

**DISEÑO DE VECTORES LENTIVIRALES REGULADOS  
FISIOLÓGICAMENTE PARA TERAPIA GÉNICA DEL SÍNDROME  
DE WISKOTT-ALDRICH**

**CECILIA ARIANA FRECHA PIETRAPERTOSA**

**GRANADA, 2007**



## ÍNDICE

<b>RESUMEN EN INGLÉS.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>11</b>
<b>1- TERAPIA GENICA: GENERALIDADES Y ENSAYOS ACTUALES.....</b>	<b>11</b>
.	
<b>2- CELULAS HEMATOPOYÉTICAS MULTIPOTENCIALES (HSCs).....</b>	<b>14</b>
2.a Generalidades.....	14
2.b HSCs como diana para terapia génica.....	16
2.c Transducción de HSCs.....	16
2.c.1 Multipotencialidad y transducción de HSCs.....	17
2.c.2 Transducción y mutagenicidad en HSCs. ....	18
.	
<b>3- VECTORES LENTIVIRALES.....</b>	<b>19</b>
3.a Generalidades.....	19
3.b Seguridad biológica.....	20
3.b.1 Recombinación con virus infectivos.....	21
3.b.2 Transformación celular.....	21
3.b.3 Efecto del transgén en el paciente.....	22
3.b.3.a Expresión ectópica .....	22
3.b.3.b Sobre-expresión.....	23
3.b.3.c Inmunogenicidad.....	23
<b>4. MODIFICACIONES PARA INCREMENTAR LA SEGURIDAD BIOLÓGICA</b>	
4.a Modificaciones del genoma (backbone) del vector .....	24
4.a.1 Vectores lentivirales de tercera generación.....	24
4.a.2 Aisladores y sitios de poliadenilación alternativos.....	25
4.b Modificaciones de la envuelta (redirección del tropismo). ....	26
4.c Modificaciones del promotor (redirección de la transcripción). ....	26
.	
<b>5- SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH: MODELO DE TERAPIA GÉNICA.....</b>	<b>27</b>
5.1 Regulación transcripcional de la expresión de WASp.....	28

5.2 Mecanismo de acción de WASp.....	29
5.3 Modelos experimentales para la terapia génica de WAS .....	30
<b>6- OPTIMIZACIÓN DE VECTORES PARA LA TERAPIA GÉNICA DE WAS.....</b>	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>33</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
Plásmidos.....	36
Producción de vectores.....	36
Aislamiento y transducción de HSCs humanas.....	37
Método de diferenciación de HSCs <i>in vitro</i> .....	37
Método de diferenciación <i>in vivo</i> : reconstitución del modelo murino RAG2 <sup>-/-</sup> , $\gamma$ C <sup>-/-</sup> .....	38
Inmunofenotipo.....	39
SDS/PAGE, Western Blot y procedimientos de cuantificación.....	39
Preparación de DNA y PCR a Tiempo Real.....	39
Líneas celulares y medios de cultivo.....	40
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
<b>1- COMPORTAMIENTO DE LOS VL-WAS EN LÍNEAS CELULARES...42</b>	
1.a Los vectores VL-WAS expresando eGFP mantienen la especificidad hematopoyética.....	42
1.b La especificidad de VL-WAS se ve alterada por la presencia del elemento WPRE. ....	44
1.c Expresión deficiente en líneas celulares mieloides.....	45
<b>2- COMPORTAMIENTO DE VL-WAS EN CÉLULAS CD34+ Y EN SU PROGENIE TRAS DIFERENCIACIÓN <i>IN VITRO</i>.....47</b>	
2.a Transducción eficiente y estable de células CD34+ .....	47
2.b La expresión de eGFP mediante VL-WAS disminuye marcadamente al producirse la diferenciación mioide.....	49

2.c	La expresión del transgén mediante VL-WAS disminuye tras la diferenciación de células CD34+ a macrófagos y células eritroides, pero no a granulocitos.....	50
2.d	El VL-WAS presenta un patrón de expresión fisiológico en granulocitos .....	52
<b>3- COMPORTAMIENTO DE VL-WAS EN CÉLULAS CD34+ Y EN SU PROGENIE TRAS DIFERENCIACIÓN IN VIVO.....</b>		<b>54</b>
3.a	Los vectores LV-WAS mantienen la expresión en el linaje linfóide y granulocitos, mientras que presenta niveles reducidos en macrófagos y eritrocitos.....	55
<b>4- MEJORA DE VL-WAS MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE NUEVAS SECUENCIAS REGULADORAS .....</b>		<b>59</b>
4.a	Efecto de la incorporación de diferentes fragmentos del promotor alternativo de WAS en la especificidad hematopoyética de los vectores LV-WAS.....	59
4.b	Vectores LV-WAS incorporando un fragmento de 386pb del promotor alternativo (AWE) mejora la expresión de eGFP en líneas celulares mieloides.....	60
4.c	El vector AWE aumenta la estabilidad de la expresión tras la diferenciación a células eritroides y macrófagos.....	61
<b>CONCLUSIONES.....</b>		<b>63</b>
<b>CONCLUSIONS.....</b>		<b>65</b>
<b>DISCUSION.....</b>		<b>67</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>		<b>72</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>		<b>75</b>

## RESUMEN EN INGLÉS

The genetic treatment of inherited diseases has augmented greatly over the last years. The advance in the knowledge of haematopoietic stem cell biology, optimization of stem cell culture conditions and particularly the development of efficient lentiviral vectors have widen the spectrum of candidate diseases. The haematopoietic stem cells (HSCs) have become easy to modify by lentiviral vectors and represent the ideal target for achieving the restoration of the entire haematopoietic system (Eckfeldt, Mendenhall et al. 2005). They retain the capacity of self-renewal and differentiation potential to the lymphoid and myeloid lineage (Cavazzana-Calvo, Hacein-Bey et al. 2000; Aiuti, Slavin et al. 2002; Ott, Schmidt et al. 2006). However, several genes related to HSC multipotency have been identified as oncogenes, and particularly LMO-2 oncogene has been related to the development of leukaemia in a X-SCID gene therapy clinical trial. In view of the clinical use of lentiviral vectors, several levels of biosafety need to be considered to avoid secondary effects due to vector and/or the therapeutic transgene. The generation of self-inactivated lentiviral vectors will reduce the possible tumorigenic effect depending on the site of insertion. The introduction of insulator sequences flanking the expression cassette can make the vector independent of the chromosomal environment, and the presence of strong polyadenylation signals gives a higher level of biosafety by making the end of the transcription more efficient. On the other hand, lentiviral vector-encoded therapeutic transgene can be associated with side effects due to ectopic expression, over-expression in the target cells and, rarely, to immunity. The use of tissue-specific or inducible promoters allows controlled expression in the right cells, reducing the risk of toxic or unknown effects of ectopic expression. Finally, an accurate strategy for achieving a physiologic expression is the design of lentiviral vectors carrying sequences of the endogenous promoter.

The Wiskott-Aldrich Syndrome is a X-Linked immunodeficiency caused by heterogeneous mutations within the *WAS* gene (Derry, Ochs et al. 1994; Greer, Shehabeldin et al. 1996; Wada, Jagadeesh et al. 2002) that lead to the partial or complete absence its encoded product (WASp)(Shcherbina, Rosen et al. 1999; Imai, Morio et al. 2004). The clinical manifestations also include eczema

and microthrombocytopenia (Thrasher 2002; Badour, Zhang et al. 2003; Dupuis-Girod, Medioni et al. 2003; Notarangelo and Ochs 2003)d. WASp expression is restricted to the haematopoietic lineage (Derry, Ochs et al. 1994; Stewart, Treiber-Held et al. 1996; Parolini, Berardelli et al. 1997), so its absence affects all the haematopoietic system. T cells from WAS patients are unable to respond to TCR mediated activation (Gallego, Santamaria et al. 1997; Dupre, Aiuti et al. 2002). Macrophages and dendritic cells cannot form podosomes in response to activating stimuli (Jones, Zicha et al. 2002; Calle, Jones et al. 2004) and platelets are seriously diminished in numbers and have also impaired function(Oda and Ochs 2000). WASp is also involved in the haemostasis and function of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells(Humblet-Baron, Sather et al. 2007; Maillard, Cotta-de-Almeida et al. 2007; Marangoni, Trifari et al. 2007), which provides a plausible explanation for the presence of autoimmune disorders. A successful therapy for WAS is bone marrow transplantation, but it carries the risk of rejection and it is not available in many cases(Filipovich, Stone et al. 2001). In this sense, gene therapy approaches are a real alternative for treating WAS patients.

Previous reports have shown deleterious effects due to WASp and WASp homologues over-expression(Devriendt, Kim et al. 2001; Marx 2006; Toscano, Frecha et al. 2007), and ectopic expression (Toscano, Frecha et al. 2007). Therefore, the design of gene therapy strategies for WAS treatment should involve vectors with the capacity to express the transgene in the right cells, and at the right levels.

We have previously designed a HIV-based, SIN-lentiviral vector (WW) (Martin, Toscano et al. 2005), carrying a 500-bp fragment of the endogenous WAS proximal promoter, upstream the full-length WAS cDNA. Transgene expression was restricted to haematopoietic cells (Martin, Toscano et al. 2005) and it completely restored the abnormal phenotype of T cell lines derived from WAS patients (Toscano, Frecha et al. 2004).

The expression profile of WASp is well documented in a wide variety of mature blood cells (Stewart, Treiber-Held et al. 1996; Parolini, Berardelli et al. 1997). However, little is known about WAS promoter regulation before and after haematopoietic differentiation.

The aim of this work is the development of a LV that mimics endogenous WASp expression.

Due to the low number of WAS patients, our system included umbilical-cord blood CD34+ cells obtained from healthy individuals and a LV driving the expression of eGFP gene through the 500bp WAS promoter (the WE vector). In order to monitor the performance of the inserted promoter and to look into its physiologic behaviour, we compared the vector-driven eGFP expression profile with the endogenous WASp expression profile, before and after haematopoiesis. We first checked if the introduction of the eGFP gene in place of the WAS cDNA altered its specificity for the haematopoietic lineage. We also investigated whether the WPRE element could influence on that specificity. We analyzed the performance of the WE vector in different haematopoietic cell lines and in primary CD34+ cells previous and after differentiation, both in vitro and in vivo.

We found that WE vector did conserve the haematopoietic-specificity, being the WPRE element a negative influence over that specificity. Therefore we eliminated the WPRE from our LVs. We also saw a preferential expression of WE vector in cell lines of lymphoid lineage. During haematopoiesis of primary cells, we found that WE vector did achieve physiologic transgene expression levels in lymphoid cells and in granulocytes but it had reduced activity in macrophages and erythroid cells. Therefore, we analyzed two optimized LVs, both including regulatory sequences from the alternative WAS promoter upstream the proximal WAS promoter fragment: cAWE carrying the complete alternative promoter, and AWE that contains a 386bp fragment of the same promoter. We first saw that the presence of the complete alternative promoter together with the proximal promoter (cAWE) resulted in a 2-fold loss of haematopoietic-specificity, while the short alternative fragment did not compromise it. Moreover, the AWE vector improved transgene expression in macrophages and erythroid cells, approaching endogenous levels. Therefore we conclude that 1) the WPRE element in the context of our LV-WAS exerts a negative effect over haematopoietic specificity; 2) the previously characterised lentiviral vector carrying the 500bp-fragment of the WAS proximal promoter is accurate for the expression has a weak side in erythrocytes and macrophages that could compromise the global efficiency of the therapy and 3) the

incorporation of regulatory sequences of the alternative *WAS* promoter lead to a lentiviral vector to with greater capacity to maintain transgene expression over differentiation in the less favoured cell types.

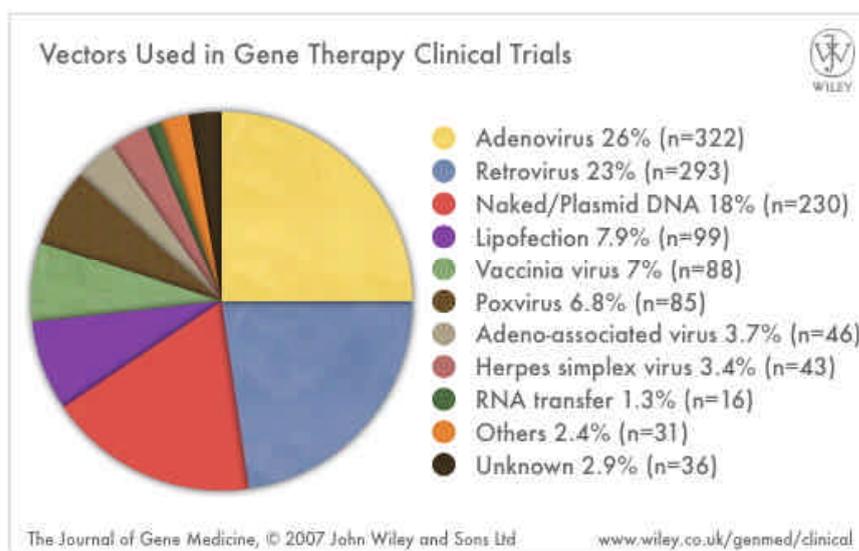
## INTRODUCCIÓN

## 1. TERAPIA GÉNICA: GENERALIDADES Y ENSAYOS ACTUALES

En la década del 70, Friedmann y Robin propusieron un método terapéutico novedoso que consistía en modificar el material genético de un individuo afectado por una patología, con el fin de curarla (Friedmann 1972). Hoy en día la terapia génica se entiende como la modificación genética de determinadas células o tejidos, con el fin de curar o aliviar enfermedades. Consta de tres partes fundamentales que son: las células diana, el transgén terapéutico y el vector de transferencia génica. La célula diana es aquella que se pretende modificar genéticamente pudiendo o no coincidir con la célula afectada por la patología. Por ejemplo, en el caso de terapias contra el cáncer o diabetes, se utilizan como células diana a linfocitos T o células dendríticas ((Morgan, Dudley et al. 2006). Por otra parte, en terapia génica de patologías primarias como las inmunodeficiencias, se modifica genéticamente a la célula afectada por la enfermedad, con el fin de revertir el fenotipo patológico. El vector de transferencia génica es la herramienta utilizada para introducir en la célula diana el material genético deseado. Dependiendo de la enfermedad y de la estrategia seguida, pueden utilizarse tanto, vectores virales (derivados de virus) como vectores no virales (Plank, Oberhauser et al. 1994; Plank, Anton et al. 2003; Plank, Scherer et al. 2003; Khoury, Bigey et al. 2006; Khoury, Louis-Pence et al. 2006; Potteaux, Deleuze et al. 2006). Aunque los vectores no virales son, en teoría, más seguros que los vectores virales, están todavía en fase de desarrollo y, para muchas aplicaciones de terapia génica son ineficientes. Por el momento, los vectores virales son los vectores de elección para la mayoría de las estrategias de terapia génica. Sin embargo, es importante mencionar que la utilización de vectores derivados de virus conlleva problemas de seguridad biológica (ver capítulo 3).

Al presente, se han iniciado más de 1200 ensayos clínicos, de ellos unos 200 se encuentran en fase II y 27 en fase III. La gran mayoría de los ensayos clínicos (850) están de avocados hacia el tratamiento del cáncer. Le siguen en orden decreciente las siguientes patologías: vasculares (116), enfermedades monogénicas (106), sida y otras infecciosas (81). Con respecto a los vectores, los retrovirus y adenovirus han sido los más exitosos, habiéndose utilizado en

un 50% de los ensayos (25% cada vector), mientras que los demás vectores virales, Poxvirus, Vaccinia, Herpesvirus, y AAV se han utilizado en un 6,8%, 3,4%, 7% y 3.7% respectivamente. Los liposomas y el ADN desnudo son de los vectores no virales los más eficientes, y se han utilizado en el 7,9% y el 18% de los pacientes respectivamente (Base de datos de la revista J Gene Medicine: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical/> y figura 1) En el año 2000 se obtuvo el primer éxito en terapia génica, al lograrse la reconstitución de un sistema inmune sano en tres niños con inmunodeficiencia combinada severa (X-SCID)(Hacein-Bey-Abina, Fischer et al. 2002; Hacein-Bey-Abina, Le Deist et al. 2002; Cavazzana-Calvo and Fischer 2004). Desde entonces esta estrategia ha cosechado varios éxitos no solo en esta enfermedad, sino también en otras inmunodeficiencias primarias como ADA(Aiuti, Slavin et al. 2002; Charrier, Dupre et al. 2007) y enfermedad granulomatosa crónica(Ott, Schmidt et al. 2006). No obstante, en el caso de Francia se han detectado efectos secundarios asociados al vector (Cavazzana-Calvo and Hacein-Bey-Abina 2001), que han revolucionado el campo de la terapia génica, tal y como se explicará más adelante.



**Fig1.** Vectores utilizados en ensayos clínicos. Los retrovirus son los segundos en utilización. Los lentivirus se encuentran dentro del grupo de “Others” y actualmente hay 8 ensayos clínicos que se basan en su utilización. Datos actualizados de la revista “The Journal of gene medicine”.

## **2 CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS MULTIPOTENCIALES (HSCs)**

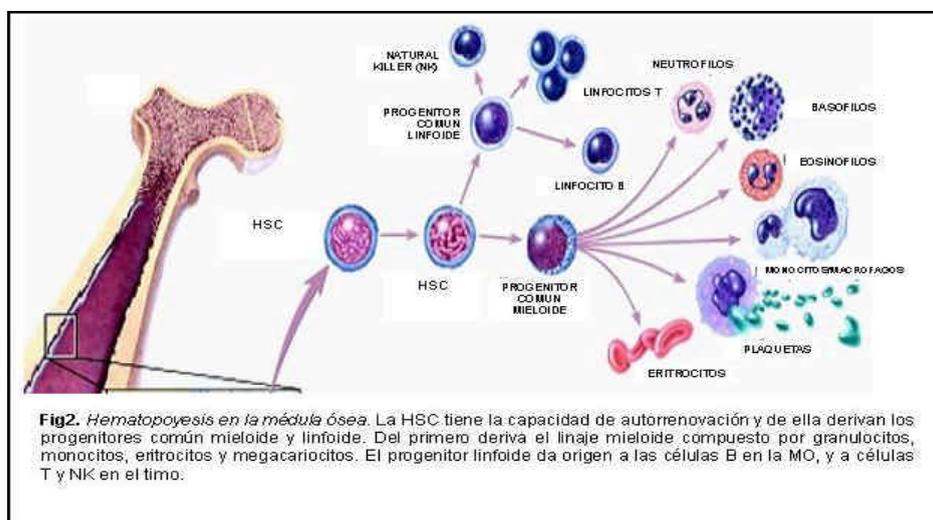
### **2.A Generalidades**

Terapia génica y células “madre”, son términos que con el paso de los años se han asociado cada vez más, debido, por un lado, a las características que presentan estas células, y por otro, a la optimización de los métodos para ser modificadas por los vectores. El nicho natural de las HSCs en el adulto es la médula ósea, y allí se asegura la autorrenovación y el control de la diferenciación. Uno de los mecanismos propuestos involucra a los osteoblastos (Calvi, Adams et al. 2003), y otras células de sostén (Karanu, Murdoch et al. 2000) los cuales expresan el ligando Notch, que contribuye a la autorrenovación (Kumano, Chiba et al. 2001). Además de en médula ósea, las HSCs están presentes en pequeñas cantidades en sangre periférica aunque su concentración puede incrementarse mediante el uso de GM-SCF para su utilización clínica. Aparte de médula ósea y sangre movilizada con GM-SCF, las HSCs se pueden obtener de una manera bastante sencilla y no agresiva de sangre de cordón umbilical. Esto ha permitido su uso generalizado tanto en estudios básicos como clínicos.

Las HSCs de UCB en comparación con las de médula ósea se encuentran en mayor proporción (Broxmeyer, Douglas et al. 1989; Broxmeyer, Hangoc et al. 1992; Broxmeyer and Cooper 1997; Mayani and Lansdorp 1998) y presentan una menor densidad de antígenos HLA (Leung, Ramirez et al. 1998), lo cual reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad del injerto contra el hospedador (GVHD) y el rechazo. Esto incrementa la utilidad de dicho tejido en trasplantes entre individuos no relacionados, siendo material de elección (Kurtzberg, Laughlin et al. 1996; Gluckman, Rocha et al. 1997; Barker, Davies et al. 2001; Rocha, Cornish et al. 2001; Wagner, Barker et al. 2002). Hoy existen unas 100.000 unidades de UCBs en todo el mundo, y se han realizado ya 20.000 trasplantes de células de cordón umbilical (Barker and Wagner 2003).

Las células HSCs dan origen, como su nombre lo indica, a todo el linaje hematopoyético. A su vez, la HSC deriva de un progenitor más ancestral, denominado hemangioblasto, que da origen a las HSCs y a su vez a los progenitores endoteliales, las EPCs, de los cuales derivan las células formadoras de vasos sanguíneos.

Las células HSCs tienen tres destinos posibles: autorrenovación, diferenciación y apoptosis. Del balance de los genes que controlan estos procesos queda determinado el número de HSCs de un individuo en un momento dado. La división ocurre de manera asimétrica, dando una célula idéntica a la célula madre y otra que se diferenciará a progenitores cada vez más diferenciados dividiéndose sucesivamente hasta formar las células de la sangre, incluyendo los linajes linfóide y mieloide. En la figura 2 se esquematiza la vía de diferenciación hematopoyética. De la HSC deriva, un progenitor común linfóide (Kondo, Weissman et al. 1997) que dará origen a células B, T y NK, y un progenitor común mieloide (Akashi, Traver et al. 2000; Kondo, Scherer et al. 2000), que da origen a granulocitos, monocitos, eritrocitos y megacariocitos (del cual derivan las plaquetas). El progenitor CFU-GEMM, es menos primitivo y tiene capacidad de generar granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos. A su vez el progenitor CFU-GEMM se diferencia a progenitores CFU-GM, el cual ha perdido capacidad de dar eritrocitos y plaquetas, pero del cual derivan CFU-G y CFU-M que conservan sólo la potencialidad de generar granulocitos y monocitos, respectivamente. De la misma manera, los progenitores CFU-E y CFU-K tienen la capacidad de generar únicamente eritrocitos y megacariocitos (Akashi, Traver et al. 2000). La generación de linfocitos B se lleva a cabo también en médula ósea a partir del progenitor común linfóide. En el timo, el progenitor común linfóide se diferenciará a linfocitos T y células natural killer (NK), siguiendo la ruta ontogénica que involucra los procesos de selección positiva y negativa, que conducen a la liberación de linfocitos naive al torrente sanguíneo.



**Fig2. Hematopoyesis en la médula ósea.** La HSC tiene la capacidad de autorrenovación y de ella derivan los progenitores común mieloide y linfóide. Del primero deriva el linaje mieloide compuesto por granulocitos, monocitos, eritrocitos y megacariocitos. El progenitor linfóide da origen a las células B en la MO, y a células T y NK en el timo.

## **2.B HSCs como diana para terapia génica.**

Las células hematopoyéticas pluripotenciales humanas son consideradas la mejor diana a la que puede ir dirigida la terapia génica de desordenes hematopoyéticos. Al presente la práctica totalidad de las patologías sujetas a terapia génica cuyo defecto se encuentra en células hematopoyéticas se basan en la modificación terapéutica de las HSCs. De los ensayos clínicos al presente el 40% están utilizando HSCs. La gran ventaja de su utilización se debe a que, en teoría, modificando una sola célula HSC se podría lograr la reconstitución completa del sistema hematopoyético. Si bien hoy en día no se ha encontrado el marcador que defina a la población más indiferenciada de HSCs, está aceptado que CD34, una proteína de superficie implicada en la regulación de la adhesión celular, define a una población altamente enriquecida por HSCs (Fehse, Richters et al. 2000).

