



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**FACOLTÀ DI SCIENZE MM.FF.NN.
LAUREA DI PRIMO LIVELLO IN BIOLOGIA MOLECOLARE**

ELABORATO DI LAUREA

**IMPIEGO DI UN VETTORE LENTIVIRALE BASATO
SUL VIRUS DELL'IMMUNODEFICIENZA UMANA
DI TIPO 1 PER IL TRASFERIMENTO GENICO DI
siRNA**

Tutor: Ch.ma Prof.ssa MARIA CRISTINA PAROLIN
DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA

Co-Tutor: Dott.ssa GIULIA LOMBARDI
DIPARTIMENTO DI ISTOLOGIA, MICROBIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE
MEDICHE

Laureando: STEFANO COMAZZETTO

ANNO ACCADEMICO 2006/2007

Indice

Abstract	1
1 Introduzione	2
1.1 Trasferimento genico	2
1.2 Vettori lentivirali	2
1.3 <i>RNA interference</i>	4
2 Materiali e Metodi	6
Materiali	6
2.1 Linee cellulari	6
2.2 Plasmidi	6
Metodi	7
2.3 Quantificazione del DNA plasmidico	7
2.4 Produzione di virioni ricombinanti HIV-1	8
2.5 Trasduzione di cellule bersaglio con virioni ricombinanti HIV-1	8
2.6 Induzione di stress ossidativo	9
2.7 Citofluorimetria di flusso	9
2.8 Saggio di quantificazione del contenuto proteico	10
2.9 Elettroforesi di proteine (SDS-PAGE) e Western Blotting	10
2.10 Concentrazione dei sovranatanti cellulari	11
2.11 Saggio ELISA	11
4 Risultati	12

Premessa	12
4.1 Produzione ed efficienza di trasduzione di virioni ricombinanti HIV-1 esprimenti shRNA-VEGF e shRNA-<i>scrambled</i>	13
4.2 Silenziamento genico di VEGF mediante trasduzione con virioni ricombinanti HIV-1 esprimenti shRNA-VEGF in cellule retiniche	14
4.3 Silenziamento genico di VEGF mediante trasduzione con virioni ricombinanti HIV-1 esprimenti shRNA-VEGF in cellule retiniche in condizioni di ipossia	18
5 Conclusioni	21
6 Bibliografia	22
7 Abbreviazioni	

Abstract

I vettori virali sono strumenti molto utilizzati nella ricerca medica per veicolare materiale genetico all'interno delle cellule, poiché sfruttano i meccanismi biologici evoluti dai virus per il trasferimento del proprio genoma nelle cellule bersaglio¹. Il materiale trasferito può consistere in un gene terapeutico, il quale complementa mutazioni responsabili di una produzione insufficiente di proteina, o in elementi regolativi, come gli *small interfering RNA* (siRNA), in grado di silenziare post-trascrizionalmente un'anormale espressione genica attraverso il meccanismo di *RNA interference* (RNAi)². Gli siRNA sono piccole molecole di RNA a doppio filamento lunghe circa 19-22 nucleotidi che riconoscono in modo sequenza-specifico l'RNA messaggero bersaglio e ne mediano la degradazione³. Questo lavoro di tesi si è focalizzato sull'impiego di un vettore lentivirale basato sul Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1 (HIV-1) per introdurre un siRNA specifico per il silenziamento del *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) in cellule di epitelio pigmentato retinico umano (ARPE-19). VEGF è stato scelto come bersaglio perché è un fattore chiave nel meccanismo di angiogenesi sia fisiologica che patologica, come nel caso della Degenerazione Maculare legata all'Età (*Age-related Macular Degeneration*, AMD) a carico della retina⁴.

1 Introduzione

1.1 Trasferimento Genico

L'introduzione di materiale genetico all'interno delle cellule è un processo fondamentale per lo sviluppo di nuovi approcci terapeutici basati sulla terapia genica. Sino ad oggi sono stati sviluppati differenti metodi di trasferimento: fisici, come l'elettroporazione; meccanici, come la microiniezione e la pistola genica; chimici, come l'impiego di liposomi o di calcio-fosfato. Questi sistemi consentono la veicolazione di DNA nudo nella cellula senza limiti di dimensioni; risultano però difficilmente applicabili *in vivo*, poiché non consentono l'indirizzamento verso uno specifico tipo cellulare.

I metodi biologici basati sull'impiego di virus geneticamente modificati forniscono la prospettiva futura di un'applicazione *in vivo* per la terapia genica, grazie all'alta efficienza di trasduzione e al *targeting* verso specifiche cellule bersaglio. Sono stati sviluppati diversi vettori virali ed ognuno di essi presenta le caratteristiche peculiari del virus da cui è derivato. Fino ad ora sono stati ingegnerizzati vettori basati su virus a DNA come Adenovirus, Virus Adeno-Associati e Virus dell'Herpes Simplex di tipo 1 e su virus a RNA quali Poliovirus, Alphavirus e Retrovirus¹. Attualmente i vettori virali di maggiore interesse sono quelli basati sui Retrovirus e, in particolare, sui virus appartenenti al genere Lentivirus, per la loro capacità di infettare e mediare l'integrazione del materiale genetico sia in cellule mitotiche sia in cellule quiescenti^{5,6}.

1.2 Vettori lentivirali

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

In particolare, HIV-1, agente eziologico della Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS), possiede una particella di forma sferica di circa 110 nm di diametro, costituita da un *envelope* fosfolipidico esterno da cui protrudono le glicoproteine di membrana e da una doppia componente capsidica, composta da una matrice proteica e da un nucleocapside (Figura 1). Quest'ultimo contiene il genoma virale, costituito da due molecole identiche di RNA a singolo filamento a polarità positiva di circa 10 Kb, e le proteine necessarie alla maturazione e alla replicazione dei virioni, quali la proteasi, la trascrittasi inversa e l'integrasi. Entrambi i filamenti del genoma virale contengono una struttura 7-metilguanosa (m⁷G(5')ppp(5')G) detta CAP all'estremità 5' e una coda di poli-adenine all'estremità 3', alle quali seguono due brevi sequenze ripetute (R) e due sequenze uniche (U5, U3) rispettivamente poste all'estremità 5' e all'estremità 3'. Da queste due regioni, grazie al meccanismo di retrotrascrizione dell'RNA virale a DNA provirale, si formano le LTR (*Long Terminal Repeat*), costituite dalla sequenza U3-R-U5 e presenti ad entrambe le estremità del genoma: la LTR al 5' funge da promotore per la presenza di una sequenza *TATA box*, mentre la LTR al 3' serve come terminatore della trascrizione. Nel genoma di HIV-1 sono presenti i geni

gag, *pol* ed *env* orientati nella stessa direzione (5' gag-pol-env-3') comune a tutti i Retrovirus⁷ (Figura 1).

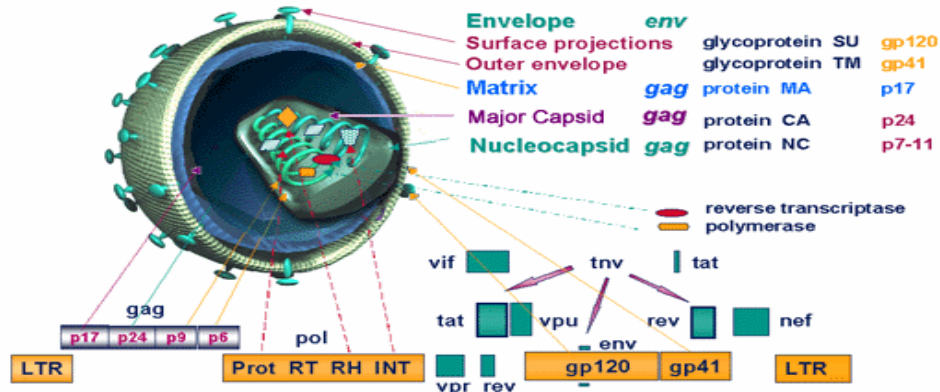


Figura 1: Rappresentazione schematica della particella virale e del genoma di HIV-1

Il gene *gag* codifica la poliproteina Pr55^{Gag} che viene processata dalla proteasi virale al momento della gemmazione per formare le proteine strutturali della matrice (MA), del capsid (CA), del nucleocapsid (NC) e il peptide p6. Il gene *pol* viene sintetizzato come precursore Pr160^{GagPol}, in seguito ad un raro *frameshift* ribosomale durante la traduzione di Gag, e viene processato per autocatalisi dalla proteasi contenuta al suo interno negli enzimi virali proteasi, trascrittasi inversa, responsabile del processo di retrotrascrizione, e integrasi, che catalizza l'integrazione del DNA provirale nel genoma cellulare. Il gene *env* codifica la glicoproteina gp160, processata da una proteasi cellulare durante la maturazione del virione in due proteine, gp120 e gp41. Inizialmente gp120 lega il recettore CD4, con cui forma un complesso molto stabile, per poi legare i co-recettori (CXCR4, CCR5). Successivamente l'esposizione del peptide di fusione presente in gp41 catalizza la fusione dell'*envelope* virale con la membrana plasmatica e il rilascio del nucleocapsid nel citoplasma della cellula bersaglio. Sono presenti anche due geni (*tat*, *rev*) codificanti due proteine regolatrici attive in *trans*, e quattro geni con funzione accessoria (*nef*, *vif*, *vpr*, *vpu*) responsabili *in vivo* della progressione della malattia. Il gene *tat* codifica la proteina Tat che funge da potente transattivatore dell'espressione genica virale grazie al riconoscimento della sequenza TAR (*Transactivation Response Region*), presente all'estremità 5' del DNA provirale. Il gene *rev* codifica la proteina Rev che regola l'esporto dal nucleo dei trascritti virali mediante il legame alla sequenza RRE (*Rev Responsive Element*) localizzata nel gene *env*⁷.

