



Consiglio Nazionale
delle Ricerche
CNR

Istituto di Biologia Cellulare e Neurobiologia
Institute of Cell Biology and Neurobiology
IBCN

Oggetto: Gene therapy for Ataxia Telangiectasia syndrome (ANAT 2019)

Per il progetto di cui in oggetto l'attività svolta fino ad oggi è la seguente:

1 Disegno e costruzione del plasmide lentivirale contenente ATM.

Poiché il lentivirus contenente ATM che dovevamo acquistare dalla Applied Biological Materials Inc. (LV499293) è stato messo fuori stock abbiamo proceduto a sviluppare due strategie per la costruzione del costruito lentivirale in collaborazione con il service EMBL-Monterotondo (Dr. Jim Sawitzke). In una prima fase abbiamo proceduto al reperimento e controllo dei plasmidi necessari per ottenere il virus pLenti-EF1s-smURPF-Atm-WPRE3.

1 per Atm (Flag-His-AtwtpcDNA3.1: ricevuto dal Dr. Yossi Shiloh, Lab of cancer genetics, Israele)

2 per EF1s, il plasmide backbone (pCDH-EF1s: # 72484, Addgene)

3 per smURFP (pLenti-smURFP, # 80349: Addgene)

4 per WPRE3 (pAAV-CW3SL-eGFP: # 61463 Addgene)

Abbiamo quindi recuperato e controllato i plasmidi di seconda generazione che serviranno per la produzione del virus in HEK293T.

-psPAX2 contenente i geni gag, pol e rev (psPAX2 #12260 Addgene)

-PMD2G contenente il gene env (PMD2G #12259 Addgene)

2 Produzione del plasmide lentivirale contenente ATM.

Inizialmente, è stata provata la strategia "Gibson Assembly" che impiega simultaneamente tre reazioni enzimatiche per modificare i frammenti di DNA da clonare prodotti attraverso amplificazione in PCR tali da avere delle estremità di circa 15-20 basi sovrapponibili, nel nostro caso smURFP, ATM e WPRE3. Nel dettaglio l'attività di una 5' esonucleasi rimuove la terminazione 5' ed espone le sequenze complementari per l'annealing dei frammenti di DNA. L'attività di una DNA polimerasi riempie la sequenza nelle regioni appaiate rimaste a filamento singolo ed infine una DNA ligasi lega covalentemente i frammenti di DNA adiacenti. Dopo una serie di tentativi utilizzando questa strategia, abbiamo optato per il clonaggio sequenziale dei vari frammenti che ci consentirà con maggiore probabilità di ottenere il costruito finale.

3 Settaggio delle condizioni di arricchimento e coltura delle cellule progenitrici CD117 positive. Le cellule sono state estratte dal midollo osseo di topi ATM KO e selezionate in modo ripetuto con il sistema di biglie magnetiche coniugate con l'anticorpo CD117. Su queste cellule sono stati anche condotti test di infezione con lentivirus di prova contenenti tag fluorescenti. In parallelo abbiamo identificato un kit per isolare le cellule progenitrici mediante "cell sorting" con lo scopo di ottenere una popolazione più selezionata e pura.

4 Caratterizzazione di animali ATM KO "longevi". In previsione di avere un miglioramento della sopravvivenza dei topi trapiantati con cellule in cui è stato trasferito il lentivirus con ATM, abbiamo iniziato a caratterizzare topi che sono sopravvissuti oltre la soglia media di 4 mesi di età. Al momento abbiamo avuto solo due femmine ATM KO che sono state sacrificate a 8 mesi di età. Abbiamo confermato mediante FACS il difetto di maturazione dei linfociti T (alterazione nei marker CD e TCRbeta) e degli ovociti, ma non è stata osservata formazione di timoma (tumore prevalente nel topo KO) bensì presenza in una delle due femmine di epatoma e splenomegalia.



Consiglio Nazionale
delle Ricerche
CNR

Istituto di Biologia Cellulare e Neurobiologia
Institute of Cell Biology and Neurobiology
IBCN

Il progetto ha sofferto dell'interruzione di tre mesi di attività di ricerca di laboratorio nel nostro ente (Marzo-Aprile-Maggio) a causa della pandemia da Covid-19. Tuttora (ma si prevede anche per i prossimi mesi) l'attività risulta rallentata e le entrate sono limitate a due/tre giorni a settimana, ciò rende complicato il coordinamento ed espletamento dell'attività sperimentale. Inoltre è stata necessaria per i mesi di smart working l'interruzione degli accoppiamenti degli animali fatto che sta rallentando la ripresa del lavoro. Per questi motivi si ritiene necessario chiedere una estensione del progetto di almeno sei mesi per poter finalizzare la parte di trapianto nei topi di cellule ingegnerizzate con ATM.

Roma 23/6/20

Manuela Pellegrini

Manuela Pellegrini, PhD
IBCN-CNR, Monterotondo
Via Ramarini 00015
Roma, Italia

cell: +39-3925619278
e-mail: manuela.pellegrini@cnr.it