



Università degli Studi di Sassari
Dipartimento di Scienze Biomediche
Sezione di Istologia V/le San Pietro 43/B 07100 Sassari

Allegato VI - Modello per la Presentazione dei Programmi di Inserimento Lavorativo

Agenzia Regionale per il Lavoro
Programma Master and Back
Via Is Mirrionis, 195
09122 Cagliari

1. Soggetto Proponente (Operante in Sardegna)

Ragione Sociale: Dipartimento di Scienze Biomediche, Università degli Studi di Sassari

Indirizzo: Viale San Pietro 43/b, 07100 Sassari

Telefono/FAX: +39-079-228152

E-mail: fgalimi@uniss.it

Rappresentante Legale: Prof. Alessandro Maida, Rettore dell'Università di Sassari

Referente per il Programma: Dr. Francesco Galimi

Tipologia

Università

Breve Presentazione del Soggetto Proponente Operante in Sardegna

Il Laboratorio di Terapia Genica situato presso il Dipartimento di Scienze Biomediche dell'Università di Sassari si occupa in particolare di vettori lentivirali. Il gruppo è coordinato dal Dr. Francesco Galimi, Ricercatore di Istologia presso la Facoltà di Medicina e Chirurgia, e include dottorandi e borsisti per un totale di 5 persone. Il gruppo è attivo nel campo del trasferimento genico, come testimoniato dalle pubblicazioni e dai finanziamenti ottenuti nell'ultimo quinquennio da parte di enti pubblici e privati, quali

Telethon, MIUR, Regione Sardegna, Ministero della Sanità. In particolare, il Dr. Galimi è stato più volte Responsabile di Unità Locale ed è attualmente Coordinatore Nazionale di Progetti di Ricerca di Interesse Nazionale (PRIN) nel campo della terapia genica. Le sue pubblicazioni hanno un Impact Factor complessivo pari a circa 180 e hanno registrato oltre 800 citazioni in letteratura (Citation Index).

Recenti pubblicazioni selezionate del Dr. Galimi:

Galimi, F., Saez, E., Gall, J., Hoong, N., Cho, G., Evans, R.M., Verma, I.M. Development of ecdysone-regulated lentiviral vectors. *Mol Ther.* 2005;11:142-148.

Galimi, F., Summers, R.G., van Praag, H., Verma, I.M., Gage, F.H. A role for bone marrow-derived cells in the vasculature of noninjured CNS. *Blood.* 2005;105:2400-2402.

Sternsdorf, T., Phan, V.T., Maunakea, M.L., Ocampo, C.B., Sohal, J., Silletto, A., Galimi, F., Le Beau, M.M., Evans, R.M., Kogan, S.C. Forced retinoic acid receptor alpha homodimers prime mice for APL-like leukemia. *Cancer Cell.* 2006;9:81-94.

Horky, L.L., Galimi, F., Gage, F.H., Horner, P.J. Fate of endogenous stem/progenitor cells following spinal cord injury. *J Comp Neurol.* 2006;498:525-38.

Cantaluppi, V., Biancone, L., Romanazzi, G.M., Figliolini, F., Beltramo, S., Ninniri, M.S., Galimi, F., Romagnoli, R., Franchello, A., Salizzoni, M., Perin, P.C., Ricordi, C., Segoloni, G.P., Camussi, G. Antiangiogenic and Immunomodulatory Effects of Rapamycin on Islet Endothelium: Relevance for Islet Transplantation. *Am J Transplant.* 2006;6:2601-11.

2. Programma di Inserimento Lavorativo

Obiettivi

Nel Laboratorio proponente sono attualmente attivati vari progetti di ricerca afferenti a 3 obiettivi.

Obiettivo 1

Terapia genica dell'Anemia di Fanconi - Lo studio delle malattie genetiche rare può avere importanti ripercussioni sulla comprensione dei meccanismi generali che sono alla base di molte malattie più comuni. Un esempio è costituito dall'anemia di Fanconi (FA), una rara malattia autosomica recessiva caratterizzata da instabilità cromosomica, aplasia midollare progressiva, malformazioni congenite e predisposizione a leucemie e tumori solidi. Studi recenti hanno permesso di identificare 11 geni responsabili (FANCA, FANCC, FANCD1-BRCA2, FANCD2, FNACE, FANCF, FANCG, FANCI, FANCI, FANCI, FANCL, FANCM), i cui prodotti interagiscono in un pathway (detto FA/BRCA), implicato nel controllo dell'integrità del genoma.