I vettori basati su HIV-1 contengono le sequenze regolative del genoma virale attive in *cis* ed una cassetta di espressione per consentire l'espressione del transgene da veicolare; le sequenze codificanti le proteine attive in *trans* necessarie sono fornite da uno o più costrutti *helper*. In questo modo si producono particelle virali infettive in grado di indurre un'infezione abortiva nelle cellule trasdotte e si limita la produzione di Retrovirus Replicazione-Competenti (RCR) dovuto ad eventi di ricombinazione¹. Per soddisfare sempre di più questi criteri i vettori virali basati su HIV-1 e i rispettivi costrutti di *packaging* si sono evoluti nel tempo. Il sistema vettoriale di prima generazione era costituito da tre costrutti: un costrutto di *packaging*, uno di *envelope* ed un costrutto vettore. Nei costrutti di *packaging* e di *envelope* le LTR al 5' e al 3' sono state sostituite rispettivamente

con un promotore ed un segnale di poliadenilazione eterologhi. Il costrutto di *packaging* contiene tutte le sequenze virali eccetto il gene *env* (*gag*, *pol*, *tat*, *rev*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *nef*), ma è debole del segnale di incapsidazione (Ψ) per impedire l'incapsidazione dell'RNA nei virioni ricombinanti. Il costrutto di *envelope* codifica le glicoproteine dell'*envelope* virale. Il costrutto vettore contiene le LTR alle estremità 5' e 3', il segnale di incapsidazione ed i primi nucleotidi del gene *gag*, responsabili dell'aumento dell'efficienza di trasferimento genico⁸, il transgene e la sequenza RRE.

Gli standard di biosicurezza tendono ad eliminare dal vettore le proteine virali e separare le sequenze codificanti necessarie in più costrutti, per diminuire la probabilità di eventi ricombinativi che portano alla formazione di RCR. Per soddisfare questi criteri i sistemi vettoriali di seconda generazione hanno eliminato dal costrutto di *packaging* le proteine virali accessorie⁹. Un ultimo miglioramento è stato apportato dai sistemi vettoriali di terza generazione, dove la proteina Rev viene fornita separatamente da un quarto costrutto e non è richiesta la proteina Tat, poiché il costrutto vettore è dotato di un promotore chimerico al 5' in cui la regione U3 della LTR è stata sostituita con il promotore del Virus del Sarcoma di Rous (RSV) o del Citomegalovirus Umano (hCMV)¹⁰. Un ulteriore progresso è stato raggiunto mediante la delezione degli elementi di attivazione della trascrizione dalla regione U3 presente all'estremità 3' rendendo il vettore *Self-Inactivating* (SIN) in seguito all'evento di retrotrascrizione⁹. La presenza di entrambe le LTR inattive impedisce l'attivazione di possibili oncogeni presenti vicino al sito di integrazione del vettore. Inoltre, i vettori di ultima generazione contengono al loro interno sequenze che promuovono l'espressione post-trascrizionale, come il *Woodchuck Hepatitis C Virus Post-transcriptional Regulatory Element* (WPRE)⁶. Infine, il tropismo di virioni ricombinanti HIV-1 può essere ampliato grazie alla capacità di HIV-1 di incorporare nell'*envelope* glicoproteine derivate da altri virus, come la glicoproteina G del Virus della Stomatite Vesicolare (VSV-G), mediante il processo di pseudotipizzazione⁶.

1.3 RNA interference

L'*RNA interference* (RNAi) si basa su un meccanismo di regolazione genica post-trascrizionale cellulare mediata da *micro RNA* (miRNA), molecole di RNA a doppio filamento di 22 paia di basi, identificato sia nei nematodi sia in lieviti e piante^{2,3}. Gli miRNA vengono trascritti inizialmente dalla RNA polimerasi II come parte di un lungo precursore primario (pri-miRNA), che si ripiega in una particolare struttura *stem-loop* (Figura 2). Il pri-miRNA viene successivamente tagliato da *Drosha*, un'endonucleasi appartenente alla famiglia delle RNasi III, a livello della base dello stelo, formando una molecola di circa 85 paia di basi (pre-miRNA) con un'estremità 5' fosfato e un *overhang* di 2 nucleotidi al 3'. Il pre-miRNA viene quindi trasportato nel citoplasma dal fattore di esporto nucleare Esportina-5, dove una seconda RNasi III (*Dicer*) riconosce l'*overhang* al 3' e taglia a circa 22 paia di basi da questo, rimuovendo il *loop* terminale e lasciando un altro *overhang* al 3'. L'miRNA maturo viene incorporato nell'*RNA-Induced Silencing Complex* (RISC); durante l'incorporazione la doppia elica dell'miRNA viene srotolata e solo il filamento di RNA che presenta l'estremità 5' meno stabile, detto antisense, rimane associato nel RISC, mentre l'altro viene rilasciato

e degradato. Il filamento di RNA antisense indirizza l'attività di RISC verso l'mRNA complementare: se l'appaiamento è perfetto, l'endonucleasi di RISC (*Slicer*) taglia l'mRNA a metà della zona di complementarità, mentre se l'appaiamento non è perfetto RISC media comunque una repressione traduzionale dell'mRNA³.

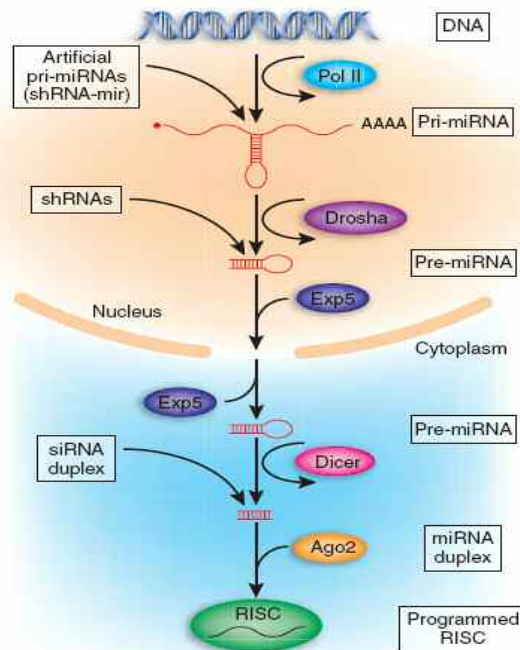


Figura 2: Modello del meccanismo naturale di processamento di miRNA e possibili RNA artificiali per indurre la cascata dell'RNA interference.

Ognuno dei tre intermedi a RNA, pri-miRNA, pre-miRNA e miRNA, può rappresentare un punto di entrata di RNA sintetici per indurre l'RNAi e regolare l'espressione genica in cellule eucariotiche (Figura 2). Inizialmente l'inserimento di lunghe molecole di RNA a doppio filamento¹¹ portava alla formazione di *small interfering RNA* (siRNA) di 22 paia di basi simili agli miRNA prodotti dal taglio di *Dicer*². In questo modo si otteneva un silenziamento genico rilevante, ma transiente. Un secondo approccio ha impiegato *short hairpin RNA* (shRNA) simili ai pre-miRNA trascritti sotto il controllo di promotori per la RNA polimerasi III per consentire un silenziamento più efficiente³. I problemi derivanti da questo approccio erano la mancata possibilità di regolare l'attività dei promotori per la RNA polimerasi III e l'espressione di shRNA mediata da vettori. Un terzo approccio fa uso di pri-miRNA artificiali (shRNA-mir) posti sotto il controllo di promotori inducibili della RNA polimerasi II; ciò consente di mediare un silenziamento molto potente e regolabile³.

Il meccanismo dell'RNAi è oggi usato in molte applicazioni al fine di ottenere il *knock-down* di specifici geni. Un esempio è il silenziamento del *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) mediato da molecole di siRNA o shRNA veicolate ad esempio da vettori basati su Adenovirus¹². La rilevanza clinica di queste applicazioni sta nel fatto che VEGF è implicato nell'angiogenesi sia fisiologica che patologica⁴. Esso è infatti il principale fattore coinvolto nella neoangiogenesi tumorale e, in particolare, nella neovascolarizzazione coroidale a livello della retina, che è la causa della Degenerazione Maculare legata all'Età (AMD)¹³.

2 Materiali e Metodi

Materiali

2.1 Linee cellulari

Per questo lavoro di tesi sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

ARPE-19: cellule di epitelio pigmentato retinico umano ottenute dall'*American Type Culture Collection* (ATCC CRL-2302). Tali cellule sono state coltivate in una miscela 1:1 di terreni *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) e HAM F12 addizionata con L-Glutammina (2.5 mM), 10% (v/v) di Siero Fetale Bovino (FBS) inattivato a 56 °C per 30 minuti e 1% (v/v) degli antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml).

293T: cellule embrionali di rene umano a morfologia stellata. Tali cellule contengono stabilmente integrato nel genoma la sequenza genica codificante l'antigene T del Virus Vacuolante della Scimmia (SV40), necessaria per un'efficiente replicazione dei vettori plasmidici recanti l'origine di replicazione di SV40. La linea cellulare è stata gentilmente fornita dal Dott. D. Baltimore (Rockefeller University) ed è stata coltivata in terreno DMEM addizionato con 10% (v/v) di FBS inattivato e 1% (v/v) degli antibiotici penicillina (100 U/ml) e streptomicina (100 µg/ml).

