 40.	7
I-C SV40 come vettore per la terapia genica.	12
I-D Costruzione di vettori episomici derivati da SV40.	13
I-F RNA interference.	15
II. ATTIVITÀ SPERIMENTALE	18
II-A Costruzione di “repliconi” derivati da SV40 con delezioni progressive della regione ORI/ses.	20
A1 Costruzione dei repliconi O/S Δ	20
A2 Costruzione dei repliconi SVE Δ	20
A3 Costruzione dei repliconi AFP-SVE Δ	20
II-B Saggio di replicazione di “repliconi” derivati da SV40 con delezioni progressive della regione ORI/ses.	21
II-C Introduzione di meccanismi del tipo “copy-control” in vettori episomici derivati da SV40.	24
II-D Efficacia delle cassette di espressione in cloni stabili.	26
D1 Preparazione dei costrutti pBSC-A e pBSC-B.	26
D2 Preparazione dei costrutti pSUPER A e pSUPER B.	29
D3 Preparazione dei costrutti pSUPER C e pSUPER D.	29
D4 Test di sensibilità delle CV1 alla puromicina.	30
D5 Trasfezione di cellule “packaging” eucariotiche.	31
D6 Infezione della linea cellulare CV1 e selezione con puromicina di linee cellulari trasformate.	31
D7 Infezione dei cloni cellulari produttori shRNA anti – SV40.	33
D8 Test di replicazione dei vettori episomici derivati da SV40 nelle linee cellulari miste e omogenee.	36
II-E Clonaggio delle cassette di espressione per RNAi in “repliconi” derivati da SV40.	38
E1 Preparazione dei costrutti contenenti le cassette di espressione per RNAi a monte della regione codificante L-T.	38
E2 Preparazione dei costrutti contenenti le cassette di espressione per RNAi nell'introne della regione codificante L-T.	39
E3 Replicazione di vettori episomici contenenti le cassette di espressione per RNAi a monte o nell'introne della regione che codifica la proteina L-T.	39
CONCLUSIONI	43
III. MATERIALI E METODI	44

BIBLIOGRAFIA	51
ABBREVIAZIONI	53