Las células CD34<sup>+</sup> más indiferenciadas no se encuentran en estado de división activa. Esta característica las había hecho hasta hace algunos años, extremadamente difíciles de transducir por vectores retrovirales (basados en el virus de leucemia murina (MLV)) que requieren división celular para su integración en el cromosoma (Miller, Adam et al. 1990; Roe, Reynolds et al. 1993). En este sentido, el advenimiento de los vectores lentivirales, capaces de transducir eficientemente células que no se dividen, ha permitido superar esta restricción (Weinberg, Matthews et al. 1991; Lewis, Hensel et al. 1992) y conseguido transducir una variedad de células primarias como retinocitos, células neuronales, progenitores y células hematopoyéticas tanto in vivo como in vitro (Vigna and Naldini 2000; Micucci, Zingoni et al. 2006). Sin embargo no transducen eficientemente linfocitos T en reposo (Dardalhon, Herpers et al. 2001; Verhoeyen, Dardalhon et al. 2003), monocitos (Kootstra, Zwart et al. 2000; Neil, Martin et al. 2001) o la población más indiferenciada de células HSCs (Sutton, Reitsma et al. 1999), probablemente por un bloqueo en la replicación posterior a la entrada del virus ( Revisado en (Verhoeyen and Cosset 2004)

## **2.C Transducción de HSCs**

En las estrategias de terapia génica donde se busca la modificación génica de las células HSCs para la expresión del gen terapéutico en todo el linaje

hematopoyético, los únicos vectores utilizados son los vectores integrativos (retrovirales). Los vectores retrovirales (oncoretrovirales y lentivirales) son los únicos capaces de modificar estas células eficientemente y de integrar su material genético en el cromosoma de las mismas. Esto supone a su vez un reto, tanto desde el punto de vista del mantenimiento del fenotipo multipotencial, como desde el punto de vista de las implicaciones que la integraciones del vector pudieran tener para las HSCs.

### **2.C.1 Multipotencialidad y transducción de HSCs**

Como ya se ha mencionado las células CD34<sup>+</sup> más indiferenciadas son quiescentes, es decir, se encuentran en fase G0 del ciclo celular (Zack 1995; Korin and Zack 1998). Si bien los vectores lentivirales no dependen del estado de división de la célula para infectarla, la eficiencia de transducción está ligada al estadio del ciclo celular según M>G1>G0 (Chinnasamy, Chinnasamy et al. 2000). Por ello, para asegurar una alta eficiencia de transducción por vectores lentivirales, es necesaria la estimulación exógena de las CD34<sup>+</sup>, previo o durante el contacto con los vectores (Kiem, Andrews et al. 1998; Kurre, Morris et al. 2001; Amsellem, Ravet et al. 2002). Sin embargo, al contrario que con los vectores oncoretrovirales (que necesitan promover la división celular), solo se necesita hacer que las células HSCs entren en fase.

Sin embargo, la estimulación exógena descontrolada pone en peligro la eficiencia de las HSCs, ya que conduce a la apoptosis, pérdida de las propiedades de *engraftment* y migración asociadas al ciclo celular y susceptibilidad al rechazo mediado por células NK (Kiem, Andrews et al. 1998; Glimm and Eaves 1999; Berrios, Dooner et al. 2001; Kurre, Morris et al. 2001; Amsellem, Ravet et al. 2002; Jetmore, Plett et al. 2002; Verfaillie 2002) En este sentido, es de crucial importancia el desarrollo de protocolos de transducción que mantengan las propiedades de las HSCs: medios libres de suero (Glimm, Flugge et al. 1998), mínima presencia de citoquinas (Zandstra, Lauffenburger et al. 2000), incorporación de factores de transcripción como HOXB4 al medio de cultivo (Antonchuk, Sauvageau et al. 2002), introducción de componentes de la matriz extracelular al cultivo (Moritz, Patel et al. 1994; Donahue, Sorrentino et al. 2001) o protocolos que permitan el retorno al estado G0 previo a la re-implantación de las HSCs (Takatoku, Sellers et al. 2001; Dao, Arevalo et al. 2003).

Incluso se están desarrollando avances en la optimización de vectores para transducción de HSCs sin necesidad de esitimulación alguna (Buchschacher and Wong-Staal 2000; Kay, Glorioso et al. 2001; Ailles, Schmidt et al. 2002; Verhoeven, Wiznerowicz et al. 2005).

### **2.C.2 Transducción y mutagenicidad en HSCs.**

En general durante los procesos de diferenciación de las células pluripotenciales, la reorganización de la eucromatina en heterocromatina parece ser un proceso bastante estable durante el cual se determinará qué regiones del genoma estarán inactivas o silenciadas para el resto de la vida de esa célula y de su progenie. Por el contrario, las zonas eucromáticas seguirán accesibles, y serán las que determinen el fenotipo de la célula. Por medio de estudios de microarrays y de hibridación substractiva, comparando la expresión de un gran número de genes en células embrionarias, HSCs y maduras, se han podido establecer conjuntos, o *clusters* de indiferenciación (Sperger, Chen et al. 2003; Eckfeldt, Mendenhall et al. 2005). Además, las células stem se encontrarían expresando continuamente un gran número de genes (30-60% de su genoma), a niveles basales, (Abeyta, Clark et al. 2004), de los cuales muchos son proto-oncogenes, genes relacionados con el ciclo celular y mecanismos anti-apoptóticos. Esto es relevante cuando se utilizan dichas células como diana de acción utilizando vectores integrativos, como es el caso de la terapia génica de inmunodeficiencias primarias. En este caso los vectores, que se integran preferentemente en zonas activas del cromosoma, encuentran un entorno mucho más favorable para la integración en zonas potencialmente peligrosas debido al efecto que podría tener en transformación celular. De hecho, muchos de los genes específicos de HSCs ya habían sido descritos con anterioridad por estar relacionados con aberraciones cromosómicas en tumores hematopoyéticos (Eckfeldt, Mendenhall et al. 2005). Un triste y claro ejemplo del posible efecto de la integración de los vectores retrovirales en células HSCs lo ofreció el primer ensayo clínico exitoso de terapia génica contra el SCID. La inserción retroviral provocó la desregulación del gen LMO2 (Royer-Pokora, Loos et al. 1991) en células HSCs de tres pacientes, produciendo el desarrollo de tumores como efecto secundario al tratamiento (ver capítulo 3). Por el contrario, no se ha observado que una

sobreexpresión de Notch-1 derive en un fenotipo tumoral (Varnum-Finney, Wu et al. 2000; Varnum-Finney, Xu et al. 2000). Es por tanto de crucial importancia la optimización de los vectores integrativos en busca de alcanzar una alta eficiencia de transducción sin alterar la expresión de genes que regulan las rutas fisiológicas de las HSCs, y que en el peor de los casos podrían derivar en proliferación tumoral.

### **3. VECTORES LENTIVIRALES**

#### **3.A Generalidades.**

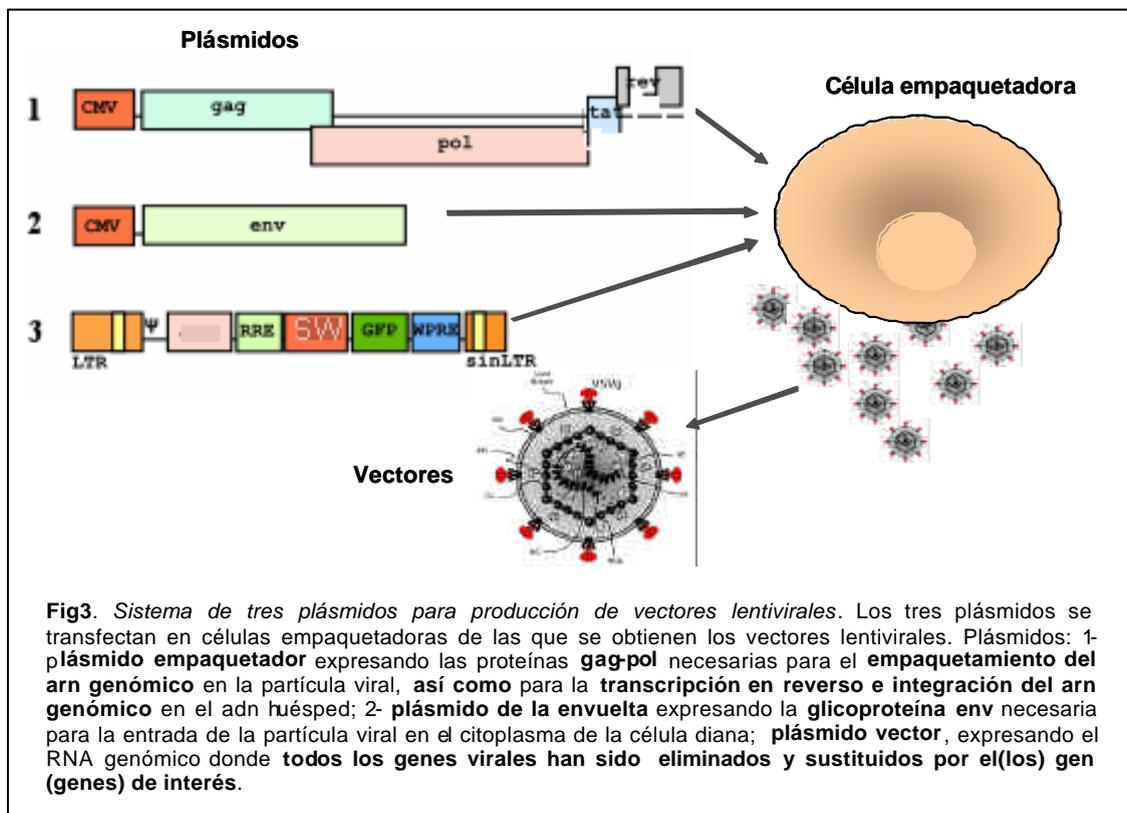
El vector que más se ha utilizado en ensayos clínicos fue derivado del moloney leukaemia virus (MLV), el cual transduce y se integra eficientemente en una amplia gama de células humanas. Sin embargo, es incapaz de transducir células que no se encuentran en estado de división activa, como por ejemplo los linfocitos T en estado de reposo (resting) y las HSCs, entre muchos otros. El advenimiento de los vectores lentivirales ha superado esta restricción, puesto que son independientes del estado de división de la célula que infectan (Hirsch and Lifson 2000). Los vectores lentivirales, basados en HIV-1 están desprovistos de todas las secuencias codificantes conservándose únicamente, las secuencias del ARN viral necesarias para la transcripción en reverso, la integración y el encapsidamiento del ARN genómico. Todas las proteínas necesarias para la decapsidación, retrotranscripción e integración son aportadas “en trans”, en un plásmido independiente (Naldini, Blomer et al. 1996); Figura 3 ). Una de las grandes ventajas del uso de los retrovirus como vectores es que aceptan una amplia gama de proteínas de envuelta de virus no relacionados (conocido como “pseudotipaje” ((Weiss 1993). Esto permite dirigir el tropismo (los tipos celulares capaz de ser modificados) del vector mediante la utilización de diferentes envueltas. La mayor parte de los sistemas lentivirales utilizan la glicoproteína del virus de la estomatitis vesicular, o VSVg, la cual presenta un amplio tropismo, y permite de esta manera hacer a una gran cantidad de células susceptibles de ser transducidas (Naldini, Blomer et al. 1996). La combinación de la proteína VSVg como envuelta en un sistema lentiviral a logrado un éxito sin precedentes en el mundo de la vectorología. De hecho se ha modificado genéticamente la práctica totalidad de las células diana

que se han probado, tanto *in vitro* como *in vivo*. Esto ha permitido un gran número de éxitos en modelos animales de diferentes enfermedades, que están buscando el paso a clínica en un futuro cercano.

Hasta el momento 8 ensayos clínicos están utilizando vectores lentivirales, de los cuales 5 están dirigidos hacia la terapia de la infección por HIV, 2 al cáncer y 1 a una enfermedad monogénica, la MPS VII (Base de datos de la revista J Gene Medicine: <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>). Sin embargo, la aplicación generalizada de los vectores lentivirales en clínica tiene que venir de la mano de un incremento de los niveles de seguridad biológica y/o un estudio pormenorizado de los riesgos de seguridad biológica que la aplicación de los mismos conlleva.

### 3.B Seguridad biológica

El término seguridad biológica es tanto amplio como interesante, y a la vez crítico para la aplicación de la terapia génica en clínica. En lo que respecta a los vectores lentivirales existen tres preocupaciones principales, la



recombinación con virus infectivos, la transformación celular y los efectos que la expresión del gen terapéutico.

### **3.B.1 Recombinación con virus infectivos, movilización.**

El proceso denominado movilización se refiere a la diseminación del RNA de un vector como consecuencia de haber sido empaquetado accidentalmente por la maquinaria de otro virus presente en el organismo. Para que se produzca la movilización de un vector lentiviral el individuo debería estar infectado con el virus HIV-1 salvaje al recibir la terapia génica siempre y cuando el vector utilizado pudiera transcribir la señal de empaquetamiento. Este fenómeno podría ser relevante en los vectores basados en HIV-1 que expresaran un transgén tóxico ya que éste podría movilizarse de la célula diana a otra y causar un efecto deletéreo. Otra posible consecuencia de la movilización podría ser la creación de un nuevo virus resultante de la recombinación entre secuencias del virus salvaje y secuencias del vector. Sin embargo, las probabilidades de que los recombinantes posean una ventaja de crecimiento por sobre los virus salvajes es muy baja dado que los vectores lentivirales conservan apenas unas pocas secuencias del HIV-1. En cualquier caso, para intentar minimizar este problema se utilizan vectores que no expresen la señal de empaquetamiento, necesaria para la incorporación del RNA viral dentro de la partícula, en las células diana (vectores auto-inactivados) (Buchsacher and Wong-Staal 2000; Ailles and Naldini 2002)

### **3.B.2 Transformación celular**

Tal y como se ha descrito en los capítulos anteriores, la modificación génica de las células HSCs con vectores retrovirales, conlleva un riesgo elevado de inserción en zonas cercanas a oncogenes, debido al perfil de expresión de las células stem. Esto se puso especialmente en evidencia durante el ensayo clínico de Caravazza-Calvo en niños SCID, donde se han desarrollado tres leucemias debido a la integración del vector en regiones cercanas al oncogen LMO2 (Hacein-Bey-Abina, Le Deist et al. 2002; Hacein-Bey-Abina, Von Kalle et al. 2003). Desde ese momento, se ha abierto enormemente el campo de investigación en seguridad biológica, y particularmente en mutagénesis

inercial. Se ha hecho especial énfasis en la utilización de vectores lentivirales, en la incorporación de secuencias aisladoras de la actividad promotora, presencia de señales de terminación más eficientes y modificaciones de la envuelta (véase capítulo 4).

### **3.B.3 Efecto del transgén en el paciente**

Cualquier estrategia de terapia génica persigue, bien la expresión de novo de un transgen o bien la sobreexpresión de uno ya existente en el paciente. En ambos casos, se produce una alteración del estado “normal” del paciente que tiene una serie de implicaciones de seguridad biológica. En TG de inmunodeficiencias, la expresión del transgen es de novo, es decir, el organismo nunca había visto antes la proteína sintetizada debido al vector. En este caso existen varias posibilidades que hay que estudiar en detalle: - Efectos de la expresión ectópica del transgen (o la expresión del vector en células que naturalmente no la expresan), - Efectos de la sobre expresión del transgén terapéutico en células diana y - La respuesta inmune contra el transgén y/o las células modificadas.

#### **3.B.3.a Expresión ectópica**

La expresión ectópica, es decir, la expresión del transgén en tejidos donde normalmente no se expresa, es fácilmente imaginable en una estrategia de terapia génica *in vivo*, es decir, la introducción de vectores virales en el individuo afectado, ya sea por vía parenteral, intramuscular o aérea. Sin embargo la expresión ectópica no es un problema exclusivo de la terapia génica *in vivo*. En estrategias de terapia génica *ex vivo*, consistente en extraer células adultas (por ejemplo CD34<sup>+</sup>) del tejido afectado y una vez transducidas, reinfundirlas al paciente, también existe riesgo de expresión ectópica. Esto es así porque no existe actualmente ningún marcador o conjunto de marcadores que defina con un 100% a la población HSC. Por ejemplo, si las células diana han sido purificadas para CD34<sup>+</sup>, contendrán también hemangioblastos (que posee la potencialidad de dar origen no solo a las células HSCs sino también a los progenitores endoteliales y probablemente a otros tipos (Murga, Yao et al. 2004; Jaffredo, Nottingham et al. 2005). De la misma forma otro tipo de selecciones, como por ejemplo las basadas en la ausencia de marcadores de

diferenciación (Lin-) pueden convertirse en tipos celulares distintos al hematopoyético (Lagasse, Connors et al. 2000; Orkin and Zon 2002; Vassilopoulos, Wang et al. 2003)

### **3.B.3.b Sobre-expresión del transgén terapéutico**

El transgén terapéutico, al igual que los fármacos, es eficaz dentro de un rango de dosis, lo que se conoce como ventana terapéutica. Por encima de estos límites existe el riesgo de desarrollar efectos secundarios, ya sea por toxicidad directa del transgén en la célula diana, o indirectamente por la alteración de rutas celulares no relacionados con la actividad terapéutica y que derivan en efectos no deseados (Baum, Dullmann et al. 2003). Por ejemplo, el gen HOXB4 puede ser utilizado como estrategia para la expansión de las HSCs, pero se observó que la sobre-expresión está relacionada con una diferenciación anormal de las HSCs, una reducida producción del linaje mieloide y linfoide (Buske, Feuring-Buske et al. 2002; Rideout, Hochedlinger et al. 2002) y un aumento de la transformación tumoral (Krosl, Baban et al. 1998). Por el contrario, una expresión insuficiente del transgén CD40L en un ensayo de terapia génica de la Hiper IgM provocó una proliferación anormal de linfocitos T, debido a una interferencia durante los procesos de selección en el timo (Brown, Topham et al. 1998).

### **3.B.3.c Inmunogenicidad del vector, transgen o de las células modificadas genéticamente**

En la terapia génica existe el riesgo de que se desarrolle una respuesta inmune frente a componentes del vector y/o al transgén expresado por las células modificadas. En estrategias ex vivo, donde se infunden HSCs modificadas, es importante tener en cuenta que las células podrían estar contaminadas con proteínas del medio de cultivo o incluso vectores que podrían disparar una respuesta inmune (Balague, Zhou et al. 2000). Por ejemplo, hay una amplia evidencia de que los componentes estructurales asociados a vectores adenovirales son inmunogénicos per se, representando un riesgo real en el paciente, sobre todo en estrategia de terapia génica in vivo. En cambio, en caso de los vectores retrovirales y/o lentivirales no se observó inmunogenicidad alguna.

En cuanto al transgén, éste puede presentarse en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo I y/o II, dependiendo del tipo celular. En el caso de las HSCs, se presentará el antígeno procesado por vía endocítica a través del MHCI, y las células podrán ser eliminadas por linfocitos T citotóxicos del hospedador a través de diversos mecanismos (Bradley, Bolton et al. 2002). Se han observado respuestas inmunes frente a transgenes artificiales o xenogéneos, como cuando se utilizan marcadores de selección o en caso de la eGFP particularmente. En primates, se desarrollaron respuestas de ataque a dicho transgén y uno de los animales desarrolló un cuadro de anemia hemolítica asociada (Rosenzweig, Connole et al. 2001). En los casos de terapia génica de desórdenes hereditarios también puede desarrollarse una respuesta inmune frente a las células modificadas puesto que el transgén nunca antes había sido visto por el receptor.

Si bien la médula ósea del donante podría promover tolerancia a un antígeno en particular o a múltiples antígenos (Heim, Hanazono et al. 2000; Kang, Giri et al. 2001) es importante investigar esta probabilidad en regímenes no mieloablativos. También es cierto que la infusión de HSCs se relaciona con una tolerancia central a antígenos del donante, incluido el transgén terapéutico, ya que parte de las células dendríticas “nodrizas” del timo pertenecerán también al donante. En este timo mosaico se eliminarán por selección negativa los linfocitos T del receptor que reconozcan antígenos del donante (Tomita, Khan et al. 1994) La reconstitución tímica con células del donante parece ser crucial para asegurar el éxito del trasplante (Bradley, Bolton et al. 2002) y por consiguiente la permanencia del transgén en el organismo.

#### **4. MODIFICACIONES PARA INCREMENTAR LA SEGURIDAD BIOLÓGICA**

##### **4.A MODIFICACIONES EN EL GENOMA (BACKBONE) DEL VECTOR**

###### **4.A.1 Vectores lentivirales de tercera generación**

Los vectores integrativos, como los oncorretrovirales o los lentivirales, requieren de una cromatina “accesible” para integrarse. De ahí, que la integración no sea simplemente al azar como se sostenía hace algunos años sino que es parcialmente al azar, teniendo preferencia por los sitios

transcripcionalmente más activos, y las zonas cromosómicas con mayor densidad de genes (Muller and Varmus 1994; Schroder, Shinn et al. 2002)

El hecho de que las LTR del vector, indispensables para la integración, sean fuertes zonas promotoras y/o enhancers lleva aparejado el riesgo de “encender” genes que estuvieran 5´ o incluso 3´ del sitio de la integración. Esta actividad enhancer de los LTR podría, en el peor de los casos, activar oncogenes, conllevando a la transformación celular. Los vectores lentivirales de tercera generación, o autoinactivables (vectores SIN) (Buchsacher and Wong-Staal 2000; Ailles and Naldini 2002) poseen una gran delección en el LTR 3´ del vector la cual anula prácticamente la actividad promotora de la misma. Al presente la totalidad de los vectores lentivirales de terapia génica son vectores SIN. Por otro lado, se han desarrollado nuevas técnicas para el estudio de macro regiones del genoma, dirigidos a la caza de sitios potencialmente peligrosos, y de detección precoz de transformación tumoral asociada a la integración del vector, como la LAM-PCR (Schmidt, Zickler et al. 2002; Woods, Muessig et al. 2003). Esta técnica permite detectar el sitio del cromosoma donde se ha insertado el vector, y por ende discriminar si la activación de determinados genes se relaciona con transformación tumoral o simplemente con una ventaja de crecimiento; y a su vez puede determinarse si la proliferación tumoral se debe o no a la integración del vector.

#### **4.A.2 Aisladores y sitios de poliadenilación alternativos**

Las secuencias aisladoras o “insulators” son secuencias repetitivas con alta densidad de CG, capaces de circunscribir el efecto de un vector al sitio definido por dichas secuencias. Al incorporar los aisladores en el vector, se evita la tanto transcripción de otros genes que se encuentren en dirección 5´ o incluso 3´ del mismo por acción residual del promotor insertado o de secuencias enhancers (Emery, Yannaki et al. 2000; Emery, Yannaki et al. 2002), como el silenciamiento del vector (Robert-Richard, Richard et al. 2007).

La incorporación de poliA más fuertes asegura por otro lado el término de la transcripción en el sitio adecuado, aumentando la seguridad biológica al impedir la transcripción de genes situados aguas abajo del vector (Furger, Monks et al. 2001; Zaiss, Son et al. 2002).

#### **4.B Modificaciones de la envuelta (redirección del tropismo).**

Diversos grupos han diseñado envueltas quiméricas (Cosset, Morling et al. 1995; Cosset and Russell 1996; Martin, Kupsch et al. 1998; Martin, Neil et al. 1999), con el fin de dirigir previamente el tropismo del vector hacia un número reducido de tipos celulares, para disminuir el riesgo de efectos secundarios por integración del vector en células que no son diana terapéutica. Por ejemplo, en el laboratorio de FLC en Francia se han diseñado vectores con afinidad por las células T naive, o por las células HSCs, por medio de la incorporación de determinadas citoquinas en la superficie, cuyos receptores están presentes en la célula diana (Verhoeven and Cosset 2004).