Tutte le colture cellulari sono state mantenute alla temperatura costante di 37 °C in un incubatore (*Hereaus BDD 6220*) ad atmosfera umidificata al 5% (v/v) di CO₂ e sottoposte a periodici controlli per escludere eventuali contaminazioni.

2.2 Plasmidi

In questo lavoro sperimentale sono stati utilizzati i seguenti costrutti plasmidici già disponibili in laboratorio:

pLVTHMshRNA-VEGF: contenente il vettore *Self-Inactivating* basato su HIV-1, caratterizzato all'estremità 5' dalla LTR *wild type*, che necessita dell'attivazione trascrizionale da parte di Tat, e dalla LTR all'estremità 3' deleta della regione U3. Sono presenti inoltre il segnale di *packaging* (Ψ), le sequenze PBS (*Primer Binding Site*) e cPPT (*central Poly-Purine Tract*), essenziali per la retrotrascrizione del vettore, la sequenza RRE, per l'esporto dei trascritti dal nucleo, la sequenza WPRE, che conferisce stabilità al trascritto virale, e una delezione del gene *env*. All'interno del vettore sono contenuti due cistroni, uno deputato all'espressione della proteina reporter *Green Fluorescent Protein* (GFP), l'altro deputato all'espressione di uno *short hairpin RNA* (shRNA) specifico per il silenziamento di VEGF. La sequenza codificante la GFP è posta sotto il controllo del promotore per il Fattore di Elongazione 1-alfa (EF 1-alfa), mentre l'shRNA diretto contro VEGF è posto sotto il controllo del promotore dell'istone H1, riconosciuto dalla RNA polimerasi III cellulare, e dell'operone TetO, che rende la trascrizione del transgene inducibile da tetraciclina, qualora sia fornito anche il plasmide codificante il repressore corrispondente.

pLVTHMshRNA-scrambled: contenente gli elementi regolativi analoghi al precedente costrutto. L'unica differenza consta nella sostituzione dell'shRNA

specifico per VEGF con un shRNA con una sequenza completamente non correlata a VEGF, quindi senza nessuna attività di silenziamento.

psPAX2: costruito di *packaging* di seconda generazione del sistema vettoriale basato su HIV-1, contenente i geni *gag*, codificante le proteine matrice, capsidi e nucleocapsidi, *pol*, codificante la proteasi, trascrittasi inversa e integrasi, e le sequenze geniche per le proteine Tat e Rev, posti sotto il controllo di un promotore Tat indipendente chimerico costituito dall'*enhancer* di hCMV, dal promotore della β -actina di pollo e dalla sequenza di fusione formata dagli introni della β -actina di pollo e della β -globina di coniglio. Inoltre è presente la sequenza RRE per l'exporto nucleare dei trascritti e la delezione della proteina accessoria Vif.

pMD2G: costruito di *envelope* contenente la sequenza codificante la VSV-G sotto il controllo del promotore di hCMV.

Tutti i costrutti plasmidici elencati, gentilmente concessi dal Dott. D. Trono (Università di Ginevra)¹⁴, contengono la sequenza di poli-adenilazione del gene della β -globina umana, per dare stabilità al trascritto, e l'origine di replicazione batterica ColE1 ed il gene per la resistenza all'ampicillina, necessari per amplificare i plasmidi in *Escherichia coli*. Inoltre, i plasmidi pLVTHMshRNA-VEGF, pLVTHMshRNA-*scrambled* e psPAX2 contengono l'origine di replicazione di SV40 per permettere una efficiente replicazione in cellule esprimenti l'antigene T di SV40.

Metodi

2.3 Quantificazione del DNA plasmidico

La quantità di DNA nelle preparazioni plasmidiche è stata determinata attraverso misure allo spettrofotometro (*BioPhotometer*, *Eppendorf*) della Densità Ottica (D.O.) di diluizioni degli acidi nucleici alla lunghezza d'onda di 260 nm, corrispondente al picco di assorbimento delle basi azotate.

La concentrazione è stata ricavata attraverso la legge di Lambert-Beer.

$$A = \epsilon * C * l$$

dove A indica l'assorbanza del campione, ϵ il coefficiente di estinzione molare (pari a $0.020 \mu\text{g} * \text{mL}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ per DNA a doppio filamento), l il cammino ottico (0.1 cm per le *Uvette* 50-200 μl , *Eppendorf*) e C è la concentrazione dell'acido nucleico in soluzione.

La presenza di eventuali contaminazioni è stata rilevata mediante lettura a 280 nm, alla quale il legame peptidico ha il massimo di assorbimento. Le soluzioni presentavano tutte un buon grado di purezza, poiché il rapporto D.O.₂₆₀/D.O.₂₈₀ era compreso tra 1.8 e 2.

2.4 Produzione di virioni ricombinanti HIV-1

I virioni ricombinanti HIV-1 sono stati prodotti trasfettando cellule 293T contemporaneamente con i costrutti di *packaging*, di *envelope* e vettore. Nel presente lavoro di tesi è stato impiegato un metodo chimico basato su liposomi per veicolare all'interno delle cellule 293T i tre costrutti plasmidici.

Il giorno prima della trasfezione, 2.5×10^6 cellule 293T sono state seminate in piastre da 10 cm di diametro (*Falcon*) in 10 ml di terreno DMEM addizionato di siero e privo di farmaci, cosicché le cellule avessero una confluenza del 90-95% al momento della trasfezione. Successivamente la miscela di DNA plasmidici, contenente 15 μg del costrutto di *packaging* psPAX2, 6 μg del costrutto di *envelope* pMD2G e 20 μg del costrutto vettore pLVTHMshRNA-VEGF o pLVTHMshRNA-*scrambled*, è stata unita a 50 μl di *Lipofectamine* 2000 (1 mg/mL, *Invitrogen*) secondo le indicazioni del produttore in terreno DMEM senza siero e farmaci. I complessi DNA-liposomi sono stati dispensati goccia a goccia sopra la coltura cellulare. I virioni ricombinanti HIV-1 rilasciati nel sovrantante sono stati raccolti dopo 48 ore dalla co-trasfezione. I residui cellulari sono stati eliminati mediante centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti a 4 °C e successiva filtrazione (0.45 μm , *Millipore*). I virioni sono stati aliquotati e conservati a -80 °C.

2.5 Trasduzione di cellule bersaglio con virioni ricombinanti HIV-1

La trasduzione di cellule ARPE-19 con i virioni ricombinanti HIV-1 è stata eseguita sia per determinare il titolo delle sospensioni virali prodotte sia per veicolare l'shRNA specifico per VEGF nelle cellule bersaglio.

Per la titolazione virale, il giorno prima della trasduzione, 3×10^5 cellule ARPE-19 sono state seminate in 2 ml di terreno completo con siero e farmaci in piastre da 35 mm di diametro (*Falcon*). Il giorno seguente il terreno è stato sostituito con 500 μl della sospensione di virioni ricombinanti o diluizioni seriali di questa addizionati con polibrene (8 $\mu\text{g}/\text{ml}$), un policatione che favorisce il processo di trasduzione schermando le cariche negative presenti sulla membrana cellulare. Il giorno successivo alla trasduzione è stato aggiunto 1 ml di terreno completo. Le cellule trasdotte sono poi state sottoposte ad analisi citofluorimetrica a 72 ore dalla trasduzione.

Per la trasduzione delle cellule ARPE-19 finalizzata alla verifica del silenziamento genico, tali cellule sono state seminate a due diverse densità per verificare se in entrambe le condizioni si aveva silenziamento di VEGF, adottando una procedura equivalente a quella descritta per la titolazione virale. 24 ore prima della trasduzione, nel primo caso sono state seminate 3×10^5 cellule ARPE-19 in 2 ml di terreno con farmaci e siero in piastre da 35 mm di diametro di diametro (*Falcon*), mentre nel secondo caso sono state seminate 9×10^5 cellule ARPE-19 in 5 ml di terreno con farmaci e siero in fiasche da 25 cm^2 (*Falcon*). Il giorno successivo alla trasduzione, la sospensione di virioni è stata sostituita con 2 ml di terreno completo, in presenza o assenza di deferoxamina a seconda dell'esperimento condotto.

Le cellule trasdotte con i virioni ricombinanti HIV-1 e coltivate in terreno in presenza o assenza di deferoxamina sono state raccolte a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione. Ad ogni tempo di raccolta, le cellule che dovevano proseguire l'esperimento sono staccate dalla piastra di coltura e riseminate nel terreno corrispondente, mentre le cellule da analizzare sono state staccate con tripsina, sedimentate e lavate due volte con PBS [137 mM NaCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2,7 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{HCl}$ (pH 7,4)] a 4 °C. Successivamente sono state sottoposte ad

analisi citofluorimetrica o preparate per la corsa elettroforetica mediante risospensione in 200 µL di soluzione di lisi RIPA [150 mM NaCl, NP-40 1% (v/v) (*Sigma*), sodio-deossicolato 0.5 % (p/v) (*Bio-Rad*), SDS 0.1 % (p/v) (*Bio-Rad*), 50 mM Tris-HCl (pH 7.4)] addizionato di una miscela di inibitori delle proteasi *Complete* (estratto di pancreas, pronasi, termolisina, chimotripsina, tripsina, papaina, *Roche*) per 30 minuti a 4 °C al fine di favorire la lisi cellulare e la solubilizzazione delle proteine bloccando l'attività delle proteasi intracellulari che, una volta rilasciate, potrebbero degradare la proteina di interesse. Il lisato è stato centrifugato a 13000 rpm per 30 minuti ed il sovranatante ottenuto è stato conservato a -80 °C in attesa di essere sottoposto a corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide.