Lo studio del pathway Fanconi ha permesso di chiarire alcuni processi generali di riparazione del DNA, il cui malfunzionamento è probabilmente coinvolto nella genesi di molte forme neoplastiche. In breve, 8 delle 11 proteine FA (FANCA, FANCB, FANCC, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL e FANCM) formano un complesso nucleare ("complesso FA"), necessario per la monoubiquitinazione di D2. La forma monoubiquitinata di D2 migra in foci nucleari dove si localizza con geni implicati in altre patologie con instabilità cromosomica e predisposizioni ai tumori (BRCA1, ATM, BLM, RAD51/MRE11/NBS1). L'ipotesi che un difetto sul controllo dell'integrità del genoma sia la causa dell'Anemia di Fanconi è stata ulteriormente consolidata dall'identificazione del gene FANCD1, che risulta essere BRCA2. BRCA2, come BRCA1, è implicato nel tumore della mammella e rappresenta un elemento di fondamentale importanza nella ricombinazione omologa.

Sulla base di queste informazioni è stata recentemente studiata la funzionalità del pathway FA/BRCA in alcune forme di tumori "sporadici". Indagini in questo settore hanno permesso di identificare mutazioni, somatiche o germinali, in tumori ovarici sensibili al cisplatino (assenza di espressione di FANCF), in un carcinoma del pancreas (mutazioni di FANCC e FANCG) e in una leucemia mieloide acuta (mutazioni di FANCA). Il nostro gruppo ha inoltre identificato mutazioni del gene FANCD2 in un paziente con AML dei linfociti T, estendendo quindi lo spettro dei tumori in cui un difetto del pathway FA/BRCA possa svolgere un importante ruolo nella carcinogenesi.

Oltre all'interesse per i meccanismi molecolari coinvolti, la Anemia di Fanconi costituisce anche un modello di malattia per la sperimentazione di terapie innovative in oncematologia. La principale causa di morbilità e mortalità per i pazienti Fanconi è la insufficienza midollare, cui consegue pancitopenia ingravescente. La messa a punto di strategie di trapianto autologo di progenitori emopoietici corretti geneticamente ex vivo dovrebbe in linea di principio correggere il problema. Sulla base di dati di marcatura genica su tessuto murino e umano, il modo più semplice di effettuare questa procedura è la cosiddetta terapia genica ex vivo, mediante purificazione delle cellule staminali dal midollo osseo del paziente, e loro correzione in vitro prima della reinfusione.

La creazione di metodiche efficienti per la ingegnerizzazione genetica del tessuto emopoietico costituisce una delle principali sfide nella moderna biomedicina. Il presente progetto si propone di affrontare il problema mediante tecnologie innovative che sfruttano le potenzialità di una nuova generazione di vettori genetici. Tali vettori hanno richiamato notevole interesse in campo ematologico e costituiscono uno dei reagenti più promettenti per uso clinico.

La terapia genica delle cellule staminali emopoietiche, cioè la possibilità di interferire con le proprietà biologiche del sistema emopoietico modificandone geneticamente i progenitori precoci, costituisce un approccio terapeutico concettualmente molto promettente per molte malattie genetiche e acquisite. Di particolare interesse è la possibilità di applicare le tecniche di terapia genica agli attuali protocolli di trapianto di midollo emopoietico, sia autologo che allogenico. La ingegnerizzazione ex vivo del midollo prima del trapianto permetterebbe in linea di principio di correggere difetti genetici o più in generale di manipolare le cellule progenitrici per ottenere un effetto terapeutico nella progenie degli elementi maturi. Ancorché suggestivo, questo scenario si scontra però con i limiti delle tecnologie oggi disponibili. In particolare, non è ancora possibile ottenere ripopolazioni a lungo termine con cellule emopoietiche ingegnerizzate ex vivo, a causa della inaccessibilità del compartimento staminale ai vettori genetici convenzionali.

I vettori retrovirali sono il mezzo più frequentemente utilizzato per il trasferimento genico in cellule emopoietiche. Il loro principale limite, tuttavia, risiede nella incapacità di trasdurre cellule quiescenti. L'efficienza di trasduzione può essere aumentata inducendo la proliferazione in coltura dei progenitori emopoietici, ma questo inevitabilmente ne stimola la differenziazione, riducendone la potenzialità di ripopolazione midollare. A tutt'oggi, la trasduzione delle cellule staminali totipotenti non proliferanti rimane un problema irrisolto.

Sono stati recentemente introdotti vettori virali di nuova generazione, derivati dall'HIV, che sono in grado di trasdurre cellule non proliferanti, permettendo quindi l'integrazione di DNA esogeno e la sua espressione stabile a lungo termine anche in popolazioni cellulari totalmente quiescenti. Dati preliminari suggeriscono come tali vettori possano essere usati per trasferimento genico in vari tessuti con alta efficienza.

Obiettivo 2

Terapia genica della β -talassemia - La β -talassemia costituisce un importante problema sanitario in Sardegna, nonostante la riduzione di incidenza dovuta ai programmi di prevenzione posti in essere negli ultimi decenni. La malattia ha un decorso fortemente invalidante, e genera un notevole costo sociale a causa delle terapie trasfusionali cui i pazienti devono sottoporsi per tutta la vita.