#### **4.C Modificaciones del promotor (redirección de la transcripción).**

Como se dijo anteriormente, la amplia mayoría de los vectores lentivirales están pseudotipados con la envuelta anfotrópica VSV-G, que posee un amplio tropismo. Además, se elige transducir células HSCs con el fin de lograr un efecto a largo plazo. Es fácil imaginar que luego de la diferenciación, el vector va a estar integrado en una gran variedad de células, por ello para restringir la expresión del transgén a las células diana de la terapia se emplean promotores específicos de tejido (Kay, Glorioso et al. 2001; Pawliuk, Westerman et al. 2001; Maatta, Korja et al. 2006). Por ejemplo, en terapia génica de hemoglobinopatías es necesario contar con un promotor específico de células eritroides (Moreau-Gaudry, Xia et al. 2001; Richard, Mendez et al. 2001). En las terapias dirigidas inmunodeficiencias de células T, es necesario utilizar un promotor específico de ese tipo celular. En el síndrome de Wiskott-Aldrich, en donde es necesaria la expresión en toda la línea hematopoyética se recurriría un promotor hematopoyético-específico, dado que las células CD34+ pueden dar origen a tipos celulares no hematopoyéticos (a partir del hemangioblasto, el cual es CD34+).

*Sobre-expresión del transgén terapéutico: Cómo alcanzar niveles fisiológicos?*

No sólo es necesario controlar donde se expresa el transgén sino a qué niveles lo hace. Es indispensable que la expresión además de ser específica de tejido, sea fisiológica, para así evitar posibles efectos secundarios asociados con sobre-expresión. Un acercamiento lógico en el diseño de vectores de expresión fisiológica es utilizar el propio promotor del gen, dado que teóricamente contiene las secuencias necesarias para una expresión regulada. Una limitación que podría encontrar esta estrategia sería que el promotor endógeno presente en el genoma y el promotor presente en el vector no se comportaran de la misma manera al estar condicionados por factores epigenéticos diferentes, ya que los entornos cromosómicos del promotor integrado y del promotor endógeno pueden diferir. En cualquier caso esta es la opción más acertada a la hora de buscar la expresión fisiológica de un transgén en un vector integrativo.

## **5. SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH: MODELO DE TERAPIA GÉNICA**

El Síndrome de Wiskott – Aldrich (WAS), es una inmunodeficiencia primaria transmitida a través del cromosoma X, posee una incidencia de 1:100000, y es causada por la carencia (o alteración) de una sola proteína (WASp) como resultado de mutaciones en el gen que la codifica (WAS). Los casos mas graves se correlacionan con la ausencia total de función, mientras que la forma atenuada de WAS cursa con niveles disminuidos de la proteína (Imai, Morio et al. 2004). Su expresión está restringida a las células del sistema hematopoyético, desde eritrocitos hasta linfocitos T y B, y también está presente en HSCs (Parolini, Berardelli et al. 1997). En estas últimas, WASp jugaría un rol durante la diferenciación hematopoyética, ya que los progenitores hematopoyéticos WAS presentan defectos en la maduración (Burns, Hardy et al. 2004; Park, Shcherbina et al. 2005). WASp tiene como función la integración de señales extracelulares con el reordenamiento de citoesqueleto de actina, como se explicará más adelante. Forma parte de la familia de proteínas WASp/WAVE/Scar, todas implicadas en la reorganización del citoesqueleto de actina en diferentes tejidos (Thrasher, Jones et al. 1998; Takenawa and Miki 2001). La ausencia de actividad de WASp genera un impacto mayor en los linfocitos T, los cuales son incapaces de responder a estímulos de activación a

través del TCR/CD3 (Molina, Sancho et al. 1993). Las plaquetas tienen también alterada su función, y las células dendríticas y macrófagos son incapaces de formar podosomas ante estímulos de activación (Davies and Stossel 1977; Linder, Nelson et al. 1999). En macrófagos, células dendríticas, linfocitos B e incluso progenitores hematopoyéticos se han descrito defectos en la quimiotaxis (Zicha, Allen et al. 1998) y en el '*homing*' o migración (Zicha, Allen et al. 1998; de Noronha, Hardy et al. 2005). Recientemente se encontró que WASp está relacionado con el mantenimiento de la homeostasis de las células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+) (Humblet-Baron, Sather et al. 2007; Maillard, Cotta-de-Almeida et al. 2007; Marangoni, Trifari et al. 2007).

Todas estas alteraciones funcionales descritas en el párrafo anterior son las causantes de las manifestaciones clínicas típicas del WAS: profunda inmunodeficiencia, anemia, microtrombocitopenia y manifestaciones autoinmunes. La terapia convencional es por un lado paliativa de los signos, e incluye administración de antibióticos, esplenectomía, administración pasiva de inmunoglobulinas y transfusión de plaquetas. En 1978 se realizó el primer trasplante de médula ósea haploidéntica (Parkman, Rapoport et al. 1978), pero debido a la alta incidencia de rechazos se reemplazó por el trasplante HLA-idéntico de dicho tejido. Sin embargo, se sigue detectando un alto número de fracasos debido a incompatibilidad antigénica entre donante y receptor (Lenarsky and Parkman 1990; Kapoor, Crooks et al. 1998), abriendo la posibilidad a terapias alternativas como la terapia génica.

### **5.1 Regulación transcripcional de la expresión de WASp**

Como fue introducido anteriormente, WASp es una proteína de expresión hematopoyética. Tanto el mRNA como la propia proteína WASp ha sido detectada en células HSCs aisladas de cordón umbilical, médula ósea y sangre periférica, y se ha detectado a su vez en todos y cada uno de los exponentes de los linajes mieloide y linfóide (Stewart, Treiber-Held et al. 1996). Los niveles de mRNA de WASp en los distintos tipos celulares hematopoyéticos no difiere significativamente (Parolini, Berardelli et al. 1997) a excepción de los glóbulos rojos periféricos, los cuales presentan niveles disminuidos de mRNA de WAS y WASp

En las células hematopoyéticas humanas, WASp es dirigido a través de dos secuencias con actividad promotora. Una secuencia de aproximadamente 1600pb a partir del sitio de inicio de la transcripción, denominada promotor proximal, y otra ubicada a 6kb en dirección 5' de la primera, denominada promotor alternativo (FIG).

El promotor proximal es el mejor caracterizado, y se encuentra localizado en dirección 5' del gen inmediatamente a partir de la zona de inicio de la transcripción. No contiene ni caja TATA ni sitios de unión para Sp1. Contiene cinco posibles sitios de unión para factores de transcripción específicos del tejido hematopoyético (dos para Ets-1, dos para c-Rel y otro para PU.1). Experimentos de expresión transitoria demostraron que un fragmento de sólo 170 pb era suficiente para otorgar una expresión hematopoyética-especifica (Petrella, Doti et al. 1998).

Por otro lado, el promotor alternativo está enriquecido en secuencias de unión a Sp1, Ets-2, PU.1, AP-2 y c-Myb. Si bien esta región no ha sido completamente caracterizada, se observó mediante ensayos de expresión transitoria *in vitro* en las líneas celulares Jurkat y HEL que la actividad de este promotor alternativo fue menor que la actividad del promotor proximal. Debido a la presencia de regiones de unión a PU.1 y c-Myb se plantea la hipótesis de que este fragmento se encuentre particularmente relacionado con la expresión de WAS durante la diferenciación hematopoyética mieloide (Gonda 1998).

## **5.2 Mecanismo de acción de WASp**

Como se mencionó antes, el tipo celular más afectado en el WAS son las células T. En estas células, WASp forma parte de la ruta de la transducción de señales procedentes de la estimulación del complejo TCR/CD3 y su papel es fundamental. La concentración de WASp activa está finamente regulada por una serie de proteínas que interactúan uniéndose a sus diferentes dominios. En ausencia de estímulo, WASp se encuentra inactivo de forma autoinhibida. Frente a estímulos mediados por el TCR, ocurre el pasaje a su forma activa, como resultado de varias cascadas de fosforilación, que en último lugar terminan con la fosforilación de la proteína de interacción de WASp (WIP) por acción de la PKC?. Así, WIP se separa de WASp quedando libre su sitio activo.

Por otro lado, ocurre la fosforilación de Cdc42-GDP a través de VAV, generándose Cdc42-GTP, que se une al dominio GTPasa de WASp. Esta interacción desestabiliza la conformación autoinhibida de WASp. La conformación activa se estabiliza posteriormente por la unión de la proteína Nck a la región rica en prolina de WASp. La función última de WASp es la de mediar el pasaje de actina monomérica a polimerizada, y en esta función participa también el complejo Arp2/3. WASp se une a dicho complejo y a los monómeros de actina por medio de su dominio VH2/VCA, creándose una rígida y ramificada red (Amann and Pollard 2001; Cannon, Labno et al. 2001; Sasahara, Rachid et al. 2002; Zeng, Cannon et al. 2003; Barda-Saad, Braiman et al. 2005).

### **5.3 Modelos experimentales para la terapia génica de WAS**

Toda patología susceptible de ser tratada por terapia génica, necesita un modelo experimental idóneo para su estudio y posterior diseño de tratamiento.

#### Modelos celulares

En un principio se han podido establecer las bases celulares de WAS, así como las anormalidades fenotípicas y funcionales, en líneas establecidas por estimulación alogénica (Molina, Kenney et al. 1992), las cuales conservan las características de las células primarias. Sin embargo, dada su limitada vida media se generaron líneas celulares inmortales o inmortalizadas, que permitieron un estudio reproducible y a largo plazo. La inmortalización por infección con el Herpesvirus Saimiri demostró ser un método eficiente en células T humanas, originando líneas celulares con fenotipo estable en el tiempo, así como la conservación de la especificidad antigénica, expresión de citoquinas y citotoxicidad (Meinl, Hohlfeld et al. 1995; Meinl and Hohlfeld 2000; Daubenberger, Nickel et al. 2001). Las células T-HVS son útiles para caracterizar adecuadamente los defectos de células T procedentes de individuos con enfermedades genéticas (Pacheco-Castro, Marquez et al. 1996; Broker, Kraft et al. 1997). En nuestro laboratorio se establecieron líneas celulares a partir de células T de pacientes WAS, por inmortalización por HVS, desarrollando vectores y condiciones de transducción eficientes lo cual había

sido una limitación hasta el momento (Toscano, Frecha et al. 2004). Pero para estudiar el efecto de un vector en la línea hematopoyética no basta con transducir células T. Los métodos de diferenciación de HSCs *in vitro*, son útiles en el estudio de la funcionalidad de WASp en la hematopoyesis, a la vez que permiten el estudio de la reconstitución fenotípica en las células hematopoyéticas generadas *de novo*. Recientemente se demostró la eficacia de un vector lentiviral expresando el cDNA de WAS por transducción de células HSCs extraídas de médula ósea de enfermos y posterior diferenciación *in vitro* (Charrier, Dupre et al. 2006)

### Modelos animales

Como paso previo al uso de un vector de terapia génica en humanos es imprescindible estudiar su comportamiento en un modelo animal adecuado. Como en muchos casos el WAS presenta características clínicas diferentes en humanos en comparación con otros animales. El modelo de ratón WAS knock out o los modelos nulos de WASp no desarrollan los mismos síntomas que los humanos, sin embargo, se afectan las mismas células, y las anormalidades fenotípicas y funcionales a nivel celular son generalmente equivalentes. (Snapper, Rosen et al. 1998). Por lo tanto han sido útiles como modelo de laboratorio para el estudio del rol de la proteína WASp en células del sistema hematopoyético. Además, mediante este modelo se ha logrado la reconstitución funcional de células T, macrófagos y células dendríticas utilizando vectores retrovirales expresando el cDNA de WAS humano. Por otro lado mediante el uso de vectores retrovirales se ha podido restablecer la función hematopoyética de células HSCs de de médula ósea de ratón WAS<sup>-/-</sup> (Klein, Nguyen et al. 2003), así como la reconstitución funcional de la progenie hematopoyética (Charrier, Stockholm et al. 2005)

## **6. OPTIMIZACIÓN DE VECTORES PARA LA TERAPIA GÉNICA DE WAS**

Como se ha mencionado, esta inmunodeficiencia primaria es causada por la mutación del gen WAS, el cual se expresa exclusivamente en tejido hematopoyético y afecta principalmente a linfocitos T. Por consiguiente, el vector terapéutico debe expresar una proteína funcionalmente correcta sólo en

las células hematopoyéticas. A su vez, para alcanzar la reconstitución del sistema hematopoyético completo la diana de acción deben ser las HSCs. En este sentido, en nuestro laboratorio se construyó un vector lentiviral expresando el cDNA completo del gen *WAS* a través de un fragmento de 500pb del promotor de *WAS* el cual restauró completamente el fenotipo anormal de células T de enfermos (*WAS* T-HVS) (Toscano, Frecha et al. 2004), siendo a la vez específico de células hematopoyéticas (Martin, Toscano et al. 2005) (Martin, Toscano et al. 2005). Sin embargo era necesario determinar su idoneidad en la población de HSCs, ya que éstas asegurarían un efecto terapéutico a largo plazo y en todas las células mieloides y linfoides que se ven afectadas en el *WAS*. Si bien está documentada detalladamente la función fisiológica de la proteína *WASp*, así como las anomalías que derivan de su ausencia, se desconoce la regulación de la misma durante la diferenciación hematopoyética. Por lo tanto, el presente trabajo de tesis tiene por finalidad el estudio del comportamiento del fragmento promotor de 500pb de *WAS* en un entorno lentiviral durante la diferenciación hematopoyética. Se hará especial énfasis en la expresión fisiológica del transgen, y se explorarán posibles estrategias para su optimización, a fin de conseguir un vector eficaz y fisiológicamente regulado para la transducción de HSCs, en vistas a su utilización en clínica de *WAS*.

## OBJETIVOS

Los vectores son la base de cualquier estrategia de terapia génica (TG). Tanto la falta de eficiencia como la presencia de efectos secundarios indeseados pueden hacerla fracasar. En este sentido los vectores lentivirales representan la herramienta ideal para TG de Inmunodeficiencias primarias debido a su eficiencia en la transducción de células HSCs. Nuestro objetivo global es el diseño de un vector lentiviral eficiente y seguro para terapia génica de Wiskott-Aldrich (WAS). De especial importancia es conseguir una expresión del transgen duradera y fisiológica en todo el linaje hematopoyético. Con todo esto, el presente trabajo de tesis tiene por objetivos:

- .
- Estudio de la eficiencia y estabilidad de los vectores lentivirales constitutivos y hematopoyético-específicos en HSCs.
- Análisis del patrón de expresión de los vectores lentivirales conteniendo el promotor proximal de WAS (**VL-WAS**) en líneas celulares linfoides y mieloides.
- Análisis del comportamiento fisiológico durante la diferenciación hematopoyética de los vectores **VL-WAS** descritos previamente (WE)
- Optimización de los vectores **VL-WAS** con la finalidad de lograr que la expresión del transgen mimetice la expresión endógena de WASp durante la diferenciación hematopoyética.

## MATERIALES Y MÉTODOS

## **Plásmidos.**

El plásmido empaquetador (pCMV?R 8.91) y el de la envuelta VSV-G (pMD.G) fueron facilitados por el Dr. D.Trono. El plásmido de empaquetamiento pCMV?R8.91 codifica para *gag*, *pol*, *tat* y *rev*. El pMD.1 codifica para la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular, y es denominado pVSV-G. El vector lentiviral SE, anteriormente designado como HRSIN-CSEW (Demaison, Parsley et al. 2002) contiene un promotor fuerte, derivado del *spleen focus forming virus* (SFFV) que dirige la expresión de la proteína verde fluorescente, eGFP. El promotor proximal de WAS (extendiéndose desde -1 a -499, a partir del sitio de inicio de la transcripción) fue obtenido por PCR de ADN genómico utilizando los siguientes oligonucleótidos cebadores: Forward 5'CCGGAATTCGGGATTACAGGTGTGAGC3' y Reverse: 5'CGCGGATCCGGTGCTTTCTGCCCTTGTCTTC3'. El fragmento amplificado fue clonado en lugar del promotor SFFV mediante corte y ligación con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI, dando como resultado el plásmido WE. El plásmido AWE, fue generado mediante la adición de un fragmento de 386 pb del promotor alternativo de WAS, amplificado directamente de DNA genómico, utilizando los cebadores Forward 5' AAGTCAAAGGAGGAGAGGGCAACGC 3' y Reverse 5' CTCAGTCTTTGTGAGCCCAGGAGTGC 3'. El promotor alternativo de WAS completo (601pb) se amplificó de DNA genómico con los cebadores: Forward 5' 3' y reverse 5' 3'. Ambos fragmentos (386pb y 601pb) fueron primero subclonados en pGemt Easy (Promega, Wisconsin, USA), escindidos mediante corte con EcoRI y clonados en el sitio EcoRI del plásmido WE, en dirección 5' inmediatamente antes del fragmento promotor de 500pb.

## **Producción de vectores**

Los vectores lentivirales fueron producidos por co-transfección de células 293T con tres plásmidos 1- Plásmido vector (SE, WE, AWE o cAWE); 2- Plásmido de empaquetamiento pCMV?R8.9 y 3- Plásmido de la envuelta pMD.G, como se ha descrito anteriormente (Toscano, Frecha et al. 2004). Los sobrenadantes conteniendo las partículas virales fueron recogidos y filtrados a través de filtros de 0.45µm (Nalgene, Rochester, NY), alicuotados y congelados a -80°C. Los

títulos virales fueron determinados sobre la base de la cantidad inicial de células diana y el porcentaje de células eGFP+, detectados en un rango lineal de diluciones seriadas de los sobrenadantes. La multiplicidad de infección (MOI) se estimó en la línea celular T Jurkat.

### **Aislamiento y transducción de HSCs humanas.**

Las muestras de sangre de cordón umbilical (UCB) se obtuvieron, previo consentimiento informado de las pacientes, tanto de cordones umbilicales derivados de cesáreas como de partos naturales. La sangre se diluyó 1:2-1:4 con PBS y se obtuvo la fracción mononuclear a partir de un gradiente de densidad, Ficoll-Paque Plus (Stem Cell Tech. 07907). Se eliminaron los eritrocitos con Cloruro de Amonio y las plaquetas por centrifugación en frío y a bajas revoluciones. La población CD34+ se purificó a través de doble pasaje por columnas magnéticas (Miltenyi-Biotech), previa incubación con anticuerpo anti-CD34 unido a esferas magnéticas, siguiendo las instrucciones del fabricante (Miltenyi Biotech). Para cada experimento se evaluó el grado de enriquecimiento, por la detección del antígeno CD34 (utilizando un anti CD34-PE, Miltenyi Biotech), por citometría de flujo, siendo en todos los casos superior al 95%.

Se incubaron durante toda la noche  $5 \times 10^4$  células CD34+ por pocillo en placa de 48 pocillos con 500  $\mu$ l de medio especial para proliferación de células HSCs (Stem Span, Stem Cell Tech) suplementado con 50 ng/ml de stem cell factor (SCF) y 10 ng/ml de trombopoyetina (TPO), Penicilina-Estreptomicina. Al día siguiente se pusieron en contacto con los sobrenadantes virales con MOIs de 2 a 50, con la finalidad de conseguir transducción del 20 al 40%. Tras 16 horas como mínimo, se lavaron las células y resuspendieron en 500-600  $\mu$ l de Stem Span.

### **Método de diferenciación in vitro**

#### Ensayo de colonias en metilcelulosa

Se tomaron  $1 \times 10^3$  células CD34+ transducidas con los vectores y no transducidas, se centrifugaron y resuspendieron en 200  $\mu$ l de medio IMDM (Gibco 21980-032) suplementado con 2% FCS, glutamina y antibióticos. Con jeringa de 5 ó 10 ml y aguja de calibre 16G (de extremo romo) se tomaron 2 ml

de medio MethoCult (GF-4434, Stem Cells Technologies) y mezclaron con las células sin formar burbujas. Se colocaron en placa de 12 pocillos, a razón de 1ml/pocillo. Luego de 14-16 días de incubación a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, se analizaron las colonias mieloides al microscopio de fluorescencia (Cell R IX 81, Olympus) para evaluación cualitativa de la actividad promotora. Las imágenes fueron capturadas con cámara digital (Orca CCD; Hamamatsu) y analizadas por doble ciego. Por otra parte, las diferentes colonias puras CFU-G, CFU-M y CFU-E fueron recogidas con una punta fina de 10ul y separadas según tipo, para luego ser analizadas en función de la expresión del transgén eGFP por citometría de flujo y de la expresión endógena de WASp, por Western Blot cuantitativo. A su vez, una muestra de cada tipo de colonia se separó para realizar la cuantificación del número de integraciones del vector por PCR a tiempo real. Durante todo el experimento y para cada vector se guardó una alícuota de células CD34<sup>+</sup> en proliferación, frente a la cual se compararon las diferentes colonias en cuanto a la expresión de eGFP y de WASp. El análisis de actividad promotora se realizó en base al parámetro incremento de la intensidad media de fluorescencia (Inc- MFI), que se calculó dividiendo el valor de MFI de la población eGFP<sup>+</sup> entre el MFI de la población eGFP<sup>-</sup>. Se comparó la actividad de los promotores tras la diferenciación calculando las relaciones entre Inc-MFI de eGFP en las distintas colonias diferenciadas y las CD34<sup>+</sup> en proliferación.

### **Método de diferenciación *in vivo*: reconstitución del modelo murino RAG2<sup>-/-</sup>, $\gamma$ c<sup>-/-</sup>**

El modelo murino RAG2<sup>-/-</sup>,  $\gamma$ c<sup>-/-</sup> fue establecido (Gimeno, Weijer et al. 2004; Traggiai, Chicha et al. 2004). Es completamente inmunodeficiente, carece de células NK, células T y B y permite el desarrollo de un sistema hematopoyético humano completamente funcional.

Se sometieron animales de 4 días de edad a dos rondas de irradiación sub-lethal, y 2,5x10<sup>5</sup> células CD34<sup>+</sup> previamente transducidas con un MOI de 25 fueron inoculadas vía intrahepática. Al cabo de 8 semanas se sacrificaron, de acuerdo a las normas éticas vigentes, y se extrajeron los siguientes órganos hematopoyéticos: sangre periférica, timo, bazo y médula ósea. Se aislaron las

células por pasaje a través de filtros de 70nm y se procedió al marcaje fenotípico de poblaciones linfoides y mieloides.

### **Inmunofenotipo**

El anticuerpo anti-CD45 humano conjugado a PE-Cy5 se utilizó para la determinación de los porcentajes de reconstitución. Anti cuerpos conjugados con APC: hCD3 (células T totales), hCD56 (natural killer), hCD19 (linfocitos B), hCD34 (células multipotenciales progenitoras), hCD4 (linfocitos T-CD4). Anticuerpos conjugados con PE: hCD20 (células B maduras), hGLyA (eritrocitos), hCD41 (megacariocitos). Todos los anticuerpos de Pharmingen (Pharmingen, San Jose, CA).

### **SDS/PAGE, Western Blot y procedimientos de cuantificación**

Las células se lisaron con buffer de lisis NP-40 1% y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma, St, Louis, MO), se resolvieron por SDS-PAGE (geles de poliacrilamida al 10%, condiciones desnaturalizantes) y se realizó la electrotransferencia a membranas de PVDF Hybond-P (Amersham, Buckinghamshire, U.K.). Se detectó la expresión de WASp con anti-WASp D1 (Santa Cruz, CA), y ERK con anti-MAP Kinase ½ (Upstate Biotechnology, UK), y la posterior adición de anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Caltag, Invitrogen, CA). Los análisis de cuantificación del Western Blot se realizaron utilizando el kit de detección ECL Advanced Western Botting Detection KIT (Amersham Bioscience, UK), analizando a 440nm con el software Quantity One 4.5.0 (Bio-Rad, CA). La contribución de cada banda fue almacenada y expresada como intensidad relativa por mm<sup>2</sup>.