I sovrinatanti delle cellule trasdotte con i virioni ricombinanti HIV-1, mantenute in terreno in presenza o assenza di deferoxamina, sono stati raccolti a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione, centrifugati a 1200 rpm per 10 minuti a 4 °C per sedimentare i residui cellulari presenti, filtrati (0.45 µm) e conservati a -80 °C in attesa di essere sottoposti a saggio ELISA.

2.6 Induzione di stress ossidativo

Al fine di simulare le condizioni di ipossia alla base della neoangiogenesi oculare, le cellule ARPE-19 trasdotte con i virioni ricombinanti HIV-1 sono state trattate con deferoxamina (*Sigma*), un agente chelante del ferro, in grado di ostacolare il trasporto degli elettroni nella respirazione cellulare¹⁵.

Durante gli esperimenti condotti in condizioni di stress ossidativo le cellule sono state mantenute in terreno completo addizionato di deferoxamina alla concentrazione di 130 µM, a partire dal giorno successivo alla trasduzione e per l'intera durata dell'esperimento.

2.7 Citofluorimetria di flusso

Le cellule ARPE-19 trasdotte con la sospensione di virioni ricombinanti HIV-1 o diluizioni seriali degli stessi sono state staccate dalla piastra di coltura con tripsina a 3, 6 e 8 dalla trasduzione a seconda dell'esperimento condotto. Successivamente sono state lavate 2 volte con PBS freddo mediante centrifugazione a 1200 rpm per 10 minuti ed il sedimento cellulare è stato quindi risospeso in 800 µl di PBS freddo per l'analisi al citofluorimetro (*FacsCalibur, Beckton & Dickinson*). La proteina reporter GFP non richiede nessun cofattore, poichè assorbe ad una lunghezza d'onda di 395 nm ed ha il suo picco massimo di emissione nella lunghezza d'onda del verde (508 nm).

I dati ottenuti dallo strumento sono stati elaborati mediante il programma WinMDI 2.8. Dalla percentuale di cellule GFP-positive è stato possibile verificare l'avvenuta trasduzione delle cellule bersaglio con i virioni ricombinanti e il mantenimento dell'espressione del gene reporter nelle cellule trasdotte. Inoltre è stato possibile risalire al titolo delle preparazioni virali, espresso in Unità Trasducenti/ml (TU/ml), applicando la seguente formula:

Unità Trasducenti/ml= (% cellule GFP positive X numero cellule trasdotte X fattore di diluizione della sospensione virale)/ volume di trasduzione

2.8 Saggio di quantificazione del contenuto proteico

Il contenuto proteico dei lisati di cellule trasdotte con i virioni ricombinanti HIV-1 è stato determinato mediante un saggio colorimetrico (*Micro BCA protein assay reagent kit, Pierce*) e successiva lettura allo spettrofotometro. Le misure spettrofotometriche analizzano i valori di assorbanza, alla lunghezza d'onda di 562 nm, di complessi di color viola formati per la reazione di complessamento tra due molecole di acido bicinconico con uno ione rameoso Cu^{+1} . Gli ioni rameosi Cu^{+1} sono resi disponibili in ambiente alcalino dalla reazione di riduzione degli ioni rameici Cu^{2+} con le proteine presenti in soluzione (reazione del biureto). La quantificazione proteica è resa possibile dalla dipendenza lineare tra la concentrazione totale delle proteine in soluzione e i composti colorati formati. Per ogni campione sono state prelevate aliquote di 2 μl di lisato cellulare, poste in piastre da 96 pozzetti (*Falcon*), successivamente diluite fino a 100 μl con H_2O e addizionate con 100 μl di soluzione di colorazione del kit. Dopo incubazione a 37 °C per 2 ore il prodotto di colorazione è stato misurato allo spettrofotometro e la quantità totale di proteine presente nel campione è stata determinata per interpolazione con una retta di taratura ottenuta con quantità note di sieroalbumina bovina.

2.9 Elettroforesi di proteine (SDS-PAGE) e Western Blotting

I lisati cellulari di cellule trasdotte con i virioni ricombinanti HIV-1 sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide per determinare i livelli di espressione intracellulare di VEGF. A questo scopo sono stati preparati gel di poliacrilammide delle dimensioni di 100 X 70 mm e dello spessore di 1.5 mm secondo la ricetta:

Gel di concentrazione al 4.5% (p/v) di poliacrilammide: costituito da 0.63 ml di Tris-HCl 1 M (pH 6.8), 0.83 ml di soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30% (*Bio-Rad*), 50 μl di Sodio Dodecil Solfato (SDS) 10% (p/v), 5 μl di N,N,N',N'-TetraMetilEtileneDiammina, (*TEMED Bio-Rad*), 50 μl di Ammonio Persolfato, (APS) 10% (p/v) (*Bio-Rad*) e portato al volume finale di 5 ml con acqua deionizzata.

Gel di separazione al 12% di poliacrilammide: costituito da 2.5 ml di Tris-HCl 1.5 M (pH 8.8), 4 ml di soluzione acrilammide/bis 37.5:1 al 30%, 100 μl di SDS 10% (p/v), 4 μl di TEMED, 100 μl di APS 10% (p/v) e portato al volume finale di 10 ml con acqua deionizzata.

Le quantità di lisati caricati sono state normalizzate in base al contenuto proteico dei corrispondenti campioni.

La corsa elettroforetica è stata effettuata al voltaggio costante di 90V per un tempo di due ore in presenza di un tampone di corsa costituito da 250 mM Tris-HCl, 1.9 M glicina, 0.1% di SDS (p/v) (pH 9.2). Al termine della corsa elettroforetica le proteine sono state trasferite su una membrana di nitrocellulosa *Hybond-C Extra (Amersham)* utilizzando l'apparato di trasferimento *Trans-Blot Cell (Bio-Rad)*. Prima del trasferimento, membrana e gel sono stati equilibrati per 30 minuti in agitazione in tampone di trasferimento [25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanolo (v/v)]. Il trasferimento è stato effettuato per 1 ora ad amperaggio costante di 0.35 mA. Successivamente la membrana è stata incubata

per 2 ore in agitazione con una soluzione di bloccaggio [latte scremato in polvere al 3% (p/v) (*Bio-Rad*) in TBST (*Tris-Buffer Saline*: 10 mM Tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl addizionato con lo 0.05% di *Tween 20* (v/v) (*Sigma*)]. In seguito è avvenuta l'incubazione per 16 ore con l'anticorpo primario, siero monoclonale di topo anti-VEGF (*R&D system*) diluito 1:250 in TBST. Dopo 3 lavaggi in TBST, la membrana è stata incubata per 2 ore con l'anticorpo secondario, immunoglobuline di pecora anti-topo coniugate con l'enzima perossidasi di rafano (HRP, *HorseRadish Peroxidase*) diluito 1:1000 in TBST. Dopo aver lavato la membrana come indicato precedentemente, è stato effettuato un lavaggio finale con TBS, a cui è seguita un'incubazione di 5 minuti con la soluzione di rilevazione chemiluminescente (*ECL Western Blotting detection system*, *Amersham*) con cui sono state impressionate le lastre fotografiche (*Biomax light film*, *Kodak*) sovrapponendole alla membrana per tempi di esposizione variabili da 1 a 4 minuti.

2.10 Concentrazione dei sovranatanti cellulari

Le proteine presenti nei sovranatanti di cellule trasdotte con i virioni ricombinanti HIV-1 sono state concentrate mediante *Amicon Ultra* (*Millipore*), dispositivi di ultrafiltrazione muniti di membrana di cellulosa. Sono state impiegate due membrane che permettevano il passaggio di proteine e soluti inferiori a 50 KDa e 10 KDa: l'uso in serie dei due filtri ha consentito di concentrare le proteine con peso molecolare compreso tra 10 KDa e 50 KDa. Per ogni sovranatante è stata centrifugata un'aliquota di 4 ml per 20 minuti a 4000 g prima con la membrana da 50 KDa, poi l'ultrafiltrato è stato trasferito nel filtro da 10 KDa, centrifugato per 20 minuti a 4000 g e il concentrato è stato recuperato al di sopra della membrana. In media i sovranatanti sono stati concentrati 40 volte e sono stati conservati a -80 °C.

2.11 Saggio ELISA

La quantità di VEGF rilasciato nel sovranatante delle cellule trasdotte con i virioni ricombinanti HIV-1 è stata determinata mediante saggio ELISA (*Quantikine*, *R&D system*). Le quantità di sovranatanti concentrati da analizzare sono state normalizzate in base al contenuto proteico dei corrispondenti lisati.

I campioni (200 µl) sono stati depositati su pozzetti rivestiti con un anticorpo monoclonale di topo specifico per VEGF. Dopo 2 ore di incubazione le molecole non legate sono state eliminate mediante 3 lavaggi con una soluzione di surfattanti. Successivamente ogni pozzetto è stato incubato per 2 ore con un anticorpo policlonale di coniglio contro VEGF coniugato all'HRP. Con 3 lavaggi si è quindi eliminato l'anticorpo in eccesso ed è stata aggiunta la soluzione contenente il substrato per la perossidasi (perossido di idrogeno unito al cromoforo tetrametilbenzidina). La reazione colorimetrica è stata bloccata con acido N-solfurico e la piastra è stata analizzata allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 450 nm. La concentrazione di VEGF è stata ricavata per interpolazione con una retta di taratura ottenuta con quantità note di VEGF.