La correzione del difetto genetico causa della β -talassemia costituisce un approccio terapeutico molto promettente, che permetterebbe di curare le cellule emopoietiche malate e liberare così il paziente dalla necessità di continue trasfusioni. Tuttavia, molteplici difficoltà tecniche hanno raffreddato gli iniziali entusiasmi, e la manipolazione genetica delle cellule del sangue resta un problema irrisolto.

Il presente programma di ricerca prevede di utilizzare la nuova generazione di vettori lentivirali per mettere a punto protocolli di trasferimento genico in cellule staminali

emopoietiche. Tale obiettivo riveste un interesse primario nell'ambito degli sforzi volti a migliorare la trasferibilità alla clinica delle tecnologie di terapia genica. Il lavoro sperimentale consisterà delle seguenti fasi: (a) messa a punto delle condizioni per la trasduzione delle cellule staminali umane con vettori lentivirali, utilizzando geni differenti geni reporter; (b) caratterizzazione della capacità rigenerativa in vitro delle cellule staminali trasdotte, mediante colture in mezzo semisolido e a lungo termine su cellule stromali; (c) costruzione di vettori capaci di trasdurre i geni delle subunità emoglobiniche e loro caratterizzazione su cellule emopoietiche.

Obiettivo 3

Trasferimento genico nel contesto del trapianto di β -insule pancreatiche - Lo scopo finale di questo progetto è lo sviluppo di protocolli per la immunoprotezione e il potenziamento funzionale nel trapianto di beta-insule pancreatiche, mediante l'utilizzo di vettori lentivirali.

Il trapianto di insule pancreatiche può ormai essere considerato come una opzione terapeutica di routine per il trattamento del diabete mellito insulino-dipendente. Diverse problematiche inerenti alla procedura di trapianto devono ancora essere perfezionate, in particolare per quanto riguarda la disponibilità, l'allocazione e la conservazione degli organi, le procedure di isolamento e di coltura cellulare, la modalità tecnica di trapianto e gli schemi di terapia immunosoppressiva. Per ottenere una massa di cellule beta insulari sufficiente a garantire un trapianto funzionante è ancora indispensabile ricorrere a donatori multipli, dal momento che un numero rilevante di insule viene distrutto una volta introdotto nel torrente ematico con l'iniezione intraportale, grazie all'insnesco di una reazione infiammatoria/pro-trombotica che riduce l'attecchimento intraepatico delle insule stesse. Una volta impiantate nel fegato, le insule vengono rivascularizzate attraverso un lento processo di angiogenesi con successiva perdita di un'altra consistente parte della massa di insule ed esposizione al sistema immunitario. Gli attuali schemi immunodepressivi per il trapianto di insule sono mutuati dal protocollo di Edmonton e sono stati disegnati con lo scopo di evitare o minimizzare le dosi di farmaci a forte impronta diabetogenica come gli steroidi e gli inibitori delle calcineurine, adottando come farmaco immunosoppressore principale la rapamicina. In ogni caso, la localizzazione intra-epatica delle insule trapiantate le espone ad alti livelli di farmaci. Inoltre, è stato dimostrato che la rapamicina possiede delle notevoli attività anti-proliferative, pro-apoptotiche ed anti-angiogenetiche, tutti meccanismi in grado di diminuire la rivascularizzazione delle insule trapiantate e la sopravvivenza delle beta cellule. L'immunosoppressione sistemica aumenta il rischio di sviluppo di infezioni e di patologie tumorali ed ha numerosi effetti collaterali tra cui nefrotossicità, mielotossicità, iperlipidemia, ipertensione, tremori, etc. Tale scenario è da considerare in modo particolare nell'ambito del trapianto di insule, dove un volume molto piccolo di tessuto trapiantato richiede l'adozione di una terapia immunosoppressiva sistemica con gli effetti collaterali sopra citati. Per queste ragioni, strategie efficaci nel ridurre la necessità di terapia immunosoppressiva mediante la protezione del tessuto trapiantato sono molto promettenti nel permettere un più ampio uso clinico del trapianto in diabetologia. Verranno studiati protocolli mirati sia al tessuto pancreatico vero e proprio, che ai progenitori endoteliali (EPCs), i quali saranno usati per la formazione di organoidi microchimerici in vitro e in vivo.