### **Preparación de DNA y PCR a Tiempo Real**

El DNA genómico de las células CD34<sup>+</sup> en proliferación o de las colonias de metilcelulosa fue aislado utilizando el kit de extracción de DNA de Promega (Promega, Madison, WT). Las reacciones de PCR a tiempo real fueron realizadas en el ciclador ABI Prism 7000 PCR Detection System (Applied Biosystems, CA), utilizando una hot start DNA polimerasa (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania). La determinación del número de copias de vector fue medida por amplificación de secuencias del eGFP insertado. Cebadores:

Forward 5'GCCCCGACAACCACTACCT3'; Reverse  
 5'CGTCCATGCCGAGAGTGA3'; sonda Taqman: 5'FAM-  
 CGGCGGGCGGTACGAACTCCA-TAMRA 3'. Para estandarizar la carga se  
 amplificó el gen de la Beta-actina utilizando: Forward  
 3'GCTATCCAGGCTGTGCTATC5'; Reverse  
 3'TGAGGTAGTCAGTCAGGTCC5'; Sonda 5'FAM-  
 CCAGCCAGGTCCAGACGCAGG-TAMRA 3'. Los parámetros de la PCR  
 fueron: 1x (95°, 2'), 45x (95°, 30'' / 61,4°, 30'' / 72°, 30''), 1x(72°, 2'). La Tm de  
 los cebadores fue optimizada en ensayos previos.

### **Líneas celulares y medios de cultivo.**

La línea celular HVS-T/WAS fue establecida a partir de un paciente WAS por inmortalización con el Herpevirus Saimiri. Las células primarias ALLO-T y ALLO-N fueron generadas por aloestimulación de células de un paciente WAS y un individuo sano, respectivamente, frente a células Raji inactivadas por mitomicina-C como fuera descrito (42moi). HVS-T/WAS, ALLO-T y ALLO-W fueron donadas por el Dr. I.Molina (universidad de Granada). Las siguientes líneas celulares hematopoyéticas se mantuvieron a su densidad óptima en medio RPMI suplementado con 10% FCS, HEPES, Glutamina, Piruvato de Sodio y Penistrep: Jurkat (línea celular T), B RAJI (línea celular B), U937 (línea promieloblástica), THP-1 (línea monocítica) , HEL (línea megacariocítica). Las líneas K562 (eritroleucémica) y HL-60 (promielocítica) fueron mantenidas en medio IMDM suplementado con 10% FCS y 20% FCS, respectivamente, además de HEPES, NaPyr, y Penistrep.

## RESULTADOS

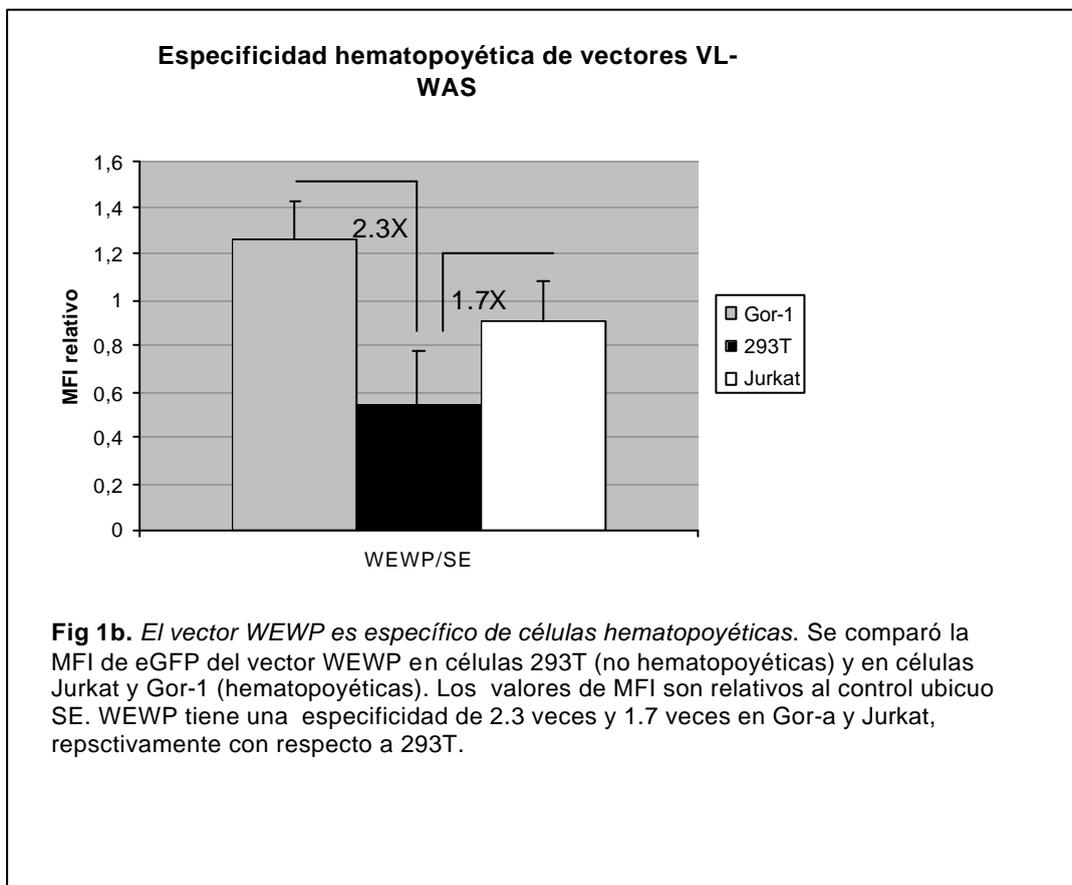
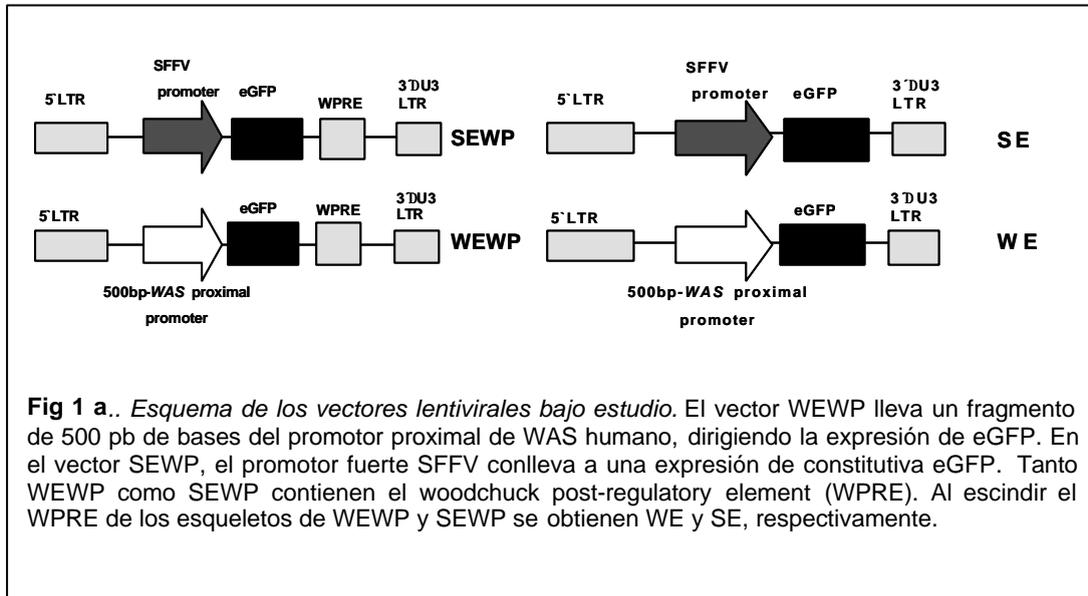
Como se ha introducido anteriormente, WAS es una patología de muy baja frecuencia en la población, lo que conlleva una escasez de muestras de pacientes. Es por eso que los estudios del presente trabajo han sido realizados en células CD34+ de cordones umbilicales normales, que expresan la proteína WASp de manera fisiológica. Debido a esto el trabajo se ha basado en el análisis de la expresión de la proteína verde de fluorescencia (eGFP) como gen reportero de la actividad del promotor proximal de WAS en un entorno lentiviral (VL-WAS) de los vectores lentivirales conteniendo el promotor proximal de WAS (**VL-WAS**). Con la finalidad de corroborar resultados y definir la actividad del promotor en un sistema lo más relevante posible, los estudios de expresión de los vectores se han realizado a tres niveles; 1- en líneas celulares. 2- en células CD34+ diferenciadas *in vitro* y 3- en células CD34+ diferenciadas *in vivo*. Finalmente se ha diseñado una estrategia de optimización de la expresión tras la diferenciación en ciertos tipos celulares que lo requirieron.

## **1- COMPORTAMIENTO DE LOS VL-WAS EN LÍNEAS CELULARES**

### **1.a Vectores lentivirales expresando eGFP a través del promotor proximal de WAS son hematopoyético-específicos.**

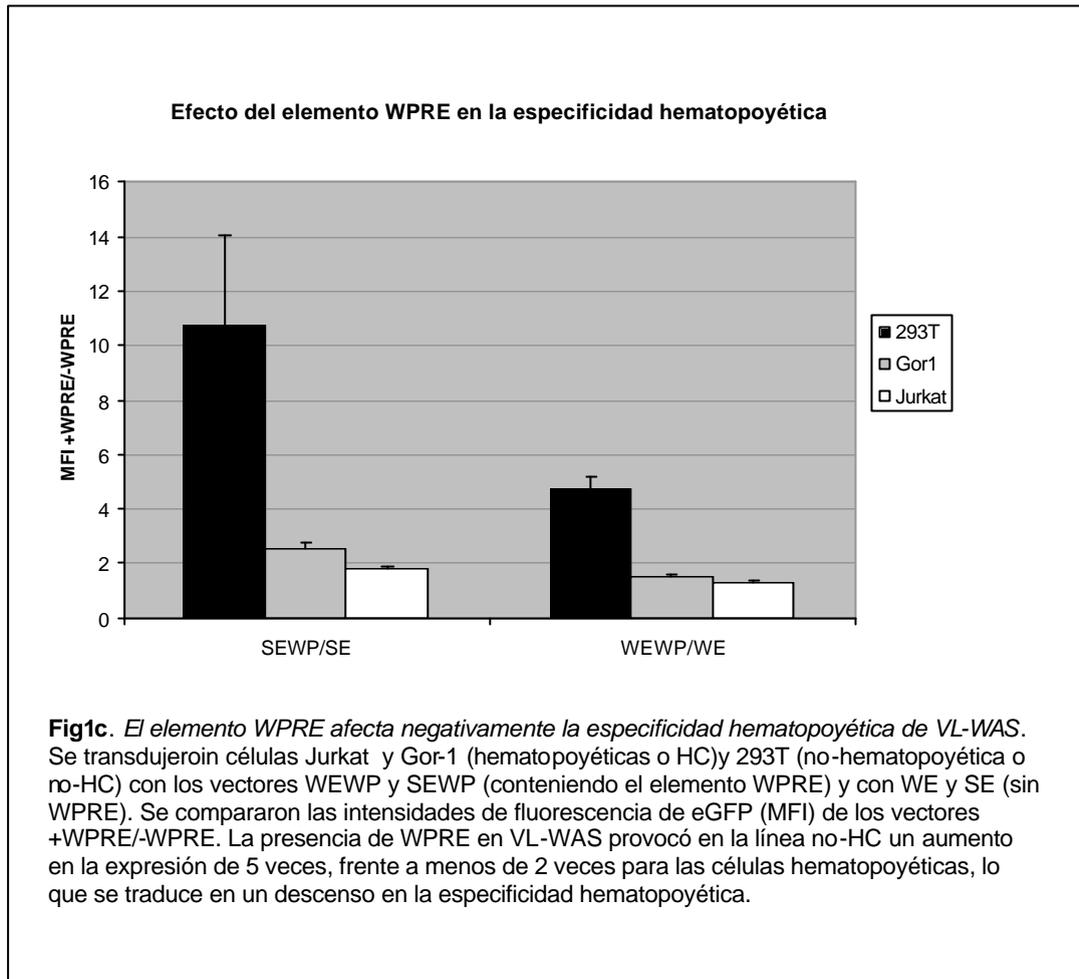
En primer lugar estudiamos si la expresión de *eGFP* dirigida por el promotor proximal de WAS era específica del tejido hematopoyético. Para ello nos basamos en el vector WEWP cedido por el Prof. Adrian Thrasher (Fig 1) que expresan la eGFP en lugar de WASp y que contienen el elemento WPRE (woodchuck post-regulatory element). El vector SE, construido a partir del SEWP por escisión del elemento WPRE, se utilizó como control. El vector WEWP contiene un fragmento de 500 pares de bases del promotor proximal de WAS, mientras que el vector SE, expresa eGFP a través un promotor fuerte derivado del *Spleen Focus Forming Virus* (SFFV) que carece de especificidad celular (figura 1a). Con los vectores WEWP y SE se transdujeron células hematopoyéticas como las Gor-1 (derivadas de un paciente WAS por inmortalización con herpesvirus saimiri) y la línea celular jurkat; por otro lado se transdujo la línea celular no hematopoyética 293T. Se midió la Intensidad

Media de Fluorescencia (MFI) por Citometría de Flujo (FACS), como parámetro de fuerza de promotor. En la figura 1b se observa que la fuerza relativa de WEWP es 2.7 y 1.7 veces mayor en células hematopoyéticas que en no hematopoyéticas.



### **1.b La especificidad de expresión de los vectores lentivirales se ve alterada por la presencia del elemento WPRE (woodchuck post-regulatory element).**

El WPRE es un elemento enhancer que afecta la expresión del gen a diferentes niveles (Donello, Loeb et al. 1998; Mastroiannopoulos, Feldman et al. 2005), y su efecto en vectores retrovirales depende tanto del promotor utilizado como de la célula diana (Hlavaty, Stracke et al. 2004; Hlavaty, Schittmayer et al. 2005; Schambach, Bohne et al. 2005). De manera general incrementa tanto los niveles de expresión como el título de los vectores que lo incorporan. Sin embargo, no se ha estudiado su influencia sobre la especificidad de tejido de un promotor. Por lo tanto decidimos estudiar el efecto del elemento WPRE sobre la especificidad hematopoyética de nuestros vectores lentivirales. Para ello se construyó el vector WE mediante la eliminación del WPRE del vector WEWP. El vector SEWP (cedido por el Prof. A. Thrasher) se utilizó como control para estudiar la influencia de dicho enhancer en un entorno SFFV. (Fig 1a). Se transdujeron células Jurkat y Gor-1 (ambas hematopoyéticas) y 293T (no hematopoyéticas) con los vectores WEWP, SEWP, WE y SE. La figura 1c muestra cómo el efecto del elemento WPRE depende tanto del vector donde se inserta como de las células diana. La intensidad de expresión de eGFP en el vector SEWP es 10 veces mayor que en el SE (sin WPRE) en 293T y 2.1 veces mayor en Jurkat y Gor-1. Mientras que la presencia de WPRE en WEWP provocó un aumento de los niveles de expresión de eGFP de casi 5 veces en la línea no hematopoyética 293T, frente a un aumento de poco 1.8 veces en las dos líneas hematopoyéticas. Por lo tanto, puesto que el elemento WPRE en el vector VL-WAS (WE) tiene un efecto mayor en la expresión de las células no hematopoyéticas que en las hematopoyéticas (figura 1c, barras de la izquierda), el resultado final es una disminución en la especificidad hematopoyética de más de 2 veces. Por tanto continuamos el estudio del fragmento promotor de WAS en el vector WE. En adelante denominaremos VL-WAS a los vectores que incorporan el fragmento promotor de WAS en un entorno lentiviral.



### 1.c El VL-WAS expresa eGFP de manera deficiente en líneas celulares mieloides.

Una vez que se constató que el patrón de expresión del vector WE era similar al del vector WW, nos decidimos analizar en profundidad el comportamiento del vector WE. La finalidad de estos estudios era determinar si el comportamiento del promotor proximal de WAS utilizado en el vector terapéutico WW seguía el patrón de expresión de WASp endógeno.

Está demostrado que las células hematopoyéticas expresan niveles constantes de RNA mensajero de WAS (Parolini, Berardelli et al. 1997) y que los niveles de proteína (WASp) serían también similares en células adultas circulantes en sangre (Stewart, Treiber-Held et al. 1996). Esto parece indicar que los niveles de expresión de WASp son muy similares en los diferentes linajes hematopoyéticos. Por esta razón decidimos realizar el estudio de expresión de WE en líneas celulares hematopoyéticas mieloides y linfoideas y contrastarlo

con los niveles de expresión de WASp de dichas células. Entre las líneas del linaje mieloide hemos incluido: HEL (línea celular megacariocítica), HL-60 (mielo-monocítica), K562 (eritrocítica-megacariocítica), THP-1 (monocítica), y U937 (leucemia monocítica). Las líneas celulares linfoides incluyen: Jurkat (línea celular T), Raji (línea celular B), T- HVS (línea celular derivada de células T de un paciente WAS, obtenida por infección con el Herpesvirus Saimiri), Allo-TW y Allo-TN (líneas celulares obtenidas por allo-estimulación, a partir de células T de un paciente WAS o de un individuo sano, respectivamente). Todas ellas fueron transducidas con los vectores SE y WE. Tras dos semanas en cultivo se midió el porcentaje de células eGFP positivas y la intensidad de fluorescencia (MFI) de las células transducidas y el de las no transducidas. EL MFI es un indicador de actividad promotora en las células transducidas, ya que a mayor número de moléculas de eGFP expresadas por célula, mayor será el MFI. Para las comparaciones de expresión entre diferentes líneas celulares, se utilizaron experimentos donde el porcentaje de células eGFP positivas era menor del 20% (en este rango de porcentaje puede considerarse que cada una de las células positivas para eGFP contiene sólo una integración del vector). Para poder comparar la actividad promotora en diferentes células hemos utilizado el incremento en intensidad media de fluorescencia, o inc-MFI como parámetro indicador de la actividad promotora. El inc-MFI se obtiene dividiendo el valor de MFI de la población eGFP positiva por el MFI de la población negativa. Como puede observarse en la figura 2 la expresión de eGFP por el vector WE varía dependiendo del tipo celular. WE presenta de 3 a 4 veces mayor actividad en líneas del tipo linfóide, que en células mieloides. Esta relación es estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ;  $n=6$ , figura 2 inferior). En cambio, al observar el perfil de expresión de WASp endógeno vemos que la práctica totalidad de las líneas celulares expresan similares niveles de dicha proteína, independientemente del linaje al que pertenezcan (fig 2, superior).

## 2- COMPORTAMIENTO DE VL-WAS EN CÉLULAS CD34+ Y EN SU PROGENIE TRAS DIFERENCIACIÓN *IN VITRO*

La reducida expresión de los vectores VL-WAS en las líneas celulares mieloides nos hizo plantearnos si dicho defecto ocurría en células primarias. De particular interés era determinar si la expresión de estos vectores se mantenía tras la diferenciación mieloide de las células CD34+ (las células diana en cualquier estrategia de terapia génica frente a WAS). Por tanto nos centramos en estudiar comportamiento de los vectores LV-WAS durante la diferenciación. Para ello utilizamos dos sistemas de diferenciación que nos permitieron monitorizar la regulación de la expresión a lo largo de la diferenciación hematopoyética: 1) diferenciación *in vitro* en matriz de metilcelulosa y 2) trasplante en ratones inmunodeficientes.

### 2.a Transducción eficiente y estable de células CD34+

Las células CD34+, fueron obtenidas de sangre de cordón umbilical mediante selección positiva con columnas magnéticas, El porcentaje de las mismas, luego de dos rondas de purificación por columnas magnéticas fue sistemáticamente igual o superior al 95% (tabla1).

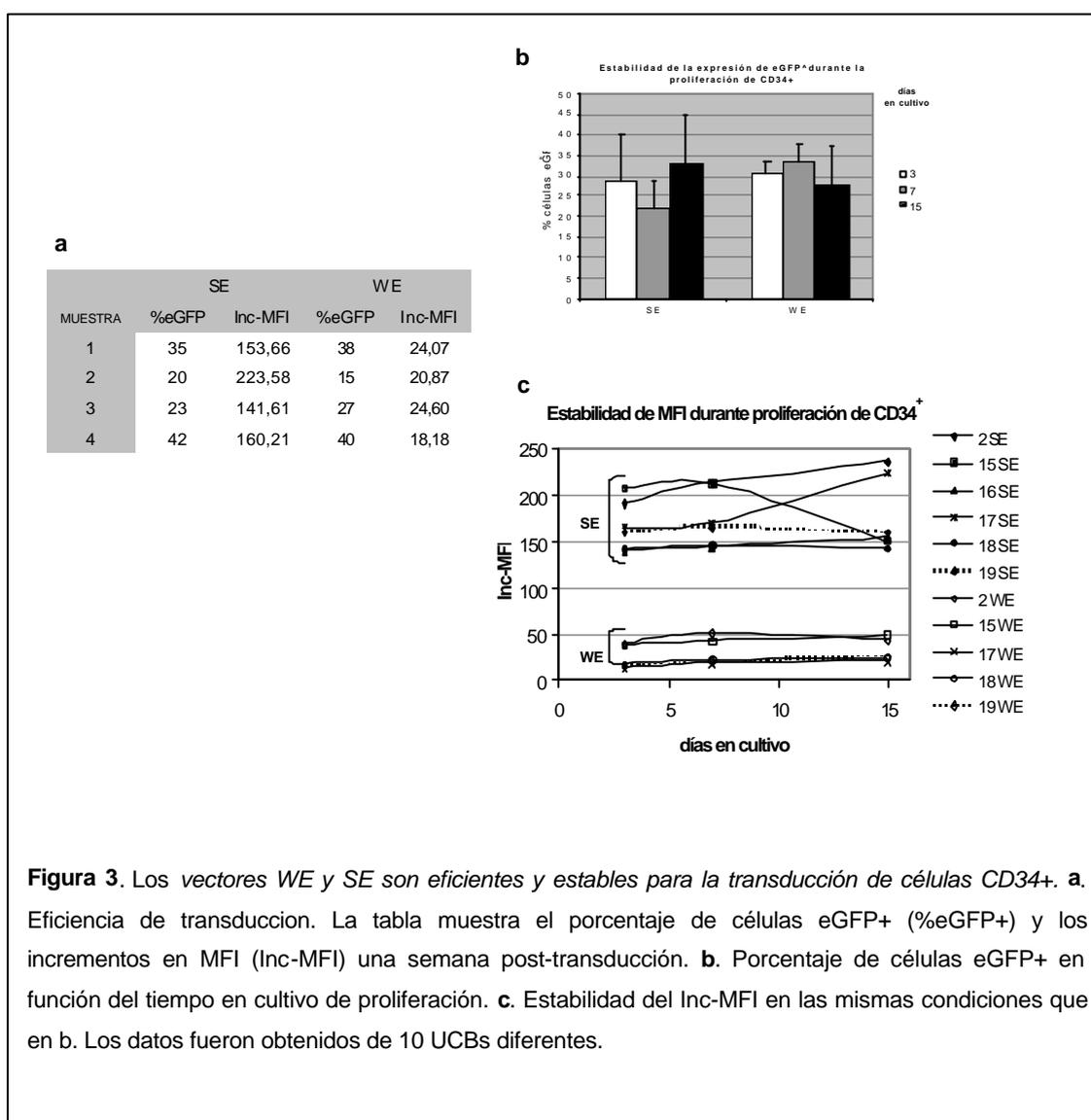
Tabla 1

% CELULAS CD34+	
ANTES	DESPUES
1,6	85,6
0,6	94,9
0,9	91,3
0,6	95,2

Porcentaje de células CD34+ de sangre de cordón umbilical (UCB) previo y posterior al doble aislamiento por columnas magnéticas. Para el aislamiento se utilizó un anti-CD34 conjugado a esferas magnéticas y para la detección se utilizó un anti-CD34-PE (Ficoeritrina)

Se transdujeron dichas células con los vectores lentivirales en presencia de mínima estimulación con las citoquinas recombinantes humanas SCF (stem cell

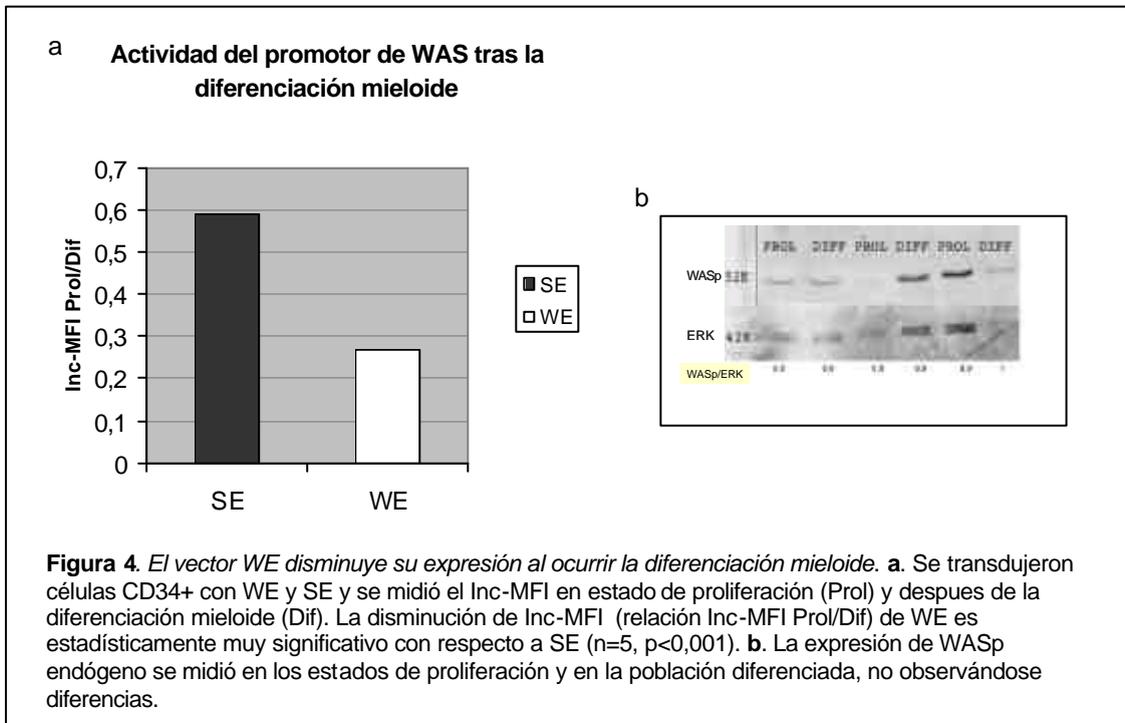
factor) y TPO (thrombopoietin). Se probaron distintas multiplicidades de infección (MOIs) para lograr un 40% de expresión de eGFP. La MFI obtenida con el vector SE fue 3 veces mayor que la obtenida con WE (1196 versus 381; (Fig 3a). Las células transducidas se mantuvieron en medio de cultivo específico de células HSCs (Stem Span) en presencia de las ya mencionadas SCF y TPO, por un período de dos semanas. En estas condiciones las células CD34+ permanecen en estado de proliferación sin diferenciarse. Se midió el porcentaje de eGFP y el inc-MFI a lo largo de dos semanas. Ambos parámetros se mantienen constantes, independientemente del promotor insertado (SE = 28% de células eGFP+, WE= 30,6% de células eGFP+; fig3b y 3c).