4 Risultati

Premessa

Il lavoro sperimentale su cui è basata questa tesi consiste nell'impiego di un vettore lentivirale basato su HIV-1 al fine di veicolare uno *short hairpin RNA* (shRNA) diretto contro VEGF in cellule di epitelio pigmentato retinico umano (ARPE-19). Il lavoro si è articolato in due fasi principali: la produzione di virioni ricombinanti HIV-1 esprimenti un shRNA diretto contro VEGF e la valutazione della capacità di questo shRNA diretto contro VEGF di silenziare VEGF nelle cellule bersaglio.

È stato impiegato un sistema lentivirale di seconda generazione costituito da tre costrutti¹⁴ – costrutto vettore, costrutto di *packaging* e costrutto di *envelope* – schematizzati in Figura 3.

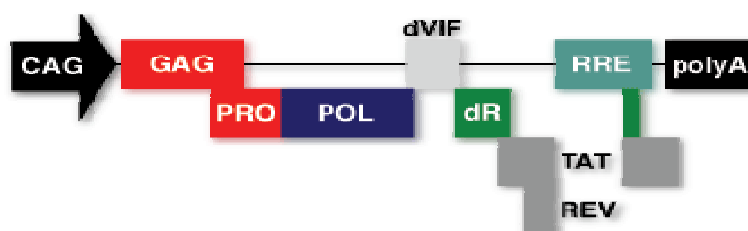
I due costrutti vettore, pLVTHMshRNA-VEGF e pLVTHMshRNA-*scrambled*, precedentemente sviluppati nel nostro laboratorio, contengono una LTR *wild type* al 5' ed una LTR inattivata al 3', la quale rende il vettore *Self-Inactivating*. Sono presenti inoltre due cassette di espressione, la prima che permette l'espressione del gene reporter codificante la GFP, essenziale per verificare l'avvenuta trasduzione, mentre la seconda regola l'espressione del transgene sotto il controllo del promotore dell'istone H1. I due transgeni sono rappresentati dalle sequenze per l'shRNA diretto contro VEGF e l'shRNA completamente estraneo all'mRNA di VEGF rispettivamente nei costrutti pLVTHMshRNA-VEGF e pLVTHMshRNA-*scrambled*.

Il costrutto di *packaging*, psPAX2, contiene i geni per le proteine strutturali ed enzimatiche di HIV-1, mentre il costrutto di *envelope*, pMD2G, contiene il gene per la glicoproteina G del Virus della Stomatite Vescicolare (VSV-G), che permette di pseudotipizzare il vettore lentivirale.

A) Vettore pLVTHMshRNA-VEGF o pLVTHMshRNA-*scrambled*



Costrutto di *packaging* psPAX2



C) Costrutto di *envelope* pMD2G



Figura 3: Rappresentazione schematica dei costrutti utilizzati per la produzione di virioni ricombinanti. A) pLVTHM: costrutto vettore contenente le sequenze del vettore basato su HIV-1 *Self-Inactivating* in cui è presente il gene reporter GFP e il promotore H1, che regola l'espressione del transgene, rappresentato da un shRNA diretto contro VEGF nel vettore pLVTHMshRNA-VEGF e da un shRNA completamente non correlato a VEGF nel vettore pLVTHMshRNA-*scrambled*; B) psPAX2: costrutto di *packaging* di seconda generazione contenente i geni per le proteine strutturali ed enzimatiche e per le proteine regolative Tat e Rev; C) pMD2G: costrutto di *envelope* contenente la regione codificante VSV-G.

4.1 Produzione ed efficienza di trasduzione di virioni ricombinanti HIV-1 esprimenti shRNA-VEGF e shRNA-*scrambled*

Il costrutto di *packaging* e il costrutto di *envelope* sono stati co-trasfettati in cellule 293T mediante liposomi insieme al costrutto vettore pLVTHMshRNA-VEGF o pLVTHMVshRNA-*scrambled* per produrre i corrispondenti virioni ricombinanti. Da qui in avanti indicheremo con shRNA-VEGF i virioni contenenti il vettore pLVTHMshRNA-VEGF e con shRNA-*scrambled* i virioni contenenti il vettore pLVTHMVshRNA-*scrambled*. Successivamente sono stati determinati l'efficienza di trasduzione e il titolo delle sospensioni virali, espresso in Unità Trasducenti per ml di sospensione virale (TU/ml), mediante analisi citofluorimetrica 72 ore dopo la trasduzione delle cellule ARPE-19, effettivo bersaglio di questo lavoro sperimentale, con diluizioni seriali delle due sospensioni virali (1:1, 1:5, 1:10, 1:100, 1:500, 1:1000).

La presenza nel vettore lentivirale del gene reporter codificante la GFP consente di quantificare la percentuale di cellule bersaglio trasdotte, in termini di cellule esprimenti la GFP, riportate in Tabella 1.

Sospensione virale	Cellule trasdotte con virioni shRNA-VEGF (% cellule GFP positive)	Cellule trasdotte con virioni shRNA- <i>scrambled</i> (% cellule GFP positive)
Virioni non diluiti	78,24	87,90
Virioni diluiti 1:5	61,05	66,08
Virioni diluiti 1:10	53,18	53,55
Virioni diluiti 1:100	15,87	17,22
Virioni diluiti 1:500	3,64	0,31
Virioni diluiti 1:1000	1,85	1,78
Controllo negativo	0,02	0,02

Tabella 1: Percentuale di cellule ARPE-19 GFP-positive trasdotte con i virioni ricombinanti shRNA-VEGF (a sinistra) e shRNA-*scrambled* (a destra) prodotti mediante lipofezione.

Dai dati percentuali derivati dall'analisi al citofluorimetro è evidente la capacità dei virioni ricombinanti HIV-1 prodotti di trasdurre efficientemente le cellule ARPE-19. Il titolo virale infatti è risultato essere pari a 1.3×10^9 TU/ml per entrambe le sospensioni virali.

4.2 Silenziamento genico di VEGF mediante trasduzione con virioni ricombinanti HIV-1 esprimenti shRNA-VEGF in cellule retiniche

I virioni ricombinanti HIV-1 prodotti sono stati usati per introdurre all'interno di cellule ARPE-19 l'shRNA diretto contro VEGF e stabilire l'efficacia del silenziamento genico di VEGF in cellule bersaglio seminate a due diverse densità. Inizialmente sono state impiegate cellule ARPE-19 seminate su piastre da 35 mm di diametro; queste sono state trasdotte con i virioni shRNA-VEGF e shRNA-*scrambled* e mantenute in coltura per un totale di 8 giorni per consentire una raccolta dei campioni a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione. Ad ogni tempo di raccolta, le cellule che dovevano proseguire l'esperimento sono state staccate e riseminate, mentre le cellule e i sovrantanti da analizzare sono stati raccolti e preparati per i saggi di espressione.

Una parte delle cellule trasdotte è stata analizzata al citofluorimetro per verificare l'avvenuta trasduzione e la stabilità dell'espressione del gene reporter GFP. La Tabella 2 riassume i dati percentuali ottenuti dalla fluorescenza delle cellule trasdotte GFP-positive, che è stata mantenuta a livelli elevati dalla maggior parte delle cellule per tutta la durata dell'esperimento.

Giorni post-trasduzione	Cellule trasdotte con virioni shRNA-VEGF (% cellule GFP-positive)	Cellule trasdotte con virioni shRNA- <i>scrambled</i> (% cellule GFP-positive)
3 giorni	85,18	84,39
6 giorni	84,61	76,80
8 giorni	87,26	88,94
Controllo negativo	0,34	0,34

Tabella 2: Percentuale di cellule ARPE-19 GFP-positive trasdotte con i virioni shRNA-VEGF (a sinistra) e con shRNA-*scrambled* (a destra) analizzate dopo 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione.

Una prima valutazione qualitativa dell'espressione intracellulare di VEGF è stata svolta sottoponendo i lisati delle cellule trasdotte con i virioni ricombinanti shRNA-VEGF e shRNA-*scrambled* a corsa elettroforetica in gel di poliaccrilammide e successivo Western Blotting con un anticorpo specifico per la rilevazione di VEGF. Le quantità di lisati caricate sono state normalizzate in base al contenuto proteico dei campioni corrispondenti. La Figura 4 riporta il Western Blotting condotto sui lisati delle cellule raccolte 6 e 8 giorni dopo la trasduzione.

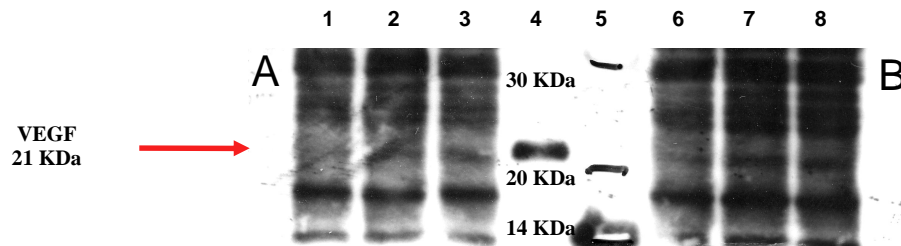


Figura 4: Espressione intracellulare di VEGF analizzata mediante SDS-PAGE e Western Blotting di lisati di cellule ARPE-19 seminate in piastre da 35 mm di diametro e trasdotte con i virioni ricombinanti shRNA-VEGF e shRNA-scrambled, raccolti a 6 (A) e 8 (B) giorni dalla trasduzione. Corsia 1, 6: lisati ottenuti da cellule non trasdotte; corsia 2, 7: lisati da cellule trasdotte con virioni shRNA-VEGF; corsia 3, 8: lisati da cellule trasdotte con virioni shRNA-scrambled; corsia 4: proteina VEGF purificata; corsia 5: marker di peso molecolare.