La terapia genica ha suscitato un notevole interesse nel campo del trapianto cellulare in seguito al suo enorme potenziale di modificazione delle proprietà biologiche delle cellule trapiantate e della risposta immunitaria del ricevente. Comunque, i vettori comunemente usati non rispondono ancora ai requisiti di sicurezza e di efficienza nel trasferimento genico nelle appropriate cellule target. I vettori più usati (adenovirus) permettono elevati livelli di espressione proteica nelle cellule sottoposte a transduzione, ma l'espressione appare essere transitoria e lo stesso vettore adenovirale induce una importante risposta immunitaria. I vettori retrovirali si integrano nel genoma della cellula ospite ma sono in grado di effettuare la transduzione solo in cellule in divisione, con conseguenti bassi livelli di espressione. La transduzione genica ad alta efficienza in cellule quiescenti è il maggiore target per la terapia genica nel trapianto di insule pancreatiche, sia per l'ingegnerizzazione delle beta cellule che delle EPCs. I vettori lentovirali sono strumenti promettenti in questo campo, perché possiedono la capacità di trasdurre efficacemente sia cellule quiescenti che in fase di divisione cellulare. Le cellule insulari pancreatiche non rappresentano l'unico target potenziale per la terapia genica nel trapianto di insule. Recentemente è stato dimostrato che le EPCs presenti nel sangue periferico contribuiscono alla rivascularizzazione delle insule trapiantate, e che tale fenomeno aumenta la sopravvivenza del trapianto in modelli sperimentali murini. Quindi, le EPCs possiedono un notevole potenziale angiogenetico che può essere sfruttato per la neovascolarizzazione terapeutica. Valuteremo se le EPCs rappresentano un target migliore delle cellule beta per il trasferimento genico, basandoci sul seguente rationale: (a) maggiore efficienza di transduzione delle EPCs in confronto alle cellule beta; (b) possibilità di interferenza diretta con le funzioni pro-infiammatorie ed immunologiche dell'endotelio insulare neoformato; (c) evitare il rischio di alterazioni della funzionalità delle cellule beta indotte dalle procedure di transduzione genica; (d) miglior controllo di qualità delle cellule dopo transduzione genica dal momento che le EPCs sono preparate prima del momento del trapianto rispetto alle cellule beta, garantendo la possibilità di un maggiore controllo del prodotto.

Attività Previste e Piano di Lavoro

Attività sperimentali comuni a più obiettivi:

Generazione di vettori pseudotipizzati basati sull'HIV (obiettivi 1, 2 e 3) - Viene utilizzato il sistema di produzione di vettori basati sull'HIV introdotto recentemente. In breve, esso consiste di tre plasmidi (figura 1):

(a) due costrutti di packaging codificanti le proteine virali necessarie in trans. Tali plasmidi sono difettivi per il segnale di packaging, per tutti i geni accessori e per il gene tat;

(b) il vettore di trasduzione, contenente le sequenze di HIV necessarie in cis per il packaging, la retrotrascrizione e l'integrazione, oltre a siti di clonaggio;

(c) un vettore di pseudotipizzazione, codificante la proteina di superficie del virus della stomatite vescicolare (VSV-G), che offre il vantaggio di una alta stabilità e permette la concentrazione delle particelle virali per ultracentrifugazione.

L'ultimo vettore può essere sostituito da altri plasmidi codificanti per altre envelope virali, incluse alcune molecole ricombinanti con specificità per popolazioni cellulari particolari.

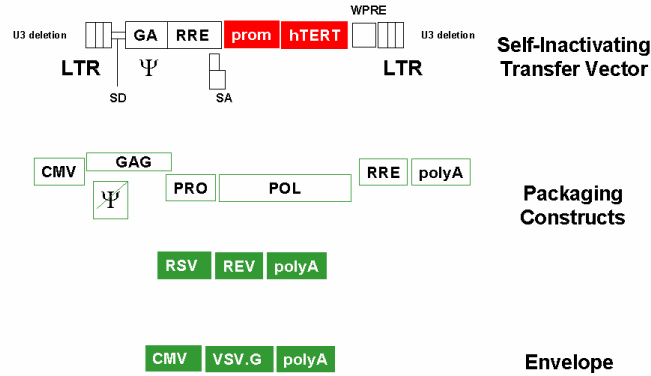


Figura 1 – Rappresentazione schematica del sistema di produzione per vettori lentivirali difettivi.

Verranno utilizzati diversi vettori di trasduzione contenenti differenti marcatori di selezione per le cellule trasdotte. Tra questi, il gene per la resistenza alla neomicina e per la Multidrug Resistance (per la crescita in mezzi di coltura selettivi), alcuni marcatori di superficie (per selezione in citofluorimetro a flusso), e la proteina verde fluorescente (GFP), per permettere la rilevazione e la selezione in cellule viventi.

Le particelle virali incapaci di replicarsi sono generate per cotrasfezione dei tre plasmidi in cellule 293T di rene umano. I supernatanti di coltura vengono titolati in test di frequenza di trasduzione su fibroblasti di ratto, e sono controllati per l'assenza di virus helper ricombinanti saggiando la produzione delle proteine tat e gag nelle cellule trasdotte.

Isolamento e infezione di cellule staminali emopoietiche (obiettivi 1 e 2) - Cellule CD34+ saranno purificate dal sangue periferico, midollare e cordonale mediante separazione per FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Le due popolazioni CD34+CD38+ e CD34+CD38- verranno usate separatamente negli esperimenti di trasduzione. L'infezione sarà effettuata coltivando le cellule in presenza di vettori pseudotipizzati. Dopo l'infezione, test di coltura liquida e di formazione di colonie in vitro (CFU C) permettono di stabilire l'efficienza di trasduzione in cellule proliferanti.