**Figura 3.** Los vectores WE y SE son eficientes y estables para la transducción de células CD34+. **a.** Eficiencia de transducción. La tabla muestra el porcentaje de células eGFP+ (%eGFP+) y los incrementos en MFI (Inc-MFI) una semana post-transducción. **b.** Porcentaje de células eGFP+ en función del tiempo en cultivo de proliferación. **c.** Estabilidad del Inc-MFI en las mismas condiciones que en b. Los datos fueron obtenidos de 10 UCBs diferentes.

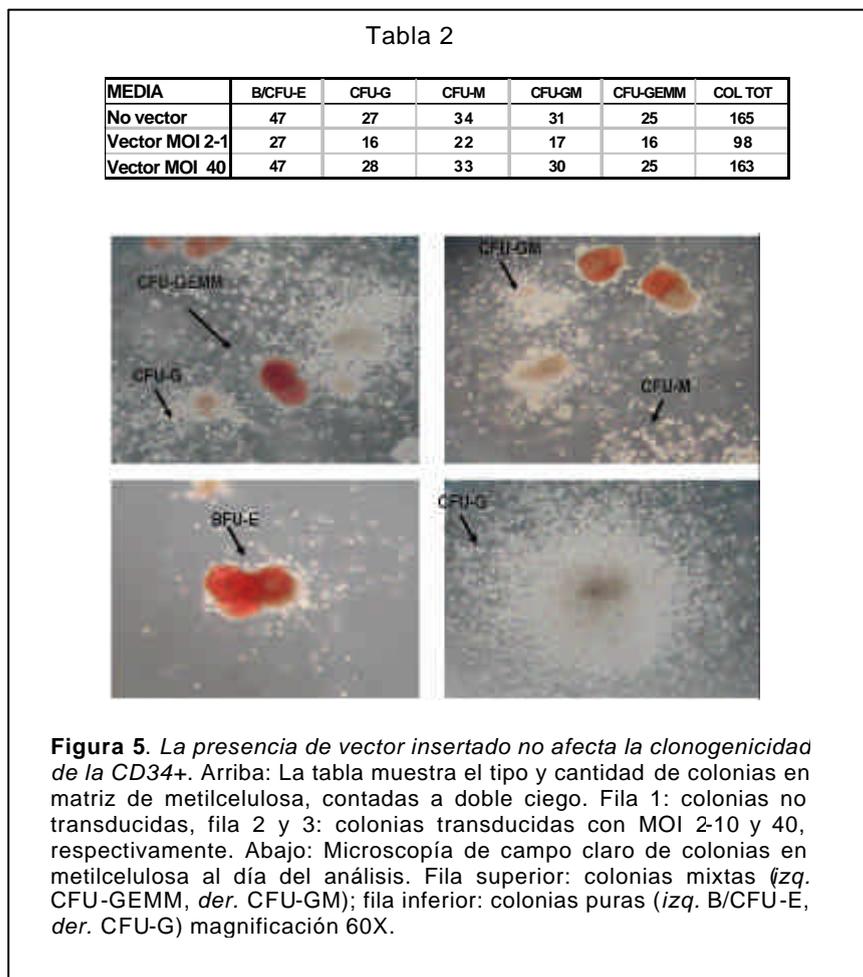
## 2.b La expresión de eGFP mediante VL-WAS disminuye marcadamente al producirse la diferenciación mieloide.

Para estudiar el comportamiento fisiológico de los VL-WAS estudiamos el patrón de expresión de WE en células CD34 y en su progenie mieloide, y se comparó con el patrón de expresión de WASp endógeno. Para ello, las células CD34+ fueron transducidas, y a las 24 horas puestas en medio de diferenciación. Tras dos semanas de incubación las células fueron recogidas y analizadas por FACS (determinando el inc-MFI y porcentaje de eGFP) y por Western blot (para estudiar los niveles de WASp en el total de células diferenciadas mieloides). Se utilizaron los niveles de la proteína ERK como referencia para normalizar los niveles de WASp. Se observó de manera sistemática una caída en la intensidad de fluorescencia tras la diferenciación de las células transducidas con el vector WE, a diferencia del SE que no disminuyó de manera tan marcada (Figura 4,  $p < 0,001$ ). Esta caída no se correspondió con una bajada en los niveles de WASp (relación WASp-CD34/WASp-linaje mieloide= 0,9)



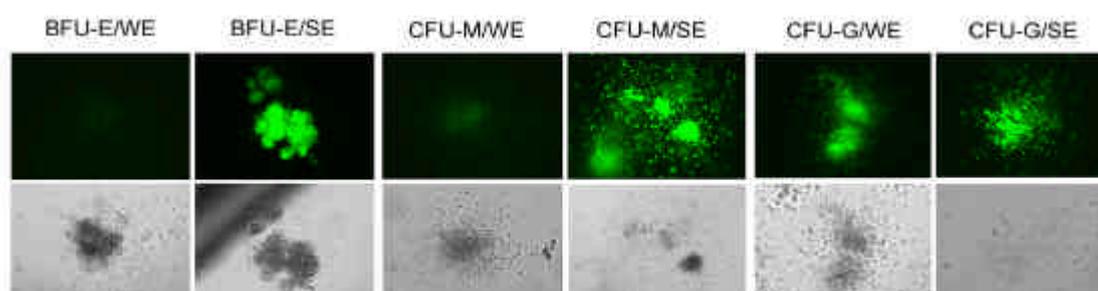
**2.c La expresión del transgén mediante VL-WAS disminuye tras la diferenciación de células CD34+ a macrófagos y células eritroides, pero no a granulocitos.**

Dado que el vector WE disminuía su expresión en la población mielóide total, decidimos diseccionar el del vector WE en cada una de las colonias mieloides por separado. Por el método de diferenciación en metilcelulosa pueden obtenerse tanto colonias mieloides mixtas (CFU-GEMM, CFU-GM), derivadas de progenitores más inmaduros, y colonias puras (CFU-G, CFU-M o B/CFU-E), derivadas de progenitores más maduros. Todas ellas pueden diferenciarse y aislarse en base a su morfología (Fig5). Se contaron un promedio de 100 colonias en las poblaciones no transducidas, y transducidas con WE y SE, pudiéndose observar que la transducción con los vectores no afectó ni el número de colonias totales, ni la abundancia relativa de un tipo sobre otro (tabla 2).



Dado que las colonias mixtas están compuestas de células de más de un origen, tomamos para el estudio sólo las colonias puras, CFU-G, CFU-M y C/BFU-E, para poder aislar el efecto del promotor de 500pb sobre cada tipo celular mieloide individual.

Los estudios de microscopía revelaron diferencias sustanciales en los niveles de expresión de eGFP (analizado en función de la intensidad de fluorescencia) entre las colonias transducidas con WE. Como puede observarse en la figura 6, es evidente que el vector WE se comporta de manera diferente dependiendo del tipo de colonia, expresando bajos niveles de eGFP en colonias eritroides (BFU-E) y macrofágicas (CFU-M) y altos niveles en colonias granulocíticas (CFU-G). En cambio, las colonias transducidas con el vector control SE no presentan diferencias tangibles en expresión de eGFP.

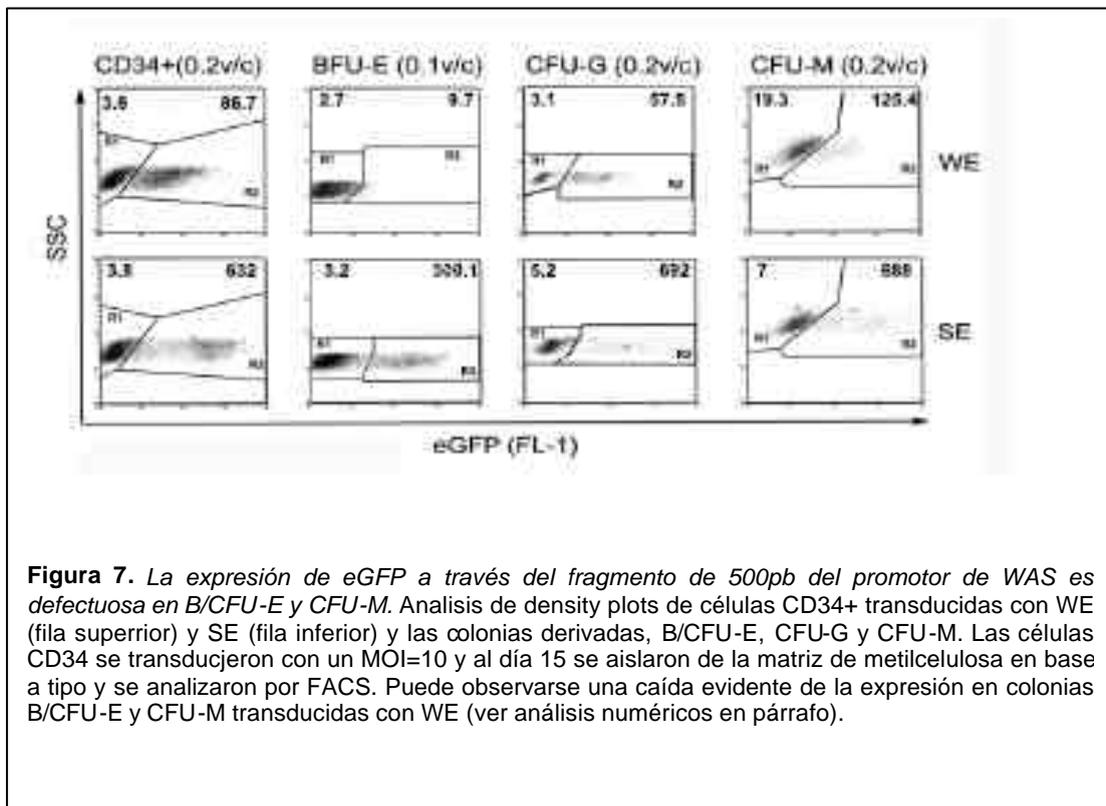


**Figura 7.** El vector WE presenta pobre expresión de eGFP en colonias eritroides y macrofágicas. La intensidad de fluorescencia (IF) de colonias B/CFU-E, CFU-M y CFU-G transducidas con WE y SE fueron comparadas utilizando los mismos settings. Puede observarse una clara bajada de la IF en colonias B/CFU-E y CFU-M transducidas con el vector WE (paneles 1 y 3, respectivamente, magnificación 60X)

Para llevar a cabo el estudio comparativo de la actividad promotora del vector WE en los distintos tipos celulares diferenciados fue necesario cuantificar las diferencias observadas por microscopía de fluorescencia. Para ello, analizamos por FACS los niveles de eGFP en CFU-G, B/CFU-E y CFU-M derivadas de células CD34+ transducidas con WE y SE. En la figura 7a se muestra el patrón de expresión en cada una de las colonias aisladas, pudiéndose observar numéricamente que efectivamente el inc-MFI obtenido con el vector WE en colonias granulocíticas (CFU-G) no varía con respecto a las células CD34+ (inc-MFI= 18,4 y 22,6 para CFU-G y CD34+, respectivamente). En cambio el inc-MFI disminuye significativamente en las colonias eritroides y macrofágicas, siendo 6,6 y 3,6 para CFU-M y BFU-E, respectivamente (figura 7, fila a). Esto significa que la actividad del VL-WAS cae 7 veces tras la diferenciación

eritropoyética de las CD34+, y 3,5 veces tras la diferenciación a macrófagos. Con el control SE no se observan diferencias significativas de expresión con respecto a las CD34+ en las colonias analizadas (figura 7, fila b). Si bien la expresión de eGFP a través de SE parece disminuir en CFU-M y BFU-E, las diferencias no son estadísticamente significativas. Es importante mencionar que para ambos vectores y en todos los casos el contenido de DNA previo y posterior a la diferenciación se mantuvo entre 0,2 – 0,1 vector/célula, permitiéndonos adjudicar las diferencias de expresión observadas a una actividad diferencial del promotor insertado.

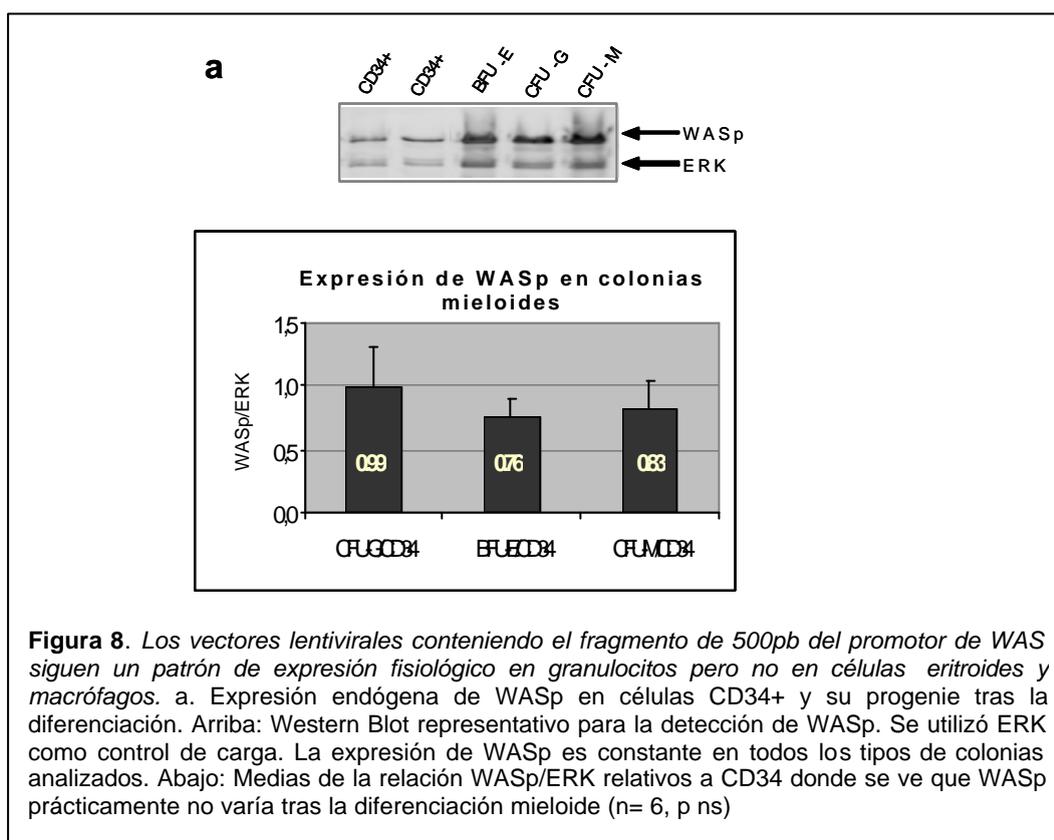
**2.d El VL-WAS presenta un patrón de expresión fisiológico en granulocitos pero no en macrófagos ni en células eritroides.**



Hasta ahora hemos demostrado que los VL-WAS tenían una expresión deficiente en ciertas líneas celulares mieloides así como en células eritrocíticas y macrofagicas derivados de CD34+. Ademas mostramos que la disminución de la expresión de eGFP en las líneas mieloides no se correlacionaba con los niveles de expresión de WASp. La cuestión ahora era determinar si la disminución de la expresión de LV-WAS en células eritroides y macrófagos se

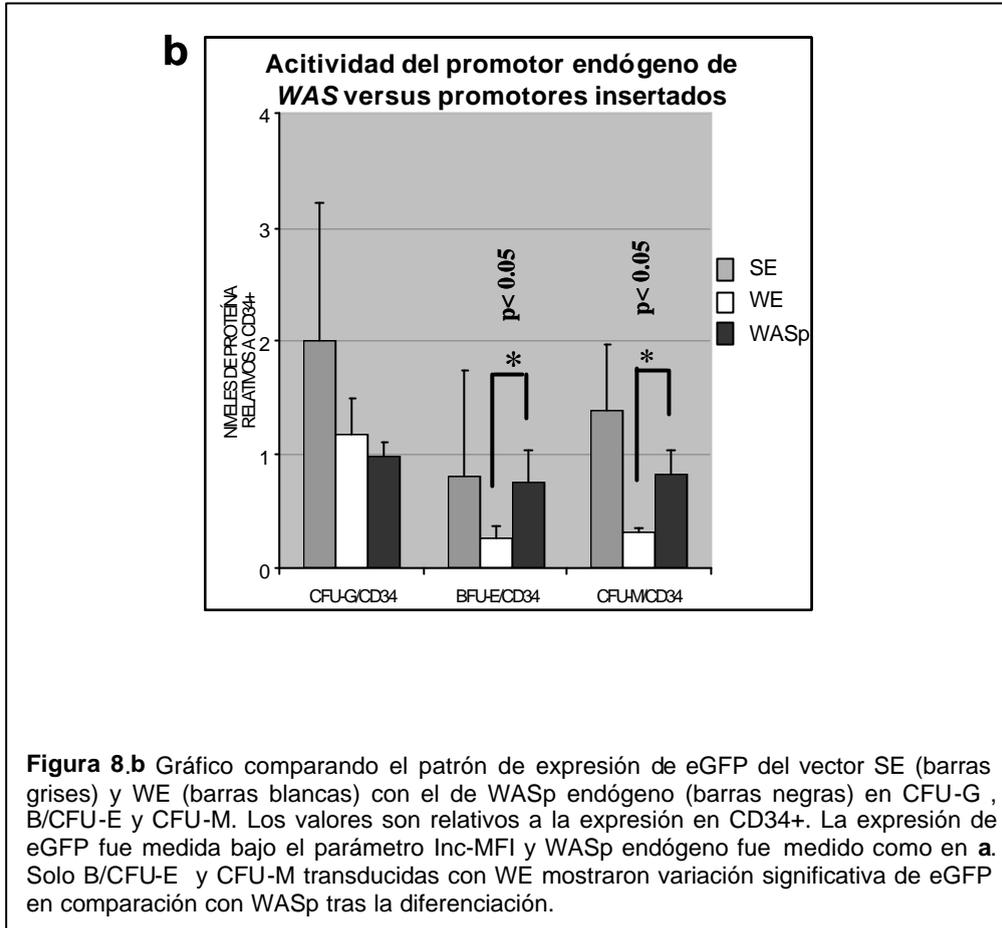
correspondía con variaciones en la expresión de WASp en estos tipos celulares.

En la figura 8a se muestra que los niveles de expresión de WASp son prácticamente constantes en las células CD34+ y en las colonias diferenciadas. De hecho, el análisis comparativo indica que la expresión de WASp no varía significativamente tras la diferenciación mieloide, siendo la relación CFU-G/CD34=1, BFU-E/CD34=0,8 y CFU-M/CD34= 0,8 (figura 8a, N=8, p=no significativa)



Una vez determinado el perfil fisiológico de WASp lo comparamos con el perfil de expresión de eGFP proveniente tanto del vector WE como de SE. Para ello, hemos calculado la relación del inc-MFI entre las mismas colonias mieloides y las células CD34+. En la figura 8b puede verse que para el vector WE, la relación entre CFU-G/CD34 en términos de incremento en MFI es cercana a 1, al igual que para WASp, sugiriendo que el promotor insertado estaría comportándose de manera fisiológica luego de la diferenciación hacia granulocitos. Sin embargo, no se observa el mismo comportamiento en macrófagos o células eritroides, ya que tanto las relaciones de inc-MFI CFU-M/CD34 y BFU-E/CD34 son de 0,27 y 0,34, respectivamente, muy diferentes

las obtenidas para WASp (BFU-E/CD34= 0,76 y CFU-M/CD34= 0,83  $p < 0,05$ ; figura 8b). Por lo tanto, no es posible descartar que el fragmento de 500 pares de bases carezca de ciertas regiones reguladoras particularmente relevantes en las rutas de diferenciación eritroide y macrofágica.



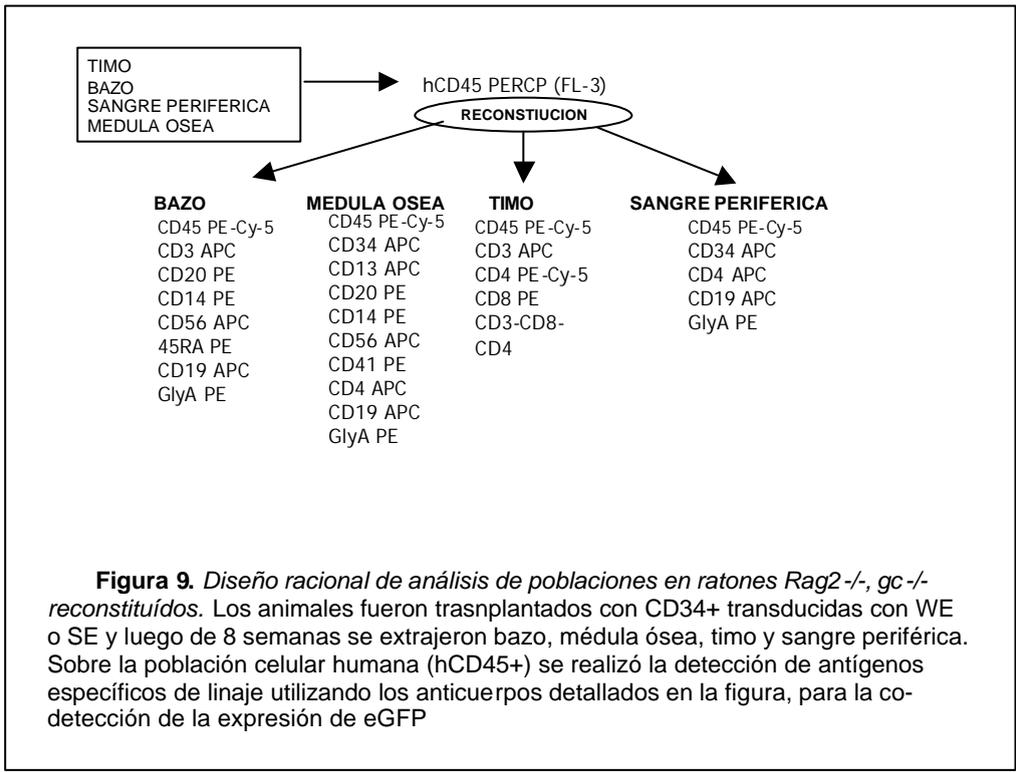
### 3- COMPORTAMIENTO DE VL-WAS EN CÉLULAS CD34+ Y EN SU PROGENIE TRAS DIFERENCIACIÓN IN VIVO.