Per identificare la banda corrispondente a VEGF è stata analizzata la corsa elettroforetica della proteina purificata, che funge da controllo positivo. Dall'immagine si può notare che all'altezza della banda data dalla proteina non è riscontrabile nessuna differenza tra le corsie relative ai diversi campioni di entrambe le raccolte. Tuttavia la bassa specificità dell'anticorpo diretto contro VEGF, come evidente in Figura 4 dalla presenza di numerose bande aspecifiche, non consente di affermare con sicurezza che la banda sia da imputare a VEGF. Inoltre la tecnica del Western Blotting potrebbe non essere sufficientemente sensibile da evidenziare il silenziamento a livello intracellulare.

Una successiva valutazione quantitativa dell'espressione extracellulare VEGF è stata eseguita mediante saggio ELISA effettuato utilizzando i sovranatanti delle cellule seminate in piastre da 35 mm di diametro e trasdotte con i virioni shRNA-VEGF e shRNA-scrambled, raccolti a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione. È stato utilizzato un saggio quantitativo di tipo *sandwich* che fa uso di un anticorpo monoclonale per la cattura di VEGF e di un anticorpo policlonale per effettuare la reazione colorimetrica. La quantità dei campioni da analizzare nel saggio ELISA è stata normalizzata in base ai dati sul contenuto proteico dei corrispondenti lisati cellulari, al fine di ottenere delle misure quantitative di VEGF direttamente confrontabili tra loro, eliminando le differenze dovute al diverso numero di cellule presenti. I dati relativi alla quantità di VEGF presente nei sovranatanti, espressa come pg/ml, è riassunta nell'istogramma in Figura 5.

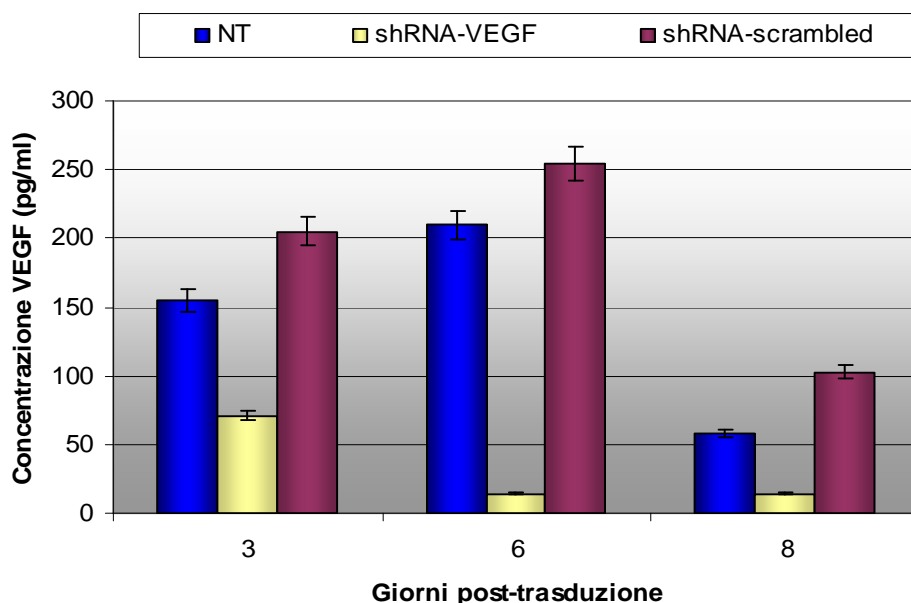


Figura 5: Quantificazione dell'espressione extracellulare di VEGF espressa in pg/ml misurata mediante saggio ELISA sui sovranatanti di cellule ARPE-19 seminate in piastre da 35 mm di diametro e trasdotte con i virioni shRNA-VEGF e shRNA-scrambled a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione. I dati sono raggruppati in base al tempo di raccolta; all'interno di ogni gruppo la quantità di VEGF presente nei sovranatanti delle cellule non trasdotte è rappresentata in blu, mentre le quantità relative a cellule trasdotte con shRNA-VEGF e shRNA-scrambled sono raffigurate rispettivamente in beige e bordeaux.

I valori riportati evidenziano una variabilità della concentrazione di VEGF tra le tre raccolte. Le cellule trasdotte con shRNA-VEGF presentano però un silenziamento dell'espressione della proteina, poiché i valori risultano inferiori sia alle cellule non trasdotte sia alle cellule trasdotte con shRNA-scrambled.

Nella Tabella 3 sono riportati i valori percentuali di silenziamento di VEGF in cellule trasdotte con i virioni esprimenti shRNA-VEGF, in confronto con le cellule non trasdotte. Il picco massimo di silenziamento si osserva 6 giorni dalla trasduzione, quando si raggiunge una riduzione del 93 % di VEGF nel sovranatante cellulare.

Giorni post-trasduzione	% silenziamento di VEGF mediato da shRNA-VEGF
3	54,08
6	93,23
8	75,68

Tabella 3: Percentuale di silenziamento di VEGF ottenuto in cellule ARPE-19 seminate in piastre da 35 mm di diametro a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione con i virioni shRNA-VEGF.

In un secondo esperimento di trasduzione con i virioni ricombinanti shRNA-VEGF e shRNA-scrambled, le cellule ARPE-19 sono state seminate in fiasche di coltura da 25 cm², per avere un maggiore numero di cellule rilascianti VEGF da testare, con l'obiettivo di verificare il silenziamento genico anche con la tecnica

del Western Blotting. Le raccolte dei campioni sono state effettuate in modo analogo all'esperimento precedente dopo 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione. Inizialmente i campioni dei lisati cellulari raccolti dalle fiasche T25 sono stati sottoposti a corsa elettroforetica in gel di poliacrilammide e successiva rilevazione in Western Blotting utilizzando un anticorpo monoclonale contro VEGF. Sebbene le maggiori dimensioni di coltura abbiano aumentato il contenuto proteico nei lisati cellulari, non è stato ancora possibile rilevare la presenza di VEGF e l'eventuale silenziamento (Figura 6).

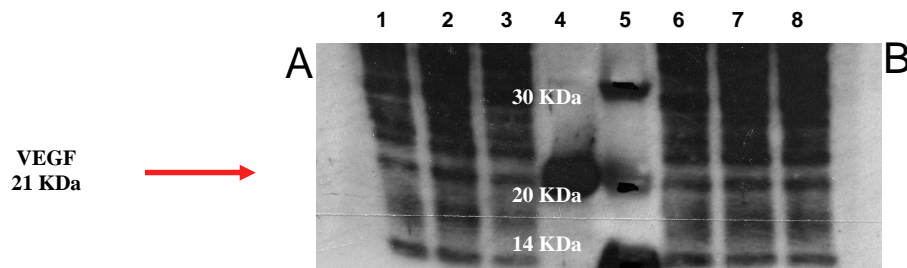


Figura 6: Espressione intracellulare di VEGF analizzata mediante SDS-PAGE e Western Blotting di lisati di cellule ARPE-19 seminate in fiasche da 25 cm² e trasdotte con i virioni ricombinanti shRNA-VEGF e shRNA-scrambled, raccolti a 6 (A) e 8 (B) giorni dalla trasduzione. Corsia 1, 6: lisati ottenuti da cellule non trasdotte; corsia 2, 7: lisati da cellule trasdotte con virioni shRNA-VEGF; corsia 3, 8: lisati da cellule trasdotte con virioni shRNA-scrambled; corsia: 4 proteina VEGF purificata; corsia 5: marker di peso molecolare.

I sovranatanti corrispondenti sono stati successivamente analizzati mediante saggio ELISA, normalizzando il volume di campione testato in base al quantitativo proteico dei lisati cellulari. I dati relativi alla quantità di VEGF, espressi in pg/ml, sono riassunti nell'istogramma in Figura 7.

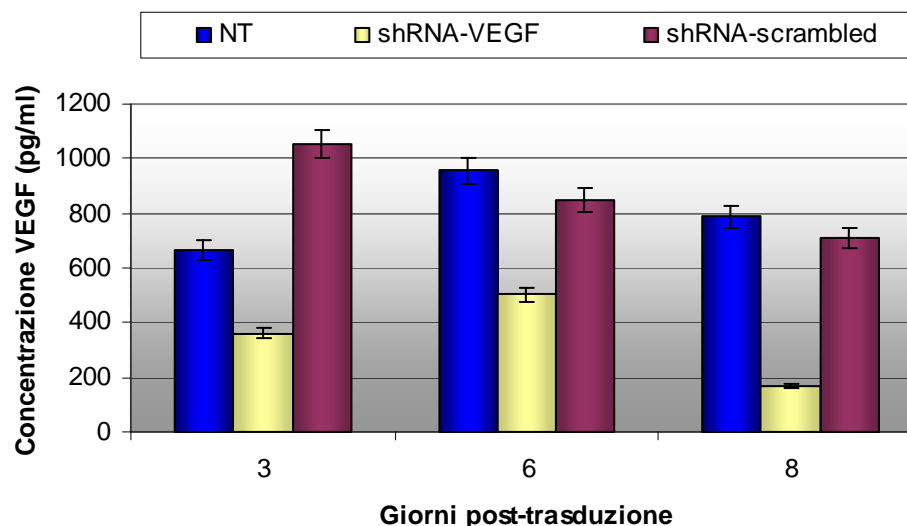


Figura 7: Quantificazione dell'espressione extracellulare di VEGF espressa in pg/ml misurata mediante saggio ELISA sui sovranatanti di cellule ARPE-19 seminate in fiasche da 25 cm² e trasdotte con i virioni shRNA-VEGF e shRNA-scrambled a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione. I dati sono raggruppati in base al tempo di raccolta; all'interno di ogni gruppo la quantità di VEGF presente nei sovranatanti delle cellule non

trasdotte è rappresentata in blu, mentre le quantità relative a cellule trasdotte con shRNA-VEGF e shRNA-*scrambled* sono raffigurate rispettivamente in beige e bordeaux.

