

Attività di ricerca

Il "Laboratorio" del Prof. Stefano Rivella, alla Cornell University di New York, è oggi uno "snodo" essenziale della ricerca scientifica sulla talassemia, sia di quella che si occupa di terapia genica sia di quella che ha come obiettivo lo sviluppo di un farmaco per l'incremento dell'emoglobina fetale. Il Laboratorio ha ormai un ricco stabulario murino ed è sui topi che si verifica ormai l'efficacia dei prodotti della ricerca, con la non esclusa possibilità di passaggio diretto sull'uomo.

L'Associazione Veneta si vanta di aver contribuito finanziariamente al raggiungimento dei risultati che sono stati finora ottenuti dai Proff. Fibach, Gambari e Rivella e che sono documentati da pubblicazioni in importanti riviste scientifiche, di cui questa rubrica ha dato notizia in precedenti puntate.

I testi disponibili in tali riviste sono però in inglese e quindi di non facile lettura per molti lettori di "EX".

Abbiamo quindi chiesto al Prof. Rivella di farci una relazione sulla sua più recente attività e su quella in programma per l'anno 2004 che, senza venir meno al rigore di una informazione scientifica corretta, consenta a tutti, anche se con un piccolo sforzo di lettura e di comprensione, di conoscere lo stato della ricerca sulla talassemia a cui sono giunti i tre scienziati su citati.

Elio Zago

"EX", aprile/maggio 2004

RELAZIONE DEL PROF. STEFANO RIVELLA

ATTIVITA' DI RICERCA NEL LABORATORIO DEL PROF. STEFANO RIVELLA AL WEIL MEDICAL COLLEGE (WMC) DELLA CORNELL UNIVERSITY DI NEW YORK

Anni: 2003-2004.

Relazione tra proporzione di cellule staminali corrette e livello di anemia in β -talassemia.

Allo scopo di valutare completamente le potenzialità del vettore terapeutico TNS9, è necessario capire qual è il numero minimo di cellule ematopoietiche staminali che devono essere geneticamente modificate con TNS9 per ottenere un effetto terapeutico. Se il gene delle β -globina presente in TNS9 ha la potenzialità di correggere il fenotipo talassemico, è necessario introdurre un secondo gene (reporter gene) per individuare il numero di cellule staminali trasdotte sul totale. L'identificazione del numero minimo di cellule geneticamente modificate che devono essere infuse in un paziente affetto da talassemia è estremamente importante, poichè questo può significare la differenza fra una completa mieloablazione e un mini-trapiato, con considerevoli vantaggi per il paziente.

Per questo motivo, abbiamo generato dei nuovi vettori che esprimono il gene della β -globina umana e, contemporaneamente, ci permettono di individuare il numero di cellule trasdotte. Inoltre, con l'intenzione di migliorare la capacità terapeutica di TNS9, abbiamo modificato questo vettore con diversi elementi genomici ed eliminato la sequenza U3 nella LTR al 3' per ridurre il rischio di mutagenesi inserzionale. I vettori terapeutici contengono una sequenza virale chiamata LTR. All'interno di questa sequenza è presente una regione chiamata U3: è stato dimostrato che questa regione è responsabile dell'attivazione dell'oncogene LMO2 che ha portato ai due casi di leucemia nel protocollo di terapia genica per la cura di pazienti affetti da SCID (una forma di immunodeficienza ereditaria) sviluppato in Francia. In altre parole, le LTR e altri elementi genomici presenti nel vettore possono interferire, ad esempio, con oncogeni al sito di integrazione. I

due recenti casi di leucemia verificatisi dopo il trattamento di terapia genica a Parigi (Cavazzano-Calvo, principal investigator) per il trattamento della sindrome SCID, hanno messo in guardia la comunità scientifica sul rischio di mutagenesi inserzionale. Mentre l'utilizzo dei vettori retrovirali ha sollevato speranze nel campo delle terapie geniche, il loro uso in Francia ha sollevato critiche e domande a cui è necessario dare alcune risposte. In questo caso, oltre a eliminare le LTR, sarebbe necessario affiancare i nuovi vettori terapeutici, con sequenze "isolatrici", che siano in grado di impedire al vettore di interagire con eventuali geni al sito di integrazione. Per questo motivo, allo scopo di ridurre il livello di variabilità di espressione del gene terapeutico e per "proteggere" il genoma dall'inserzione del vettore terapeutico, negli ultimi mesi abbiamo modificato il vettore TNS9 eliminando le sequenze U3 nella LTR e inserendo nel vettore sequenze isolatrici. La Dottoressa Breda ha preparato questi vettori: la loro analisi *in vitro* sarà completata nei prossimi mesi. Questi vettori saranno inseriti in cellule embrionali staminali embrionali e in cellule ematopoietiche staminali murine per generare, rispettivamente, topi transgenici e trapianti di midollo. A questo scopo La Dottoressa Breda ha già messo a punto le condizioni per trasdurre le cellule staminali embrionali ed è in grado di utilizzare questa tecnica per la generazione di animali transgenici (vedi anche il progetto di riespressione dell'emoglobina fetale). Alcuni dei vettori per lo studio della relazione tra proporzione di cellule staminali corrette e livello di anemia in β -talassemia sono già stati inseriti, con successo, in cellule embrionali staminali murine e i cloni sono stati isolati.