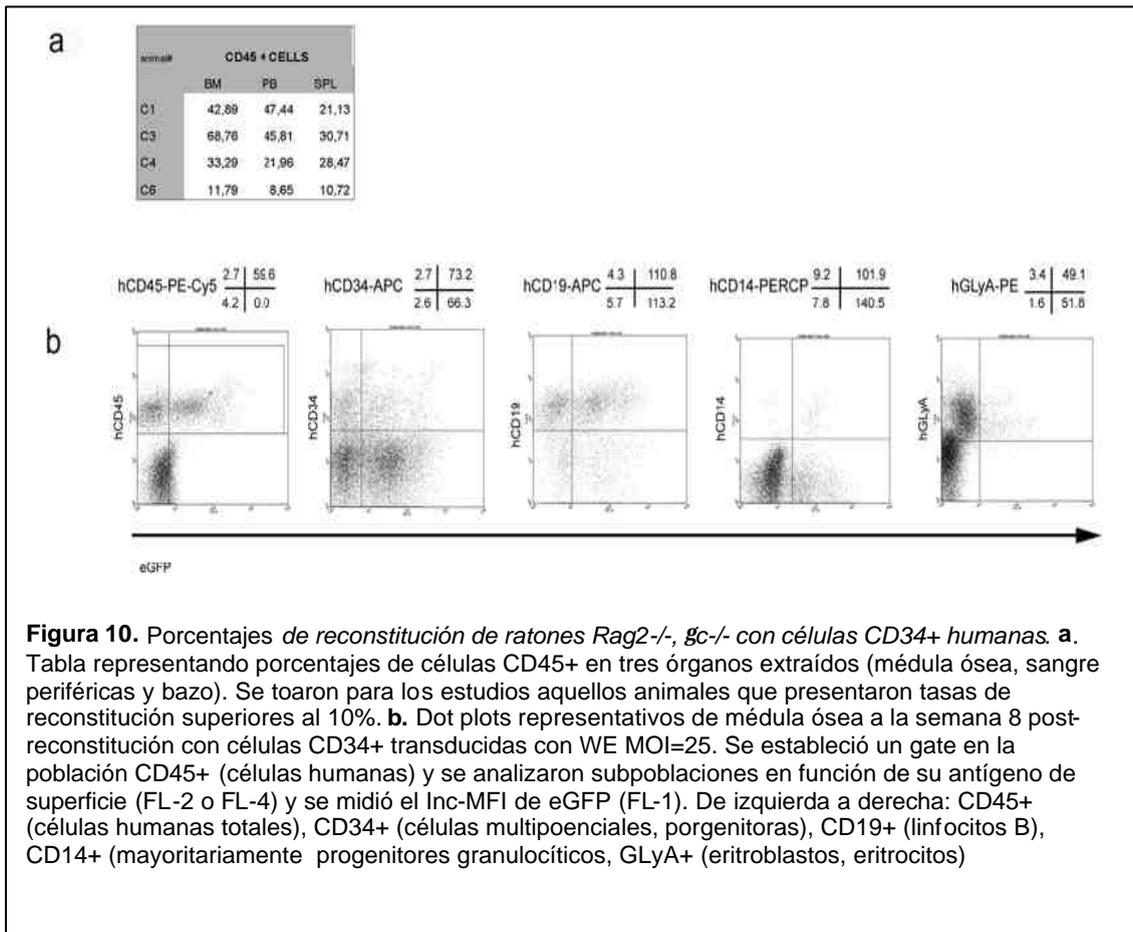
Como se ha mencionado anteriormente, uno de los tipos celulares más afectados en el WAS son las células T. Es por lo tanto relevante estudiar el comportamiento del VL-WAS en la población linfóide diferenciada a partir de células CD34+. Recientemente, se ha establecido un nuevo modelo murino, Rag2<sup>-/-</sup>,  $\gamma$ c<sup>-/-</sup>, Balbc (Gimeno, Weijer et al. 2004; Traggiai, Chicha et al. 2004), para el trasplante de células CD34+ humanas y el posterior desarrollo de un sistema hematopoyético completo y funcional. En el animal repoblado, puede

evaluarse la expresión de eGFP a través de los vectores WE y SE en las células CD34+ y en la progenie linfoide y mieloides.

**3.a LV-WAS, *in vivo*, alcanza niveles de eGFP altos y estables en el linaje linfoide y granulocitos, mientras que presenta niveles reducidos en macrófagos y eritrocitos.**

Para el análisis *in vivo*, se transdujeron células CD34+ con WE y SE con un MOI de 25. 2,5x10<sup>5</sup> células CD34+ transducidas con cada uno de los vectores fueron inyectadas intrahepáticamente en animales de 4 días de edad, previa irradiación subletal. Tras 8 semanas se extrajeron médula ósea, timo, bazo y sangre periférica y se determinó el fenotipo de las distintas células linfoides y mieloides, así como de subpoblaciones tímicas, por FACS (Figura 9). Se tomaron en cuenta aquellos animales con tasas de reconstitución superiores al 10%, a través de la detección del antígeno humano CD45 (Figura 10).

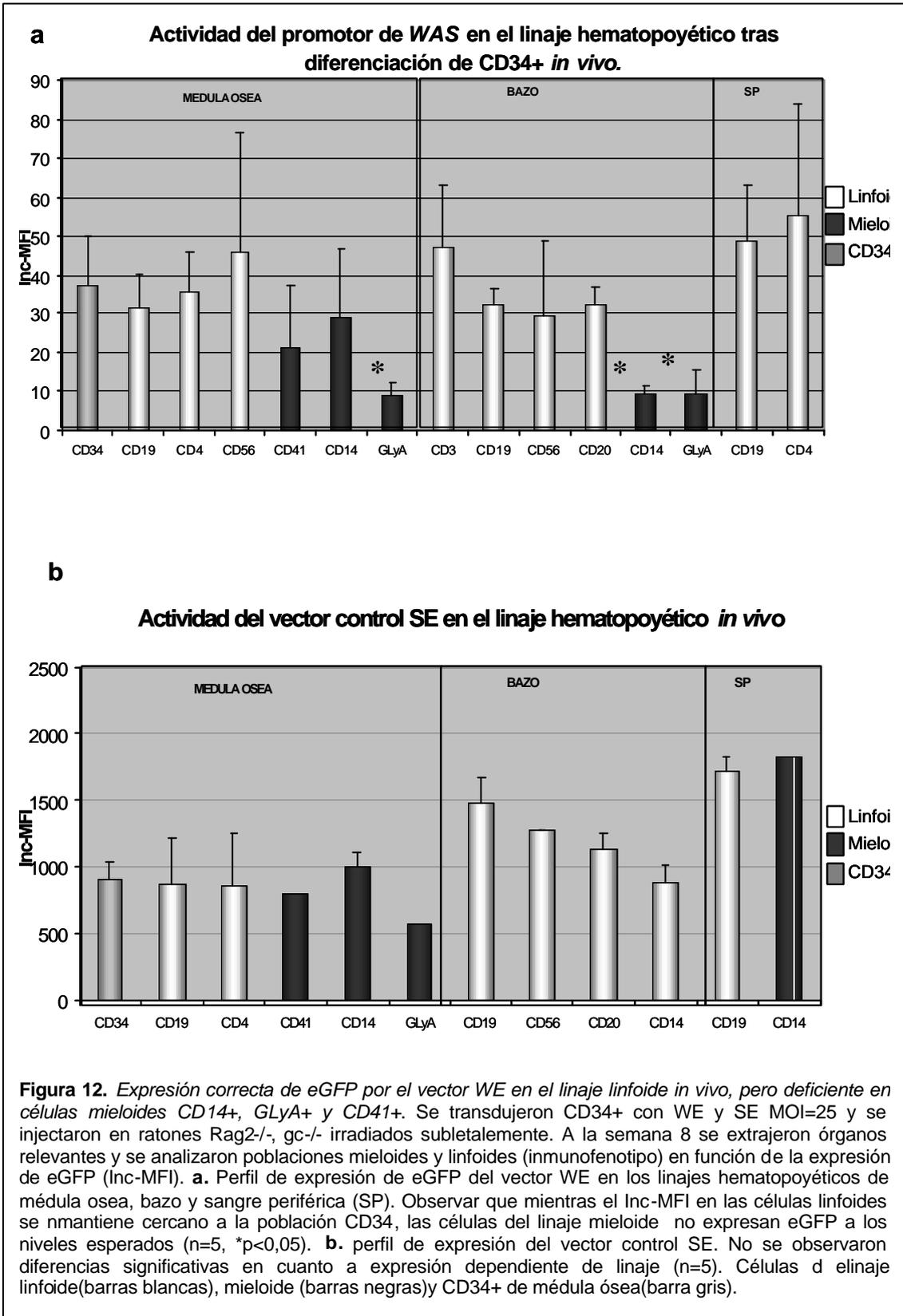




El estudio comparativo de los niveles de expresión de eGFP de los vectores WE y SE en los diferentes tipos mieloides y linfoides se encuentra en la figura 11. Las barras negras y blancas representan células humanas de linajes mieloides y linfoides, respectivamente, mientras que la barra gris representa a las células CD34<sup>+</sup> aisladas de médula ósea. Hemos observado diferencias de expresión dependientes de tipo celular: El inc-MFI alcanzado por WE fue sistemáticamente mayor en células linfoides que en mieloides, tanto en médula ósea, bazo o sangre periférica (figura 11a), mientras que el vector SE no mostró diferencias de expresión dependientes de linaje (figura 11b). Con el vector WE el inc-MFI en linfocitos T (CD4<sup>+</sup>), B (CD19<sup>+</sup>) y células NK (CD56<sup>+</sup>) fue de 35,6, 31,6 y 46,2, respectivamente, cercano al que presentan las células CD34<sup>+</sup> en ese mismo tejido (inc-MFI=37,2). Este resultado sugiere que WE podría estar regulado correctamente antes y después de la diferenciación linfoides *in vivo*.

Con respecto al linaje mieloides, al igual que habíamos observado *in vitro*, detectamos una menor expresión en células eritroides (GLyA<sup>+</sup>) y macrófagos

de bazo (S-CD14+) (Figura 11 a, barras negras). De hecho, la relación entre el inc-MFI de GLyA/CD34 es de 0,27, igual al obtenido *in vitro* en las colonias eritroides BFU-E (Figura 8b: inc-MFI BFU-E/CD34= 0,27). De manera similar, en los S-CD14 se detectó una caída de la expresión de eGFP de 4 veces con respecto a los niveles de expresión de las CD34+ ( $p < 0,05$ ). Estos datos están de acuerdo con los anteriormente obtenidos *in vitro*, en las colonias macrofágicas CFU-M. Sin embargo, al analizar la población CD14+ de médula ósea encontramos diferencias con respecto a las S-CD14, ya que la primera presenta niveles de eGFP similares a los de las células CD34 (inc-MFI CD14 de médula ósea/CD34= 0,9, figura 11 a). Estas discrepancias entre poblaciones CD14+ de médula ósea y bazo pueden explicarse por el hecho de que en médula ósea dicho marcador es compartido por progenitores granulocíticos, granulocitos maduros y monocitos, mientras que en el bazo la población CD14+ caracteriza a macrófagos residentes de la pulpa blanca. Eso explica porqué el VL-WAS en las S-CD14 se comporta de la misma manera que en las colonias macrofágicas *in vitro*. Cabe agregar que la disminución de la expresión en megacariocitos (CD41+) no fue estadísticamente significativa. El perfil de expresión de eGFP a través del vector control SE en las células CD34+ y en los linajes mieloide y linfoide, no varía significativamente entre ambos linajes (figura 11b). Estos resultados evidencian que, aun siendo adecuada la *performance* del vector WE en la línea linfoide, es necesaria una optimización de la expresión del transgén tras la diferenciación de las CD34+ a células eritroides y macrófagos.



#### **4- MEJORA DE VL-WAS MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE NUEVAS SECUENCIAS REGULADORAS**

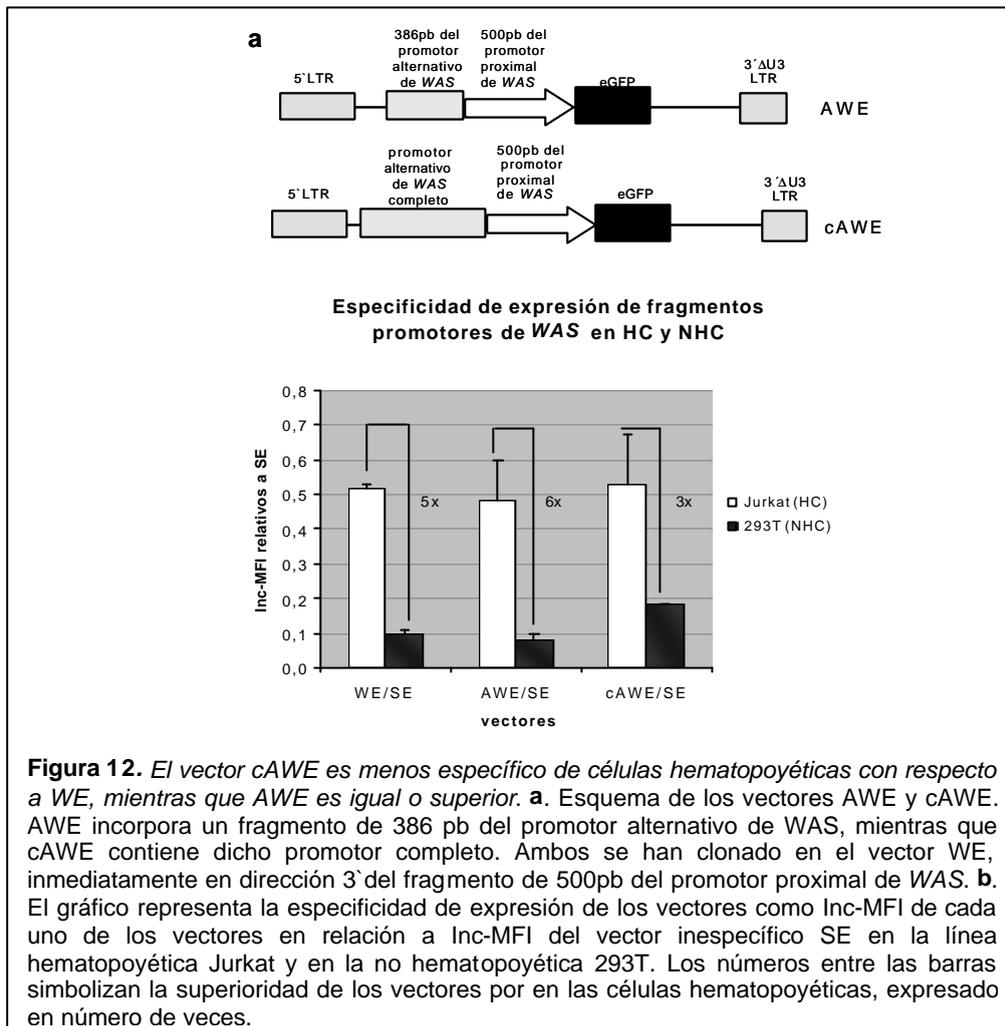
La evidencia de la limitación de VL-WAS de mantener los niveles de expresión en eritrocitos y macrófagos tanto *in vitro* como *in vivo* nos llevó a diseñar nuevas construcciones con el fin de mejorar el perfil de expresión en dichas células. Se han descrito dos promotores que controlan la expresión del gen WAS. El VL-WAS contiene un fragmento de 500 pb del promotor proximal de WAS, y se demostró que tanto dicho fragmento como la versión completa del fragmento proximal se comportan de la misma manera en un entorno lentiviral {Charrier, 2007 #1109}. El segundo fragmento promotor consta de 600pb y esta menos caracterizado, aunque por estudios *in silico* se le asoció un rol en la diferenciación hematopoyética al linaje mielóide preferentemente {Hagemann, 1999 #1065}.

##### **4.a Efecto de la incorporación de diferentes fragmentos del promotor alternativo de WAS en la especificidad hematopoyética de los vectores LV-WAS.**

Teniendo en cuenta la presencia de sitios potenciales de unión a factores de transcripción involucrados en diferenciación mielóide en el promotor alternativo, se construyeron dos vectores, uno conteniendo el promotor alternativo completo (cAWE) y otro conteniendo un fragmento de 386 pares de bases del mismo (AWE). En ambos vectores los fragmentos se clonaron inmediatamente en dirección 3' del fragmento de 500 pb del promotor proximal presente en el vector WE, con la idea de generar un cassette de expresión con dos promotores en tándem (Figura 12a).

Como primer requisito investigamos si la presencia de estos fragmentos comprometían o no la especificidad hematopoyética. Se transdujeron líneas celulares hematopoyéticas y no hematopoyéticas (Jurkat y 293T, respectivamente) con los vectores WE, AWE, cAWE y el control inespecífico SE. En la figura 12b puede observarse que, en comparación con WE, el fragmento de 386pb unido al fragmento proximal de 500pb (AWE) no afectó

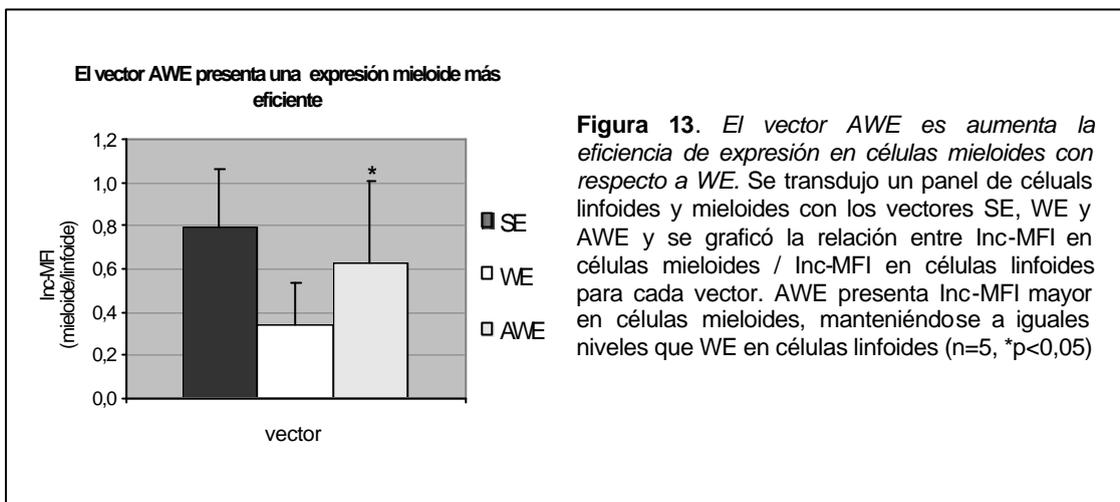
negativamente la especificidad hematopoyética. Si analizamos el comportamiento de cAWE puede observarse que la especificidad disminuye a la mitad, a expensas de un aumento de la expresión en la línea 293T. Por esta



razón excluimos al vector cAWE de estudios posteriores.

#### 4.b Vectores VL-WAS incorporando un fragmento de 386pb del promotor alternativo (AWE) mejora la expresión de eGFP en líneas celulares mieloides.

Seguidamente llevamos a cabo la transducción de un amplio panel de líneas celulares mieloides y linfoides con el objetivo de evaluar el comportamiento de AWE con respecto a al vector WE. En la figura 13 puede observarse que el vector AWE es significativamente más eficiente en células mieloides que el vector WE ( $p < 0,05$ ), manteniendo la misma efectividad en células linfoides.

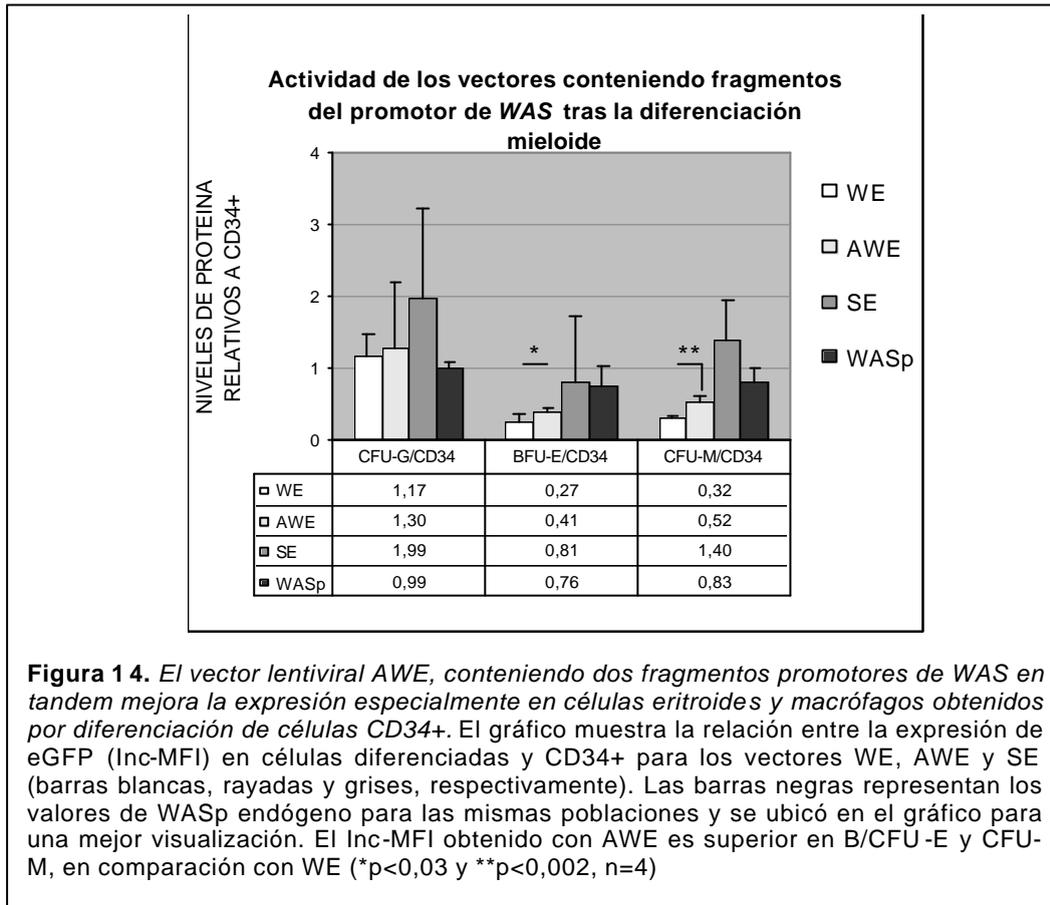


#### 4.c El vector AWE aumenta la estabilidad de la expresión tras la diferenciación a células eritroides y macrófagos..

Para corroborar que la presencia del fragmento de 386pb del promotor alternativo mejora el patrón de expresión en el linaje mieloides, se transdujeron células CD34+ aisladas de cordón umbilical con AWE y, junto con WE y SE, se analizó la eficiencia de transducción y el perfil de expresión en colonias diferenciadas de metilcelulosa, en comparación con los niveles endógenos de WASp.