La procedura di infezione verrà ottimizzata, p.es. modificando le condizioni, utilizzando envelope alternative, o saggiando l'effetto di citochine e cocultura con cellule stromali. Come controllo verrà sempre utilizzato un vettore retrovirale convenzionale, pseudotipizzato come la controparte lentivirale.

Culture emopoietiche a lungo termine (obiettivi 1 e 2) - Le cellule infettate saranno saggiate per la loro capacità generativa in vitro, in test di formazione di colonie a lungo termine in presenza di cellule stromali (LTC-IC e E-LTC-IC) come descritto. Le cellule saranno piastrate su stroma irradiato in presenza di citochine emopoietiche. Ogni 2-3 settimane, aliquote di cellule non aderenti saranno prelevate e testate in mezzo semisolido per la formazione di CFU-C, allo scopo di misurare il contenuto di progenitori nella coltura. Le colonie trasdotte saranno identificate con metodiche differenti a seconda del marcatore utilizzato (v. sopra). L'analisi clonale dei siti di integrazione verrà effettuata per inverse polymerase chain reaction, come descritto.

Attività specifiche per i vari obiettivi:

Obiettivo 1

Lo scopo di questo progetto è la messa a punto di protocolli innovativi di correzione genetica dei progenitori emopoietici in pazienti Fanconi. La terapia genica ex vivo della Anemia di Fanconi si è finora scontrata con la estrema fragilità delle cellule malate, e i tentativi finora condotti con vettori retrovirali hanno avuto successo. Per mezzo di una nuova generazione di vettori, detti lentivirali, siamo stati in grado di correggere il difetto genetico Fanconi in cellule staminali di topo. Il passo successivo è tentare la correzione di cellule umane. Anche se i dati su animali sono molto promettenti, esperimenti su cellule ottenute dai pazienti sono necessari prima di poter proporre un'applicazione clinica di questa tecnologia. Le cellule staminali verranno purificate da campioni di midollo osseo e corrette in provetta. L'effetto terapeutico verrà poi valutato trapiantando le cellule in topi immunodeficienti NOD/scid. Se i promettenti risultati ottenuti sulle cellule staminali di topo saranno ripetuti su quelle umane, ciò costituirà un significativo passo verso la applicazione delle tecniche di terapia genica ai pazienti affetti da Anemia di Fanconi.

Obiettivo 2

Il lavoro sperimentale consisterà delle seguenti fasi:

- messa a punto delle condizioni ottimali per la purificazione delle cellule staminali umane e per la loro trasduzione con vettori lentivirali, utilizzando geni differenti geni reporter;
- caratterizzazione della capacità rigenerativa in vitro delle cellule staminali trasdotte, mediante colture in mezzo semisolido e a lungo termine su cellule stromali;
- costruzione di vettori capaci di trasdurre i geni delle subunità emoglobiniche e loro caratterizzazione su cellule emopoietiche.

La prima fase del lavoro sperimentale prevede la messa a punto di protocolli di trasferimento genico in progenitori emopoietici umani utilizzando la proteina verde fluorescente come marcatore.

Obiettivo 3

Lo scopo del progetto è la messa a punto di protocolli per l'ingegnerizzazione di progenitori endoteliali mediata da vettori lentivirali, allo scopo di generare organoidi

microchimerici composti da cellule beta pancreatiche complessate con progenitori endoteliali espansi ex vivo. Tramite ingegnerizzazione tissutale svilupperemo degli "organoidi" microchimerici composti da insule pancreatiche ricoperte da EPCs raccolte dal sangue periferico ed espanse "ex-vivo". Lo scenario è quello in cui le EPCs vengono isolate dal sangue dei pazienti in lista di attesa, espanse "ex-vivo", congelate ed impiantate al momento opportuno nei siti di rivascularizzazione come un vero e proprio trapianto autologo. Il co-impianto delle insule microchimerizzate con le EPCs autologhe precedentemente preparate potrebbe favorire una rapida ed abbondante rivascularizzazione dopo il trapianto. Le ben conosciute proprietà di marcato potenziale di crescita e di angiogenesi delle EPCs e la loro possibilità di sfuggire alla reazione di rigetto dal momento che sono state ottenute dal ricevente stesso supportano il ruolo di tali cellule in questo studio. Il trapianto combinato insule-EPCs potrebbe, inoltre, riportare nuovo interesse verso siti di impianto più convenienti dal punto di vista clinico che sono stati abbandonati in passato a causa delle difficoltà ad ottenere una adeguata vascolarizzazione. Inoltre, la protezione dal danno indotto dalla reazione infiammatoria/trombotica dopo iniezione nel torrente ematico può essere raggiunta grazie alla microchimerizzazione delle insule.