Al pari dei sovranatanti raccolti dalle piastre da 35 mm di diametro, il contenuto di VEGF è abbastanza vario nelle diverse raccolte, ma superiore, in accordo con la maggiore densità di cellule rilascianti VEGF (Figura 5). Le concentrazioni di VEGF nei campioni trasdotti con shRNA-VEGF risultano inferiori rispetto alle cellule non trasdotte o trasdotte con i virioni shRNA-*scrambled*, a dimostrazione del silenziamento indotto dall'shRNA-VEGF. In Tabella 4 sono riportati i valori percentuali di silenziamento, calcolato in confronto alle cellule non trasdotte, che raggiunge un picco pari a 79% a 8 giorni dalla trasduzione.

Giorni post-trasduzione	% silenziamento di VEGF mediato da shRNA-VEGF
3	45,85
6	47,38
8	78,93

Tabella 4: Percentuale di silenziamento di VEGF ottenuto in cellule ARPE-19 seminate in fiasche da 25 cm² a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione con i virioni shRNA-VEGF.

Le quantità di VEGF ottenute dal saggio ELISA si attestano sull'ordine dei 1000 pg/ml al massimo, confermando l'impossibilità di poter rilevare il VEGF intracellulare in Western Blotting, poiché è un saggio meno sensibile se paragonato all'ELISA e VEGF è una proteina secreta che non si accumula nel citoplasma.

4.3 Silenziamento genico di VEGF mediante trasduzione con virioni ricombinanti HIV-1 esprimenti shRNA-VEGF in cellule retiniche in condizioni di ipossia

L'espressione del gene VEGF è regolata in modo rilevante dalla tensione tissutale di O₂; l'ipossia costituisce nel caso specifico uno dei responsabili della neangiogenesi oculare alla base dell'AMD¹³.

L'efficienza di silenziamento genico indotto dai virioni ricombinanti shRNA-VEGF in cellule ARPE-19 è stata analizzata quindi in condizioni di stress ossidativo indotto mediante trattamento con deferoxamina, una sostanza in grado di chelare il ferro e ostacolare la catena di trasporto degli elettroni nella respirazione cellulare¹⁵.

Inizialmente cellule ARPE-19 seminate su piastre da 35 mm di diametro sono state trasdotte con virioni shRNA-VEGF e shRNA-*scrambled* e mantenute in terreno di coltura addizionato con deferoxamina per un totale di 8 giorni, per consentire una raccolta dei campioni a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione. Ad ogni tempo di raccolta le cellule che dovevano proseguire l'esperimento sono state staccate e riseminate in terreno completo contenente deferoxamina, mentre le cellule e i sovranatanti da analizzare sono stati raccolti e preparati per i saggi di espressione.

È stato osservato che la deferoxamina induce profondi cambiamenti morfologici e una notevole diminuzione della crescita e della vitalità cellulare, come confermato da valori di contenuto proteico più bassi rispetto a cellule trasdotte con gli stessi virioni, ma non sottoposte a stress ossidativo.

I lisati cellulari non sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica e Western Blotting poiché negli esperimenti descritti precedentemente con cellule trasdotte non trattate con deferoxamina non era stato possibile evidenziare la proteina e il relativo silenziamento.

L'analisi è stata concentrata sui sovrinatanti quantificati mediante saggio ELISA. Nell'allestire il saggio le quantità dei campioni utilizzate sono state normalizzate in base ai dati del contenuto proteico dei rispettivi lisati, procedendo analogamente ai campioni ottenuti in condizioni di normossia. La quantificazione del VEGF mediante saggio ELISA, espressa in pg/ml, è riassunta nell'istogramma seguente (Figura 8).

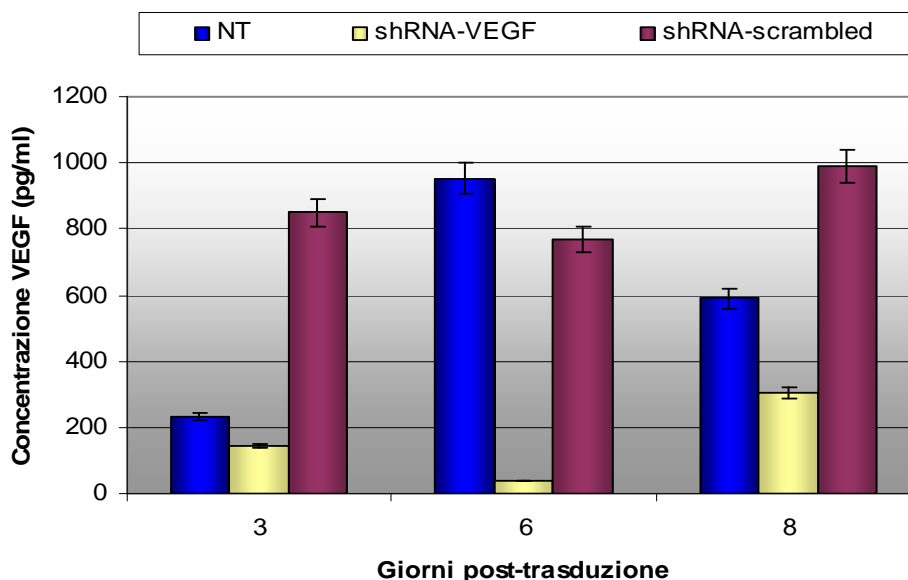


Figura 8: Quantificazione dell'espressione extracellulare di VEGF espressa in pg/ml misurata mediante saggio ELISA sui sovrinatanti di cellule ARPE-19, seminate in piastre da 35 mm di diametro, trattate con deferoxamina e trasdotte con i virioni shRNA-VEGF e shRNA-scrambled a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione. I dati sono raggruppati in base al tempo di raccolta; all'interno di ogni gruppo la quantità di VEGF presente nei sovrinatanti delle cellule non trasdotte è rappresentata in blu, mentre le quantità relative a cellule trasdotte con shRNA-VEGF e shRNA-scrambled sono raffigurate rispettivamente in beige e bordeaux.

Dai dati riportati si può notare innanzitutto un aumento della quantità di VEGF rilasciato nel sovrinatante delle cellule non trasdotte ma sottoposte a ipossia, rispetto alle medesime cellule mantenute in normali condizioni di coltura (figura 5). Le concentrazioni di VEGF nei sovrinatanti di cellule trasdotte con shRNA-VEGF risultano inferiori rispetto alle cellule non trasdotte e alle cellule trasdotte con shRNA-scrambled.

I dati percentuali di silenziamento ottenuto in cellule trasdotte con shRNA-VEGF, calcolati in confronto a cellule non trasdotte ma sottoposte alle stesse condizioni di stress ossidativi, sono riassunti in Tabella 10. Il massimo di silenziamento viene raggiunto a 6 giorni dalla trasduzione, analogamente all'andamento in normossia.

Giorni post-trasduzione	% silenziamento di VEGF mediato da shRNA-VEGF
3	38,20
6	95,86
8	48,21

Tabella 10: Percentuale di silenziamento di VEGF ottenuto in cellule ARPE-19 seminate in piastre da 35 mm di diametro e trattate con deferoxamina, a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione con i virioni shRNA-VEGF.

In un secondo esperimento di trasduzione con i virioni ricombinanti shRNA-VEGF e shRNA-scrambled le cellule ARPE-19 sono state coltivate in fiasche da 25 cm² in terreno di coltura addizionato con deferoxamina. Analogamente al precedente esperimento, le cellule sono state mantenute in coltura per 8 giorni e le raccolte dei campioni sono state effettuate a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione.

I campioni dei surnatanti sono stati testati mediante saggio ELISA per valutare l'entità di silenziamento causato dall'shRNA-VEGF, normalizzando le quantità analizzate in base ai dati del contenuto proteico. I valori quantitativi della concentrazione di VEGF rilevati mediante saggio ELISA, espressi come pg/ml, sono riportati nell'istogramma in Figura 9.