La incorporación de fragmento del promotor alternativo en el vector lentiviral (AWE) resultó en un aumento del inc-MFI en todas las colonias diferenciadas, en comparación con WE (figura 14). De manera interesante observamos que mientras la expresión de eGFP cayó 4 veces tras la diferenciación eritroide con el vector WE, solo bajó 2,5 veces con AWE; y en macrófagos la expresión de eGFP bajó 3 veces con WE y 2 veces con AWE. Es decir se que al pasar de WE a AWE se logró un aumento de 0,27 a 0,40 en la relación BFU-E/CD34 ( $p < 0,03$ ), y un aumento de 0,32 a 0,50 en la relación CFU-M/CD34 ( $p < 0,001$ ). Los incrementos en ambas poblaciones acercan los perfiles de expresión de eGFP a los de WASp endógeno (figura 14). Es importante notar que la relación de inc-MFI entre granulocitos y CD34+ no aumentó ostensiblemente, lo cual es

un punto positivo dado que ya el vector WE había alcanzado niveles similares a los de WASp en esa población, y por lo tanto mayores niveles expresados por AWE podrían considerarse como sobre-expresión. Por otro lado, puede observarse que la expresión de eGFP a través del promotor SFFV (vector SE) es en todos los casos mayor a los esperados en relación WASp endógeno, lo cual apoya la necesidad de contar con vectores de expresión específica de tejido y controlada.



## CONCLUSIONES

I- LA PRESENCIA DEL ELEMENTO ENHANCER WPRE INFLUYE DE FORMA NEGATIVA SOBRE LA ESPECIFICIDAD HEMATOPOYÉTICA DE LOS VL-WAS.

II- LA EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN A TRAVÉS DEL FRAGMENTO DE 500pb DEL PROMOTOR DE WAS EN UN ENTORNO LENTIVIRAL DISMINUYE TRAS LA DIFERENCIACIÓN MIELOIDE *IN VITRO*, A EXPENSAS DE LAS CÉLULAS ERITROIDES Y MACRÓFAGOS.

III- *IN VIVO*, LA EXPRESION DEL TRANSGÉN POR VL-WAS ES SUPERIOR EN EL LINAJE LINFOIDE Y SE REPRODUCE EL PERFIL DE EXPRESION MIELOIDE OBSERVADO *IN VITRO*.

IV- LA INCORPORACIÓN DE UN FRAGMENTO DE 386pb DEL PROMOTOR ALTERNATIVO DE WAS, ENRIQUECIDO EN SECUENCIAS DE UNIÓN A FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN MIELOIDE, AUMENTA LA EXPRESIÓN DEL TRANSGÉN EN LOS TIPOS CELULARES CRÍTICOS, ACERCANDO EL COMPORTAMIENTO GLOBAL DEL VECTOR HACIA LO FISIOLÓGICO,

## CONCLUSIONS

I- THE WPRE ENHANCER ELEMENT EXERTS A NEGATIVE EFFECT OVER THE HAEMATOPOIETIC SPECIFICITY OF VL-WAS VECTOR.

II- eGFP EXPRESSION THROUGH THE 500bp FRAGMENT OF THE WAS PROXIMAL PROMOTER DECREASES AFTER *IN VITRO* MYELOID DIFFERENTIATION OF HSCs, DUE TO A LIMITATION IN ERYTHROID CELLS AND MACROPHAGES.

III- WE BEHAVES IN A WAY SIMILAR TO ENDOGENOUS WAS PROMOTER IN *IN VIVO* - GENERATED LYMPHOID CELLS AND REPRODUCES THE *IN VITRO*-MYELOID PROFILE .

IV- THE ADDITION OF A 386bp FRAGMENT OF THE WAS ALTERNATIVE PROMOTER IMPROVES TRANSGENE EXPRESSION LEVELS IN ERYTHROID CELLS AND MACROPHAGES, THUS APPROACHING A PHYSIOLOGIC BEHAVIOUR.

## DISCUSSION

La terapia génica de desórdenes hematopoyéticos tales como el Síndrome de Wiskott-Aldrich necesita vectores eficientes, cuya expresión sea regulada fisiológicamente. La expresión de la proteína (WASp) está restringida a las células del linaje hematopoyético, abarcando desde las células multipotenciales CD34+ hasta la progenie diferenciada completa (Derry, Ochs et al. 1994; Stewart, Treiber-Held et al. 1996; Parolini, Berardelli et al. 1997). Petrella (Petrella, Doti et al. 1998) y Hagemann (Hagemann and Kwan 1999) han demostrado que la región promotora del gen *WAS*, que incluye las bases -137 a +33, es suficiente para conferir una expresión específica de linaje hematopoyético. Entre las células diana para la terapia génica de *WAS* la población multipotencial CD34+ es la más idónea (Eckfeldt, Mendenhall et al. 2005). Pueden ser fácilmente expandidas *ex vivo* y modificadas por vectores retrovirales (Bodine, Karlsson et al. 1989; Bodine, Orlic et al. 1992; Petzer, Zandstra et al. 1996; Bhatia, Bonnet et al. 1997; Glimm and Eaves 1999) y reconstituyen el sistema hematopoyético completo de un individuo luego de una ronda de trasplante (Cavazzana-Calvo, Hacein-Bey et al. 2000; Aiuti, Slavin et al. 2002; Ott, Schmidt et al. 2006). Por esta razón un vector diseñado para la transducción de células CD34+ debe mantener los niveles de expresión del transgén a lo largo de la hematopoyesis, a la vez otorgando niveles adecuados del transgén dependiendo de la célula en la que se encuentre. El objetivo de este trabajo de tesis fue el de estudiar y mejorar el comportamiento de un vector que contiene un fragmento promotor ya descrito, el fragmento de 500pb del promotor proximal de *WAS* (Hagemann and Kwan 1999) y que, en el contexto del vector original (WW) demostramos que expresa el transgén terapéutico de manera fisiológica y específica de tejido hematopoyético (Devriendt, Kim et al. 2001). Para ello, y dada la limitación de células CD34+ de cordón umbilical de pacientes *WAS*, fue necesaria una modificación estructural del vector original WW (Martin, Toscano et al. 2005), que consistió en cambiar el transgén terapéutico (cDNA de *WAS*) por el gen reportero eGFP (vector WE). De esta manera fue posible monitorizar la actividad de expresión del fragmento promotor a través de los niveles de eGFP, y por comparación con el

perfil de expresión de WASp endógeno se determinó si el comportamiento del promotor insertado es o no fisiológico.

En primer lugar mostramos que la expresión de eGFP a través del vector fragmento de 500 pb del promotor proximal de WAS estaba disminuida en líneas celulares mieloides en comparación con las linfoides, indicando que dicho promotor podría ser defectuoso en ese linaje celular. Naturalmente, los resultados obtenidos en líneas celulares son sólo indicativos de lo que podría estar sucediendo en células primarias. Por ello, estudiamos la expresión de eGFP en células CD34+ obtenidas de sangre de cordón umbilical y en la progenie mieloide y linfoide que de ella deriva. Por un lado utilizamos un método de diferenciación *in vitro* en matriz de metilcelulosa, que permite el desarrollo de la serie mieloide completa. Los estudios *in vivo* se realizaron mediante reconstitución de ratones Rag2<sup>-/-</sup>,  $\gamma$ c<sup>-/-</sup>, modelo recientemente establecido, que permite el trasplante de células CD34+ humanas y el subsecuente desarrollo de un sistema hematopoyético completo, con los linajes linfoides y mieloides, y órganos linfoides primarios y secundarios (Gimeno, Weijer et al. 2004; Traggiai, Chicha et al. 2004).

Los estudios de diferenciación *in vivo* demostraron que el vector WE expresa el transgén en linfocitos T, linfocitos B y células NK a los mismos niveles que las células CD34+ residentes en médula ósea. Estos datos estarían de acuerdo con el hecho de que el contenido de mRNA de WAS en todas estas células es constante (Parolini, Berardelli et al. 1997). Estos resultados, unidos que WASp endógeno tampoco varió en linfocitos T maduros y linfocitos B con respecto a CD34+, y que para alcanzar niveles de WASp normales en células WAS<sup>-/-</sup> es necesario sólo 1,5 copias del vector (Martin, Toscano et al. 2005), podemos inferir que el fragmento de 500pb del promotor proximal de WAS en un entorno lentiviral se comporta de manera fisiológica en células linfoides.

Por el contrario, WE no se comportó de manera fisiológica en todo el linaje mieloide. El método de diferenciación en metilcelulosa permitió aislar selectivamente colonias de distinto origen, como eritroides, macrófagicas y granulocíticas, para poder comparar la expresión del transgén y el contenido de WASp endógeno. Hemos determinado que el fragmento de 500pb presente en el vector WE es suficiente para alcanzar niveles fisiológicos del transgén sólo en colonias granulocíticas, ya que el patrón de expresión de eGFP se

correlacionó con el de WASp endógeno tras la diferenciación. Sin embargo, este vector mostró una disminución en la expresión de eGFP luego de ocurrida la diferenciación de las células CD34+ hacia monocitos/macrófagos y hacia células eritroides, lo cual no se correlacionó con el perfil de WASp endógeno. Estos resultados fueron reproducidos *in vivo*, donde el vector WE mostró deficiencias estadísticamente significativas en cuanto a la expresión en células macrofágicas y eritroides. Los experimentos de reconstitución nos permitieron, además, evidenciar una caída en la expresión luego de la diferenciación a megacariocitos.

Estos resultados nos llevaron a estudiar más en detalle el comportamiento del promotor de WAS, con el objetivo de mejorar los niveles de expresión en aquellos tipos celulares. El gen WAS humano está sometido a regulación transcripcional por dos fragmentos promotores. Un fragmento de 1,1 kilobases, situado justo antes del sitio de inicio de la transcripción, denominado fragmento proximal, y otro fragmento, ubicado a 6 kilobases en dirección 3' de éste, denominado promotor alternativo de WAS. El primero está bien caracterizado (Hagemann and Kwan 1999) y está enriquecido en gran cantidad de sitios de unión de factores de transcripción como Ets, PU.1, c-Rel, RelA, Sp1, relacionados con la especificidad y la diferenciación (Petrella, Doti et al. 1998; Friedman, Keefer et al. 2003; Liu, Keefer et al. 2003; Iwasaki, Somoza et al. 2005). Estudios recientes demostraron que tanto la versión corta de 500 pares de bases del fragmento proximal como el promotor proximal completo de 1,1 kb se comportan de la misma manera en un entorno lentiviral (Charrier, Dupre et al. 2006). Por otro lado, el promotor alternativo de WAS tiene una extensión de 600 pares de bases y está menos estudiado, aunque se ha postulado su relevancia en la diferenciación mieloide por estudios *in silico* (Hagemann and Kwan 1999). Por ello incluimos en nuestros vectores lentivirales la versión completa del promotor alternativo de WAS (generando el vector cAWE) y un fragmento de 386 pares de bases del mismo, especialmente enriquecido en secuencias de unión a factores de transcripción de diferenciación mieloide (vector AWE). En ambos vectores los fragmentos se clonaron inmediatamente en dirección 3' del fragmento proximal de 500 pb del vector WE, generando un cassette de expresión con los dos promotores en tándem. Fueron estudiados en términos de especificidad de expresión arrojando resultados dispares.

Mientras que la presencia del fragmento corto de 386 pb aumentó levemente la especificidad hematopoyética con respecto al vector original WE, la unión de la versión completa del promotor alternativo junto al fragmento de 500 pb del promotor proximal resultó en una disminución a la mitad de la especificidad. Dado que WASp endógeno se expresa sólo en el linaje hematopoyético, para evitar efectos secundarios derivados de la expresión ectópica, es de crucial relevancia contar con vectores altamente específicos de células hematopoyéticas. Por tanto se excluyó del estudio al vector conteniendo la versión completa del promotor alternativo de WAS (cAWE).

La construcción del vector AWE resultó en una mejor expresión en líneas celulares mieloides con respecto a WE. En células primarias derivadas de CD34+ el vector AWE aumentó significativamente la expresión de eGFP en monocitos/macrófagos y en células eritroides, punto débil que evidenció el vector WE. Es importante añadir que AWE no modificó sustancialmente la expresión de eGFP en granulocitos, lo cual es un punto positivo dado que el vector WE ya alcanzaba niveles fisiológicos de expresión en este tipo celular. Los resultados sugieren la presencia de un efecto, sino cooperativo, al menos aditivo de los dos fragmentos promotores que resultan en una mejor expresión del transgén en monocitos/macrófagos y células eritroides.

Por último podemos concluir que el presente trabajo brinda nueva información acerca del comportamiento fisiológico del fragmento promotor de 500 pares de bases de WAS, la cual es de gran utilidad para el diseño racional de vectores lentivirales para la terapia génica del Síndrome de Wiskot-Aldrich. Proponemos la incorporación del fragmento de 386pb del promotor alternativo de WAS para la optimización de la expresión en monocitos/macrófagos y células eritroides diferenciadas a partir de células CD34+, dos tipos celulares íntimamente relacionados a la etiopatogenia de la enfermedad y, por ende, dianas de reconstitución.

## PUBLICACIONES

## PUBLICACIONES EN EL ÁREA DE TERAPIA GÉNICA Y CELULAR

- **Frecha C**, Verhoeyen E, Toscano, M, Costa, C, Saez-Lara, M.J., Cosset FL and Martin F. Lentiviral Vectors For Wiskott-Aldrich Syndrome Gene Therapy That Mimic Endogenous Expression Profiles Throughout Haematopoiesis. Enviado para su publicación en la revista Gene Therapy (Abril 2007)
- Toscano MG, **Frecha C**, Benabdellah, K, Cobo, M, Blundell, M, Thrasher, A.J., García-Olivares, E, Molina, I.J. and Martin F. Haematopoietic-Specific lentiviral vectors for Wiskott-Aldrich Syndrome gene therapy : Analysis of the potential safety benefits. Enviado para su publicación en la revista Gene Therapy (Marzo 2007)
- Sáez-Lara-MJ, **Frecha C**, Martín F, Rosa M., Santisteban-Bailón, Abadía F, Gil A, Fontana L. Transplantation of human CD34+ stem cells from umbilical cord blood to rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis. Xenotransplantation, 2006 Nov;13(6):529-35 .
- Nuria Andreu, Maricruz García-Rodríguez, Victor Volpini, **Cecilia Frecha**, Ignacio J.Molina, Gumersindo Fontan and Cristina Fillat. A novel WASP complex mutation identified in a WAS patient results in an aberrant product at the C-terminus from two transcripts with unusual polyA signals. J. Hum. Genet, 2006;51(2):92-7.
- Martin F, Toscano M, Blundell M, **Frecha C**, Srivastava G, Santamaria M, Thrasher A, Molina I. Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by wasp gene proximal promoter sequences restore Wiskott-Aldrich Syndrome defects. Gene Ther. 2005 Apr;12(8):715-23.

- Toscano MG, **Frecha C**, Ortega C, Santamaria M, Martin F, Molina IJ. Efficient lentiviral transduction of Herpesvirus saimiri immortalized T cells as a model for gene therapy in primary immunodeficiencies Gene Ther. 2004 Jun;11(12):956-61.

#### PUBLICACIONES EN EL ÁREA DE INMUNOLOGÍA

- Munoz-Fernandez R, Blanco FJ, **Frecha C**, Martin F, Kimatrai M, Abadia-Molina AC, Garcia-Pacheco JM, Olivares EG. Follicular dendritic cells are related to bone marrow stromal cell progenitors and to myofibroblasts. J Immunol. 2006 Jul 1;177(1):280-9.
- Olmos, S. Blois, **C. Frecha**, G. Marquez and M.E. Roux. Cytokines mediating inflammation in a model of secondary immunodeficiency in wistar rats: immunomodulation triggered by thymomodulins. J.Inflammation 2006 Nov, ;4 (2) : 29-39
- Delettieres D, **Frecha C**, Roux ME. Early appearance of TNF-alpha and other cytokines in bronchus associated lymphoid tissues (BALT) from growing Wistar rats. What is the role of TNF-alpha? Clin Dev Immunol. 2004 Sep-Dec;11(3-4):253-9.
- Roux, M.E., Marquez, M.G., Olmos S., **Frecha C**. and Florin - Christensen, A. Compartmentalisation between gut and lung mucosae in a model of secondary immunodeficiency. Effect of Thymomodulin. Int J Immunopathol Pharmacol. 2003 May-Aug;16(2):151-6.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abeyta, M. J., A. T. Clark, et al. (2004). "Unique gene expression signatures of independently-derived human embryonic stem cell lines." Hum Mol Genet **13**(6): 601-8.
- Ailles, L., M. Schmidt, et al. (2002). "Molecular evidence of lentiviral vector-mediated gene transfer into human self-renewing, multi-potent, long-term NOD/SCID repopulating hematopoietic cells." Mol Ther **6**(5): 615-26.
- Ailles, L. E. and L. Naldini (2002). "HIV-1-derived lentiviral vectors." Curr Top Microbiol Immunol **261**: 31-52.
- Aiuti, A., S. Slavin, et al. (2002). "Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning." Science **296**(5577): 2410-3.
- Akashi, K., D. Traver, et al. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-7.
- Amann, K. J. and T. D. Pollard (2001). "The Arp2/3 complex nucleates actin filament branches from the sides of pre-existing filaments." Nat Cell Biol **3**(3): 306-10.
- Amsellem, S., E. Ravet, et al. (2002). "Maximal lentivirus-mediated gene transfer and sustained transgene expression in human hematopoietic primitive cells and their progeny." Mol Ther **6**(5): 673-7.
- Antonchuk, J., G. Sauvageau, et al. (2002). "HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo." Cell **109**(1): 39-45.
- Badour, K., J. Zhang, et al. (2003). "The Wiskott-Aldrich syndrome protein: forging the link between actin and cell activation." Immunol Rev **192**: 98-112.
- Balague, C., J. Zhou, et al. (2000). "Sustained high-level expression of full-length human factor VIII and restoration of clotting activity in hemophilic mice using a minimal adenovirus vector." Blood **95**(3): 820-8.
- Barda-Saad, M., A. Braiman, et al. (2005). "Dynamic molecular interactions linking the T cell antigen receptor to the actin cytoskeleton." Nat Immunol **6**(1): 80-9.
- Barker, J. N., S. M. Davies, et al. (2001). "Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis." Blood **97**(10): 2957-61.
- Barker, J. N. and J. E. Wagner (2003). "Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer." Nat Rev Cancer **3**(7): 526-32.
- Baum, C., J. Dullmann, et al. (2003). "Side effects of retroviral gene transfer into hematopoietic stem cells." Blood **101**(6): 2099-114.
- Berrios, V. M., G. J. Dooner, et al. (2001). "The molecular basis for the cytokine-induced defect in homing and engraftment of hematopoietic stem cells." Exp Hematol **29**(11): 1326-35.
- Bhatia, M., D. Bonnet, et al. (1997). "Quantitative analysis reveals expansion of human hematopoietic repopulating cells after short-term ex vivo culture." J Exp Med **186**(4): 619-24.
- Bodine, D. M., S. Karlsson, et al. (1989). "Combination of interleukins 3 and 6 preserves stem cell function in culture and enhances retrovirus-mediated gene transfer into hematopoietic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(22): 8897-901.
- Bodine, D. M., D. Orlic, et al. (1992). "Stem cell factor increases colony-forming unit-spleen number in vitro in synergy with interleukin-6, and in vivo in Sl/Sld mice as a single factor." Blood **79**(4): 913-9.

- Bradley, J. A., E. M. Bolton, et al. (2002). "Stem cell medicine encounters the immune system." Nat Rev Immunol **2**(11): 859-71.
- Broker, B. M., M. S. Kraft, et al. (1997). "Activation induces apoptosis in Herpesvirus saimiri-transformed T cells independent of CD95 (Fas, APO-1)." Eur J Immunol **27**(11): 2774-80.
- Brown, M. P., D. J. Topham, et al. (1998). "Thymic lymphoproliferative disease after successful correction of CD40 ligand deficiency by gene transfer in mice." Nat Med **4**(11): 1253-60.
- Broxmeyer, H. E. and S. Cooper (1997). "High-efficiency recovery of immature haematopoietic progenitor cells with extensive proliferative capacity from human cord blood cryopreserved for 10 years." Clin Exp Immunol **107 Suppl 1**: 45-53.
- Broxmeyer, H. E., G. W. Douglas, et al. (1989). "Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(10): 3828-32.
- Broxmeyer, H. E., G. Hangoc, et al. (1992). "Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(9): 4109-13.
- Buchschacher, G. L., Jr. and F. Wong-Staal (2000). "Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases." Blood **95**(8): 2499-504.
- Burns, S., S. J. Hardy, et al. (2004). "Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence." Cell Motil Cytoskeleton **57**(2): 118-32.
- Buske, C., M. Feuring-Buske, et al. (2002). "Deregulated expression of HOXB4 enhances the primitive growth activity of human hematopoietic cells." Blood **100**(3): 862-8.
- Calvi, L. M., G. B. Adams, et al. (2003). "Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche." Nature **425**(6960): 841-6.
- Calle, Y., G. E. Jones, et al. (2004). "WASp deficiency in mice results in failure to form osteoclast sealing zones and defects in bone resorption." Blood **103**(9): 3552-61.
- Cannon, J. L., C. M. Labno, et al. (2001). "Wasp recruitment to the T cell:APC contact site occurs independently of Cdc42 activation." Immunity **15**(2): 249-59.
- Cavazzana-Calvo, M. and A. Fischer (2004). "Efficacy of gene therapy for SCID is being confirmed." Lancet **364**(9452): 2155-6.
- Cavazzana-Calvo, M. and S. Hacein-Bey-Abina (2001). "Correction of genetic blood defects by gene transfer." Curr Opin Hematol **8**(6): 360-7.
- Cavazzana-Calvo, M., S. Hacein-Bey, et al. (2000). "Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease." Science **288**(5466): 669-72.
- Cosset, F. L., F. J. Morling, et al. (1995). "Retroviral retargeting by envelopes expressing an N-terminal binding domain." J Virol **69**(10): 6314-22.
- Cosset, F. L. and S. J. Russell (1996). "Targeting retrovirus entry." Gene Ther **3**(11): 946-56.
- Charrier, S., L. Dupre, et al. (2006). "Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients." Gene Ther.
- Charrier, S., L. Dupre, et al. (2007). "Lentiviral vectors targeting WASp expression to hematopoietic cells, efficiently transduce and correct cells from WAS patients." Gene Ther **14**(5): 415-28.
- Charrier, S., D. Stockholm, et al. (2005). "A lentiviral vector encoding the human Wiskott-Aldrich syndrome protein corrects immune and cytoskeletal defects in WASP knockout mice." Gene Ther **12**(7): 597-606.