La rilevanza di questi studi consiste nella importanza della preservazione del fragile e prezioso tessuto insulare necessario per il trapianto. Al momento attuale, meno del 30-50% dei pancreas processati per l'isolamento delle insule fornisce materiale biologico necessario per un trapianto. Inoltre, in media due preparazioni di insule pancreatiche sono necessarie per raggiungere lo stato di insulino-indipendenza nel paziente diabetico, dal momento che buona parte delle insule vengono distrutte durante l'attecchimento. Quindi, sebbene il trapianto di insule sia una opzione terapeutica di successo nei pazienti con diabete di tipo I, il suo impatto clinico rimarrà comunque marginale finché non saranno trovate delle nuove strategie intese a proteggere la vitalità e la funzionalità delle insule espandendo il numero di trapianti effettuati anche da donatori marginali. Inoltre, la generazione di microambienti privilegiati dal punto di vista immunologico attraverso la terapia genica con molecole dotate di capacità di immunoregolazione può portare ad una importante riduzione dell'immunosoppressione sistemica, alterando l'attuale rapporto rischio/beneficio del trapianto di insule, vincolato dagli effetti collaterali dei farmaci immunosoppressivi.

Il progetto si propone di generare e caratterizzare di vettori lentivirali portatori dei seguenti geni:

- Molecole di costimolazione CTLA4-Ig, CD40-Ig, CD5-Ig. Abbiamo precedentemente generato dei recettori solubili delle molecole di costimolazione unendo il dominio extracellulare cDNA con la regione cerniera e la frazione costante (Fc) delle IgG in un plasmide cDM8 (CD40-Ig, CTLA4-Ig and CD5-Ig) ed abbiamo dimostrato la loro capacità di interferire con la risposta immunitaria in vivo. Saranno generati dei costrutti lentivirali codificanti per CD40-Ig, CTLA4-Ig and CD5-Ig e saranno effettuati degli studi di trasduzione sulle insule umane e murine.
- Platelet-activating factor acetilidrolasi (PAF-AH). Il cDNA plasmidico di PAF-AH murino in vettore plasmidico è ancora disponibile presso il nostro laboratorio ed è già stato efficientemente utilizzato in studi di transfezione sulla inibizione delle capacità pro-infiammatorie delle cellule endoteliali attivate.

- Hepatocyte Growth Factor (HGF) ed eritropoietina. È stato dimostrato che questi due fattori di crescita sono in grado di agire anche sulle cellule beta insulari. La scelta del promotore sarà effettuata mediante esperimenti di marcatura genica con GFP, comparando diverse sequenze promotrici come la fosfogliceraldeide chinasi umana (PGK), il promotore CMV ed il promotore ibrido attivatore CMV/beta actina di pollo (CAG). Saranno anche presi in considerazione promotori inducibili e tessuto-specifici. I vettori contenenti la GFP sotto il controllo dei diversi promotori sono già disponibili e in fase di analisi su tessuto pancreatico e progenitori endoteliali. Bisogna sottolineare che i promotori più attivi sulle cellule beta potrebbero non essere ugualmente attivi sulle EPCs e viceversa, così che il pannello di vettori nello studio potrebbe includere diverse combinazioni gene-promotore.

Successivamente verranno valutati gli effetti della transduzione delle EPCs con i vettori lentivirali descritti. Questi esperimenti si basano sull'ipotesi che la transduzione delle EPCs potrebbe avere alcuni vantaggi rispetto alla transduzione delle insule, come l'uso di una linea cellulare più resistente, l'ovvia assenza del danno indotto dai procedimenti di transduzione delle insule, la possibilità di pianificare il timing della procedura.

Risultati Attesi

Obiettivo 1

Questi i principali risultati attesi:

- a) generazione di vettori lentivirali contenenti cassette di espressione per i geni Fanconi;
- b) ottimizzazione dei protocolli di purificazione dei progenitori emopoietici da campioni di midollo di pazienti Fanconi;
- c) correzione della capacità proliferativa in vitro e ripopolativa in vivo dei progenitori Fanconi.

Il progetto porterà alla messa a punto di protocolli innovativi di correzione genetica dei progenitori emopoietici in pazienti Fanconi. La terapia genica ex vivo della Anemia di Fanconi si è finora scontrata con la estrema fragilità delle cellule malate, e i tentativi condotti con vettori retrovirali hanno avuto successo. Per mezzo di una nuova generazione di vettori, detti lentivirali, siamo stati in grado di correggere il difetto genetico Fanconi in cellule staminali di topo. Il passo successivo è tentare la correzione di cellule umane. Anche se i dati su animali sono molto promettenti, esperimenti su cellule ottenute dai pazienti sono necessari prima di poter proporre un'applicazione clinica di questa tecnologia. Le cellule staminali verranno purificate da campioni di midollo osseo e corrette in provetta. L'effetto terapeutico verrà poi valutato trapiantando le cellule in topi immunodeficienti NOD/scid. Se i promettenti risultati ottenuti sulle cellule staminali di topo saranno ripetuti su quelle umane, ciò costituirà un significativo passo verso la applicazione delle tecniche di terapia genica ai pazienti affetti da Anemia di Fanconi.