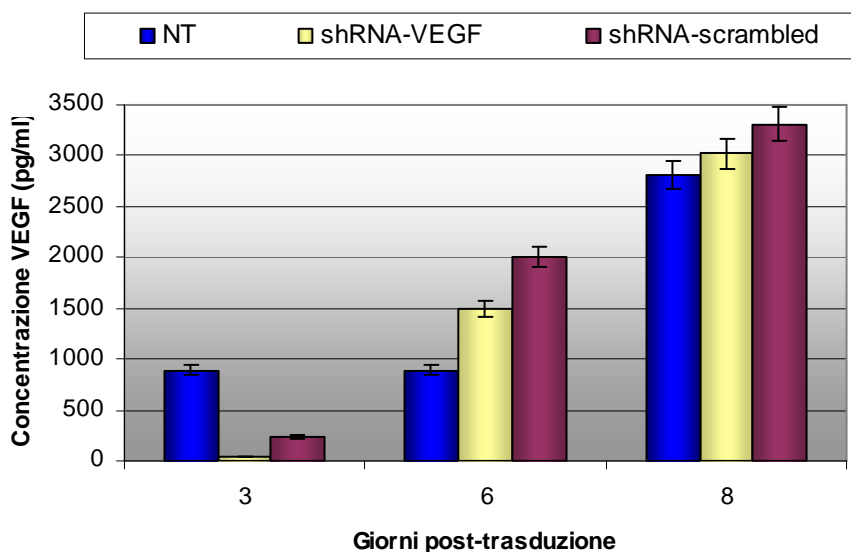


Figura 9: Quantificazione dell'espressione extracellulare di VEGF espressa in pg/ml misurata mediante saggio ELISA sui surnatanti di cellule ARPE-19, seminate in fiasche da 25 cm², trattate con deferoxamina e trasdotte con i virioni shRNA-VEGF e shRNA-scrambled a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione. I dati sono raggruppati in base al tempo di raccolta; all'interno di ogni gruppo la quantità di VEGF presente nei surnatanti delle cellule non trasdotte è rappresentata in blu, mentre le quantità relative a cellule trasdotte con shRNA-VEGF e shRNA-scrambled sono raffigurate rispettivamente in beige e bordeaux.

Inizialmente si può notare l'aumento della concentrazione di VEGF rispetto alle cellule ARPE-19 trasdotte in fiasche di 25 cm² non trattate con deferoxamina (Figura 7) ed alle cellule sottoposte allo stesso stress ossidativo coltivate in piastre da 35 mm di diametro (figura 8). A differenza di quest'ultime, i valori di VEGF delle cellule trasdotte con shRNA-VEGF risultano notevolmente inferiori alle cellule non trasdotte solamente dopo 3 giorni dalla trasduzione, mentre

successivamente la quantità extracellulare di VEGF dei sovrinatanti trasdotti con shRNA-VEGF è superiore a quella delle cellule non trasdotte.

Nella Tabella 11 sono riportati i valori percentuali di silenziamento ottenuti in cellule ARPE-19 trasdotte con i virioni ricombinanti shRNA-VEGF, in confronto a cellule non trasdotte mantenute nelle medesime condizioni di stress ossidativo.

Giorni post-trasduzione	% silenziamento di VEGF mediato da shRNA-VEGF
3	96,12
6	/
8	/

Tabella 11: Percentuale di silenziamento di VEGF ottenuto in cellule ARPE-19 seminate in fiasche da 25 cm² e trattate con deferoxamina, a 3, 6 e 8 giorni dalla trasduzione con i virioni shRNA-VEGF.

L'shRNA-VEGF si rivela quindi molto efficace dopo 3 giorni dalla trasduzione, mentre poi sembra non indurre alcun silenziamento. La mancanza di silenziamento nelle raccolte successive è imputabile al fatto che il mantenimento delle cellule in uno stato di stress ossidativo comporta un effetto cumulativo sull'induzione di VEGF. Questo fatto viene inoltre amplificato dal maggiore volume di coltura in cui sono state coltivate le cellule rispetto al primo esperimento di trasduzione, che permette un ulteriore accumulo di VEGF nei sovrinatanti.

5 Conclusioni

I risultati ottenuti in questo lavoro di tesi evidenziano la capacità di un vettore basato su HIV-1 di trasferire un shRNA diretto contro VEGF in cellule di epitelio pigmentato retinico umano. L'entità del silenziamento in condizioni di normossia e ipossia ottenuta a basse densità di cellule mediato da questo shRNA può ritenersi incoraggiante per il proseguimento di questo progetto di ricerca. Ci si propone ora di verificare il silenziamento a livello intracellulare mediante l'uso della tecnica di immunoprecipitazione, al fine di purificare VEGF dal restante contenuto proteico delle cellule trasdotte, per ottenere quantità di VEGF rilevabili con la tecnica del Western Blotting. È stata osservata un'incapacità di silenziare efficacemente VEGF in condizioni di ipossia quando viene trattato un più alto numero di cellule. Si può prospettare l'uso di promotori contenenti elementi inducibili da stress ossidativo, come ad esempio l'*Hypoxia Response Element* (HRE) riconosciuto dal fattore di trascrizione indotto dall'ipossia (*Hypoxia-Inducible Factor 1*)¹⁵, per regolare l'espressione dell'shRNA contro VEGF, al fine di garantire un silenziamento più potente e mirato, efficace in condizioni patologiche in presenza di alte densità di cellule.

6 Bibliografia

- ¹ **Kay MA, Glorioso JC, Naldini L.** 2001. Viral vector for gene therapy: the art of turning infectious agent into vehicles of therapeutics. *Nat Med*, Vol 116, pp. 33-40
- ² **Bartel DP.** 2004. MicroRNA: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell*, Vol 116, pp. 281-297
- ³ **Cullen BR.** 2005. RNAi the natural way. *Nat Med*, Vol 37, pp. 1163-1165
- ⁴ **Ferrara N.** 2001. Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, Vol 280, pp 1358-1366
- ⁵ **Naldini L, Blömer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM, Trono D.** 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, Vol 272, pp. 263-267
- ⁶ **Srinivasakumar N.** 2001. HIV-1 vector systems. *Somat Cell Mol Gen*, Vol 26, pp. 51-81
- ⁷ **Freed EO.** 2001. HIV-1 replication. *Somat Cell Mol Gen*, Vol 26, pp. 13-33
- ⁸ **Parolin C, Dorfman T, Palù G, Göttlinger H, Sodroski J.** 1994. Analysis in human immunodeficiency virus type 1 vectors of cis-acting sequences that affect gene transfer into human lymphocytes. *J Virol*, Vol 68, pp. 3888-3895
- ⁹ **Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D.** 1998. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol*, Vol 72, pp. 9873-9880
- ¹⁰ **Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L.** 1998. A third generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol*, Vol 72, pp. 8463-8471
- ¹¹ **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, Vol 391, pp. 806-811
- ¹² **Cashman SM, Bowman L, Christofferson J, Kumar-Singh R** 2006. Inhibition of choroidal neovascularisation by Adenovirus-mediated delivery of short hairpin RNA targeting VEGF as a potential therapy for AMD. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Vol 47, pp. 3496-3504
- ¹³ **Bainbridge JWB, Mistry AR, Thrasher AJ, Ali RR.** 2003. Gene therapy for ocular angiogenesis. *Clin Sci*, Vol 104, pp. 561-575
- ¹⁴ **Wiznerowicz M, Trono D.** 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol*, Vol 16, pp. 8957-8961
- ¹⁵ **Jiang BH, Zheng JZ, Leung SW, Roe R, Semenza GL.** 1997. Transactivation and inhibitory domains of hypoxia-inducible factor 1 alpha modulation of transcriptional activity by oxygen tension. *J Biol Chem*, Vol 272, pp. 19253-19260.

7 Abbreviazioni

AIDS	Sindrome da Immunodeficienza Acquisita
AMD	<i>Age-related Macular Degeneration</i>
APS	Ammonio Persolfato
ARPE-19	Cellule di epitelio pigmentato retinico umano
CA	Capside
cPPT	<i>central Poly-Purine Tract</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
D.O.	Densità Ottica
EF-1alfa	Fattore di Elongazione 1-alfa
ELISA	<i>Enzyme Lynked ImmunoSorbent Assay</i>
FBS	Siero Fetale Bovino
FIV	Virus dell'Immunodeficienza Felina
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
hCMV	Citomegalovirus Umano
H1	Istone H1
HIV-1	Virus dell'Immunodeficienza Umana di tipo 1
HRE	<i>Hypoxia Response Element</i>
HRP	<i>HorseRadish Peroxidase</i>
Kb	Chilobasi
LTR	<i>Long Terminal Repeat</i>
MA	Matrice
miRNA	<i>micro RNA</i>
NC	Nucleocapside
PAGE	Poliacrilammide Gel Elettroforesi
PBS	<i>Primer Binding Site</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
pre-miRNA	<i>micro RNA precursor</i>
pri-miRNA	<i>primary micro RNA</i>
R	sequenza ripetuta
RCR	Retrovirus Replicazione-Competente
RISC	<i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNAi	<i>RNA interference</i>
RNasi	Ribonucleasi
RRE	<i>Rev Responsive Element</i>
RSV	Virus del Sarcoma di Rous
SDS	Sodio Dodecil Solfato
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
shRNA-mir	precursori artificiali di shRNA
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SIV	Virus dell'Immunodeficienza della Scimmia
SIN	Vettore <i>Self-Inactivating</i>
SV40	Virus Vacuolante della Scimmia
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline</i> addizionato con <i>Tween 20</i>
TAR	<i>Transactivation Response Region</i>
TEMED	N,N,N',N'-TetraMetilEtilenDiammina

TU	Unità Trasducenti
U3	sequenza unica in 3'
U5	sequenza unica in 5'
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VSV-G	Glicoproteina G del Virus della Stomatite Vescicolare
WPRE	<i>Woodchuck Hepatitis C Virus Post-transcriptional Regulatory Element</i>