Generazione di costrutti che possano essere utilizzati per lo studio della riattivazione dell'emoglobina fetale umana in topi transgenici.

In collaborazione con il laboratorio del Professore Roberto Gambari, abbiamo quasi completato la costruzione dei vettori per generare topi transgenici che esprimano i geni della β e γ -globina umana allo scopo di studiare i composti per la riattivazione della emoglobina fetale.

Siccome la principale limitazione all'uso di farmaci induttori dell'emoglobina fetale è stata la mancanza di un sistema *in vivo* di riferimento, lo scopo di questo progetto è generare animali transgenici per identificare e testare *in vivo* nuovi farmaci.

Questa strategia prevede di generare cellule staminali embrionali murine modificate con vettori che contengono la β e la γ -globina umana. I cloni positivi con una copia del vettore integrata saranno utilizzate per generare topi transgenici. In tali topi saranno quantificati i trascritti gamma e beta umani prima e dopo il trattamento farmacologico.

Per tale scopo stiamo generando quattro vettori lentivirali. In questi, oltre ad un backbone comune, costituito da una struttura del tutto analoga a quella del vettore utilizzato per il trasferimento genico, sono state inserite le cassette di espressione per la beta o gamma globina o la combinazione di entrambe le globine sotto il controllo della LCR. Con questi vettori saremo in grado di individuare, *in vivo*, la riattivazione farmacologica da parte dei farmaci presi in considerazione. Inoltre, questi vettori saranno un valido strumento per lo studio del meccanismo di attivazione della γ -globina.

L'unità trascrizionale che codifica i geni globinici è stata assemblata utilizzando il gene della **β -globina** e la sequenza **LCR** (Locus Control Region) umane provenienti dal vettore TNS9; il gene della **γ -globina** umana è stato amplificato e isolato da DNA genomico. Sono state inserite le sequenze **cPPT** e **WPRE** allo scopo di aumentare la produzione lentivirale. Con questi elementi genomici abbiamo generato dei vettori che contengono il gene della **γ -globina** umana.

Il primo passaggio sperimentale prevederà l'infezione di linee cellulari eritroidi con i vettori costruiti, e in tali cellule verrà analizzata la stabilità dei vettori stessi e verranno quantificati i trascritti beta o gamma globinici.

Inoltre, avendo messo a punto le condizioni di trasferimento genico nelle cellule ematopoietiche staminali per generare i topi transgenici, la Dottoressa Sara Gardenghi sarà in grado, sotto la supervisione della Dottoressa Laura Breda, di trasdurre le cellule embrionali staminali murine. Sempre in collaborazione con il gruppo del Professore Roberto Gambari abbiamo messo a punto le

tecniche di quantificazione dei trascritti globinici murini (Real Time PCR) allo scopo di valutare l'effetto, *in vivo*, dei composti che riattivano l'emoglobina fetale umana *in vitro*. Inoltre, il gruppo del Professore Roberto Gambari, ci fornirà l'assistenza per la quantificazione delle proteine prodotte da questi vettori (β -globina e γ -globina umana).

Stefano Rivella, PhD
Assistant Professor in Genetic Medicine
Director, Jaffe Genetics Laboratory
Weill Medical College of Cornell University
Department of Pediatric Hematology-Oncology
515E 71st street, S725, box 284
New York, NY 10021
Phone: 212-746 4941
Fax: 212- 746 8423
e-mail: str2010@med.cornell.edu
<http://www.med.cornell.edu/research/srivella>

(la relazione è stata pubblicata nel periodico "EX" di Ravenna, n. 3, aprile-maggio 2004)