Obiettivo 2

Verranno costruiti e caratterizzati vettori contenenti cassette di espressione per la beta-globina. Tali costrutti sono particolarmente impegnativi a causa della complessità della regolazione genica necessaria. I vettori risultanti verranno prodotti ad alto titolo e testati dapprima in vitro su cellule di eritroleucemia umana (HEL), successivamente su progenitori emopoietici primari.

Obiettivo 3

Saranno eseguiti i seguenti esperimenti:

a) Ingegnerizzazione tissutale per lo sviluppo di insule pancreatiche chimerizzate con un mantello esterno di EPCs. Saranno testate diverse condizioni di co-coltura per favorire l'adesione delle EPCs alla superficie delle insule, in particolare valutando la variazione della composizione del medium di coltura e della viscosità con carbossimetilcellulosa o con acido ialuronico ad alta viscosità, o aggiungendo al medium di coltura fattori di crescita per gli endotelioцитi come bFGF o VEGF. L'interazione superficiale tra insule e EPCs verrà analizzata in microscopia a fluorescenza ed in microscopia elettronica a scansione.

b) Valutazione della protezione delle insule dalla reazione infiammatoria/trombotica scatenata dall'immissione delle insule stesse nel torrente ematico dopo microchimerismo con uno strato di EPCs. Il complesso EPCs-insule sarà messo in incubazione con sangue senza anticoagulanti compatibile per il gruppo ABO con lo scopo di valutare la coagulazione ematica, l'aggregazione piastrinica e la fissazione del complemento con analisi su sangue e tramite immunoistochimica delle insule.

c) Valutazione in vivo della rivascularizzazione dopo trapianto. Le insule-EPCs chimerizzate saranno impiantate sotto la capsula renale di topi SCID. Le EPCs verranno colorate con un tracciante fluorescente prima degli esperimenti in vivo. La rivascularizzazione del composto chimerico sarà paragonata a quella che avviene dopo l'impianto delle insule singolarmente mediante analisi della densità intra- e peri-insulare dopo determinati periodi di tempo.

d) Valutazione della protezione delle insule pancreatiche fornita dopo terapia genica delle EPCs. Abbiamo precedentemente dimostrato che il PAF induce delle alterazioni in senso pro-infiammatorio delle cellule endoteliali che possono essere prevenute dal trasferimento genico di PAF-AH, il maggiore enzima inattivante l'azione del PAF. Quindi, programmeremo la transduzione delle EPCs con cDNA per PAF-AH e valuteremo la protezione delle insule dalla reazione trombotica dopo contatto con il sangue. Abbiamo precedentemente sviluppato dei costrutti di cDNAs murini codificanti per CTLA4-Ig e CD40-Ig che sono stati usati per generare dei recettori solubili in grado di inibire la risposta immunitaria murina. Effettueremo dei trapianti allo genico di insule pancreatiche e le insule microchimerizzate con le EPCs trasformate verranno analizzate. I costrutti per HGF ed eritropoietina sono disponibili in commercio. Le insule trasformate saranno testate in vitro ed in vivo dopo il trapianto per la vitalità e la funzionalità. In parallelo, le procedure per lo sviluppo in vivo del microchimerismo per generare degli "organoidi" di insule vascolarizzate sarà progettato nel seguente modo: a) valutazione di differenti gel di impianto sottocutanei contenenti EPCs ed insule. I due tipi cellulari saranno inclusi in placche di matrigel, collagene, acido ialuronico ad alta viscosità o una

formulazione iniettabile viscosa di acido ialuronico e bFGF e verranno iniettate sottocute nei topi; b) trasferimento genico di molecole inibitrici della risposta immunitaria sulle EPCs per valutare la protezione sulle insule. Le EPCs transfettate ed impiantate saranno testate per la loro capacità di creare una sorta di ambiente protetto e privilegiato dal punto di vista immunologico, senza bisogno di terapia farmacologia sistemica immunosoppressiva.

Attività formative

Per tutta la durata del programma è prevista la partecipazione a congressi e seminari mirati all'aggiornamento nel campo del trasferimento genico, oltre ad una intensa attività collaborativa con altri laboratori italiani ed esteri.

Risorse Professionali Impegnate

Il gruppo di ricerca di cui il candidato prescelto entrerà a far parte conta al momento 4 borsisti sotto il coordinamento del Dr. Galimi. Il laboratorio è attivamente impegnato in collaborazioni sia a livello locale che con istituzioni nazionali e internazionali, quali la Università di Torino e il Salk Institute di La Jolla (California, USA).

Risorse Finanziarie Impegnate

Il Laboratorio proponente è ben finanziato sia da fonti nazionali che internazionali, sia private che pubbliche, e dispone di tutte le attrezzature necessarie allo svolgimento delle attività formative proposte.