- Chinnasamy, N., D. Chinnasamy, et al. (2000). "Efficient gene transfer to human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells using human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vectors." Hum Gene Ther **11**(13): 1901-9.
- Dao, M. A., J. Arevalo, et al. (2003). "Reversibility of CD34 expression on human hematopoietic stem cells that retain the capacity for secondary reconstitution." Blood **101**(1): 112-8.
- Dardalhon, V., B. Herpers, et al. (2001). "Lentivirus-mediated gene transfer in primary T cells is enhanced by a central DNA flap." Gene Ther **8**(3): 190-8.
- Daubenberger, C. A., B. Nickel, et al. (2001). "Herpesvirus saimiri transformed T cells and peripheral blood mononuclear cells restimulate identical antigen-specific human T cell clones." J Immunol Methods **254**(1-2): 99-108.
- Davies, W. A. and T. P. Stossel (1977). "Peripheral hyaline blebs (podosomes) of macrophages." J Cell Biol **75**(3): 941-55.
- de Noronha, S., S. Hardy, et al. (2005). "Impaired dendritic-cell homing in vivo in the absence of Wiskott-Aldrich syndrome protein." Blood **105**(4): 1590-7.
- Demaison, C., K. Parsley, et al. (2002). "High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of immunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter." Hum Gene Ther **13**(7): 803-13.
- Derry, J. M., H. D. Ochs, et al. (1994). "Isolation of a novel gene mutated in Wiskott-Aldrich syndrome." Cell **78**(4): 635-44.
- Devriendt, K., A. S. Kim, et al. (2001). "Constitutively activating mutation in WASP causes X-linked severe congenital neutropenia." Nat Genet **27**(3): 313-7.
- Donahue, R. E., B. P. Sorrentino, et al. (2001). "Fibronectin fragment CH-296 inhibits apoptosis and enhances ex vivo gene transfer by murine retrovirus and human lentivirus vectors independent of viral tropism in nonhuman primate CD34+ cells." Mol Ther **3**(3): 359-67.
- Donello, J. E., J. E. Loeb, et al. (1998). "Woodchuck hepatitis virus contains a tripartite posttranscriptional regulatory element." J Virol **72**(6): 5085-92.
- Dupre, L., A. Aiuti, et al. (2002). "Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates lipid raft dynamics during immunological synapse formation." Immunity **17**(2): 157-66.
- Dupuis-Girod, S., J. Medioni, et al. (2003). "Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients." Pediatrics **111**(5 Pt 1): e622-7.
- Eckfeldt, C. E., E. M. Mendenhall, et al. (2005). "The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(9): 726-37.
- Emery, D. W., E. Yannaki, et al. (2002). "Development of virus vectors for gene therapy of beta chain hemoglobinopathies: flanking with a chromatin insulator reduces gamma-globin gene silencing in vivo." Blood **100**(6): 2012-9.
- Emery, D. W., E. Yannaki, et al. (2000). "A chromatin insulator protects retrovirus vectors from chromosomal position effects." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(16): 9150-5.
- Fehse, B., A. Richters, et al. (2000). "CD34 splice variant: an attractive marker for selection of gene-modified cells." Mol Ther **1**(5 Pt 1): 448-56.
- Filipovich, A. H., J. V. Stone, et al. (2001). "Impact of donor type on outcome of bone marrow transplantation for Wiskott-Aldrich syndrome: collaborative study of the International Bone Marrow Transplant Registry and the National Marrow Donor Program." Blood **97**(6): 1598-603.

- Friedman, A. D., J. R. Keefer, et al. (2003). "Regulation of granulocyte and monocyte differentiation by CCAAT/enhancer binding protein alpha." Blood Cells Mol Dis **31**(3): 338-41.
- Friedmann, T. a. R., R. (1972). "Gene therapy for human genetic disease?" Science **175**: 949-955.
- Furger, A., J. Monks, et al. (2001). "The retroviruses human immunodeficiency virus type 1 and Moloney murine leukemia virus adopt radically different strategies to regulate promoter-proximal polyadenylation." J Virol **75**(23): 11735-46.
- Gallego, M. D., M. Santamaria, et al. (1997). "Defective actin reorganization and polymerization of Wiskott-Aldrich T cells in response to CD3-mediated stimulation." Blood **90**(8): 3089-97.
- Gimeno, R., K. Weijer, et al. (2004). "Monitoring the effect of gene silencing by RNA interference in human CD34+ cells injected into newborn RAG2-/- gammac-/- mice: functional inactivation of p53 in developing T cells." Blood **104**(13): 3886-93.
- Glimm, H. and C. J. Eaves (1999). "Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture." Blood **94**(7): 2161-8.
- Glimm, H., K. Flugge, et al. (1998). "Efficient serum-free retroviral gene transfer into primitive human hematopoietic progenitor cells by a defined, high-titer, nonconcentrated vector-containing medium." Hum Gene Ther **9**(6): 771-8.
- Gluckman, E., V. Rocha, et al. (1997). "Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group." N Engl J Med **337**(6): 373-81.
- Gonda, T. J. (1998). "The c-Myb oncoprotein." Int J Biochem Cell Biol **30**(5): 547-51.
- Greer, W. L., A. Shehabeldin, et al. (1996). "Identification of WASP mutations, mutation hotspots and genotype-phenotype disparities in 24 patients with the Wiskott-Aldrich syndrome." Hum Genet **98**(6): 685-90.
- Hacein-Bey-Abina, S., A. Fischer, et al. (2002). "Gene therapy of X-linked severe combined immunodeficiency." Int J Hematol **76**(4): 295-8.
- Hacein-Bey-Abina, S., F. Le Deist, et al. (2002). "Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy." N Engl J Med **346**(16): 1185-93.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, et al. (2003). "LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1." Science **302**(5644): 415-9.
- Hagemann, T. L. and S. P. Kwan (1999). "The identification and characterization of two promoters and the complete genomic sequence for the Wiskott-Aldrich syndrome gene." Biochem Biophys Res Commun **256**(1): 104-9.
- Heim, D. A., Y. Hanazono, et al. (2000). "Introduction of a xenogeneic gene via hematopoietic stem cells leads to specific tolerance in a rhesus monkey model." Mol Ther **1**(6): 533-44.
- Hirsch, V. M. and J. D. Lifson (2000). "Simian immunodeficiency virus infection of monkeys as a model system for the study of AIDS pathogenesis, treatment, and prevention." Adv Pharmacol **49**: 437-77.
- Hlavaty, J., M. Schittmayer, et al. (2005). "Effect of posttranscriptional regulatory elements on transgene expression and virus production in the context of retrovirus vectors." Virology **341**(1): 1-11.

- Hlavaty, J., A. Stracke, et al. (2004). "Multiple modifications allow high-titer production of retroviral vectors carrying heterologous regulatory elements." J Virol **78**(3): 1384-92.
- Humblet-Baron, S., B. Sather, et al. (2007). "Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for regulatory T cell homeostasis." J Clin Invest **117**(2): 407-18.
- Imai, K., T. Morio, et al. (2004). "Clinical course of patients with WASP gene mutations." Blood **103**(2): 456-64.
- Iwasaki, H., C. Somoza, et al. (2005). "Distinctive and indispensable roles of PU.1 in maintenance of hematopoietic stem cells and their differentiation." Blood **106**(5): 1590-600.
- Jaffredo, T., W. Nottingham, et al. (2005). "From hemangioblast to hematopoietic stem cell: an endothelial connection?" Exp Hematol **33**(9): 1029-40.
- Jetmore, A., P. A. Plett, et al. (2002). "Homing efficiency, cell cycle kinetics, and survival of quiescent and cycling human CD34(+) cells transplanted into conditioned NOD/SCID recipients." Blood **99**(5): 1585-93.
- Jones, G. E., D. Zicha, et al. (2002). "Restoration of podosomes and chemotaxis in Wiskott-Aldrich syndrome macrophages following induced expression of WASp." Int J Biochem Cell Biol **34**(7): 806-15.
- Kang, E., N. Giri, et al. (2001). "In vivo persistence of retrovirally transduced murine long-term repopulating cells is not limited by expression of foreign gene products in the fully or minimally myeloablated setting." Hum Gene Ther **12**(13): 1663-72.
- Kapoor, N., G. Crooks, et al. (1998). "Hematopoietic stem cell transplantation for primary lymphoid immunodeficiencies." Semin Hematol **35**(4): 346-53.
- Karanu, F. N., B. Murdoch, et al. (2000). "The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells." J Exp Med **192**(9): 1365-72.
- Kay, M. A., J. C. Glorioso, et al. (2001). "Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics." Nat Med **7**(1): 33-40.
- Khoury, M., P. Bigey, et al. (2006). "A comparative study on intra-articular versus systemic gene electrotransfer in experimental arthritis." J Gene Med **8**(8): 1027-36.
- Khoury, M., P. Louis-Pence, et al. (2006). "Efficient new cationic liposome formulation for systemic delivery of small interfering RNA silencing tumor necrosis factor alpha in experimental arthritis." Arthritis Rheum **54**(6): 1867-77.
- Kiem, H. P., R. G. Andrews, et al. (1998). "Improved gene transfer into baboon marrow repopulating cells using recombinant human fibronectin fragment CH-296 in combination with interleukin-6, stem cell factor, FLT-3 ligand, and megakaryocyte growth and development factor." Blood **92**(6): 1878-86.
- Klein, C., D. Nguyen, et al. (2003). "Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice." Blood **101**(6): 2159-66.
- Kondo, M., D. C. Scherer, et al. (2000). "Cell-fate conversion of lymphoid-committed progenitors by instructive actions of cytokines." Nature **407**(6802): 383-6.
- Kondo, M., I. L. Weissman, et al. (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." Cell **91**(5): 661-72.
- Kootstra, N. A., B. M. Zwart, et al. (2000). "Diminished human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription and nuclear transport in primary macrophages arrested in early G(1) phase of the cell cycle." J Virol **74**(4): 1712-7.

- Korin, Y. D. and J. A. Zack (1998). "Progression to the G1b phase of the cell cycle is required for completion of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription in T cells." J Virol **72**(4): 3161-8.
- Krosil, J., S. Baban, et al. (1998). "Cellular proliferation and transformation induced by HOXB4 and HOXB3 proteins involves cooperation with PBX1." Oncogene **16**(26): 3403-12.
- Kumano, K., S. Chiba, et al. (2001). "Notch1 inhibits differentiation of hematopoietic cells by sustaining GATA-2 expression." Blood **98**(12): 3283-9.
- Kurre, P., J. Morris, et al. (2001). "Gene transfer into baboon repopulating cells: A comparison of Flt-3 Ligand and megakaryocyte growth and development factor versus IL-3 during ex vivo transduction." Mol Ther **3**(6): 920-7.
- Kurtzberg, J., M. Laughlin, et al. (1996). "Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients." N Engl J Med **335**(3): 157-66.
- Lagasse, E., H. Connors, et al. (2000). "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." Nat Med **6**(11): 1229-34.
- Lenarsky, C. and R. Parkman (1990). "Bone marrow transplantation for the treatment of immune deficiency states." Bone Marrow Transplant **6**(6): 361-9.
- Leung, W., M. Ramirez, et al. (1998). "In vivo engraftment potential of clinical hematopoietic grafts." J Investig Med **46**(6): 303-11.
- Lewis, P., M. Hensel, et al. (1992). "Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle." Embo J **11**(8): 3053-8.
- Linder, S., D. Nelson, et al. (1999). "Wiskott-Aldrich syndrome protein regulates podosomes in primary human macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(17): 9648-53.
- Liu, H., J. R. Keefer, et al. (2003). "Reciprocal effects of C/EBPalpha and PKCdelta on JunB expression and monocytic differentiation depend upon the C/EBPalpha basic region." Blood **101**(10): 3885-92.
- Maatta, A. M., S. Korja, et al. (2006). "Transcriptional targeting of virus-mediated gene transfer by the human hexokinase II promoter." Int J Mol Med **18**(5): 901-8.
- Maillard, M. H., V. Cotta-de-Almeida, et al. (2007). "The Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for the function of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells." J Exp Med **204**(2): 381-91.
- Marangoni, F., S. Trifari, et al. (2007). "WASP regulates suppressor activity of human and murine CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) natural regulatory T cells." J Exp Med **204**(2): 369-80.
- Martin, F., J. Kupsch, et al. (1998). "Retroviral vector targeting to melanoma cells by single-chain antibody incorporation in envelope." Hum Gene Ther **9**(5): 737-46.
- Martin, F., S. Neil, et al. (1999). "Retrovirus targeting by tropism restriction to melanoma cells." J Virol **73**(8): 6923-9.
- Martin, F., M. G. Toscano, et al. (2005). "Lentiviral vectors transcriptionally targeted to hematopoietic cells by WASP gene proximal promoter sequences." Gene Ther **12**(8): 715-23.
- Marx, J. (2006). "Cell biology. Podosomes and invadopodia help mobile cells step lively." Science **312**(5782): 1868-9.
- Mastroiannopoulos, N. P., M. L. Feldman, et al. (2005). "Woodchuck post-transcriptional element induces nuclear export of myotonic dystrophy 3' untranslated region transcripts." EMBO Rep **6**(5): 458-63.
- Mayani, H. and P. M. Lansdorp (1998). "Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells." Stem Cells **16**(3): 153-65.

- Meinl, E. and R. Hohlfeld (2000). "T cell transformation with Herpesvirus saimiri: a tool for neuroimmunological research." J Neuroimmunol **103**(1): 1-7.
- Meinl, E., R. Hohlfeld, et al. (1995). "Immortalization of human T cells by Herpesvirus saimiri." Immunol Today **16**(2): 55-8.
- Micucci, F., A. Zingoni, et al. (2006). "High-efficient lentiviral vector-mediated gene transfer into primary human NK cells." Exp Hematol **34**(10): 1344-52.
- Miller, D. G., M. A. Adam, et al. (1990). "Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection." Mol Cell Biol **10**(8): 4239-42.
- Molina, I. J., D. M. Kenney, et al. (1992). "T cell lines characterize events in the pathogenesis of the Wiskott-Aldrich syndrome." J Exp Med **176**(3): 867-74.
- Molina, I. J., J. Sancho, et al. (1993). "T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative responses." J Immunol **151**(8): 4383-90.
- Moreau-Gaudry, F., P. Xia, et al. (2001). "High-level erythroid-specific gene expression in primary human and murine hematopoietic cells with self-inactivating lentiviral vectors." Blood **98**(9): 2664-72.
- Morgan, R. A., M. E. Dudley, et al. (2006). "Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes." Science **314**(5796): 126-9.
- Moritz, T., V. P. Patel, et al. (1994). "Bone marrow extracellular matrix molecules improve gene transfer into human hematopoietic cells via retroviral vectors." J Clin Invest **93**(4): 1451-7.
- Muller, H. P. and H. E. Varmus (1994). "DNA bending creates favored sites for retroviral integration: an explanation for preferred insertion sites in nucleosomes." Embo J **13**(19): 4704-14.
- Murga, M., L. Yao, et al. (2004). "Derivation of endothelial cells from CD34- umbilical cord blood." Stem Cells **22**(3): 385-95.
- Naldini, L., U. Blomer, et al. (1996). "In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector." Science **272**(5259): 263-7.
- Neil, S., F. Martin, et al. (2001). "Postentry restriction to human immunodeficiency virus-based vector transduction in human monocytes." J Virol **75**(12): 5448-56.
- Notarangelo, L. D. and H. D. Ochs (2003). "Wiskott-Aldrich Syndrome: a model for defective actin reorganization, cell trafficking and synapse formation." Curr Opin Immunol **15**(5): 585-91.
- Oda, A. and H. D. Ochs (2000). "Wiskott-Aldrich syndrome protein and platelets." Immunol Rev **178**: 111-7.
- Orkin, S. H. and L. I. Zon (2002). "Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity." Nat Immunol **3**(4): 323-8.
- Ott, M. G., M. Schmidt, et al. (2006). "Correction of X-linked chronic granulomatous disease by gene therapy, augmented by insertional activation of MDS1-EV11, PRDM16 or SETBP1." Nat Med **12**(4): 401-9.
- Pacheco-Castro, A., C. Marquez, et al. (1996). "Herpesvirus saimiri immortalization of alpha beta and gamma delta human T-lineage cells derived from CD34+ intrathymic precursors in vitro." Int Immunol **8**(11): 1797-805.
- Park, J. Y., A. Shcherbina, et al. (2005). "Phenotypic perturbation of B cells in the Wiskott-Aldrich syndrome." Clin Exp Immunol **139**(2): 297-305.
- Parkman, R., J. Rapoport, et al. (1978). "Complete correction of the Wiskott-Aldrich syndrome by allogeneic bone-marrow transplantation." N Engl J Med **298**(17): 921-7.

- Parolini, O., S. Berardelli, et al. (1997). "Expression of Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene during hematopoietic differentiation." Blood **90**(1): 70-5.
- Pawliuk, R., K. A. Westerman, et al. (2001). "Correction of sickle cell disease in transgenic mouse models by gene therapy." Science **294**(5550): 2368-71.
- Petrella, A., I. Doti, et al. (1998). "A 5' regulatory sequence containing two Ets motifs controls the expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) gene in human hematopoietic cells." Blood **91**(12): 4554-60.
- Petzer, A. L., P. W. Zandstra, et al. (1996). "Differential cytokine effects on primitive (CD34+CD38-) human hematopoietic cells: novel responses to Flt3-ligand and thrombopoietin." J Exp Med **183**(6): 2551-8.
- Plank, C., M. Anton, et al. (2003). "Enhancing and targeting nucleic acid delivery by magnetic force." Expert Opin Biol Ther **3**(5): 745-58.
- Plank, C., B. Oberhauser, et al. (1994). "The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems." J Biol Chem **269**(17): 12918-24.
- Plank, C., F. Scherer, et al. (2003). "Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery with superparamagnetic nanoparticles and magnetic fields." J Liposome Res **13**(1): 29-32.
- Potteaux, S., V. Deleuze, et al. (2006). "In vivo electrotransfer of interleukin-10 cDNA prevents endothelial upregulation of activated NF-kappaB and adhesion molecules following an atherogenic diet." Eur Cytokine Netw **17**(1): 13-8.
- Richard, E., M. Mendez, et al. (2001). "Gene therapy of a mouse model of protoporphyria with a self-inactivating erythroid-specific lentiviral vector without preselection." Mol Ther **4**(4): 331-8.
- Rideout, W. M., 3rd, K. Hochedlinger, et al. (2002). "Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy." Cell **109**(1): 17-27.
- Robert-Richard, E., E. Richard, et al. (2007). "Murine Retroviral but not Human Cellular Promoters Induce In Vivo Erythroid-specific Deregulation that can be Partially Prevented by Insulators." Mol Ther **15**(1): 173-82.
- Rocha, V., J. Cornish, et al. (2001). "Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia." Blood **97**(10): 2962-71.
- Roe, T., T. C. Reynolds, et al. (1993). "Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis." Embo J **12**(5): 2099-108.
- Rosenzweig, M., M. Connole, et al. (2001). "Induction of cytotoxic T lymphocyte and antibody responses to enhanced green fluorescent protein following transplantation of transduced CD34(+) hematopoietic cells." Blood **97**(7): 1951-9.
- Royer-Pokora, B., U. Loos, et al. (1991). "TTG-2, a new gene encoding a cysteine-rich protein with the LIM motif, is overexpressed in acute T-cell leukaemia with the t(11;14)(p13;q11)." Oncogene **6**(10): 1887-93.
- Sasahara, Y., R. Rachid, et al. (2002). "Mechanism of recruitment of WASP to the immunological synapse and of its activation following TCR ligation." Mol Cell **10**(6): 1269-81.
- Schambach, A., J. Bohne, et al. (2005). "Equal potency of gammaretroviral and lentiviral SIN vectors for expression of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in hematopoietic cells." Mol Ther.
- Schmidt, M., P. Zickler, et al. (2002). "Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model." Blood **100**(8): 2737-43.

- Schroder, A. R., P. Shinn, et al. (2002). "HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots." Cell **110**(4): 521-9.
- Shcherbina, A., F. S. Rosen, et al. (1999). "WASP levels in platelets and lymphocytes of wiskott-aldrich syndrome patients correlate with cell dysfunction." J Immunol **163**(11): 6314-20.
- Snapper, S. B., F. S. Rosen, et al. (1998). "Wiskott-Aldrich syndrome protein-deficient mice reveal a role for WASP in T but not B cell activation." Immunity **9**(1): 81-91.
- Sperger, J. M., X. Chen, et al. (2003). "Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13350-5.
- Stewart, D. M., S. Treiber-Held, et al. (1996). "Studies of the expression of the Wiskott-Aldrich syndrome protein." J Clin Invest **97**(11): 2627-34.
- Sutton, R. E., M. J. Reitsma, et al. (1999). "Transduction of human progenitor hematopoietic stem cells by human immunodeficiency virus type 1-based vectors is cell cycle dependent." J Virol **73**(5): 3649-60.
- Takatoku, M., S. Sellers, et al. (2001). "Avoidance of stimulation improves engraftment of cultured and retrovirally transduced hematopoietic cells in primates." J Clin Invest **108**(3): 447-55.
- Takenawa, T. and H. Miki (2001). "WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement." J Cell Sci **114**(Pt 10): 1801-9.
- Thrasher, A. J. (2002). "WASp in immune-system organization and function." Nat Rev Immunol **2**(9): 635-46.
- Thrasher, A. J., G. E. Jones, et al. (1998). "Is Wiskott--Aldrich syndrome a cell trafficking disorder?" Immunol Today **19**(12): 537-9.
- Tomita, Y., A. Khan, et al. (1994). "Role of intrathymic clonal deletion and peripheral energy in transplantation tolerance induced by bone marrow transplantation in mice conditioned with a nonmyeloablative regimen." J Immunol **153**(3): 1087-98.
- Toscano, M. G., C. Frecha, et al. (2007). "Hematopoietic-Specific Lentiviral Vectors for Wiskott-Aldrich Syndrome Gene Therapy: Analysis of the Potential Safety Benefits." Gene Therapy Submitted for publication.
- Toscano, M. G., C. Frecha, et al. (2004). "Efficient lentiviral transduction of Herpesvirus saimiri immortalized T cells as a model for gene therapy in primary immunodeficiencies." Gene Ther **11**(12): 956-61.
- Traggiai, E., L. Chicha, et al. (2004). "Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice." Science **304**(5667): 104-7.
- Varnum-Finney, B., L. Wu, et al. (2000). "Immobilization of Notch ligand, Delta-1, is required for induction of notch signaling." J Cell Sci **113 Pt 23**: 4313-8.
- Varnum-Finney, B., L. Xu, et al. (2000). "Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling." Nat Med **6**(11): 1278-81.
- Vassilopoulos, G., P. R. Wang, et al. (2003). "Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion." Nature **422**(6934): 901-4.
- Verfaillie, C. M. (2002). "Hematopoietic stem cells for transplantation." Nat Immunol **3**(4): 314-7.
- Verhoeven, E. and F. L. Cosset (2004). "Surface-engineering of lentiviral vectors." J Gene Med **6 Suppl 1**: S83-94.

- Verhoeyen, E., V. Dardalhon, et al. (2003). "IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes." Blood **101**(6): 2167-74.
- Verhoeyen, E., M. Wiznerowicz, et al. (2005). "Novel lentiviral vectors displaying "early-acting cytokines" selectively promote survival and transduction of NOD/SCID repopulating human hematopoietic stem cells." Blood **106**(10): 3386-95.
- Vigna, E. and L. Naldini (2000). "Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy." J Gene Med **2**(5): 308-16.
- Wada, T., G. J. Jagadeesh, et al. (2002). "Retrovirus-mediated WASP gene transfer corrects Wiskott-Aldrich syndrome T-cell dysfunction." Hum Gene Ther **13**(9): 1039-46.
- Wagner, J. E., J. N. Barker, et al. (2002). "Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival." Blood **100**(5): 1611-8.
- Weinberg, J. B., T. J. Matthews, et al. (1991). "Productive human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection of nonproliferating human monocytes." J Exp Med **174**(6): 1477-82.
- Weiss, R. A. (1993). "Cellular receptors and viral glycoproteins involved in retroviral entry." Plenum Press, New York. **2**.
- Woods, N. B., A. Muessig, et al. (2003). "Lentiviral vector transduction of NOD/SCID repopulating cells results in multiple vector integrations per transduced cell: risk of insertional mutagenesis." Blood **101**(4): 1284-9.
- Zack, J. A. (1995). "The role of the cell cycle in HIV-1 infection." Adv Exp Med Biol **374**: 27-31.
- Zaiss, A. K., S. Son, et al. (2002). "RNA 3' readthrough of oncoretrovirus and lentivirus: implications for vector safety and efficacy." J Virol **76**(14): 7209-19.
- Zandstra, P. W., D. A. Lauffenburger, et al. (2000). "A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis." Blood **96**(4): 1215-22.
- Zeng, R., J. L. Cannon, et al. (2003). "SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site." J Immunol **171**(3): 1360-8.
- Zicha, D., W. E. Allen, et al. (1998). "Chemotaxis of macrophages is abolished in the Wiskott-Aldrich syndrome." Br J Haematol **101**(4): 659-65.