Il candidato beneficiario avrà accesso ai finanziamenti attivi presso il Laboratorio per lo svolgimento delle attività sperimentali previste e le attività collaterali (quali missioni, corsi esterni, etc.; v. oltre "Costi"). Non è previsto un cofinanziamento al presente Progetto di Inserimento Lavorativo; tuttavia, una integrazione stipendiale sui fondi di ricerca disponibili potrà essere considerata in relazione alla esperienza professionale del candidato prescelto, nel rispetto della normativa vigente.

Numero di borse per piano: 1

3. Piano di Inserimento Lavorativo

Titolo:

Ottimizzazione del trasferimento genico mediato da vettori lentivirali in tessuti primari umani.

Obiettivi Formativi e Professionali

Lo scopo del presente Programma è quello di contribuire a formare una figura professionale esperta nelle problematiche connesse al trasferimento genico.

Il trasferimento genico è una disciplina trasversale alle scienze biomediche, che di recente sta assumendo dignità autonoma grazie al gran numero di applicazioni in campo sperimentale, industriale e clinico. Nell'ambito delle metodiche di trasferimento genico, i vettori lentivirali sono tra i reagenti più versatili e promettenti. Il candidato beneficiario parteciperà a progetti di prim'ordine nell'area del trasferimento genico in ambito sperimentale preclinico, sia in campo ematologico che diabetologico.

Gli obiettivi formativi possono essere così riassunti:

- conoscenza dei principali sistemi di trasferimento genico con vettori virali difettivi;
- esperienza dettagliata nella progettazione, costruzione, e produzione di vettori lentivirali con struttura genomica di varia complessità;
- conoscenze di base nei principali campi di applicazione del trasferimento genico per usi clinici;
- esperienza in campo ematologico sperimentale, relativamente ai principali test in vitro e in vivo;
- approccio metodologico alla definizione di un progetto di terapia genica, con particolare riferimento alle limitazioni dei vettori disponibili e alle loro tossicità.

Le prospettive professionali aperte dalla acquisizione delle competenze riassunte in questo progetto sono ampie grazie alla diversificazione delle tecnologie coinvolte, che trovano sempre maggiore applicazione in campo sperimentale (biomedico e non solo), diagnostico, industriale. Le aree di sbocco professionale comprendono pertanto la ricerca di base, la pratica clinica, le società di servizi biotecnologici, etc.

Piano Analitico delle Attività Formative e Professionali

Il candidato beneficiario svolgerà le seguenti attività:

1. progettazione della struttura genomica di vettori lentivirali volti alla sovraespressione di geni in cellule eucariotiche, sia sotto il controllo di promotori costitutivi che inducibili;
2. progettazione della struttura genomica di vettori lentivirali volti al silenziamento genico in cellule eucariotiche, mediante la tecnologia della *RNA interference*;
3. produzione di vettori lentivirali ad alto titolo, e loro caratterizzazione in termini di efficienza e tossicità;

4. manipolazione di tessuti primari umani e murini in vitro, quali progenitori emopoietici, cellule endoteliali, insule pancreatiche;
5. ottimizzazione dei protocolli di trasduzione genica con vettori lentivirali;
6. partecipazione a congressi e attività collaborative nel campo della terapia genica.

Requisiti Professionali Richiesti

Requisiti professionali di entrata obbligatori a cui non viene attribuita nessuna valutazione: Diploma di laurea in Scienze Biologiche o Medicina e Chirurgia.

Elementi valutabili dall'Organismo Proponente sottoforma di griglia con un punteggio massimo attribuibile di 40 punti:

Il candidato ideale deve essere in possesso dei seguenti titoli e requisiti professionali:	Punteggio:
Esperienza lavorativa presso laboratori di trasferimento genico in ambito ematologico	15
Esperienza nel settore dei vettori genetici lentivirali e delle malattie genetiche in campo emato-oncologico (Anemia di Fanconi, Talassemia)	15
Ottima conoscenza della lingua inglese	5
Colloquio	5

Costi del Programma di Inserimento Lavorativo

Oltre allo stipendio biennale per il quale si richiede il finanziamento regionale, il Laboratorio metterà a disposizione del beneficiario fondi di ricerca approssimabili a €40'000 per anno, oltre all'uso delle attrezzature disponibili e alle risorse messe a disposizione dai gruppi collaboratori.

Partecipazione Finanziaria dell'Organismo Proponente

Non è previsto un cofinanziamento al presente Progetto di Inserimento Lavorativo.

Piano di Valorizzazione Professionale del Beneficiario

Il soggetto proponente si impegnerà a mettere a disposizione per il soggetto beneficiario un contratto di collaborazione nei 12 mesi successivi allo svolgimento del piano lavorativo. Durante questo periodo il beneficiario del piano, grazie all'esperienza acquisita, potrà ulteriormente approfondire le tematiche svolte nel precedente biennio.

Durata del Piano di Inserimento Lavorativo: 24 mesi